



---

---

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Revertante de la cepa mutante de la leucín  
aminopeptidasa yspII  
y análisis bioinformático del microarreglo de  
*Schizosaccharomyces pombe***

Tesis presentada para obtener el título de:

**Maestría en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Biól. GETULIO FLORES TLALPA**

**Directora de Tesis**

**Dra. Irma Herrera Camacho**

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.  
CQ-ICUAP.

Junio de 2018

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS E INSTITUCIONALES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la BUAP, bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho.

El estudio del fenotipo de las cepas por fluorescencia se realizó con un Microscopio invertido de contraste de fases del Laboratorio de Interacción Bacteria Planta, del Centro de Ciencias Microbiológicas del ICUAP BUAP, México, con el asesoramiento del Dr. Alberto Ramírez Mata a quien agradecemos su apoyo académico y disposición de tiempo.

Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo responsable de la Unidad de Microarreglos de ADN del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, México. Así como también a los integrantes de dicha unidad, Q.F.P. Lorena Chávez González, M en I.B.B. Simón Guzmán León y Dr. José Luis Santillán torres por su ayuda con el proceso de los microarreglos de ADN.

Un reconocimiento especial a la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta por su apoyo académico y técnico a lo largo del desarrollo de esta tesis.

### **Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, el cual fue apoyado financieramente por:**

- Programa de apoyo a Proyectos de Investigación VIEP-BUAP.  
Proyectos: HECI-NAT 2016, 2017 y 2018
- Redes Temáticas-PROMEP-SEP-BUAP.  
CA: Bioquímica y Biología Molecular.  
Proyecto: 2015-2017.
- Apoyo a Proyectos registrados del ICUAP (2016-2018)

### **Para la realización de este trabajo agradezco el apoyo en becas de:**

- Beca CONACYT 2016-2017 (CVU 744943).
- Beca de término VIEP-BUAP, abril y junio 2018.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	1
LISTA DE TABLAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1. Proteólisis.....	9
1.2. Proteasas .....	11
1.2.1. Clasificación.....	11
1.2.2. Mecanismo .....	12
1.3. Sistemas proteolíticos .....	15
1.3.1. Sistema lisosomal .....	15
1.3.2. Sistema citosólico.....	16
1.4. Leucín aminopeptidasas (LAPs) .....	18
1.5. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	20
1.5.1. Características generales.....	20
1.5.2. Sistema proteolítico de <i>S. pombe</i> .....	23
2. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS .....	35
5.1. Objetivo general.....	35
5.2. Objetivos específicos .....	35
6. METODOLOGÍA .....	36
6.1. Esquema de trabajo .....	36
6.2. Material y reactivos .....	37
6.3. Material biológico.....	37
6.4. Vectores utilizados .....	38
6.4.1. pJET1.2/Blunt.....	38
6.4.2. pRSP.....	39

6.5. Diseño de iniciadores para la reversión .....	40
6.6 Extracción de ADN cromosómico de levaduras.....	42
6.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) .....	43
6.8. Purificación de banda a partir de gel de agarosa.....	44
6.9. Ligación de secuencias linealizadas a vectores.....	45
6.9.1. Ligación a pJET1.2/Blunt .....	46
6.9.2. Ligación a pRSP.....	47
6.10. Transformación de bacterias .....	48
6.11. Extracción de ADN plasmídico de bacterias.....	50
6.12. Transformación de levaduras .....	52
6.13. Obtención de extracto celular soluble .....	53
6.14. Determinación de proteínas totales .....	54
6.15. Determinación de la actividad enzimática .....	56
6.16. Sincronización celular en fase G1 mediante inanición de nitrógeno .....	59
6.17. Cinética de crecimiento .....	60
6.18. Determinación de viabilidad celular .....	61
6.19. Fijación celular mediante formaldehído .....	61
6.20. Tinción con fluoróforos (DAPI y FM 4-64) .....	61
6.21. Ensayo de microarreglo da ADN.....	63
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	66
7.1. Obtención del vector de reversión pRSP-ape2T.....	66
7.1.1. Amplificación y purificación del gen <i>ape2</i> .....	67
7.1.2. Resguardo del amplicón <i>ape2T</i> en el vector pJET1.2/Blunt.....	69
7.1.3. Verificación de la construcción pJET-ape2T mediante restricción por endonucleasas .....	70
7.1.4. Purificación del inserto <i>ape2T</i> .....	72
7.1.5. Purificación del vector de levaduras pRSP .....	72
7.1.6. Construcción del vector de reversión pRSP-ape2T .....	74
7.2. Obtención de la cepa revertante de <i>S. pombe</i> 4XΔape2Rev .....	76
7.2.1. Transformación de la cepa 4XΔape2 con el vector pRSP-ape2T.....	76
7.2.2. Identificación de las clonas revertantes 4XΔape2Rev .....	77
7.3. Caracterización fenotípica de la cepa revertante 4XΔape2Rev .....	79

7.3.1. Cinética de crecimiento celular en medio mineral .....	79
7.3.1.1. Sincronización de cultivos mediante arresto en fase G1 por inanición de nitrógeno .....	79
7.3.1.2. Cinética de crecimiento de la cepa 4XΔape2Rev y controles .....	81
7.3.2. Actividad enzimática de la LAP yspII en la cepa revertante .....	86
7.3.3. Viabilidad celular de la cepa revertante durante el crecimiento celular.....	88
7.3.4. Fenotipo de la cepa revertante 4XΔape2Rev por microscopía de fluorescencia (DAPI y FM 4-64) .....	92
7.4. Análisis bioinformático del microarreglo de <i>S. pombe</i> con la cepa mutante 4XΔape2 y 4X como control. ....	104
7.4.1. Depuración de datos y prueba Z-Score .....	104
7.4.2. Análisis de los genes en la plataforma en línea DAVID .....	106
7.4.3. Rutas de señalización modificadas por la interrupción del gen <i>ape2</i> .....	108
7.4.3.1. Genes que disminuyen su expresión .....	108
7.4.3.2. Genes que aumentan su expresión .....	115
8. CONCLUSIONES.....	120
9. PERSPECTIVAS.....	122
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	123
11. ANEXOS .....	134

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólisis de un enlace peptídico.	13
Figura 2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	20
Figura 3. Filogenia de hongos.	21
Figura 4. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i> .	22
Figura 5. Cinética enzimática con Mn <sup>2+</sup> .	25
Figura 6. Modelado <i>in silico</i> de la LAP yspII.	27
Figura 7. Construcción interruptora.	28
Figura 8. Esquema general de la interrupción.	29
Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa 4XΔape2 y 4X como control.	30
Figura 10. Curva de viabilidad celular durante la cinética de crecimiento.	31
Figura 11. Fenotipo de la cepa mutante 4XΔape2 en la fase final de crecimiento.	32
Figura 12. Esquema del vector pJET1.2/Blunt en una conformación cerrada.	38
Figura 13. Esquema del vector de expresión pRSP.	40
Figura 14. Posicionamiento de los iniciadores RevG en el contexto del gen <i>ape2</i> .	41
Figura 15. Representación esquemática del gen <i>ape2</i> .	67
Figura 16. Amplicon <i>ape2</i> T (gen <i>ape2</i> completo).	68
Figura 17. Purificación de la banda del amplicón <i>ape2</i> T.	69
Figura 18. Verificación del vector pJET- <i>ape2</i> T.	71
Figura 19. Purificación del inserto <i>ape2</i> T y el vector pRSP.	73
Figura 20. Vector de reversión pRSP- <i>ape2</i> T.	75
Figura 21. Posibles clonas revertantes 4XΔape2Rev.	77

Figura 22. Actividad enzimática de la LAP yspII de las 16 clonas revertantes 4X $\Delta$ ape2Rev.	78
Figura 23. Arresto celular en la fase G1.	80
Figura 24. Cinéticas de crecimiento celular.	83
Figura 25. Cinéticas de crecimiento ajustadas al modelo de Monod.	85
Figura 26. Actividad leucín aminopeptidasa de la LAP yspII.	87
Figura 27. Viabilidad celular durante el crecimiento.	90
Figura 28. Comparación de viabilidad de la cepa revertante con el control y mutante	91
Figura 29. Cepa control 4X con 32 horas de crecimiento celular.	93
Figura 30. Cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 con 32 horas de crecimiento celular.	94
Figura 31 Cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con 32 horas de crecimiento celular.	95
Figura 32 Cepa 4X con 36 horas de crecimiento celular.	96
Figura 33. Cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 con 36 horas de crecimiento celular.	98
Figura 34. Cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con 36 horas de crecimiento celular.	99
Figura 35. Cepa control 4X con 44 horas de crecimiento celular.	100
Figura 36. Cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 con 44 horas de crecimiento celular.	101
Figura 37. Cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con 44 horas crecimiento celular.	102
Figura 38. Análisis estadístico y prueba Z-Score del microarreglo.	105
Figura 39. Genes con cambios significativos de expresión con un Z-Score $\geq 2$ .	106
Figura 40. Interacciones del complejo estabilizador.	109
Figura 41. Esquema de la protección de Sgo2 a la cohesión entre ADN y Rec8.	111

Figura 42. Presencia de Rec8 en los centrómeros de diferentes cepas mutantes.	112
Figura 43. Esquema que muestra el agrupamiento de Mis14 con el complejo NMS.	113
Figura 44. Efecto de la ausencia de proteínas Mis del cinetocoro sobre la compactación y estabilidad del centrómero.	113
Figura 45. Localización de las proteínas Mis.	114
Figura 46. Representación esquemática del proteosoma de <i>S. pombe</i> .	115
Figura 47. Desregulación de los microtúbulos.	116
Figura 48. Regulación de la compactación de la cromatina por el proteosoma.	118

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Elementos característicos de las familias y letras con las que se nombran.	12
Tabla 2. Microorganismos usados en el presente trabajo.	37
Tabla 3. Iniciadores para la amplificación del gen <i>ape2</i> con su promotor ( <i>ape2T</i> ).	41
Tabla 4. Condiciones de la PCR.	44
Tabla 5. Parámetros cinéticos.	85

## ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AOX1	Alcohol oxidasa 1
ATP	Adenin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bobina
CDS	Secuencia codificante de ADN
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
h	hora
LAP	Leucín aminopeptidasa
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-4000	Polietilenglicol
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
siRNA	ARN de interferencia
UA	Unidades de absorbancia
UTR	Región no traducible

## RESUMEN

La familia de proteasas M17 está integrada por leucín aminopeptidasas (LAP), son exopeptidasas que usan metales divalentes como zinc, manganeso o cobalto como cofactor, han sido descritas en organismos procariontes y eucariontes, llevando a cabo funciones diversas, en cada organismo, como factor de virulencia, regulador metabólico, regulador de progresión de cáncer en humano, entre otras. En el organismo modelo *Schizosaccharomyces pombe* se describió en 2007 la LAP yspII (yeast *Schizosaccharomyces pombe* II), es una enzima básica dependiente de manganeso, el gen que la codifica se denomina *ape2* ubicado en el cromosoma I, hidroliza leucina del extremo N-terminal, tiene una conformación homohexamérica de 320 KDa compuesta por monómeros de 54 KDa. La función de esta enzima no ha sido clarificada, en estudios previos, mediante la interrupción del gen *ape2* se obtuvo una cepa que no expresa a la LAP yspII, se observó una disminución en su velocidad de crecimiento, así como disminución de la viabilidad celular, también se apreció la presencia de células con una distribución anormal del material genético durante la división celular, estos resultados apuntan a que la función de la LAP yspII está relacionada con la regulación de procesos del ciclo celular y la mitosis.

El objetivo de este trabajo fue el de revertir los efectos fenotípicos causados por la interrupción del gen *ape2* en la cepa mutante 4X $\Delta$ *ape2*, mediante la reincorporación del gen completo a través del plásmido pRSP en la cepa mutante y llevar a cabo un análisis bioinformático de un microarreglo de 4000 genes de *S. pombe*, para determinar los genes que cambian su expresión y los procesos de señalización y metabólicos que se ven afectados, especialmente los que tengan que ver con la regulación de la mitosis y la segregación de cromátidas hermanas.

Se obtuvo la construcción de reversión pRSP-*ape2* de 11863 pb, que incluye el promotor, UTRs y CDS del gen *ape2*, elementos necesarios para la expresión de la LAP yspII, cuya expresión está regulada por el promotor nativo. El comportamiento cinético de la cepa revertante 4X $\Delta$ *ape2*Rev se recuperó, siendo los parámetros cinéticos tales como velocidad máxima, DO máxima y tiempo de duplicación estadísticamente iguales a las de la cepa control 4X. Se recuperó la viabilidad celular en la cepa revertante, así como la actividad de leucín aminopeptidasa. En lo que respecta a la distribución del material genético durante la división celular se llevaron a cabo tinciones con DAPI y FM 4-64 de células fijadas con formaldehído de las cepas 4X como control, 4X $\Delta$ *ape2* y la revertante 4X $\Delta$ *ape2*Rev. Se observó de nueva cuenta una repartición desigual del material genético en la cepa mutante, además de la aparición de aglomeraciones citoplasmáticas que no habían sido descritas antes, una compactación amorfa de los cromosomas y células de formas no cilíndricas. Estos efectos son apreciables después de las 32 horas de crecimiento que representa el final de la fase logarítmica y el inicio de la estacionaria, en la cepa revertante no se encontró evidencia de estos rasgos morfológicos durante la mencionada sección de la curva de crecimiento que abarca de las 32 a 44 horas de crecimiento. Con base en los resultados se confirmó que los efectos fenotípicos en la cepa mutante se deben a la ausencia de la LAP yspII, lo que apoya la idea de que esta enzima participa en el control de la mitosis y la segregación del material genético. Con respecto al ensayo de microarreglo se encontraron proteínas que disminuyeron su expresión y que están relacionados con la condensación y segregación de las cromátidas tales como Mis4, Mis14, Sgo2 y Cnp20. Las proteínas Rpn5 y  $\beta$ 5 (pts1) aumentaron su expresión, son parte del proteosoma 26S que regula el anclaje del uso cromático a los centrómeros, promueve la segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis y el cambio de metafase a anafase.

La LAP yspII parece estar involucrada en la regulación citoplasmática del ensamblaje del proteosoma, que a su vez participa en la regulación del cambio de fase en la mitosis, la segregación de las cromátidas hermanas y posiblemente en la modulación de la expresión de genes que intervienen en estos mismos procesos.

# 1. INTRODUCCIÓN

La célula es un claro y abrumador ejemplo de lo que representa la complejidad en todos los aspectos de esta; un sistema complejo cuya propiedad emergente más sobresaliente, es lo que concebimos como vida.

De todos los grupos de macromoléculas que conforman los sistemas vivos, las proteínas, son tal vez, el más sobresaliente; porque todo lo que caracteriza a un ser vivo y lo distingue de uno que no lo está, se encuentra siempre relacionado con la actividad o función de las proteínas.

Este grupo de biomoléculas es el más versátil y diverso [Luque-Guillen, 2015]. Dada esa versatilidad y a una gran abundancia en los seres vivos, están involucradas en todos los procesos celulares [Lehninger *et al.*, 2003]. Están presentes en la membrana tanto de manera estructural como funcional, son el fundamento del sistema inmune con el que interactuamos molecularmente con nuestro entorno, forman la base de macroestructuras como los músculos, se encargan del metabolismo de los ácidos nucleicos, llevan a cabo todas las vías de señalización celular y conforman su estructura física a través del citoesqueleto. Tanta es la presencia de las proteínas, que más de la mitad de la masa seca de un organismo se debe a ellas [Lodish *et al.*, 2016].

Dentro de las proteínas existe un grupo que sobresale por los alcances de su estructura y función, dada la estrecha relación que guardan, relación que pone en evidencia la línea que divide el mundo vivo del inerte, estas son las enzimas.

Dada la enorme cantidad de proteínas distintas que están presentes en la célula en un momento dado, se tiene una gran diversidad, en cuanto a la función que llevan a cabo, el tiempo de vida y la actividad catalítica que presentan; todas estas características son diferentes para cada una de las proteínas presentes. La célula es capaz de regular con gran precisión la función de cada proteína en los aspectos ya mencionados. La regulación se hace de tres formas principales. En primer lugar, la célula, puede aumentar o disminuir el nivel de una proteína en particular en su estado estacionario, alterando su velocidad de síntesis, de

degradación, o ambas. En segundo término, puede cambiar la actividad intrínseca, de un modo independiente de la cantidad de proteína; por medio de interacciones covalentes en los sustratos puede modificar su afinidad, o bien cambiando el tiempo en el que las proteínas están en su forma activa e inactiva. En tercer lugar, la célula puede hacer un cambio en la localización y la concentración de otras moléculas que intervienen en la actividad de la proteína en cuestión, ya sea activándola o inhibiéndola [Lodish *et al.*, 2016].

No solo se regula la función de las proteínas, también su concentración dependiendo de las necesidades de la célula, ya sea por el momento en el ciclo de vida, el estado de la célula, un estímulo externo o como respuesta a algún tipo de estrés. Retomando el primer punto del párrafo anterior, se dice que la célula es capaz de regular la cantidad de proteínas mediante el control de su síntesis y degradación, esto quiere decir que las proteínas al ser requeridas por la célula, se generan en la medida que se necesite y se degradan cuando ya no son necesarias con una velocidad que también es controlada [Lodish *et al.*, 2016]. Este juego entre la síntesis y la degradación de proteínas en función de los requerimientos celulares se conoce como recambio proteico, y podemos decir que funciona mediante el equilibrio de dos fenómenos, la expresión genética y la proteólisis.

En primer lugar, está la expresión genética. La definición más simple de gen dice, que es la “unidad de ADN que contiene la información para especificar la síntesis de una única cadena polipeptídica o ARNm funcional”. Los genes son también conocidos como la unidad mínima funcional de un genoma y se componen de dos partes esenciales, una región promotora o reguladora y una codificante. La región reguladora suele ser la más extensa y abarca secuencias tanto anteriores como posteriores a la región codificante (en el caso de procariontes). Generalmente resulta complicado definir en totalidad el promotor, si bien, existen secuencias consenso que se mantienen en la gran mayoría de los genes y elementos característicos con una función determinada, como la caja TATA y la caja GC. Existen elementos como los potenciadores, que son secuencias alejadas

de la región codificante capaces de aumentar la velocidad de síntesis considerablemente, pero que se encuentran muy alejados de la secuencia principal del gen, logrando interactuar con ella debido a la topología entramada de la eucromatina. Por otro lado, la región codificante suele estar más condensada dentro del genoma, generalmente es una secuencia consecutiva y sin interrupciones, presente en organismos tanto procariontes, archaeas y eucariontes; sin embargo, en estos últimos las regiones transcripcionales suelen incluir intrones, teniéndose que modificar o madurar el ARNm generando las cadenas polipeptídicas; de esta característica se obtienen las isoformas que puede adoptar una proteína, modificando así su estructura y función. Por otro lado, una vez traducido el ARNm a una cadena polipeptídica, esta pasará por un proceso de maduración donde las proteínas adquieren su conformación y demás modificaciones postraduccionales para ser moléculas activas [Lodish *et al.*, 2016].

La segunda parte que conforma el equilibrio del recambio proteico es la proteólisis, de la que se ahondará en la siguiente sección.

### **1.1. Proteólisis**

De manera simplista se puede entender a la proteólisis como la lisis de proteínas mediante la hidrólisis del enlace peptídico, llevado a cabo por enzimas que se denominan proteasas. La definición anterior se vuelve escasa al reducir el rompimiento del enlace peptídico con un fin solo de degradación, y no señalar las funciones reguladoras o de reestructuración que conlleva dicha hidrólisis.

La proteólisis entonces, es un mecanismo presente en todas las etapas de la vida celular, que regula la concentración de proteínas, forma parte de los procesos de control transcripcional, traduccional, de maduración y activación de las proteínas; formando así un equilibrio en cuanto a la producción y degradación de las mismas [Timer *et al.*, 2007]. La degradación por proteasas constituye el segundo proceso regulador que determina el nivel o concentración de una

proteína en algún momento dado del ciclo celular, además de ser un mecanismo fundamental para el control postraducciona [Holger *et al.*, 1999]. La degradación selectiva es de suma importancia para los organismos. Las macromoléculas están acompañadas de una secuencia o estructura que sirve como señal para el destino o función de esta. En el caso de la proteólisis las señalizaciones sirven para identificar las proteínas que serán degradadas [Lenk *et al.*, 2000]. Una de estas es la secuencia KEFRQ, presente en las proteínas citosólicas, esta, las envía al lisosoma frente a una disminución de nutrientes [Wilkinson *et al.*, 1999].

En las levaduras la ruta de envío del citoplasma a la vacuola (Ruta CTV) es la responsable de mantener los niveles de proteínas de vida media larga. En el citosol es el proteosoma el que se encarga de la degradación de proteínas, generalmente de vida media corta, que están señaladas con una unión a ubiquitina a través de residuos expuestos de lisina [Dice, 1999; Nutznert *et al.*, 2007].

Tomando en cuenta lo anterior, se puede entender a la proteólisis como un eje fundamental en la regulación de los procesos celulares, las enzimas que llevan a cabo el proceso son llamadas proteasas, cuyas características y mecanismos se discutirá con más detalle en la siguiente sección.

## **1.2. Proteasas**

Basándose en lo estipulado por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) las proteasas son enzimas que forman parte del grupo funcional de las hidrolasas (EC 3), que actúan sobre péptidos (proteínas) (EC 3.2) [IUBMB, abril 2018].

### **1.2.1. Clasificación**

De manera muy general las peptidasas se pueden clasificar de acuerdo al sitio sobre la cadena peptídica donde llevan a cabo la hidrólisis. La mayoría de las peptidasas son denominadas exopeptidasas, puesto que escinden uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal; un menor número de ellas son llamadas endopeptidasas, puesto que la hidrólisis del enlace se lleva a cabo en el interior de la cadena peptídica. Las exopeptidasas que liberan un solo aminoácido del extremo N-terminal son llamadas aminopeptidasas, si son dos a.a. dipeptidil-peptidasas, y cuando son tres a.a. tripeptidil-peptidasas. Cuando la escisión del a.a. se lleva a cabo en el extremo C-terminal se les nombra carboxipeptidasas [Barret *et al.*, 2004].

Por otro lado, las endopeptidasas son divididas con base en el mecanismo catalítico que las caracteriza en, aspártico-endopeptidasas, cisteín-endopeptidasas, metalo-endopeptidasas, serin-endopeptidasas y treonin-endopeptidasas. Finalmente se denominan oligopeptidasas a las endopeptidasas que actúan sobre sustratos más pequeños que las proteínas [Barret *et al.*, 2004].

Una manera más específica de clasificar a las peptidasas, es su agrupación en familias, además, esta clasificación es de uso universal. Las familias se nombran con la primera letra del aminoácido o elemento (metal) que siempre está presente en el sitio catalítico y que es indispensable para la actividad de la peptidasa, seguido de un número. Las familias son enlistadas en la tabla 1.

**Tabla 1. Elementos característicos de las familias y letras con las que se nombran.**

<b>Familia</b>	<b>Elemento característico</b>
<b>A</b>	Aspártico
<b>C</b>	Cisteína
<b>G</b>	Glutámico
<b>M</b>	Metal
<b>N</b>	Asparagina
<b>P</b>	Mezclado
<b>S</b>	Serina
<b>T</b>	Treonina
<b>U</b>	Desconocido

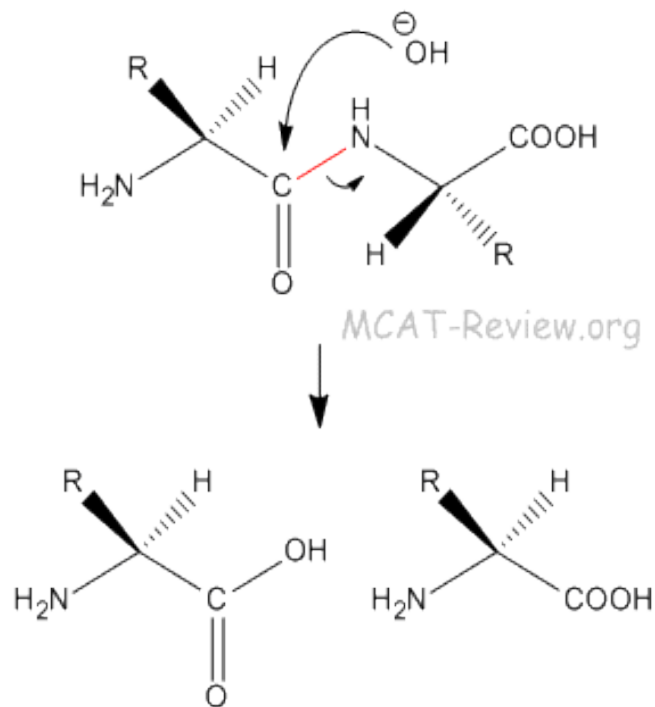
### **1.2.2. Mecanismo**

La proteólisis se basa en la hidrólisis de enlaces peptídicos. Básicamente se trata de un ataque nucleofílico al enlace peptídico mediante una molécula de agua. Este proceso en esencia, es el mismo para todas las peptidasas; sin embargo, existen algunas particularidades en la catálisis que pueden servir para agrupar dichos procesos catalíticos. Entre las características diferenciadoras, está el aminoácido que funciona como: puente en el ataque nucleofílico, o bien, los elementos metálicos que cumplen dicha función. Generalmente se toma como ejemplo el modelo de zinc, gracias a su capacidad de funcionar como átomo de coordinación y las diferentes conformaciones estructurales y espaciales que puede adoptar, así como su naturaleza anfotérica, lo que permite ejemplificar de forma general los mecanismos catalíticos [Barret *et al.*, 2004].

El aminoácido o el metal reaccionan como ácido y base mediante una reacción anfotérica, por lo tanto, se lleva a cabo cuando el átomo metálico o el aminoácido polarizan a la molécula de agua, esta molécula de agua “activada” se comporta

como un nucleófilo, y por lo tanto el ataque se realiza cuando el agua cede su par de electrones libres al compuesto electrófilo, en este caso al carbono que está formando el enlace peptídico con el nitrógeno. El carbono entonces se polariza y acepta por completo los electrones del agua enlazándose con ella, formando un carboxilo ionizado; mientras que los electrones que formaban el enlace con el nitrógeno regresan a él, pues su fuerza polar los atrae, regenerando el grupo amino en su forma protonada [Barret *et al.*, 2004].

De manera resumida la hidrólisis del enlace peptídico consiste en adicionar una molécula de agua a un enlace peptídico, siendo esto posible por la capacidad anfotérica del aminoácido o el metal que facilita la energización de los componentes [Barret *et al.*, 2004; Neurath, 1985] (Figura 1).



**Figura 1. Hidrólisis de un enlace peptídico.** Mediante un ataque nucleofílico de una molécula polarizada de agua. Tomado de MCAT-Review.org.

### 1.2.3. Función

Retomando lo que se mencionó en la sección 1.2, la proteólisis se entiende como un mecanismo global en la célula, tanto en localización como en los procesos donde interviene. De manera general se pueden agrupar los procesos en tres secciones. La primera es la degradación, las peptidasas que se encuentran en esta sección son las más fácilmente relacionadas con el término proteólisis y se encargan de la degradación total de las cadenas peptídicas, generalmente funcionan como sistema de defensa a agentes externos y reciclaje de elementos celulares. En segundo lugar, la maduración de proteínas, como es el caso de la escisión del péptido señal en las proteínas que siguen con su maduración en el retículo endoplásmico. Finalmente, la modulación de procesos. En este caso la diversidad de funciones e implicaciones para la célula son grandemente diversas, tanto como lo son las peptidasas [Lodish *et al.*, 2016]. Tanto es así que se ha establecido que, la proteólisis está involucrada en el mantenimiento homeostático y se encarga de la gestión interna en la célula [Chondrogianni *et al.*, 2002].

Un ejemplo de cómo la proteólisis afecta el estado celular es SPK1, que es un puente entre la maquinaria de regulación celular y el sistema proteolítico de ubiquitina, se comprobó con mutantes de SPK1 que, las células pueden quedar arrestadas en la fase G1 o G2, sugiriendo que hay una regulación de los sistemas proteolíticos sobre los estados del ciclo celular [Bai *et al.*, 1996].

### **1.3. Sistemas proteolíticos**

De manera muy general se pueden agrupar a las peptidasas en dos sistemas proteolíticos de acuerdo a su localización en la célula.

#### **1.3.1. Sistema lisosomal**

En estos organelos se lleva a cabo una degradación selectiva y no selectiva. La más conocida es la no selectiva, dado que estos organelos cuentan con un contenido de peptidasas muy reactivas. Las primeras proteínas que son degradadas por los lisosomas son las que forman parte de la membrana celular o bien de vesículas, como las de secreción, que después de haber cumplido su cometido, se fusionan con un lisosoma para su el reciclaje de los a.a. La crinofagia es un ejemplo de ello, donde las vesículas excretoras y las proteínas que llevan dentro son reguladas por los lisosomas, al controlar la cantidad de las proteínas excretadas al medio extracelular. Muchas de las proteínas del citoplasma son también el blanco de estos organelos; la autofagia es el proceso en el que la célula degrada partes del citoplasma, incluyendo en algunos casos organelos completos. Dependiendo del volumen que es ingresado por los lisosomas se tiene la microautofagia, que modula la concentración de proteínas en el citoplasma, se encuentra siempre activa y es parte de la actividad proteolítica basal. La macroautofagia que suele presentarse en momentos de carencia de nutrientes, haciendo que la célula en busca de conseguir elementos aminoacídicos degrade partes del citoplasma. Existe también evidencia de una vía de señalización que envía directamente proteínas de vida libre al lisosoma, se conoce una secuencia señal llamada KFERQ que mantiene contacto con la proteína Hsc73 que es la responsable de mantener la conformación que favorece la unión con la membrana lisosómica [Bohley y Seglen, 1992].

### 1.3.2. Sistema citosólico

La proteólisis que tiene lugar en el citosol se puede dividir de acuerdo a las enzimas que llevan a cabo la hidrólisis.

**Calpaínas.** Son de la familia de las cisteín-proteasas. La cualidad que las hace particulares, es que su actividad es independiente de ATP, pero dependiente de calcio. Su actividad esta modulada por las concentraciones de  $\text{Ca}^+$  libre y un inhibidor endógeno llamado calpatina, tiene sustratos específicos, principalmente de membrana, aunque hay evidencia que prueba que pueden ingresar al núcleo donde se desempeñan como factores de transcripción. Otros estudios sugieren que interviene en la diferenciación celular y los procesos de envejecimiento [Chondrogianni *et al.*, 2002].

**Proteosoma.** Es un complejo proteico. En su forma activa se denomina 26S, estando conformado por el subcomplejo 20S, que es donde se encuentra el sitio catalítico con por lo menos 5 diferentes actividades proteolíticas, y el subcomplejo 19S que es la que se encarga de la regulación [Chondrogianni *et al.*, 2002].

Subcomplejo 20S tiene una conformación de 4 anillos heteroheptaméricos apilados, dos externos denominados  $\alpha$  y dos internos llamados  $\beta$ . Los anillos al estar apilados forman una especie de túnel, siendo que los anillos  $\alpha$  forman un “poro” que funciona a modo de compuerta, para controlar la entrada del sustrato y remover los productos de la degradación. Uno de los elementos que son cruciales para la función de esta compuerta son los dominios N-terminal de cada una de las 7 subunidades que conforman el anillo  $\alpha$ , que son las que actúan propiamente dicho como una compuerta abriéndose y cerrándose [Groll *et al.*, 2000]. Además, estos anillos  $\alpha$  son también los responsables de la localización del proteosoma en la célula en un momento determinado [Nederlof *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1990; Ogiso *et al.*, 2002]. De manera similar los dos anillos  $\beta$  se conforman de 7 subunidades cada uno, las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$  son las que contienen los sitios catalíticos con diferentes especificidades proteolíticas. Las partículas  $\beta$  se sintetizan con una porción extra en la región N-terminal llamada

propéptido, que se elimina en la maduración, lo que expone los sitios catalíticos de naturaleza treonin-peptidasa, aunque en proteosomas maduros se observa otros tipos de actividades proteolíticas [Groll *et al.*, 1997; Dick *et al.*, 1998].

Subcomplejo 19S es la que se encarga de la regulación en un proteosoma 26S ensamblado, dos de ellas se posicionan sobre los anillos  $\alpha$  de la partícula 20S, uno de cada lado. La partícula 19S es multifuncional y esta característica depende de su conformación, que también modula la localización y unión con sustratos ubiquitinizados. Las subunidades Rpt1 a Rpt6 son ATP dependientes, mientras que las subunidades Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13 son independientes de ATP [Díaz-Villanueva *et al.*, 2015]. El resto de las subunidades que pueden conformar la partícula 19S provocan cambios en la velocidad de catálisis, afinidad de sustratos, tipo de actividad catalítica y localización celular. Todo lo anterior pone en evidencia que el proteosoma es el ejemplo claro de que la proteólisis no se limita a la degradación de proteínas dañadas o inservibles. El estatus multifuncional del proteosoma apunta claramente a la participación de la proteólisis como mecanismo regulador de muchos procesos celulares [Livneh *et al.*, 2016].

Enzimas libres. En esta categoría podemos agrupar a un gran número de enzimas proteolíticas, en esta clasificación se encuentran todas las que no forman parte de las calpaínas ni del proteosoma. Se pueden incluir a las caspasas, que forman parte de las cisteín-proteasas, su importancia radica en ser parte de la cascada de señalización que conlleva a la muerte celular, por lo que son un regulador de la apoptosis y del ciclo celular [Lodish *et al.*, 2016]. También se encuentran las enzimas que se exportan al medio extracelular, que tiene funciones de defensa o digestivas, como la capsina que degrada las proteínas de los alimentos, la candidapepsina que es un factor de virulencia en la candidiasis, la aspergillopepsina I es segregada al medio exterior por el hongo *Aspergillus oryzae* y cumple funciones de obtención de nutrientes para el micelio [Barret *et al.*, 2004]. Entre las enzimas citosólicas se encuentran las leucín aminopeptidasas (LAPs) que se describen con más detalle a continuación.

#### **1.4. Leucín aminopeptidasas (LAPs)**

Forman parte del clan MF que contiene solo a la familia M17, tienen dos dominios estructurales, uno N-terminal y otro C-terminal, en este último es donde está el sitio catalítico. Suelen presentar dos iones de  $Zn^{2+}$  como cofactor aunque los iones metálicos pueden ser también  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , son exopeptidasas que liberan generalmente leucina del extremo N-terminal, son consideradas como enzimas que intervienen en el mantenimiento de las células, crecimiento, desarrollo, defensa contra patógenos y a la vez factor de virulencia de los mismos [Barret *et al.*, 2004]; tienen una temperatura y pH óptimos variables y requerimientos de cationes divalentes diversos [Matsui *et al.*, 2006]. Su actividad puede regularse en la presencia de metales divalentes como:  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  [Smith, 1945]. Se han identificado LAPs en organismos como cerdo (*Sus scrofa domestica*) [Melius *et al.*, 1970], humano (*Homo sapiens*) [Toda *et al.*, 2002], jitomate (*Solanum lycopersicum*) [Gu *et al.*, 1996; Fowler, *et al.*, 2009] *Arabidopsis thaliana* [Bartiling y Weiler, 1991], hongos como *Aspergillus sojae* [Chen *et al.*, 2002]; bacterias como *Escherichia coli* [Golich *et al.*, 2006] entre otros. A continuación, se mencionan algunos ejemplos con más detalle.

La LAP del cristalino bovino (*Bos taurus*) pertenece a la familia M17 siendo la proteína modelo del grupo, es hexamérica, tiene dos sitios de unión a dos iones metálicos esenciales para la catálisis [Burley *et al.*, 1990]. Se determinó que hidroliza el dipéptido Cys-Gly, que es resultado del metabolismo del glutatión y actúa como un prooxidante, manteniendo el estado redox de los residuos de cisteínas de las proteínas [Capiello *et al.*, 2006]. La caída de los niveles de la LAP durante la maduración y el envejecimiento se ha relacionado con la formación de cataratas, debido a la acumulación de proteínas parcialmente degradadas y su tendencia a formar agregados que producen opacidad en el ojo [Chaerkady *et al.*, 2004].

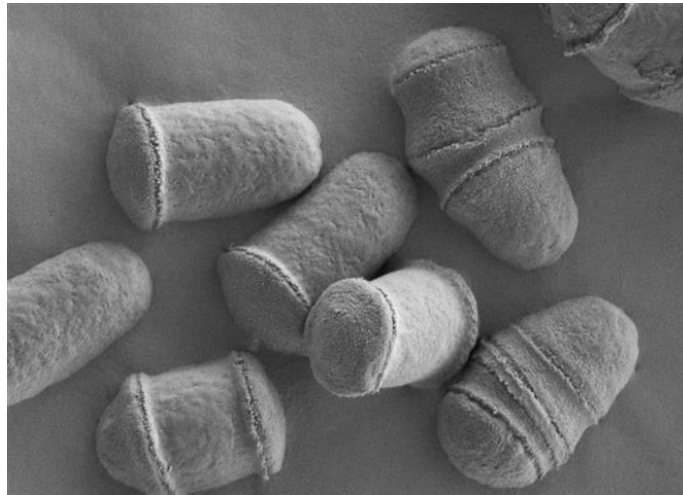
Las LAPs de *Schistosoma mansoni* [Rinaldia *et al.*, 2009], *Toxoplasma gondii* [Jia *et al.*, 2009], *Clonorchis sinensis* [Kang *et al.*, 2012] y *Fasciola gigantica* [Changklugmoa *et al.*, 2013], están involucradas en el procesamiento de péptidos para el reciclaje de aminoácidos en el paso final del catabolismo de proteínas, la invasión y migración en tejidos del hospedero, la hidrólisis de las proteínas para la obtención de nutrientes y la modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero. Estas enzimas se proponen como factor de virulencia y blanco en el desarrollo de vacunas y la aplicación de drogas [Rinaldia *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012; Changklugmoa *et al.*, 2013] En un estudio realizado en 2013 con la LAP de *Fasciola gigantica*, que está presente en todas las etapas de crecimiento, se propuso que esta sería un buen blanco para vacunas. Por lo que la enzima se expresó en *E. coli*, esta proteína recombinante protegió a un 62 % de ratones inmunizados, generando isotipos IgG1 e IgG2, que implican la respuesta Th1/Th2 mixta [Changklugmoa *et al.*, 2013].

En cuanto a ejemplos de LAPs con un gran impacto se tiene la LAP3 de humano. Se ha encontrado que en células cancerígenas esta proteína está sobreexpresada. Aumenta la movilidad celular, debido a que su sobreproducción disminuye la expresión de E-caderina, lo que conlleva a un mayor grado de metástasis. En experimentos donde se silencia la expresión de la LAP3 con siRNAs, aumenta la expresión de las E-caderinas lo que limita la movilidad celular, la metástasis y en general la capacidad invasiva de las células cancerígenas. El aumento de la LAP3 promueve la activación de CDK2 y CDK6, que promueven la transición de fase G1 a S, se confirmó mediante silenciamiento, donde las células con una menor cantidad de LAP3 se arresta en la fase G1. Todo esto implica que la LAP3 es un modulador de la viabilidad celular y del ciclo celular [Tian *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015].

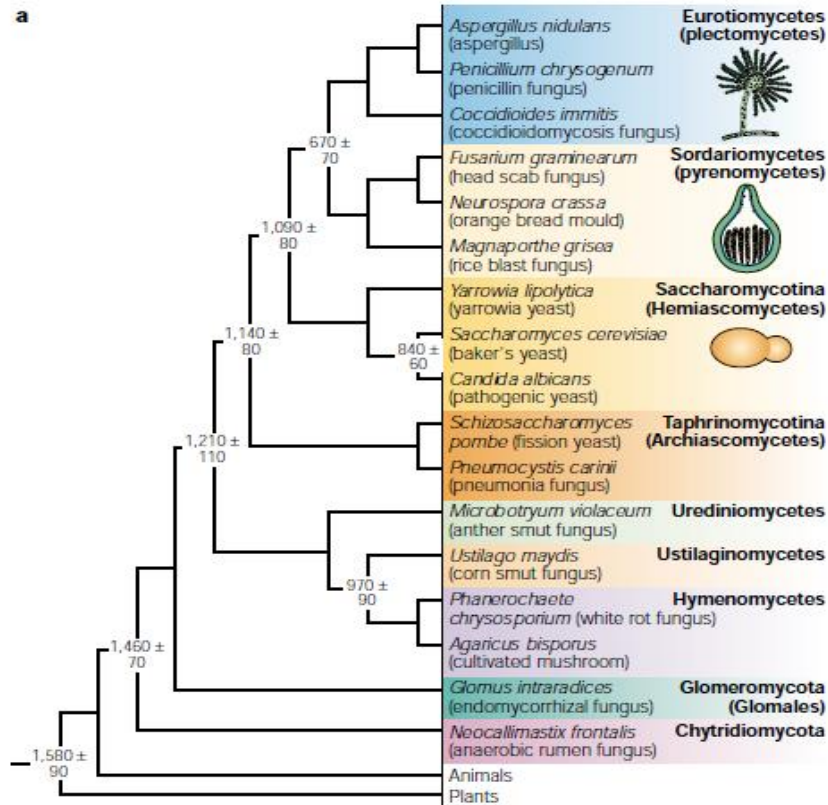
## 1.5. *Schizosaccharomyces pombe*

### 1.5.1. Características generales

*Schizosaccharomyces pombe* (Figura 2) es una levadura no patógena descrita por P. Linder en Alemania en 1893. Fue nombrada “pombe” que significa cerveza en Swahili, ya que fue aislada de la cerveza de mijo en el este de África [Linder, 1983]. Es un ascomiceto que pertenece al grupo Archaeascomicetos, el cual se separó de las levaduras de gemación (Hemiascomycetes) desde hace 1140 millones de años (Figura 3) [Hedges, 2002]. Tiene dos formas de reproducción, una por fisión binaria y otra por esporulación, por lo tanto, es posible encontrarla tanto en estado haploide como diploide; en el primero las células tienen forma cilíndrica, miden de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 7 a 15  $\mu\text{m}$  de largo, y en estado diploide miden de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de largo [Wixon, 2002].



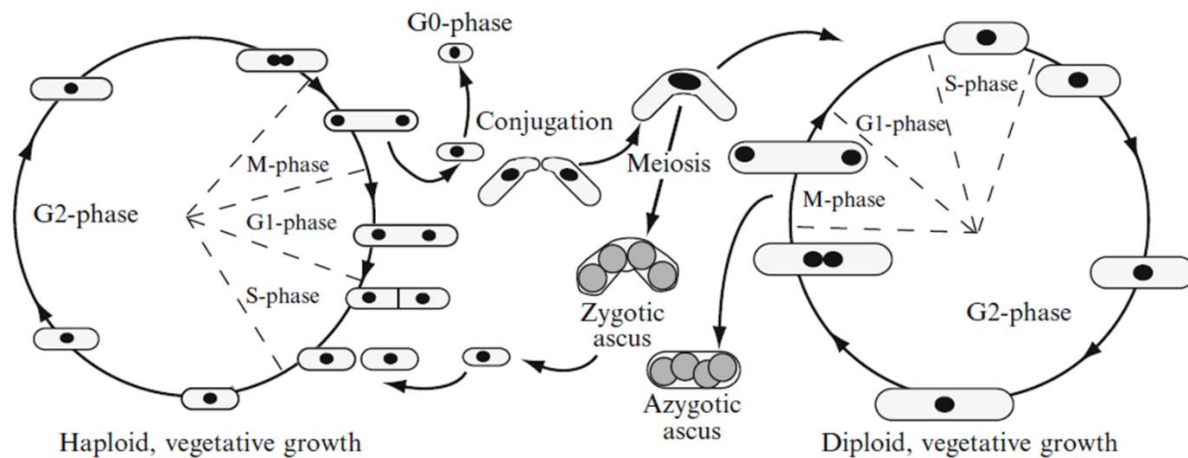
**Figura 2.** *Schizosaccharomyces pombe*. Microscopia (SEM) tomada y modificado de Norwich Research park image library (22 de abril de 2018).



**Figura 3. Filogenia de hongos.** Donde se marcan los sucesos de divergencia de grupos importantes en millones de años +/- el error estándar. En este análisis se estableció una tasa de sustitución igual a la de los animales. En otros estudios se han propuesto tasas más rápidas, lo que estima un tiempo de divergencia menor. Tomado de Hedges, 2002.

En condiciones normales se reproduce mediante mitosis, mientras que en condiciones desfavorables (especialmente en carencia de nitrógeno) lo hace por meiosis, una muy parecida a la de mamíferos, y la subsecuente formación de ascosporas que originan células con tipos sexuales complementarios h- y h+, que posteriormente pueden conjugarse para formar un cigoto y reproducirse mediante mitosis (en estado diploide); sin embargo la célula diploide es inestable y pronto genera 4 ascosporas que dan origen a células haploides que continúan su reproducción de manera mitótica en estado haploide. De manera esquemática se puede ver su ciclo de vida en la figura 4, donde es posible apreciar que tanto

en estado haploide como diploide la fase G2 representa la mayor parte del ciclo de división vegetativa, esta característica del ciclo celular es la que hace que *S. pombe* funcione como modelo de estudio para células con división meiótica de organismos pluricelulares. La división meiótica puede dar origen a una división mitótica en ambos estados (haploide y diploide).



**Figura 4. Ciclo de vida de *S. pombe*.** Tomado de Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces pombe* [Sabatinos y Forsburg, 2010].

Tiene características importantes como la presencia de genes y proteínas homólogas con las de otros organismos como el humano, la capacidad de procesar el ARNm mediante corte y empalme, la presencia de modificaciones postraduccionales en proteínas como la glucosilación, la fácil y amplia manipulación de su genoma [Egel, 2002; Yamamoto *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 2002], bajos costos de mantenimiento, no representar riesgos a la salud pública, su genoma está completamente secuenciado, mide 13.8 Mb distribuidas en 3 cromosomas: el primero de 5.7 Mb, el segundo de 4.6 Mb y el tercero de 3.5 Mb, cuenta con un genoma mitocondrial de 20 Kb [Wood *et al.*, 2002]. Por todas las características antes mencionadas, este organismo puede ser usado como modelo de estudio en mitosis, meiosis, procesos celulares, procesamiento de

ARNm, el control del ciclo celular, finalmente y como sucede con los modelos unicelulares, es mucho más fácil estudiar genes, proteínas, rutas metabólicas y procesos celulares en una célula, que en un organismo pluricelular.

### **1.5.2. Sistema proteolítico de *S. pombe***

Entre los campos de estudio de este organismo está el del sistema proteolítico, que es un punto clave en el recambio proteico de la célula. No existe tanta información de este sistema a comparación de otros organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, se mencionan las proteasas que han sido descritas en *S. pombe*.

**Proteinasa yspA**, se detectó en extractos solubles, es una endoproteasa de la hemoglobina, su actividad se ve incrementada en un pH = 5 pero la velocidad de reacción disminuye, lo que probablemente signifique que existe un inhibidor endógeno que se activa en un pH ácido [Suárez *et al.*, 1991].

**Proteinasa yspB**, es una enzima soluble endoproteolítica, es una proteasa neutra, termorresistente, cuya mayor actividad se ha detectado en la fase estacionaria [Suárez *et al.*, 1991; Escudero *et al.*, 1993].

**Carboxipeptidasa yspI**, enzima vacuolar homóloga a la enzima producida por el gen *cpyI* de *S. cerevisiae*, se genera en una forma inmadura de 110 kDa que sufre proteólisis para terminar en su forma madura como un heterodímero de 32 kDa, es una serín-carboxipeptidasa, tiene en el extremo N-terminal de la forma inmadura una señal que comparte con su homólogo en *S. cerevisiae* que la señala para la vacuola [Escudero *et al.*, 1993; Tabuchi *et al.*, 1997].

**Aminopeptidasa yspI**, se trata de una exopeptidasa dimérica de 184 kDa con subunidades idénticas de 92 kDa, hidroliza proteínas o péptidos con residuos básicos como son lisina y arginina del extremo N-terminal a un pH = 7, es inhibida por iones metálicos pesados como Cu<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>, así también por agentes

quelantes como EDTA y Cloraquina [Arbesu *et al.*, 1991, 1993; Tabuchi *et al.*, 1997].

**Dipeptidil aminopeptidasa yspI**, es una enzima termolábil con una masa atómica relativa de 300 kDa, un pH óptimo de 7.5, el compuesto pCMB e iones de  $Zn^{2+}$  funcionan como inhibidores de la actividad, es codificada por el gen *dpal* localizado en el cromosoma III [Villa y Suárez, 1994; Tabuchi *et al.* 1997].

**Peptidasa multicorn**, se trata de un complejo citoplasmático con dos formas oligoméricas, solo una de estas formas tiene actividad, su masa relativa es de 400 kDa mientras que la menor mide 150 kDa y se trata de un homólogo de la proteína tricolor de arqueobacterias [Osmulsky *et al.*, 1998].

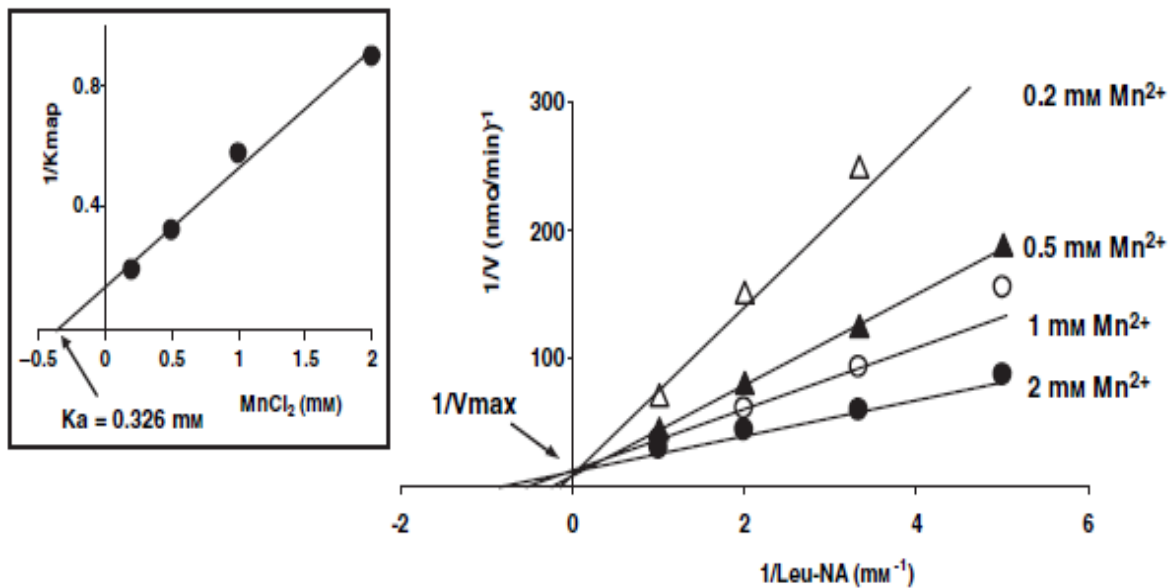
**Proteosoma 26S**, esta proteasa es un complejo proteico, que tiene dos subunidades principales, el subcomplejo 20s que es la catalítica y el 19S que es la reguladora, aunque los anillos  $\alpha$  de la subunidad 20S también tienen funciones reguladoras. Está involucrada en la degradación por medio de ubiquitinación y en el control de procesos celulares como el estado de compactación de la cromatina [Wilkinson *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2017].

**Felixina** (putativa), en estudios del laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP en conjunto con nuestro laboratorio, se detectó una nueva peptidasa en *S. pombe*, su presencia se predijo por homología con la Felixina de ratón y en estudios de expresión de ARNm se logró detectar su presencia en todas las fases del crecimiento celular, también se hizo un modelado por homología usando las proteínas de ratón y humano como plantilla, resultando ser una proteína de membrana, específicamente de retículo endoplásmico [Paiz-Candia, 2012]. Cabe mencionar que actualmente en nuestro laboratorio se está llevando a cabo su clonación en vectores de expresión, buscando su purificación y la generación de anticuerpos.

**Leucín aminopeptidasa yspII**, esta es nuestro objeto de estudio por lo que se describirá en detalle a continuación.

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

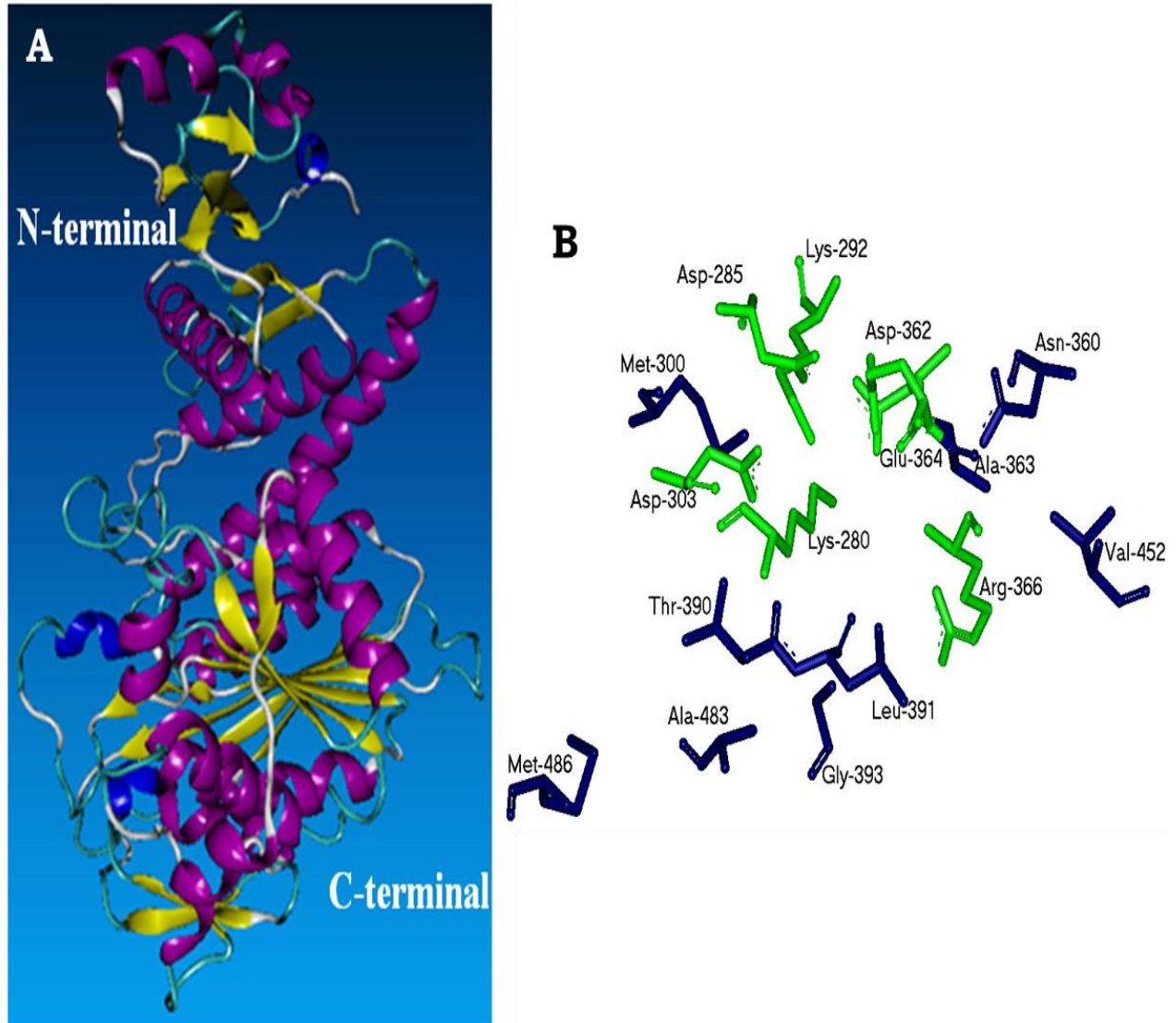
En 2007 el grupo de Herrera-Camacho describió bioquímicamente y molecularmente una nueva aminopeptidasa en *S. pombe*, una exopeptidasa denominada “Leucín aminopeptidasa yspII” (LAP yspII) tiene un peso molecular de 320 kDa, constituida por 6 subunidades monoméricas de 54 kDa. Pertenece a la familia M17, en específico es la M17.009, es una metaloproteasa básica con un pH óptimo de 8.5, su localización es citosólica. En estudios de cinética enzimática se demostró una dependencia de su actividad a concentraciones de  $Mn^{2+}$  en un rango de 0.2 a 2 mM, funcionando este como un activador competitivo con una constante de activación ( $K_a$ ) de 0.326 mM (Figura 5). En el análisis de la secuencia de aminoácidos, se encontró el motivo NTDAEGRL en la posición 360, indicando que esta enzima tiene una localización citosólica [Herrera-Camacho *et al.*, 2007].



**Figura 5. Cinética enzimática con  $Mn^{2+}$ .** Tomado de Herrera-Camacho, 2007.

El CDS (secuencia de ADN codificante) se encuentra en el gen *ape2*, en el cromosoma I, su tamaño es de 1542 pb que codifican para una proteína de 513 a.a. La secuencia del gen y sus características básicas se encuentra en la base de datos NCBI con el símbolo de gen SPAC13A11.05, con el que se denomina al locus del gen *ape2*, su posición en el cromosoma va desde el pb 582273 a 584402, siendo un fragmento de 2130 pb. La secuencia puede ser visualizada en la base GeneBank cuya última actualización hasta la escritura de este trabajo fue el 5 de abril de 2018. En cuanto a los elementos que conforman el gen, estos pueden verse detallados en la secuencia de 3431 pb con número de acceso KJ756508.1 con la última actualización fechada el 2 de agosto de 2014. En esta secuencia es posible identificar el CDS junto con los UTRs 5' y 3' (región no traducida), que sumados transcriben al ARNm de 2130 pb. También se encuentra una secuencia reguladora río arriba de 763 pb que funciona como promotor mínimo [NCBI, 2018].

A partir de las estructuras cristalizadas de las LAPs de *B. taurus* y *E. coli*, se llevó a cabo una predicción de la estructura tridimensional de la LAP yspII, donde se identificaron dos dominios en la forma monomérica; el dominio C-terminal constituido por 347 a.a. que tiene una topología  $\alpha/\beta$  en forma de silla de montar donde se encuentra el sitio activo y el dominio N-terminal, el cual aún se desconoce su función específica, aunque se presume sería de tipo reguladora. En la misma predicción se determinaron los aminoácidos que forman el bolsillo hidrofóbico (Met300, Asn360, Ala363, Thr390, Leu391, Ala483 y Met485). Por la estrecha relación que guarda la disposición de los a.a. de esta enzima con la LAP de *B. taurus* se estimaron los posibles a.a. del sitio catalítico: Asp285, Asp362, Glu364, Lys292, Arg366 y Lys 280, donde probablemente la Lys292 sea un aminoácido indispensable para la actividad enzimática, de nuevo basado en la relación estructural con los modelos cristalizados (Figura 6) [Herrera-Camacho *et al.*, 2007; Rivera-Juárez, 2009].

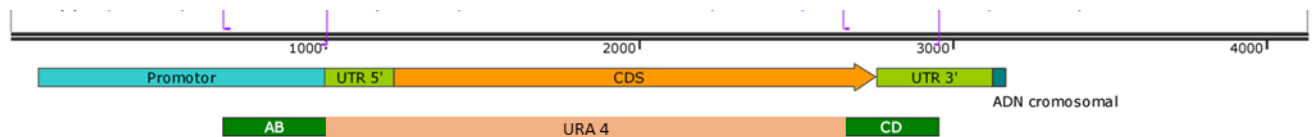


**Figura 6. Modelado *in silico* de la LAP yspII. A)** estructura tridimensional de uno de los monómeros, que muestra el dominio N-terminal y el C-terminal donde se presume está el sitio activo. **B)** Modelado en el programa WEB LAB VIEWER donde se marcan en azul los a.a. que forman el saco hidrofóbico y en verde los responsables de la actividad catalítica. Tomado de Herrera-Camacho *et al.*, 2007 y Rivera-Juárez, 2009.

Para el seguimiento del estudio de la LAP yspII, en nuestro grupo de investigación se ha trabajado en dos aspectos: su estructura y el estudio de su función.

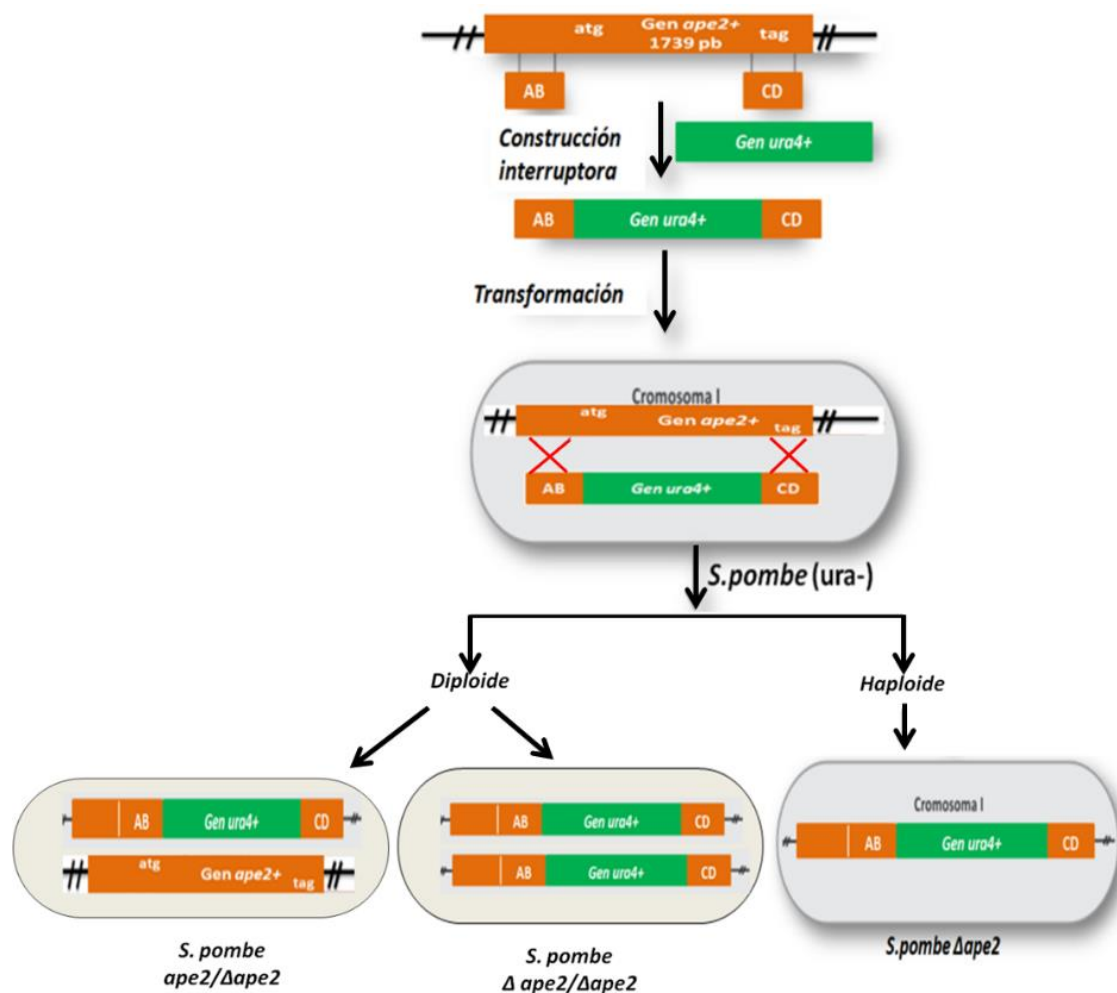
En cuanto a la determinación de la estructura, se ha purificado a homogeneidad la leucín aminopeptidasa yspII a partir de cepas sobreproductoras, tanto de *S. pombe* (cepa 3DpLAPII con el vector de sobreproducción pSRP [Cruz-Ramos, 2006; Rivera-Juárez, 2009], así como la cepa X-33-LAPII de *Pichia pastoris*, incorporando el vector pPICZα-LAPII al cromosoma, en el locus del gen AOX1 de la alcohol-oxidasa. Un aspecto interesante es que la enzima es activa tanto en su forma hexamérica como en la monomérica [Flores-Tlalpa, 2015].

Para estudiar su función, en trabajos precedentes se obtuvo una mutante del gen *ape2* con la cepa de *S. pombe* SP 201399 haploide ( $h^+$  *ura4-D18*, *leu1-32*, *ade6-M210*, *his7-3669*) a la que se denominó 4X. Se obtuvo una construcción interruptora sustituyendo un fragmento de 1646 pb del CDS del gen *ape2* por el gen *ura4* de *S. pombe* (Figura 7).



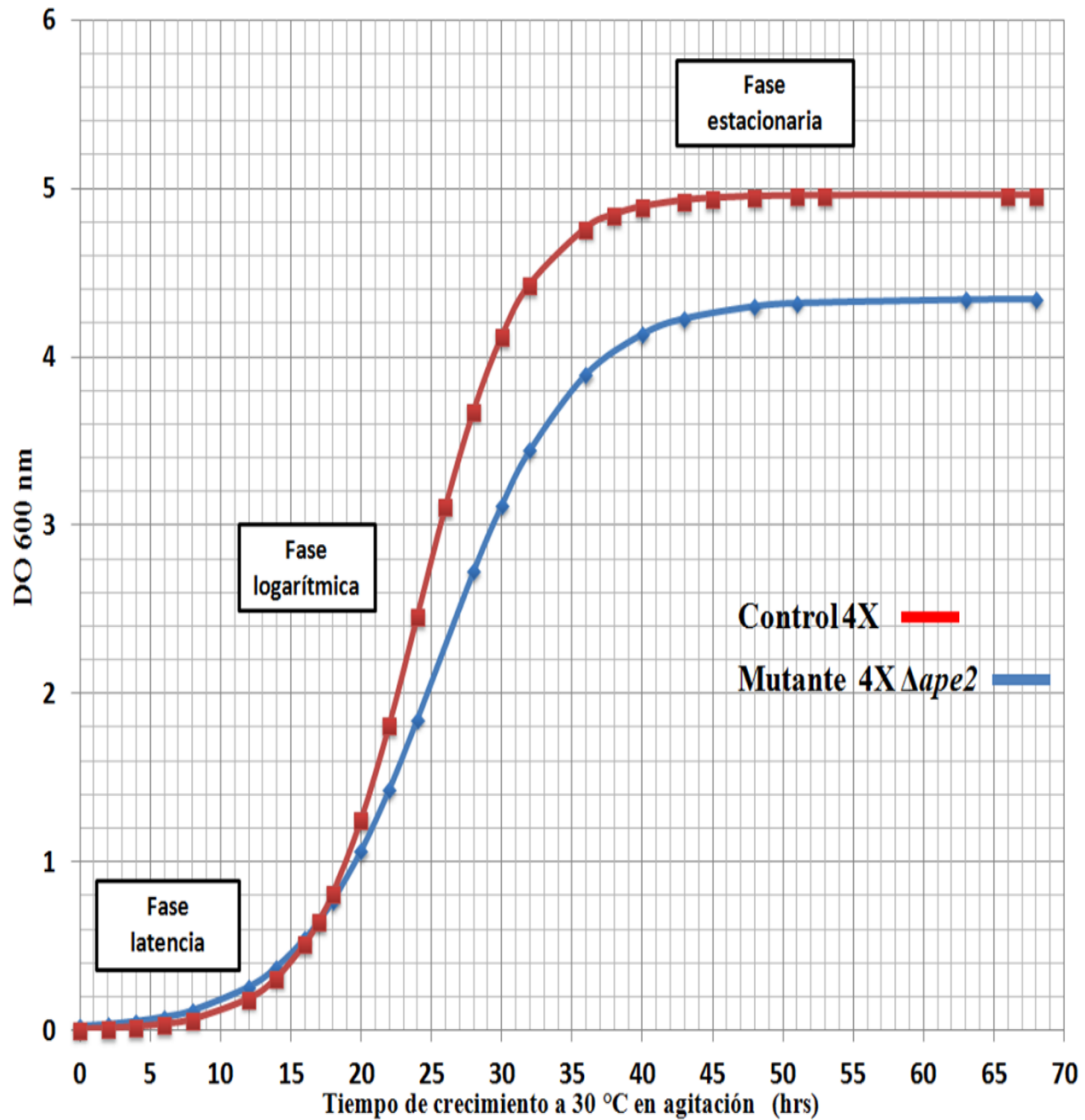
**Figura 7. Construcción interruptora.** Se puede visualizar la ubicación de los segmentos AB y CD y la secuencia que se sustituyó por el gen *ura4* con respecto a los elementos del gen.

Al incorporarse la construcción interruptora en el gen *ape2* del cromosoma por recombinación homóloga, se obtuvo la cepa mutante 4XΔ*ape2* (Figura 8) [Gutiérrez, 2014]. Esta cepa mutante presentó fenotipos muy interesantes.



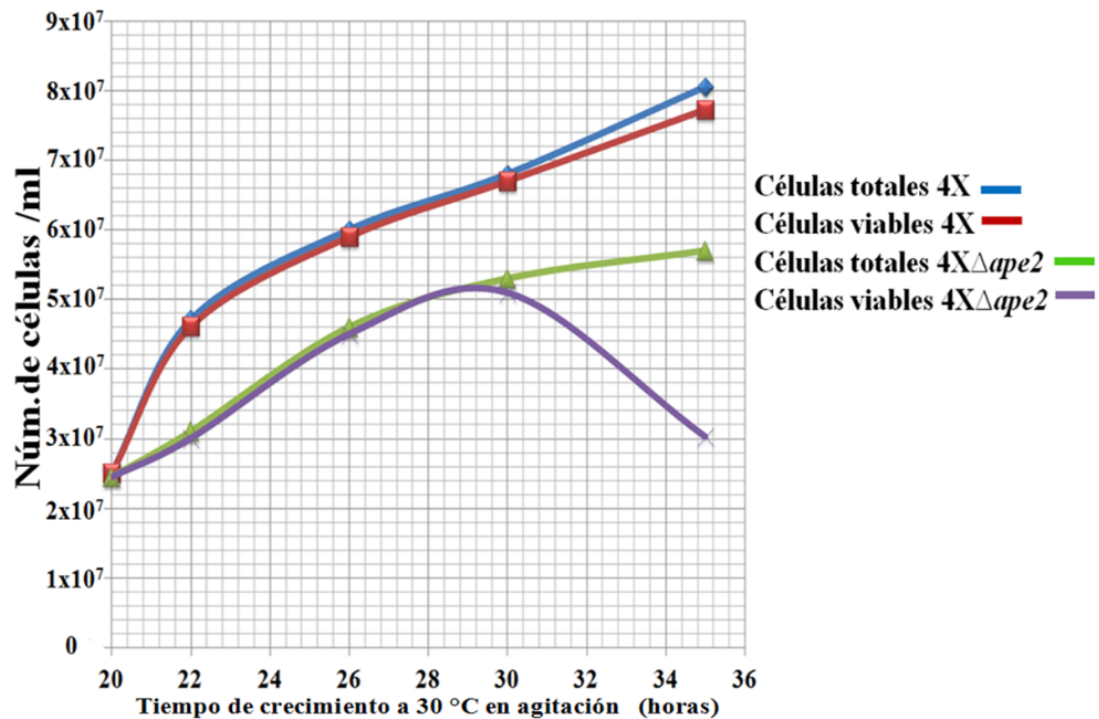
**Figura 8. Esquema general de interrupción.** Con el que se reemplazó el gen *ape2* y se obtuvieron cepas mutantes  $\Delta$ *ape2* en *S. pombe*. Tomado de Gutiérrez, 2014.

Con respecto al comportamiento cinético del crecimiento (Figura 9), en primera instancia se puede apreciar que ambas cepas tienen una fase de latencia igual. Después de 20 horas de crecimiento, al empezar la fase logarítmica, la cepa  $4X\Delta$ *ape2* muestra una desaceleración en su crecimiento con respecto a la cepa  $4X$ , manteniendo esta diferencia a lo largo de toda la cinética. Cuando las cepas llegan a la fase estacionaria, existe una marcada diferencia entre ambas, estando la  $4X$  alrededor de 5 UA y la  $4X\Delta$ *ape2* entre 4.2 y 4.4 UA. La velocidad de duplicación de la  $4X$  es de 2.59 horas mientras que la de la  $4X\Delta$ *ape2* es de 3.46 horas [Gutiérrez, 2014].



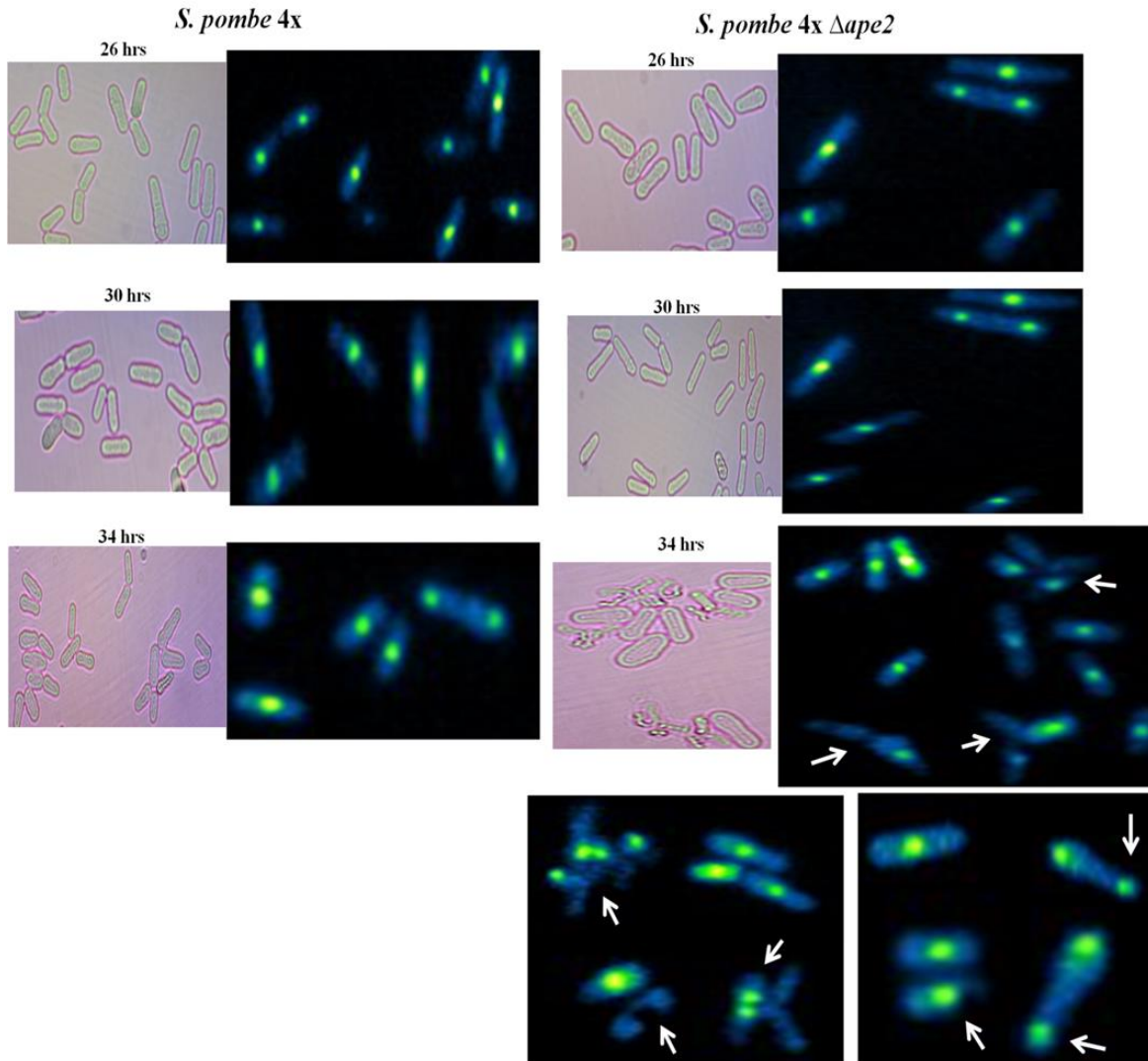
**Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa 4XΔape2 y 4X como control.** Tomado de Gutiérrez, 2014.

Durante la cinética de crecimiento se tomaron muestras de células para determinar la viabilidad celular, y llevar a cabo observaciones con microscopía de fluorescencia con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Por otro lado, se observó que después de 30 horas de crecimiento el número de células viables en la cepa mutante 4XΔape2 decae, habiendo una diferencia con respecto al control del 50% a las 35 horas de crecimiento (Figura 10) [Gutiérrez, 2014].



**Figura 10. Curva de viabilidad celular durante la cinética de crecimiento.** Tomado de Gutiérrez, 2014.

Se realizó un muestreo durante las 26, 30 y 34 horas de crecimiento, para tinción con DAPI, y observar el contenido de ácidos nucleicos en la célula (Figura 11). En las muestras de las 26 y 30 horas de crecimiento no se observaron diferencias entre las células de la cepa control y la mutante, habiendo una distribución homogénea del material cromosómico en el interior de la célula y una repartición homogénea del mismo durante la división celular. A las 34 horas de crecimiento, la cepa control 4X no presentó cambios aparentes, mientras que la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 si los presentó; observándose una repartición desigual del material genético, llegando a encontrarse células anucleadas [Gutiérrez, 2014].



**Figura 11. Fenotipo de la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 en la fase final de crecimiento.** Microscopia de Contraste de fases y de fluorescencia (DAPI). Las flechas marcan las células con una distribución desigual del núcleo y células anucleadas. Tomado de Gutiérrez, 2014.

Basándose en las observaciones anteriormente descritas, se puede concluir que la ausencia de la enzima LAP yspII conlleva a las células a una disminución en su velocidad de crecimiento, la pérdida de viabilidad y la repartición desigual del material cromosómico durante la división celular, así como la aparición de células anucleadas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Schizosaccharomyces pombe* es una levadura con un uso amplio en la actualidad en biotecnología, pero principalmente en la investigación, por ser considerada como modelo de estudio cuyos resultados pueden ser extrapolados a organismos pluricelulares, como el humano. Las LAPs, son proteínas que están ampliamente distribuidas en todo tipo de seres vivos, son además proteínas que conservan entre sí una notable homología estructural y aunque su función básica, es la de hidrolizar leucina del extremo N-terminal, las funciones que se derivan de esta hidrólisis y los procesos celulares en los que están inmersas, son muy variables en cada organismo, la relevancia de las LAPs es también distinta en cada uno de ellos. Habiendo casos de suma importancia como es el caso del humano donde se ha visto que intervienen en la generación y progresión de algunos tipos de cáncer.

La LAP yspII de *S. pombe*, esta se describió en nuestro grupo de investigación en 2007, sin embargo, aún hay mucho por estudiar sobre ella, especialmente en lo que se refiere a su función dentro de la célula. Al ser una proteasa citosólica y encontrarse en bajas concentraciones, podría funcionar como parte de algún sistema de degradación o bien en algún mecanismo de regulación. Recientemente en 2014 se obtuvo una mutante que carece de la expresión del gen *ape2*, que es el que codifica para la LAP yspII, observándose que la mutación afectaba el desarrollo celular, disminuía su velocidad de replicación, después de la mitad de la fase exponencial, el número de células inviables aumenta considerablemente con respecto al control, y mediante microscopia de fluorescencia usando DAPI, fue posible apreciar que la mutación afectaba la distribución de las cromátidas hermanas en el momento de la división celular, distribuyéndose el material genético de forma desigual entre las células hijas, habiendo incluso células sin material genético. Estos resultados indican que lo más probable es que la LAP yspII esté involucrada en procesos de regulación, más que en procesos de degradación. En específico es posible suponer su participación en mecanismos de control del ciclo celular y en especial de la mitosis.

Para poder corroborar las suposiciones descritas, se tiene que definir si los efectos fenotípicos son causados directamente por la ausencia de la LAP yspII, y ahondar más en el estudio de su función, analizando cómo es que los patrones de expresión cambian en la célula, cuáles son las rutas metabólicas o vías de señalización que se ven afectadas significativamente, y que tengan que ver en la regulación del ciclo celular y la mitosis. Para esto, se planteó obtener la cepa revertante y un ensayo de microarreglo con el afán de clarificar la función que la LAP yspII desempeña.

#### **4. HIPÓTESIS**

1. Al reincorporar el gen *ape2* a la cepa mutante 4X $\Delta$ *ape2* mediante complementación extracromosomal, se generará una reversión equivalente de la interrupción del gen *ape2* y la restauración del fenotipo inicial.
2. La función de la LAP yspII está relacionada con los mecanismos de control del ciclo celular y/o mitosis. Por lo que su ausencia en la célula ocasiona una desregularización de los niveles de expresión de genes cuyas proteínas intervienen en dichos mecanismos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

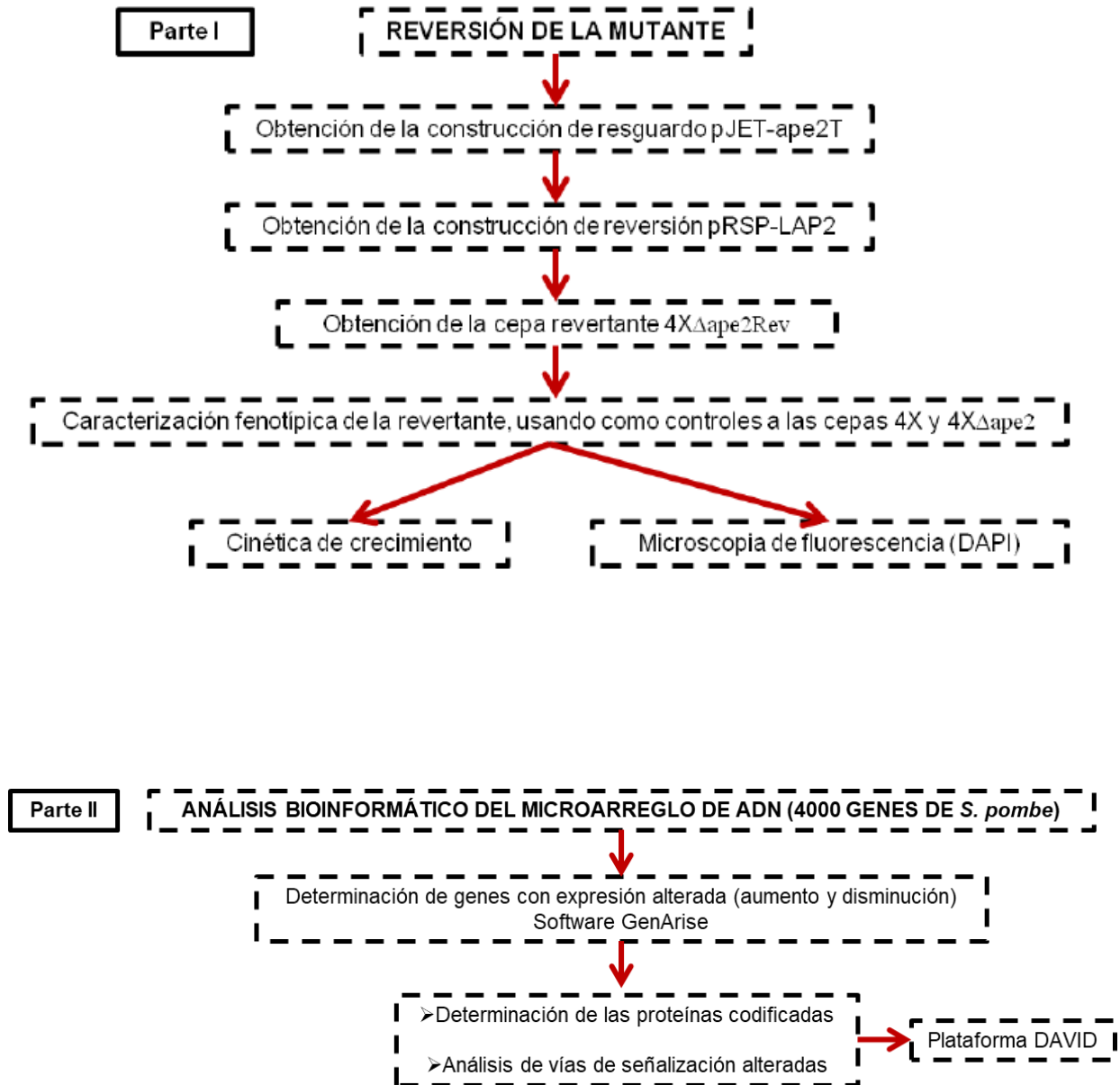
Confirmar por reversión equivalente que el fenotipo aberrante de la mutante  $4X\Delta ape2$  es por ausencia de la LAP yspII, así como, mediante el análisis bioinformático de un microarreglo de 4000 genes de *S. pombe*, determinar aquellos genes que modifican su expresión, así como las vías de señalización y metabólicas donde las proteínas alteradas se ven implicadas.

### **5.2. Objetivos específicos**

1. Construir el vector de reversión pRSP-apeT que incluye el promotor y el marco de lectura del gen *ape2*.
2. Obtener la cepa revertante al transformar la cepa  $4X\Delta ape2$ , con el vector pRSP-ape2T.
3. Corroborar la reversión del fenotipo aberrante al normal en la cepa revertante mediante cinéticas de crecimiento y microscopia de fluorescencia.
4. Realizar el análisis bioinformático de los cambios de expresión en 4000 genes mediante microarreglo de la cepa mutante  $4X\Delta ape2$  y 4X como control.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Esquema de trabajo



## 6.2. Material y reactivos

Los reactivos usados en este trabajo son de las casas comerciales: Thermo Scientific, Promega, New England Biolabs, Difco, Jena Biocense, Vector Laboratories y Sigma Aldrich.

A lo largo de la realización de los experimentos, se mantuvieron las condiciones de asepsia y esterilidad requeridas.

El agua usada es tridestilada, que es desionizada y esterilizada

Todo el material, soluciones y medios se esterilizaron mediante autoclave, de 15 a 20 psi por 15 minutos.

## 6.3. Material biológico

Las cepas de *S. pombe* y *E. coli* usadas en este trabajo se nombran a continuación en la tabla 2. Donde también se detallan algunas de las características de su genoma, que son principalmente deleciones o mutaciones puntuales. Para los cultivos de cepas de *S. pombe* con auxotrofias es necesario suplementar los medios, aun tratándose de medios ricos como YE o YPD, pues dentro de los nutrientes que contienen, los requerimientos auxotróficos se agotan rápidamente, lo que ocasiona un aletargamiento en el crecimiento, en *S. pombe*, esta falta de nutrientes esenciales se ve reflejada en la aparición de una coloración rosada en los cultivos.

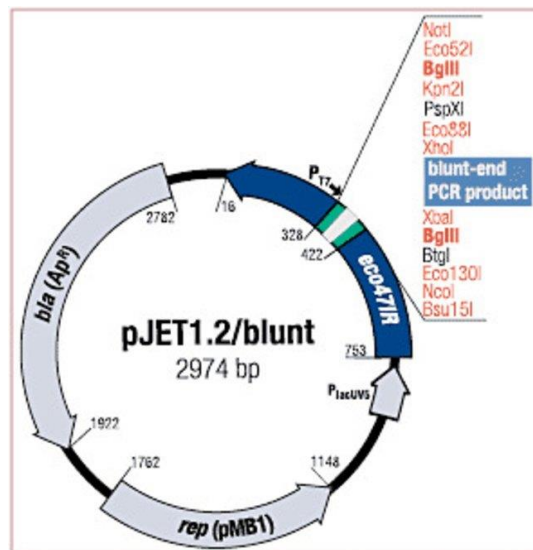
**Tabla 2. Microorganismos usados en el presente trabajo.**

Nombre	Genotipo
<i>S. pombe</i> 972	h <sup>-</sup>
<i>S. pombe</i> 201399 (4X)	H <sup>+</sup> ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, his7-366
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

## 6.4. Vectores utilizados

### 6.4.1. pJET1.2/Blunt

El vector pJET1.2/Blunt (Figura 12) de 2974 pb, es un plásmido que en su forma comercial esta linealizado, para poder clonar cualquier secuencia con extremos romos. Contiene el gen de resistencia a ampicilina como método de selección, un origen de replicación de alto número de copias, y un promotor T7 para la transcripción de la proteína en caso de requerirlo. Para este trabajo se usó este vector como método de resguardo y amplificación de las secuencias de interés.



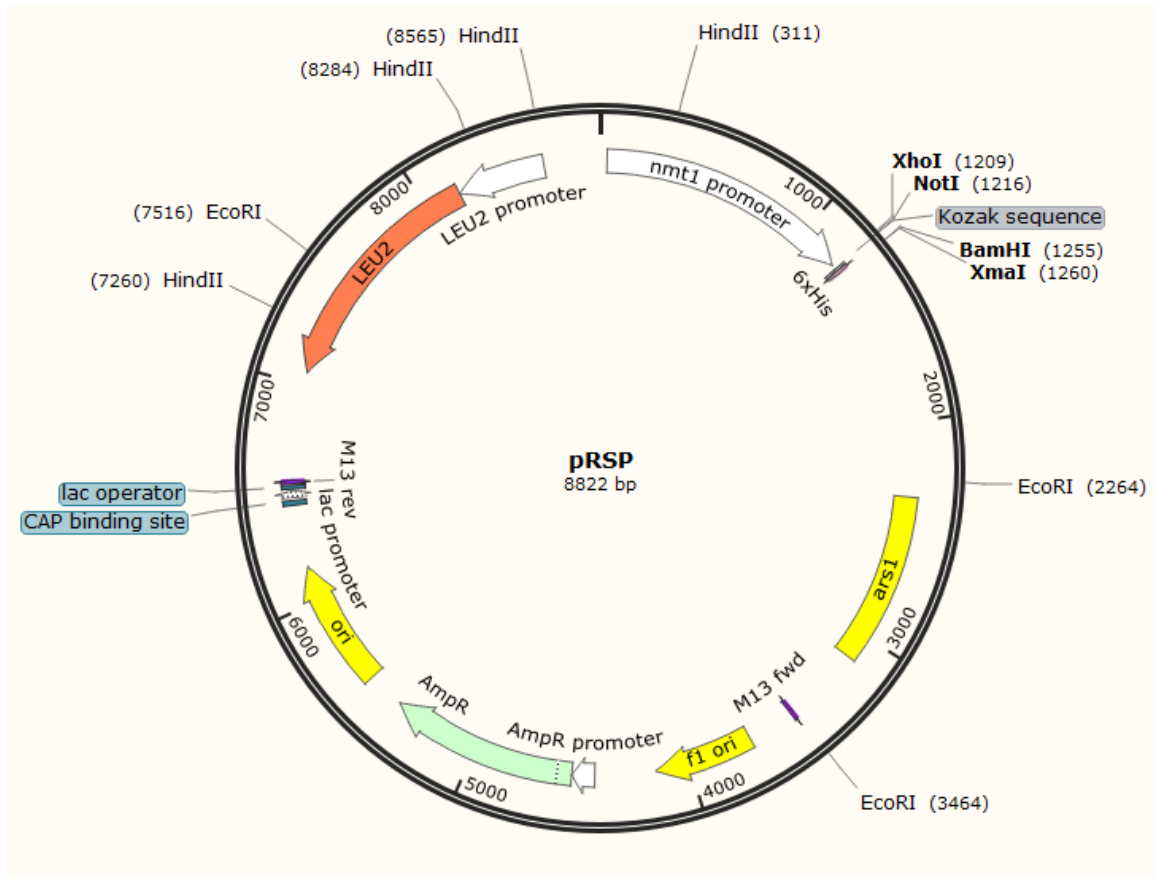
**Figura 12. Esquema del vector pJET1.2/Blunt en una conformación cerrada.**

Los elementos que contiene el vector se mencionan a continuación. La secuencia rep que es responsable de la replicación del vector. Un sitio de inicio de la replicación. El gen *bla* que codifica para la  $\beta$ -lactamasa que aporta a las células transformadas con el vector resistencia a ampicilina como elemento de selección. El gen letal *eco47IR*. El promotor del gen letal P<sub>lacUV5</sub>. El promotor T7 de la ARN polimerasa que permite la transcripción de la secuencia clonada. Un sitio de

clonación múltiple. Y sitios en los que hibridan los iniciadores pJET1.2, diseñados para la secuenciación del inserto.

#### **6.4.2. pRSP**

El plásmido pRSP de 8822 pb (Figura 13), es un vector de expresión para levaduras, está basado en la serie de vectores pRS que se generó en la levadura *S. cerevisiae*. Tiene como elementos importantes; el promotor de tiamina nmt1 que promueve la expresión de la secuencia clonada. La secuencia Kosak (presente en eucariontes) que promueve la traducción de la secuencia insertada. Una etiqueta de histidinas (6xHis) que se adiciona en el extremo 5' de la proteína. La secuencia ars1 de la levadura *S. pombe*, que es una secuencia de replicación autónoma. El origen de replicación del bacteriófago f1. Un gen de resistencia a ampicilina. Un origen de replicación bacteriano de alto número de copias, el sitio de unión CAP, un operador de lactosa. El promotor y marco de lectura del gen *leu2* de levaduras, que sirve como elemento de selección para la transformación de las mismas. En nuestro laboratorio a este vector se le insertó el gen *kin17* de *S. pombe* que codifica a una proteína de unión a ADN y ARN, la cual tiene un homólogo en humanos; esta clonación dio origen al vector PM082 que se puso en resguardo en cepas de *E. coli*. Por lo tanto, para obtener el vector pRSP se debe liberar el gen *kin17* mediante restricción por endonucleasas.



**Figura 13. Esquema del vector de expresión pRSP.**

### 6.5. Diseño de iniciadores para la reversión

Para el diseño de los iniciadores se partió de la secuencia SPAC13A11.05 (NCBI), se visualizó una región de 1000 pb río arriba del sitio +1. Los iniciadores se construyeron con la ayuda de la herramienta en línea Oligo Analyzer del IDT. Se buscó que compartieran entre ellos un % de GC y Tm muy parecidos para facilitar su uso en la amplificación por PCR. A la secuencia de los cebadores se agregaron sitios de restricción para llevar a cabo una clonación direccionada, Xho I en el iniciador sentido y Xma I en el antisentido. Los sitios de restricción son coincidentes en cuanto a la direccionalidad de la secuencia, con los que están presentes en el vector de pRSP, lo que permite la correcta expresión del gen. Los iniciadores y sus parámetros se muestran en la tabla 3. Donde se puede ver que el % de GC es cercano al 50%, lo que siempre es preferible, las Tm tienen entre

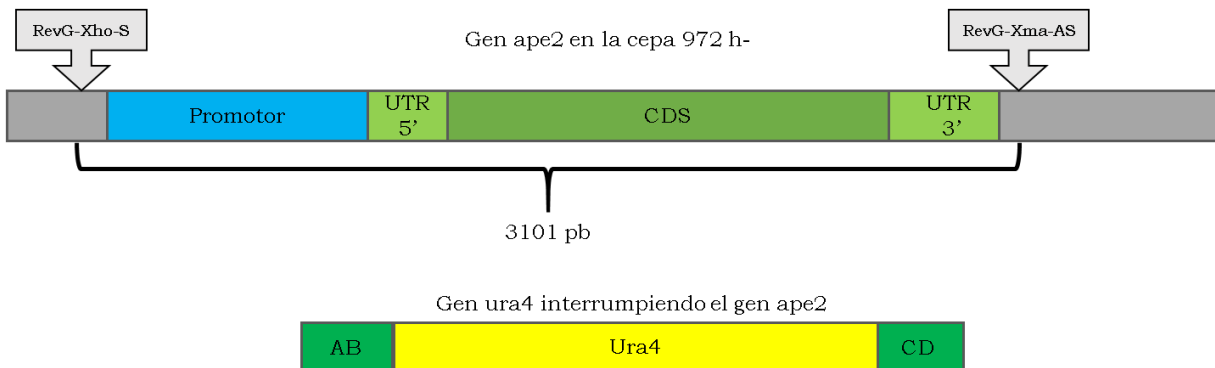
ellas una diferencia de 3.2 °C lo que permite una Tm de reacción en la que ambos iniciadores puedan hibridar sobre la plantilla.

**Tabla 3. Iniciadores para la amplificación del gen *ape2* con su promotor (*ape2T*).**

Remarcado en negritas se encuentran los sitios de restricción para las endonucleasas usadas en la subclonación.

Nombre	Secuencia	Longitud	% de GC	Tm (°C)
RevG-XhoI-S	5' <b>CTCGAG</b> AGATGCTGGCAACCTTCTAC 3'	26	53.8	60.6
RevG-XmaI-AS	5' ATT <b>CCCGGG</b> TTGTAAACTCGCACAGGAG 3'	28	53.6	63.8

El posicionamiento de los iniciadores en el contexto del gen *ape2* se muestra en la figura 14, donde se observa como el amplicón abarca la totalidad de la secuencia que genera el ARNm de 2130 pb, 914 pb del promotor y 42 pb de ADN cromosómico en la región 3', que sumados con los pb que se agregan por los sitios de restricción dan un total de 3101 pb. Esta amplificación abarca toda la secuencia que fue interrumpida, que si bien, no remplazara la secuencia de interrupción en el genoma, si sustituye la expresión de la LAP *yspII* y su función, llevando a cabo así una “reversión equivalente”.



**Figura 14. Posicionamiento de los iniciadores RevG en el contexto del gen *ape2*.**

## 6.6 Extracción de ADN cromosómico de levaduras

Protocolo basado en la metodología de Hoffman (2001) para la extracción de ADN genómico de levaduras.

1. Inocular un cultivo de *S. pombe* de 10 mL en medio YE. Incubar a 30 °C en agitación hasta obtener una DO a 600 nm de entre 2 y 3 UA.
2. Centrifugar a 8000 rpm por 2 min a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
3. Suspender el paquete celular en 500 µL de agua Mili-Q/estéril y mezclar en vórtex.
4. Centrifugar a 8000 rpm por 2 min a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
5. Adicionar 200 µL de solución de lisis para levaduras y 200 µL de fenol:cloroformo (5:1).
6. Adicionar aproximadamente 200 µL de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro.
7. Mezclar en vórtex durante 10 min hasta romper las células.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4 °C.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y adicionar 20 µg/mL RNAasa. Incubar a 37 °C durante 30 min.
10. Adicionar acetato de sodio 3M pH = 5.2. en un volumen igual a un decimo del volumen transferido.
11. Adicionar etanol absoluto frío hasta llenar el tubo.
12. Centrifugar a 12000 rpm por 15min a 4°C y eliminar el sobrenadante con una micropipeta sin tocar el precipitado.

13. Lavar el precipitado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % frío y centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4 °C. Eliminar el sobrenadante con una micropipeta sin tocar el precipitado.
14. Secar el precipitado a temperatura ambiente abriendo e invirtiendo el tubo para evaporar el etanol residual, no más de 10 min.
15. Suspender el precipitado en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.
16. Determinar la concentración y pureza del ADN mediante espectroscopia a 260 nm y 280 nm.\*
17. Conservar muestra a -20 °C.

\*Una relación  $\frac{260nm}{280nm} = 1.8$  a 2 equivale a una muestra pura, > 2.1 denota la presencia de ARN, < 1.6 quiere decir que existe contaminación con proteínas o fenoles.

### **6.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

A partir de ADN cromosómico de la cepa silvestre 972h- se amplificó por PCR el gen *ape2*. El iniciador sentido hibrida en la posición -914 pb con un sitio para XhoI, el antisentido lo hace en la el pb +2171 con sitio para XmaI. La amplificación se realizó usando el kit de PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific (K0171). Tomando como referencia el manual del kit, las concentraciones de la mezcla de reacción fueron las siguientes. Para una reacción de 20  $\mu\text{L}$ : 10  $\mu\text{L}$  de Master Mix 2X, 1  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 0.1  $\mu\text{g}$  de ADN cromosómico, agua libre de nucleasas hasta llegar a 20  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 4, que se tomaron de la hoja técnica del kit, estableciendo como  $T_m$  de reacción 57 °C. Las concentraciones de la mezcla de reacción y las condiciones de PCR se confirmaron por triplicado en reacciones de 20  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 4. Condiciones de la PCR.** Con las que se logró la amplificación del gen ape2 incluyendo al promotor.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>No Ciclos</b>
Desnaturalización Inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineamiento	57	30 s	
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	10 min	1
Recuperación	25	5 min	1

### **6.8. Purificación de banda a partir de gel de agarosa.**

La purificación de la banda se llevó a cabo usando el kit GeneJET Gel Extracción (K0691) de Thermo Scientific de acuerdo al protocolo marcado, que se describe a continuación.

1. El producto de PCR se carga en un gel de agarosa al 7 % con buffer de carga para ácidos nucleicos 6X.
2. El corrimiento electroforético se realizó con buffer TBE 0.5X a 80 V y 30 min.
3. La banda se cortó de forma rápida para someter el menor tiempo posible el amplicón a la radiación UV y se traspasó a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
4. La banda se disolvió con la solución Buffer de unión, en un proporción 1:1, usando 100 µL por cada 100 mg de gel.

5. La mezcla se incubó a una temperatura de 50-60 °C por 10 min, para la completa disolución de la agarosa.
6. La dilución se pasó a la columna de purificación en tandas de 800 µL.
7. Se centrifugó a 12000 g por 1 min desechando el fluido filtrado.
8. Se adicionaron 700 µL de Buffer de lavado y se centrifugó a 12000 g por 1 min.
9. Se realizó una centrifugación más, sin agregar solución alguna, para eliminar las trazas de las soluciones anteriores de la resina.
10. La columna se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio, se agregaron 30 µL de Buffer de elución y se centrifugó por 1.5 minutos a 12000 g.
11. El purificado se guardó a -20 °C.

### **6.9. Ligación de secuencias linealizadas a vectores**

Para calcular la cantidad de inserto en cada caso se siguió la siguiente fórmula:

$$ng\ i = \left( \frac{(ng\ v)(Kb\ i)}{Kb\ v} \right) \left( \frac{i}{v} \right)$$

Donde:

- $ng\ i$  = ng de inserto a usar
- $ng\ v$  = ng usados del vector
- $kbi$  = longitud del inserto en kb
- $kbv$  = longitud del vector en kb
- $i/v$  = relación inserto: vector

### 6.9.1. Ligación a pJET1.2/Blunt

Se usó el kit CloneJET PCR clonig (K1231), siguiendo la metodología para extremos adhesivos generados por la Taq polimerasa marcada en la hoja técnica. La mezcla de reacción se describe a continuación.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Buffer de reacción 2X	10
Producto de PCR	7 (150 a 200 ng)
Agua libre de nucleasas	Hasta 17
Enzima DNA Blunting	1
<i>Volumen total</i>	18

1. Mezclar brevemente en vórtex y centrifugar entre 3 a 5 segundos.
2. Incubar la mezcla de reacción a 70 °C por 5 minutos. Colocar brevemente en hielo.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
pJET 1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 (50 ng)
T4 DNA Ligase	1
<i>Volumen final</i>	20

3. Mezclar brevemente en vórtex y centrifugar de 3 a 5 segundos.
4. Incubar la mezcla de reacción de ligación a 4 °C durante 12 a 16 h.
5. Usar la mezcla de ligación directamente para la transformación de bacterias.

### 6.9.2. Ligación a pRSP

<b>Componente</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Buffer de reacción 10X	2
Purificado de banda	7 (80 y 260 ng)*
pRSP linealizado	4 (100 ng)
Ligasa T4	1
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 μL
<i>Volumen total</i>	20

1. Mezclar brevemente en vórtex y centrifugar de 3 a 5 segundos.
2. Incubar la reacción de ligación a 4 °C durante 12 a 16 h.
3. Usar la mezcla de ligación directamente para la transformación de bacterias.

\*Con base en las relaciones molares aproximadas, se calculó el volumen del fragmento de ADN a ligar y el volumen del vector de clonación para tener una relación inserto: vector 3:1 y 10:1.

## **6.10. Transformación de bacterias**

Metodología basada en el protocolo No 25 del capítulo 1, para la transformación de *E. coli* mediante cloruro de calcio del manual Molecular Cloning de Sambrook y Russell, 3° edición.

Esta metodología se realizó en campana de flujo laminar con soluciones y material estéril.

### **Preparación de competentes**

1. Inocular un precultivo de *E. coli* en 3 mL de medio LB a 37 °C con agitación (180 rpm) entre 16 a 18 h.
2. Con el precultivo inocular un cultivo de 25 mL de LB e incubar a 37 °C con agitación (180 rpm) hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0.35$  UA (aproximadamente 2 h). Monitorear el crecimiento del cultivo cada 20 minutos después de 90 minutos de crecimiento.
3. Transferir el cultivo a un tubo de centrifuga estéril y colocar en hielo por 10 minutos.
4. Centrifugar a 4100 rpm por 10 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
5. Colocar el tubo en posición invertida por 1 min para eliminar las trazas de medio.
6. Suspender la pastilla de células en 15 mL de  $MgCl_2/CaCl_2$  (80mM/20mM respectivamente) frío.
7. Centrifugar a 4100 rpm por 10 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
8. Colocar el tubo en posición invertida por 1 minuto para eliminar trazas de la solución.

9. Suspender el precipitado en 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M frío y transferir las células competentes a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
10. A partir de este punto las células están listas para ser transformadas

### **Transformación**

1. Tomar 200  $\mu\text{L}$  de células competentes y adicionar 50 ng del ADN plasmídico en un volumen no mayor a 10  $\mu\text{L}$  en un tubo de microcentrifuga nuevo.
2. Mezclar las células suavemente por pipeteo.
3. Incubar las células en hielo durante 30 min.
4. Transferir el tubo a un baño maría a 42 °C por 90 segundos exactamente.
5. Transferir el tubo inmediatamente en hielo por 2 min.
6. Adicionar 800  $\mu\text{L}$  de medio LB e incubar de 45 min a 2 h a 37 °C con agitación (180 rpm).
7. Sembrar en placas de LB con ampicilina en una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubar a 37 °C entre 12 a 16 h.

### **6.11. Extracción de ADN plasmídico de bacterias**

Metodología basada en el protocolo No 2 del capítulo 1, para la preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS del manual Molecular Cloning de Sambrook y Russell, 3° edición.

#### **Preparación de células**

1. Inocular con células *E. coli* transformadas 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) e incubar a 37 °C con agitación (180 rpm) durante 12 a 20 h.
2. Centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C y desechar el medio por decantación.
3. Colocar el tubo en posición invertida por 1 min para eliminar las trazas de medio.

#### **Lisis celular**

4. Suspender la pastilla con 200 µL de solución de lisis I fría y agitar vigorosamente en vórtex. Transferir la suspensión a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
5. Adicionar 400 µL de solución de lisis II (preparada al momento y a temperatura ambiente). Mezclar la suspensión invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces (no usar vórtex). Mantener el tubo en hielo.
6. Adicionar 300 µL de solución de lisis III fría. Mezclar la suspensión invirtiendo el tubo varias veces hasta observar la suspensión viscosa y traslucida. Mantener el tubo en hielo entre 3 a 5 min.
7. Centrifugar el lisado celular a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C.
8. Transferir cuidadosamente aproximadamente 600 µL del sobrenadante a un tubo limpio.

9. Adicionar 1 volumen igual (600  $\mu$ L) de fenol: cloroformo (5:1) y mezclar la emulsión en vórtex.
10. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a 4°C.
11. Transferir cuidadosamente la fase superior a un tubo limpio evitando mezclarla con la fase orgánica (inferior).

### **Recuperación del plásmido**

12. Adicionar 600  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar la solución en vórtex y mantener el tubo a temperatura ambiente por 2 minutos.
13. Centrifugar a máxima velocidad por 5 min a temperatura ambiente.
14. Retirar el sobrenadante sin tocar el precipitado. Dejar el tubo en posición vertical e invertida sobre una toalla de papel para que se evapore el isopropanol residual.
15. Adicionar al precipitado 1 mL de etanol al 70 % y centrifugar a máxima velocidad durante 2 min a temperatura ambiente.
16. Retirar el sobrenadante procurando que las paredes del tubo queden libres de gotas residuales de etanol. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol se haya evaporado por completo. \*
17. Adicionar entre 30 a 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y mezclar.
18. Agregar 20  $\mu$ g/mL de RNasa y mezclar suavemente. Incubar a 37 °C durante 30 min.
19. Almacenar a -20°C.
20. \* En caso de que el precipitado se seque excesivamente, se recomienda incubar los extractos plasmídicos a 60 °C por 5 min

## 6.12. Transformación de levaduras

Metodología usando Acetato de Litio. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente.

1. Inocular un precultivo de 3 mL de medio YE e incubar a 30 °C por 24 h.
2. Inocular con el precultivo un cultivo de 10 mL de medio YE hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 2$  UA.
3. Centrifugar el cultivo a 4000 rpm por 5 min y desechar el sobrenadante.
4. Lavar la pastilla con 5 mL de TE pH = 7.5 estéril, centrifugar a 4000 rpm por 5 min y desechar el sobrenadante.
5. Suspender la pastilla en 4 mL de acetato de litio 1 M estéril (disuelto en TE pH = 7.5) e incubar a 30 °C por 1 h en agitación constante (130 rpm).
6. Centrifugar a 4000 rpm por 5 min y desechar el sobrenadante.
7. Suspender el precipitado en 200  $\mu$ L de acetato de litio 1 M estéril (disuelto en TE pH = 7.5) y transferir a un tubo de 1.5 mL.
8. Añadir 10  $\mu$ L (250ng) de plásmido e incubar a 30 °C por 10 min.
9. Agregar 1 mL de PEG-4000 al 50 % estéril e incubar a 30 °C por 60 min.
10. Dar un choque térmico pasando el tubo a 42 °C por 5 min. Centrifugar mediante pulsaciones para bajar el líquido de las paredes del tubo.
11. Agregar 1 mL de sorbitol 0.8 M estéril, centrifugar a 4000 rpm por 5 min y desechar el sobrenadante.
12. Agregar 200  $\mu$ L de sorbitol 0.8 M estéril y sembrar en placas de medio YNB con los requerimientos auxotróficos pertinentes.

### **6.13. Obtención de extracto celular soluble**

El protocolo está basado en la metodología descrita por Arbesú *et al.*, 1991.

1. Tomar 5 mL de cultivo con  $DO_{600nm} = 2$  UA.
2. Centrifugar a 6000 rpm por 10 min a 4 °C.
3. Lavar 2 veces las células con agua estéril y centrifugar a 6000 rpm por 10 min a 4 °C.
4. Suspender las células en 60  $\mu$ L de Tris/HCl 20 mM pH = 8 con 0.1 mg de zimoliasa 20-T.
5. Incubar a 37 °C por 30 min.
6. Suspender en un volumen final de 100  $\mu$ L de Tris/HCl 20 mM pH = 8.
7. Adicionar perlas de vidrio de 0.5mm de diámetro, en igual volumen que la suspensión celular.
8. Agitar en vórtex durante 10 minutos, alternando 30 s en agitación y 30 s en hielo.
9. Añadir 200  $\mu$ L de Tris/HCl 20 mM pH = 8 y agitar vigorosamente.
10. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4 °C.
11. Separar el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL limpio, añadir al paquete celular 200  $\mu$ L de Tris/HCl 20 mM pH = 8, agitar en vórtex y centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4 °C.
12. Separar el sobrenadante, mezclarlo con el que se obtuvo anteriormente y descartar la pastilla.
13. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4 °C y separar el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga (aprox. 400  $\mu$ L de extracto celular soluble).
14. Guardar a -20°C.

#### 6.14. Determinación de proteínas totales

Esta técnica se basa en la conversión de color del azul brillante de Coomassie G-250 en una solución ácida, de un color naranja pardo a un azul intenso. La intensidad del azul está directamente relacionada con la concentración de proteínas de la muestra. El protocolo está basado en la metodología descrita por Sedmak y Grossberg en 1977. La preparación de la solución de azul de Coomassie se detalla en anexos.

Para cada ensayo se debe realizar una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 0.1 mg/mL, como se muestra a continuación:

<b>Tubo</b>	<b>Agua (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>BSA [0.1 mg/mL] (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Solución Azul de Coomassie (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Blanco	500	0	500
1	490	10	500
2	480	20	500
3	460	40	500
4	440	60	500
5	420	80	500
6	400	100	500
7	360	140	500
8	300	200	500

Preparación de las muestras:

<b>Tubo</b>	<b>Agua (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Muestra (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Solución Azul de Coomassie (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
n	500-x	x	500

1. Agregar los componentes de las tablas en tubos de ensayo.
2. Mezclar vigorosamente.
3. Dejar reposar la reacción por 10 min. \*
4. Medir absorbancia a 620 nm. \*\*

(\* ) La absorbancia es estable entre 60 a 90 min a temperatura ambiente.

(\*\*) Para la interpolación, es necesario que los valores de Abs de las muestras queden dentro del rango de la curva patrón.

Cálculo de la concentración de proteínas totales.

Se realiza una interpolación con las Abs a 620 nm de las muestras en la curva patrón de BSA.

1. Graficar los  $\mu\text{g}$  de albúmina\* [eje x] contra la Abs a 620 nm [eje y].
2. Obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que debe ser mayor a 0.9 para validar el ensayo.
3. Ajustar los valores de absorbancia de la curva patrón de BSA, mediante la ecuación de la recta, obteniendo así los valores ajustados con los que se realizará la interpolación. \*\*
4. Mediante el método de mínimos cuadrados obtener los  $\mu\text{g}$  de proteínas totales de cada muestra.
5. Dividir el resultado anterior entre los  $\mu\text{L}$  usados de muestra, obteniendo la concentración de proteínas totales en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

(\* ) Los  $\mu\text{g}$  de BSA se deducen de los  $\mu\text{L}$  de solución de BSA (0.1 mg/mL) usados en la curva patrón; dividiendo los  $\mu\text{L}$  de solución usados entre 10.

(\*\*) El cálculo se hace para cada punto tomando los  $\mu\text{g}$  de BSA como "x".

### 6.15. Determinación de la actividad enzimática

El protocolo usado está basado en el método descrito por Frey y Röhm y modificado por Herrera-Camacho *et al.*, 2007.

El sustrato que se usa es la L-Leucina-p-nitroalánina (L-Leu-p-NA). Se forma de una molécula cromófora (p-nitroalánina) unida por un enlace peptídico a un aminoácido, L-Leucina en este caso. En esta metodología, la actividad se determina por la cantidad de moles de sustrato hidrolizado, que a su vez estará directamente relacionado con la intensidad del color (amarillo) que se cuantifica por espectrofotometría.

La mezcla de reacción se detalla a continuación.

<b>Componente</b>	<b>μL</b>	<b>Concentración final</b>
Agua	225	
Tris/HCl 200 mM pH= 8.5	125	50 mM
MnCl <sub>2</sub> 10 mM (*)	50	1 mM
Extracto soluble (**)	50	
Incubación		
L-Leu-p-NA 10 mM (*)	50	1 mM
<i>Volumen final</i>	500	

Para la reacción control o blanco se sustituye el extracto soluble por agua.

1. En un tubo de ensayo mezclar agua, Tris/HCl, MnCl<sub>2</sub> y extracto soluble (agua en el blanco) y se incuban por 10 min a 37 °C.

2. Enseguida agregar los 50  $\mu\text{L}$  de sustrato.
3. Incubar a 37 °C hasta la aparición de una coloración amarilla en la solución de reacción (revisar la reacción cada 30 minutos).
4. Detener la incubación y agregar 500  $\mu\text{L}$  de solución de paro y agitar vigorosamente.
5. Incubar a 4°C por 10 minutos.
6. Vaciar la reacción en celdas de 1 cm.
7. Leer la absorbancia a 405 nm usando la reacción testigo como el blanco.

(\*) Estas soluciones deben protegerse de la luz. El sustrato se debe mantener en congelación.

(\*\*) La cantidad de extracto soluble usado en la reacción puede variar, compensando el cambio con la disminución o aumento del volumen de agua.

Solución de paro:

EDTA 40mM pH= 8

Cloroquina 20mM

Esta solución se prepara al momento de usarla (500  $\mu\text{L}$  por reacción) a partir de concentrados 2x de los componentes (EDTA 80mM pH= 8 y cloroquina 40mM).

## Cálculo de parámetros

1. Miliunidades enzimáticas (mU). Una miliunidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un nmol de sustrato por minuto.

$$mU \text{ (nmol/ min)} = \frac{Abs}{(t)(\epsilon)(l)} (0.001)(10^9)$$

Donde:

Abs = absorbancia a 405 nm.

t= tiempo de reacción en min.

$\epsilon$ = coeficiente de extinción molar de la p-NA ( $9900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

l= longitud de la celda en cm (1).

0.001= volumen final en el que se mide la absorbancia en litros.

$10^9$  = factor de conversión de moles a nanomoles.

2. Actividad específica. Es la cantidad (cociente) de mU por mg de proteína total de la muestra.

$$\text{Actividad específica [nmol/ min)/mg]} = \frac{mU}{mg}$$

Donde:

mU = miliunidades enzimáticas.

mg = mg de proteína total en la reacción.

### **6.16. Sincronización celular en fase G1 mediante inanición de nitrógeno**

Para obtener cultivos de *S. pombe* sincronizados en la fase G1 del ciclo celular por inanición de nitrógeno, se siguió la metodología descrita por Kazuki (1995) con algunas modificaciones:

1. Inocular un precultivo de *S. pombe* en 3 mL de medio YE. Incubar a 30 °C en agitación (250 rpm) hasta alcanzar  $DO_{600nm} = 3$  UA.
2. Inocular un cultivo de 10 mL de medio EMM2 con densidad óptica inicial de 0.2 e incubar a 30 °C en agitación (250 rpm) hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 2.4$  UA (entre 18 a 24 h).
3. Centrifugar a 8000 rpm por 10 min a 4 °C y descartar el sobrenadante.
4. Lavar células con agua estéril por triplicado centrifugando a 8000 rpm por 5 min a 4 °C y descartar el sobrenadante.
5. Suspender las células en 20 mL de medio EMM2-N partiendo de una  $DO_{i600nm} = 0.4$  UA, incubar a 30°C en agitación constante (250 rpm) por 36 horas\*.

(\*) Aproximadamente el 100% de la población celular sincronizada en fase G1 se observa a las 36 horas de inanición de nitrógeno.

### 6.17. Cinética de crecimiento

Una vez que se ha sincronizado el cultivo de *S. pombe* en fase G1, se realiza la curva de crecimiento en medio mínimo EMM2.

1. Inocular 2 cultivos en medio EMM2, con un desfase de 12 h, ambos con una  $DO_{i600nm} = 0.2$  UA
2. Monitorear el crecimiento celular midiendo la densidad óptica de ambos cultivos (A y B) cada 4 horas durante 12 h continuas por 3 días seguidos.
3. Graficar las absorbencias y construir la curva de crecimiento utilizando el modelo de crecimiento microbiano de Monod, con una modelación logística integrada.

Ecuación del modelo logístico integrado:

$$x = \frac{x_0 * e^{\mu_{max} * t}}{1 + \frac{x_0}{x_{max}} (e^{\mu_{max} * t} - 1)}$$

Una vez que se obtienen los parámetros cinéticos se calcula el tiempo de duplicación con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\ln \frac{2x_0}{x_0}}{\mu_{max}} = \frac{\ln 2}{\mu_{max}}$$

### **6.18. Determinación de viabilidad celular**

Durante la cinética de crecimiento se tomaron muestras, las cuales fueron observadas al microscopio y contadas en una cámara de Neubauer. Las muestras celulares se diluyeron hasta que el número de células por cada cuadrante fue el adecuado para llevar a cabo la medición, 100 células por cada cuadrante. Una vez establecida la dilución de la muestra celular, la suspensión se tiñó con azul de tripano. El conteo celular se llevó a cabo tomando en cuenta los 4 cuadrantes medianos.

### **6.19. Fijación celular mediante formaldehído**

1. Tomar 267.5  $\mu\text{L}$  de cultivo celular.
2. Adicionar 32.5  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37 %.
3. Incubar durante 1 hora en hielo mezclando por inversión cada 15 min.
4. Centrifugar las células a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C.
5. Suspender el paquete celular en 60  $\mu\text{L}$  de PBS 1X.
6. Guardar las células fijadas a 4 °C.

### **6.20. Tinción con fluoróforos (DAPI y FM 4-64)**

La microscopia de fluorescencia permite apreciar detalles de la estructura celular, así como estudiar procesos de manera más amplia, al permitir experimentos *in vivo*, diferenciar partículas muy pequeñas y permite localizar moléculas específicas en la célula. La técnica aprovecha la especificidad de unión y la capacidad de los fluoróforos para absorber energía (luz en este caso), llegando a un punto de máxima excitación, inmediatamente después de la cual, emite esa misma energía, pero en menor cantidad en forma de radiación lumínica.

Los fluoróforos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Se usó una mezcla lista para su uso "VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI" de la casa comercial Vector Laboratories, con una concentración de 1.5 µg/mL. Tiene una excitación máxima a 358 nm y emite a 461 nm. Se une a ADN bicatenario, específicamente en el surco menor donde forma interacciones, preferente con el pb A-T.

FM 4-64 Dye (N-(3-Trietilaminopropil)-4-(6-(4-(Dietilamino) Fenil) Hexatrienil) Piridin Dibromida) de la casa comercial Invitrogen con una concentración de 1 µg/µL. Tiene una excitación máxima a 510 nm y emite a 640 nm. Es una molécula lipofílica gracias a un radical estiril (derivado del estireno), por lo que se une a membranas lipídicas.

La reacción se llevó a cabo como se describe a continuación.

1. Tomar 15 µL de células fijadas con formaldehído y adherir a una laminilla de vidrio mediante calor (50 °C por 2 a 5 min).
2. Mezclar en un portaobjetos con 10 µL de solución DAPI (0.015 µg) y 2 µL de una dilución 1:100 de FM 4-64 (0.02 µg).
3. Colocar un cubreobjetos y sellar con esmalte cosmético transparente.
4. Observar con microscopio de fluorescencia de contraste de fases, con la longitud de onda adecuada para cada fluoróforo.

### **6.21. Ensayo de microarreglo da ADN**

Los microarreglos son herramientas moleculares que permiten el análisis de la expresión de un número grande de genes (miles), siendo en cierta forma una “fotografía” del transcriptoma. Se trata de un arreglo ordenado en columnas y filas de cadenas de ADN complementario adheridas a una superficie sólida mediante una molécula intermediaria. Las aplicaciones de los microarreglos son diversas, dentro de las que se destacan la posibilidad de estudiar la expresión del genoma en un momento determinado o en función de algún estímulo o mutación. Además, permite realizar identificación de cepas, diagnóstico clínico, entre otras aplicaciones.

En el caso del presente trabajo el ensayo de microarreglo aporta un panorama general de las alteraciones en la expresión del genoma de *S. pombe* al interrumpir el gen *ape2*, de esta forma identificar que vías de señalización y metabólicas se ven afectadas y discriminar las que tengan relación con los efectos fenotípicos observados en la cepa mutante 4XΔ*ape2*.

El microarreglo se realizó en la Unidad de Microarreglos de ADN del Instituto de Fisiología Celular de la UNMA, México. Se usó ARN total de la cepa mutante 4XΔ*ape2* y 4X como control, obtenidos en un trabajo precedente. Se partió de células sincronizadas con las que se inocularon cultivos en medio EMM2 de la cepa 4X como control y la cepa mutante 4XΔ*ape2* como grupo experimental. Con base en las características fenotípicas de la cepa 4XΔ*ape2*, las muestras se tomaron a las 33 horas de incubación, que representa en la cinética de crecimiento, el final de la fase exponencial y el punto donde empieza a notarse la repartición desigual de las cromátidas hermanas. El ensayo se describe a continuación.

Se utilizaron microarreglos de *S. pombe* de la compañía MYcroarray (<http://www.mycroarray.com/index.html>).

## **Prehibridación**

Los portaobjetos se rehidrataron con vapor de agua a 60 °C y se fijaron con dos ciclos de luz ultravioleta (1200 J). Posteriormente se hirvieron durante 2 min a 92 °C. Los portaobjetos se lavaron con etanol al 95 % durante un minuto y se prehibridaron en SSC 5X, SDS al 0,1% y BSA al 1% durante una hora a 42 °C. Los portaobjetos se lavaron y secaron para una mayor hibridación.

## **Preparación de la sonda e hibridación a matrices.**

Se usaron 10 µg de ARN total para la síntesis de ADNc que incorpora dUTP-Alexa555 o dUTP-Alexa647 empleando el kit de marcaje de ADNc First-Strand (Invitrogen). La incorporación de los fluoróforos se analizó midiendo  $A_{555nm}$  para Alexa555 y  $A_{650nm}$  para Alexa647. Cantidades iguales de ADNc marcado se hibridaron usando la solución de hibridación UniHyb (TeleChem International INC). Las matrices se incubaron durante 14 h a 42 °C, y se lavaron 3 veces con SSC 1X, SDS al 0.05% a temperatura ambiente.

## **Generación de datos a partir de imágenes de matriz.**

La generación y cuantificación a partir de las imágenes de matriz se realizó en GenePix 4100A con el software complementario GenePix de Molecular Devices. Todas las imágenes fueron capturadas usando una resolución de 10 µm. Para cada punto, el valor medio de densidad Alexa555, Alexa647 y el valor medio de fondo se calcularon con el software ArrayPro Analyzer de Media Cybernetics.

## **Análisis estadístico de datos**

El análisis de datos del microarreglo se realizó con el software libre genArise, desarrollado en la Unidad de Computación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise lleva a cabo una serie de transformaciones: corrección de fondo, normalización mediante el algoritmo “lowess”, filtro de intensidad, replica del análisis y selecciona diferencialmente genes expresados. El objetivo de genArise es identificar cuáles de los genes

muestran evidencias de una expresión diferencial. El software identifica los genes con diferencias en su expresión obteniendo el valor de Z-score para cada gen, dicho parámetro estadístico mide el número de desviaciones estándar que se aleja un dato de la media, siguiendo la siguiente fórmula.

$$Z_i = \frac{R_i - \bar{R}}{S_R}$$

Donde:

$$R_i = \log_2 \left( \frac{Alexa647}{Alexa555} \right)$$

$$\bar{R} = \bar{X} \left\{ \log_2 \left( \frac{Alexa647}{Alexa555} \right) \right\}$$

$$S_R = S\{\bar{R}\}$$

Para la selección de los genes que hayan cambiado su expresión de forma significativa, se tomara en cuenta los elementos con un Z-score > 2. Cabe resaltar que para este trabajo cada uno de los 4000 genes se cuantifico por triplicado.

Dado el gran número de datos analizados, para el cálculo de las medias y desviaciones estándar se usó un algoritmo de ventana deslizante, para cada punto de datos.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

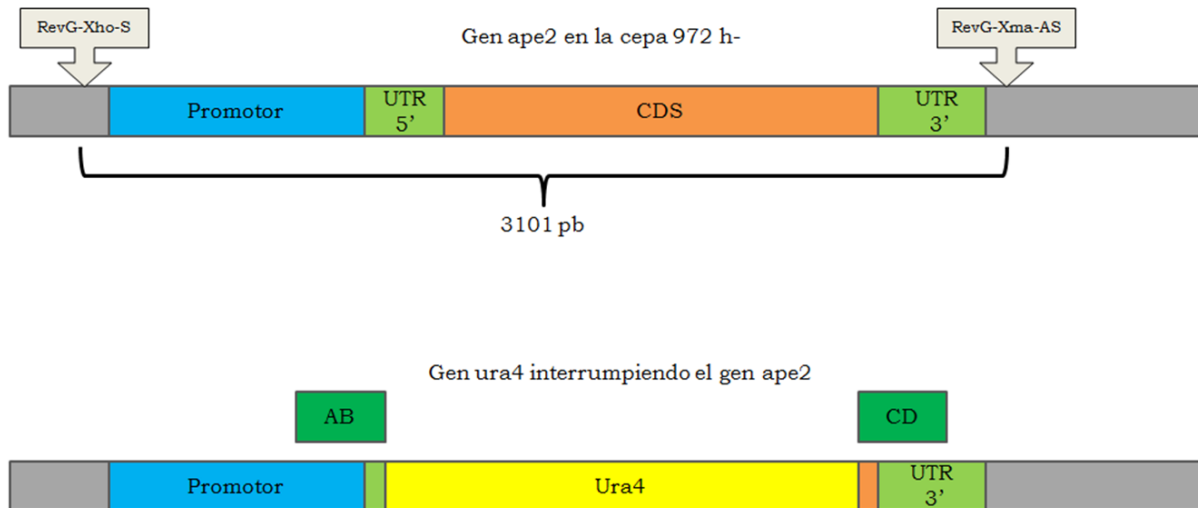
### 7.1. Obtención del vector de reversión pRSP-ape2T

Para comprobar que los efectos observados en la cepa mutante 4XΔape2 se deben a la ausencia de la LAP yspII, es necesario revertir los efectos de la mutación reintegrando la proteína a la célula, de forma que su expresión sea lo más parecida a la basal, por tal motivo la expresión de la proteína se debe regular por su propio promotor. Para este caso se optó por la opción de reintegrar el gen *ape2* completo, incluyendo la región codificante y la reguladora, por medio de un plásmido con la capacidad de permanecer en la célula y de permitir la expresión de la LAP yspII.

Tomando en cuenta los elementos del gen *ape2* que se describen en la sección 2, específicamente en la parte que corresponde a la secuencia en la base de datos del NCBI, que es referenciada con el número KJ756508.1. En dicha secuencia se encuentran los elementos descritos del gen, un promotor mínimo de 763 pb, el UTR 5' de 219 pb el CDS de 1542 pb y el UTR 3' de 369 pb. El tamaño total de la secuencia es de 2983 pb. Se decidió que la secuencia promotora a clonar estuviese alrededor de 900 a 1000 pb río arriba del sitio +1 y que abarcase por completo la secuencia del UTR 3', de esta manera se incluye tanto la región promotora, como, toda la parte que codifica para la proteína.

Para fines prácticos a esta amplificación del gen *ape2* se le llamará *ape2T*, siendo la T una referencia a la constitución total del gen. En la figura 15 se muestra esquemáticamente todas las regiones descritas del gen *ape2*, que fueron incluidas en la construcción de reversión. El amplicón se generó a partir de ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. pombe* 972 h-. Como se puede ver en la figura 15 los iniciadores se posicionan fuera de las regiones descritas del gen *ape2* incluyéndolas así en el amplicón de 3101 pb. En la parte inferior del esquema se muestra como se encuentra interrumpida la secuencia del gen *ape2* en el cromosoma de la cepa mutante 4XΔape2, estando posicionado el gen *ura4* dentro del marco de lectura y las regiones que abarcan las secuencias que se

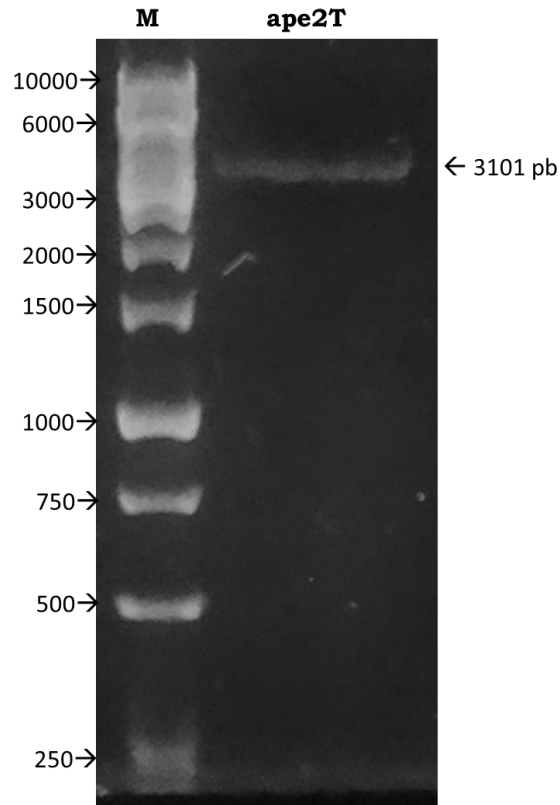
usaron como homologas en la estrategia de interrupción (AB y CD), con lo que se muestra como el amplicón incluye la región mutada del gen *ape2*.



**Figura 15. Representación esquemática del gen *ape2*.** En la cepa silvestre con la posición de los iniciadores (arriba) y en la cepa mutante (abajo).

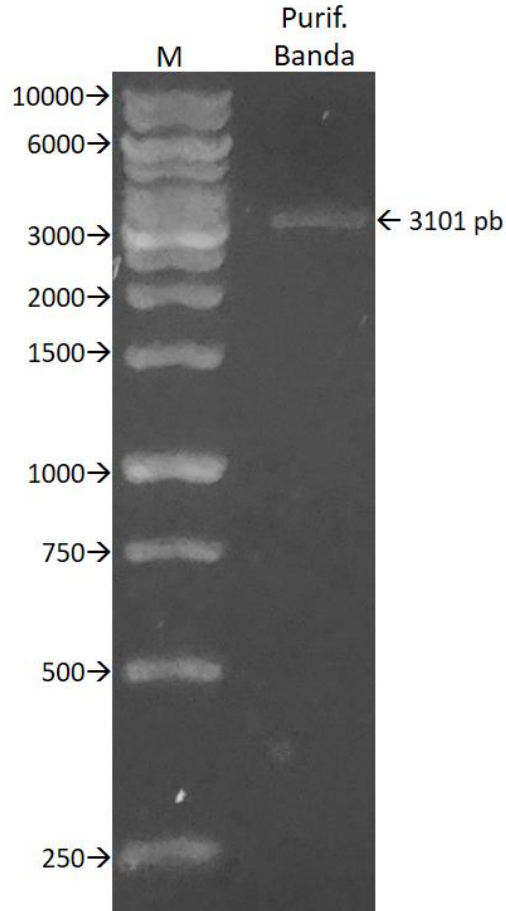
### 7.1.1. Amplificación y purificación del gen *ape2*

La amplificación del gen *ape2* se llevó a cabo con los iniciadores RevG, el amplicón obtenido (*ape2T*) visualizado en gel de agarosa se encuentra en la posición esperada con respecto al marcador, teniendo un tamaño de 3101 pb (Figura 16), donde se incluyen el promotor, el CDS y ambos UTRs cabe mencionar que los iniciadores aportaron al amplicón sitios de restricción para su posterior clonación, Xho I en el extremo 5' y Xma I en el extremo 3'.



**Figura 16. Amplicón *ape2T* (gen *ape2* completo).** A partir de ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. pombe* 972 h-. M: marcador de pb. Gel con 0.7 % de agarosa, TBE 0.5X, 85 V por 30 min.

La banda correspondiente al amplicón fue purificada a partir de gel de agarosa, usando el kit GeneJET Gel Extracción (K0691) de acuerdo al protocolo marcado en la hoja técnica. La corroboración de la purificación se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 17), donde se aprecia una única banda de 3101 pb que corresponde al amplicón *ape2T*.



**Figura 17. Purificación de la banda del amplicón ape2T.** M: marcador de pb. Gel con 0.7 % de agarosa, TBE 0.5X, 85 V por 40 min.

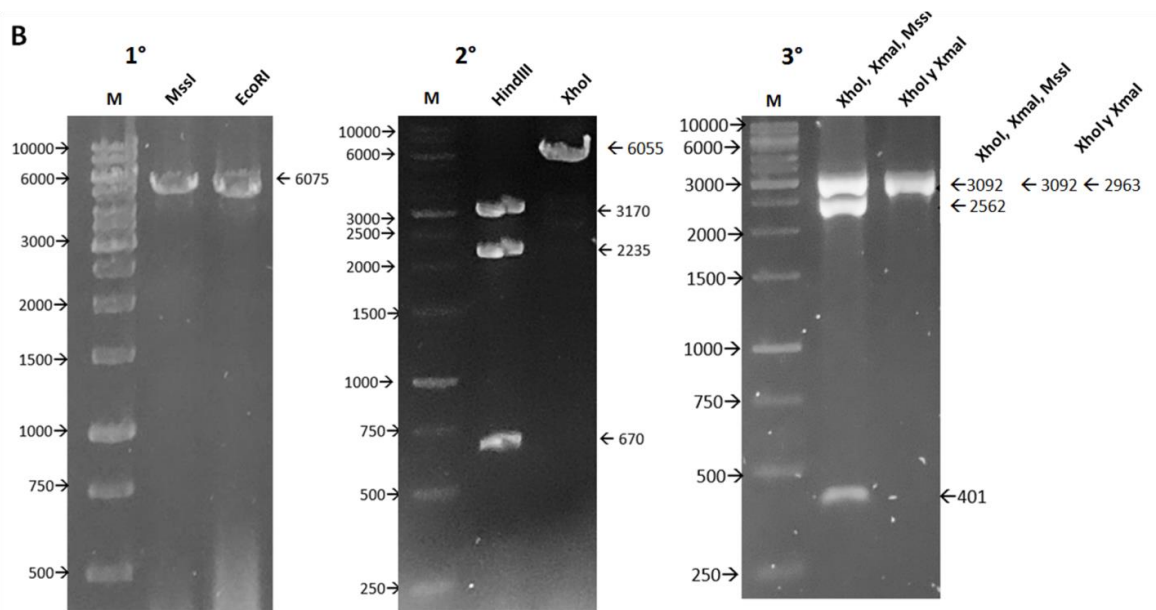
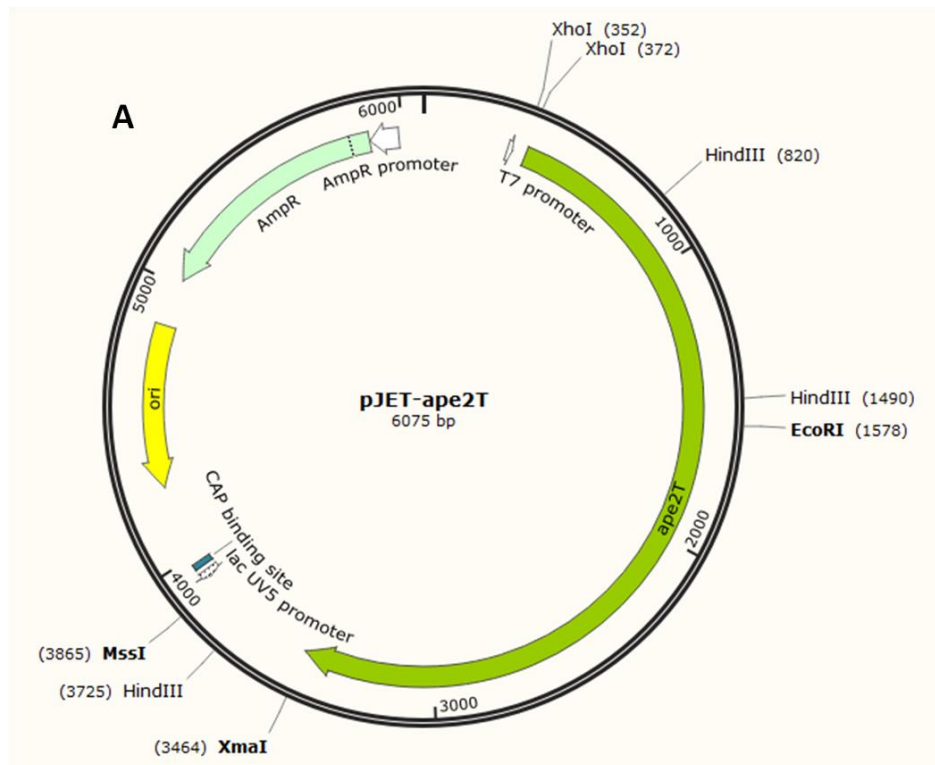
### 7.1.2. Resguardo del amplicón ape2T en el vector pJET1.2/Blunt.

El amplicón se ligó al vector pJET1.2/Blunt siguiendo el protocolo de ligación para extremos adhesivos generados por PCR, que marca la hoja técnica del kit CloneJET PCR clonning (K1231) de Thermo Scientific. Con la ligación se transformaron bacterias competentes de *E. coli* TOP10. Se sembraron cajas de LB/ampicilina (100 µg/mL) con 100 µL de células transformadas, obteniendo un crecimiento de 300 a 400 colonias. Se seleccionaron colonias, que fueron analizadas mediante extracción de ADN plasmídico y restricciones con endonucleasas.

### **7.1.3. Verificación de la construcción pJET-ape2T mediante restricción por endonucleasas**

En la figura 18A se muestra esquemáticamente la construcción pJET-ape2T que tiene un tamaño de 6075 pb, las características de este vector permitirán la amplificación de la secuencia del amplicón ape2T mediante cultivos de *E. coli*. El inserto se encuentra flanqueado por los dos sitios de restricción (XhoI y XmaI) cuyas secuencias se introdujeron con los iniciadores. En esta figura también se muestran sitios de restricción de interés para la identificación de la correcta construcción de este vector, en concreto para las enzimas XhoI, XmaI, HindIII, EcoRI y MssI. Dado que la construcción del vector se llevó a cabo mediante extremos romos, el inserto pudo clonarse tanto en la dirección que se muestra en el esquema, como en la dirección contraria, sin que esto afectara el propósito de la construcción, pero en este caso la clonación se llevó a cabo como se muestra en la figura 18A.

En la figura 18B se muestran las restricciones con las que se caracterizó positivamente al vector pJET-ape2T. En el primer gel están dos linealizaciones, una con MssI (2° carril) que corta sobre pJET y otra con EcoRI (3° carril) cuyo sitio de restricción está a la mitad del inserto; en ambos casos la banda corresponde al tamaño esperado de 6075 pb. En el segundo gel se obtiene un patrón de tres bandas, 3170, 2235 y 670 pb, usando HindIII (2° carril), así como también una banda de 5055 pb que corresponde a una digestión con XhoI (3° carril), la razón por la que esta banda es 20 pb más pequeña que las linealizaciones con MssI y EcoR I, se debe a que en la construcción existen dos sitios de restricción para XhoI, uno del vector y otro que se agrega al clonar el inserto. En el tercer gel se muestra una triple digestión (2° carril) con XhoI, XmaI y MssI. Se optó por la triple digestión debido a que solo usando una doble digestión con XhoI y XmaI (3° carril) no es posible distinguir las dos bandas que se generan, esto por su tamaño similar, 3092 del inserto y 2936 del pJET.



**Figura 18. Verificación del vector pJET-ape2T. A)** Vector pJET-ape2T y sitios de restricción que se usaron para la caracterización de la construcción. **B)** Restricciones del plásmido pJET-ape2T usadas para la caracterización del vector y la liberación del inserto ape2T para su posterior purificación. M: marcador de pb. Gel con 0.7 % de agarosa, TBE 0.5X, 85 V por 90 a 120 min.

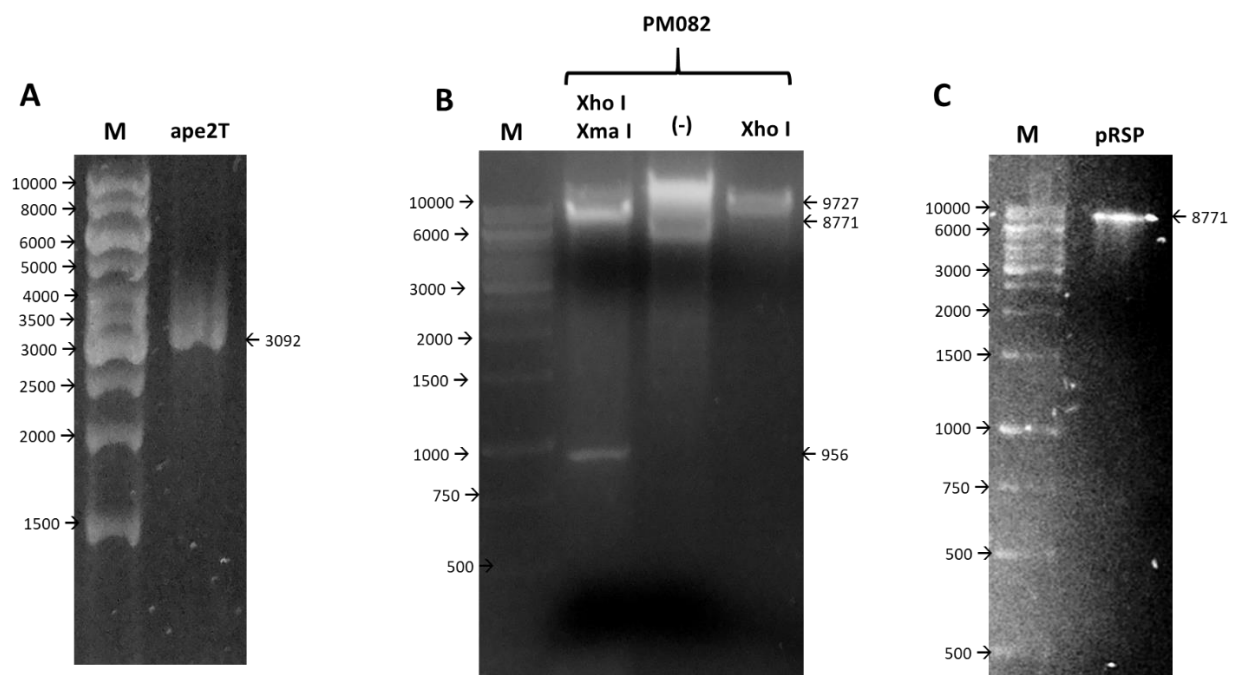
#### **7.1.4. Purificación del inserto ape2T**

Como se explica en la sección anterior, no es posible distinguir el inserto del vector pJET1.2/Blunt debido a los tamaños similares, lo que causa que en el gel de electroforesis se vea una sola banda. Por lo tanto, para obtener purificado el inserto se realizó una triple restricción. Usando las enzimas XhoI, XmaI (Cfr9I) y MssI (PmeI), las tres enzimas son de la casa comercial Thermo Scientific, lo que permitió realizar la reacción en un solo paso, usando buffer Tango de la misma casa comercial, que sirve para restricciones múltiples. La concentración más adecuada para este propósito fue de 1X, en la que las tres enzimas conservan una actividad media del 20 al 50 % de la actividad total. Se usaron 5 U de cada una con un tiempo de incubación de 16 h a 37 °C. Para la purificación de banda a partir de gel de agarosa se usó el kit GeneJET Gel Extracción (K0691) de Thermo Scientific de acuerdo al protocolo marcado en la hoja técnica. En la figura 19A se muestra la banda correspondiente al inserto ape2T purificado, la banda se encuentra en la posición esperada con respecto al marcador, teniendo un tamaño de 3092 pb y sin mostrar algún tipo de degradación.

#### **7.1.5. Purificación del vector de levaduras pRSP**

En nuestro laboratorio, para obtener el vector pRSP de 8822 pb, partimos del plásmido PM082 de 9727 pb, cuya diferencia con el pRSP es la presencia del elemento SPKin17 de 912 pb en el sitio de clonación múltiple, que corresponde al CDS del gen *kin17* de *S. pombe*, que codifica para la proteína KIN17 que se une a ADN de doble cadena mediante dedos de zinc. Para liberar este fragmento y a su vez obtener el vector pRSP abierto, se llevó a cabo una digestión doble con XhoI y XmaI, y de esta forma crear los extremos adhesivos en el vector pRSP que se necesitan para la subclonación. La reacción de restricción se llevó a cabo usando buffer Tango 1X, concentración con la cual ambas enzimas mantienen un porcentaje de actividad del 20 al 50 %, la incubación fue a 37 °C por 16 h. En la figura 19B, se muestra la doble restricción usando XhoI y XmaI (2° carril) obteniendo dos bandas, el fragmento SPKin17 con un tamaño de 956 pb y el

vector pRSP linealizado con un tamaño de 8771 pb. El 3° carril se trata de un control negativo del vector sin enzima y en el 4° carril se muestra la linealización de pPM082 con XhoI obteniendo una sola banda de 9727 pb. Para la purificación de banda a partir de agarosa del pRSP se usó el kit GeneJET Gel Extracción (K0691) de Thermo Scientific de acuerdo al protocolo marcado en la hoja técnica. En la figura 19C se observa el purificado de banda del vector pRSP linealizado, con el tamaño esperado de 8771pb y sin rastros de degradación.

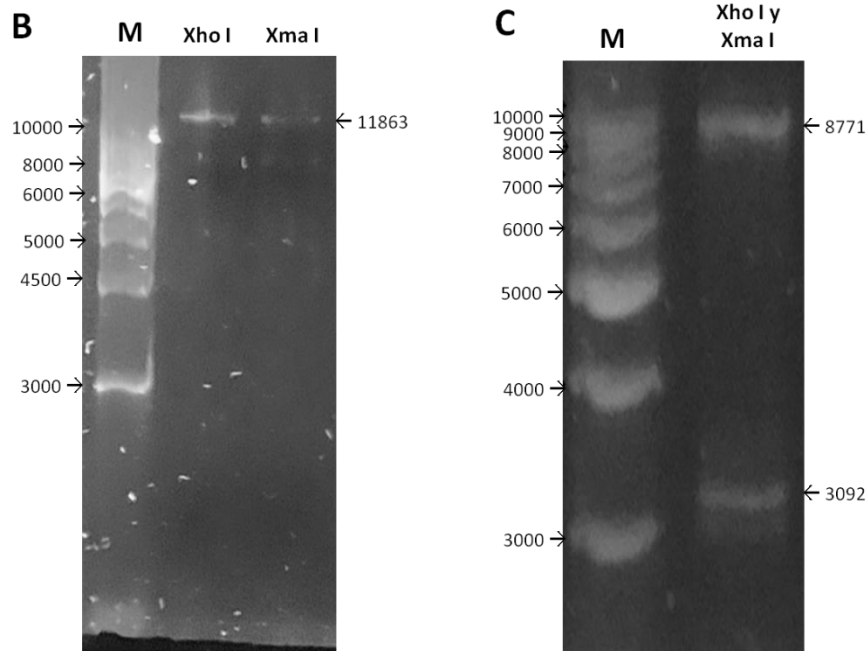
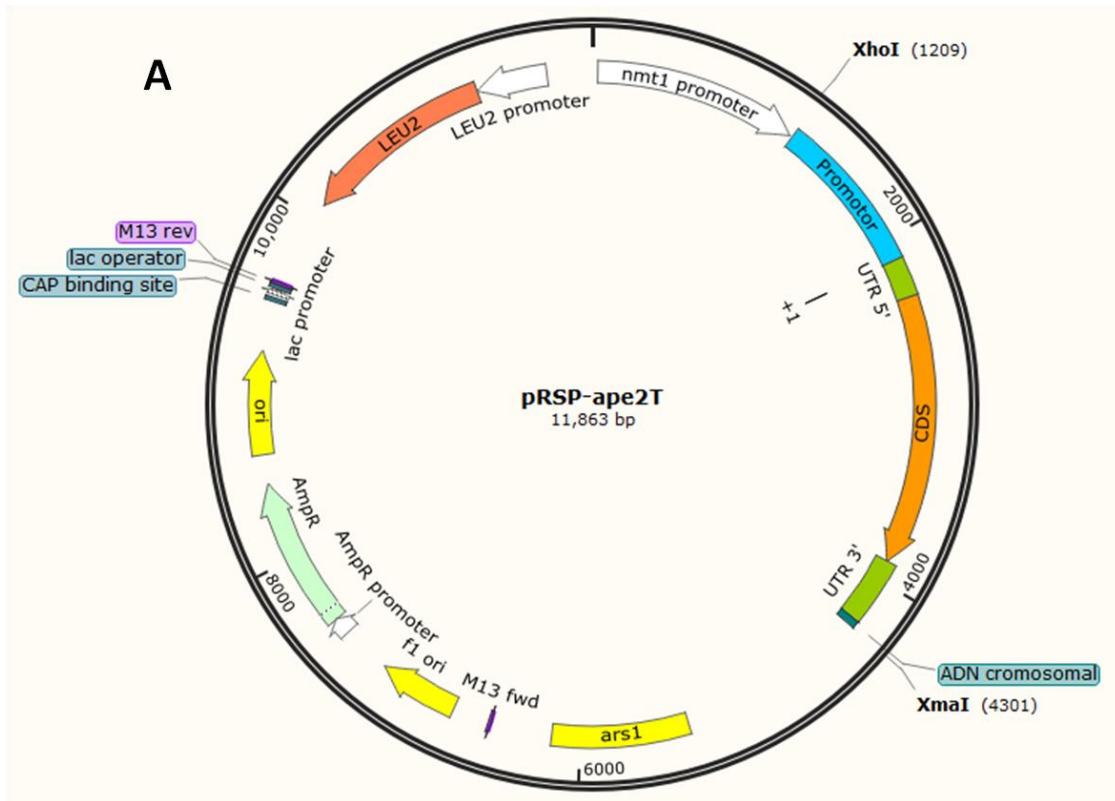


**Figura 19. Purificación del inserto ape2T y el vector pRSP.** **A)** Inserto ape2T purificado a partir de gel de agarosa. **B)** 2° carril: doble digestión de PM082 con XhoI y XmaI. 3° carril: control negativo sin enzima. 4° carril: linealización con XhoI del PMO82. **C).** Purificación de banda a partir de gel de agarosa del vector PRSP. M: marcador de pb. Gel con 0.7 % de agarosa, TBE 0.5X, 85 V por 60 a 120 min.

### **7.1.6. Construcción del vector de reversión pRSP-ape2T**

Para la construcción del vector de reversión, se realizó la subclonación del inserto ape2T en el vector pRSP linealizado. La se confirmó la construcción pRSP-ape2T se realizó mediante restricción por endonucleasas.

Una vez obtenidas las bandas purificadas de, tanto del inserto ape2T, con una concentración de 20 ng/ $\mu$ L, como del vector pRSP linealizado, con 17 ng/ $\mu$ L; se llevó a cabo la ligación del inserto ape2T en el vector pRSP. Con las ligaciones se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10, las clonas positivas se analizaron mediante la extracción y restricción de ADN plasmídico. La figura 20A muestra el esquema del vector de reversión pRSP-ape2T con los sitios de restricción para XhoI y XmaI, donde se insertó la secuencia ape2T en el vector pRSP, siendo posible visualizar los componentes del inserto: promotor, UTR 5', CDS, UTR 3' y una pequeña región de ADN cromosómico. El vector de expresión pRSP se describe en detalle en la sección 6.4.2, pero cabe resaltar al gen *leu2* que funciona como marcador de selección de las colonias, y a la secuencia de replicación autónoma (*ars1*) que permite que el plásmido pueda replicarse y de esta forma segregarse en las células hijas durante la mitosis. En la figura 20B se muestra la confirmación de la construcción pRSP-ape2T; linealización del vector con XhoI (2° carril) y Xma I (3° carril), en ambos casos se observa la presencia de una única banda, con el tamaño esperado de 11862 pb. Se realizó una doble digestión al vector de reversión con XhoI y XmaI (Figura 20C) lo que liberó el inserto apeT de 3092 pb del vector pRSP de 8771 pb, ambas bandas se observan en la posición esperada con respecto al marcador.



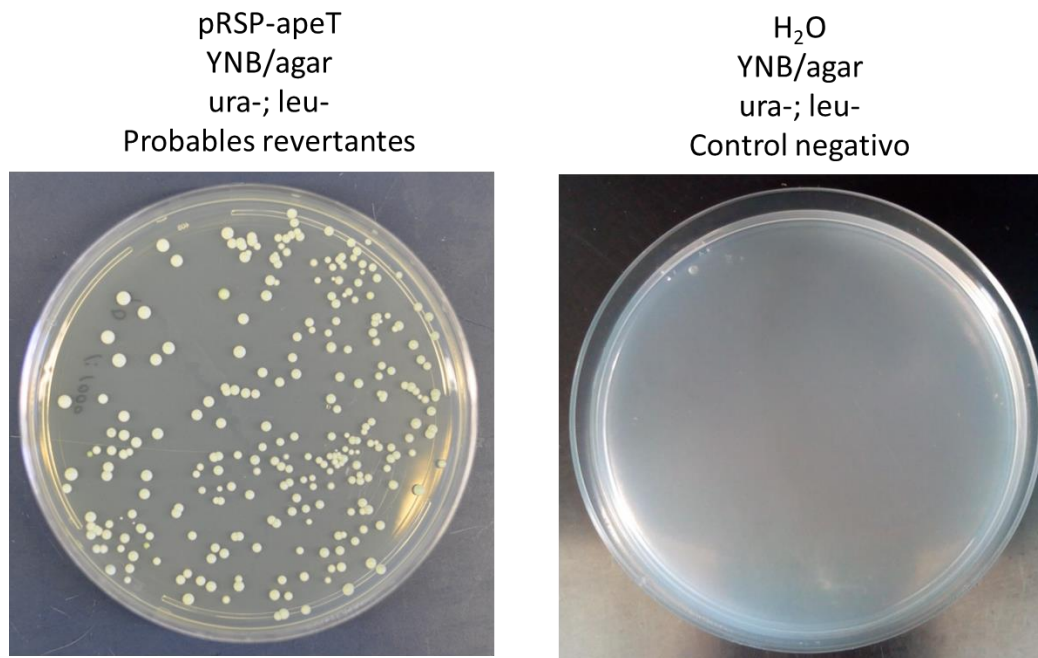
**Figura 20. Vector de reversión pRSP-ape2T.** **A)** Esquema del vector pRSP-ape2T, cuyos elementos permiten usarlo para la reversión. **B)** Linealizaciones del vector pRSP-ape2T: 2° carril XhoI, 3° carril XmaI. **C)** Doble restricción para la liberación del inserto ape2T. M: marcador de pb. Gel con 0.7 % de agarosa, TBE 0.5X, 85 V por 60 a 120 min.

## **7.2. Obtención de la cepa revertante de *S. pombe* 4XΔape2Rev**

Como ya se ha mencionado anteriormente el vector pRSP permite la expresión de proteínas en levaduras. El gen *leu2* funciona como elemento de selección usando una cepa con auxotrofia por leucina, el elemento *ars1* hace posible que el vector se replique y segregue durante la división celular. De manera que al incorporar por transformación el vector pRSP-ape2T a las células mutantes, se asegura que las células tengan la capacidad de producir la LAP *yspII* generación tras generación. La internalización de este vector es una forma fácil de revertir la mutación. En este caso particular la reversión es de tipo equivalente, dado que la complementación fue extracromosomal y no se restituye la sección del gen *ape2* interrumpida en el cromosoma. Cabe mencionar que el plásmido ingreso de forma cerrada, para limitar las posibilidades de recombinación. Es importante mencionar que la expresión de la enzima está regulada por su propio promotor.

### **7.2.1. Transformación de la cepa 4XΔape2 con el vector pRSP-ape2T**

Para la transformación se usaron células de la cepa mutante 4XΔape2, que tienen la interrupción del gen *ape2* por el gen *ura4* y no expresan la leucín aminopeptidasa *yspII*. Las células transformadas con el vector pRSP-ape2T se sembraron en placas de medio YNB suplementadas con adenina, histidina y lisina, se omitió el uso de uracilo pues el gen *ura4* ya ha sido restituido mediante la interrupción, y la leucina puesto que el gen *leu2* se encuentra en el vector pRSP-ape2T. Estos dos últimos suplementos, funcionaron como elementos de selección para las células transformadas, pues solo las levaduras que contengan ambos genes serán capaces de sobrevivir en un medio que no esté suplementado. A modo de control negativo se llevó a cabo un ensayo con agua en lugar de plásmido, para corroborar la sensibilidad de la levadura a las auxotrofias. La incubación se llevó a cabo a 28 °C por 24 horas. En la figura 21 se muestran las placas con las colonias transformadas, posibles clonas revertantes (4XΔape2Rev), junto con la caja del control negativo donde no se observa crecimiento.

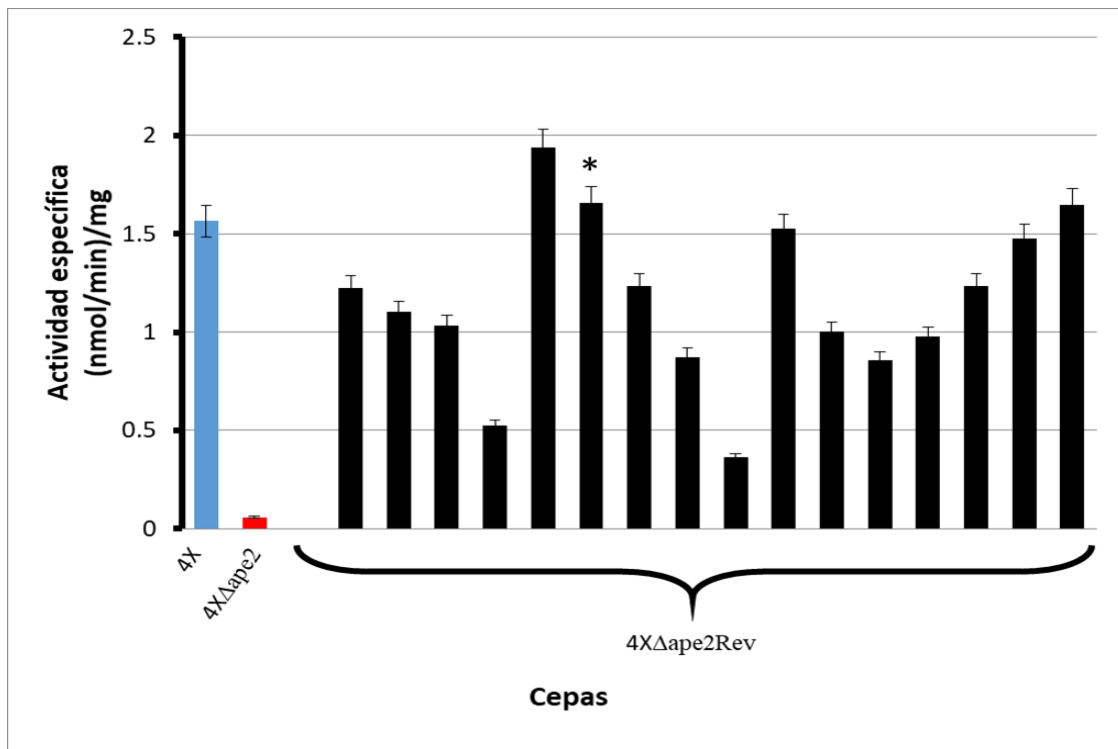


**Figura 21. Posibles clonas revertantes 4XΔape2Rev.**

### **7.2.2. Identificación de las clonas revertantes 4XΔape2Rev**

El método usado para analizar las posibles colonias revertantes fue mediante ensayos de actividad enzimática. Se seleccionaron 16 colonias con las que se inocularon cultivos en medio mínimo mineral (EMM2), se tomaron muestras de los cultivos ajustando el volumen de la muestra al número de células (mediante DO<sub>600nm</sub>), para que cada extracto celular soluble fuera comparable entre sí. Se usó como control positivo la cepa 4X, y la cepa mutante 4XΔape2 como control negativo, en la cual no debe haber actividad por la interrupción del gen *ape2*. En la figura 22 se muestra una gráfica de barras que representa la actividad específica de 16 colonias revertantes. Tomando como referencia inicial la actividad específica de la cepa 4X, podemos observar que, como se esperaba la cepa mutante 4XΔape2 no muestra actividad enzimática. La actividad que se muestra en las diferentes clonas revertantes es muy variable, empezando con algunas clonas cuyos valores de actividad son de aproximadamente el 50 % de

la actividad del control (cepa 4X), y otras más tiene una actividad muy parecida a la del control. Para los ensayos siguientes se eligió la clona marcada (\*), cuya actividad enzimática no fue estadísticamente diferente a la que presenta la cepa control 4X.



**Figura 22. Actividad enzimática de la LAP yspII de 16 clonas revertantes 4XΔape2Rev.** Control positivo cepa 4X y control negativo cepa mutante 4XΔape2. Las barras representan el error estándar de la media.

Las clonas que presentan una actividad de aproximadamente el 50 % del control se debe a que la cantidad de proteína presente en el extracto fue menor por lo que las mU enzimáticas también lo fueron y a su vez la actividad específica. A pesar de que la actividad específica se obtiene en función de los mg de proteína usados en cada ensayo, si la absorbancia de la reacción es baja el ajuste por cantidad de proteína no iguala en gran medida los valores de actividad específica. Otra explicación a la variación en la actividad enzimática podría ser el número

de plásmidos que hayan podido ingresar a la célula, teniendo más actividad enzimática las cepas con un número mayor de plásmidos y por lo tanto de copias del gen *ape2*.

### **7.3. Caracterización fenotípica de la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev**

Una vez que se seleccionó la clona de la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev, el siguiente paso fue evaluar si en esta cepa se revierten las características fenotípicas que se vieron afectadas en la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2, para comprobar que los efectos sobre las células se deben a la ausencia de la LAP yspII, en especial la segregación desigual del material genético durante la división celular, característica que apunta a la posible función o papel que desarrolla la enzima en la célula.

#### **7.3.1. Cinética de crecimiento celular en medio mineral**

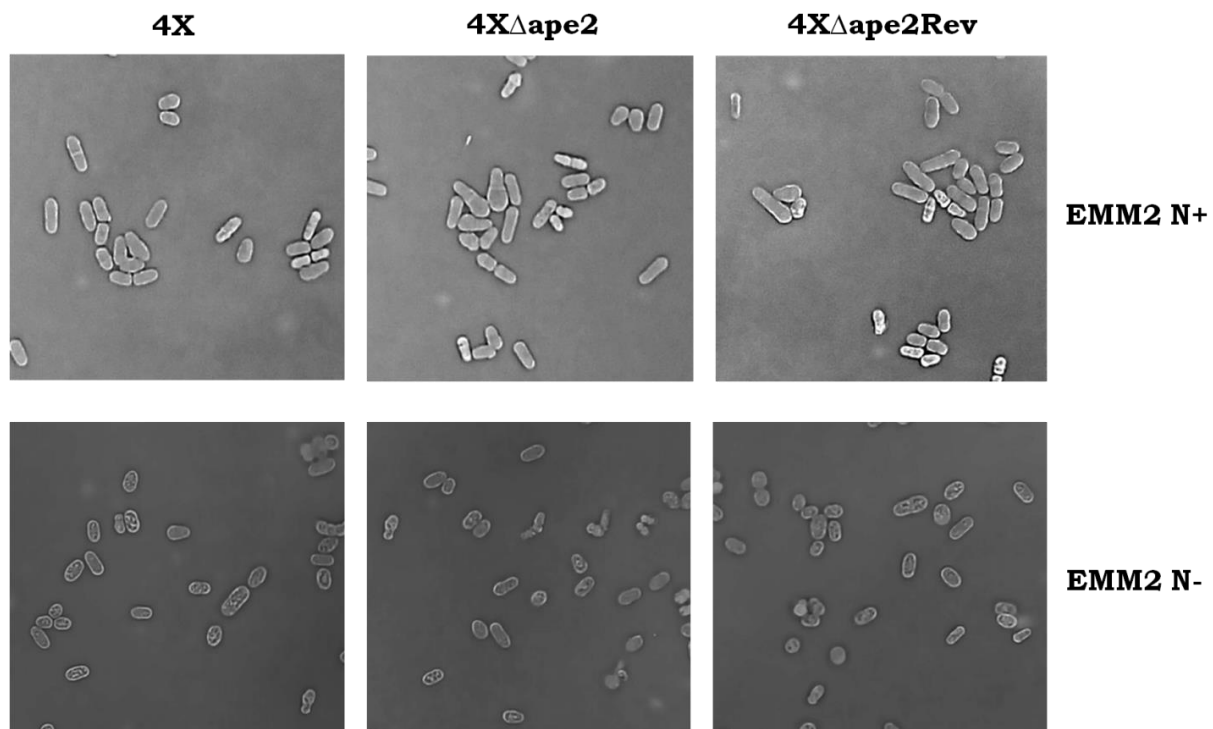
Para realizar el estudio cinético de crecimiento de las cepas, es importante usar células sincronizadas en fase G1, para tener mejores estimaciones de los parámetros cinéticos de cada cepa.

##### **7.3.1.1. Sincronización de cultivos mediante arresto en fase G1 por inanición de nitrógeno**

El arresto de las células en fase G1 es ocasionado por una carencia de nutrientes en el medio, especialmente nitrógeno o como respuesta a estrés, de esta forma la célula detiene su crecimiento y dejan de dividirse, entrando en una especie de latencia, este proceso ha sido observado en células animales y en levaduras de fisión. El arresto termina cuando las condiciones del medio lo favorecen o bien se reintegra la disponibilidad de nitrógeno en el medio [Nurse, 1990; Hayles y Nurse, 1992; Kazuki *et al.*, 1995]. En el trabajo precedente, en el cual se logró observar el fenotipo de la cepa mutante, las células se sincronizaron con medio

mineral sin nitrógeno (EMM2 N-) [Gutiérrez, 2014]; mismo medio que se usó en el presente trabajo.

Se pusieron a crecer las cepas control (4x), mutante (4X $\Delta$ ape2) y revertante (4X $\Delta$ ape2rev) en 20 mL de medio EMM2 N-, después de alrededor de 36 horas de crecimiento, aproximadamente el 100 % de las células se encuentran arrestadas en fase G1, en este estado las células toman una apariencia redondeada a diferencia de la forma cilíndrica que tienen en condiciones normales (Figura 23).



**Figura 23. Arresto celular en la fase G1.** Células de cada una de las cepas de *S. pombe*, cultivadas en medio EMM2 con nitrógeno (arriba N+) y sin nitrógeno (abajo N-) arrestadas en fase G1. Las fotografías se tomaron en un microscopio de contraste de fases con un aumento de 100X y un filtro digital para aumentar el contraste.

### **7.3.1.2. Cinética de crecimiento de la cepa 4X $\Delta$ ape2Rev y controles**

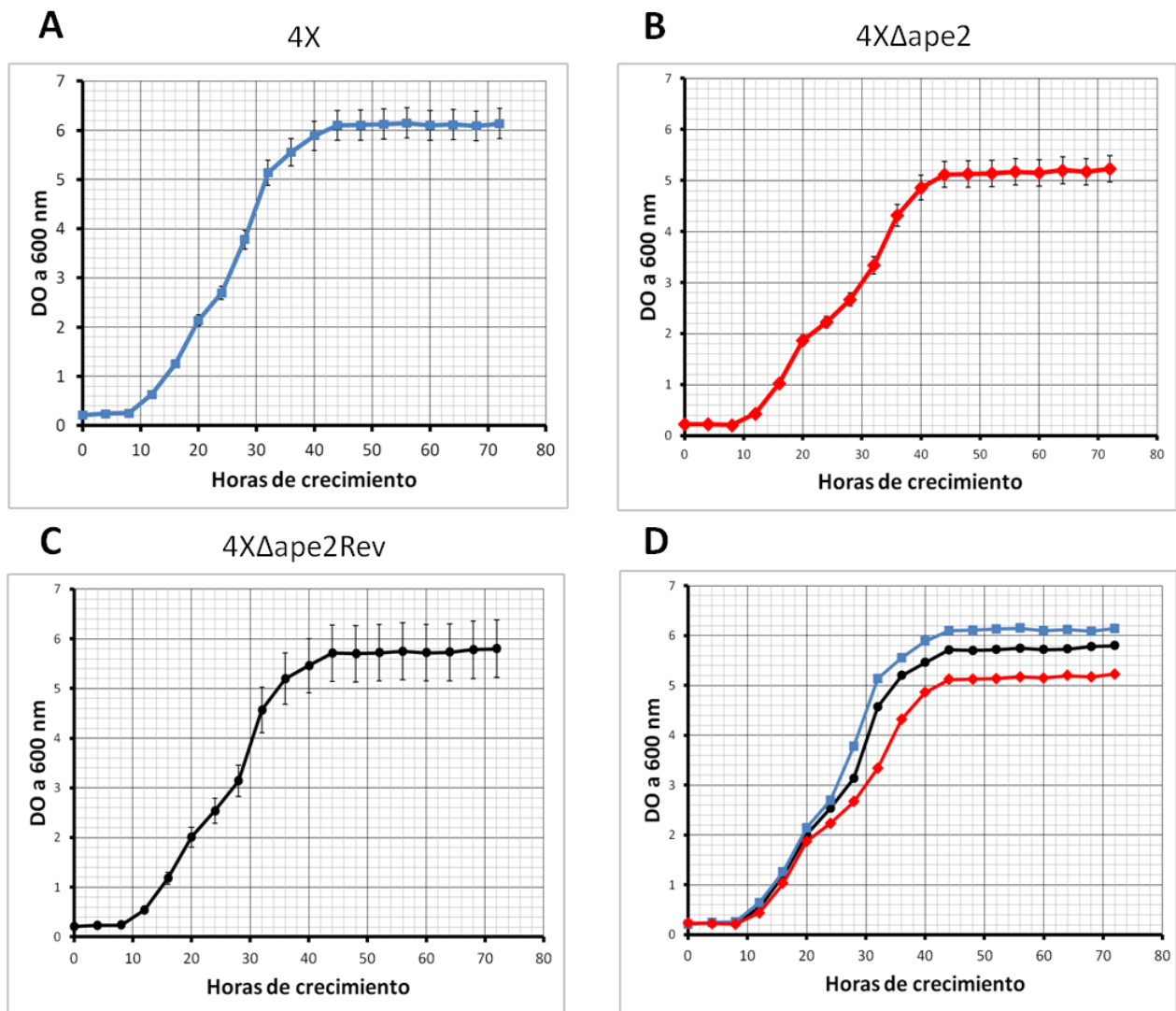
Se ha comprobado ampliamente que la expresión de proteínas se puede llevar a cabo mediante plásmidos en levaduras. En *S. pombe* se han expresado y estudiado funciones de proteínas tales como, la tirosin cinasa Crs clonada en el plásmido pRSP [Gonfloni *et al.*, 2000], la proteína Yab8p en el vector pNWL [Hannus *et al.*, 2000], el factor de polaridad celular Crb2 en pRSP [Collura *et al.*, 2005]. En los casos antes mencionados, las proteínas no solo fueron producidas, su función pudo estudiarse en la célula, por lo que hipotetizamos que la expresión del gen *ape2* insertado en el vector pRSP-ape2T y la producción de la LAP yspII en forma funcional. Es importante mencionar que al usar el vector pRSP, este suele usarse con fines de sobreexpresión mediante el promotor negativo de tiamina nmt1, el cual se activa al haber una carencia de tiamina, promoviendo una alta transcripción del CDS insertado. En lo que respecta a este trabajo, el medio EMM2 no está suplementado con tiamina lo que hace que el promotor nmt1 se active; sin embargo, la secuencia contigua es el promotor nativo del gen *ape2* y no un marco de lectura. Se comprobó computacionalmente que no se generan secuencias peptídicas que puedan estar reguladas por el promotor nmt1. Por lo tanto, la expresión del gen *ape2* está regulada por el promotor nativo, suponiendo que se generara una producción de la LAP yspII en la célula con los niveles basales de la cepa 4X. Lo anterior conlleva a la reversión del fenotipo observado en la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2, sin ocasionar afecciones debido a una sobreexpresión de la enzima.

Cada ensayo de cinética se realizó partiendo de células sincronizadas. Se usó medio EMM2 en volúmenes de 10 y 30 mL, se probaron tres densidades ópticas iniciales (DOi) 0.1, 0.2 y 0.4 UA; en busca de las condiciones de cultivo que permitieran mostrar los efectos de la interrupción del gen *ape2*, así como los de la reversión a mediante complementación extracromosomal. La DOi con la que se decidió trabajar fue 0.2 UA en cultivos de 30 mL, las mediciones se realizaron cada 4 horas durante 72 horas. Los resultados de estas mediciones se muestran en la figura 24A, B y C; donde se graficaron por separado el promedio de la DO

en cada punto de medición (cada 4 horas) de una  $n = 6$  con el error estándar de la media de cada punto. De modo comparativo se muestran las tres cinéticas en la figura 24D. Tomando el comportamiento cinético de la cepa 4X como control; observamos en primer lugar que las fases de latencia no muestran cambios en los tres casos, así como en la primera parte de la fase logarítmica (Figura 24A y D). La cepa 4X $\Delta$ ape2 muestra una notable disminución en su crecimiento después de 20 horas de crecimiento, un poco antes de la mitad de la fase logarítmica (Figura 24B y D), este rezago en el crecimiento aumenta conforme la fase logarítmica avanza, estabilizándose y manteniéndose durante el resto de la fase logarítmica y la fase estacionaria, esta diferencia de DO es de aproximadamente 1 UA (Figura 24D), este comportamiento concuerda con el descrito previamente por Gutiérrez en 2014.

La cepa 4X $\Delta$ ape2Rev muestra una recuperación del crecimiento con respecto a la cepa mutante, siendo el comportamiento cinético similar al que se observa en la cepa control 4X (Figuras 24C y D). Sin embargo, el comportamiento cinético no termina de ser igual al de la cepa control. Esta diferencia pudiera ser debido a varios factores. La carga metabólica que está generando la presencia de varios plásmidos en la célula (puesto que en la transformación más de un plásmido puede ingresar), ocasiona estrés metabólico en el cultivo y a su vez una deficiencia en el crecimiento con respecto al control 4X. En el caso de que la expresión de LAP yspII en la cepa revertante se esté dando en mayor medida a la basal, esta relativa sobreexpresión puede causar una disminución en la tasa de crecimiento del cultivo. Se ha visto que la sobreexpresión de la LAP3 de humano tiene un efecto directo sobre el crecimiento y división celular, aunque el efecto en este caso es contrario al que se observa en nuestros experimentos, pues la LAP3 promueve el crecimiento y la división [Tian *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014]. Pero es importante mencionar dicho caso, pues de entre las distintas LAPs descritas, es una de las que interviene en procesos de regulación del ciclo celular y mitosis. Por otra parte, la regulación de la expresión genética es un proceso que incluye no solo a la batería de proteínas y complejos que llevan a cabo la transcripción,

también intervienen factores como el estado de compactación de la cromatina y fenómenos epigenéticos; al realizar la reversión sin restituir la secuencia en el cromosoma, se obtiene una recuperación de la actividad, pues la proteína se produce, pero no así de los efectos indirectos que conlleva la sustitución de la secuencia, es decir la desregulación de algún proceso que tenga que ver o bien controle el ciclo celular.



**Figura 24. Cinéticas de crecimiento celular.** **A)** Cepa control 4X **B)** Cepa mutante 4XΔape2 **C)** Cepa revertante 4XΔape2Rev **D)** Comparación de las tres cinéticas sin ajuste. Las barras representan el error estándar de la media.

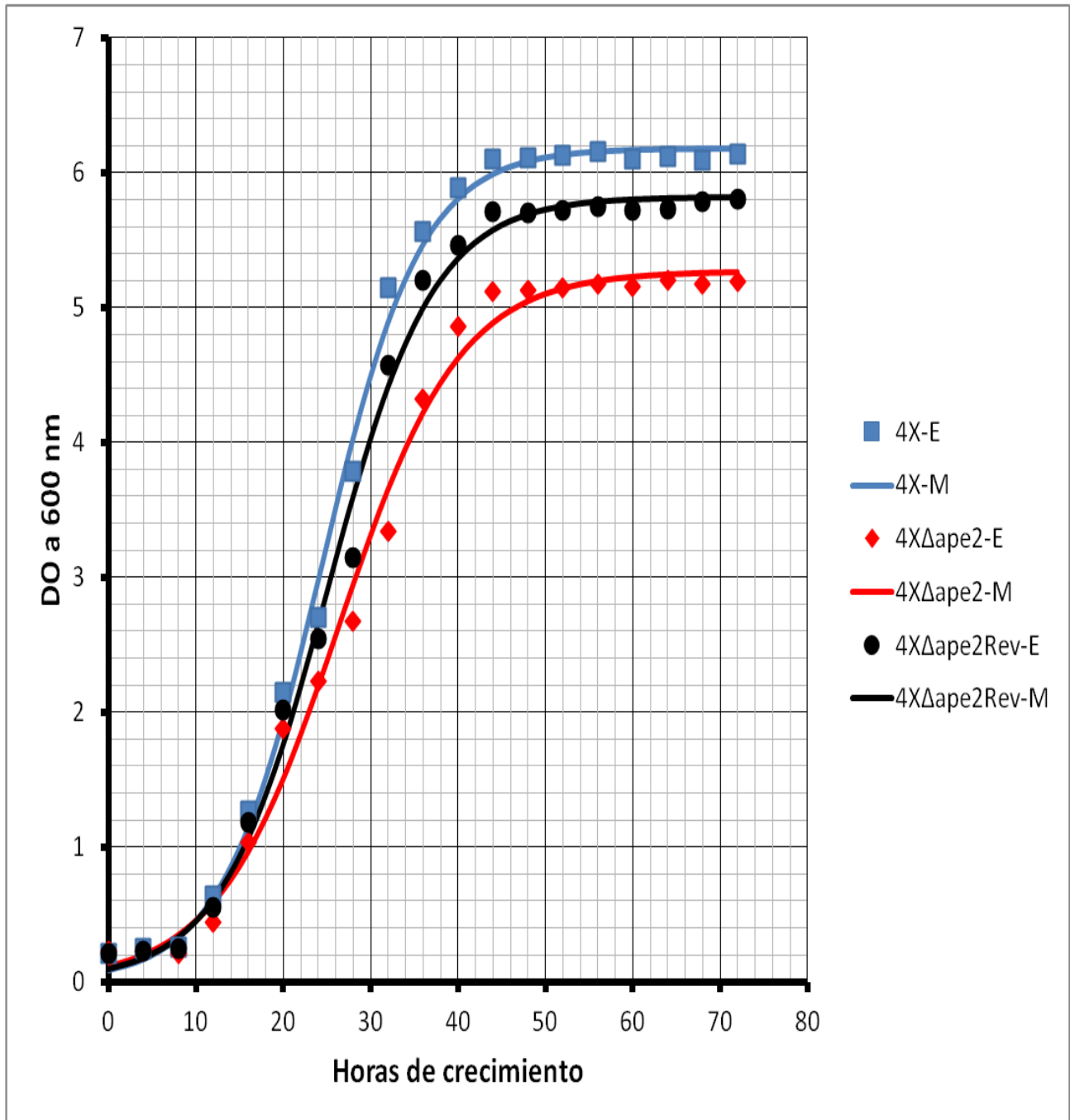
Para el mejor análisis y comparación de las cinéticas de crecimiento, fue necesario ajustar los datos a un modelo de crecimiento biológico. Para este caso se usó el modelo de crecimiento microbiano de Monod con un ajuste logístico integrado. Se tomaron los promedios de cada punto de medición en las cepas, y se ajustaron mediante un modelo logístico integrado para cada cepa por separado. En la figura 25 se muestra en líneas continuas las cinéticas ajustadas al modelo de Monod, mientras que con puntos están los promedios de los datos experimentales, el modelado es congruente con los datos sin ajustar, mostrando una fase de latencia igual para las tres cepas. La primera parte de la fase exponencial muestra un crecimiento parecido entre los tres casos, apareciendo la divergencia de la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 pasadas 20 horas de crecimiento, la diferencia va aumentando y se estabiliza en la región de transición entre la fase exponencial y la estacionaria, siendo el crecimiento de la cepa 4X $\Delta$ ape2 considerablemente menor a la del control, lo cual coincide con lo reportado anteriormente [Gutiérrez, 2014].

Por su parte la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev tiene una recuperación del crecimiento con respecto a la mutante 4X $\Delta$ ape2, teniendo un comportamiento cinético más parecido al de la cepa control.

Mediante el ajuste de los datos experimentales no solo confirmamos el comportamiento cinético de cada cepa, también se obtuvieron los parámetros cinéticos que se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Parámetros cinéticos.**

<b>Parámetro</b>	<b>4X</b>	<b>4X<math>\Delta</math>ape2</b>	<b>4X<math>\Delta</math>ape2Rev</b>
<b>X<sub>0</sub></b>	0.09091	0.08252	0.09091
<b>X<sub>max</sub></b>	5.82204	6.18477	5.82203
<b><math>\mu</math><sub>max</sub></b>	0.16502	0.17594	0.16502
<b>t<sub>D</sub></b>	4.20037	3.93970	4.20034



**Figura 25. Cinéticas de crecimiento ajustadas al modelo de Monod.** Están graficados los datos experimentales (E) y ajustados mediante un modelo logístico integrado (M).

La DO máxima ( $X_{max}$ ) corrobora que el mayor crecimiento lo tienen las cepas 4X y la revertante 4X $\Delta$ ape2Rev, siendo los valores semejantes entre sí, y siendo la cepa 4X $\Delta$ ape2 la que presenta la menor DO máxima. La constante de velocidad máxima ( $\mu_{max}$ ) es muy similar entre las tres cepas. Con respecto al tiempo de duplicación ( $t_D$ ) la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 tiene el menor tiempo, mientras que las cepas control y revertante tienen un tiempo de duplicación igual entre sí.

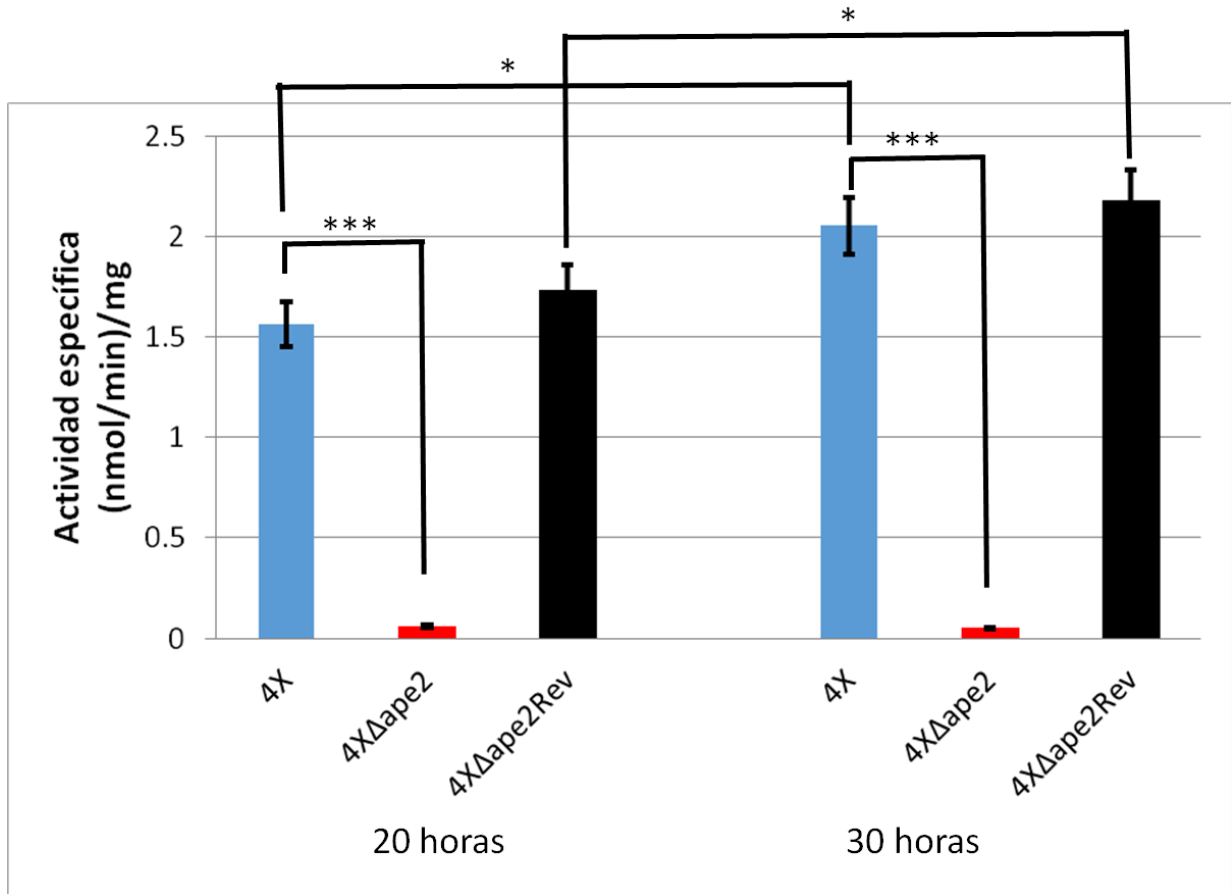
### **7.3.2. Actividad enzimática de la LAP yspII en la cepa revertante**

El efecto más importante de la ausencia de la LAP yspII es la distribución desigual del material genético durante la mitosis, llegando al grado de aparecer células sin material genético.

Es importante determinar cómo son los niveles de actividad leucín aminopeptidasa en puntos clave de la cinética de crecimiento, en este caso se seleccionaron 2 puntos. El primero es el momento de la divergencia en el crecimiento celular, por parte de la cepa mutante, que se da aproximadamente a una  $DO_{600nm} = 2$  a las 20 horas de crecimiento. El segundo es en la parte final de la fase exponencial a partir de las 30 horas de crecimiento, que es donde se ha descrito anteriormente, empieza a notarse los efectos aberrantes sobre las cromátidas hermanas en la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 [Gutiérrez, 2014].

En la figura 26 se graficó la actividad enzimática específica, de extractos celulares solubles de las tres cepas, en los puntos antes mencionados (20 y 30 horas de crecimiento). Para poder comparar los datos, el volumen de cultivo tomado como muestra se ajustó con respecto a la  $DO_{600nm}$ , guardando entre ambas variables una relación proporcional inversa. Considerando la actividad específica de la cepa 4X como control en ambos momentos del crecimiento, tenemos que la cepa 4X $\Delta$ ape2 no muestra actividad enzimática significativa, pues no es capaz de generar la LAP yspII, los valores no permanecen en cero debido a que en el tiempo de incubación de la reacción, posiblemente algunas moléculas en el extracto celular soluble sean capaces de degradar una pequeña parte del sustrato, más

las variaciones intrínsecas al experimento da una lectura ligeramente mayor a cero.



**Figura 26. Actividad leucín aminopeptidasa de la LAP yspII.** Muestras tomadas en el momento de divergencia de las cinéticas de crecimiento (20 horas) y en el comienzo de la distribución anormal de las cromátidas hermanas durante la mitosis (30 horas). Comparación mediante t-Student, n = 3, \* → p < 0.05, \*\*\* → p < 0.001.

La actividad de la cepa revertante 4XΔape2Rev es estadísticamente la misma que la del control 4X, en ambos momentos del crecimiento, no habiendo diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, al comparar la actividad de la cepa control y la revertante entre cada punto del crecimiento, se encontró que la actividad a

las 30 horas es significativamente mayor a la actividad en la hora 20 (t-Student,  $p < 0.05$ ). Está marcada diferencia de la actividad también se observó en el trabajo previo [Gutiérrez, 2014] donde al censar los cambios de la actividad de la LAP yspII durante el crecimiento se encontró que a las 30 horas existe mayor actividad que en la hora 20, estando el pico de actividad enzimática en la hora 26, tiempo que corresponde a la mitad de la fase exponencial.

Con base en los resultados obtenidos podemos decir que, en los puntos de la cinética de crecimiento que son de interés (la divergencia y el comienzo de una mala distribución de cromátidas hermanas en la mitosis), la actividad leucín aminopeptidasa se ha recuperado en la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev a niveles de la cepa control 4X.

### **7.3.3. Viabilidad celular de la cepa revertante durante el crecimiento celular**

Otro aspecto importante a valorar del fenotipo en los cultivos es la viabilidad celular. En la figura 25 se mostraron las cinéticas de crecimiento, que se construyeron a partir de la DO<sub>600nm</sub> de cada cultivo, esta forma de medición refleja la turbidez del cultivo, es decir, una medida indirecta de la cantidad de células totales, pero no se pueden diferenciar las células vivas de las muertas. Se mostró que la cepa 4X $\Delta$ ape2 tiene un menor crecimiento en comparación del control y de la revertante, pero es igual de importante determinar la viabilidad celular, pues esta refleja de mejor forma cómo afecta la ausencia de la LAP yspII a la división y supervivencia celular y si la revertante fue capaz de revertir el fenotipo de la mutante.

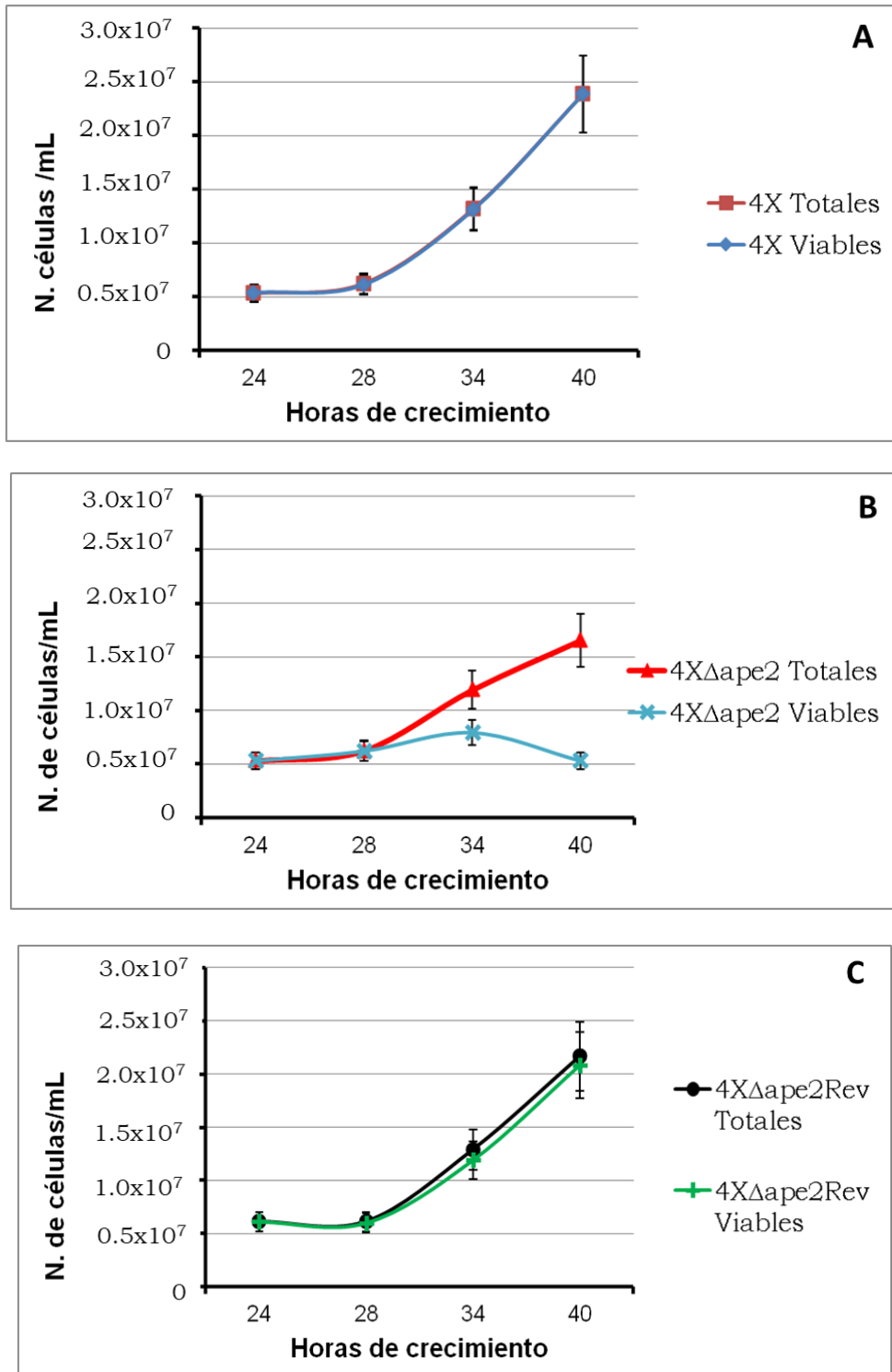
En la figura 27 se muestra el número de células totales y el número de células viables en función del tiempo de crecimiento celular. Al comparar el número de células totales y viables entre sí, para cada cepa, se encontró que en la cepa control 4X no hay diferencias entre el número de células totales y viables (Figura 27A). En el caso de la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 las células viables empiezan a decaer después de las 28 horas de crecimiento, siendo el número de células

viables significativamente menor con respecto a las totales en la hora 40 ( $p < 0.05$ ). Se nota que la tendencia en el cultivo, es la disminución constante del número de células viables en la cepa mutante, por lo que claramente la ausencia de la LAP yspII afecta negativamente la viabilidad (Figura 27B). Para el caso de la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev es notable la recuperación en la viabilidad celular siendo que no hay diferencias entre el número de células totales y viables (Figura 27C), sugiriendo que la presencia de la LAP yspII revierte el fenotipo de la mutante.

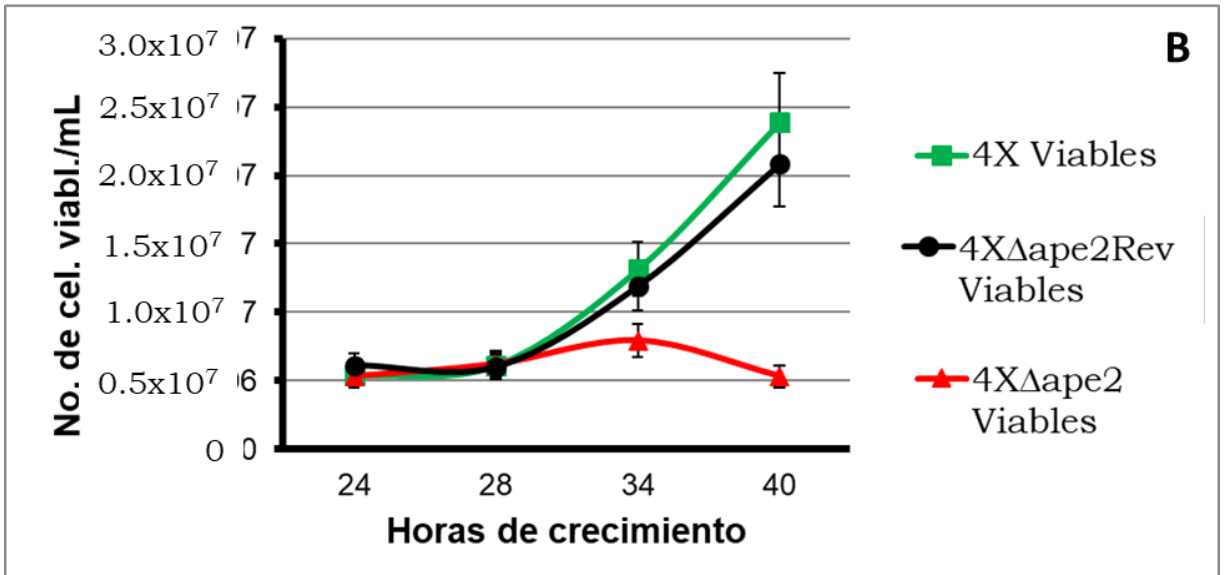
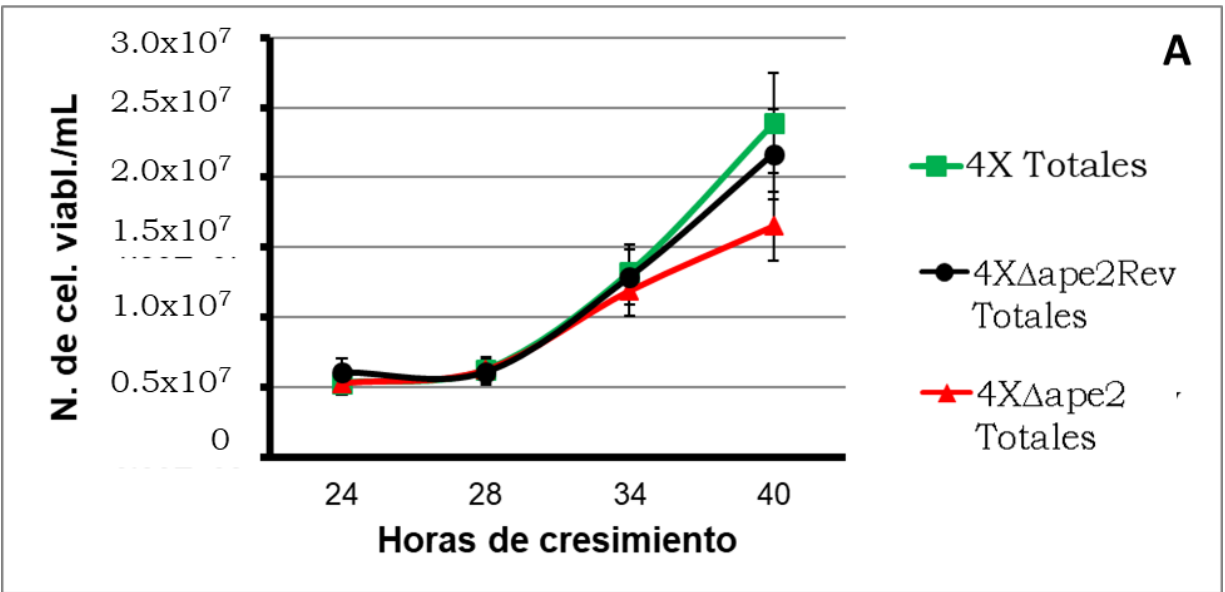
Los resultados correspondientes a la cepa control y la mutante, son congruentes con los obtenidos en el trabajo previo a este, donde de igual forma la cepa 4X $\Delta$ ape2 mostraba una marcada reducción de la viabilidad celular a partir de la hora 30 de cultivo, y de ahí en adelante la disminución de la viabilidad continua [Gutierrez, 2014].

Haciendo una comparación de la cepa revertante con la cepa mutante y su control, observamos que en la figura 28A no hay diferencias significativas de células totales entre el control y la revertante, siendo estas dos significativamente mayores al número de células totales de la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 ( $p < 0.05$ ). Finalmente en la figura 28B se muestra que no hay diferencia en la viabilidad entre el control 4x y la revertante 4X $\Delta$ ape2Rev, pero estas dos si guardan una diferencia significativa con la viabilidad de la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 que es significativamente menor ( $p < 0.05$ ).

Los resultados anteriores indican que la reversion mediante el vector de expresion pRSP-ape2T y la presencia de la LAP yspII tiene efectos directos en la recuperación de la viabilidad celular con respecto a la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2.



**Figura 27. Viabilidad celular durante el crecimiento. A)** Cepa control 4X. **B)** Cepa mutante 4XΔape2. **C)** Cepa revertante 4XΔape2Rev. En cada panel se graficó la media de una n = 3, y se calculó el error estándar de la media, la comparación se realizó mediante una prueba de  $\chi^2$ .



**Figura 28. Comparación de la viabilidad de la cepa revertante con el control y mutante. A)** Comparación del número de células totales de las tres cepas. **B)** Comparación del número de células viables en las tres cepas.

#### **7.3.4. Fenotipo de la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev por microscopía de fluorescencia (DAPI y FM 4-64)**

Como se explica en la sección 2 figura 11, uno de los efectos más impactantes de la interrupción del gen *ape2* (cepa mutante 4X $\Delta$ ape2) es la distribución desigual de las cromátidas hermanas durante la mitosis, así como la presencia de células sin núcleo, esto junto con la disminución de la viabilidad celular, hacen suponer que la LAP yspII está involucrada en la regulación del ciclo celular y mitosis, especialmente en los mecanismos que generan la repartición de las cromátidas durante la mitosis [Gutierrez, 2014].

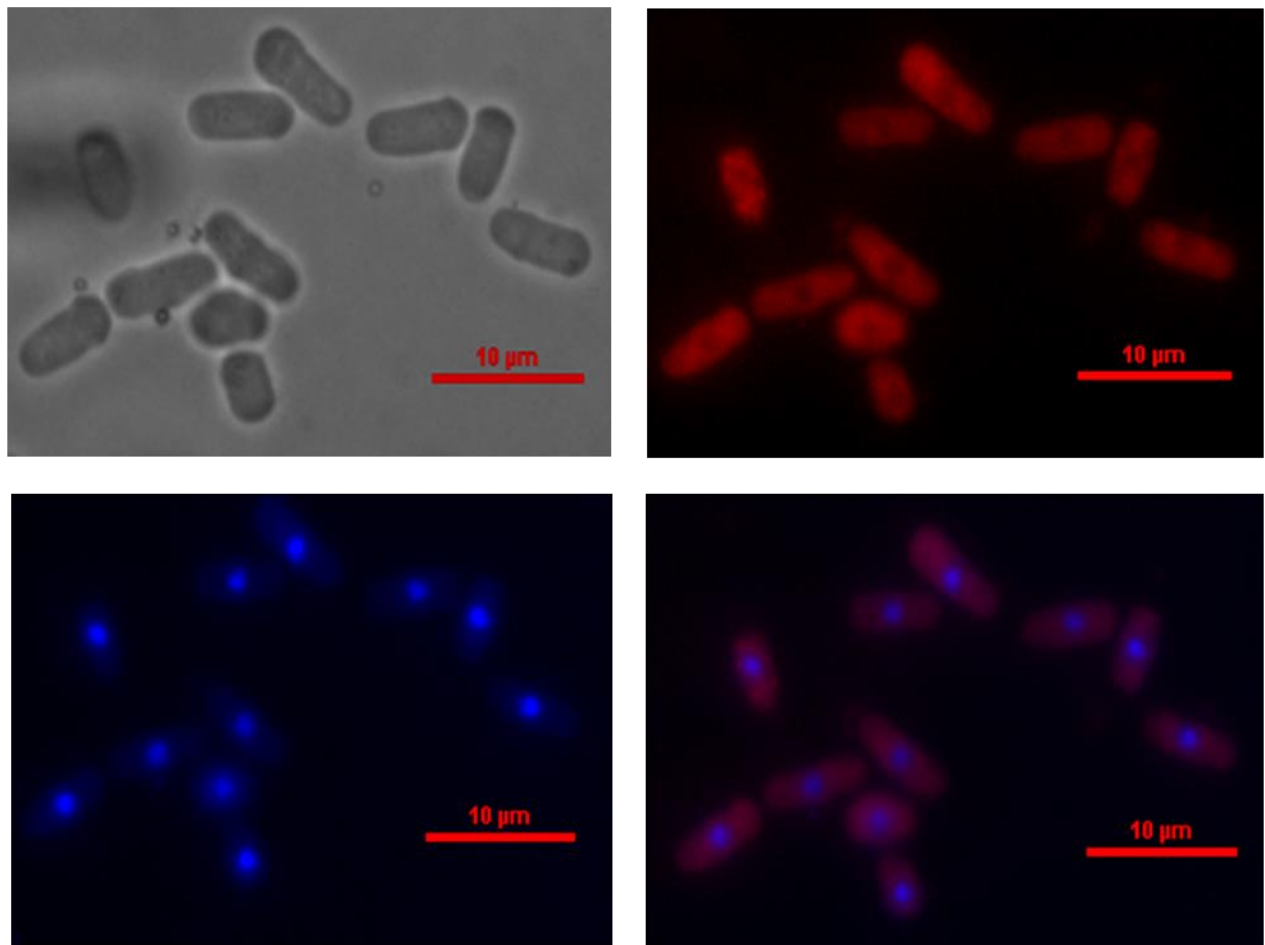
En este trabajo se realizó el estudio del fenotipo de la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con las cepas 4X y 4X $\Delta$ ape2 como controles, se usaron dos fluoróforos, DAPI y FM 4-64, las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon modelo ECLIPSE TE2000-U) del Laboratorio de Interacción Bacteria Planta, del Centro de Ciencias Microbiológicas del ICUAP BUAP, México, bajo la asesoría del Dr. Alberto Ramírez Mata. Para este propósito se usó el fluoróforo DAPI que tiñe el ADN bicatenario de azul, combinado con el fluoróforos FM 4-64 que tiñe de rojo los lípidos de membrana, esta combinación de fluoróforos permitió un mejor contraste en las imágenes.

En la sección anterior (7.3.3) se muestra la recuperación de la viabilidad celular de manera significativa en la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev. En esta sección mostramos el fenotipo de la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev obtenida con las cepas 4X y la mutante 4X $\Delta$ ape2 como controles, a las 32, 36 y 44 horas de crecimiento celular. A partir de las cinéticas de crecimiento de las tres cepas en medio EMM2 inoculadas con células sincronizadas en fase G1, se tomaron muestras que se fijaron con formaldehído con una concentración final del 4 %, células con las cuales se hizo un frotis en laminillas de vidrio a las que se adherieron las células fijadas mediante calor. Posteriormente se añadieron y mezclaron los fluoróforos sobre las células adheridas, finalmente las preparaciones se sellaron con un cubreobjetos y esmalte cosmético. En la siguiente serie de figuras se muestran cuatro paneles (de izquierda a derecha y de arriba a abajo), campo claro, tinción

con FM 4-64 (rojo), tinción con DAPI (azul) y la sobreposición con FM 4-64 y DAPI.

En la figura 29 se muestran células con 32 horas de crecimiento celular de la cepa control 4X, se observan células cilíndricas, normales en tamaño y forma, así como núcleos bien definidos, centrados y de igual tamaño, lo que sugiere una distribución equitativa del ADN (imagen con FM 4-64 y DAPI).

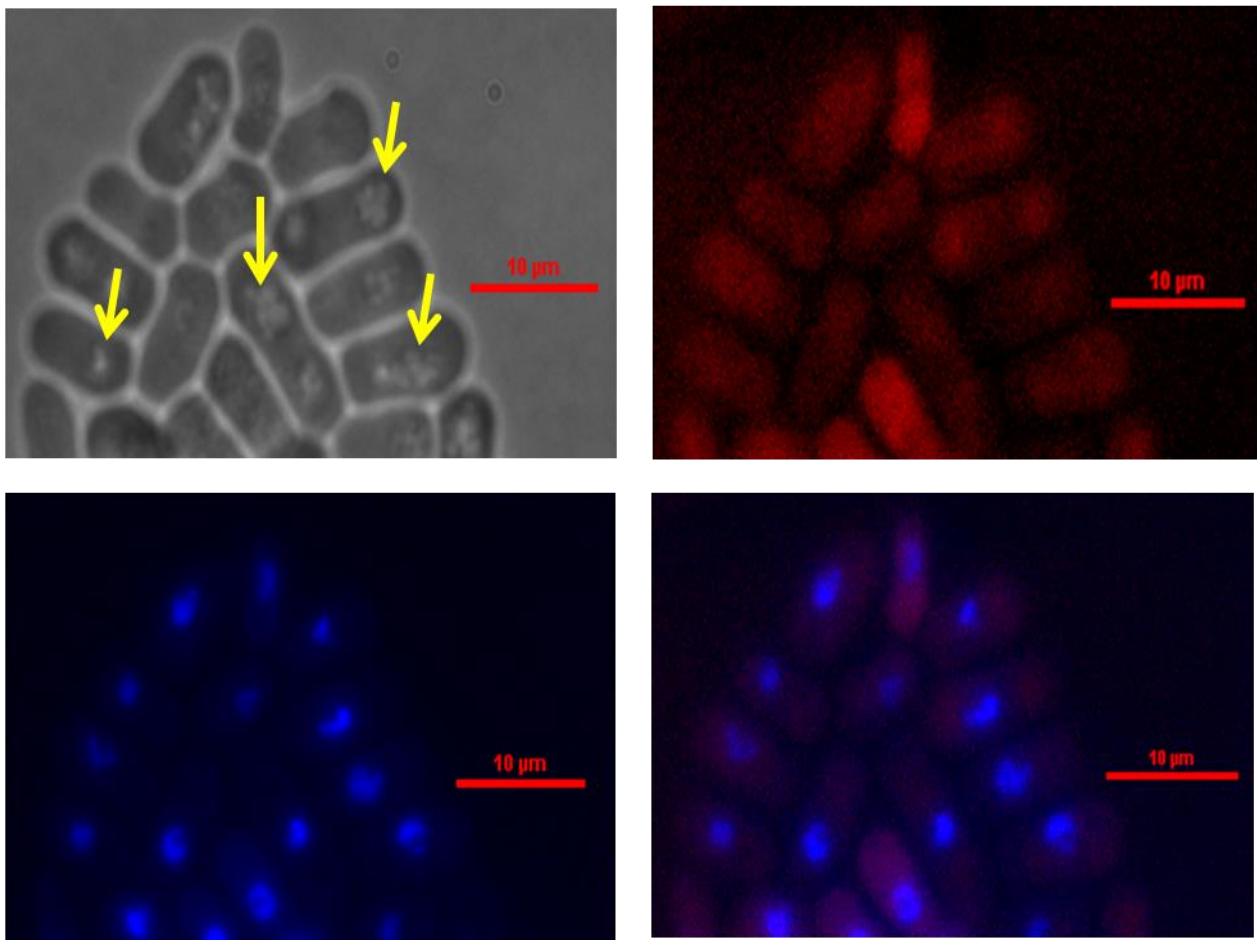
4X 32 horas



**Figura 29. Cepa control 4X con 32 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

En la figura 30 se muestran las células mutantes  $4X\Delta\text{ape2}$  con 32 horas de crecimiento celular, se observan ya diferencias con respecto al control  $4X$ , en primer lugar, se ve en el campo claro, una condensación del contenido citoplasmático, los núcleos no están tan definidos como en el control y se notan un poco amorfos, sin embargo, no hay presencia de células sin núcleo.

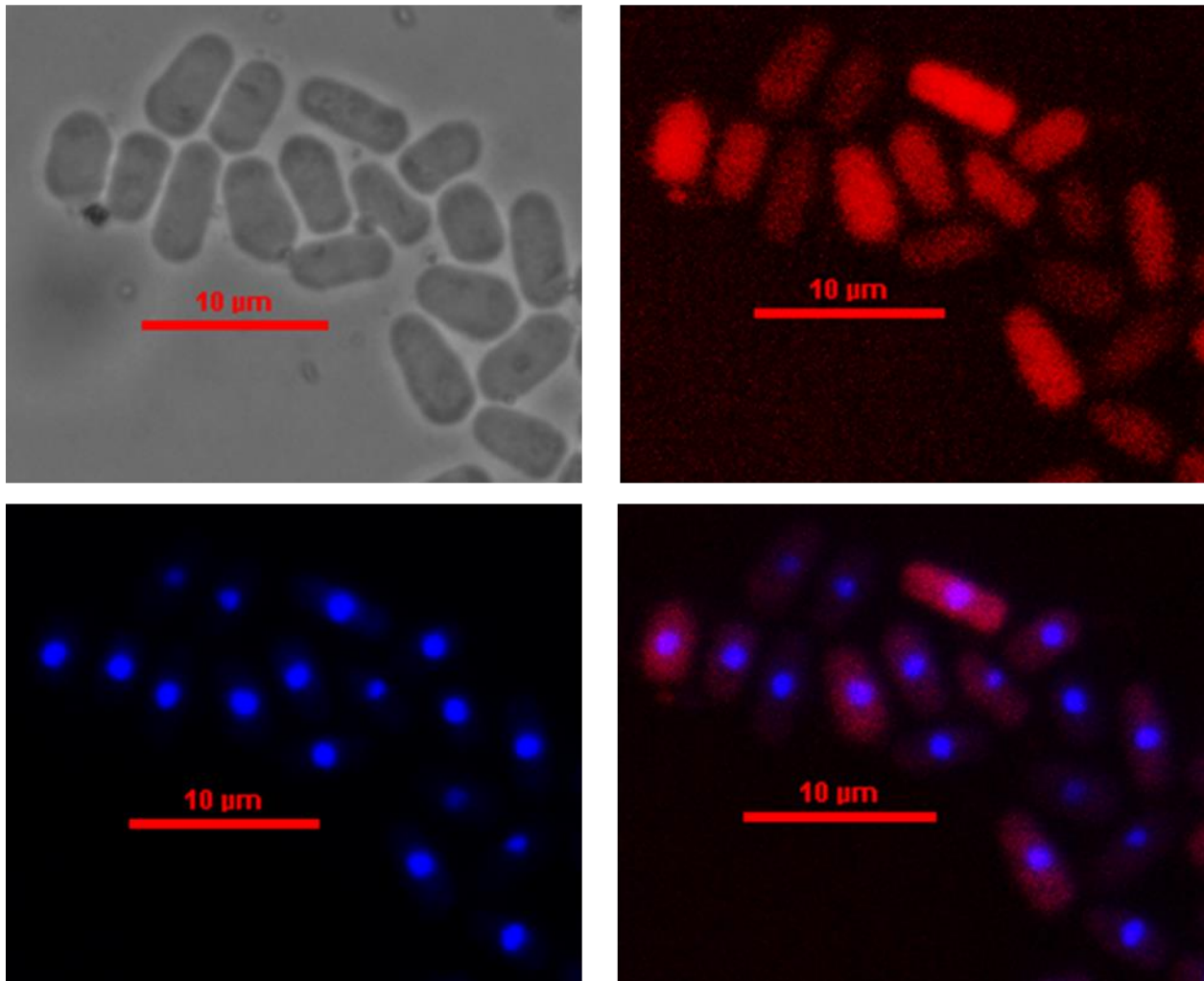
### $4X\Delta\text{ape2}$ 32 horas



**Figura 30. Cepa mutante  $4X\Delta\text{ape2}$  con 32 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

En la figura 31, se muestran las células de la cepa revertante  $4X\Delta\text{ape2Rev}$ , observando una morfología normal, parecida a las células control 4X, la forma es cilíndrica y bien definida, en el campo claro no se observan las condensaciones en el citoplasma, los núcleos están definidos y centrados en las células de igual forma que en el control 4X.

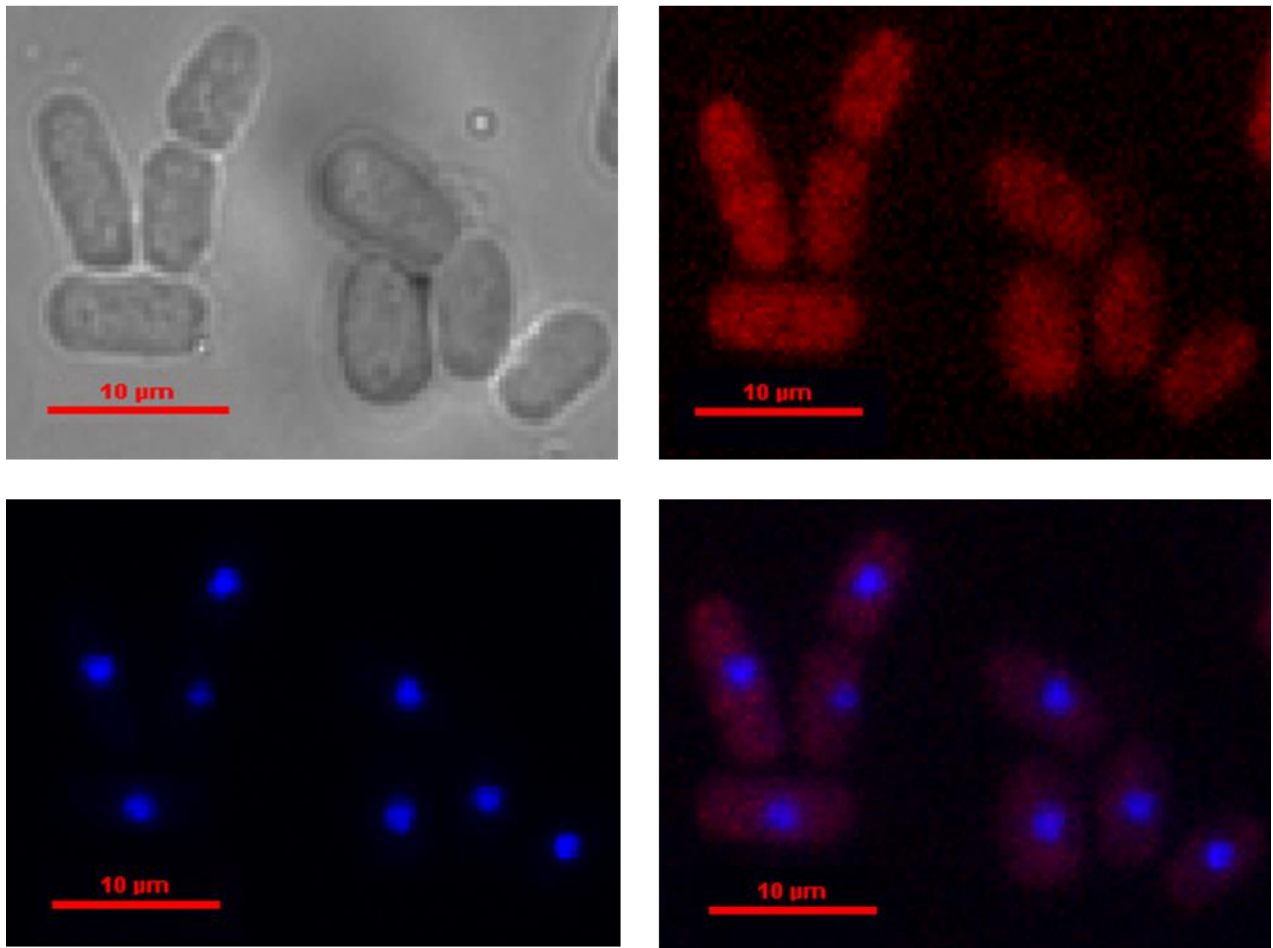
### $4X\Delta\text{ape2Rev}$ 32 horas



**Figura 31. Cepa revertante  $4X\Delta\text{ape2Rev}$  con 32 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

En la figura 32 se muestran células de la cepa control 4X con 36 horas de crecimiento celular, se muestran células normales de forma cilíndrica y sin rastros de condensaciones en el citoplasma, los núcleos están bien definidos y en posición centrada dentro de la célula, por lo que no hay cambios morfológicos con respecto a la primera muestra de 32 horas de crecimiento celular (Figura 29).

### 4X 36 horas

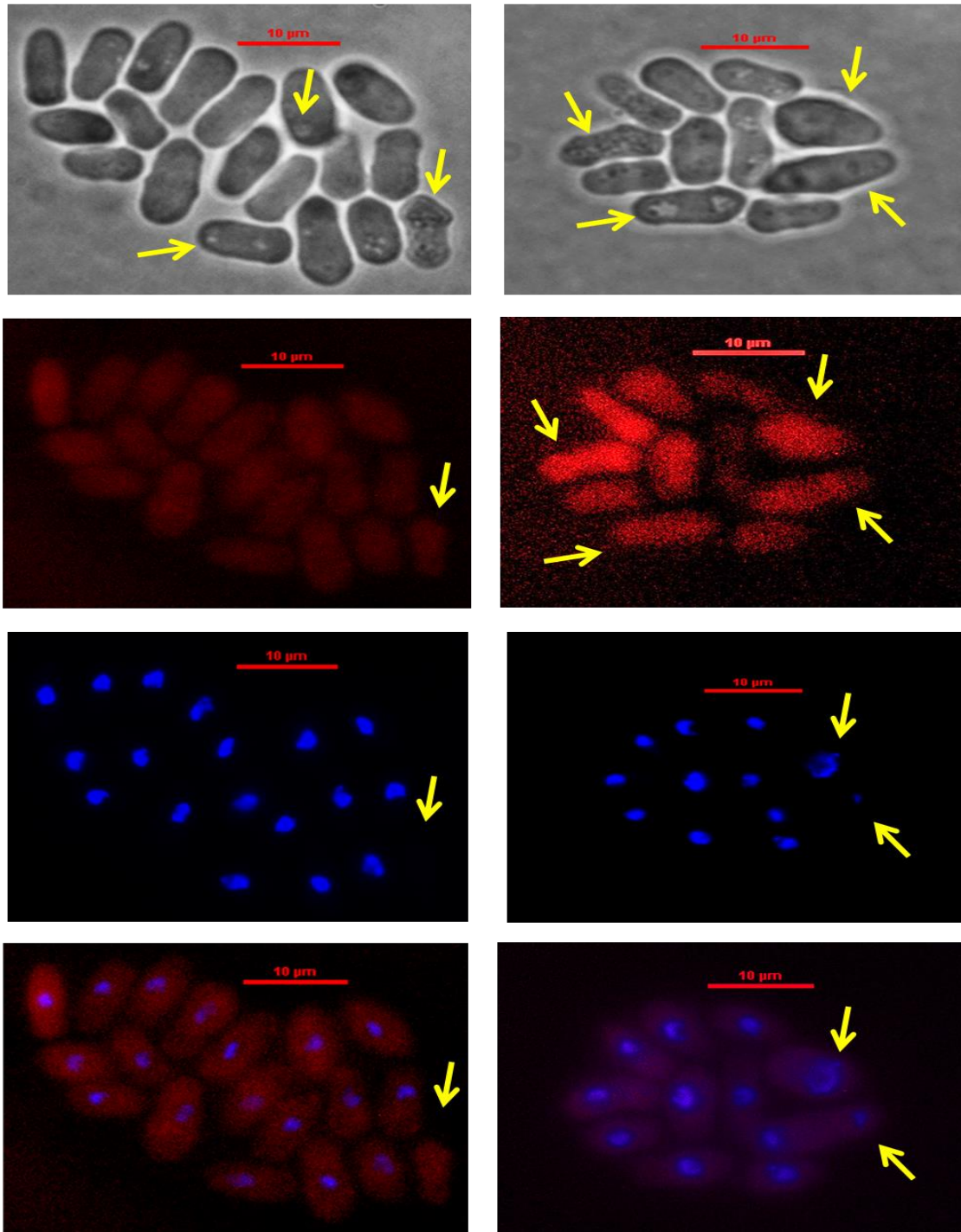


**Figura 32. Cepa 4X con 36 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

En la figura 33 se observan las células mutantes  $4X\Delta\text{ape}2$  con 36 horas de crecimiento celular, muestran dos series de fotografías en forma de columna, de dos muestras distintas. En las imágenes de campo claro se mantienen la presencia de las condensaciones en el citoplasma de forma generalizada, se puede observar la aparición de células sin núcleo (abajo a la izquierda), también se aprecia como el material genético no está condensado de la misma forma que en el control y se encuentra descentralizado; lo que sugiere que durante la polarización del uso cromático hay una repartición desigual del material genético, teniendo así, células con una mínima cantidad de ADN nuclear (abajo a la derecha). El fenotipo aberrante de la mutante se hace más evidente en esta muestra que en las células con 32 horas de crecimiento (Figura 30).

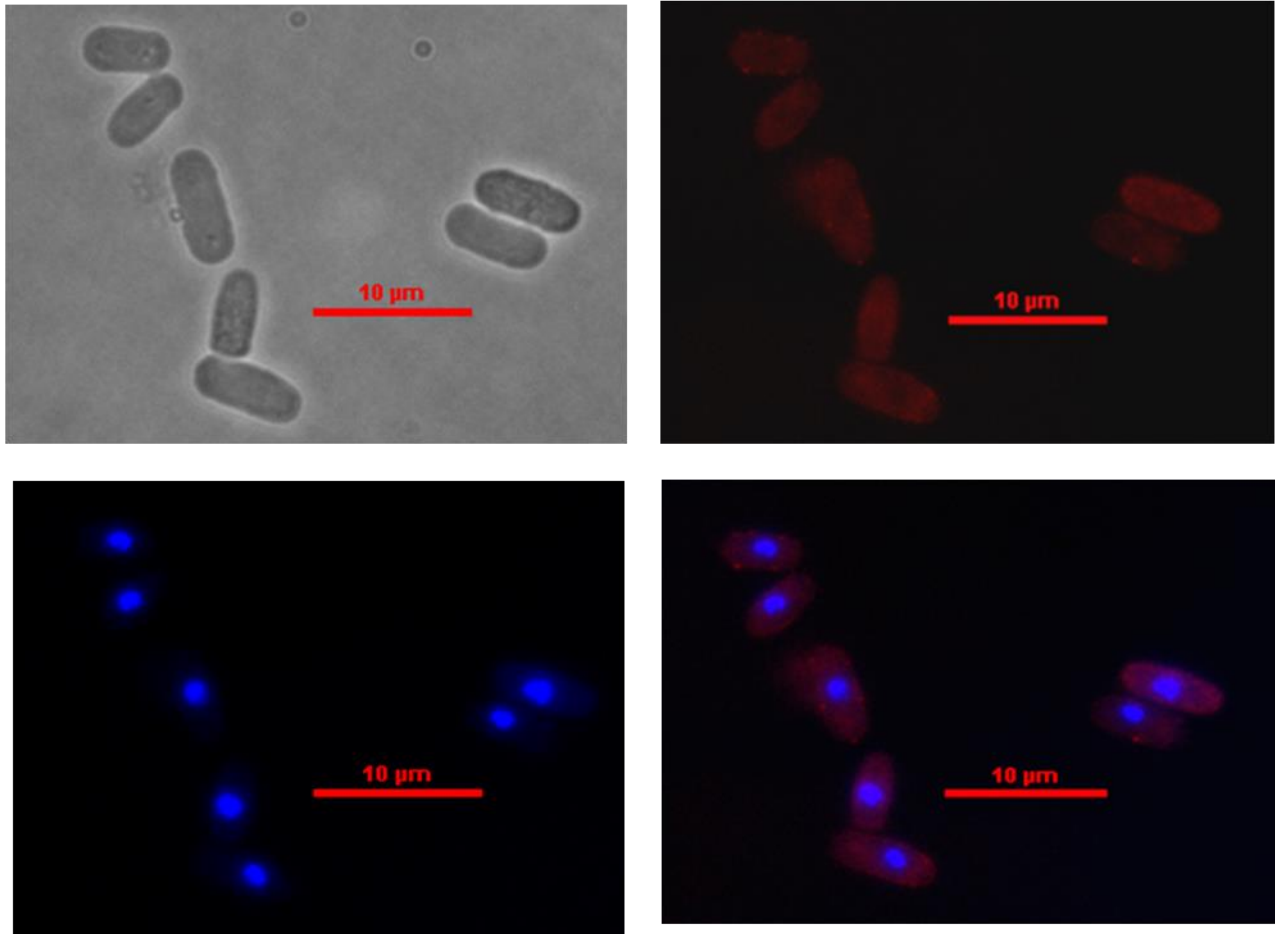
En la figura 34 se muestran las células de la cepa revertante  $4X\Delta\text{ape}2$  con 36 horas de crecimiento celular, estas mantienen la forma cilíndrica, el citoplasma tiene una apariencia normal, los núcleos están bien definidos y centrados en la célula, teniendo un fenotipo similar a la cepa control 4X (Figura 32). Basados en estos resultados observamos que la cepa revertante  $4X\Delta\text{ape}2\text{Rev}$  al estar expresando y produciendo la LAP  $\text{yspII}$  en concentraciones reguladas de forma equivalente a la cepa 4X, se revierte el fenotipo aberrante de la cepa mutante al fenotipo normal, es decir, que la cepa  $4X\Delta\text{ape}2\text{Rev}$  tiene un comportamiento similar a la cepa control 4X.

4X $\Delta$ ape2 36 horas



**Figura 33. Cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 con 36 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

### 4X $\Delta$ ape2Rev 36 horas



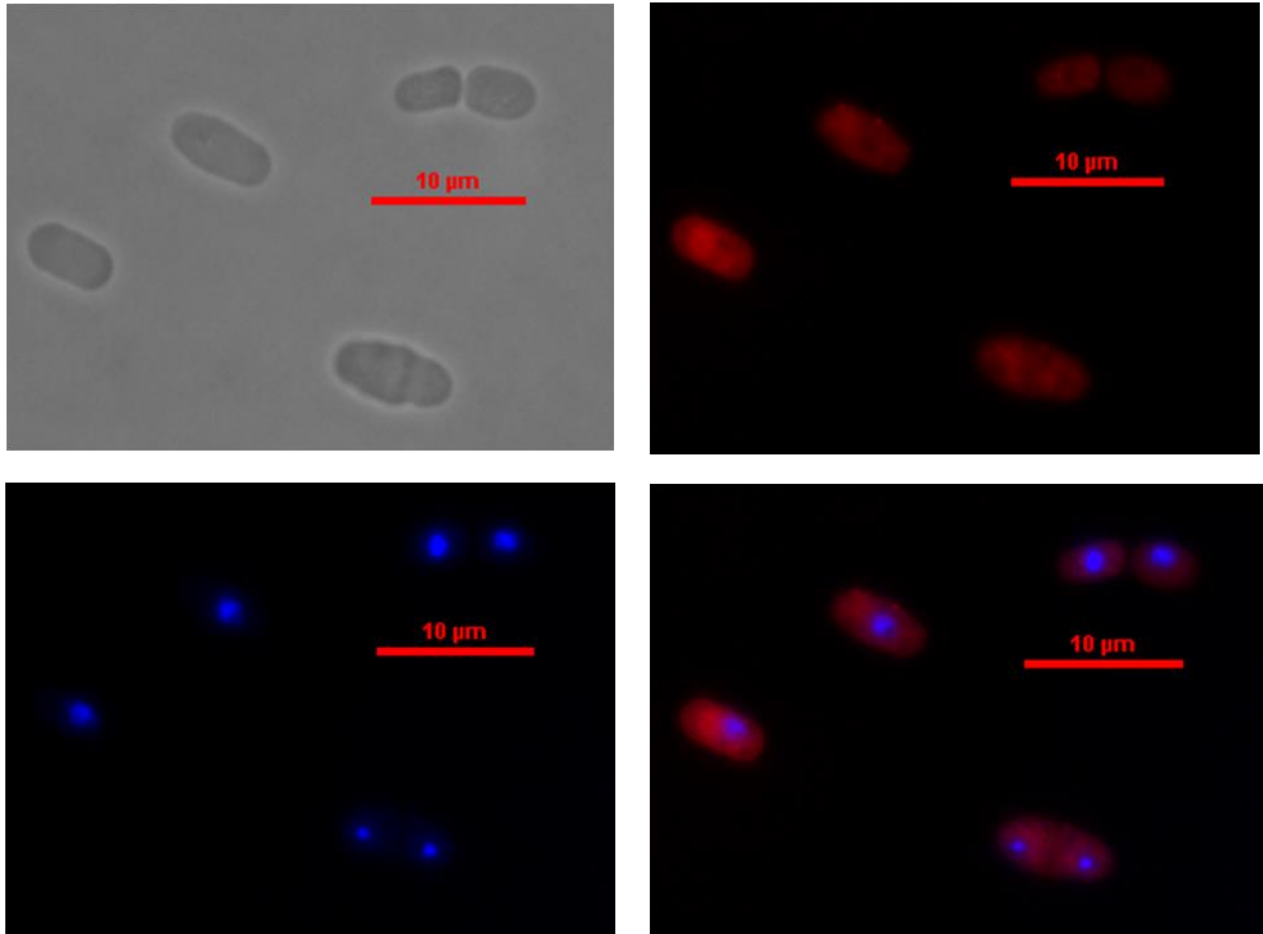
**Figura 34. Cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con 36 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

Por último, se tomaron muestras del crecimiento celular a las 44 horas en el inicio de la fase estacionaria (Figura 26), donde la viabilidad de las células mutadas es muy baja (Figura 28B).

En la figura 35 se muestran células de la cepa control 4X con 44 horas de crecimiento celular, observando células cilíndricas, sin la presencia de acumulaciones en el citoplasma, los núcleos están bien definidos y centrados; lo

que sugiere una segregación equitativa de las cromátidas hermanas durante la división celular.

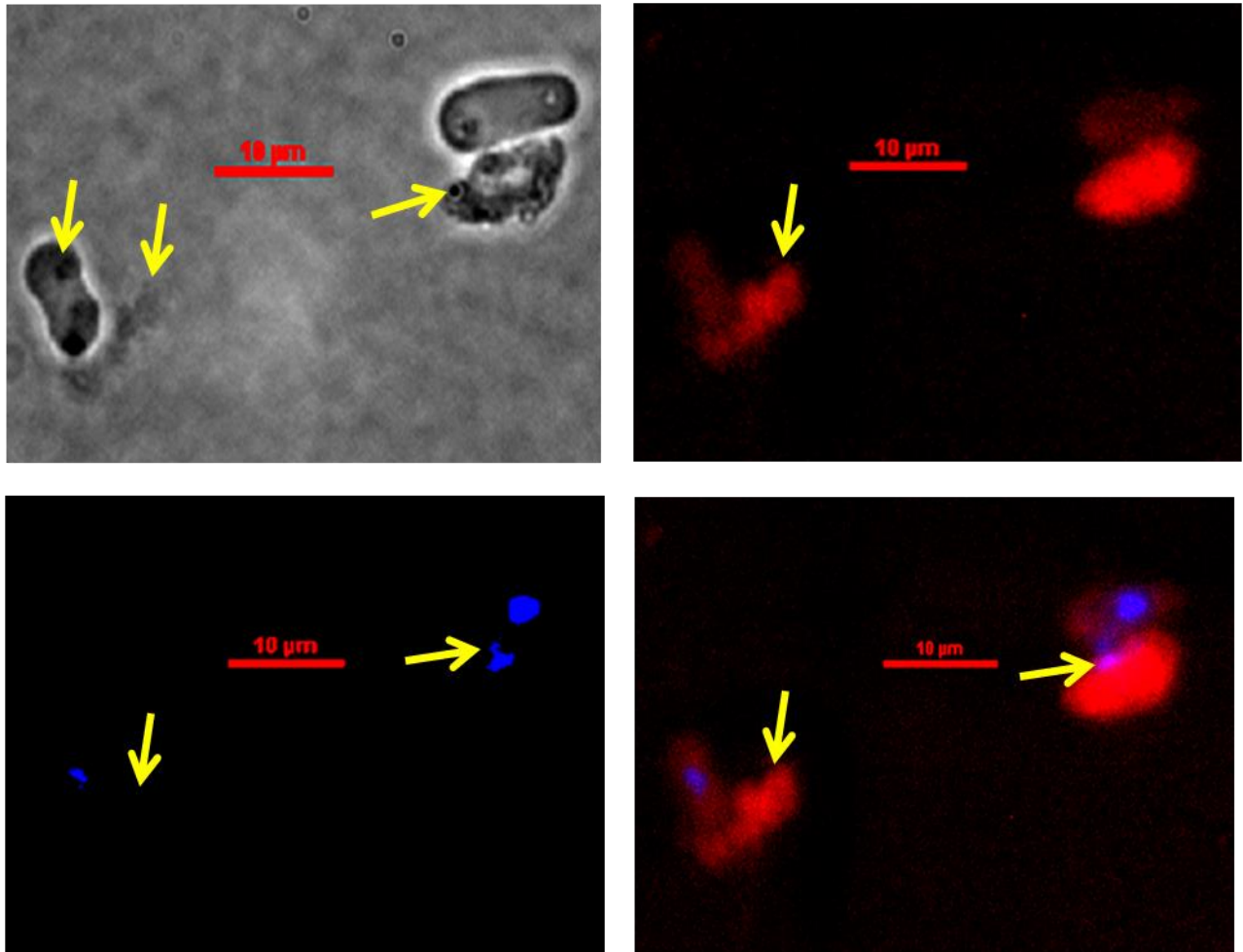
4X 44 horas



**Figura 35. Cepa control 4X con 44 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

Por otra parte, en la figura 36 se muestran las células mutantes  $4X\Delta ape2$  con 44 horas de crecimiento celular, donde se aprecia más evidentemente el fenotipo aberrante, una localización nuclear no centrada y la presencia de células sin núcleo, así como una distribución de ADN nuclear desigual, lo que confirma los efectos de la interrupción del gen *ape2*, especialmente los que tienen que ver con la segregación de las cromátidas hermanas durante la división celular.

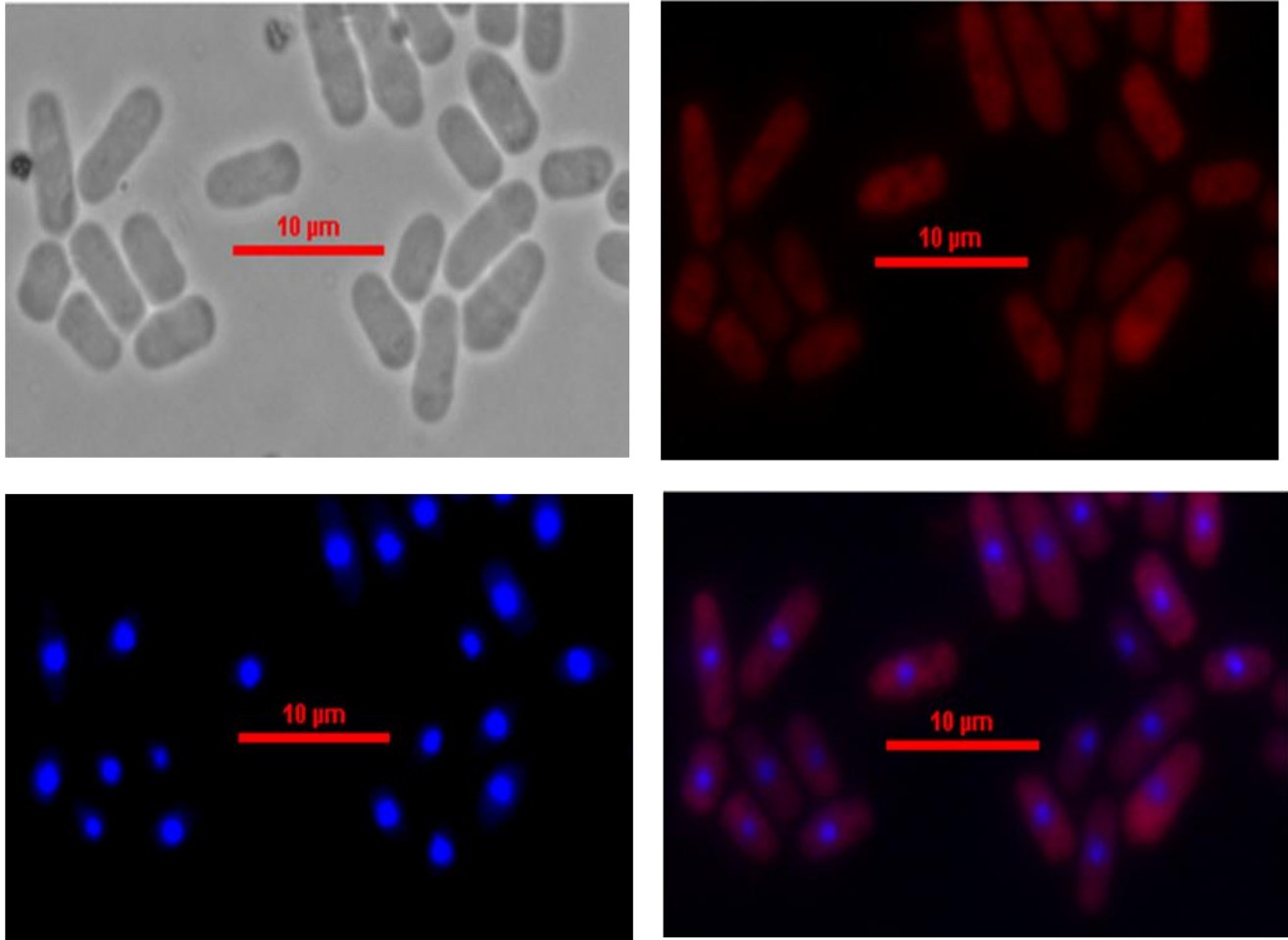
## 4X $\Delta$ ape2 44 horas



**Figura 36. Cepas mutante 4X $\Delta$ ape2 con 44 horas de crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

Con respecto a la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con 44 horas de crecimiento, en la figura 37 se observan células con forma y tamaño normal, no se notan acumulaciones en el citoplasma, los núcleos se mantienen bien definidos y centrados dentro de las células sin la presencia de evidencia que apunte a una distribución anormal de las cromátidas, por lo que los efectos de la interrupción del gen *ape2* logran ser revertidos mediante el vector pRSP-ape2T, el cual está expresando el gen y produciendo la LAP yspII.

4X $\Delta$ ape2Rev 44 horas



**Figura 37. Cepas revertantes 4X $\Delta$ ape2Rev con 44 horas crecimiento celular.** Aumento 100X. Paneles de izquierda a derecha y de arriba a abajo: campo claro, FM 4-64 (rojo), DAPI (azul) y sobreposición de FM 4-64 y DAPI.

Los resultados anteriores apuntan a que se ha conseguido la reversión del fenotipo aberrante, referente a la segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis, resultando en que la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev muestre células con núcleos bien definidos, con una viabilidad similar al control (4X) y que tienen una distribución nuclear equitativa evidenciando que el fenotipo aberrante es causado por la ausencia de la LAP yspII.

Un hecho importante que se pudo evidenciar en este trabajo, es que además del fenotipo aberrante que corresponde a la distribución de las cromátidas en la cepa mutante, que fue evidenciado por Gutiérrez en 2014 en un estudio precedente, fue posible detectar otra característica fenotípica al observar de forma muy clara aglomeraciones en el citoplasma desde las 32 horas de crecimiento celular (Figura 30).

En las células existe un proceso denominado polaridad celular, que es la capacidad celular de generar regiones destinadas a realizar una función en específico, esta polaridad depende de la reestructuración del citoesqueleto, el cual juega un papel muy importante en la segregación de las cromátidas hermanas (Lodish *et al.*, 2015), tomando en cuenta los efectos de la interrupción del gen *ape2* sobre la segregación de las cromátidas, es posible que el efecto se refleje también en la aparición de las aglomeraciones observadas en las células mutantes, o bien se trate de una respuesta al estrés que sufren las levaduras.

#### **7.4. Análisis bioinformático del microarreglo de *S. pombe* con la cepa mutante 4X $\Delta$ *ape2* y 4X como control.**

Para seguir con el estudio de la función de la LAP *yspII* en la célula se planteó llevar a cabo un ensayo de microarreglo. Esta herramienta molecular permite obtener un panorama general de los patrones de expresión del genoma de un organismo bajo diferentes condiciones, en respuesta de algún estímulo o cambio en el organismo, tal como, mutaciones. Para este trabajo, con el microarreglo se buscó determinar las vías de señalización y metabólicas que se vieron afectadas por la interrupción del gen *ape2*.

##### **7.4.1. Depuración de datos y prueba Z-Score**

En primer lugar, se eliminaron los datos cuyo valor de densidad fuesen muy bajos con respecto al valor del fondo y los datos provenientes de retículas imperfectas o señales no deseadas. Los datos depurados fueron graficados estando R en el eje de las abscisas e I en el eje de las coordenadas.

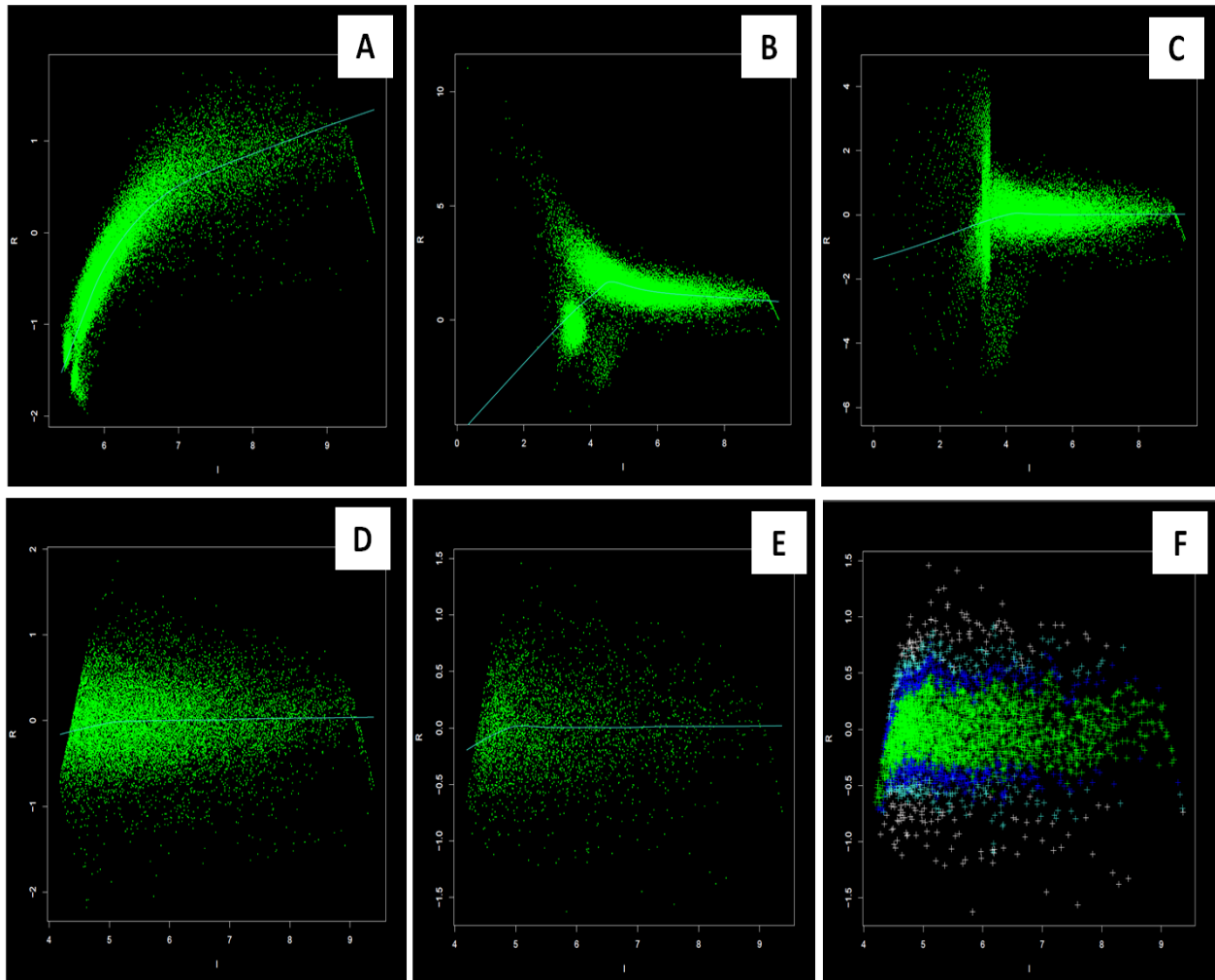
Donde:

$$R = \log_2 (\text{Alexa555}) - \text{Log}_2 (\text{Alexa647})$$

$$I = \log_{10} (\text{Alexa555}) + \text{Log}_{10} (\text{Alexa647})$$

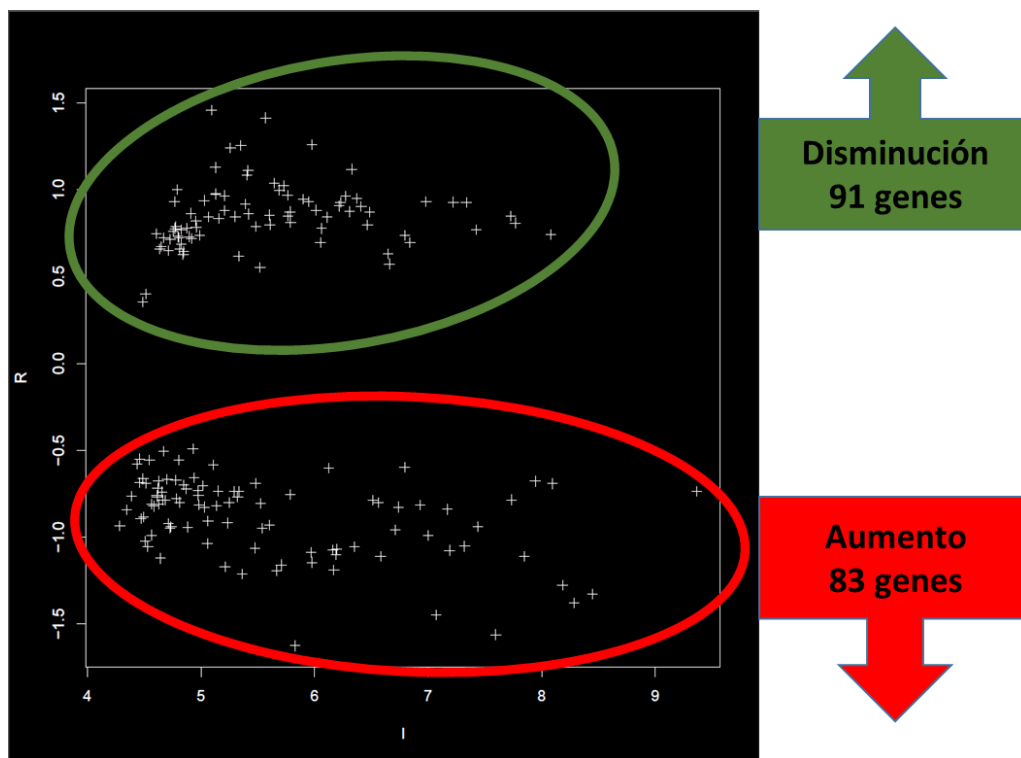
Estas transformaciones logarítmicas permiten una mejor visualización de los datos como se muestra en la figura 38A. Lo siguiente fue aplicar una corrección a los valores restando el valor del fondo a cada uno (Figura 38B). Para una mejor agrupación de los datos y evidenciar de mejor manera la dispersión de los mismos, se normalizaron mediante un algoritmo “Lowess” que normaliza los datos mediante regresión ponderada local (Figura 38C), los datos que presentan mucha dispersión son los que no se agrupan cercanos a la media, estos fueron eliminados puesto al tener una dispersión tan grande los valores serían sobre estimados (Figura 38D). El siguiente paso fue quitar los duplicados, para dejar

solo un valor por cada gen (Figura 38E). Finalmente se calcula el valor Z-Score para cada punto. En la figura 38F se muestran los rangos de Z-Score al que pertenece cada punto en la gráfica mediante colores. En verde están los que tienen un valor  $<1$ , en azul están los valores  $\geq 1$  y  $<1.5$ , en turquesa se marcan los que son  $\geq 1.5$  y  $<2$ , y en blanco los  $\geq 2$ .



**Figura 38. Análisis estadístico y prueba Z-Score del microarreglo.**

Para que los cambios de expresión de un gen sean considerados como significativos el valor de Z-Score del gen en cuestión deberá ser  $\geq 2$  [Genarise, Marzo 2018]. En otros trabajos donde se han estudiado mutaciones mediante microarreglos se maneja también dicho estándar, tomando en cuenta genes con valores de Z-Score  $\geq 2$  [Rallis *et al.*, 2017]. Bajo este criterio se obtuvieron 83 genes que aumentaron significativamente su expresión y 91 genes que disminuyeron su expresión de forma significativa (Figura 39).



**Figura 39. Genes con cambios significativos de expresión con un Z-Score  $\geq 2$ .**

#### **7.4.2. Análisis de los genes en la plataforma en línea DAVID**

Tomando los genes cuyo valor de Z-Score fue  $\geq 2$ , se realizó un análisis en la plataforma en línea DAVID (Data Base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Esta plataforma tiene dos características importantes, la primera es el agrupar los genes o proteínas en procesos celulares en los que

intervienen, y la segunda es la de funcionar como un directorio que enlaza estas agrupaciones de genes o proteínas a las bases de datos donde se encuentra la información con respecto a dichos procesos, como rutas metabólicas o cascadas de señalización. Estas bases de datos a las que se redirecciona tienen también herramientas de agrupamiento lo que permite hacer una búsqueda integral.

Esta integración en la información es posible gracias a la ontología de genes (Gene Ontology Consortium), este proyecto busca integrar coherentemente y secuencialmente, la gran cantidad de información de los sistemas biológicos que se almacenan en la red. Para esto los genes, proteínas y procesos celulares cuentan con un número GO que los identifica y enlaza a toda la información relacionada disponible que se encuentre dentro de este sistema [Gene Ontology, Abril 2018]. Esta información es fácilmente relacionable con la presente en otras bases de datos fuera del sistema, gracias a que cada proceso tiene la lista de genes y proteínas que intervienen en el.

Para comenzar el análisis se importaron las listas de ID de genes con aumento y disminución de expresión en la plataforma, estos números de identificación provienen de la plataforma NCBI, con los IDs la plataforma obtiene la lista de proteínas de cada gen, con dicha lista se pueden usar las herramientas de agrupación funcional, donde se clasifican las proteínas de la lista en los diversos procesos celulares donde participan, pudiendo ser uno o varios, dependiendo de la proteína en cuestión. Los agrupamientos van acompañados de anotaciones de cada proteína, su función y los enlaces externos, siendo estos últimos de donde se obtiene la mayor cantidad de información.

### **7.4.3. Rutas de señalización modificadas por la interrupción del gen *ape2***

Pudiendo considerar a la célula como un claro ejemplo de lo que es un sistema complejo, donde todos los elementos están interconectados y agrupados formando una inmensa red funcional; la interrupción del gen *ape2* y la pérdida de la capacidad para generar la LAP yspII, generó en las células de *S. pombe* una gran cantidad de cambios, algunos son morfológicos y relativamente fáciles de observar. Sin embargo, la mayor cantidad de cambios suceden a nivel molecular. Para el propósito de este trabajo, los procesos celulares que se tomaron en cuenta fueron únicamente los que están relacionados con el ciclo celular y la mitosis.

#### **7.4.3.1. Genes que disminuyen su expresión**

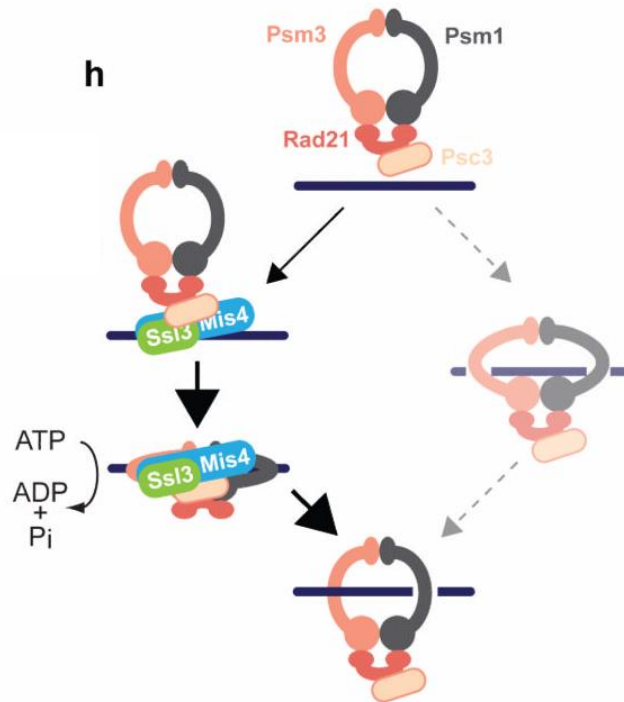
En lo que respecta a los 91 genes que disminuyeron significativamente su expresión, no se encontraron proteínas que intervinieran directamente sobre la regulación del ciclo celular y la mitosis. En este caso dado que los genes con un valor Z-Score  $\geq 2$ , no se relacionan directamente con los procesos en cuestión, se expandió la búsqueda a los genes con un Z-Score  $\geq 1.5$ , que incluye a los genes con un valor  $\geq 2$ . En este caso sí se encontraron proteínas con intervención en procesos relacionados a los de interés. Se tomaron dos agrupaciones, la primera con respecto a la organización cromosómica y la segunda tiene que ver con la división celular.

Uno de los procesos afectados es la segregación de cromátidas hermanas durante la mitosis, las proteínas más importantes de este grupo son Mis4, Cnp20, Sgo2, Mis14. El papel de cada una de describe a continuación:

#### **Mis4, factor de cohesión (aderina).**

Juega un papel estructural en la cromatina, interactúa físicamente con ADN bicatenario y Ssl3. La forma en la que interviene en la segregación de las cromátidas es funcionando como un puente entre el centrómero y el cinetocoro. Se encontró que forma un heterodímero junto a Ssl3, Mis4 se une al ADN y Ssl3

se une a su vez a Psc3, esta proteína es parte de un complejo llamado anillo de estabilización (Figura 40) [Muyama *et al.*, 2014].



**Figura 40. Interacciones del complejo estabilizador.**

Tomado de Muyama *et al.*, 2014.

Esta unión se mantiene hasta la anafase, en etapas tempranas evita que las cromátidas se polaricen precipitadamente, es decir, que el complejo estabilizador evita la segregación temprana de las cromátidas [Muyama *et al.*, 2014]. Con base en lo anterior se podría suponer que al disminuir los niveles de Mis4 en la cepa mutante, el puente entre el anillo estabilizador y el ADN se ve afectado negativamente, es decir, que la segregación se puede estar dando antes, lo que a su vez causa que en las células de la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 haya una repartición desigual del material genético.

#### **Cnp20, isoforma de la histona H4.**

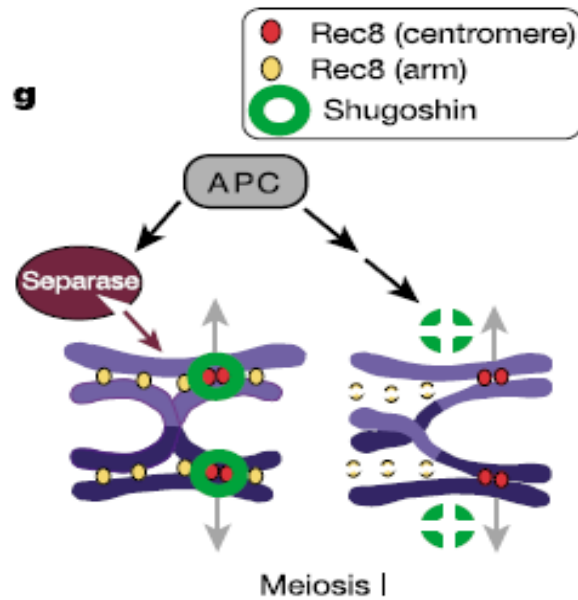
Está involucrada en la segregación de las cromátidas hermanas, otras proteínas que están relacionadas con este proceso y que pueden interactuar con Cnp20 son:

cbh1, cbh2, cbp1, cnl2, cnp20, csi1, fta3, fta4, fta6, fta7, hip1, mal2, mis12, mis13, mis14, mis15, mis16, mis17, mis18, mis20, mis6, mlo2, msd1, mtol1, nbl1, nud3, pic1, pk11, sgo2, sim4, slm9, spc24, spc25, wdr8, wip1, SPBC8D2.16c (Pombase, Abril 2018).

Cpn20 no está publicada en estudios, la aseveración de que intervenga en la segregación de cromátidas es por homología, siendo el número de referencia GO: 0000051. No se sabe con precisión su papel, pero al tratarse de una histona debe estar unida al ADN y puede que tenga que ver con la estructura y compactación de la cromatina.

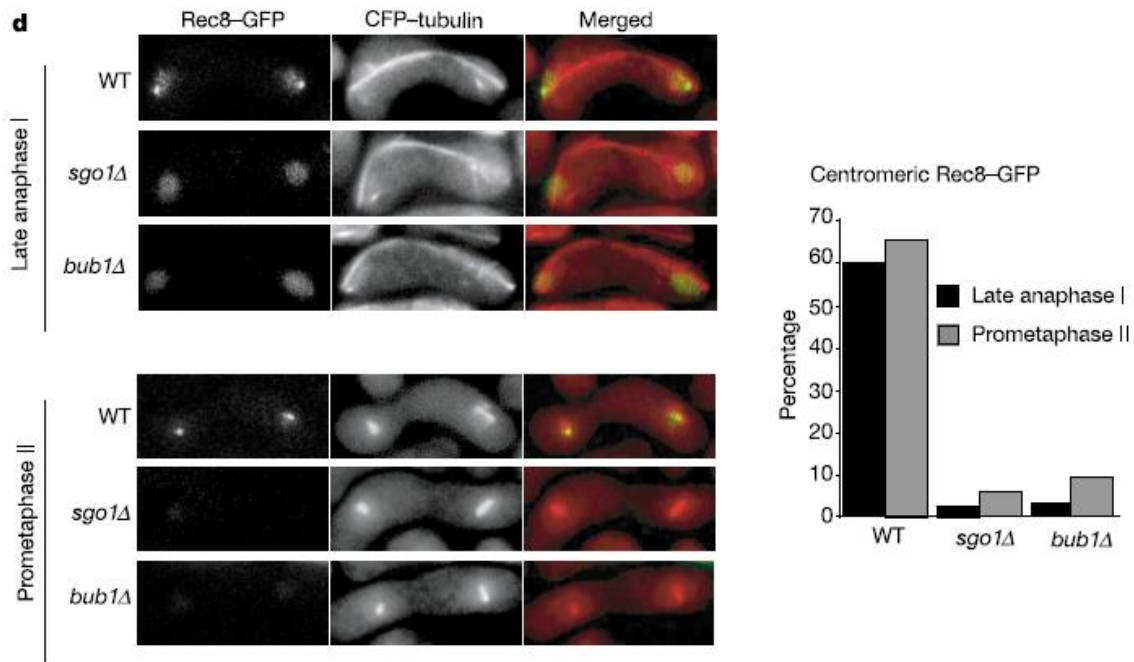
#### **Sgo2 (proteína Shugoshin), proteína que forma parte del centrómero.**

Interviene en la orientación de la polaridad de las cromátidas tanto en mitosis como en meiosis. Su localización depende de su regulador Bub1 (cinasa). Su función es la de proteger la cohesión de los centrómeros entre cromátidas hermanas. Dicha cohesión está dada entre el ADN y la proteína Rec8, la Separasa inhibe esta cohesión disgregando a Rec8, el papel que juega Sgo2 es el de cubrir la cohesión no permitiendo la intervención de la Separasa, esto se lleva a cabo durante la transición de la metafase II a la anafase II en la meiosis (Figura 41). Esta protección evita una repartición temprana de los cromosomas. Una vez que se ha dado el cambio de fase el complejo APC degrada a Sgo2 y permite la separación de las cromátidas [Kitallima *et al.*, 2004].



**Figura 41. Esquema de la protección de Sgo2 a la cohesión entre ADN y Rec8.**  
 Tomada de Kitallima *et al.*, 2004.

Se ha visto que la ausencia de Sgo2 ocasiona que Rec8 no se posicione en el núcleo durante la prometafase II, pues justo en la anafase tardía I Rec8 todavía se encuentra presente. La disminución de la presencia de Rec8 también se ve disminuida con la ausencia del regulador Bub1 que activa a Sgo2, la diferencia que ocasiona el silenciamiento de Sgo2 y el regulador Bub1 son claramente notables, en lo que respecta a la presencia de Rec8 (Figura 42) [Kitallima *et al.*, 2004]. El efecto final de la ausencia de Sgo2 es una mala distribución del ADN durante la meiosis, este efecto también es notable en el presente trabajo, donde al disminuir la expresión de Sgo2 en la cepa mutante aparece una segregación desigual del material genético (Figuras 33 y 36), aunque en este caso se lleva a cabo en la mitosis.

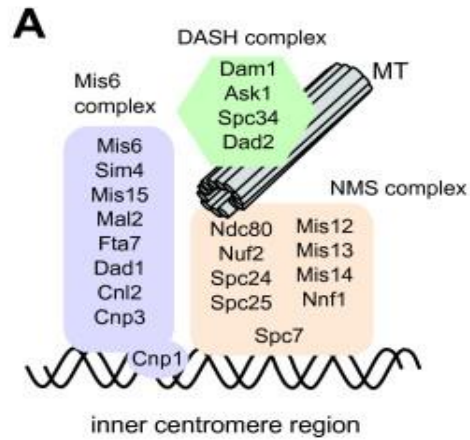


**Figura 42. Presencia de Rec8 en los centrómeros de diferentes cepas mutantes.** La grafica representa el porcentaje de células en las que se encuentra Rec8 durante la transición de anafase I a metafase II. Tomada de Kitallima *et al.*, 2004.

### Mis14, proteína estructural del cinetocoro.

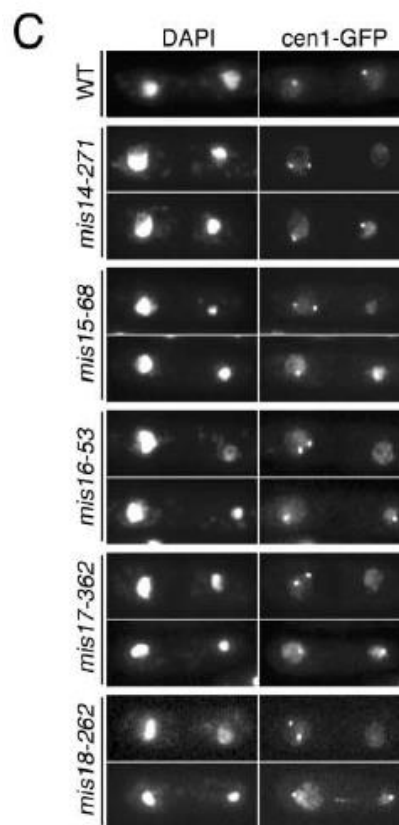
Interactúa físicamente con Mis12 que es la proteína principal del complejo NMS que tiene contacto directamente con el centrómero (Figura 43) [Haruhiko *et al.*, 2007].

La ausencia de Mis14 provoca una disgregación del centrómero, es decir, que no se lleva a cabo la compactación completa de los cromosomas, o bien la estabilidad del centrómero se ve comprometida, esto también sucede con otras proteínas Mis, lo que demuestra la alta regulación que se necesita para la estabilización de los centrómeros y la posterior segregación (Figura 44). La comprobación de la presencia de Mis14 y otras proteínas Mis durante la segregación de las cromátidas se observa en la figura 45, donde se demuestra el desplazamiento a la par del material genético y Mis14. [Hayashi *et al.*, 2004].

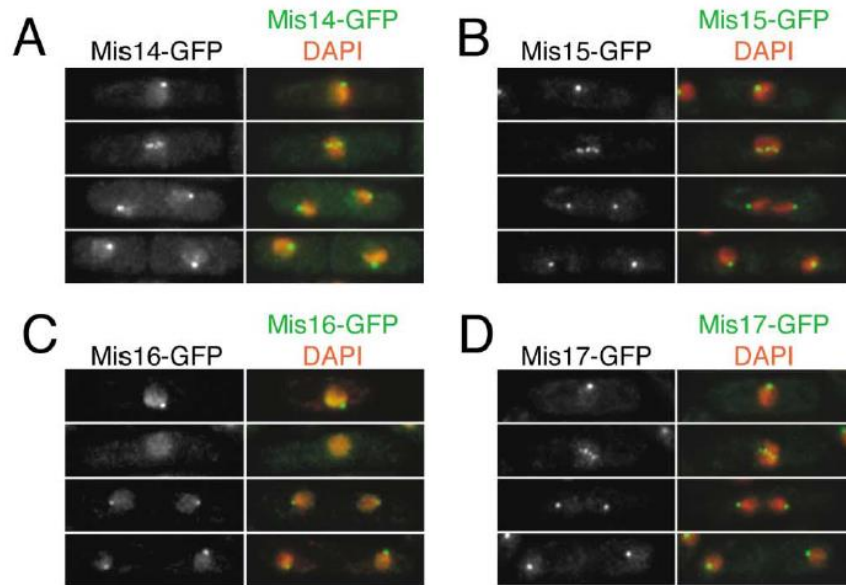


**Figura 43. Esquema que muestra el agrupamiento de Mis14 con el complejo NMS.**

Tomado de Haruhiko *et al.*, 2007.



**Figura 44. Efecto de la ausencia de proteínas Mis del cinetocoro sobre la compactación y estabilidad del centrómero.** Tomada de Hayashi *et al.*, 2004.



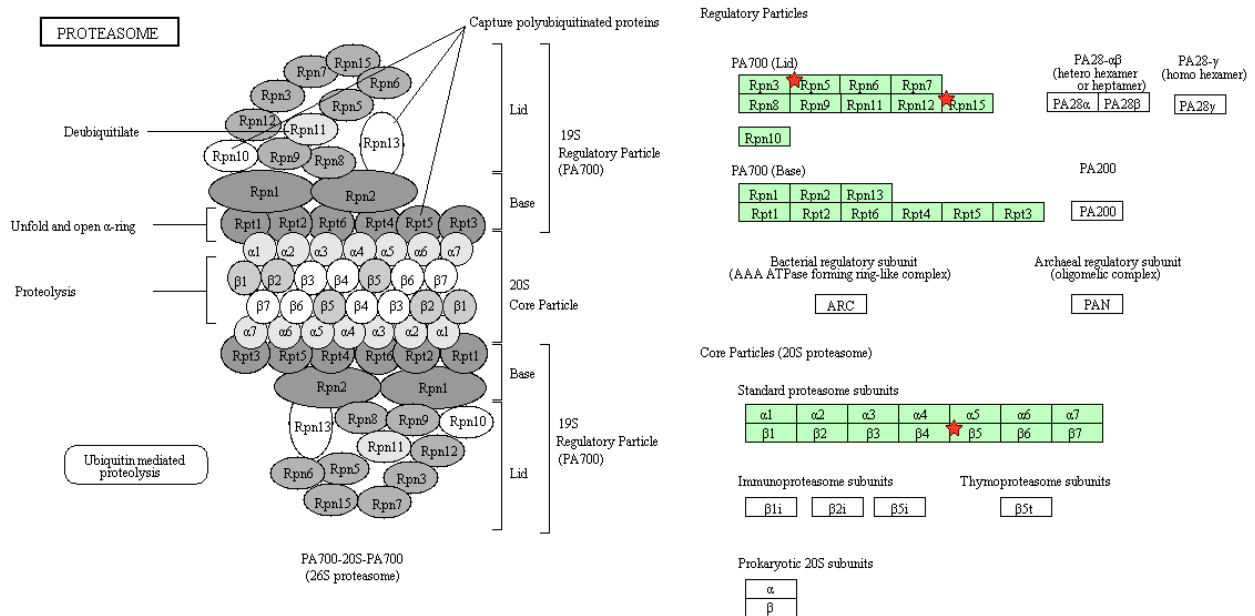
**Figura 45. Localización de las proteínas Mis.** La fluorescencia del cinetocoro está acompañado del ADN durante la segregación del material genético. Tomada de Hayashi *et al.*, 2004.

Los efectos fenotípicos de la cepa mutante  $4X\Delta ape2$  específicamente el efecto visto sobre la segregación de las cromátidas hermanas, son congruentes con los resultados del análisis de los genes que disminuyeron su expresión con un valor de Z-Score  $\geq 1.5$  y  $< 2$ , aunque generalmente los valores más significativos sean los  $\geq 2$ , en ocasiones el no analizar los datos con valor menor puede significar perder información valiosa, como ha sido este caso. Aunque, esta disminución no tan notable de la expresión de los genes anteriores, es también coincidente con el porcentaje de células que presentan el fenotipo, pues durante las observaciones en microscopia de fluorescencia no se encontró un gran número de células con una mala repartición del material genético, pero sí se encontraron muchas células con una condensación amorfa del núcleo.

### 7.4.3.2. Genes que aumentan su expresión

Dentro de los genes que aumentaron su expresión, si se encontraron genes que intervienen en procesos de control de ciclo celular, en específico de mitosis, entre los cuales tenemos a *rpn501*, *rpn502* y *pts1*.

Los genes *rpn501* y *rpn502* codifican para la proteína Rpn5-a y Rpn5-b respectivamente, que es parte de la subunidad reguladora 19S del proteosoma; el aumento de estas partículas proteosómicas conlleva a la regulación positiva de la mitosis en la transición de metafase a anafase, que es cuando las cromátidas hermanas se separan y se dirigen a los centriolos polarizados (Figura 46) [Pombase, Abril 2018]

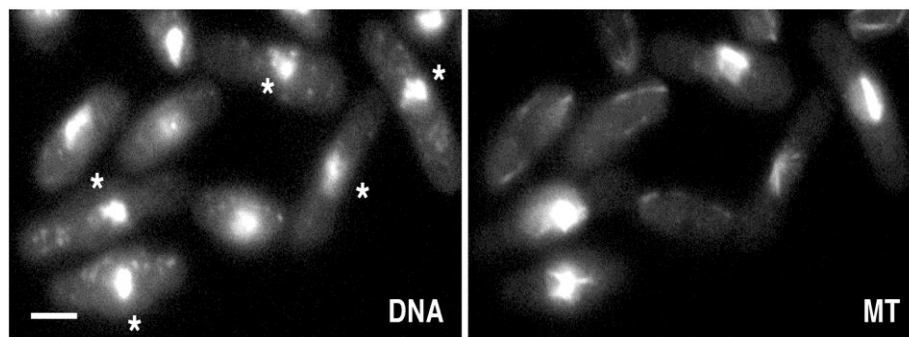


**Figura 46. Representación esquemática del proteosoma de *S. pombe*.** Obtenida mediante reconstrucción homóloga en la plataforma KEGG (Abril de 2018). Donde se marcan con estrellas rojas las proteínas que promueven la regulación del proteosoma sobre la movilidad cromática.

Por otro lado, *pts1* que codifica para la partícula proteosómica β5 que es parte de la subunidad 20S, específicamente de la región proteolítica, siendo una histona desacetilasa (Clr6), actúa conjuntamente con las partículas Rpn5 y

Rpn15 (pertenecientes a la subunidad 19S) y promueven que el proteosoma regule positivamente la movilidad de la cromatina (Figura 46) [KEGG, Abril 2018; EMBL-EBI, Abril 2018].

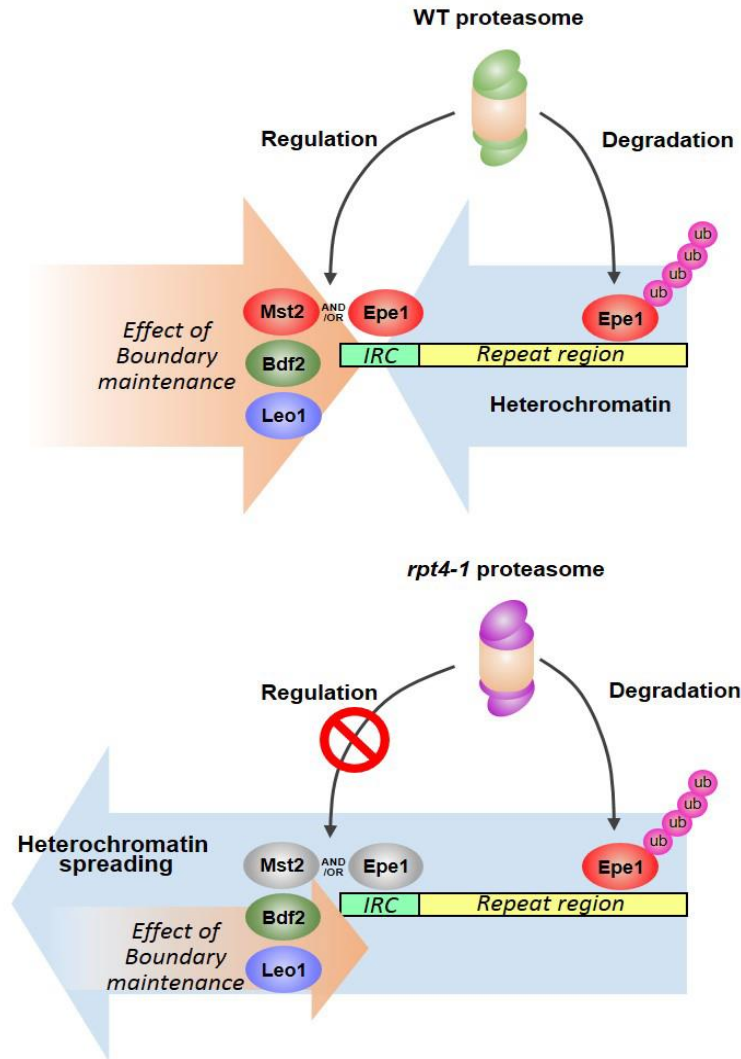
Se ha visto que el proteosoma regula la cromatina al ingresar al núcleo, el regulador de esta localización subcelular es Int6 (Yin6), esta proteína coopera con Ras1 para regular la segregación de la cromatina a través de Rpn5, esta regulación también involucra a la estructuración de los microtúbulos que son los encargados de la segregación de las cromátidas (Figura 47). Pareciera ser que una sobreexpresión de la partícula proteosómica Rpt2 que se une al factor de transcripción Mts2, causa que los microtúbulos no formen el uso cromático [Yen *et al.*, 2003]. En el caso de este trabajo la partícula que se ve afectada es Rpn5, que posiblemente este ocasionando un efecto similar y por eso se ve su expresión aumentada en las células que presenta la segregación desigual del material genético.



**Figura 47. Desregulación de los microtúbulos.** Este efecto se debe a la ausencia del regulador Yin6 y la sobreexpresión del complejo Mts2/Rpn1. Tomada de Yen *et al.*, 2003.

El conjunto de datos obtenidos en el microarreglo es muy interesante, sugiriendo fuertemente que la ausencia de la LAP yspII provoca una desregulación en los mecanismos de mitosis, específicamente en los que modulan la movilidad de la cromatina. Como respuesta a la carencia de la LAP yspII las células expresan en mayor medida proteínas que promueven la desregulación del uso cromático, pero a su vez favorecen el cambio de metafase a anafase. Deducimos que se ha producido en la cepa mutante, una desincronización de los procesos reguladores para el cambio de fase en la mitosis y el ciclo celular, con los procesos reguladores de la segregación de cromátidas hermanas, provocando la aparición de la morfología aberrante de la cepa  $4X\Delta ape2$  (repartición desigual del material genético en la mitosis).

La importancia del proteosoma sobre la cromatina radica no solamente en la segregación de las cromátidas, también es importante en la regulación del estado de compactación, lo que demostraron Seo *et al.*, en 2017. En su estudio demuestran que el proteosoma juega un papel fundamental en la regulación de la extensión de la heterocromatina mediante un papel dual. Por un lado, promueve la expresión de Mst2 y/o Epe1 que generan un efecto límite, frenando la expansión de la heterocromatina. Por otra parte, degrada a Epe1 que se encuentra repartida en la heterocromatina provocando su extensión (Figura 48). En específico esta regulación se da por la partícula Rpt4, de la subunidad reguladora 19S, pues al silenciar esta, la regulación positiva del efecto límite es insuficiente o se detiene, mientras que la degradación de Epe1 continua, lo que provoca la expansión de la heterocromatina.



**Figura 48. Regulación de la compactación de la cromatina por el proteosoma.** La regulación se lleva a cabo mediante la partícula reguladora Rpt4. Tomado de Seo *et al.*, 2017.

Con base en los resultados del microarreglo, se notan dos cosas. La primera es que proteínas que forman parte del uso cromático y el cinetocoro, disminuyen su expresión, lo que causa que no se tengan los anclajes físicos para la segregación de las cromátidas. Por otra parte, el proteosoma está jugando un papel aparentemente desregulador, pues el aumento de la partícula reguladora Rpn5 provoca que los microtúbulos no se agrupen en el momento adecuado a la vez

que promueve el cambio de fase mitótica. Este papel dual del proteosoma no es inesperado, como se vio anteriormente.

Lo que concierne a la ubicación de la LAP yspII dentro de los procesos descritos, es claro que debe intervenir en los procesos que se lleva a cabo en el citoplasma, pues es esta su ubicación. En cuanto a la participación de LAPs en la regulación de ciclo celular, tenemos la LAP3 de humano, que interviene en la progresión de cáncer. Cuando los niveles de expresión de la LAP3 aumentan, conlleva al aumento de marcadores de proliferación celular como son CDK2, CDK6 y PCNA, al mismo tiempo disminuye la expresión de E-caderina; estos dos efectos causan un aumento en la división de las células cancerígenas y la disminución de la adhesión celular favoreciendo la metástasis. Estos cambios son congruentes con el tipo de cáncer en el que se ha encontrado, que es el carcinoma hepatocelular maligno [Tian *et al.*, 2014].

El mecanismo de acción de la LAP no se ha clarificado, pero guarda una relación directa con la cascada de señalización de ciclinas, en especial con CDK2 y la ciclina D2 [Tian *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014].

En el caso de este trabajo la relación entre la LAP yspII y la expresión de elementos de regulación del ciclo celular se mantiene, disminuyendo los niveles de la ciclina Cig1 y la formina Cdc12 en la cepa mutante. Estas proteínas son reguladores del ciclo celular. Por lo tanto, la función de la LAP yspII puede estar relacionada con la activación, maduración o inhibición de algún punto en la cascada de regulación de ciclinas, y éstas a su vez provocan los efectos sobre el proteosoma, el uso cromático y el cinetocoro. Aunque también puede estar interviniendo en la regulación del ensamblaje del proteosoma, pues como se ha mencionado, el proteosoma puede tener diversas funciones dependiendo de las partículas proteosómicas que lo formen en un momento dado.

## 8. CONCLUSIONES

- La actividad leucín aminopeptidasa que se pierde en la cepa mutante 4X $\Delta$ ape2 debido a la interrupción del gen *ape2*, se recupera en la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev, que se obtuvo mediante una reversión equivalente (complementación extracromosómica) mediante el vector pRSP-ape2T.
- El comportamiento cinético del crecimiento celular en la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev fue muy similar al de la cepa control 4X, de la misma forma que la velocidad máxima y el crecimiento máximo de la cepa revertante.
- La viabilidad celular se vio claramente recuperada en la cepa revertante 4X $\Delta$ ape2Rev con respecto a la mutante 4X $\Delta$ ape2, siendo la viabilidad de la cepa 4X $\Delta$ ape2Rev estadísticamente igual al control 4X.
- El fenotipo caracterizado por la distribución desigual de las cromátidas hermanas durante la mitosis en la cepa 4X $\Delta$ ape2, se logró revertir en la cepa 4X $\Delta$ ape2Rev, donde se observó una distribución equitativa del material genético durante el final de la fase logarítmica y el principio de la estacionaria (32 a 44 horas de crecimiento)
- Disminuyeron su expresión 235 genes con un valor de Z-Score  $\geq 1.5$ . Dentro de las más importantes se encuentran los que codifican a las proteínas Mis4, Sgo2, Cnp20 y Mis14.
- Las proteínas que disminuyeron su expresión regulan la formación y función del cinetocoro, así como su interacción con el centrómero de las cromátidas hermanas durante la mitosis.
- Aumentaron su expresión 83 genes con un valor Z-Score  $\geq 2$ . Dentro de los más importantes están los que codifican para las proteínas Rpn5-a, Rpn5-b y  $\beta 5$  (Clr6).

- Las proteínas que aumentan su expresión son parte del proteosoma 26S, regulan la formación del uso cromático y su participación en la polarización de las cromátidas hermanas durante la mitosis. También generan una regulación positiva en la transición de metafase a anafase.
- La LAP yspII está involucrada en la regulación citoplasmática del ensamblaje del proteosoma y/o en la regulación de Cdc12 y la ciclina Cig1 que intervienen en la cascada de señalización de ciclinas para la regulación del ciclo celular.

## 9. PERSPECTIVAS

- Censar los niveles de expresión del gen *ape2* mediante su ARNm y presencia de LAP yspII durante las fases mitóticas, en especial metafase y anafase.
- Comprobar la relación que se guarda entre la expresión del gen *ape2* de la LAP yspII con la expresión de los genes que codifican a las proteínas Mis4, Sgo2, Cnp20 y Mis14, Rpn5 y  $\beta 5$  Cdc12 y Cig1; mediante q-PCR.
- Localizar a través de fluorescencia la posición de la LAP yspII en las células, durante las fases de la mitosis, en especial metafase y anafase. Conjuntamente con la localización de las proteínas relacionadas antes mencionadas.
- Mediante ChIP concretar las interacciones físicas de la LAP yspII con alguna de las proteínas reguladoras que se mencionan.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albrecht S, Al-Lakkis-Wehbe M, Orsini A, Defoin A, Pale P, Salomon E, Tarnus C, Weibel J M. **(2011)**. Amino-benzosuberone: a novel warhead for selective inhibition aminopeptidase-N/CD13. *Biorg Med Chem.* 19: 1434-1449.
2. Arbesú MA J, Valle E, Suárez-Rendueles P. **(1993)**. Purification and characterization of aminopeptidase yspI from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 9 (6): 637-644.
3. Arbesú MA J, Gascon S, Suárez-Rendueles P. **(1991)**. Insolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants lacking aminopeptidase activity. *Yeast.* 7 (5): 525-531.
4. Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper J, Elledge S. **(1996)**. SKP1 connects cell cycle regulator to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *CellPress.* 86: 2-26.
5. Barret A J, Woessner J, Rawlings N. **(2004)**. Introduction: Metallopeptidases and their clans. In: Alan J Barrett, J Fred Woessner and Neil D Rawlings, editors. Handbook of Proteolytic Enzymes 2a ed. Vol. 1. San Diego: Academic Press.
6. Bartling D, Weiler E W. **(1992)**. Leucine aminopeptidase from *Arabidopsis thaliana*. Molecular evidence for a phylogenetically conserved enzyme of protein turnover in higher plants. *Eur J Biochem.* 205: 425-31.
7. Bohley P, Seglen P O. **(1992)**. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia.* 48 (2): 151-7.
8. Burley S K, David P R, Taylor A, Lipscomb W N. **(1990)**. Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 6878-6882.
9. Capiello M, Alterio V, Amodeo P, Del Corso A, Scaloni A, Pedone C, Moshini R, De Donantis GM, De Simone G, Mura U. **(2006)**. Metal ion substitution in the

catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing to leucyl aminopeptidase. *Biochemistry*. 45: 3226-3234.

10. Chaerkady R y Shrama K K. **(2004)**. Characterization of a bradykinin-hidrolizing protease from the bovine lens. *Invest Ophthalmol*. 45: 1214-1223.
11. Changklugmoa N, Kuekhai P, Riengrojpitak S, Chaithirayanon K, Chaichanasak P, Preyavichyapugdee N, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. **(2013)**. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitology Research*. 112: 3653-3659.
12. Chien H C, Lin L L, Chao S H, Chen C C, Wang W C, Shaw C Y, Tsai Y C, Hu H Y, Hsu W H. **(2002)**. Purification, characterization and genetic analysis of a leucine aminopeptidase from *Aspergillus sojae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1576: 119-121.
13. Chondrogianni N, Fragoulis E, Gonos E S. **(2002)**. Protein degradation during aging: the lysosome-, the calpain- and the proteasome-dependent cellular proteolytic systems. *Biogerontology*. 3: 121-123.
14. Collura A, Blaisonneau J, Baldacci G, Francesconi S. **(2005)**. The Fission Yeast Crb2/Chk1 Pathway Coordinates the DNA Damage and Spindle Checkpoint in Response to Replication Stress Induced by Topoisomerase I Inhibitor. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (17): 7889–7899.
15. Cruz-Ramos J. **(2006)**. Construcción de un vector de sobreproducción que sobre-exprese la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe* [Tesis de licenciatura]. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ICUAP BUAP. Puebla, México.
16. Díaz-Villanueva JF, Díaz-Molina R, García-González V. **(2015)**. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int J Mol Sci*. 16:17193-17230.

17. Dice J F. **(1996)**. Peptide sequence that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trend in Biochemical Sciences*. 15 (8): 305-309.
18. Dick T P, Nussbauma A K, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanović S, Wolf D H, Huber R, Rammensee H G, Schild H. **(1998)**. Contribution of proteasomal  $\beta$ -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *The Journal Biological Chemistry*. 273 (40): 25637- 25646.
19. Egel R. **(2000)**. Fission yeast on the brink of meiosis. *BioEssays*. 22 (9): 854-860.
20. EMBL-EBI. [Monografía en internet]. Consultado en **Abril 2018**. Disponible en: [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk). GO:0007091.
21. Escudero B, Parra F, Suárez-Rendueles P. **(1993)**. Purification and characterization of the endogenous inhibitor of proteinase B from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimie*. 75 (10): 855-859.
22. Flores-Tlalpa G. **(2015)**. Leucín aminopeptidasa yspII recombinante: condiciones óptimas de sobreproducción en la levadura *Pichia pastoris*, peso molecular y purificación. [Tesis de Licenciatura]. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ICUAP BUAP. Puebla, México.
23. Fowler J H, Narváez-Vázquez J, Aromdee D N, Pautot V, Holzer F M, Walling L L. **(2009)**. Leucine aminopeptidase regulates defense and wound signaling in tomato downstream of jasmonic acid. *Plant Cell*. 21 (4): 1239-51.
24. Genarise. [Monografía en internet]. Consultado en **Marzo 2018**. Disponible en: [www.ifc.unam.mx/genarise](http://www.ifc.unam.mx/genarise).
25. Gene Ontology. [Monografía en internet]. Consultado en **Abril 2018**. Disponible en: [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org).

26. Golich F C, Han M, Crowder M W. **(2006)**. Over-expression, purification and characterization of aminopeptidase N from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 47 (2): 634-639.
27. Gonfloni S, Weijland A, Kretzschmar J, Superti-Furga G. **(2000)**. Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src. *Nat Struct Biol*. 7 (4): 281-286.
28. Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin D M, Huber R, Glickman M H, Finley D. **(2000)**. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*. 7 (11): 1062-1067.
29. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik H D, Huber R. **(1997)**. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 386 (6624): 463-471.
30. Gu Y Q, Chao W S, Walling L L. **(1996)**. Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *J Biol Chem*. 271: 25880–25887.
31. Gutiérrez Díaz N Y. Leucín aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*: obtención de mutantes por delección del gen *ape2* y caracterización de su fenotipo **(2014)**. [Tesis de Maestría]. Laboratorio de bioquímica y biología Molecular ICUAP. BUAP Puebla, México.
32. Hannus S, Bühler D, Romano M, Seraphin B, Fischer U. **(2000)**. The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1 *Human Molecular Genetics*. 9 (5): 663–674.
33. Haruhiko A, Tokuko H, Yasushi H. **(2007)**. Reconstruction of the kinetochore: a prelude to meiosis. *Cell Div*. 2: 17.

34. Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. **(2004)**. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell*. 118 (6): 715–729.
35. Hayles J, Nurse P. **(1992)**. Genetics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Genet*. 26: 373–402.
36. He X, Huang Q, Qiu X, Liu X, Sun G, Guo J, Ding Z, Yang L, Ban Na, Tao T, Wang D. **(2015)**. LAP3 promotes glioma progression by regulating proliferation, migration and invasion of glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72: 1081-1089.
37. Hedges S B. **(2002)**. The origin and evolution of model organisms. *Nat. Rev. Genet*. 3 (11): 838–849.
38. Herrera-Camacho I, Rosas Murrieta N, Rojo-Domínguez A, Millán L, Reyes-Leyva J, Santos-López, Suárez-Rendueles P. **(2007)**. Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe*. *The FEBS Journal*. 274 (23): 6228-6240.
39. Holger Bastians, Topper L M, Gorbcki G L, Ruderman J V. **(1999)**. Cell Cycle-regulated Proteolysis of Mitotic Target Proteins. *Molecular Biology of the Cell*. 10 (11): 3927-3941.
40. IUBMB, [Monografía en internet]. Consultado en **Abril 2018**. Disponible en: [www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/](http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/)
41. Jia H, Nishikawa Y, Luo Y, Yamagishi J, Sugimoto C, Xuan X. **(2009)**. Characterization of a leucine aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biochemical Parasitology*. 170 (1): 1-6.

42. Kang J M, Ju H L, Ju J W, Sohn W M, Kin T S, Bahk Y Y, Hong S J, Na B K. **(2012)**. Comparative biochemical and functional properties of two leucine aminopeptidases of *Clonorchis sinensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 182: 17-26.
44. Kazuki K, Su S, Yanagida M, Toda T. **(1995)**. Fission yeast TPR-family protein nuc2 is required for G<sub>1</sub>-arrest upon nitrogen starvation and is an inhibitor of septum formation. *Journal of Cell Science*. 108: 895-905.
45. KEGG. [Monografía en internet]. Consultado en **Abril 2018**. Imagen disponible en: [www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?spo03050](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?spo03050)
46. Kitajima T S, Kawashima S A, Watanabe Y. **(2004)**. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature*. 427 (6974): 510–517.
47. Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. **(2003)**. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2<sup>a</sup> Ed. Omega.
48. Lenk U, Sommer T. **(2000)**. Ubiquitin- mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 39403-39410.
49. Lindner P. **(1893)**. *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gährungserreger. *Wochenschrift für Brauerei*. 10: 1298–1300.
50. Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A. **(2016)**. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research*. 26 (8): 869-885.
51. Lodish H, Berk A, Kaiser C, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Scott M P. **(2016)**. *Molecular Cell Biology*. 7a Ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.

52. Luque Guillén V. Estructura y propiedades de las proteínas. [Monografía en internet]. Consultado en **Abril 2015**. Universidad de Valencia. Valencia, España. Disponible en: [www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09.pdf](http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf).
53. Matsui M, Fowler J H, Walling L L. **(2006)**. Leucine aminopetidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*. 387: 1535-1444.
54. Melius P, Moseley M H, Brow D M. **(1970)**. Characterization of the subunits of swine kidney leucine aminopeptidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 221: 62-68.
55. Murayama Y, Uhlmann F. **(2014)**. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by cohesion ring. *Nature*. 505 (7483): 367-371.
56. NCBI. [Monografía en internet]. Consultado en **abril 2018**. Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=SPAC13A11.05](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=SPAC13A11.05).
57. Nederlof P M, Wang H R, Baumeister W. **(1995)**. Nuclear localization signals of human and *Thermoplasma* proteasomal  $\alpha$  subunits are functional in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92 (26): 12060-12064.
58. Neurath H. **(1985)**. Proteolytic enzymes, past and present. *Federation Proceedings*. 44 (14): 2907-2913.
59. Neutzner A, Youle R J, Karbowski M. **(2007)**. Outer mitochondrial membrane protein degradation by the proteasome. *Novartis Foundation symposium*. 287: 4-14.
60. Nurse P. **(1990)**. Universal control mechanism regulation onset of M-phase. *Nature*. 344: 503-508.

61. Ogiso Y, Tomida A, Tsuruo T. **(2002)**. Nuclear localization of proteasomes participates in stress-inducible resistance of solid tumor cells to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Research*. 62: 5008-5012.
62. Osmulski P A, Gaczyska M E. **(1998)**. A new large proteolytic complex distinct from the proteosoma is present in the cytosol of fission yeast. *Current Biology*. 8 (18): 1023-1026.
63. Paiz-Candia B. **(2012)**. Caracterización *in silico* del gen Fxna de *Schizosaccharomyces pombe*. [Tesis de maestría]. Posgrado de Ciencias Químicas. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
64. Pombase. [Monografía en internet]. Consultado en **Abril 2018**. Disponible en: [www.pombase.org](http://www.pombase.org)
65. Rallis C, Townsend St J, Bähler J. **(2017)**. Genetic interactions and functional analyses of the fission yeast gsk3 and amk2 single and double mutants defective in TORC1-dependent processes. *Scientific Reports*. 7: 44257.
66. Ramírez J, Chávez L, Santillán J L, Guzmán S. **(2003)**. Microarreglos de ADN. *Mensaje Bioquímico*. UNAM. 27: 97-120.
67. Rinaldi G, Morales M E, Alrefaei Y N, Cancela M, Castillo E, Dalton J P, Tort J F, Brindley P J. **(2009)**. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and Biochemical parasitology*. 167 (2): 118-126.
68. Rivera-Juárez M A. **(2009)**. Leucín aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*. Sobreproducción, purificación, estudio cinético de competición de iones y modelado del dominio N-terminal. [Tesis de Maestría]. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ICUAP BUAP. Puebla, México.

69. Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning a laboratory manual. **(2001)**. 3<sup>o</sup> Edicion. Vols 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
70. Sedmak J J, Grossberg S E. **(1977)**. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. Analytical Biochemistry. 79 (1-2): 544-552.
71. Seo H D, Choi Y, Kim M, Kang K, Urano T, Lee D. **(2017)**. The 19S proteasoma is directly involved in the regulation of heterochromatin spreading in fission yeast. The Journal of Biological Chemistry. 292 (41): 17144-17155.
72. Smith E L. Manganese and L-leucine aminoexopeptidase. **(1945)**. The Journal of Biological Chemistry. 163: 15-27.
73. Suárez-Rendueles P, Villa L, Arbesú M J, Escudero B. **(1991)**. The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Microbiology Letters. 81 (2): 215-220.
74. Tabuchi M, Iwaihara O, Ohtani Y, Ohuchi N, Sakurai J, Morita T, Iwahara S, Takegawa K. **(1997)**. Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport, and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Bacteriology. 179 (13): 4179-4189.
75. Tanaka K, Yoshimura T, Tamura T, Fujiwara T, Kumatori A, Ichihara A. **(1990)**. Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. FEBS Letters. 271 (1-2): 41-46.
76. Tian W, Cao Y, Ismael A, Stone D, Liang J. **(2014)**. Roles of regulated internalization in the polarization of cell surface receptors. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2014: 1166-1169.
77. Tian S-Y, Chen S-H, Shao B-F, Cai H-Y, Zhou Y, Zhou Y-L, Xu A-B. **(2014)**. Expression of leucine aminopeptidase 3 (LAP3) correlates with prognosis and

malignant development of human hepatocellular carcinoma (HCC). *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 7 (7): 3752-3762.

78. Timer J C, Enoksson M, Wildfang E, Zhu W, Igarashi Y, Denault J-B, Ma Y, Dummitt B, Chang Y, Mast A E, Eroshkin A, Smith J W, Tao W A, Salvesen G S. **(2007)**. Profiling constitutive proteolytic events *in vivo*. *Biochemical Journal*. 407 (Pt 1): 41-48.
79. Toda S, Ando H, Nagasaka T, Tsukahara S-I, Nomura M, Kotani Y, Nomura S, Kikkawa F, Tsujimoto M, Mizutani S. **(2002)**. Existence of placental leucine aminopeptidase/oxitocinase/insulin-regulated membrane aminopeptidase in human endometrial epithelial cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87 (3): 1384-1389.
80. Villa L, Suárez-Rendueles P. **(1994)**. Dipeptidyl aminopeptidase yspI mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: genetic mapping of dpa1+ on chromosome III. *FEMS Microbiology Letters*. 120 (1-2): 211-216.
81. Wilkinson C R, Penney M, McGurk G, Wallace M, Gordon C. **(1999)**. The 26S Proteosoma of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 354 (1389): 1523-1532.
83. Wixon J. **(2002)**. Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, The Fission Yeast. *Comparative and Functional Genomics*. 3 (2): 194-204.
84. Wood V, Gwilliam R, Rajandream M A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle E J, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S,

Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail M A, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor R G, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl T M, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves S J, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst S M, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada V A, Garzon A, Thode G, Daga R R, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Dominguez A, Revuelta J L, Moreno S, Armstrong J, Forsburg S L, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski G V, Ussery D, Barrell B G, Nurse P. **(2002)**. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 415 (6874): 871-880.

85. Yamamoto M, Imai Y, Watanabe Y. **(1997)**. Mating and Sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *CSH Monographs The Molecular and Cellular Biology of the Yeast*. 3: 1037-1106.

86. Yen H C, Gordon C, Chang E C. **(2003)**. *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras Homologs Regulate Cell Division and Mitotic Fidelity via the Proteasome. *Cell*. 112 (2): 207-217.

87. Zhang S, Yang X, Shi H, Li M, Xue Q, Ren H, Yao L, Chen X, Zhang J, Wang H. (2014). Overexpression of leucine aminopeptidase 3 contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Molecular Histology*. 45 (3): 283-292.

## 11. ANEXOS

### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

#### LB

- Peptona de caseína ----- 1%
- Extracto de levadura ----- 0.5%
- Cloruro de sodio ----- 1%

(Si se requiere medio sólido, agregar 1.5% agar)

Esterilizar en autoclave a 15psi/15 minutos.

#### YES 2064

- Extracto de levadura ----- 0.5%
- Glucosa ----- 3%
- L-Adenina ----- 0.0225%
- L-Histidina ----- 0.0225%
- L-Leucina ----- 0.0225%
- Uracilo ----- 0.0225%
- L-Lisina\*HCl ----- 0.0225%

(Si se requiere medio sólido, agregar 2% agar)

Esterilizar en autoclave a 15ps/15 minutos.

## **EMM2**

- Ácido ftálico ----- 0.3%
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ----- 0.224%
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  ----- 0.5%
- Sales 50X ----- 2%
- Glucosa 10X ----- 10%
- Vitaminas 1000X ----- 0.1%
- Minerales 10'000X ----- 0.01%
- Aminoácidos y bases 50X----- 2%

(Si se requiere medio sólido, agregar 2% agar)

Esterilizar en autoclave a 15psi/15 minutos.

## **SALES 50X**

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ----- 5.35%
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ----- 0.075%
- $\text{KCl}$  ----- 5%
- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ----- 0.2%

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar.

Esterilizar en autoclave a 15ps/15 minutos.

## **VITAMINAS 1'000X**

- Ácido pantoténico ----- 0.1%
- Ácido nicótico ----- 1%
- Inositol ----- 1%
- Biotina ----- 0.01%

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar.

Esterilizar por filtración.

### **MINERALES 10'000X**

- Ácido bórico ----- 0.5%
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ----- 0.45%
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ----- 0.72%
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ----- 0.17%
- Ácido molibdico ----- 0.16%
- KI (yoduro de potasio) ----- 0.1%
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ----- 0.04%
- Ácido cítrico ----- 1.1%

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar.  
Esterilizar por filtración.

### **AMINOÁCIDOS Y BASES 50X**

Preparar 11.25 mg/mL de cada componente:

- Adenina
- Histidina
- Leucina
- Uracilo
- Lisina

Esterilizar en autoclave a 15psi/15 minutos. Preferentemente por filtración.

### **GLUCOSA 30% (200 mL)**

- Glucosa ----- 60 g

Aforar a 200 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  mili-Q estéril.

Esterilizar en autoclave a 15ps/15 minutos.

## **EMM2 N-**

- Ácido ftálico ----- 0.3%
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>----- 0.224%
- Sales 50X ----- 2%
- Glucosa 10X ----- 10%
- Vitaminas 1000X ----- 0.1%
- Minerales 10`000X ----- 0.01%
- Aminoácidos y bases 50X----- 2%

(Si se requiere medio sólido, agregar 2% agar)

Esterilizar en autoclave a 15psi/15 minutos.

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE LISIS ALCALINA PARA ADN PLASMÍDICO**

### **SOLUCIÓN DE LISIS I**

- 50mM glucosa
- 25mM Tris-HCl pH=8
- 10MM EDTA pH=8

Esterilizar en autoclave 15psi/15 minutos y almacenar a 4°C.

### **SOLUCIÓN DE LISIS II**

- 0.2N NaOH
- 1% SDS

Esta solución se prepara al momento que se requiera ser utilizada a temperatura ambiente.

### **SOLUCIÓN DE LISIS III (100 mL)**

- 5M acetato de potasio ----- 60 mL
- Ácido acético glacial ----- 11.5 mL
- Agua mili-Q estéril ----- 28.5 mL

Almacenar a 4°C.

### **PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE LISIS PARA LEVADURAS**

- 2% tritón (X-100)
- 1% SDS
- 100mM NaCl
- 10mM Tris-HCl pH=8
- 0.38mM EDTA

Esterilizar en autoclave a 15psi/15 minutos.

### **PBS 1X    pH 7.4**

Para 100 mL:

- NaCl ----- 0.8g
- KCl ----- 0.02g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 0.144g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 0.024g

Ajustar pH a 7.4 y esterilizar en autoclave a 15psi/ 15minutos.

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN TBE PARA GELES DE AGAROSA Y BUFFER DE CORRIDA**

### **TBE 5X**

Para 1 L:

- Tris base ----- 27g
- Ácido bórico ----- 13.75g
- EDTA pH 8, 0.5M ----- 10 mL

La concentración final de la solución de trabajo es 0.5X.

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE AZUL DE COOMASSIE**

### **SOLUCIÓN 0.06% EN ÁCIDO PERCLÓRICO AL 3%**

Para 200 mL:

- Ácido perclórico ----- 3%
- Azul brillante G-250 ----- 0.12g

Realizar ajuste de pureza del ácido perclórico antes de preparar la solución.

Mezclar la solución en agitación constante entre 30-40 min.

Filtrar y aforar a 200 mL.

Leer absorbancia a 465 nm, la absorbancia del colorante deberá encontrarse entre 1.3-1.5