



Universidad
de La Laguna

Facultad de Ciencias

Sección de Biología



**Análisis funcional de genes que podrían
codificar para quinona reductasas de dos
electrones de *Saccharomyces cerevisiae***

**Functional analysis of genes that could
be codified to two electrons quinone
reductase of *Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo de Fin de Grado

Crysta M^a Quintero García

Grado en Biología

Julio 2016

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

Datos Personales

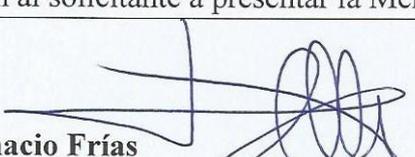
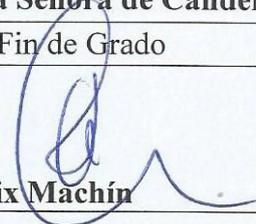
Nº DNI o pasaporte: 43381691-B	Nombre y Apellidos: Crysta Quintero
Teléfono: 689086162	Dirección de correo electrónico: crystam.qg7@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Análisis funcional de genes que podrían codificar para quinona reductasas de dos electrones de *Saccharomyces cerevisiae*.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

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

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

A mi familia

Índice

1. Introducción	1
1.1 Quinonas	1
1.2 Efectos tóxicos y mecanismos biológicos de defensa	2
1.3 Interés clínico de las quinonas	4
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para el estudio biológico de las quinonas	5
2. Objetivos	7
3. Materiales y métodos	8
3.1 Obtención de los productos de transformación	8
3.2 Modificación genética de las cepas.....	9
3.2.1 Competentes:.....	9
3.2.2 Transformación:	10
3.2.3 Comprobación genotípica de las nuevas cepas.	10
3.3 Ensayo en placas de sensibilidad y resistencia a quinonas	10
3.4 Ensayo de microscopía de fluorescencia	12
3.4.1 Experimento de “inducción-represión” para cepas GAL-yeGFP-(gen):.....	12
3.4.2 Experimento de exposición a quinonas con las cepas (gen)-yeGFP:	12
4. Resultados y discusión	13
4.1 Construcción de las cepas	13
4.1.1 Obtención de los productos de transformación	13
4.1.2 Comprobación fenotípica y genotípica de las cepas de transformantes:.....	14
4.2 Ensayo en placas de sensibilidad y resistencia a quinonas	18
4.3 Experimento de “inducción-represión” para cepas GAL-yeGFP-(gen):.....	20
4.4 Experimento de exposición a quinonas con las cepas (gen)-yeGFP:	21
4.5 Anexo.....	22
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía	24

Resumen

Las quinonas son dionas cíclicas que resultan de la oxidación de compuestos aromáticos como el benceno. Estas moléculas son ampliamente utilizadas debido a sus múltiples aplicaciones clínicas. En este trabajo se ha tratado de modificar genes que codifican para posibles quinona oxidoreductasas de dos electrones (QRs) de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura cuenta con al menos siete genes codificantes de QRs, más cuatro pautas abiertas de lectura que también podrían codificar para QRs.

Partiendo de mutantes analizados anteriormente utilizamos técnicas de ingeniería genética para crear cepas que sobreexpresen los productos de dos de los genes QRs. Aprovechando los fenotipos esperados de toxicidad para diferentes quinonas (quinonas que se inactivan por QR como la menadiona, o aquellas que se activan por QR como la beta-lapachona), se intentó identificar actividad QR in vivo para los citados productos génicos. También se construyeron cepas que fusionan estos genes con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) para estudiar abundancia y localización celular de las QRs mediante microscopía de fluorescencia.

Palabras clave: NAD(P)H quinona oxidoreductasa (QR), β -lapachona, menadiona, quinona, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The quinones are cyclic diones that ensue from the oxidation of aromatic compounds as the benzene. These molecules are widely used due to their multiple clinical applications. In this work it has been a question by modifying candidate genes if they codify for quinone oxidoreductases of two electrons (QRs) in *Saccharomyces cerevisiae*. This yeast possesses at least seven clear candidates for QRs, plus four open reading frames that also might codify for QRs.

Departing from mutants analyzed previously we used genetic engineering to create new yeast strains that overexpressed the products of two of the candidate QR genes. Taking advantage of the phenotypes expected from toxicity for different quinones (quinones that are inactivated by QR as the menadione, or those that are activated by QR as the beta-lapachone), I tried to identify in vivo QR activity for the mentioned gene products. Also I constructed strains that fused these genes with the gene of the green fluorescent protein (GFP) to study abundance and cellular location of the QRs by means of fluorescence microscopy.

Key words: NAD(P)H quinone oxidoreductase (QR), β -lapachone, menadione, quinone, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Introducción

1.1 Quinonas

Las quinonas son moléculas orgánicas que derivan de compuestos aromáticos a través de la conversión de un número par de grupos $-CH$ en grupos $-C(=O)-$, con cualquier reordenamiento necesario de dobles enlaces, para formar dionas cíclicas completamente conjugadas. La estructura más simple es la ciclohexadiendiona y se nombra como derivado del sistema aromático del que procede, por ello también se le denomina benzoquinona (ya sean las posiciones orto- o para-), ya que tiene su origen en la molécula del benceno (<http://global.britannica.com/science/quinone>) (Fig.1).

Las quinonas constituyen una amplia variedad de compuestos, pudiendo clasificarlas en quinonas naturales, sintéticas o como intermediarios metabólicos de hidrocarburos y polifenoles.

Las quinonas naturales son aquellas que se sintetizan por acción metabólica y celular en el interior de los seres vivos sobre todo en plantas superiores y hongos. El mejor ejemplo de quinona natural que se conoce es el de la ubiquinona o coenzima Q10. Esta quinona liposoluble participa en el proceso de la cadena transportadora de electrones en la respiración celular como aceptor y transportador de electrones entre fotosistemas gracias a su capacidad para presentarse en tres estados (oxidado, semirreducido y reducido).

Existen multitud de quinonas de origen natural que se producen como consecuencia del metabolismo secundario, que cumplen una función no esencial para el organismo y son sintetizadas en pequeñas cantidades, pudiendo estar su producción restringida a un determinado género, familia y/o especie. Aunque la función de estos metabolitos secundarios no es esencial, pueden otorgar propiedades alternativas al organismo que las produce, lo que supone una ventaja a la hora de hacer frente a las relaciones interespecíficas tipo depredación, parasitismo y/o competencia. Es en este punto donde los metabolitos secundarios, como las quinonas desempeñan un papel importante y es donde reside el interés por obtener quinonas de origen natural y renovarlas o modificarlas sintéticamente para potenciar la principal función que tienen (antibiótica, citostática, colorantes o venenos entre otras) (Masayo y Shigeru 1989).

Como se mencionó anteriormente también se puede encontrar una gran variedad de quinonas que se producen en forma de intermediarios metabólicos al procesar compuestos como hidrocarburos y polifenoles. Hay multitud de hidrocarburos aromáticos dispersos en el ambiente, y muchos de ellos surgen como producto de reacciones que tienen lugar en sistemas artificiales, por ejemplo, el humo producido por

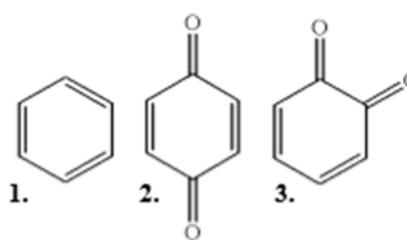


Figura 1. Estructura molecular del benceno (1), para-benzoquinona (2) y ortobenzoquinona (3).

cualquier vehículo que utilice la combustión de fuentes fósiles o el humo que se desprende a raíz del consumo de tabaco. Dado que estos dos ejemplos someten al ser humano a la exposición directa y diaria de la inhalación de hidrocarburos tóxicos, es común que las enzimas del metabolismo los procesen para expulsarlos del organismo, dando lugar a intermediarios metabólicos de naturaleza quinónica que se acumulan en las células y que pueden llegar a producir efectos nocivos en multitud de tejidos, un ejemplo de esto es la conversión del naftaleno en naftoquinona (Kumagai, 2012).

En cuanto a los compuestos fenólicos y polifenólicos, se trata de moléculas bioactivas con capacidad antioxidante que se caracterizan por contener uno o más anillos bencénicos unidos a uno o más grupos hidroxilo ($-OH$). Normalmente forman parte de la dieta ya que muchas frutas y verduras los producen y los almacenan en las vacuolas en bajas cantidades para utilizarlos como mecanismo de defensa. Cuando se ven sometidas a algún tipo de estrés de carácter invasivo como puede ser el ataque de un insecto, los fenoles se liberan del compartimento vacuolar y se oxidan por acción de enzimas específicas (por ejemplo, la catecol oxidasa o la polifenol oxidasa), dando lugar a la aparición de una quinona que resulta tóxica para el animal que la ingiere. Esta quinona también cumple funciones antibióticas para la planta, evitando posibles infecciones por hongos y bacterias. Sin embargo estas enzimas oxidasas se inactivan en ambientes que presentan un pH bastante ácido, por lo que los humanos no tienen problema con la ingesta de estos alimentos (Klabunde et al., 1998).

1.2 Efectos tóxicos y mecanismos biológicos de defensa

Las quinonas conforman un grupo de especies orgánicas con alta reactividad, motivo por el que pueden interactuar con numerosos sistemas biológicos produciendo respuestas incluso antagónicas del tipo inflamatorio/antiinflamatorio, anti-cancerígeno o tóxico, etc. El primer efecto se da por el alto potencial electrofílico que presentan muchas de ellas, pudiendo reaccionar químicamente con biomoléculas para modificarlas e inactivarlas de manera irreversible. Por ejemplo la vitamina K3 o menadiona (MD), modifica la enzima aldosa reductasa dando lugar a la formación de un tioéter estable que mantiene inactiva la principal función de la enzima (catalizar la reducción de las hexosas) (Kumagai et al., 2012).

Otro efecto de las quinonas es la capacidad que tienen para realizar ciclos redox y generar especies reactivas del oxígeno (ROS). Cuando las quinonas son reducidas a radicales semiquinona por acción del citocromo P450 (que actúa como una quinona oxidorreductasa de un electrón), pueden iniciar una reacción en cadena de propagación de radicales libres. En el estado semiquinona, las quinonas son extremadamente reactivas por tener electrones desapareados, y por ello pueden transferirlos a cualquier tipo de molécula para convertirla también en radicales libres (O'Brien, 1991; Kumagai et al., 2012). Si el oxígeno está involucrado en estas reacciones, la semiquinona puede autooxidarse y producir anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), volviendo a transformarse en la quinona original para realizar nuevamente el mismo proceso. A este ciclo fútil que conlleva además agotamiento de poder reductor y acumulación intracelular de ROS se le conoce como ciclo redox (**Fig.2**) (Ramos et al., 2014). La enzima superóxido

dismutasa convierte los aniones $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez pueden interactuar con metales de transición y dar lugar a radicales hidroxilos, muy dañinos para las células.

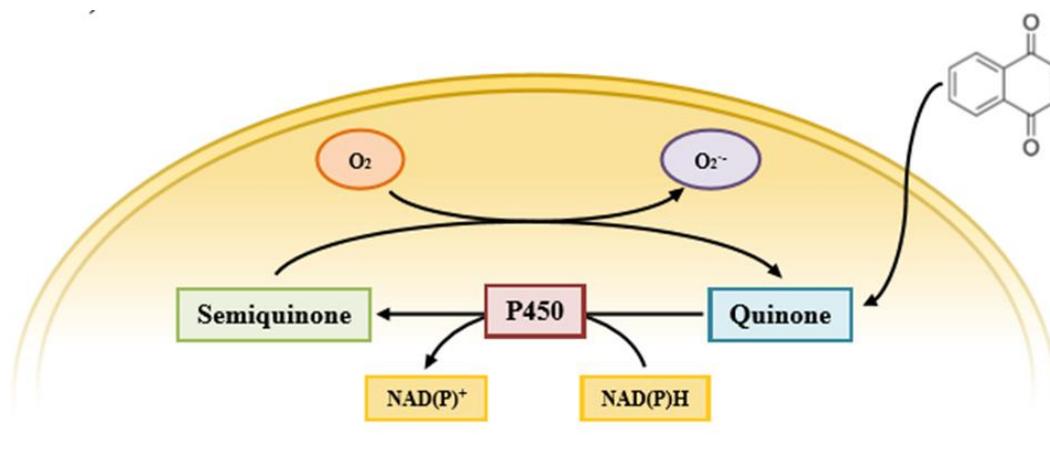


Figura 2. Esquema del ciclo fútil redox de las quinonas. Una vez que la quinona entra en la célula, el citocromo P450 utiliza poder reductor para donarle un electrón y reducirla a radical semiquinona. En este estado presenta un alto nivel de reactividad, pudiendo interactuar con cualquier molécula para producir efectos nocivos tales como la inactivación de enzimas o conjugación con el ADN. En presencia de oxígeno la quinona semirreducida se autooxida para volver a su estado inicial y reanudar el ciclo, aumentando en consecuencia la concentración de anión $O_2^{\cdot-}$ que también producirá daños. (Ayra, 2015)

Por último, existen quinonas que ejercen su toxicidad al inhibir enzimas fundamentales para la célula, estando capacitadas para competir con algunos sustratos uniéndose al sitio catalítico o de unión al ATP de diversas enzimas.

Los organismos han conseguido desarrollar diversos mecanismos de defensa para hacer frente a la toxicidad que presentan las quinonas. Un componente fundamental en varios de estos mecanismos de defensa es el glutatión (**Fig.3**).

Se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos L-glicina, L-cisteína y ácido L-glutámico y está presente en todas las células eucariotas en forma mayoritariamente reducida (GSH). Tiene actividad antioxidante y además de

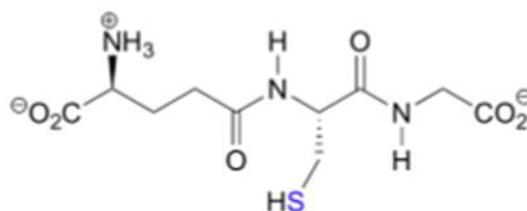


Figura 3. Estructura química del glutatión.

detoxificar ROS, puede modular la expresión génica y regular la actividad de muchas enzimas. Su presencia es tan importante que normalmente se encuentra en concentraciones de rango milimolar siendo aquellos órganos que lo exhiben en bajas concentraciones más susceptibles de sufrir daños por la toxicidad de algunos xenobióticos. Un ejemplo de esto es la sensibilidad de la médula ósea para combatir la toxicidad de las quinonas derivadas de los hidrocarburos. Esto explica el por qué las

quinonas se asocian fundamentalmente a enfermedades como la anemia aplásica, la mielodisplasia e incluso la leucemia (Bolton et al., 2000).

En general, el glutatión contribuye a que las quinonas con alto carácter electrofílico queden fuertemente adheridas al tripéptido mediante un enlace covalente, posibilitando la interacción con otros complejos proteicos o sistemas de detoxificación que logran expulsarla del interior celular y reparar los daños producidos.

Otro mecanismo de defensa contra las quinonas viene dado por las enzimas quinonas oxidorreductasas de dos electrones, también se las denomina NAD(P)H quinonas oxidorreductasas (NQO o QR), ya que necesitan el aporte de los electrones de estos agentes reductores para poder ejercer su función.

1.3 Interés clínico de las quinonas

Dado que las quinonas tienen distintos efectos tóxicos dentro de las células, esto ha supuesto que sean objeto de estudio en la aplicación de diversas enfermedades, ya que además de las propiedades antibióticas que ofrecen, algunas tienen la capacidad de frenar el desarrollo tumoral. Por ello, una importante línea de investigación se ha centrado en la búsqueda de nuevas quinonas antitumorales y los mecanismos moleculares que están detrás de esta acción. Las quinonas antitumorales pueden atacar a las células cancerígenas de distintas maneras, pero generalmente se pueden clasificar en tres modalidades: inhibidores de la topoisomerasa II (Top2), prodrogas alquilantes e hidroquinonas autooxidantes.

Las que utilizamos en este trabajo entran en la categoría de quinonas que presentan capacidad autooxidante una vez que se convierten en hidroquinonas. Antes se mencionó la toxicidad producida por aquéllas que se reducen a radical semiquinona mediante la acción del citocromo P450. Este daño se previene cuando la NQO reduce la quinona hasta hidroquinona, permitiendo que los carbonos α y/o β del anillo bencénico principal sean atacados por el grupo tiol del GSH y se produzca su eliminación.

Sin embargo, existen quinonas como la β -Lapachona (β -lap) que mantienen una alta toxicidad cuando se encuentran en un estado reducido. Esto es así porque la NQO favorece la autooxidación de la hidroquinona para volver a convertirse en la quinona inicial y así crear un un segundo ciclo redox fútil. Como consecuencia se agota aún más el poder reductor disponible y se genera una cantidad aún más alta de ROS, lo cual induce su apoptosis (**Fig.4**) (Li et al., 2014).

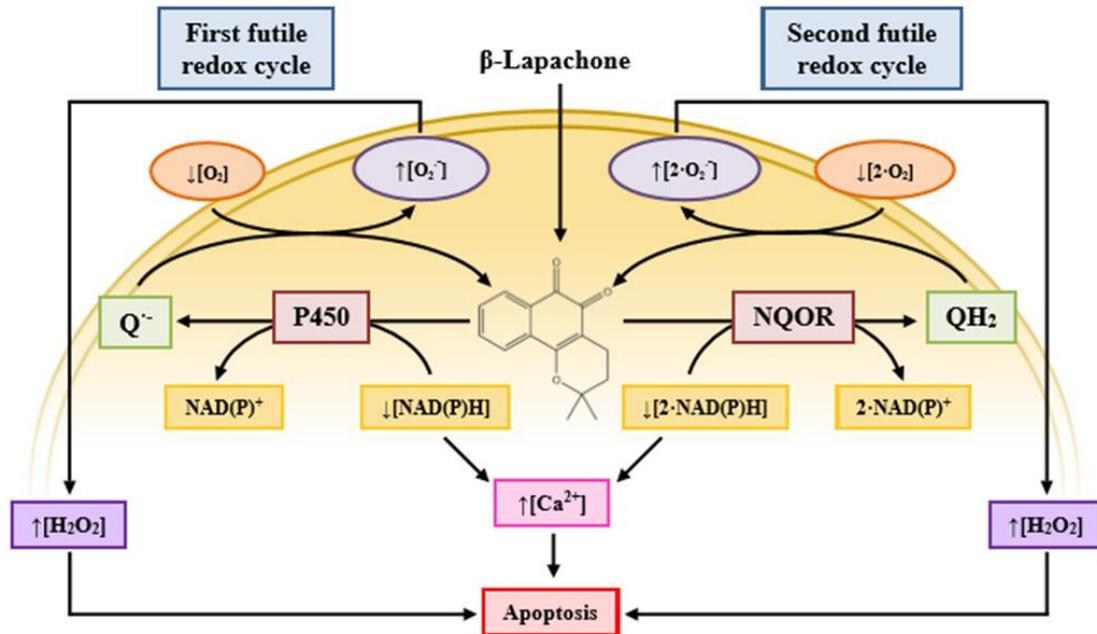


Figura 4. En esta figura se representa el mecanismo de toxicidad propuesto para la β -Lapachona. Cuando ésta entra en la célula, el citocromo P450 la reduce a radical semiquinona, y en este estado se autooxida para dar lugar a la quinona inicial y generar el primer ciclo fútil. Tras ello, la célula activa las NQOR, que reducen la β -Lapachona hasta su forma de hidroquinona. En este punto reside la característica más interesante de esta quinona, pues su forma completamente reducida no es susceptible de formar enlaces con el GSH, fomentando también su autooxidación en presencia de oxígeno y alimentando un segundo ciclo fútil redox. Las consecuencias son críticas para las células, pues el agotamiento de la fuente de poder reductor (que provoca un incremento de la concentración de calcio intracelular), la conversión de las condiciones del ambiente en anaerobias, y la sobreproducción masiva de ROS generan una cascada de señalizaciones intracelulares que inducen la apoptosis. (Ayra, 2015)

1.4 *Saccharomyces cerevisiae* para el estudio biológico de las quinonas

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) es un organismo unicelular muy utilizado en el mundo de la investigación (Fig.5)

También utilizada como levadura del pan, la cerveza y el vino, constituye un modelo de estudio perfecto ya que posee características únicas que ofrecen numerosas ventajas para desarrollar trabajos en cualquier ámbito (citogenético, de toxicidad, fisiológico, bioquímico, etc.). Se trata de un organismo eucariota cuyo ciclo de vida puede desarrollarse tanto en forma haploide como diploide sin presentar ningún tipo de problema para la

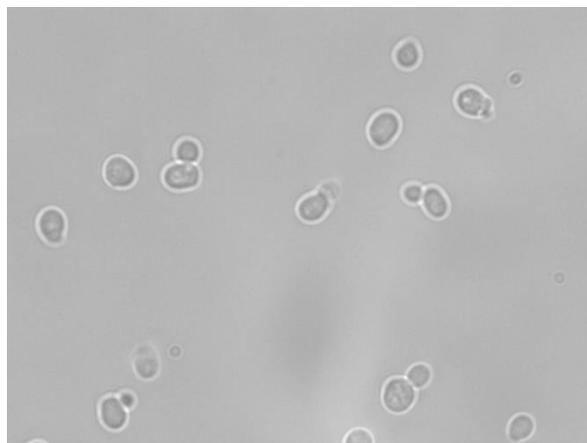


Figura 5. Imagen de *S.cerevisiae* al microscopio con objetivo de inmersión 63X.

estabilidad celular. Debido a su elevada tasa de recombinación, a su corto tiempo de generación (entre 90 y 120 minutos), y a la gran disponibilidad de marcadores auxotróficos y de resistencia a antibióticos que existen; resulta relativamente sencillo de manipular genéticamente.

Una de las propiedades más importantes es su capacidad para crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, ya que se trata de un organismo aerobio facultativo, de hecho en presencia de oxígeno opta por realizar la fermentación alcohólica. Quizás se trate de una estrategia evolutiva, ya que a pesar de obtener menor cantidad de energía que en la respiración, fermentar le permite excretar al medio grandes cantidades de etanol (tolerando hasta un 20 %), e inhibir el crecimiento de organismos competidores en su entorno.

Gracias a que la maquinaria molecular de muchos de los procesos celulares se encuentra conservada tanto en levaduras como en plantas y mamíferos, *S. cerevisiae* se ha convertido en una herramienta capaz de proporcionar un punto de partida para estudiar eucariotas más complejos. Por ello, esta levadura ha sido el organismo empleado en el desarrollo de este trabajo.

Las quinonas con actividad antitumoral presentan un gran interés para lograr el desarrollo de nuevas terapias para combatir la enfermedad del cáncer e intentar disminuir los niveles de agresividad que presentan muchas de las terapias que se utilizan actualmente. Se ha comprobado que las NQOR se encuentran sobreexpresadas en células tumorales (Cresteil y Jaiswal, 1991; Ough et al., 2005); y es aquí donde radica el interés por la utilización de quinonas autooxidantes (como la β -lap) para ejercer la toxicidad necesaria para que la propia célula cancerígena induzca su apoptosis.

S. cerevisiae posee al menos 11 genes que podrían codificar proteínas con posible actividad de NQOR según análisis *in silico*. En ese mismo análisis se determinó que los mejores candidatos para codificar NQOR citosólicas eran *LOT6* y *ZTA1*, habiendo además confirmación experimental de que *Lot6* tiene actividad NQOR *in vitro*. Previamente estudiamos mutantes sencillos y dobles para estas dos posibles NQOR sin que se llegase a un resultado concluyente sobre su posible papel en detoxificar o bioactivar quinonas (Ayra, 2015).

El objetivo de este trabajo ha sido sobreexpresar estos genes y exponer las células a dos quinonas, β -lapachona (β -lap) (**Fig.6**) y menadiona (MD) (**Fig.7**), para intentar dilucidar si alguno de estos dos genes codifica para proteínas con actividad NQO *in vivo*.

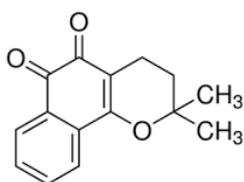


Figura 6. Estructura molecular de la β -lapachona.

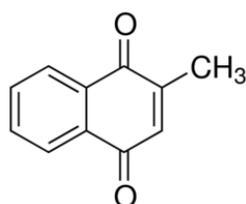


Figura 7. Estructura molecular de la menadiona.

2. Objetivos

Debido a la dificultad de la investigación y puesto que se trata de un Trabajo de Fin de Grado se establecieron unos objetivos específicos. El objetivo a largo plazo es identificar los genes que codifican para NQOR y su papel en la detoxificación de MD y β -lap.

Dado que previamente se había intentado comprobar el papel NQO de los genes *LOT6* y *ZTA1* mediante delección génica, seguido de comparación de la sensibilidad a las quinonas de las diferentes cepas mutantes respecto a la cepa salvaje (WT), para este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Construir nuevas cepas mediante manipulación genética para incorporar por un lado el promotor de la galactosa delante de los genes *LOT6* y *ZTA1*, y así sobreexpresar las posibles proteínas NQOR, y por otro lado fusionar la proteína GFP (Green Fluorescence Protein) a *Lot6* y *Zta1* para ver la proteína mediante microscopía de fluorescencia.
- Medir los niveles de resistencia o sensibilidad de las cepas de sobreexpresión una vez expuestas a las quinonas mediante la técnica de siembra en placas en diluciones seriadas.
- Determinar la respuesta de las proteínas y su posible relocalización dentro de las células al exponerlas a las diferentes quinonas, visualizándolas para ello mediante microscopía de fluorescencia, además de ver cuál de las dos proteínas posee una mayor respuesta ante las quinonas.
- Determinar la localización dentro de la célula mediante microscopía de fluorescencia de las proteínas sobreexpresadas gracias al promotor de la galactosa.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención de los productos de transformación

Para llevar a cabo las transformaciones de las cepas primero fue necesario crear los productos de transformación. Para ello se utilizaron tres plásmidos como molde para amplificar los diferentes productos mediante el uso de primers con colas (Tabla 1 y Fig.8). Esas colas corresponderían con 40 nucleótidos de las secuencias inmediatamente anterior al ATG o inmediatamente posterior al codón de parada de los genes *LOT6* y *ZTA1* (Janke et al. 2004).

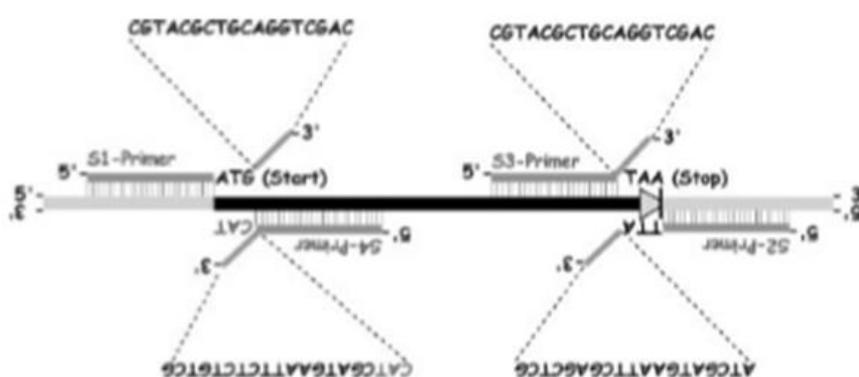


Figura 8. Representación de los primers con colas anteriormente mencionados (Janke et al. 2004).

Plásmido	Primers	Tamaño del producto	Tagueo	Marcador
pYM-N23	S1/S4 LOT6 ZTA1	1818	Promotor GAL1	natNT2
pYM-N25	S1/S4 LOT6 ZTA1	2578	Promotor GAL1, yeGFP	natNT2
pYM25	S2/S3 LOT6 ZTA1	2550	yeGFP	hphNT1

Tabla 1. Esta tabla muestra los nombres de los plásmidos utilizados como molde con sus correspondientes primers y los tamaños que tendrían los productos de transformación una vez amplificados. También vemos el contenido de esos productos y el correspondiente marcador de resistencia a antibiótico.

La amplificación de los productos de transformación se realizó mediante PCR, para ello se utilizó a partir de un stock previamente preparado tanto de los primers para ambos genes (10 μ M en H₂O) como de los plásmidos (~ 2 ng/ μ l en H₂O). Para la PCR se añadió 1 μ l del stock de plásmido para cada producto, 0'5 μ l de los primers forward y reverse para cada producto, y 23 μ l en cada tubo de una mezcla maestra previamente preparada que contenía: 14'625 μ l H₂O, 5 μ l Buffer 5X, 2'5 μ l MgCl₂, 0'25 μ l DMSO

(Dimetilsulfóxido), 0'5µl dNTPs (mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato a 2'5 mM cada uno) y 0'125 µl de un stock 5 U/µl de *GoTaq polymerase* (Promega), todo esto multiplicado por el número de productos que necesitara amplificar (6 productos de transformación) (**Fig.9**)

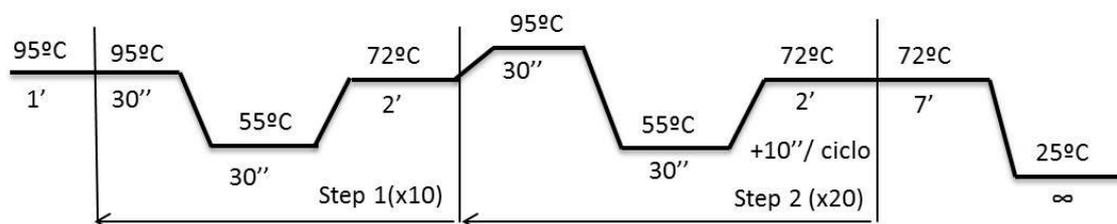


Figura 9. Representación esquemática de los pasos seguidos por el termociclador para llevar a cabo la PCR con la Gotaq polimerasa, se añadieron unas rampas en el paso 2 de 10'' por ciclo debido a las colas de los primers.

Una vez finalizada la PCR los resultados los analizamos mediante una electroforesis en gel de agarosa (1% peso/volumen). Para ello usamos un gel pequeño de 8 pocillos, a cargar 7, 1 con el marcador de peso molecular, y 6 pocillos con cada uno de los productos de transformación. Para hacer el gel se pesaron 0'5 g de agarosa y se diluyeron en 50ml de TBE 1X. Para cargar los pocillos se añadieron a 15 µl de las muestras 5µl de *loading buffer* 6X que contiene azul de bromofenol y glicerol (para que las muestras vayan al fondo del pocillo), a continuación se dejó correr el gel a 100V aproximadamente 1 hora y 15 minutos.

3.2 Modificación genética de las cepas.

3.2.1 Competentes:

La primera etapa para modificar genéticamente a *S.cerevisiae* es preparar las células competentes, para ello lo primero que se hizo fue crecer un día las cepas que nos interesaba transformar en medio YPD (*Yeast extract* 1%, *Peptone* 2%, *D-glucose* 2%) líquido. Después de toda la noche en crecimiento, se centrifugaron las células en tubos cónicos de 50 ml durante 1 minuto a 2500 rpm, después de retirar el sobrenante se hizo un lavado con agua y volvió a centrifugar. El *pellet* restante a continuación se resuspende en 1ml de SORB (LiAc 100 mM; Tris-HCl 10 mM a pH 8.0; EDTA 1 mM y sorbitol 1mM) y se transfiere a un tubo Eppendorf donde se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 segundos, retirando a continuación el sobrenadante. Por último se resuspenden las células en 350µl de SORB y 50µl de *carrier DNA* (ADN de esperma de salmón desnaturalizado), y se guardan los tubos a -80°C.

Se emplearon 6 cepas con diferentes características para el estudio de los genes *LOT6* y *ZTA1*: la primera, BY4741, es la cepa salvaje (WT) o de referencia de la colección Euroscarf. También se empleó la cepa FM773, cuyo genotipo es WT rho- (sin mitocondrias). Las otras cepas son mutantes sencillos para los genes de interés de la colección Euroscarf: FM624, con el gen *LOT6* deletado y sustituido por un *cassette*

de selección en presencia del antibiótico geneticina (Δ lot6::KanMX4); y FM66 con el gen ZTA1 delecionado y sustituido por el mismo *cassette* (Δ zta1::KanMX4). Por último usamos las cepas sin mitocondrias derivadas de los mutante previos: FM2077 y FM2078 (Δ lot6::KanMX4 rho- y Δ zta1::KanMX4 rho- respectivamente).

3.2.2 Transformación:

El proceso para transformar levaduras es relativamente sencillo. El primer paso fue mezclar 3 μ l de producto de PCR, 27 μ l de la alícuota de células competentes y 180 μ l de PEG (Polietilenglicol), homogeneizando con la pipeta, tras esto los tubos se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió 23 μ l de DMSO y durante 15 minutos se incubaron las muestras en un baño a 42°C. Por último se centrifugaron los tubos para retirar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 150 μ l de YPD, dejando las células en agitación a 30°C durante unas 3 horas. Pasadas las 3 horas todo el contenido de los tubos se siembra en placas de YPAD (Yeast extract 1%, peptone 2%, Agar 2%, D-glucose 2%) y antibiótico. Dependiendo del marcador de resistencia que contuviera el producto amplificado por PCR se añadía a la placa nourseotricina (Nat) (100 μ g/ml por placa), o higromicina (Hyg) (300 μ g/ml por placa), y se incubaba a 30°C durante unos 3 días hasta que aparezcan colonias de levaduras.

3.2.3 Comprobación genotípica de las nuevas cepas.

La comprobación genotípica de las cepas comenzó con la extracción de ADN de las mismas. El primer paso fue resuspender una cantidad considerable de células en 200 μ l de Breaking buffer (Triton X – 100, 2 %, v/v; SDS, 1 %, w/v; NaCl (100 mM); Tris-Cl (10 mM) a pH 8.0 y EDTA (1 mM) a pH 8.0) en un tubo Eppendorf, a los cuales se le añadían 200 μ l de una solución de ice-cold phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) con bolas de vidrio de 0'5mm de diámetro para dar vortex durante 2'30'', esto rompe las células tanto física como químicamente. A continuación se añadían 200 μ l de TEBuffer (Tris-Cl (10mM) a pH 8.0 y EDTA (1mM) a pH 8.0) y se centrifugan las muestras a máxima potencia durante 5 minutos, de esta manera el ADN de todas las células que se hubieran añadido queda en la fase acuosa superior. De esta fase acuosa se cogen 350 μ l y se pasan a otro tubo Eppendorf para añadirle 1ml de ice-cold etanol 100%. Tras dejar reposar 10 minutos se centrifuga a máxima potencia de nuevo y se elimina y deja secar el etanol, una vez secos los tubos se añaden otros 50 μ l de TEBuffer y se guardan las muestras a -20°C.

Seguidamente se comprobó la inserción correcta del producto de transformación mediante una PCR similar a la descrita en el apartado 3.1., pero usando unos cebadores externos a los genes diana. Los cebadores específicos se describen más adelante en la sección de resultados.

3.3 Ensayo en placas de sensibilidad y resistencia a quinonas

Este ensayo se realizó como método para apreciar de manera sencilla y visual cómo afectan las quinonas con diferentes fuentes de carbono (que controlan la expresión del los genes bajo el promotor GAL) sobre las cepas construidas.

Para ello se escogieron 8 cepas: como controles las cepas WT, *Δyap1* (hipersensible al estrés oxidativo), y los dobles mutantes *Δlot6 Δzta1* con y sin mitocondrias; y para ver el efecto de las quinonas con el gen *ZTA1* sobreexpresado las cepas *Δlot6 GAL-ZTA1* y *Δlot6 GAL-ZTA1 rho-* (de esta última se usaron 3 cepas construidas de distintas colonias).

Para empezar se incuban las cepas overnight en 10ml de medio YPD líquido, de manera que al día siguiente lo primero que se hizo fue medir con un espectrofotómetro a OD_{660} todas las cepas para normalizar los cultivos a $OD_{660}=0.6$. El proceso de siembra de las placas comienza con una placa de 96 pocillos, donde rellenamos la primera columna (8 pocillos) con 200μl de cada una de las cepas cuya OD hemos normalizado. A continuación rellenamos hasta la columna número 6 (5 columnas) con una pipeta multicanal, cada pocillo con 180μl de medio líquido YPD para llevar a cabo las diluciones seriadas transfiriendo 20μl desde la primera columna a la segunda, de la segunda a la tercera, y así consecutivamente (**Fig.10**).

Las placas de Petri eran preparadas con anterioridad y reposaban en la nevera. Se hicieron 7 placas de Petri, 3 con 10 ml de medio YPD, 3 con 10ml de medio YPGAL (2% galactosa) y 1 con 10ml de medio YPGly (con 3% de glicerol, las cepas sin mitocondrias no crecerían en este medio), y a cada tipo de medio le añadimos un compuesto extra, a una placa añadimos 100 μl de DMSO (de manera que tenemos una concentración final de 1% v/v) para los tres medios, a la segunda añadimos 100μl de un stock 10 mM de MD (100 μM final) para los medios con glucosa y galactosa, y por último, para estos medios también, añadimos 30 μl de un stock 10 mM de β-lap (30μM final) + 70μl de DMSO (para ajustar la concentración final del solvente a 1% v/v).

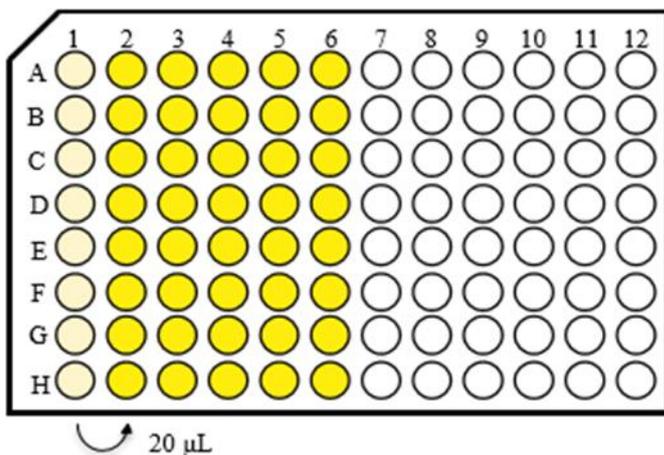


Figura 10. Representación de las diluciones seriadas para la siembra en placas.

Para terminar se hace uso del “pin stamp” para la siembra de las placas, este aparato tiene 48 cilindros que sobresalen y que, sumergiéndolos en los pocillos, quedan las muestras adheridas a ellos por capilaridad, de manera que sembramos una pequeña gota de cada uno de los pocillos en las placas, dejamos secar esas gotas y se incuban durante 2 o 3 días a 30°C para sacar unas fotos de las placas, y a continuación otros 2 o 3 días a 30°C para volver a sacar

fotos a las 6 días.

3.4 Ensayo de microscopía de fluorescencia

Para la observación al microscopio se usó el sistema DMI6000B (Leica) usando el objetivo de inmersión de 63X y el conjunto de filtros de fluorescencia apropiado.

3.4.1 Experimento de “inducción-represión” para cepas GAL-yeGFP-(gen):

Este ensayo tiene como objetivo ver mediante fluorescencia y al microscopio el efecto que tiene la sobreexpresión de los posibles genes de NQOR (localización en la célula, aglomerados, etc) cuando las células son expuestas a galactosa y estos genes están tagueados en N-terminal con el promotor GAL más la proteína verde fluorescente.

Para empezar las cepas deben crecerse overnight en un medio mínimo para disminuir todo lo posible la autofluorescencia de las células. Este medio es SCraff [-trp+ade] al cual se lo añadió además uracilo, se trata de un medio con una fuente de nitrógeno neutra que reduce considerablemente la autofluorescencia que puedan tener las células debido por ejemplo a procesos de síntesis de aminoácidos como la adenina. Además como fuente de carbono se usó rafinosa, de esta manera no se vería inducido ni reprimido el promotor de la galactosa. Una vez incubadas las levaduras normalizamos los cultivos a una $OD_{620}=0.3$ en ese medio en un volumen final 5ml de cultivo.

Cuando eso esté hecho se cogen 200 μ l de muestra en un tubo Eppendorf, se centrifuga y el pellet lo guardamos a -20°C como T=0. Es entonces cuando empezamos el experimento time-course de inducción, añadimos directamente galactosa al medio para una concentración final del 2% v/v, y tomamos otros 200 μ l de muestra cada 20' mirando al microscopio en los canales BF (visible), GFP (fluorescencia verde) y RFP (fluorescencia roja), calibrando los setting de fluorescencia para maximizar la sensibilidad de la GFP y minimizar la autofluorescencia. En nuestro caso terminamos utilizando para los canales de fluorescencia: 1'' de exposición, 6.5 grados de ganancia (sobre 10 de máximo) y una intensidad entre 4 y 5 (sobre 5 de máximo). Finalmente tomamos fotos en Z (diferentes campos focales) de varios campos de muestra en el portaobjetos. Una vez miradas las muestras bajo el microscopio congelamos a -20°C el resto del pellet.

A las 2 horas comenzamos el experimento de represión, para el cual se añadió glucosa al medio para una concentración final de 2% v/v. Tras esto tomamos 200 μ l de muestra a los 30' y congelamos el pellet sobrante.

Por último, y tras al menos 48 horas congelados los pellets, se vuelven a mirar bajo el microscopio, esta vez cotiñendo con DAPI los núcleos.

3.4.2 Experimento de exposición a quinonas con las cepas (gen)-yeGFP:

El objetivo de este ensayo es ver bajo microscopía de fluorescencia el efecto que tiene en las células el exponerlas ante las quinonas, si hay relocalización de las posibles proteínas NQOR marcadas, si hay mayor expresión de las mismas, cuál de los dos genes podría tener una mayor acción y con qué quinona MD o β -lap, etc. Para este ensayo usamos la cepa WT con la proteína yeGFP tagueada en C-terminal de los genes *LOT6* y *ZTA1*, así como la cepa madre, BY4741 (WT). En este caso, y a diferencia del ensayo

anterior, las proteínas fusionadas a la GFP se expresan bajo el control de su promotor nativo.

De nuevo el primer paso es crecer overnight las cepas en un medio que minimice al máximo la autofluorescencia de las células, este medio es SCGlu [-trp+ade] al cual se le añadió además uracilo igual que en el experimento anterior, con la diferencia de que como fuente de carbono usamos en este caso glucosa. Una vez incubadas las levaduras normalizamos los cultivos a una $OD_{620}=0.3$ en ese medio, para ello medimos las OD con un espectrofotómetro y normalizamos para tener un volumen final 5ml de cultivo. Dividimos entonces cada cepa en 3 tubos, con 5ml en cada uno ya con una $OD_{620}=0.3$.

De cualquiera de los tres tubos cogemos una muestra de 200 μ l de cada cepa en un tubo Eppendorf y centrifugamos para congelar el pellet a -20°C como $T=0$. Entonces comenzamos con el experimento time-course para cada cepa: en el tubo 1 añadimos DMSO para una concentración final de 1% v/v; en el tubo 2 añadimos MD para una concentración final de 30 μM en 1% v/v de DMSO; en el tubo 3 añadimos β -lap para una concentración final e 10 μM en 1% v/v de DMSO.

De cada uno de los tubos tomamos 200 μ l de muestra y congelamos nuevamente los pellets cada 15' durante 90'. Tras al menos 48 horas a -20°C miramos los pellets al microscopio.

De nuevo primero calibramos los setting para maximizar la sensibilidad de la GFP y minimizar la autofluorescencia, resultando 1'' de exposición, 6.5 grados de ganancia y una intensidad entre 4 y 5, y además cotiñendo con DAPI los núcleos de las levaduras. Por último sacamos fotos en Z de varios campos.

4. Resultados y discusión

4.1 Construcción de las cepas

4.1.1 Obtención de los productos de transformación

El primer paso de este trabajo consistió en tratar de obtener los diferentes productos de transformación. En esta etapa surgieron diversos problemas, empezando porque algunos productos de transformación no amplificaban con la Gotaq polimerasa debido a su tamaño y/o secuencia, por lo que fue necesario el uso de una polimerasa más potente. Los productos que amplificaron inicialmente fueron (**Fig.11**):

- Primers S1-S4 para ZTA1+pYM-N23 → #250
- Primers S1-S4 para ZTA1+pYM-N25 → #251
- Primers S2-S3 para ZTA1+pYM25 → #252
- Primers S2-S3 para LOT6+pYM25 → #253

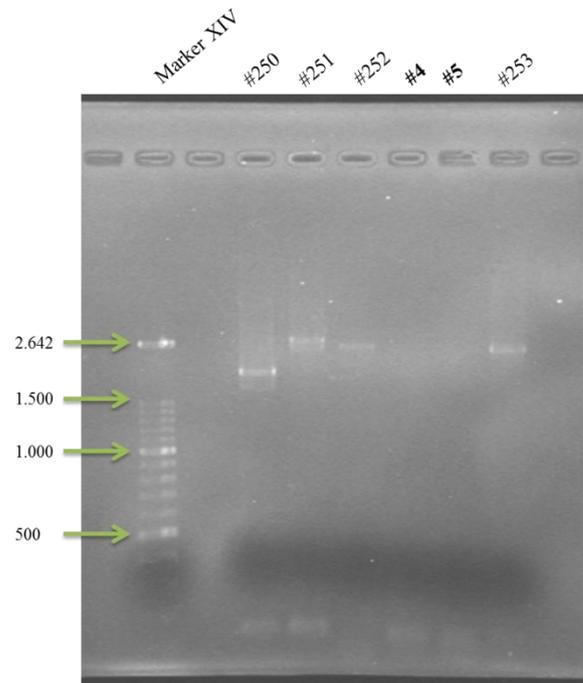


Figura 11. Imagen que muestra la comprobación por gel de agarosa de la amplificación de los productos de transformación.

Y los productos que no salieron inicialmente, sino con la polimerasa con más capacidad para productos de PCR difíciles fueron:

- Primers S1-S4 para LOT6+pYM-N23 → #4
- Primers S1-S4 para LOT6+pYM-N25 → #5

4.1.2 Comprobación fenotípica y genotípica de las cepas de transformantes:

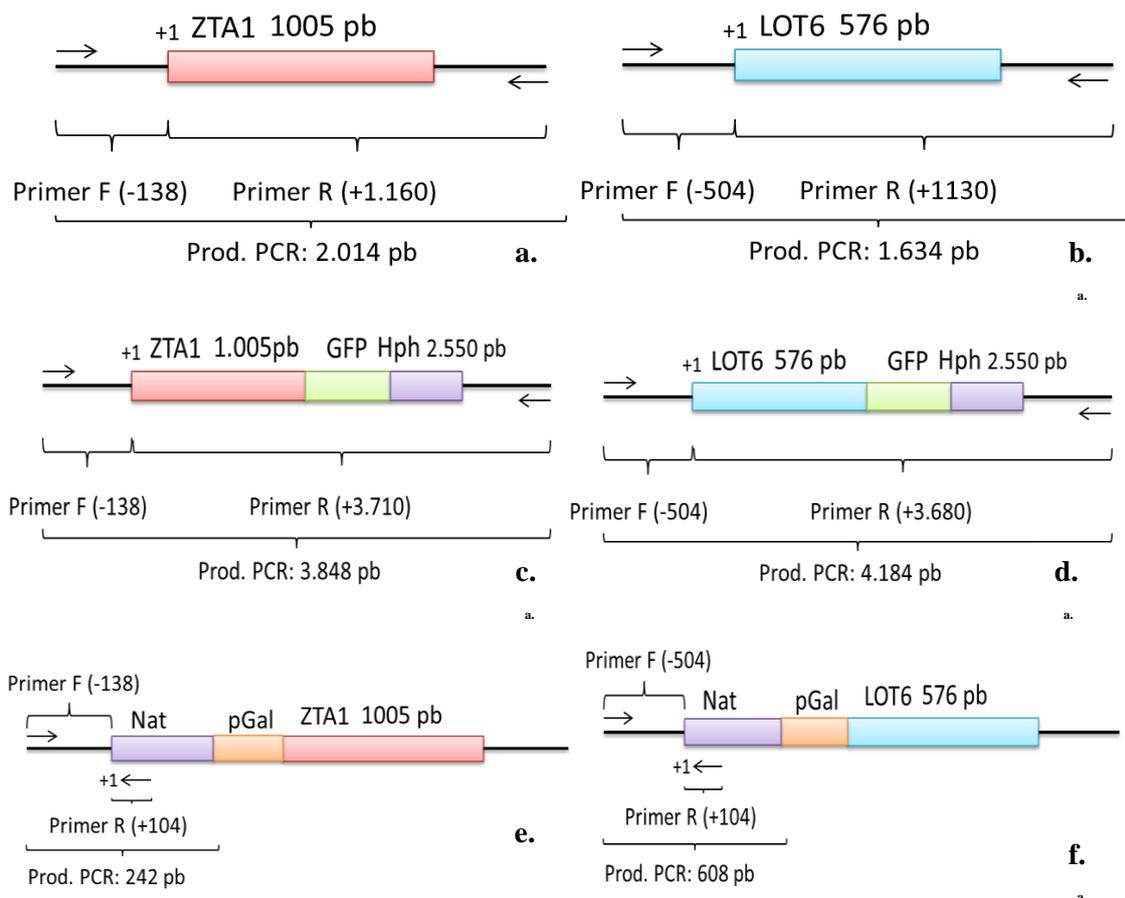
Tras la transformación de las correspondientes células competentes, y pasados los días de crecimiento en las placas de selección, en caso de que existiera crecimiento de colonias de levaduras se comprobó fenotípicamente en primer lugar picando las colonias con un asa de siembra y haciendo una siembra por estrías en otra placa YPAD + antibiótico. En caso de que hubiera un buen crecimiento en la placa esto significaría que las levaduras de esa colonia habían incorporado a su genoma el producto de transformación que les confiere resistencia ante el antibiótico utilizado, en ese caso se procedió a extraer el ADN de las cepas y comprobar genotípicamente si se había insertado el producto de transformación en el lugar correcto del genoma.

La comprobación genotípica de las cepas se hizo mediante PCR, para ello usamos primers que flanquean las pautas abiertas de lectura de cada gen (**Tabla 2**).

Gen	Primers	
LOT6	Fordward1	LOT6-F1 (-656)
	Fordward	LOT6-F (-504)
	Reverse	LOT6-R (+1130)
ZTA1	Fordward 1	ZTA1-F1 (-366)
	Fordward	ZTA1-F (-138)
	Reverse	ZTA-R (+1160)
	Reverse	KanHis (+104)

Tabla 2. Representa todos los primers usados para comprobar los diferentes genes y sus posiciones corriente arriba y corriente debajo de la posición +1 del gen.

Dependiendo del tamaño del producto resultante de la PCR utilizamos diferentes tiempos de extensión en el termociclador, usando para los productos más grandes (unas 4.000 pb) más tiempo (4'), y para los productos más pequeños (unas 200 pb) menos tiempo (1'). Para estos últimos de unas 200pb se usó el primer *KanHis* localizado en la secuencia del cassette de resistencia a Nat (**Fig.12**).



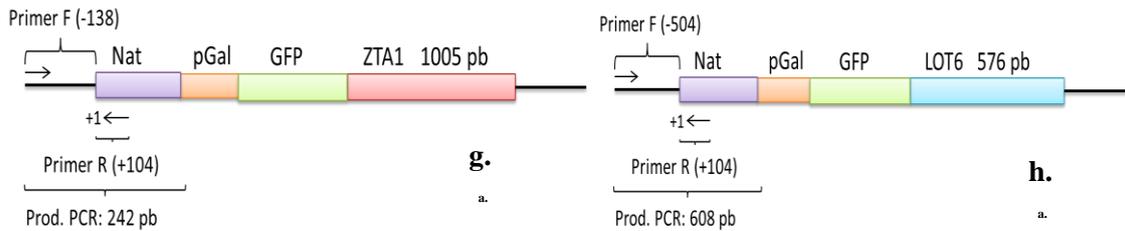


Figura 12. Representaciones esquemáticas del genotipo final de cada cepa transformada y sus tamaños en la amplificación mediante PCR. a) y b) genes sin transformar, c) y d) gen ZTA1 y gen LOT6 transformados con productos #252 y #253 respectivamente, e) y f) gen ZTA1 y gen LOT6 con #250 y #4 respectivamente, g) y h) gen ZTA1 y gen LOT6 con #251 y #5 respectivamente.

Tras la PCR se comprobó la presencia y tamaño de los productos esperados mediante una electroforesis en gel de agarosa (**Fig.13**).

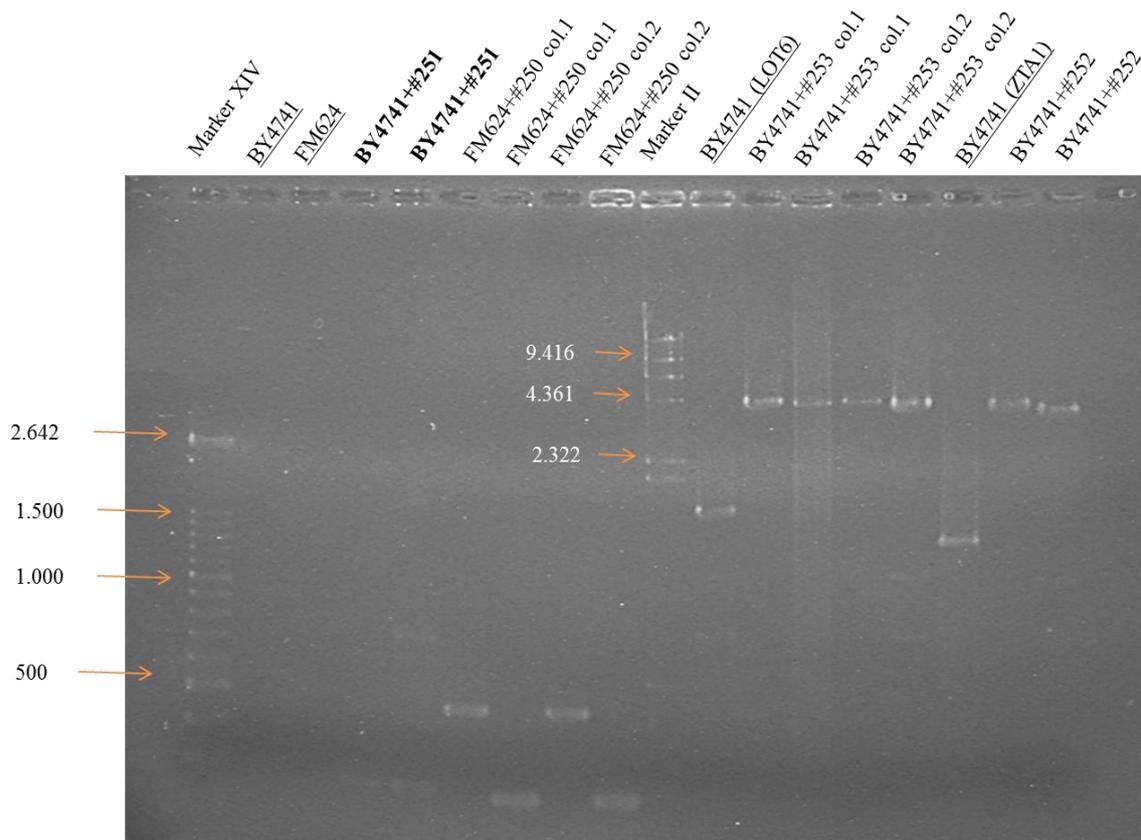


Figura 13. Gel de electroforesis de comprobación de algunas de las cepas transformadas con éxito, encontramos en letra más oscura la cepa que no es transformante positiva, y subrayado las que usamos como control de PCR. Se hicieron dos PCR para todas las colonias de posibles transformantes, las primeras se comprobaron con los *primers Forward 1* y los segundos con los *primers Forward* para confirmar que efectivamente el producto de transformación se hubiera ubicado en los genes de interés y no en otro sitio del genoma.

Existieron ciertos problemas a la hora de llevar a cabo con éxito algunas transformaciones, y aparecieron muchos casos de colonias que resultaron falsos positivos. A pesar de todo se consiguió llevar a cabo varias transformaciones con éxito sobre las inicialmente programas (**Tabla 3**).

Cepa original	Genotipo final	Fenotipo directo	Cepa transformada
BY4741	GAL-LOT6	Nat+	
BY4741	GAL-ZTA1	Nat+	
BY4741	GAL-yeGFP-LOT6	Nat+	
BY4741	GAL-yeGFP-ZTA1	Nat+	
BY4741	LOT6-yeGFP	Hyg+	FM2108;2109
BY4741	ZTA1-yeGFP	Hyg+	FM2110
FM773	GAL-LOT6 rho-	Nat+	
FM773	GAL-ZTA1 rho-	Nat+	
FM773	GAL-yeGFP-LOT6 rho-	Nat+	
FM773	GAL-yeGFP-ZTA1 rho-	Nat+	
FM773	LOT6-yeGFP rho-	Hyg+	
FM773	ZTA1-yeGFP rho-	Hyg+	
FM624	Δlot6 GAL-ZTA1	Nat+	FM2111;2112
FM624	Δlot6 GAL-yeGFP-ZTA1	Nat+	FM2107
FM624	Δlot6 ZTA1-yeGFP	Hyg+	
FM660	Δzta1 GAL-LOT6	Nat+	
FM660	Δzta1 GAL-yeGFP-LOT6	Nat+	
FM660	Δzta1 LOT6-yeGFP	Hyg+	FM2119;2120
FM2077	Δlot6 GAL-ZTA1 rho-	Nat+	FM2121;2122;2123
FM2077	Δlot6 GAL-yeGFP-ZTA1 rho-	Nat+	FM2124;2125
FM2077	Δlot6 ZTA1-yeGFP rho-	Hyg+	
FM2078	Δzta1 GAL-LOT6 rho-	Nat+	
FM2078	Δzta1 GAL-yeGFP-LOT6 rho-	Nat+	
FM2078	Δzta1 LOT6-yeGFP rho-	Hyg+	FM2126

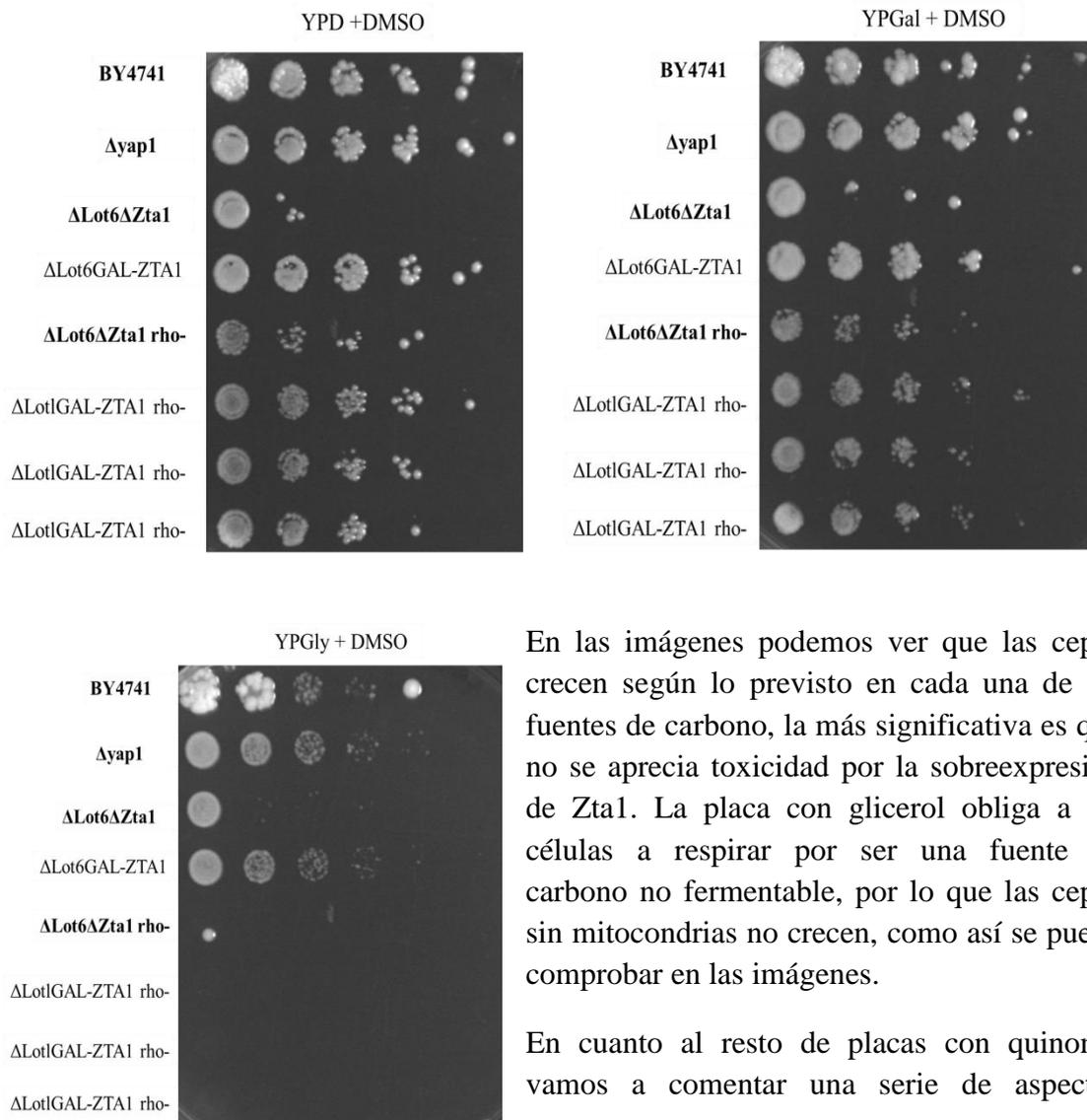
Tabla 3. En esta tabla se encuentran representadas todas las combinaciones de las cepas con las que trabajamos ya mencionadas anteriormente, junto con todos los productos de transformación creados también explicados ya. Aparecen los genotipos que deberían tener cada una de las nuevas cepas así como su marcador de resistencia a antibiótico, en letra más oscura se encuentran las cepas transformadas con éxito y el nombre de la nueva cepa en la columna final.

Un problema al que nos enfrentamos a menudo fue el de las contaminaciones de las placas de selección por bacterias, por lo que las colonias de posibles transformantes debían sembrarse y salvarse lo antes posible en un medio con el antibiótico marcador de resistencia y además antibiótico extra contra las bacterias, siendo estos últimos ampicilina, o penicilina-eritromicina.

Las transformaciones que no lograron llevarse a cabo con éxito suponemos que ha sido quizás por la dificultad que tienen las levaduras a la hora de integrar fragmentos de ADN de gran tamaño, o tiene alguna relación con las dificultades de las PCR para el gen *LOT6*, ya que fue este el que resultó más difícil de modificar.

4.2 Ensayo en placas de sensibilidad y resistencia a quinonas

En este ensayo se esperaba que si alguna de las proteínas estudiadas fuera una NQOR, su sobreexpresión otorgara mayor resistencia a la MD, induciendo a su vez más muerte celular frente a β -lap debido a la mayor acumulación de ROS y pérdida de poder reductor llevado a cabo por el ciclo fútil de la NQOR para esta última. Las tres primeras placas eran un control de crecimiento en diferentes fuentes de carbono sin quinonas tóxicas para ver cómo se comportaba cada cepa, sobre todo por si la sobreexpresión de alguno de estos genes resultaba tóxico por sí solo. Las placas con glicerol eran controles para las cepas sin mitocondrias (**Fig.14**).



En las imágenes podemos ver que las cepas crecen según lo previsto en cada una de las fuentes de carbono, la más significativa es que no se aprecia toxicidad por la sobreexpresión de *Zta1*. La placa con glicerol obliga a las células a respirar por ser una fuente de carbono no fermentable, por lo que las cepas sin mitocondrias no crecen, como así se puede comprobar en las imágenes.

En cuanto al resto de placas con quinonas vamos a comentar una serie de aspectos

Figura 14. Imágenes tomadas a los 2 días de incubación de las placas a 30°C.

interesantes (**Fig.15**).

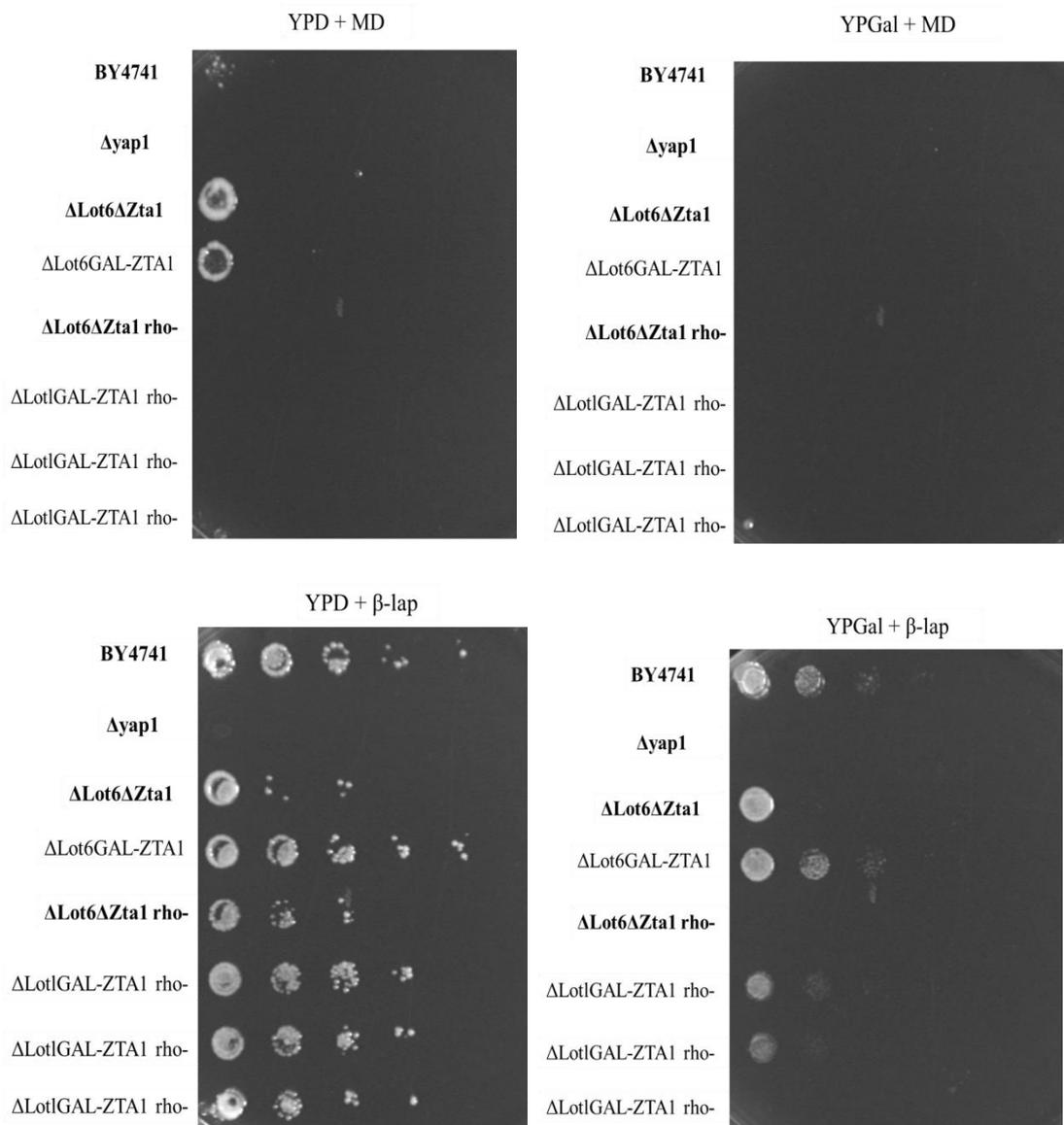


Figura 15. Imágenes tomadas a los 2 días de incubación de las placas a 30°C.

Visualmente lo primero que llama la atención es el muy limitado crecimiento en glucosa, o nulo en caso de galactosa, para las placas que contenían 100 μ M de MD. Aunque nuestra intención era incubar las cepas en una concentración tóxica de MD para el WT, de manera que pudiéramos detectar el efecto detoxificante de las posibles NQOs, la concentración ha resultado ser excesivamente tóxica y un ajuste más fino es necesario para sacar una conclusión en firme. Aun así, en YPD con MD hubo crecimiento de dos de las cepas: Δ lot6 Δ zta1, que es el doble mutante para los genes de interés de este trabajo, y Δ lot6 GAL-ZTA1 se espera que se comportase como el doble mutante, ya que la glucosa inhibe fuertemente el promotor de galactosa. En cambio en

la placa YPGal el crecimiento de las cepas fue nulo en presencia de MD. Lo esperado era que esto ocurriera en presencia de β -lap debido a la potenciación del segundo ciclo fútil, sin embargo vemos que la sobreexpresión de Zta1 en lugar de conferir resistencia a MD produce hipersensibilidad.

Las placas a las que se añadió β -lap presentan un crecimiento muy diferente a la MD. El primer hecho destacable es que la cepa $\Delta yap1$ que es hipersensible ante estrés oxidativo, no tiene crecimiento, al contrario que las otras cepas, lo que significa como se esperaba que se está produciendo ROS en presencia de β -lap. Sin embargo, la cepa $\Delta lot6$ GAL-ZTA1 no se comporta como esperábamos en galactosa: la sobreproducción de Zta1 le confiere a las levaduras igual o mayor resistencia a β -lap.

En general, con estos experimentos en placa encontramos que la posible sobreproducción de Zta1 da lugar a resultados contrarios a los anticipados, como si la MD se comportara como una quinona autooxidante en levaduras y la β -lap no. Más experimentos son necesarios para elucidar esta contradicción.

4.3 Experimento de “inducción-represión” para cepas GAL-yeGFP-(gen):

Se ha querido apreciar de manera visual la respuesta de la célula ante la sobreexpresión de la proteína Zta1. Este experimento fue por tanto realizado con la cepa FM2107 (Fig.16).

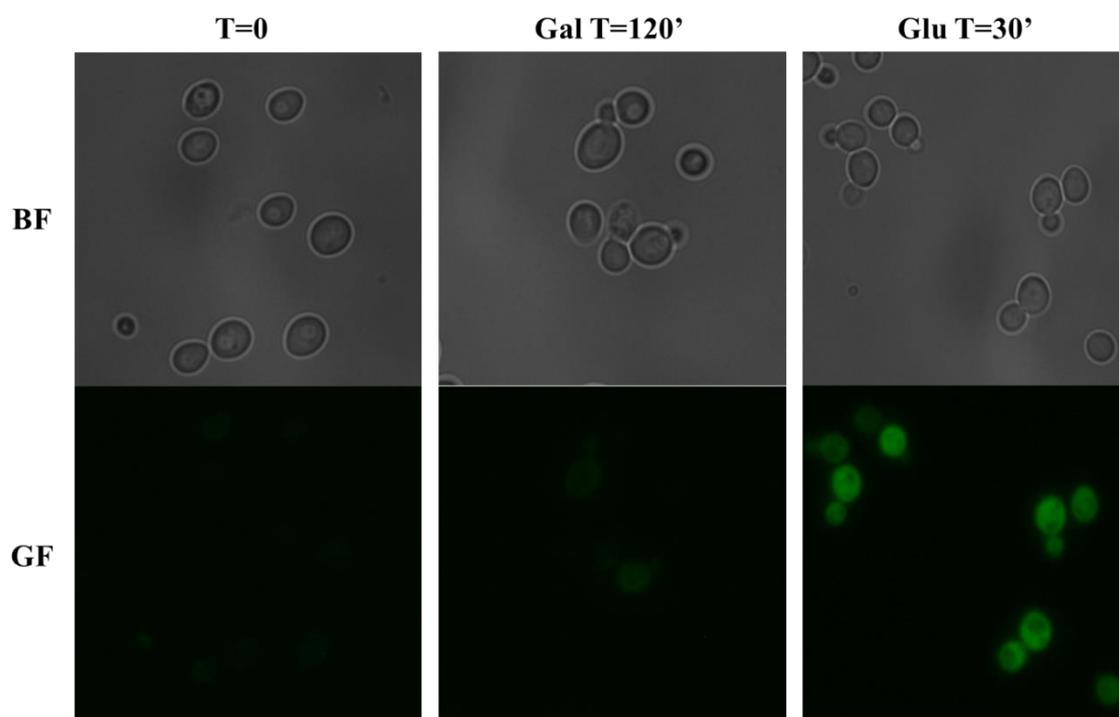


Figura 16. Fotografías tomadas de la cepa transformada FM2107 ($\Delta lot6$ GAL-yeGFP-ZTA1), en el T=0 sin añadir más fuente de carbono que la rafinosa del medio, a los 120' de añadir galactosa, y a los 30' de añadir glucosa.

Sorprendentemente en este experimento resultó salir también todo lo contrario a lo esperado. Como se ve en las imágenes no se aprecia fluorescencia ni en el tiempo 0 inicial, ni a los 120' de añadir galactosa, pero contra todo pronóstico al añadirle glucosa al medio para reprimir el promotor de la galactosa aparece a los 30' gran cantidad de fluorescencia en todas las células. Esto nos sugiere que, efectivamente, la galactosa actuaba sobre el promotor GAL asociado a ZTA1 provocando la transcripción del gen, pero de alguna manera el ARNm no llegaba a traducirse o, si lo hacía, no llegaba a plegarse y a ser funcional la proteína GFP-Zta1. Sin embargo y para nuestra sorpresa, al añadirle glucosa al medio la fluorescencia se disparaba en las células, llegando a apreciarse que la gran cantidad de Zta1 se distribuye por todo el citoplasma, excluyendo a las vacuolas y el núcleo celular. Esto puede ser debido a que la glucosa actúa de alguna manera en el proceso de traducción del ARNm, activándolo, o que al reprimir al promotor de la galactosa es cuando la proteína comienza a ser funcional ya que se inhibe la transcripción de la misma. Más experimentos son necesarios para entender este extraño fenómeno.

4.4 Experimento de exposición a quinonas con las cepas (gen)-yeGFP:

El objetivo de este último experimento ha sido intentar apreciar de manera visual la respuesta de los niveles endógenos de Lot6 y Zta1 ante las quinonas, y determinar el grado de respuesta para cada una de las quinonas estudiadas. Para ello usamos las cepas FM2109 y FM2110 donde visualizamos las proteínas Lot6-GFP y Zta1-GFP

respectivamente, usando como control la cepa BY4147 (WT) (Fig.17).

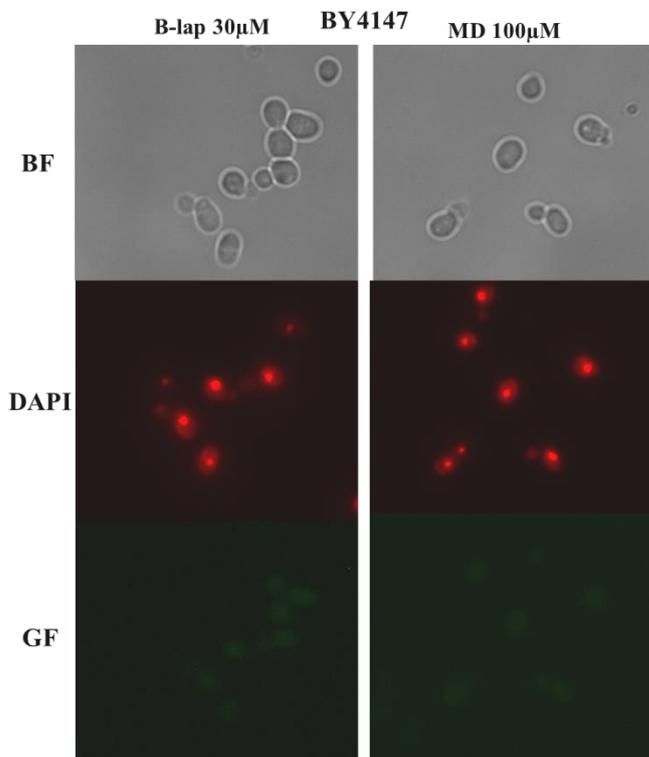


Figura 17. Imágenes tomadas al microscopio de la cepa WT expuesta a β -lap y MD.

En el control con la cepa salvaje salió el resultado esperado ya que no había sido tagueada con la GFP, vemos además que no existe autofluorescencia que pudiéramos confundir con los resultados positivos de las cepas tagueadas con la proteína verde.

En cuanto a las cepas con el *LOT6* y el *ZTA1* tagueados junto a GFP (Fig.18) los resultados indican que existe una mayor respuesta frente a la β -lap. Además podemos afirmar que Zta1-GFP tiene un mayor protagonismo a la hora de responder a β -lap ya que, no solo se aprecia visualmente mayor cantidad de células con fluorescencia, sino que además su

acción se podía ver a partir de los 30' desde la adición de la quinona, en cambio Lot6 fue visualizada a los 45', y en muchas células se aprecia una agregación citoplásmica. Por último cabe destacar que así como para β -lap, se observó también más actividad y en menor tiempo de Zta1 frente a la MD.

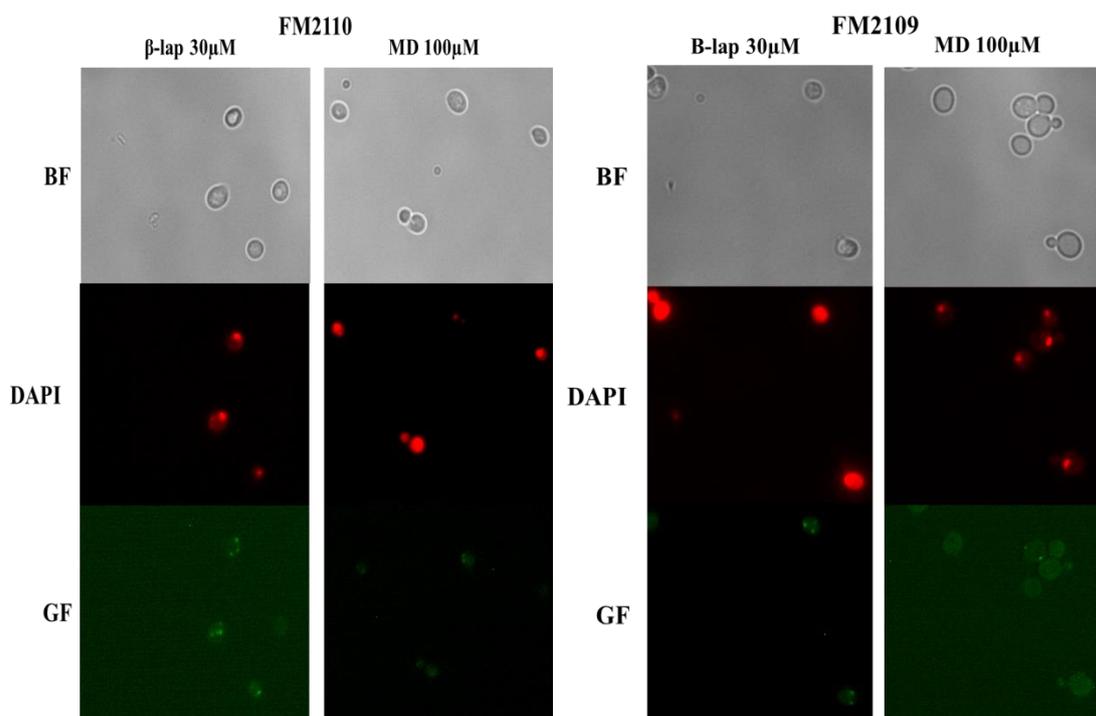


Figura 18. Imágenes tomadas al microscopio de fluorescencia de las cepas FM2110 y FM2109 donde vemos la respuesta de las proteínas Zta1 y Lot6 respectivamente ante la exposición a quinonas.

4.5 Anexo

Abreviaturas utilizadas en Materiales y Métodos:

- LiAc = Acetato de litio
- Tris-HCl = tris(hidroximetil)aminometano-HCl
- EDTA = ácido etilendiaminotetraacético
- TBE = Tris-borato-EDTA
- DMSO = dimetil sulfóxido
- dNTPs = desoxinucleótidos trifosfato
- PEG = polietilenglicol
- SDS = dodecilsulfato sódico

5. Conclusiones

- Se consiguió llevar a cabo con éxito la construcción de 8 nuevas cepas modificadas genéticamente, 7 de ellas para el gen *ZTA1* y la última para el gen *LOT6*.
- La sobreexpresión de Zta1 no es tóxica para las células, pero tampoco revertió o potenció la toxicidad de la beta-lapachona en presencia de mitocondrias.
- Parece ser que el crecimiento con galactosa induce la sobreexpresión del gen, sin embargo cuando se reprime la misma con glucosa es cuando se observa la proteína GFP-Zta1.
- La exposición de las células a las quinonas hace que niveles endógenos de Zta1-GFP se acumulen localmente dentro de la célula, más tras el tratamiento con β -lap que con MD.
- Lot6-GFP sigue un patrón similar a Zta1-GFP pero de forma menos definida.

Conclusions

- I carry out successfully the construction of of 8 yeast strains, 7 of them for the gene *ZTA1* and the last one for the gene *LOT6*.
- Overexpression of Zta1 is not toxic. In the presence of functional mitochondria, this overexpression cause neither resistance nor sensitivity to β -lap.
- Growth in galactose induces the overexpression of the *ZTA1* gene, nevertheless it is when the promoter is shut down with glucose that we see the overexpressed GFP-Zta1 in the cells.
- Under the presence of quinones endogenous levels of Zta1-GFP accumulate in foci, more evident when cells were treated with β -lap.
- Lot6-GFP behaves like Zta1-GFP with respect to quinones but less strongly.

6. Bibliografía

1. Ayra, J. 2015. Identification of two-electron quinone reductases genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo Fin de Grado en Biología; Universidad de La Laguna; España.
2. Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. y Monks, T.J. 2000. Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*. 13:135 – 160.
3. Cresteil, T. y Jaiswal, A.K. 1991. High levels of expression of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) gene in tumour cells compared to normal cells of the same origin. *Biochemical Pharmacology*. 42:1021 – 1027.
4. Janke C., Magiera M., Rahtfelder N., Taxis C., Reber S., Maekawa H., Moreno-Borchart A., Doenges G., Schwob E., Schiebel E. y Knob N. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 21: 947–962.
5. Klabunde, T., Eicken, C. y Sacchettini, J.C., Krebs B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*. 5:1084 – 1090
6. Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T. y Cho, A.K. 2012. The Chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 52:47 – 221.
7. Li, J.K., Ke, Y., Misra, H.P., Trush, M.A., Li, R., Zhu, H. y Jia, Z. 2014. Mechanistic studies of cancer cell mitochondria- and NQO1 -mediated redox activation of beta-lapachone, a potentially novel anticancer agent. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 281:285 – 293.
8. Masayo, I. y Shigeru, I. 1989. Electron transfer in spinach photosystem I reaction center containing benzo, naphtho- and anthraquinones in place of phyloquinone. *FEBS Letters*. 256:11 – 16.
9. O'Brien, P.J. 1991. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemical Biology*. 80:1 – 41.
10. Ough, M., Lewis, A., Bey, E.A., Gao, J., Ritchie, J.M., Bornmann, W., Boothman, D.A., Oberley, L.W. y Cullen, J.J. 2005. Efficacy of β -Lapachone in Pancreatic Cancer Treatment. *Cancer Biology & Therapy*. 4: 95 – 102.
11. Ramos-Pérez, C., Lorenzo-Castrillejo, I., Quevedo, O., García-Luis, J., Matos-Perdomo, E., Medina-Coello, C., Estévez-Braun, A. y Machín, F. 2014. Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent β -lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. *Biochemical Pharmacology*. 92:206 – 219.
12. <http://global.britannica.com/science/quinone>

13. <http://www.yeastgenome.org/>