

ULL

Universidad  
de La Laguna

Facultad de Ciencias  
Sección de Biología



Estimación de reordenamientos genéticos  
mitóticos causados por diversos agentes  
antitumorales en el organismo modelo  
*Saccharomyces cerevisiae*

Estimation of mitotic genetic rearrangements  
caused by several anticancer agents in the  
model organism *Saccharomyces cerevisiae*

Silvia María Santana Sosa

Grado en Biología

Julio, 2016

<b>SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016</b>	<b>ENTRADA</b> Fecha: Núm:
--	----------------------------------

**Datos Personales**

Nº DNI o pasaporte: 45782144T	Nombre y Apellidos: Silvia María Santana Sosa
Teléfono: 616557977	Dirección de correo electrónico: silvia.sansos@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

**Estimación de reordenamientos genéticos mitóticos causados por diversos agentes antitumorales en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

<b>Dr./ José Antonio Pérez</b>	
<b>Departamento de Bioquímica microbiología biología celular genética</b>	
<b>y Dr./ Félix Machín</b>	
<b>Unidad de Investigación. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.</b>	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: José Antonio Pérez	 Fdo.: Félix Machín

La Laguna, a 24 de Junio de 2016

Firma del interesado/a



**SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA**

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. El cáncer</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Etiología del cáncer</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Quimioterapia basada en la Topoisomerasa II como diana antitumoral</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Mecanismos biológicos de reparación del daño al ADN tras el tratamiento con poisons de la Topo II</b>	<b>4</b>
<b>1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para el estudio biológico de los efectos de agentes antitumorales</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento estándar</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Agentes antitumorales y otros compuestos</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Modificación genética de las cepas de interés</b>	<b>13</b>
3.3.1. Obtención de células competentes	13
3.3.2. Transformación	13
<b>3.4. Cribado genético de las cepas de interés</b>	<b>14</b>
3.4.1. Extracción de ADN	14
3.4.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	14
3.4.3. Electroforesis	16
3.4.4. Digestión con enzimas de restricción	16
<b>3.5. Determinación de las concentraciones máximas subletales (LC<sub>0</sub>)</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Detección de reordenamientos genéticos mitóticos</b>	<b>18</b>
3.6.1. Sin preselección	18
3.6.2. Preselección con canavanina	18
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Construcción de cepas <math>\Delta tdp1</math> con diferentes marcadores de selección</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Deleción del gen <i>TDPI</i> en las cepas haploides de los sistemas de detección de reordenamientos mitóticos</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Construcción de las cepas diploides heterocigóticas para la deleción del gen <i>TDPI</i></b>	<b>24</b>
<b>4.4. Estimación de los LC<sub>0</sub> en las cepas diploides</b>	<b>24</b>
<b>4.5. Determinación de las frecuencias de reordenamientos genéticos mitóticos</b>	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>30</b>

## Resumen

Los agentes utilizados en el tratamiento del cáncer que tienen como diana la topoisomerasa II son capaces de producir reordenamientos en el genoma, y éstos pueden conllevar efectos secundarios no deseados. Por ello es importante saber cómo afecta el uso de estas sustancias al material genético y elegir aquellos agentes que conlleven menos efectos adversos.

En el presente trabajo se ha utilizado el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de estimar la frecuencia de reordenamientos genéticos mitóticos producidos tras la exposición durante un ciclo celular a determinados agentes antitumorales. Para ello se han calculado las concentraciones máximas subletales para cada compuesto, a partir de las cuales se han realizado ensayos de reordenamientos genéticos con cepas especialmente diseñadas para manifestar fenotípicamente estos cambios y la naturaleza de los mismos. Además se pretendía construir, mediante transformación con ADN recombinante, cepas heterocigóticas y homocigóticas para la delección del gen *TDPI* (implicado en la separación de complejos covalentes topoisomerasa II:ADN) para posteriormente estimar sus propias frecuencias de reordenamientos.

Se obtuvo que el amonafide, el etopósido y la menadiona son capaces de aumentar al menos diez veces la frecuencia de reordenamientos genéticos, mientras que la amsacrina,  $\beta$ -lapachona y elipticina no mostraron un aumento significativo de los mismos.

**Palabras clave:** agentes antitumorales, reordenamientos genéticos, topoisomerasa II, *TDPI* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## Abstract

Anti-cancer agents which target topoisomerase II are able to produce rearrangements in the genome, which can lead to side effects. Thus, it is important to know how the use of these compounds affect the genetic material and to choose agents with the minimum adverse effects.

In this work we have used the model organism *Saccharomyces cerevisiae* with the aim of estimating the frequency of mitotic genetic rearrangements produced by several anti-cancer agents after being exposed for one cell cycle. With that purpose, we have calculated the maximum sublethal concentrations for each compound, and we used them afterwards in assays of rearrangements with strains specially designed to phenotypically show these changes and its nature. Moreover, we pretended to construct, through transformation with recombinant DNA, new strains homozygotic and heterozygotic for the gene *TDPI* (involved in the separation of covalent complexes topoisomerase II:DNA) and estimate their own frequency of rearrangements.

We found that the treatment with amonafide, etoposide and menadione produce at least a ten-fold increase in the appearance of genetic rearrangements, while amsacrine,  $\beta$ -lapachone and ellipticine didn't show a significant increase in this number.

**Keywords:** anti-cancer agents, genetic rearrangements, topoisomerase II, *TDPI* and *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. El cáncer

Cáncer es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cuya característica principal es la multiplicación rápida y descontrolada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir tejidos adyacentes o propagarse incluso a otros órganos (metástasis) mediante los sistemas circulatorio y linfático. Este constituye una de las principales causa de morbilidad y mortalidad a escala mundial (8,2 millones de defunciones en 2012 según la Organización Mundial de la Salud), por lo que resulta imprescindible un compromiso mundial en investigación para tratar de disminuir esa cifra.

### 1.2. Etiología del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, es decir, que está causada por cambios en los genes que controlan la dinámica del funcionamiento celular, especialmente tres tipos:

- **Proto-oncogenes:** regulan el crecimiento y división celular normal. Al ser alterados pueden convertirse en genes productores de oncoproteínas, que promueven que las células logren dividirse descontroladamente.
- **Genes supresores de tumores:** controlan también el crecimiento, la división celular y el suicidio programado. La mutación de estos genes permite que células dañadas o envejecidas sobrevivan.
- **Genes reparadores del ADN:** corrigen daños producidos en el material genético. Mutaciones en estos genes evitan la posibilidad de reparación de daños en los protooncogenes y los genes supresores de tumores.

Estos cambios o mutaciones pueden ser, tanto heredados de los individuos parentales, como producirse a lo largo de la vida del individuo como resultado de errores en el proceso de división celular o mitosis, o bien por el daño al ADN causado por exposición a agentes mutágenos presentes en el ambiente (**Tabla 1**).

Tabla 1. Agentes mutágenos externos

Agentes mutágenos externos	
<b>Carcinógenos físicos</b>	Radiaciones UV e ionizantes
<b>Carcinógenos químicos</b>	Amianto, componentes del humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico...
<b>Carcinógenos biológicos</b>	Infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos

Del mismo modo, el envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer, probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer (consumo de tabaco y alcohol, dieta malsana, inactividad física), que a su vez se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad. Además, con el avance del cáncer, ocurren cambios adicionales en células diferentes del mismo tumor, que pueden ser resultado del mismo y no su causa.

### 1.3. Quimioterapia basada en la Topoisomerasa II como diana antitumoral

La quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleadas en el tratamiento del cáncer y engloba una gran variedad de fármacos que se denominan antineoplásicos o quimioterápicos. Estos fármacos llegan prácticamente a todos los tejidos del organismo, y ahí es dónde ejercen su acción, tanto sobre las células tumorales como sobre las sanas. En general, actúan en la fase de división celular impidiendo su multiplicación y destruyéndolas, lo que se traduce en la disminución o desaparición del tumor. Su acción se ve favorecida por el hecho de que las células tumorales se multiplican más rápido que las sanas.

Durante la división celular, las enzimas a cargo de modificar la topología del ADN son las topoisomerasas (Champoux, 2001), que actúan creando roturas transitorias en el ADN para producir la relajación o superenrollamiento de la molécula, facilitando su apertura para la maquinaria enzimática de replicación y transcripción, para su compactación y para deshacer nudos y otras uniones topológicas. Esto las convierte en enzimas con especial interés clínico, ya que mediante la alteración de su función son capaces de inducir rupturas en el ADN (pueden actuar como un Caballo de Troya), y conducir las células a entrar en el ciclo de muerte celular programada (apoptosis). Existen dos tipos de topoisomerasas:

- **Tipo I** (topo I): estas cortan una hebra del ADN para reducir el superenrollamiento que se produce durante la replicación y transcripción, y una vez se relaja, vuelve a sellarla.
- **Tipo II** (topo II): estas cortan las dos hebras del ADN, permitiendo que otra molécula de ADN sin cortar pase a través de esta rotura y posteriormente vuelve a sellar las hebras (**Fig. 1**). Este mecanismo de acción no solo sirve para liberar tensión de la molécula, sino también para resolver catenaciones producidas durante la replicación al quedar ligadas las moléculas hijas por entrelazamiento de los ADN dúplex (Sundin y Varshavsky, 1980).

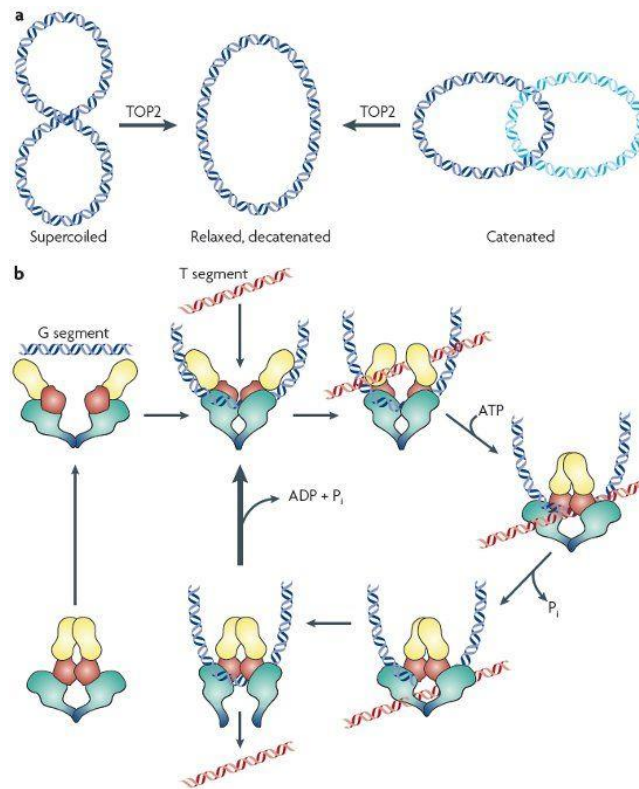


Figura 1. Mecanismo de acción de la topoisomerasa II: a) La topo II se encarga de la separación de catenaciones y la relajación del superenrollamiento. b) Mecanismo de corte y ligamiento de la topo II debido a cambios conformacionales (Fuente: DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nitiss JL. 2009)

Las topoisomerasas de tipo II son capaces de realizar las funciones de relajación de las de tipo I, pero son las únicas con capacidad de quitar las catenaciones, lo que las hace indispensables en todos los organismos vivos. Por esta razón, la topo II ha atraído la atención de la comunidad médica y científica desde hace años, desde que se identificó como la principal diana molecular de muchos agentes antitumorales usados en quimioterapia (Nitiss, 2009a). Las topo II en eucariotas comparten altos niveles de homología, aunque *Saccharomyces cerevisiae* tiene solamente una topoisomerasa de tipo II (Top2), mientras que los mamíferos cuentan con dos: la TopoII $\alpha$  y la TopoII $\beta$ , que comparten aproximadamente un 40% de homología con la Top2.

Los agentes que se utilizan en clínica y tienen como diana antitumoral la topo II se clasifican en dos grandes grupos en función de su mecanismo de acción:

- **Poisons:** dan lugar a daño al ADN mediado por la enzima, debido a la formación de complejos covalentes entre el ADN, la Top2 y/o el agente antitumoral, aumentando la frecuencia de dobles roturas en la molécula de ADN (lo que las convierte en unas “tijeras moleculares” para el ADN), produciendo gran daño celular y desencadenando la apoptosis. Estos tienen una gran eficiencia probada en quimioterapia. No obstante,

se dan fenómenos de resistencia ante ellos por la reducción de la expresión de los genes que codifican la enzima (Nitiss et al, 1992).

- **Inhibidores catalíticos:** su acción citotóxica se basa en privar a las células de la actividad enzimática esencial de esta durante el ciclo celular, sin aumentar los niveles de complejos covalentes, de modo que al no poder producirse la correcta disyunción de los cromosomas, estos pueden sufrir múltiples roturas durante la citocinesis y dan lugar a la muerte de las células hijas.

Resulta de especial importancia mencionar que el tratamiento con *poisons* puede dar lugar como efecto secundario contrastado a la aparición de tumores secundarios por translocaciones cromosómicas en regiones que son puntos caliente de acción Topo II.

#### 1.4. Mecanismos biológicos de reparación del daño al ADN tras el tratamiento con *poisons* de la Topo II

Las células eucariotas han desarrollado una red de mecanismos de control, conocidos como *checkpoints*, que coordinan la progresión del ciclo celular en respuesta a condiciones estresantes de naturaleza externa (como la radiación, ciertos compuestos químicos y algunos virus) o interna (como las especies reactivas de oxígeno) (Longhese et al., 1998). Así mismo, los *checkpoints* coordinan también la ejecución de los mecanismos de reparación de aquellos componentes celulares afectados por los citados tipos de estrés.

La reparación del daño al ADN producido por la topo II requiere el reconocimiento del complejo covalente (posiblemente por la interferencia en los procesos de replicación y transcripción), la eliminación de la enzima y la reparación de las roturas en el ADN. Existen dos vías para la separación de la topo II del complejo: la escisión por nucleasas y la degradación proteolítica de la topo II (**Fig. 2**). No obstante, ambas vías requieren la acción de la proteína tirosil-ADN-fosfodiesterasa para la separación del residuo fosfotirosil del centro activo de la enzima y el ADN, que no puede ser eliminado por proteasas. En eucariotas superiores existen los genes *TDPI* y *TDP2*, que codifican las tirosil-ADN-fosfodiesterasas I y II, que resuelven los complejos covalentes de la topo I y la topo II respectivamente, mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* solo existe el *TDPI*, que resuelve ambos (Yang et al, 1996; Nitiss et al, 2006; Ledesma et al, 2009).



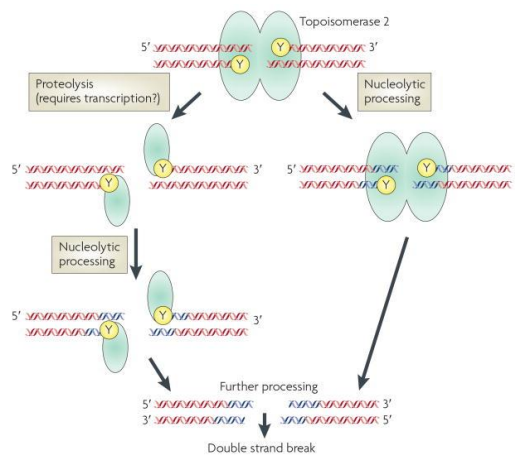


Figura 2. Mecanismos de liberación del ADN de la topo II: mediante proteólisis de la enzima o escisión por nucleasas, que separan el residuo tirosil (Y) del ADN. Esta función en *S. cerevisiae* la realiza la proteína tirosil-ADN-fosfodiesterasa 1, imprescindible en ambas vías (Fuente: Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nitiss JL. 2009)

Una vez el ADN ha sido liberado del complejo, en el caso de roturas dobles en la molécula (*double strand breaks*, DSBs) de ADN se pueden llevar a cabo de manera general dos procesos para su reparación (**Fig. 3**), en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentre:

- **Unión de extremos no homólogos** (*non-homologous end-joining*, NHEJ): ocurre principalmente durante G1. En esta fase, las células haploides no tienen hebra molde para reparar las hebras dañadas, por lo que el mecanismo consiste en la unión de los dos extremos de la rotura. Asimismo, si los extremos de la rotura son romos, esta unión puede ser imprecisa, aunque afortunadamente la mayor parte de las roturas da lugar a extremos protuberantes, en las que el sellado se realiza a partir de microhomologías.
- **Recombinación homóloga** (*homologous recombination*, HR): este mecanismo se utiliza principalmente en las fases S, G2 y M, ya que durante estas, el genoma se encuentra replicado (o bajo replicación), de manera que la cromátida hermana se puede usar como molde y se trata de la ruta preferente en levaduras. Los mecanismos incluidos en esta vía tienen en común la degradación 5'→3' de los extremos rotos para crear fragmentos finales de cadena simple y la invasión dependiente de Rad51 de la hebra molde para encontrar homologías (menos SSA).
  - Anillamiento de una sola hebra (*single-strand annealing*, SSA): en secuencias con repeticiones en tándem, es posible que la hebra rota encuentre homologías en la hebra contraria, de manera que se sellan sin necesidad de invasión ni síntesis.
  - Entrecruzamiento de hebras: se produce en las situaciones en las que la reparación termina con la formación de dobles intermediarios de Holliday, y

estos se resuelven endonucleolíticamente de forma asimétrica. Si el ADN molde proviene del cromosoma homólogo, en lugar de la cromátida hermana, da lugar a intercambios recíprocos de información entre homólogos (*crossovers*, CO).

- Conversión génica (*gene conversion*, GC): se produce si el ADN molde proviene del cromosoma homólogo y los dobles intermediarios de Holliday o bien se resuelven de forma simétrica o bien se disuelven por la helicasa de Bloom (*non-crossover*, NCO). También es el resultado de la vía de reparación conocida como anillamiento de la hebra dependiente de síntesis (SDSA, de sus siglas en inglés).
- Replicación inducida por rotura (*break induced replication*, BIR): se crea una horquilla de replicación tras la invasión de la hebra afectada y se replica el cromosoma completo, o una importante porción del mismo, usando como molde la hebra invadida. Si se utiliza como molde el cromosoma homólogo en lugar de la cromátida hermana, se produce una pérdida de heterocigosidad en esa región.

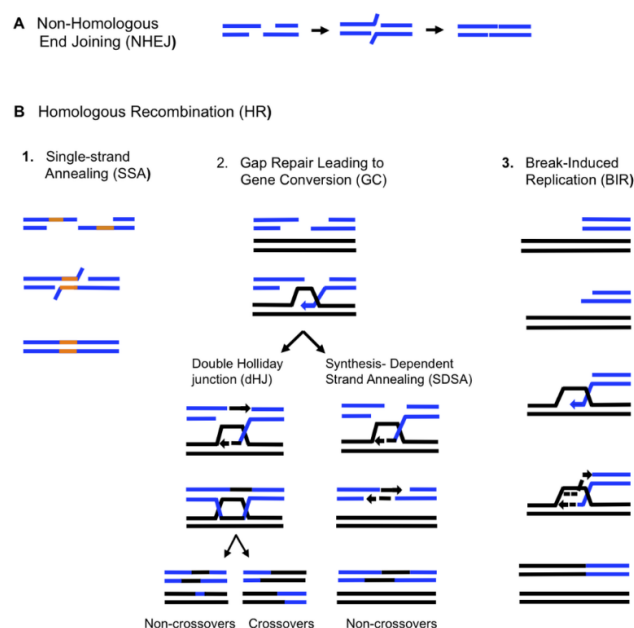


Figura 3. Mecanismos de reparación de DSBs en el ADN: unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga (Fuente: Break-Induced Replication and Genome Stability. Sakofsky et al. 2012)

### 1.5. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio biológico de los efectos de agentes antitumorales

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), más conocida por ser la levadura de la cerveza, el vino y el pan, es un hongo unicelular (4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro) no patógeno que se ha convertido,

por múltiples razones, en un potente modelo biológico de organismos eucariotas en el mundo de la investigación y la biotecnología.

En primer lugar, se trata del primer eucariota cuyo genoma fue secuenciado por completo (1996) y actualmente sigue siendo el mejor conocido. Además, su ciclo de vida puede desarrollarse en forma haploide o diploide indistintamente, se multiplica rápidamente por gemación (90-120 minutos) y tiene la capacidad de formar ascosporas que contienen los cuatro productos de la meiosis durante la reproducción sexual (**Fig. 4**); tiene una elevada tasa de recombinación (facilita la modificación del genoma con ADN recombinante) y dispone de gran cantidad de marcadores de auxotrofia y de resistencia a antibióticos, por lo que su manipulación genética y selección resulta sencilla.

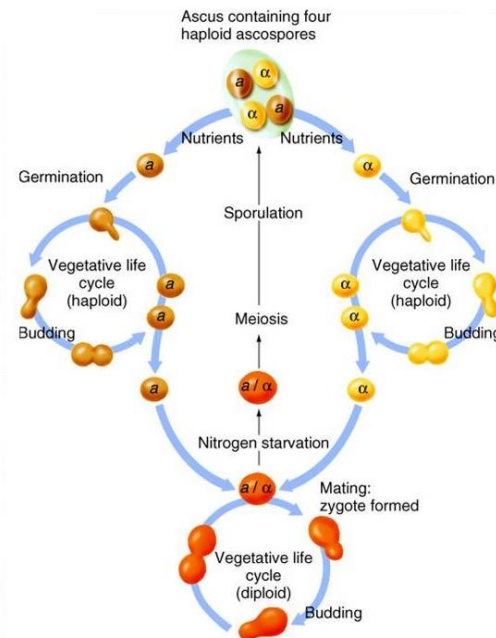


Figura 4. Ciclo de vida de *S. cerevisiae* (Fuente: The McGraw-Hill Companies, Inc.)

Por último, resulta de gran importancia que, a pesar de la divergencia evolutiva, más de una tercera parte de los genes de la levadura se encuentran también en humanos (homólogos) y en muchos casos realizan funciones similares (ortólogos). Una gran proporción de estos corresponden a genes relacionados con enfermedades hereditarias, metabólicas o con el cáncer. Asimismo, la similitud entre los sistemas celulares fundamentales de la levadura y animales superiores, como la división celular, la organización en cromosomas, la respuesta al estrés, el metabolismo primario y los sistemas de reparación del daño al ADN (incluyendo la HR, la NHEJ y escisión por nucleasas TDP) las han consolidado como modelo eucariota a nivel celular y molecular.

## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo principal del presente trabajo consiste en la estimación de la frecuencia de reordenamientos genéticos mitóticos en células diploides de *S. cerevisiae* tras la exposición a los siguientes antitumorales durante aproximadamente la duración de un ciclo celular: amonafide,  $\beta$ -lapachona, etopósido, amsacrina, menadiona y elipticina. Además, se pretende comparar las frecuencias estimadas para cepas *TDPI/TDPI*, *TDPI/ $\Delta$ tdp1* y  *$\Delta$ tdp1/ $\Delta$ tdp1*.

Como objetivo a largo plazo se plantea la identificación de la naturaleza de estos reordenamientos: entrecruzamiento recíproco, aneuploidías, GC o BIR. Esto es posible debido al diseño de las cepas utilizadas, que mostrarán una determinada manifestación fenotípica en cada caso, apreciable en colonias aisladas en placas de Petri (cambios de color, aparición de sectores de distinto color en la misma colonia, resistencia/sensibilidad a antibióticos, etcétera); así como por el hecho de que genotípicamente las cepas portan 55.000 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) cuya distribución en la progenie puede ser asimismo estudiada.

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Construir diferentes variantes de la cepa procedente de la colección de Euroscarf (*European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis*) mutante simple para el gen *TDPI*, que se encuentra deletado y sustituido por el *cassette* de resistencia *kanMX4*, con diferentes marcadores de resistencia a antibióticos que permitan la selección de las cepas transformadas.
2. Determinar las concentraciones máximas subletales ( $LC_0$ , medido como la concentración máxima que no implica pérdida de la viabilidad) para los compuestos antitumorales citados en estas cepas diploides híbridas diseñadas para la medición precisa y rápida de reordenamientos genéticos en base a marcadores fenotípicos y genotípicos.
3. Construir nuevas cepas diploides híbridas que resulten mutantes heterocigóticos y homocigóticos para la delección del gen *TDPI*, a través de la transformación, selección artificial y cruce de haploides de distinto sexo.
4. Identificar y cuantificar cambios fenotípicos que evidencian reordenamientos genéticos en las cepas *TDPI/TDPI*, *TDPI/ $\Delta$ tdp1* y  *$\Delta$ tdp1/ $\Delta$ tdp1* tras la exposición a las citadas sustancias quimioterapéuticas a su respectiva concentración  $LC_0$ .

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento estándar

Las cepas empleadas en este trabajo proceden de la colección MATa Euroscarf de mutantes simples para la delección de genes no esenciales y del Dr. Thomas Petes (Duke University Medical Center) (**Tabla 2**). Estas fueron tomadas de la colección del grupo de Investigación del Dr. Félix Machín (FM), conservada a -80°C, y sembradas e incubadas en placas de Petri con medio de cultivo YPDA (*Yeast extract, Peptone, Dextrose, Agar*) (**Tabla 3**) a su temperatura óptima: 30°C. Posteriormente se mantuvieron en una cámara fría a 4°C para su posterior uso en los ensayos, utilizando FM 23 (BY4741) como cepa salvaje de referencia (WT).

Tabla 2. Identificación y genotipo de las cepas utilizadas durante el TFG

Cepa	Genotipo relevante	Procedencia
<b>FM 23 (BY4741)</b>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Euroscarf
<b>FM 643</b>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δtdp1::kanMX4	Euroscarf
<b>FM 1060 (PSL2)</b>	MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 ura3-1 trp1-1 V9229:HYG V261553:LEU2	T. Petes
<b>FM 1061 (PSL5)</b>	MATα ade2-1 ura3-1 Δcan1::SUP4-o	T. Petes
<b>FM 1062 (JSC12)</b>	MATa leu2-1,112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 trp1-1 Δcan1:NAT IV1510386:KANMX:can1-100	T. Petes
<b>FM 1063 (JSC21)</b>	MATα ade2-1 ura3-1 Δcan1::NAT IV1510386:SUP4-o	T. Petes
<b>FM 2010-2012 (PSL2/PSL5)</b>	Mata/α ade2-1/ade2-1 can1-100/Δcan1::SUP4-o his3-11,15/HIS3 ura3-1/ura3-1 trp1-1/TRP1 V9229:HYG/V V261553:LEU2/V	T. Petes
<b>FM 2013-2015 (JSC12/JSC21)</b>	Mata/α leu2-1,112/LEU2 his3-11,15/HIS3 ura3-1/ura3-1 ade2-1/ade2-1 trp1-1/TRP1 Δcan1:NAT/Δcan1::NAT IV1510386:KANMX:can1-100/ IV1510386:SUP4-o	T. Petes

Debido a que la frecuencia espontánea de recombinación mitótica es muy baja, se han diseñado cepas con determinados marcadores para su detección. Contamos con cuatro cepas haploides que pertenecen a dos sistemas diferentes según el cromosoma y las posiciones en el que están los principales marcadores de selección: PSL (cromosoma V) (**Fig. 5**) y JSC (cromosoma IV) (**Fig. 6**). Estas cepas provienen de dos fondos genéticos complejos (W303 e YJM789), con múltiples SNPs entre ellos, ya que se diseñaron con la intención de ser analizadas por microarrays. Estas cepas portan la mutación ocre *ade2-1* en el cromosoma XV, que otorga a las colonias un color rojo intenso por la acumulación de un pigmento producido en la ruta de biosíntesis de la adenina debido a esta mutación. Las mutaciones ocre son mutaciones sin-sentido que cambian un codón que codifica un aminoácido en un codón de parada (UAA),

causando la terminación prematura de la cadena polipeptídica durante la traducción. De este modo, las cepas que portan el gen del supresor ocre *SUP4-o* (un gen que codifica para un falso tRNA para UAA), son de color blanco ya que no se interrumpe la biosíntesis y no se acumula el pigmento producido. Asimismo, los diploides que resultan de la unión de éstas forman colonias rosas por la expresión de la mitad de la dosis génica de *ADE2*. Las cepas que portan el alelo con la mutación ocre *can1-100* en lugar del WT *CAN1* resultan resistentes al aminoácido tóxico canavanina ( $\text{Can}^R$ ), al igual que las que poseen *CAN1* deletado y sustituido por *SUP4-o* (ya que no son capaces de codificar la permeasa que las hace sensibles). No obstante, este supresor ocre anula también el efecto de *can1-100* en la cepa diploide, haciéndolo sensible a la canavanina ( $\text{Can}^S$ ). Además portan varios marcadores para la selección por resistencia a los siguientes antibióticos: geneticina ( $\text{Kan}^R$ ), higromicina ( $\text{Hyg}^R$ ) y nourseotricina ( $\text{Nat}^R$ ).

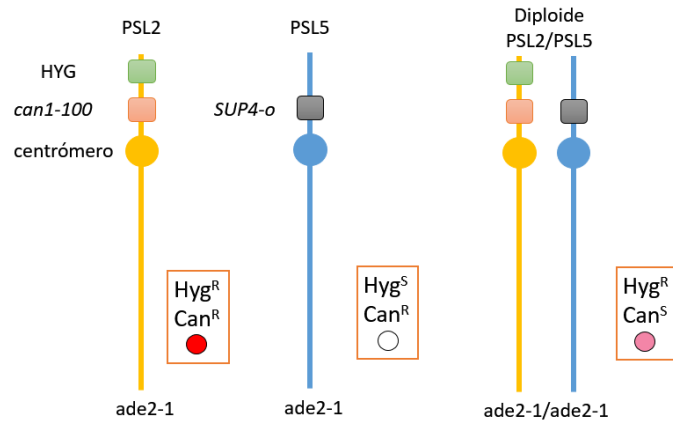


Figura 5. Representación del cromosoma V de los haploides PSL2 y PSL5 y del diploide en que resultan tras el emparejamiento, así como de las características relevantes que presentan

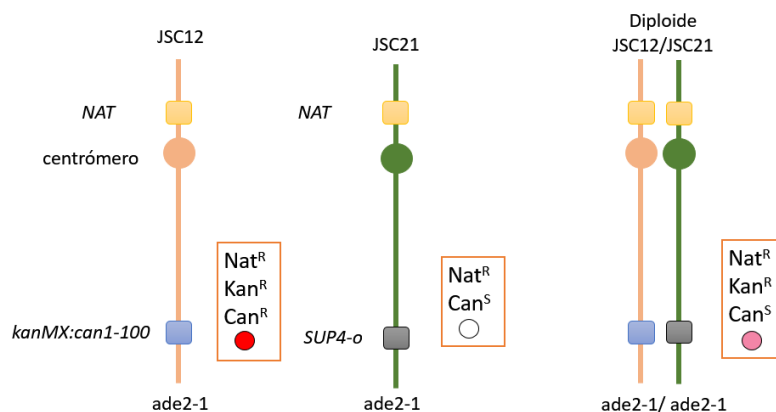


Figura 6. Representación del cromosoma IV de los haploides JSC12 y JSC21 y del diploide en que resultan tras el emparejamiento, así como de las características relevantes que presentan

De este modo, las cepas haploides FM 1060 -1063 constituyen dos sistemas diferentes para la creación de diploides sobre los que se realizaron ensayos de detección de reordenamientos. En nuestro caso, sobre estas cepas se intentó la delección y sustitución del gen *TDPI*, lo que

permitiría observar los efectos de la mitad de su dosis génica (haploinsuficiencia) y en su ausencia total.

Partimos de la cepa FM 643 para la creación de producto de transformación para los haploides de los sistemas PSL y JSC, ya que posee el gen de interés (*TDPI*) deletado y sustituido por el *cassette kanMX4* (Fig. 7). Este último está compuesto por el promotor y el terminador del gen *TEF* ( $P_{TEF}$  y  $T_{TEF}$ ) para permitir su expresión constitutiva y además contiene la secuencia del gen *KanR*, que confiere resistencia al antibiótico G418.

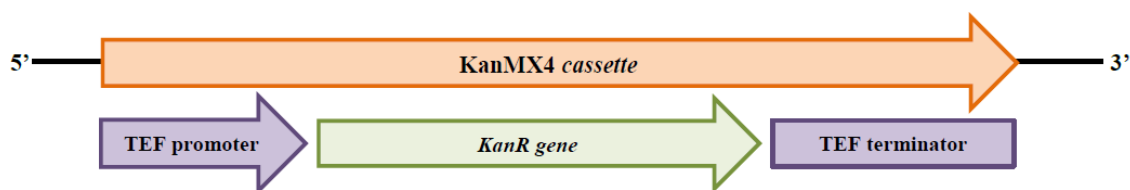


Figura 7. Representación esquemática del *cassette kanMX4* (cortesía de Jessel Ayra Plasencia)

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados durante el TFG

Medios de cultivo	
<b>Medio rico: YPDA</b>	Extracto de levadura 1 % (peso/volumen)
	Peptona 2 % (peso/volumen)
	Dextrosa 2 % (peso/volumen)
	Agar 2 % (peso/volumen)
<b>Medio mínimo</b>	<i>Yeast Nitrogen Base</i> 0,68 % (peso/volumen)
	Dextrosa 2 % (peso/volumen)
	Agar 2 % (peso/volumen)
	*Aminoácidos según los requerimientos del ensayo en forma de <i>drop-in</i> o <i>drop-out</i>
<b>*Para hacer medios de cultivos líquidos se utilizan estas mismas proporciones pero sin adicionar agar 2x.</b>	

### 3.2. Agentes antitumorales y otros compuestos

Los compuestos quimioterápicos utilizados pertenecen a la categoría de *poisons*. Algunos difieren de los que originalmente figuran en la Propuesta de Trabajo de Fin de Grado debido al stock disponible y su posible interés en cuanto a los resultados en este trabajo. Finalmente han sido:

**Amonafide** (Amo): es un agente intercalante del ADN que pertenece a la familia de las naftalimidias y fue desarrollado a partir de sustancias de origen vegetal. Se encuentra en fase de desarrollo clínico y su gran ventaja reside en que es refractario a las bombas de extrusión, que

constituye una de las principales causas de resistencia antitumoral. Sin embargo, resulta altamente tóxico por su conversión hepática en N-acetilamonafide.

**Amsacrina** (Amsa): se trata de un agente intercalante del ADN derivado de la aminoacridina aprobado para el tratamiento en quimioterapia, que ha resultado especialmente efectivo en linfomas y leucemias, más que en tumores sólidos.

**Elíptica** (Eli): se trata de un compuesto policíclico intercalante del ADN con gran actividad antitumoral por medio de arresto celular e inducción de la apoptosis, capaz de unirse covalentemente al ADN por medio de activación enzimática por el citocromo P450 y/o peroxidasas (Stiborova et al, 2006).

**Etopósido** (Etop): es una podofilina semisintética derivada de la planta *Podophyllum peltatum*, que se encuentra incluida en la lista de medicamentos esenciales de la OMS y se utiliza ampliamente contra diferentes tipos de cáncer desde su aprobación en 1983.

**$\beta$ -lapachona** ( $\beta$ -lap): su principal mecanismo de acción se cree que está mediado por la enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1, produciendo especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y cambiando el balance redox de las células, ya que ambos eventos promueven la muerte celular por apoptosis. Esta enzima se halla sobrepresada en las células tumorales, lo que aumenta su sensibilidad frente a este compuesto. Esta sustancia se aísla del árbol lapacho (*Tabebuia avellaneda*) y pertenece a la familia de las naftoquinonas. A pesar de que ha sido probada in vitro su actividad anti-topo II (Frydman et al, 1997; Gurbani et al, 2012) y también que tiene como objetivo la topo I (Li et al, 1993), los experimentos in vivo sugieren que el mecanismo de envenenamiento de la topo II no es el factor determinante (Ramos et al, 2014).

**Menadiona** (Men): se trata de una naftoquinona sintética, también denominada vitamina K3. Al igual que la  $\beta$ -lapachona, se cree que su mecanismo de acción se basa no solamente en la interferencia con la topo II, sino que ocurre por medio de la formación de ROS.

Para cada uno de estos agentes se prepararon stocks 100 mM en **dimetilsulfóxido** (DMSO), ya que de manera general son pobremente solubles en agua, y se conservaron a -20 °C en tubos Eppendorf recubiertos con papel de aluminio, debido a que son compuestos fotosensibles.

Asimismo, se utilizó **L-canavanina** para la preselección de cepas resistentes en el ensayo de estimación de reordenamientos, tratándose de un aminoácido no proteínico de procedencia



vegetal y relacionado estructuralmente (análogo) con el aminoácido L-arginina, pero que resulta tóxico para *S. cerevisiae* (Fig. 8).

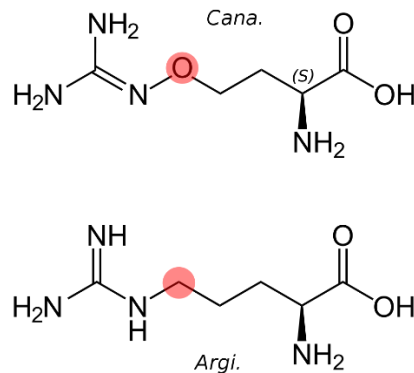


Figura 8. Estructura molecular del aminoácido arginina y su análogo tóxico, la canavanina

### 3.3. Modificación genética de las cepas de interés

Como se dijo en la introducción, *S. cerevisiae* ofrece una alta facilidad para la manipulación de su genoma debido a la alta tasa de recombinación homóloga que posee, necesitando solamente unos 20 nucleótidos de homología para llevar a cabo el proceso. Las transformaciones de las cepas se hicieron usando una versión modificada del protocolo de acetato de litio (Knop et al, 1999; Janke et al, 2004).

#### 3.3.1. **Obtención de células competentes**

Para preparar a las células para el protocolo de transformación se crecen en un matraz autoclavado con 40 mL de YPD durante la noche en un incubador orbital a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.3 – 1 a 660 nm (OD<sub>660</sub>). Se pasa el cultivo a un tubo Falcon de 50 mL, se centrifuga 1 minuto (min) a 2.500 g y se resuspende el pellet celular con 1 mL de SORB (acetato de litio 100 mM; Tris-HCl 10 mM a pH 8.0; EDTA 1 mM y sorbitol 1 M). Posteriormente se transfiere la solución a un tubo Eppendorf, se centrifuga 10 segundos a 13.000 rpm y se resuspende el pellet en 350 µL de SORB tras desechar el sobrenadante. Finalmente se le añaden 50 µL de ADN *carrier* (ADN de esperma de salmón desnaturalizado) y se almacena a -80 °C. Con este procesado se consiguen alteraciones en la membrana de la célula que aumentan la permeabilidad, permitiendo la incorporación del producto de transformación.

#### 3.3.2. **Transformación**

Para la transformación, se añaden 3 µL del producto de PCR que se desea insertar a 27 µL de células competentes en un tubo Eppendorf. Se añaden 180 µL de polietilenglicol (PEG:

acetato de litio 100 mM; Tris-HCl 10 mM a pH 8.0 y PEG3350 40 %) y se deja incubando 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añaden 33,3  $\mu$ L de DMSO y se somete a choque térmico en un baño termostatzado a 42°C durante 15 min. Finalmente se centrifuga 3 min a 2.000 rpm, se descarta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 150  $\mu$ L de medio mínimo y se siembra en césped en la placa selectiva correspondiente con la ayuda 4 de bolas de vidrio.

En los casos en los que la transformación implica la introducción de un marcador de resistencia a antibiótico, el pellet final se resuspende en YPD y se incuba 3 horas a 30°C en un incubador orbital para permitir la recuperación de las células y la expresión de los genes de resistencia. Finalmente, se siembran los 150  $\mu$ L en la placa correspondiente. Las concentraciones finales usadas para los antibióticos corresponden a 300  $\mu$ g/mL para G-418 e higromicina B y 7,5  $\mu$ g/mL para bleomicina.

### 3.4. Cribado genético de las cepas de interés

#### 3.4.1. **Extracción de ADN**

Se realizó a partir de colonias en YPDA en placas de Petri mantenidas a 4°C. Para ello se resuspende una colonia con un asa de siembra en 200  $\mu$ L de *Breaking Buffer* [Triton X-100, 2 %, v/v; SDS, 1 %, p/v; NaCl (100 mM); Tris-Cl (10 mM) a pH 8.0 y EDTA (1 mM) a pH 8.0] en un Eppendorf y se homogeneiza con un vórtex durante unos segundos. Posteriormente se añaden 200  $\mu$ L de *phenol:chloroform:isoamyl alcohol* (25:24:1) y 200 mg de bolas de vidrio, seguido de la agitación con vórtex durante 2 min y medio para producir la rotura de las membranas celulares por acción mecánica de las bolas. A continuación se añaden 200  $\mu$ L de *TE buffer* (Tris-Cl (10 mM) a pH 8.0 y EDTA (1 mM) a pH 8.0) y se centrifuga a 13.500 rpm durante 5 min. Seguidamente se transfieren unos 300  $\mu$ L de la fase acuosa a otro Eppendorf, se le añade 1 mL etanol al 95% frío y se deja reposar durante 10 min. Finalmente se centrifuga a 13.500 rpm durante 3 min, se descarta el sobrenadante (eliminando por completo mediante pipeteo) y se resuspende en 50  $\mu$ L de *TE buffer*. Posteriormente se conserva a -20 °C.

#### 3.4.2. **PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Las mezclas maestras de PCR tenían un volumen final determinado por su objetivo, de 20  $\mu$ L si se utilizaba solamente para la comprobación del genotipo de las cepas y de 50  $\mu$ L si se utilizaba el resultado como producto de transformación (**Tablas 4 y 5, Fig. 9**).

Tabla 4. Componentes y volúmenes utilizados para las mezclas maestras de PCR

Mezcla de PCR estándar para la GoTaq		
Componentes	Volumen en $\mu\text{L}$	
H <sub>2</sub> O milliQ	11,3	29,75
Buffer/Green Buffer 5x (sin Mg, de Promega)	4	10
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,6	4
dNTPs 10 mM	0,4	1
Primer Forward (F) $\mu\text{M}$	0,8	2
Primer Reverse (R) $\mu\text{M}$	0,8	2
Enzima GoTaq AND polimerasa (Promega)	0,1	0,25
AND molde	1	
	V <sub>F</sub> = 20 mL	V <sub>F</sub> = 50 mL

Tabla 5. Primers utilizados durante el TFG

Nombre	Objetivo	Secuencia
<b>P<sub>TEF-F</sub></b>	Para la amplificación del gen hphMX4 a partir del plásmido pAG32	CTGTAGAGAAATATAAAAAGGTTAG
<b>T<sub>TEF-R</sub></b>	Para la amplificación del gen hphMX4 a partir del plásmido pAG32	CTAACATTTGATTAAAATAGAACA
<b>TDP1-F1 (-335)</b>	<i>Forward</i> externo para comprobar la deleción del gen TDP1	AGCCCATTTGATTTACTTGAGCA
<b>TDP1-F(-133)</b>	Amplificación de la región del gen TDP1	TCTGATGTATTTTCGGCGGC
<b>TDP1-R(+1806)</b>	Amplificación de la región del gen TDP1	CGAATAAAGGACTCGGAAGCT
<b>Kan&amp;His primer</b>	Para la comprobación de la deleción de genes con marcadores MX	TGGGCCTCCATGTCGCTGG

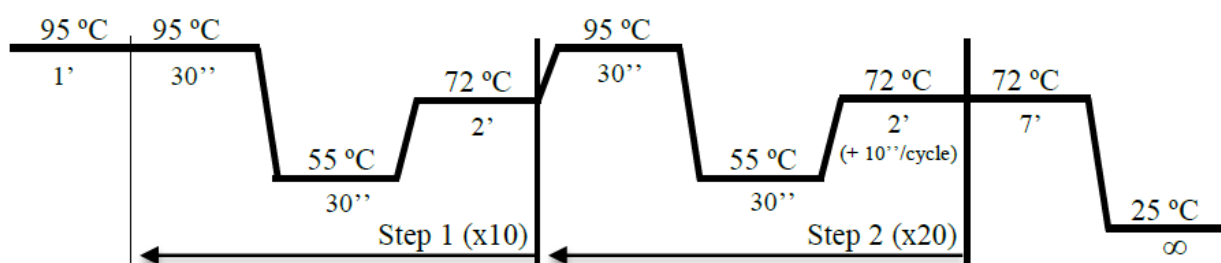


Figura 9. Programa usado en el termociclador para realizar la PCR con la enzima GoTaq polimerasa (Cortesía de Jessel Ayra Plasencia)

### 3.4.3. Electroforesis

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v de 50 y 100 mL para la comprobación de las PCRs utilizando como tampón de electroforesis TBE 1x (Tris 89 mM a pH 8, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM). Para cargar los pocillos se utilizaron 3  $\mu$ L de la muestra y 2 de tampón de carga 2x, en caso de que no se utilizara *Green buffer* (Promega) en la PCR; en caso que se usara este buffer, se cargaron 5  $\mu$ L del resultado de la misma. El marcador de peso molecular utilizado fue el XIV 100 pb de Roche, del que se cargaban 2  $\mu$ L + 2  $\mu$ L de tampón de carga.

Los geles fueron teñidos con BrEt a 0.5  $\mu$ g/mL en agua durante 15 minutos y revelados con luz ultravioleta en el sistema Gel Doc de Bio-Rad después de un lavado de 10 minutos con agua corriente.

### 3.4.4. Digestión con enzimas de restricción

La digestión fue necesaria para el análisis de fragmentos de ADN de tamaño muy similar cuya diferenciación resultaba difícil en la electroforesis sin tratamiento previo. La única enzima de restricción utilizada durante este proyecto fue EcoRV de Promega. La digestión se realizaba sobre 15  $\mu$ L de una reacción de PCR, al que se adicionaban 2  $\mu$ L de Buffer D, 1  $\mu$ L de BSA 10x y 1  $\mu$ L de EcoRV. Los tubos se incubaban durante 2 horas a 37 °C y posteriormente se sometían de nuevo a electroforesis en gel de agarosa.

Asimismo, se estudiaron las posibles enzimas de restricción a utilizar en cada caso con el programa informático SerialCloner mediante simulación de las reacciones de PCR y digestión enzimática de las mismas. EcoRV corta la secuencia del *TDPI* en 2 fragmentos de 1487 y 655 pares de bases, mientras que no corta *kanMX4*, *URA3MX* ni *hphMX4*.

### 3.5. Determinación de las concentraciones máximas subletales (LC<sub>0</sub>)

Para hallar las concentraciones máximas de los agentes antitumorales que no conllevaban pérdida de viabilidad (LC<sub>0</sub>) en los cultivos se realizó un protocolo de dosis-respuesta sobre las cepas diploides de los sistemas PSL (FM 2011) y JSC (2013).

Los ensayos se hicieron a partir de siete diluciones seriadas 1:2 en DMSO partiendo de stocks 100 mM para todos los agentes antitumorales. Estas diluciones maestras fueron preparadas con anterioridad y mantenidas hasta el momento de su utilización a -20°C protegidas de la luz con papel de plata.

En primer lugar se inoculan las cepas diploides en 5 mL de YPD y se dejan toda la noche en el incubador orbital a 30°C y 180 rpm, con los tubos inclinados para aumentar la eficacia de la agitación. Al día siguiente se cuantifica el crecimiento mediante la densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>), que debe estar en el rango entre 0,1 – 1,4 (fase logarítmica). Se toma el volumen necesario del cultivo para preparar 1 mL de YPD fresco a una OD<sub>600</sub>=0,1 (aproximadamente 3x10<sup>6</sup> células/mL), que constituye un stock 10x de células en relación al ensayo final. Posteriormente se preparan 8 tubos Eppendorf cada uno con 90 µL de YPD y 1 µL de las siete diluciones seriadas del quimioterápico, menos al octavo tubo que constituye el control con 1 µL de DMSO en su lugar. Seguidamente se le añaden 10 µL del stock 10x de células a cada tubo y se incuban 3 h a 30°C en el incubador orbital a 180 rpm. Tras las 3 h se retira el agente químico mediante lavados con YPD: primero añadimos 900 µL de YPD, se centrifuga a 10.000 rpm 3 min y se decanta el sobrenadante; añadimos 1 mL de YPD y repetimos el mismo procedimiento, realizamos una centrifugación corta para hacer bajar los restos de líquido de las paredes del tubo y los descartamos por pipeteo, para finalmente resuspender en 300 µL de YPD. Después se prepara una placa de 96 pocillos con una pipeta multicanal con la siguiente configuración (**Fig. 10**):

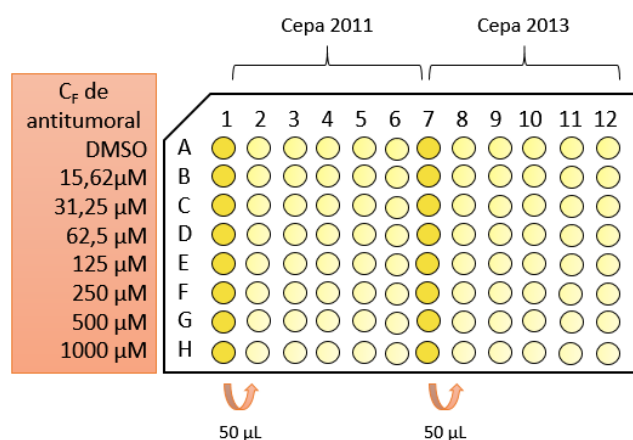


Figura 10. Distribución de la placa de 96 pocillos. Se transfieren 150 µL de los tubos Eppendorf tras la incubación a sus respectivas columnas (1 y 7), el resto de pocillos se rellenan con 100 µL de YPD y luego se realizan diluciones seriadas 1:3 de la fila 1 a la 6 y de la 7 a la 12.

Posteriormente, se siembran placas de Petri de tamaño convencional (90 mm) de YPDA usando un *pin stamp*, realizando tres réplicas técnicas por cepa, que se incuban 2 – 5 días a 30°C. Una vez llegado el punto de crecimiento óptimo, se toman fotos con el sistema Gel Doc de Bio-Rad y se estiman los LC<sub>0</sub> como aquella concentración máxima de químico donde no se aprecia visualmente caída de la viabilidad clonogénica en relación al control con DMSO.

### 3.6. Detección de reordenamientos genéticos mitóticos

Ambos protocolos derivan del protocolo de determinación de los LC<sub>0</sub>, por lo que solo se explicarán las diferencias.

#### 3.6.1. **Sin preselección**

A partir de la preparación del stock 10x de células, se preparan solamente 2 tubos Eppendorf por cepa, ambos con 90 µL de YPD a los que se le añaden 10 µL del stock de células, pero uno lleva además 1 µL de la dilución correspondiente al LC<sub>0</sub> calculado en el protocolo anterior y el otro constituye un control con 1 µL de DMSO. Se sigue el mismo paso de incubación de 3 h seguido de los lavados en YPD, pero finalmente el pellet se resuspende en 1 mL de YPD. Posteriormente se hace una dilución 1:10 de células en un volumen final de 1 mL de YPD (aproximadamente 3.000 células) y se siembran en césped (con 8 bolas de vidrio) tres réplicas técnicas de 333 µL del tubo con el químico y una placa con el mismo volumen del control con DMSO en placas de Petri “grandes” de 140 mm con YPDA. Estas se incuban a 30°C durante 3 – 5 días (hasta que las colonias sean suficientemente grandes, pero sin dejar que se solapen) y se mantienen otros 3 – 5 días a 4°C para que se desarrolle bien el color. En ese momento se sacan fotos de las placas y se cuantifican las colonias según su tipo (rosas, blancas, rojas y con sectores).

#### 3.6.2. **Preselección con canavanina**

Para este protocolo solamente se utiliza la cepa FM 2011, ya que el sistema de selección por canavanina solo funciona en las cepas que derivan de los haploides PSL. Al igual que en el protocolo sin preselección, solamente se preparan dos tubos Eppendorf tras la preparación del stock 10x de células, uno con el agente antitumoral y el otro como control con DMSO, que se someten al mismo paso de incubación de 3 h. No obstante, a la hora de realizar los posteriores lavados, solo el primero se hace en YPD, mientras que el segundo se hace en medio mínimo sin arginina y se resuspende en 100 µL de este. Luego se apartan en un tubo de PCR alícuotas de 10 µL de cada tubo, que posteriormente se contabilizaran con un hemocitómetro, mientras que los 90 µL (unas 27.500 células) restantes se siembran en césped en placas de tamaño convencional con medio mínimo sin arginina y con canavanina 0,12 mg/mL. Estas se incuban a 30°C durante 3 – 5 días y se mantienen otros 3 – 5 días a 4°C para que se desarrolle bien el color. En ese momento se sacan fotos de las placas y se cuantifican las colonias según su tipo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Construcción de cepas $\Delta tdp1$ con diferentes marcadores de selección

Para efectuar la delección del gen *TDPI* en los haploides de los sistemas PSL y JSC fue necesario crear producto de transformación a partir de reacciones de PCR que amplificaran la secuencia que se desea insertar. Esto se hizo a partir de transformaciones de la cepa FM 643, que ya lo posee delecionado, de manera que solo había que realizar cambios de marcador manteniendo el promotor y terminador del gen *TEF* y las regiones de homología que flanquean el *cassette*.

Al comenzar el proyecto, el plan de trabajo incluía el cambio de marcador de *kanMX4* por el de resistencia a la bleomicina (*bleMX4*), pero al hacer crecer las transformaciones en las placas selectivas crecía un césped que nos indicaba que la selección no estaba funcionando.

Así, optamos por cambiar de estrategia y usar *URA3MX* para el cambio de marcador, ya que nos serviría para seleccionar todas las cepas haploides transformadas ya que ninguna es capaz de crecer en ausencia de uracilo porque portan la mutación *ura3-1*. Ambos productos de transformación utilizados fueron tomados de la colección del grupo de investigación, que ya habían sido preparados previamente. De este cambio de marcador se obtuvieron cuatro colonias positivas y dos falsos positivos tras comprobar por doble selección en: 1) placas sin uracilo y 2) placas con antibiótico G418; manifestándose que efectivamente habían incorporado *URA3MX* mientras que *kanMX4* ya no estaba presente, dando lugar a las nuevas cepas FM 2099 (Colonia 1), FM 2100 (Colonia 2), FM 2101(Colonia 3) y FM 2102 (Colonia 4), que constituyen clones independientes (**Fig. 11**).

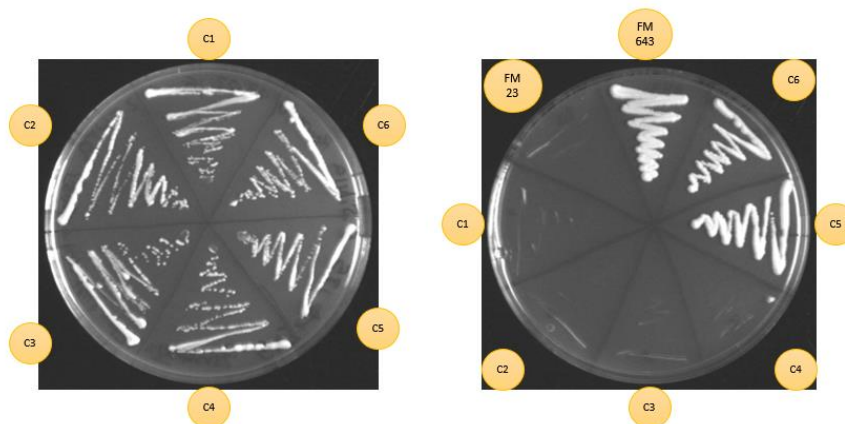


Figura 11. Comprobación de la transformación por selección en medio sin uracilo (izquierda) y G418 (derecha), utilizando como referencia las cepas FM 23 como control positivo y FM 643 como control negativo. Los círculos citados como C seguidos de un número hacen referencia a la colonia sembrada que proviene de la placa de la transformación

Además, para la obtención de producto de transformación  $\Delta tdp1::kanMX4$ , se utilizaron alícuotas que provenían de la reacción de PCR realizada para la comprobación del genotipo  $\Delta tdp1::kanMX4$  de la cepa FM 643 con los primers F y R para el gen *TDP1*. Además, paralelamente se hizo una PCR de comprobación con los primers F del *TDP1* y el *Kan&His*, ya que este último es complementario a una secuencia en el promotor del *cassette kanMX4*, de modo que solo amplificarán las cepas que porten dicha secuencia adyacente al promotor del *TDP1*, dando como resultado un fragmento de tamaño aproximado de 250 pb (Figs. 12 y 13).

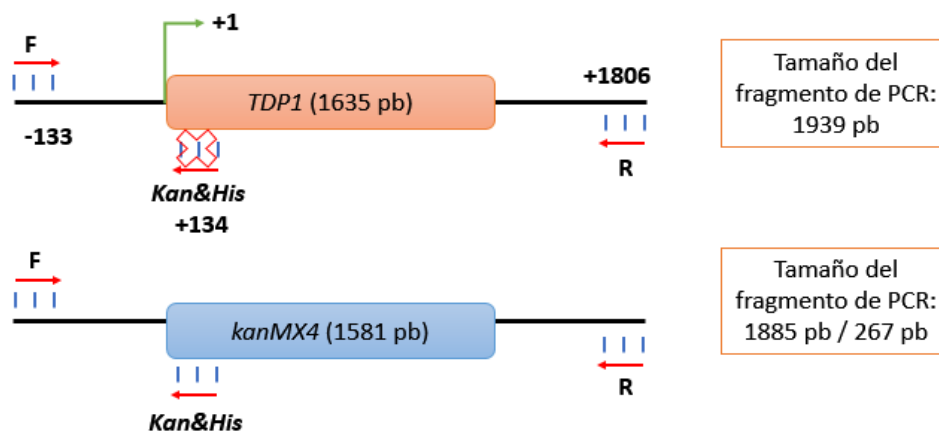


Figura 12. Esquema de las reacciones de PCR realizadas sobre FM 23 y FM 643 para la comprobación del genotipo y obtención de producto de transformación

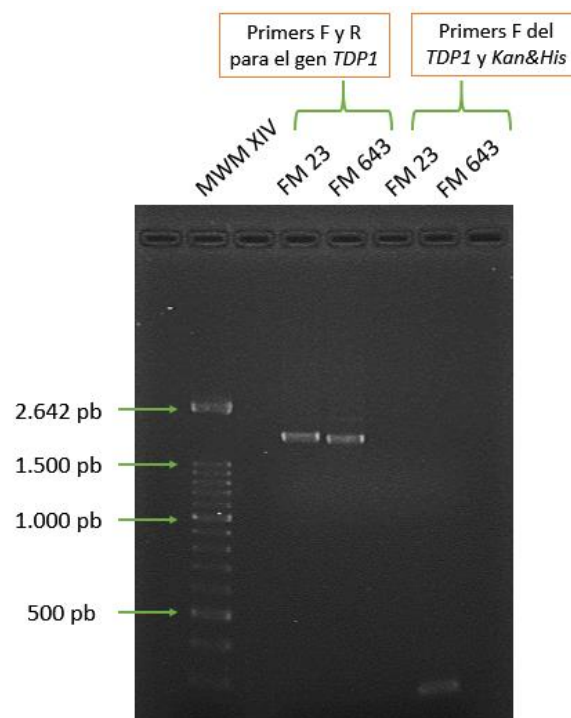


Figura 13. Electroforesis de las PCRs de comprobación del genotipo de la FM 643 mediante tamaño de los fragmentos y primer *Kan&His*. En ella se observan los tamaños esperados para los fragmentos de PCR del gen *TDP1* y del *cassette kanMX4*, siendo este último el único capaz de amplificar con el primer *Kan&His*



Por otra parte, el producto de transformación *hphMX4* se obtuvo a partir de un plásmido que porta el *cassette* (pAG32) en una reacción de PCR con los primers  $P_{TEF}$ -F y  $T_{TEF}$ -R. Una vez conseguido esto, se realizó un cambio de marcador en la cepa FM 643 de *kanMX4* por *hphMX4* (esta vez con los primers F1 y R para el *TDPI*, debido a que varios intentos con el primer F dieron lugar a PCRs inespecíficas) (**Fig. 14**). De este cambio de marcador se obtuvieron cuatro colonias positivas tras la doble selección en placas de YPD + higromicina B y la comprobación por fenotipo sensible al antibiótico G418 (placas no mostradas), manifestándose que efectivamente habían incorporado *hphMX4* mientras que *kanMX4* ya no estaba presente, dando lugar a las nuevas cepas FM 2173 (Colonia 1), FM 2174 (Colonia 2), FM 2175 (Colonia 3) y FM 2176 (Colonia 4), que constituyen clones independientes. Además se comprobó por tamaño de los fragmentos de PCR (**Fig. 15**).

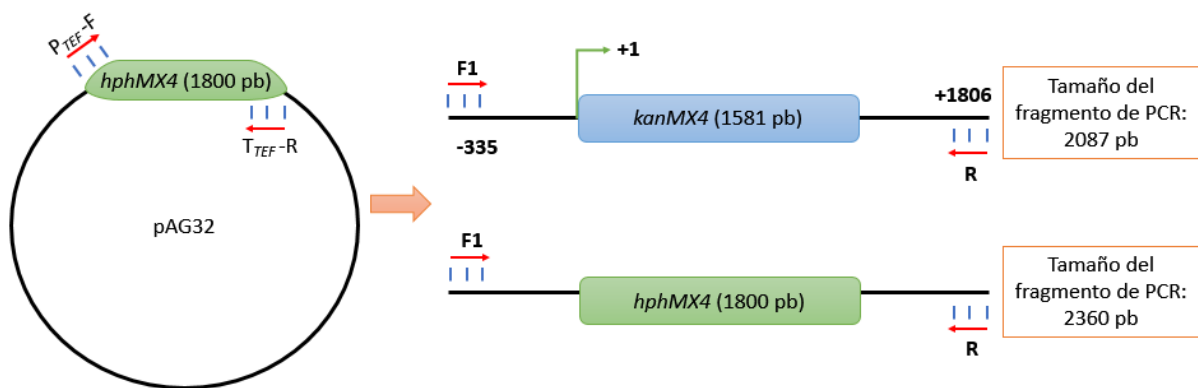


Figura 14. Esquema de la obtención de producto de transformación *hphMX4* a partir del plásmido pAG32, utilizado en el cambio de marcador de la FM 643

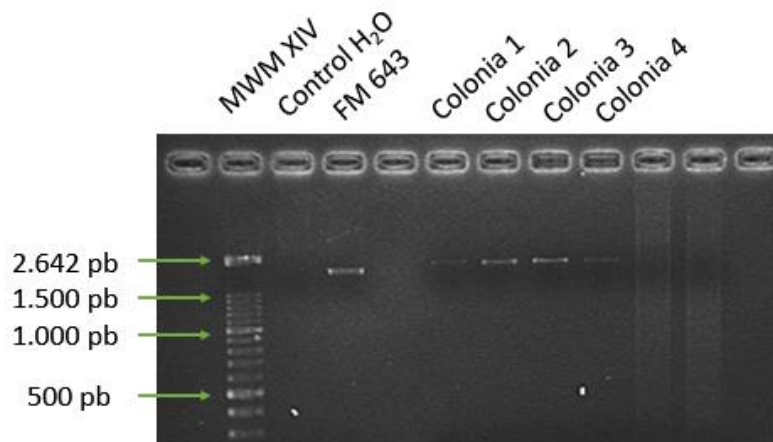


Figura 15. Electroforesis con los primers F1 y R para el gen *TDPI* del cambio de marcador en FM 643 de *kanMX4* por *hphMX4*

#### 4.2. Delección del gen *TDPI* en las cepas haploides de los sistemas de detección de reordenamientos mitóticos

Comenzamos los ensayos de delección y sustitución del gen *TDPI* en los haploides del sistema PSL con el marcador *URA3MX*. No obstante, tras el análisis de aproximadamente 30 colonias entre los dos haploides, primero por doble selección en medio de cultivo sin uracilo (todas eran capaces de crecer) y luego por la comprobación por PCR y digestión con *EcoRV*, determinamos que todas eran falsos positivos (**Fig. 16**).

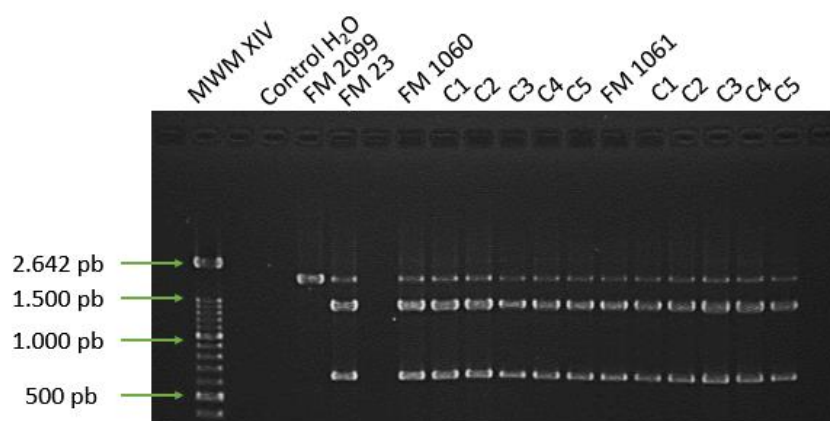


Figura 16. Electroforesis de la digestión con *EcoRV* de las reacciones de PCR para la delección del gen *TDPI* y su sustitución por *URA3MX* en las cepas de los sistemas PSL.

Sospechamos que el hecho de que porten una mutación puntual para el locus *URA3* (*ura3-I*) puede promover que la mayor parte de las integraciones tras la transformación del producto  $\Delta tdp1::URA3MX$  ocurran en el locus *URA3* en lugar del *TDPI*.

Debido a eso, optamos por un cambio de estrategia y elegimos el marcador *kanMX4* y el *hphMX4* para la delección del gen *TDPI* en los sistemas PSL y JSC respectivamente, ya que debido a sus genotipos no era posible usar el mismo marcador para ambos.

Para el sistema PSL obtuvimos una cepa positiva que provenía de la primera colonia analizada de la transformación de FM 1060, a la que se nombró como FM 2127 para añadir a la colección. No obstante, tanto para esa cepa como para la FM 1061 se analizaron aproximadamente 20 colonias en total que resultaron ser también falsos positivos tras la comprobación por PCR (**Fig. 17**).

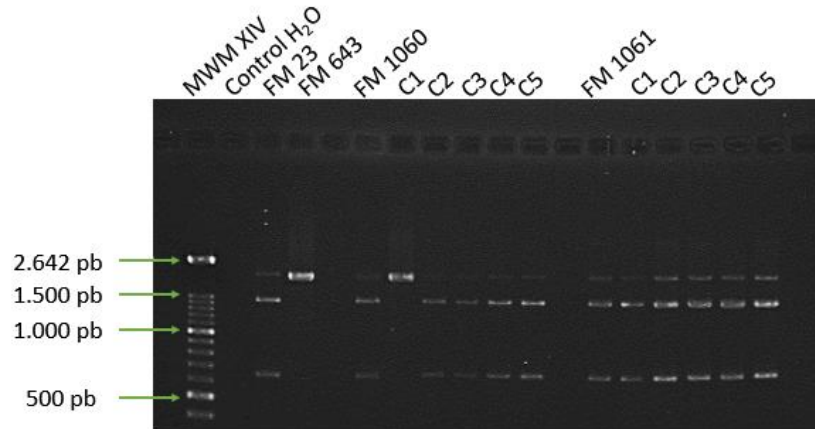


Figura 17. Electroforesis de la digestión con EcoRV de las reacciones de PCR para la delección del gen *TDPI* y su sustitución por *kanMX4* en las cepas de los sistemas PSL

Asimismo, para la transformación de los haploides del sistema JSC con el marcador *hphMX4* hicimos una PCR y digestión con EcoRV tras la selección en medio con higromicina. En ésta pudimos comprobar que se trataba nuevamente de falsos positivos, a pesar de que en la C1 de FM 1063 se observan fragmentos esperados para los dos casos, pero que probablemente nos indican una duplicación de esa región (**Fig. 18**).

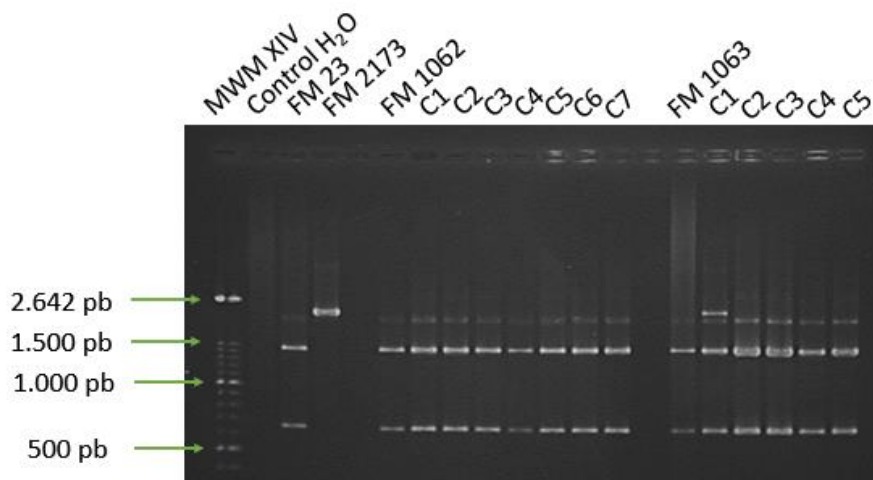


Figura 18. Electroforesis de la digestión con EcoRV de las reacciones de PCR para la delección del gen *TDPI* y su sustitución por *hphMX4* en las cepas de los sistemas JSC

La explicación que proponemos ante esta alta frecuencia de falsos positivos es recombinación ectópica, es decir, integración del producto de transformación en un sitio inespecífico del genoma. Esto podría suceder debido a los fondos genéticos tan diferentes de los que provienen las cepas de los sistemas de detección de reordenamientos respecto a la cepa FM 643. De este modo, al poseer un elevado número de SNPs, el sistema de recombinación homóloga no detecta correctamente las regiones homólogas a los brazos del producto de transformación. La solución que pretendemos usar en el futuro consiste en el diseño de primers

más alejados al locus *TDPI* para tener brazos de homología más largos en el producto de transformación.

#### 4.3. Construcción de las cepas diploides heterocigóticas para la delección del gen *TDPI*

Debido a la baja eficiencia obtenida en las transformaciones de los haploides de ambos sistemas, solamente pudimos hacer un intento de creación del diploide heterocigótico para el gen *TDPI*, combinando las cepas FM 2127 y la FM 1061. Las cepas haploides de *S. cerevisiae* tienen una gran facilidad para emparejarse con células haploides de sexo contrario (MAT $\alpha$  y MAT $a$ ) con escasos requerimientos al estar en contacto, debido a la emisión de feromonas.

Tras mantenerlas en contacto en 1mL de YPD en un Eppendorf durante 6 h a 30°C, llevando un control de los haploides aislados en las mismas condiciones, se sembraron en tres placas de YPDA respectivamente, esperando aislar diploides por manifestación fenotípica del color rosa que les corresponde, a diferencia de los haploides que poseen colores rojo y blanco respectivamente, fácilmente diferenciables. No obstante, a pesar de haberlas incubado juntas en condiciones favorables, no aparecieron colonias de color rosa, incluso las que se solapan mantuvieron el color de los haploides. Este sorprendente resultado sugiere que nuestro único clon positivo *Atdpl* del sistema PSL es estéril (**Fig. 19**).



Figura 19. Placas de YPDA del emparejamiento de las cepas FM 1061 y FM 2127 para la creación del diploide heterocigótico para el gen *TDPI*, llevando como control fenotípico las cepas homocigóticas

#### 4.4. Estimación de los LC<sub>0</sub> en las cepas diploides

Para la determinación de los LC<sub>0</sub> se tuvo en cuenta la tendencia en 6 réplicas técnicas de cada ensayo. En los casos en los que figura como elegido LC<sub>0</sub> 1 mM, en realidad quiere decir que no se pudo determinar la LC<sub>0</sub> por ser mayor o igual a esta concentración. Se utilizó esta concentración para los ensayos de reordenamientos, a pesar de que podría ser mayor que 1 mM,

por lo que habría que realizar ensayos con mayores concentraciones de antitumoral (**Fig. 20**). Asimismo, en ocasiones existían problemas de precipitación en las concentraciones mayores al adicionar el químico a la mezcla con YPD, que se trataban de resuspender por medio de vórtex y sonicación antes de la incubación de 3 horas con las células para intentar que no disminuyera la concentración efectiva de los mismos. Además, existen algunas irregularidades puntuales en cuanto al crecimiento esperado, que probablemente tienen que ver con fallos de carga del *pin stamp*.

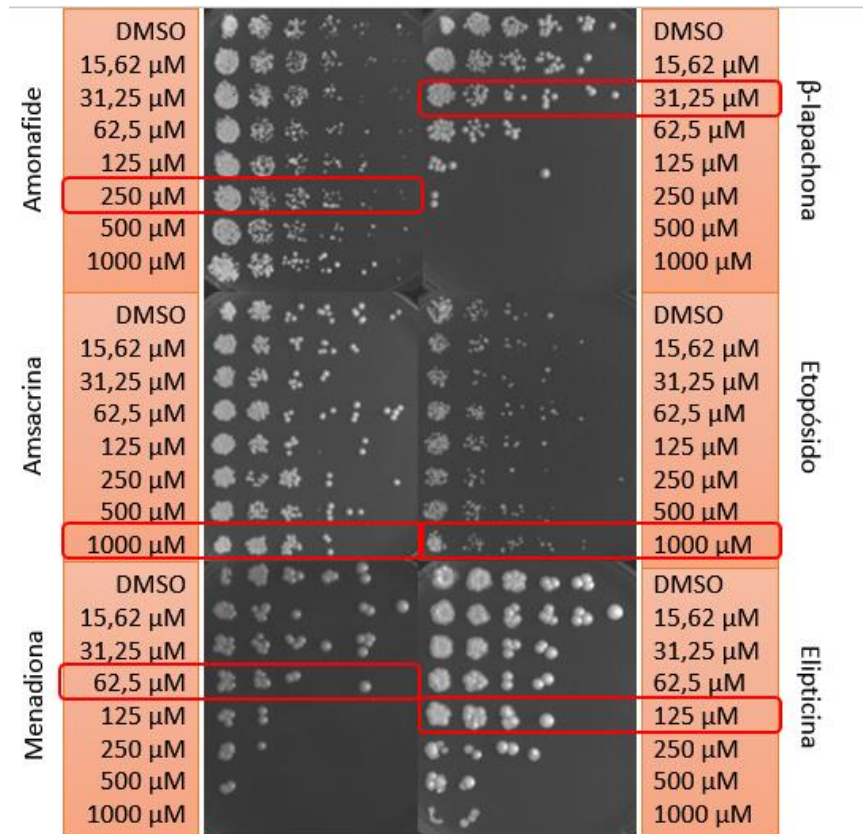


Figura 20. Esquema de las placas de diluciones seriadas más representativas para la determinación del LC<sub>50</sub> (enmarcados en rojo) de cada agente antitumoral utilizado

#### 4.5. Determinación de las frecuencias de reordenamientos genéticos mitóticos

Se comenzó haciendo los ensayos sin preselección en canavanina, pero ante el bajo número de reordenamientos detectados, seleccionamos las colonias que sufrían reordenamientos y se convertían en Can<sup>R</sup>, debido a que los diploides son Can<sup>S</sup> en ausencia de reordenamientos.

Sin preselección se llegaron a realizar los ensayos con Amo y β-lap (**Tabla 6**). La detección de colonias blancas resulta especialmente complicada en la cepa FM 2011, que presenta un color rosado más pálido que la FM 2013. No obstante, suelen ser identificables porque son más pequeñas que la mayoría (**Fig. 21**).

Tabla 6. Recuento de colonias procedentes del ensayo de detección de reordenamientos sin preselección en canavanina

	Amo		$\beta$ -lap	
	FM 2011	FM 2013	FM 2011	FM 2013
<b>DMSO</b>	409 (4 blancas)	524 (1 roja, 1 blanca)	1.106 (2 blancas, 1 roja)	695 (2 blancas)
<b>Réplica 1</b>	391 (6 blancas)	375 (1 roja, 2 blancas)	785 (2 blancas, 1 roja)	800 (1 roja, 3 blancas, 1 sector)
<b>Réplica 2</b>	349 (6 blancas)	352 (2 rojas, 1 blanca)	626 (1 blanca)	836 (1 roja, 3 blancas)
<b>Réplica 3</b>	376 (7 blancas)	376 (3 blancas)	667 (4 rojas)	854 (1 roja, 5 blancas)
<b>Ratio Q/C<sup>A</sup></b>	1,75:1	2,15:1	1,42:1	1,96:1
<b>P-valor<sup>B</sup></b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

<sup>A</sup> Ratio calculado para el compuesto antitumoral (Q) frente al Control con DMSO (C). Para los reordenamientos se considera la suma de colonias rojas y blancas

<sup>B</sup> p-valores calculados mediante el Test Exacto de Fisher con el software GraphPad

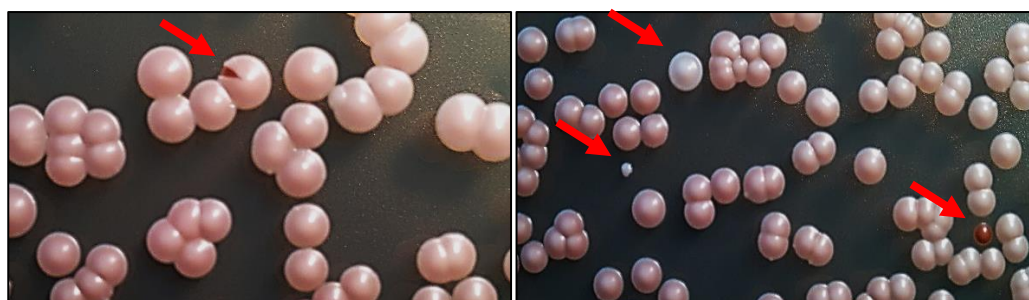


Figura 21. Imágenes representativas de los diferentes tipos de colonias obtenidas en los ensayos de reordenamientos sin preselección. En ellas se observan la variedad de tamaños que se daban entre estas colonias con reordenamientos

En los primeros ensayos con preselección en canavanina (Amo y  $\beta$ -lap), utilizamos un *drop-out* sin arginina, pero se produjo un crecimiento a modo de césped en toda la placa de colonias de muy pequeño tamaño, así que se hicieron réplicas de placa con un replicador y terciopelo en placas de medio mínimo adicionando por separado cada uno de los aminoácidos de auxotrofia de la cepa (*drop-in*), lo que indicaba que el *drop-out* tenía trazas de arginina. Aun así, esto nos permitió hacer una estimación aproximada del número de células sembradas, aparentemente igual en cada placa y que correspondía al calculado en el protocolo, ya que el recuento con el hemocitómetro no fue posible debido a la mala distribución de las células en el mismo, que además no concordaban con el número esperado (**Tabla 7**).

Tabla 7. Recuento de colonias procedentes del ensayo de detección de reordenamientos con preselección en canavanina

	Eli		$\beta$ -lap		Amo		Etop		Amsa		Men	
	C	Q	C	Q	C	Q	C	Q	C	Q	C	Q
Colonias rojas	1	8	1	6	-	7	2	20	5	19	1	13
Colonias blancas	15	21	15	26	1	7	2	>50	14	18	1	28
Ratio Q/C <sup>C</sup>	1,8:1		2:1		14:1		>17,5:1		1,9:1		20,5:1	
P-valor <sup>D</sup>	>0,05		<0,05		<0,05		<0,01		<0,05		<0,01	

<sup>C</sup> Estos ratios se calcularon considerando que la cantidad de células viables era igual en las placas de C y Q. Para los reordenamientos se considera la suma de colonias rojas y blancas

<sup>D</sup> p-valores calculados mediante Chi cuadrado con corrección de Yates con el software GraphPad, utilizando el valor estimado de 27.500 como número de colonias sembradas

La tendencia general evidencia que la adición de químico aumenta el número de colonias que han sufrido un reordenamiento genético y que el etopósido y la menadiona, con diferencia, son los que producen una mayor proporción, de manera que serían los agentes ensayados con mayor tendencia clastogénica, y por tanto mayor genotoxicidad.

No obstante, en estos ensayos no se obtuvieron colonias que procedieran de entrecruzamientos recíprocos entre cromosomas homólogos (**Fig. 22**), que son las que dan lugar a colonias con sectores mitad rojo y mitad blanco. Se obtuvo únicamente un sector (**Fig. 21**) que no está dividido en dos mitades, sino que corresponde a una división posterior, por lo que no se considera que haya sido producido durante la exposición al agente antitumoral.

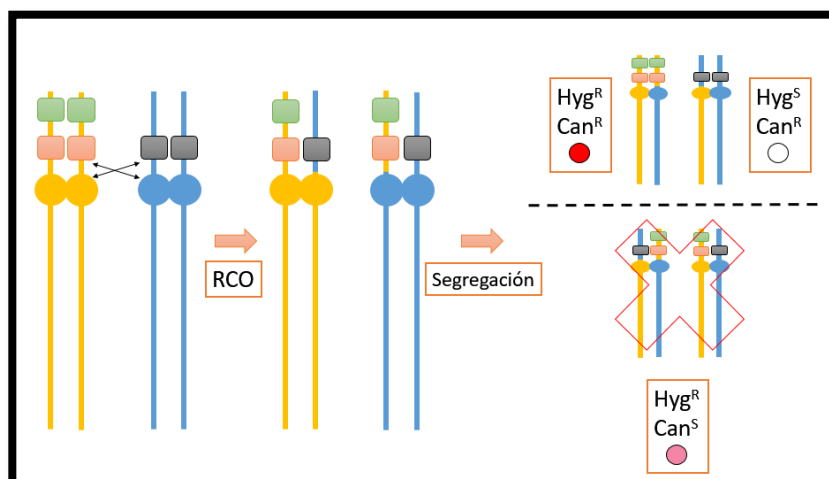


Figura 22. Esquema del entrecruzamiento recíproco (reciprocal crossing over, RCO) y de los dos posibles resultados tras la segregación (segr.) cromosómica de las células hijas. La X roja marca la célula hija incapaz de crecer en presencia de canavanina

Debido al tratamiento con canavanina, se dejan de observar sectores propios de otros de los reordenamientos más frecuentes, como los BIR, las GC y las aneuploidías, debido a que una de las células hijas muere por la preselección (**Figs. 23, 24 y 25**). Las colonias con cambio de color que se observan en los ensayos pertenecen a este tipo de reordenamientos: las colonias blancas provienen de eventos de BIR o GC, mientras que las rojas provienen además de eventos de pérdidas cromosómicas parciales.

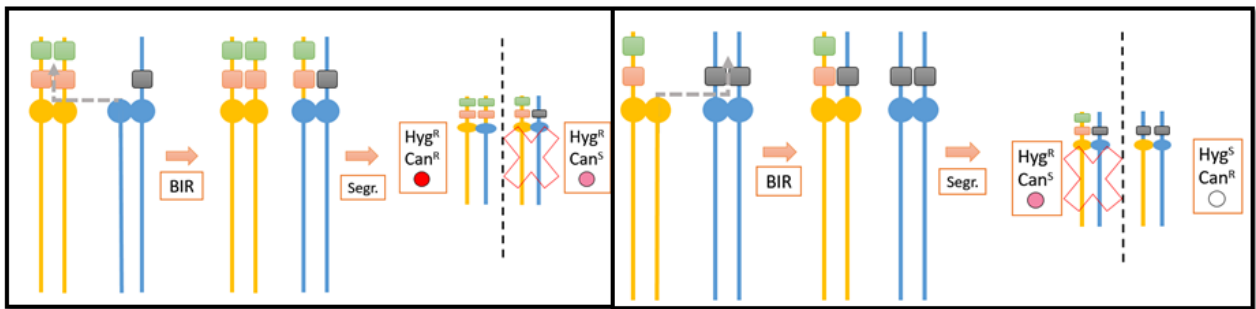


Figura 23. Esquema de los posibles resultados en cuanto a células hijas tras un reordenamiento de tipo BIR

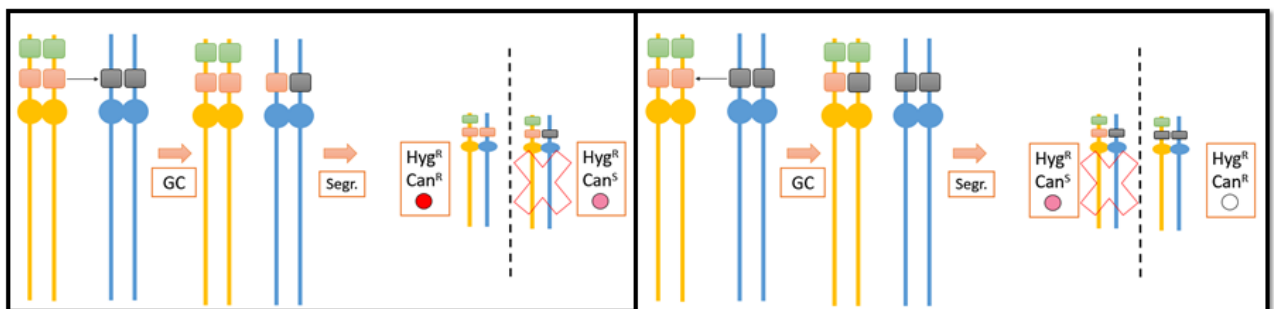


Figura 24. Esquema de los posibles resultados en cuanto a células hijas tras una conversión génica (GC)

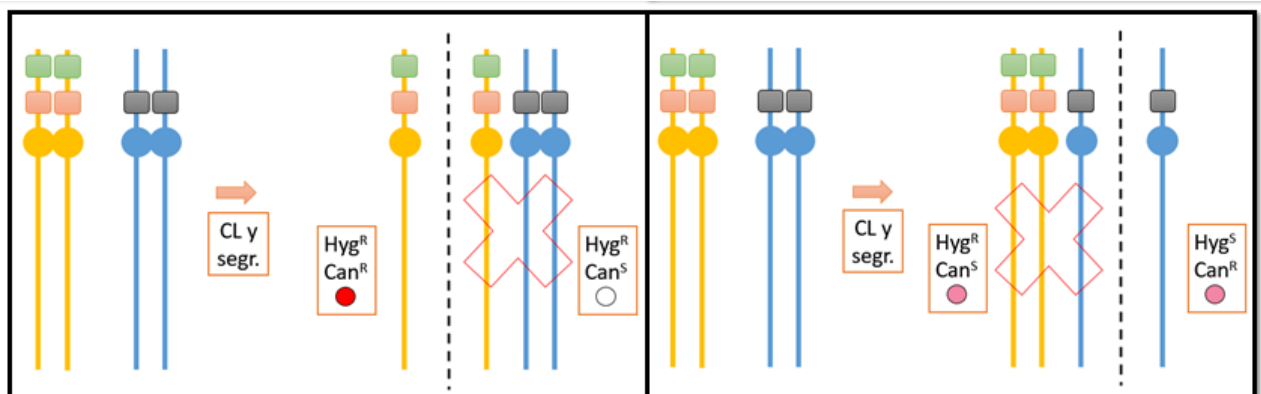


Figura 25. Esquema de los posibles resultados en cuanto a células hijas producidos por aneuploidías



## 5. CONCLUSIONES

---

- I. La estimación de la máxima concentración subletal ( $LC_0$ ) para diploides *TDPI/TDPI* determinó que el orden de toxicidad de los agentes antitumorales analizados fue:  
 $\beta$ -lapachona>Menadiona>Elipticina>Amonafide>Etopósido y Amsacrina
- II. En los ensayos sin preselección en canavanina para dichos diploides, ninguno de los dos compuestos ensayados (amonafide y  $\beta$ -lapachona) dio lugar a diferencias significativas en cuanto a la aparición de reordenamientos genéticos mitóticos.
- III. En los ensayos con preselección en canavanina, hubo un incremento de reordenamientos de al menos diez veces para los tratamientos con amonafide, etopósido y menadiona respecto al control con DMSO.
- IV. Ninguno de los reordenamientos observados, con o sin preselección con canavanina, involucró un intercambio recíproco.

## 5. CONCLUSIONS

---

- I. The maximum sublethal concentrations estimated for *TDPI/TDPI* diploids determined the following order of analyzed antitumor agents regarding to toxicity:  
 $\beta$ -lapachone>Menadione>Ellipticine>Amonafide>Etoposide y Amsacrine
- II. In the assays without previous selection with canavanine for these diploids, none of the compounds tested (amonafide and  $\beta$ -lapachone) gave significant differences according to the appearance of mitotic genetic rearrangements.
- III. In the assays with selection with canavanine, there was at least a ten-fold increase of rearrangements for the treatments with amonafide, etoposide and menadione regarding the control with DMSO.
- IV. None of the rearrangements observed, with or without previous selection with canavanine, involved a reciprocal exchange.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Ayra J. 2015. Identificación de los genes de las quinona reductasas de dos electrones de *Saccharomyces cerevisiae*. Graduado en Biología por la Universidad de La Laguna. ULL, España.
2. Barbera MA. & Petes TD. 2006. Selection and analysis of spontaneous reciprocal mitotic cross-overs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(34):12819-12824.
3. Champoux JJ. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 369-413.
4. Cortes-Ledesma F., El-Khamisy SF., Zuma MC., Osborn K., Caldecott KW. 2009. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*. 461(7264):674-8.
5. Dexheimer TS., Antony S., Marchand C. & Pommier Y. 2008. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 8(4):381-9.
6. Frydman B., Marton LJ., Sun JS., Neder K., Witiak DT., Liu AA., Wang HM., Mao Y., Wu HY., Sanders MM. & Liu LF. 1997. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Research*. 57: 620-627.
7. Gurbani D., Kukshal V., Laubenthal J., Kumar A., Pandey A., Tripathi S., Arora A., Jain SK., Ramachandran R., Anderson D. & Dhawan A. 2012. Mechanism of inhibition of the ATPase domain of human topoisomerase II $\alpha$  by 1,4-benzoquinone, 1,2-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, and 9,10-phenanthroquinone. *Toxicological Sciences*. 126: 372-390.
8. Hiom K. 2010. Coping with DNA double strand breaks. *DNA Repair*. 9(12):1256-63.
9. Janke C., Magiera MM., Rathfelder N., Taxis C., Reber S., Maekawa H., Moreno-Borchart A., Doenges G., Schwob E., Schiebel E. & Knop M. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 21:947-962.
10. Knop M., Siegers K., Pereira G., Zachariae W., Winsor B., Nasmyth K. & Schiebel E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*. 15:963-972.
11. Li CJ., Averboukh L. & Pardee AB. 1993. B-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 22463-22468.
12. Liu C., Pouliot JJ. & Nash HA. 2004. The role of TDP1 from budding yeast in the repair of DNA damage. *DNA Repair*. 3(6):593-601.
13. Longhese MP., Foiani M., Muzi-Falconi, M., Lucchini G. & Plevani P. 1998. DNA damage checkpoint in budding yeast. *The EMBO Journal*. 17(19):5525-5528.
14. Nitiss JL. 2009a. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 9:338-350.
15. Nitiss JL. 2009b. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*. 9:327-337.
16. Nitiss JL., Liu YX., Harbury P., Jannatipour M., Wasserman R. & Wang JC. 1992. Amsacrine and etoposide hypersensitivity of yeast cells overexpressing DNA topoisomerase II. *Cancer Research*. 52:4467-72.

17. Nitiss KC., Malik M., He X., White SW., Nitiss JL. 2006. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(24):8953-8.
18. Ramos C. 2016. Consequences for the cell progeny in the loss of activity of the anti-tumour target Topoisomerase 2, either by mutations acquired during the selection of tumour resistance or by the use of anti-cancer agents. Doctor con Mención Internacional por la Universidad de La Laguna. ULL, España.
19. Stiborova M., Rupertova M., Schmeiser HH. & Frei E. 2006. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 150(1):13-23.
20. Sundin O., Varshavsky A. 1980. Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell*. 21:103-114.
21. Whelan WL. Gocke E. & Manney TR. 1979. The CAN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates. *Genetics*. 91(1):35-51.
22. Yang SW., Burgin AB., Huizenga BN., Robertson CA., Yao KC. & Nash HA. 1996. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(21):11534-11539.
23. <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>
24. <http://www.beta-lapachone.com/>
25. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
26. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
27. <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/TRATAMIENTOS/QUIMIOTERAPIA/Paginas/Quees.aspx>
28. [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)

\*Todas las páginas webs fueron consultadas en múltiples ocasiones durante el desarrollo de este trabajo.