

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EFFECTO DEL ESTRÉS NUTRICIONAL EN CÉLULAS DE  
*Yarrowia lipolytica* EN AUSENCIA DE LOS GENES *GPA***

**POR**

**ALEJANDRA BRIONES RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**JULIO, 2021**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EFFECTO DEL ESTRÉS NUTRICIONAL EN CÉLULAS DE**  
***Yarrowia lipolytica* EN AUSENCIA DE LOS GENES *GPA***

**POR**

**ALEJANDRA BRIONES RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**JULIO, 2021**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**

**EFFECTO DEL ESTRÉS NUTRICIONAL EN CÉLULAS DE  
*Yarrowia lipolytica* EN AUSENCIA DE LOS GENES *GPA***

**POR**

**ALEJANDRA BRIONES RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**JULIO, 2021**

<b>Tabla de contenido</b>	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN .....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	viii
2. ANTECEDENTES .....	1
2.1 Relevancia de las vías de señalización y el sensado de nutrientes en organismos eucariotas .....	1
2.3 Receptores acoplados a proteínas G (GPCR) .....	2
2.4 Mecanismo y función de la proteína G heterotrimérica .....	3
2.5 Subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica .....	4
2.6 Proteína G heterotrimérica en humanos .....	5
2.8 Función de los genes que codifican para la subunidad $G\alpha$ en microorganismos...7	7
2.9 <i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo de estudio .....	8
2.10 Mutante <i>gpa1-Δ</i> de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	9
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
4.JUSTIFICACIÓN .....	11
5. HIPÓTESIS .....	13
6.OBJETIVOS .....	13
6.1 Objetivo general .....	13
6.2 Objetivos específicos.....	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
7.1 Material biológico .....	14
7.2 Métodos .....	14
7.2.1 Diseño del estudio.....	14
7.2.2 Estrategia de trabajo .....	15
7.3 Propagación de las células y obtención de los plásmidos.....	16
7.4 Extracción del ADN plasmídico.....	16
7.4.1 Obtención del cassette de disrupción <i>GPA2+ LEU</i> por PCR.....	17
7.4.2 Electroforesis en geles de agarosa.....	18
7.4.3 Recuperación del ADN a partir de los geles de agarosa por medio de extracción orgánica.....	19
7.5 Generación de las mutantes de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	19
7.5.1 Células competentes de <i>Y. lipolytica</i> .....	19
7.5.2 Transformación de células litio-competentes de <i>Y. lipolytica</i> por choque térmico.....	20

7.5.3 Selección de las putativas dobles mutantes .....	21
7.6 Genotipificación de las células transformadas de <i>Y. lipolytica</i> .....	21
7.6.1 Diseño de oligonucleótidos para el análisis genotípico .....	22
7.6.2 Reacción de PCR con oligonucleótidos específicos.....	23
7.6.3 Identificación del cassette de disrupción <i>GPA2+LEU</i> por digestión enzimática. .....	24
7.7 Análisis fenotípico de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> .....	25
7.7.1 Crecimiento y morfología celular en medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa .....	25
7.7.2 Comparación del crecimiento celular de las cepas de <i>Y. lipolytica</i> en diferentes condiciones nutricionales .....	25
7.8 Análisis estadístico .....	26
8. RESULTADOS .....	27
8.1 Selección y crecimiento de las células transformadas de <i>Y. lipolytica</i> .....	27
8.2 Análisis genotípico.....	28
8.2.1 Identificación del cassette de disrupción en las posibles dobles mutantes <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i> .....	28
8.2.2 Comprobación de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> por digestión con enzimas de restricción. ....	30
8.3 Análisis fenotípico de la doble mutante.....	32
8.3.1 Morfología de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> en medio limitado en nutrientes .....	32
8.3.2 Morfología de la cepa <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> , en medio rico en nutrientes.....	33
8.3.3 Morfología colonial de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> , en medio YNB.....	34
8.4 Curva de crecimiento de la cepa <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> .....	36
8.5 Análisis del crecimiento de la cepa P01a y la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> por peso seco.....	37
9. DISCUSIÓN .....	42
9.1 Comparación de la morfología en medio mínimo YNB .....	43
9.3 Determinación del crecimiento de las cepas de <i>Y. lipolytica</i> por OD y por peso seco. ....	45
9.4 Análisis del Crecimiento de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> en medio mínimo YNB .....	46
9.5 Crecimiento de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> en medio rico en nutrientes ....	48
10. CONCLUSIONES .....	50
11. BIBLIOGRAFÍA.....	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Componentes de la PCR	17
2	Condiciones para la reacción de PCR	17
3	Componentes y cantidades utilizados para la preparación de medio selectivo YNB	21
4	Oligonucleótidos específicos utilizados en el análisis genotípico	23
5	Reacción convencional de PCR My Taq polimerasa	24
6	Condiciones para una PCR convencional con My Taq polimerasa	24
7	Componentes para la reacción de digestión enzimática	25
8	Características morfológicas de las colonias de las cepas P01a y <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	34
9	Comparación del crecimiento de las cepas P01a y <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> en medio mínimo YNB adicionado con diferentes concentraciones de glucosa	37
10	Comparación del crecimiento celular (peso seco) entre las cepas doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> y P01a cultivadas en medio YNB con diferentes concentraciones de glucosa	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proteína G heterotrimérica	3
2	Ejemplo de la participación de la proteína G en la homeostasis de glucosa	6
3	Estrategia general de trabajo	15
4	Crecimiento de las posibles dobles mutantes <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> en medio selectivo YNB.	27
5	Presencia o ausencia del cassette <i>GPA2+LEU2</i> en las transformantes de <i>Y. lipolytica</i>	29
6	Identificación de la orientación del cassette <i>GPA2+LEU2</i> en las putativas mutantes <i>Y. lipolytica</i> .	30
7	Comprobación de la inserción del cassette en el genoma de la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> .	31
8	Comparación de la morfología celular entre las cepas P01a y doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i> .	32
9	Comparación de la morfología celular entre la cepa P01a y doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio YPD y YNB	33
10	Análisis de las colonias correspondientes a la doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i>	35
11	Crecimiento de la <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> y P01a en medio (YNB) adicionado o no con diferentes concentraciones de glucosa	36
12	Comparación del crecimiento de las cepas P01a y doble mutante <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i> , en medio YNB adicionado con glucosa	38

13	Comparación del crecimiento de la cepa P01a y <i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> de <i>Y. lipolytica</i> con diferentes concentraciones de glucosa	40
14	Comparación del crecimiento de la cepa control y la doble mutante en medio YNB y YPD	41



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
AMPc	Adenin mono fosfato cíclico
D	Delección del gen
OD <sub>600</sub>	Densidad Óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Horas
LEU2	Leucina (gen)
YNB	Medio de cultivo con requerimientos mínimos (yeast nitrogen base)
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
YPD	Medio de cultivo rico en nutrientes (yeast extract peptone dextrose)
TA	Temperatura ambiente
T <sub>m</sub>	Temperatura de alineamiento (melting temperature)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
<i>GPA1</i>	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica gen 1
<i>GPA2</i>	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica gen 2
Uv	Ultravioleta
URA3	Uracilo (gen)
Rpm	Revoluciones por minuto

## RESUMEN

La subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica participa en la activación de la Proteína Kinasa dependiente de AMPc (PKA); esta proteína está implicada en diferentes procesos biológicos como crecimiento, proliferación y sensado de nutrientes. La vía PKA -y sus componentes- están conservados en distintos organismos eucariotas, desde los hongos hasta los humanos.

En la levadura *Yarrowia lipolytica* se han identificado los genes *GPA1* y *GPA2* que codifican para la subunidad  $G\alpha$ . Las células mutantes generadas a partir de la delección del gen *GPA1* no mostraron cambios tanto en la morfología como en el crecimiento al utilizar diferentes concentraciones de glucosa ni al cambiar la fuente de carbono (por glicerol); lo que sugiere que posiblemente la delección de ambos genes *GPA* afecte el sensado de nutrientes en *Y. lipolytica*. En el presente estudio se generó una doble mutante carente de los genes *GPA1* y *GPA2* de *Y. lipolytica*; partiendo de cassettes de disrupción previamente clonados en el plásmido pCR TOPO4 y *E. coli* (Huerta, 2014). Los cassettes se amplificaron por PCR y los productos se purificaron a partir de geles de agarosa. En paralelo, células de *Y. lipolytica* (*gpa1-Δ*) fueron tratadas con acetato de litio y se usaron para la transformación por choque térmico (37°C, 10 min). Las células ya transformadas se cultivaron en placas de Petri con medio selectivo YNB (sin adición de leucina o uracilo), se incubaron a 28°C por 6 días. Se seleccionaron las colonias aisladas, las cuales fueron cultivadas en medio YNB líquido para realizar el análisis genotípico (por PCR y por digestión enzimática) y se identificó una doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*). En el análisis fenotípico se observó que la morfología de las células correspondientes a la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* al cultivarla en medio rico en nutrientes (YPD) permaneció en forma de levadura, de manera similar que la cepa control, pero al cultivarla en medio mínimo YNB adicionado con glucosa (1, 2 ó 4%) dicha morfología era predominantemente en forma de hifa. Para comparar el crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, con respecto a la cepa parental, se realizó un análisis cuantitativo cuyos resultados indican que la mutante no creció en medio sin glucosa, por el contrario al cultivarla en presencia de glucosa el crecimiento de la mutante fue mayor, con respecto a lo observado en la cepa parental. Los resultados indican que en las células carentes

de los genes *GPA* está alterada tanto su capacidad dimorfica como su velocidad de crecimiento, cuando son sometidas a condiciones de estrés nutricional.

## 1. INTRODUCCIÓN

El entorno extracelular de los organismos eucariotas está compuesto por moléculas informativas como hormonas, esteroides, neurotransmisores y nutrientes (Valdespino et al., 2015). Estas moléculas son detectadas y recibidas por receptores que se encuentran localizados en la membrana celular, cuya finalidad es transportar la información del exterior al interior de la célula (Lim, Mayer, & Pawson, 2015). Una proteína clave en este mecanismo es la Proteína Kinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual tiene un papel fundamental en diferentes procesos biológicos como adaptación, diferenciación, proliferación, crecimiento celular y el sensado de nutrientes. Uno de los nutrientes de suma importancia en este mecanismo, es la glucosa, la cual estimula los receptores acoplados a proteínas G y mediante la acción de la subunidad  $G\alpha$ , se activa la vía PKA y la síntesis de AMPc. Entre los organismos eucariotas que utilizan este mecanismo, se encuentran las levaduras, quienes a través de la subunidad  $G\alpha$  pueden sensar glucosa; en las levaduras pueden existir hasta tres genes que codifican para esta subunidad. De manera particular, en el hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica* se han identificado dos genes: *GPA1* y *GPA2*; estos genes comprometen el crecimiento de la célula, por lo que es de interés conocer si la delección de ambos genes impacta de manera directa en el sensado de nutrientes y en el crecimiento de la levadura.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Relevancia de las vías de señalización y el sensado de nutrientes en organismos eucariotas**

Todos los organismos celulares tienen la capacidad de detectar la presencia o la ausencia de nutrientes necesarios para generar energía. La disponibilidad de los nutrientes influye de manera directa en las decisiones de la célula, creando un vínculo poco comprendido entre el metabolismo celular, los mecanismos de señalización y la transcripción de genes. Tanto en levaduras como en los mamíferos, se han identificado vías de señalización conservadas que participan en diferentes procesos biológicos. La función de estas vías depende de las condiciones y necesidades en las que se encuentre la célula; por ejemplo, los organismos unicelulares tienen la capacidad de disponer de los nutrientes que se encuentran en el ambiente de manera directa a través del sensado de éstos, mientras que en los organismos multicelulares el acceso a los nutrientes es mediante el torrente sanguíneo (Chantranupong, Wolfsonet y Sabatini, 2015; Krejčí, 2012; Wellen y Thompson, 2010).

Las levaduras utilizan un sistema de sensado de la glucosa extracelular regulado por el receptor acoplado a la proteína G (GPCR), a través de la vía AMPc-PKA, cuya respuesta es la tolerancia al estrés, mecanismo de adaptación, estimulación a la fermentación y proliferación celular. Cabe destacar que otros nutrientes esenciales activan la vía PKA y son esenciales para el crecimiento de la levadura por lo tanto la enzima adenilato ciclasa de la levadura es controlada por dos proteínas G (proteína G y Ras), cada una participa en la detección de la glucosa (Conrad et al., 2014).

### **2.2 La vía de la Proteína Kinasa dependiente de AMPc (PKA)**

Las proteínas quinasas son enzimas que participan en la regulación de diferentes procesos biológicos, como la actividad de las proteínas a nivel postraduccional, media la proliferación, la diferenciación, el metabolismo, la migración y la supervivencia celular. Una falla en la transducción de señales puede ocasionar apoptosis, descontrol del ciclo celular, angiogénesis y puede desarrollar fenotipos malignos, puesto que las proteínas quinasas son reguladoras clave en el origen de procesos patológicos (Ortiz, 2009).

La subunidad  $G\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas activa a la enzima adenilato ciclasa para la síntesis de AMPc, la cual amplifica una señal a través del citoplasma que se une a la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). PKA es una molécula heterotetramérica, compuesta por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) (Murray et al., 2013). La PKA regula diferentes procesos biológicos, como la actividad de las proteínas a nivel postraduccional, media la proliferación, la diferenciación, la migración, la supervivencia celular, y activa procesos metabólicos como gluconeogénesis, glucogenólisis y lipólisis (Weinstein, 2014). Estos procesos se llevan a cabo a través de la transferencia de grupos fosfato del ATP a una serina o una treonina de una proteína diana; el AMPc se encarga de disociar las dos subunidades reguladoras de las catalíticas, una vez que estas últimas (C) están libres pueden catalizar la fosforilación de varias proteínas diana (Becker et al., 2006).

### **2.3 Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)**

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR, G-protein-coupled receptors), se caracterizan por ubicarse en la superficie de las células y están involucrados en procesos de recepción de señales extracelulares e intracelulares (glucagón, catecolaminas, hormona estimulante de tiroides (TSH) y endocannabinoides). Estas señales son enviadas hacia las proteínas G. Pertenecen a la familia más grande de receptores, se caracterizan por tener siete dominios o hélices transmembranales; tienen un segmento N-terminal que se encarga de interactuar con los ligandos y el extremo C-terminal, localizado en la parte intracelular. En organismos superiores los GPCR se expresan en hígado, riñón, o en menor proporción en corazón, páncreas, retina, adipocito, cerebro y tracto gastrointestinal y se caracterizan por su participación en procesos fisiológicos como presión arterial, actividad cardíaca, neurotransmisión, lesión tisular, metabolismo lipídico, recepción sensorial y regulación de las funciones de las glándulas endócrinas y exocrinas (Campos, 2012; Heldin, Lu, Evans y Gutkind, 2016; Lima Martínez, Betancourt y Bermúdez, 2011; Mckee y Mckee, 2014).

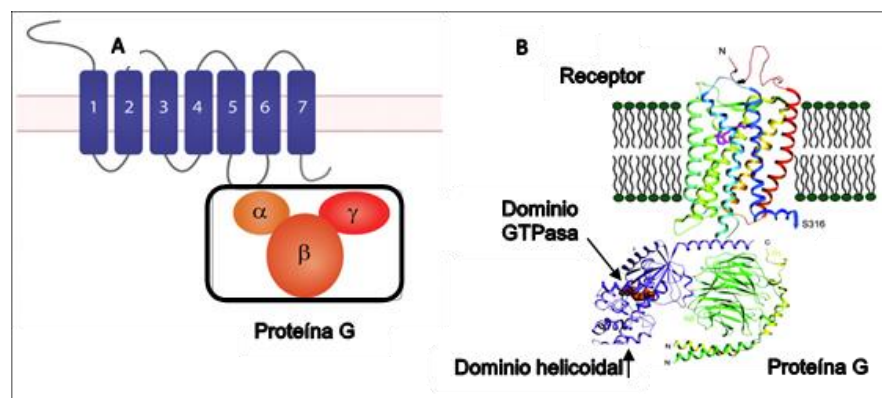
Los GPCR juegan un papel muy importante como proteínas de señalización, debido a que su función es detectar estímulos extracelulares para transmitirlos hacia el interior de la célula, principalmente participan como intermediarios en muchos procesos

moleculares como desarrollo, proliferación y diferenciación celular. La señalización inicia con la detección de un agonista (ligando), que al unirse con al GPCR causa un cambio conformacional y activa a la proteína G, la cual intercambia nucleótidos de guanina (GDP/GTP) y provoca la liberación de la subunidad alpha ( $\alpha$ ) de la proteína G, a continuación la  $G\alpha$  se desplaza a la superficie citoplásmica de la membrana para activar una enzima generadora de un segundo mensajero (Liu, Wong y IJzerman, 2016; Mckee y Mckee, 2014).

## 2.4 Mecanismo y función de la proteína G heterotrimérica

Las proteínas G heterotriméricas desempeñan un papel importante en la transducción de señales, también son esenciales para la unión de muchos receptores de la superficie celular a proteínas efectoras en la membrana plasmática (Helper y Gilman, 1992).

Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por tres monómeros diferentes:  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ ) (figura 1) (Helper y Gilman, 1992). En su forma inactiva, la subunidad  $G\alpha$  está unida a GDP y se encuentra estrechamente unida a las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  que se encuentran formando un dímero ( $G\beta\gamma$ ) (Latek, Modzelewska, Trzaskowski, Palczewski, y Filipek, 2012). El mecanismo de activación de la proteína G heterotrimérica involucra su separación de las subunidades  $G\alpha$  y el dímero  $G\beta\gamma$  en respuesta a una señal extracelular (Oldham y Hamm, 2008).



**Figura 1. Proteína G heterotrimérica.** A) Estructura de la proteína G: subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  2) Dominios GTPasa y helicoidal de la subunidad  $\alpha$ . Adaptado de Cabrera-Vera et al, 2003.

La unión de un ligando se une a la proteína GPCR y ocasiona un cambio en la estructura de la proteína que genera la activación de la señal, promoviendo el intercambio de una molécula de GDP por una molécula de GTP (fosforilación) dentro del sitio activo de la subunidad  $G\alpha$  (la subunidad  $\alpha$  tiene actividad GTPasa intrínseca, lo que permite la hidrólisis de GTP (forma activa) a GDP (forma inactiva). La unión de GTP provoca la disociación del complejo heterotrimérico y tanto la subunidad  $G\alpha$  unida a GTP como el dímero  $G\beta\gamma$  liberados, son capaces de interactuar con efectores intracelulares o de membrana. Después, tanto la subunidad  $G\alpha$  (liberada) como el dímero  $G\beta\gamma$  se unen a otras proteínas con la finalidad de propagar diferentes señales (Hamm, 1998). Una vez terminada su función en la propagación de señales y activación de procesos específicos, la subunidad  $G\alpha$  y el dímero  $G\beta\gamma$  se asocian nuevamente (Rasmussen et al., 2011).

## **2.5 Subunidad $\alpha$ de la proteína G heterotrimérica**

En los mamíferos, la subunidad  $G\alpha$  se puede clasificar en cuatro subfamilias con respecto a su funcionalidad;  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12}$  (Gautam, Downes, Yan y Kisselev, 1998).

En la familia de  $G\alpha_s$  hay dos miembros:  $G\alpha_s$  (s, significa estimulación) se expresa en la mayoría de las células y  $G\alpha_{olf}$  (olf, significa olfato) se expresa en las neuronas sensoriales olfativas. La familia de las  $G\alpha_i$  (i, significa inhibición) es la más grande y diversa incluyendo  $G\alpha_{i1}$  -la cual se ha detectado en la mayoría de los diferentes tipos celulares- así como las  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_{i4}$ ,  $G\alpha_o$ , las que se expresan mayoritariamente en las neuronas. En humanos, los miembros de las familias  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{11}$  se expresan al mismo tiempo en todos los órganos; uno de sus miembros ( $G\alpha_{14}$ ) se encuentra principalmente en riñón, pulmón e hígado mientras que  $G\alpha_{16}$  se expresa específicamente en células hematopoyéticas. Los miembros de la familia  $G\alpha_{12}$  se expresan también en la mayoría de los tipos de células (Syrovatkina, Alegre, Dey y Huang, 2017) .

La subunidad  $G\alpha$  contienen dos dominios: un dominio de GTPasa, el cual participa en la unión e hidrólisis de GTP y un dominio helicoidal que coloca el GTP dentro del

núcleo de la proteína, éste último desempeña un papel importante en la especificidad del acoplamiento y la actividad de la proteína G (Cabrera-Vera et al., 2003; Montes, Restrepo y McEwen, 2003).

En los humanos existen 21 genes  $G\alpha$ ; algunas de las funciones de las subunidades  $G\alpha$  son las siguientes: la subunidad  $\alpha_i$  estimula los canales de  $K^+$  pero inhiben los canales de  $Ca^{2+}$ , mientras que la subunidad  $\alpha_s$  funciona de manera contraria al estimular los canales de  $Ca^{2+}$  pero inhibiendo los de  $K^+$  (Murray et al., 2013).

## **2.6 Proteína G heterotrimérica en humanos**

En mamíferos la homeostasis de glucosa es controlada por el balance entre la acción de la insulina y el glucagón. La insulina, secretada por la células- $\beta$  del páncreas en los islotes de Langerhans, favorece la disminución de los niveles de glucosa sanguínea, mientras que el glucagón, secretado por las células- $\alpha$  presentes en la periferia de los islotes de Langerhans, tiene el efecto contrario, es decir aumentan tales niveles. La insulina actúa por medio del receptor tirosina quinasa, mientras que el glucagón a través del receptor de glucagón (GCGR), un miembro de la familia de las GPCRs. La presencia de glucagón promueve tanto la glucogenólisis como la gluconeogénesis hepática (Bray, Nielsen, y Popkin, 2004). El proceso inicia cuando el receptor GCGR se acopla y estimula a la proteína G heterotrimérica, dando lugar al aumento de los niveles de AMP cíclico intracelular (AMPC), cuya función es actuar como 2° mensajero, activando a la PKA. Esta vía promueve la degradación del glucógeno en glu-1-fosfato que luego se desfosforila por la glucosa-6-fosfatasa a glucosa en el retículo endoplásmico (RE); después, la glucosa será transportada del RE al citoplasma por los transportadores de glucosa localizados en el RE (figura 2) (Hilário-Souza et al., 2016).



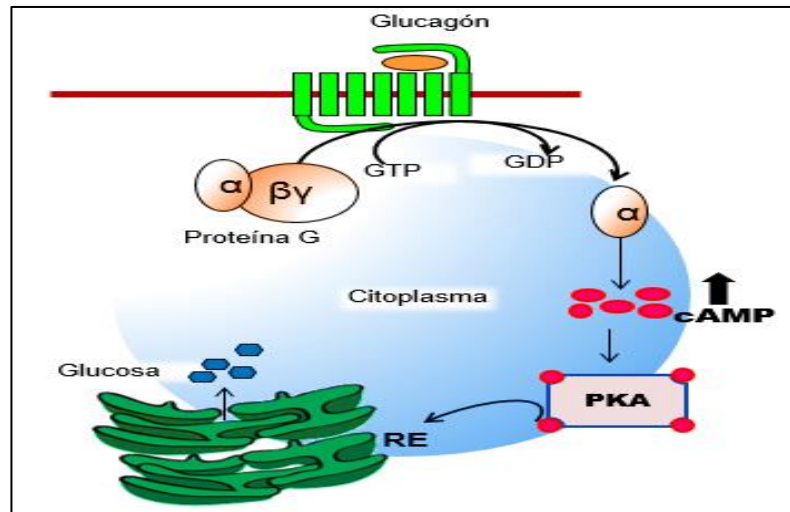


Figura 2. Ejemplo de la participación de la proteína G en la homeostasis de glucosa. Adaptado de Hilário-Souza et al, 2016.

## 2.7 Patologías asociadas a la vía PKA

Las variaciones en la vía PKA están relacionadas con la expresión de genes responsables de codificar a estas proteínas que integran la vía. Tales variaciones se manifiestan en cambios fisiológicos que pueden modificar algunas propiedades de las células, por ejemplo, durante la maduración y envejecimiento celular o en procesos patológicos (Caretta y Mucignat-Caretta, 2011).

En la regulación transcripcional de la adipogénesis, participa la familia de señalización de kinasas AGC (proteína kinasa A (PKA), PKG, PKC), y se ha demostrado que las interacciones entre las proteínas kinasas y las fosfoproteínas juegan un papel importante en el desarrollo de la obesidad (Engin, 2017). La obesidad tiene efectos pro y anti-inflamatorios generados por las adipocinas y citoquinas a través de vías de señalización intracelular, que involucran factores nucleares como Kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) y los sistemas de cinasas N- terminal (JKN) (Engin, 2017). Un mal funcionamiento de la vía de señalización PKA puede ocasionar la formación de tumores en diferentes tejidos endócrinos (tejidos sensibles a hormonas), principalmente en la hipófisis, la corteza suprarrenal y la tiroides; así como síndromes hereditarios y mutaciones somáticas en el gen GNAS1 (codifica para la subunidad  $G\alpha$ ) (Ronchi, 2019; Sapio et al., 2014). En otro estudio, Prieto y cols. (2005) identificaron que la funcionalidad de las subunidades  $G\alpha_s$  (estimula la actividad del adenilato ciclasa) y  $G\alpha_i$  (inhibe la

actividad del adenilato ciclasa) (componentes de la proteína G Heterotrimérica) estaba modificada en pacientes con adenocarcinoma prostático.

## **2.8 Función de los genes que codifican para la subunidad $G\alpha$ en microorganismos**

En las levaduras (eucariotas inferiores en la escala evolutiva) se ha reportado que la activación de la adenilato ciclasa (responsable de la síntesis de AMPc) está controlada por dos sistemas distintos de la proteína G: Ras 1, 2 y Gpa2 (homólogo a la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G herotrimérica), y se ha propuesto que en estos organismos, las proteínas G están involucradas en el proceso de sensado de glucosa tanto intracelular como extracelular. Se ha descrito que estos organismos detectan glucosa extracelular a través de los GPCRs y activan a la proteína Ras para la estimulación de la adenilato ciclasa y la señalización a través de la vía PKA (Peeters y Thevelein, 2014). En *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, se ha reportado que las proteínas G son esenciales para detectar glucosa y feromonas presentes en el entorno extracelular. De manera similar a lo descrito en los humanos, en la activación del adenilato ciclasa participan un receptor transmembrana que activa a la proteína G y ello conlleva a la activación de vías de señalización como PKA o la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). En *S. pombe* se han identificado dos genes *GPA1* y *GPA2* que codifican para la subunidad  $\alpha$  de la proteína G (P. Wang y Heitman, 1999); las proteínas codificadas por estos genes participando en la transducción de señales generadas por feromonas y nutrientes (glucosa) (Shpakov, 2013). En *S. cerevisiae*, hay dos genes que codifican para  $G\alpha$ : *GPA1*, que participa en la detección de feromonas y *GPA2* que está implicado en la detección de nutrientes durante el crecimiento filamentoso (Wang y Heitman, 1999).

En un estudio realizado por Yu y cols. (2008) utilizando como modelo de estudio al hongo patógeno *Gibberella zeae*, se identificaron tres genes que codifican para la subunidad  $G\alpha$  (*GPA1*, *GPA2* y *GPA3*). Las cepas mutantes de *G. zeae* carentes del gen *GPA1* y *GPA3* no se vieron afectados en su patogenicidad; la delección del gen *GPA2* afectó ligeramente el crecimiento de las células; la mutante carente del gen

GPA1 ( $\Delta GzGPA1$ ) no mostró cambios significativos en el crecimiento vegetativo o la esporulación asexual.

## **2.9 *Yarrowia lipolytica* como modelo de estudio**

Los organismos modelo, son aquellos organismos vivos con diversidad biológica, de importancia práctica y convenientes para realizar investigaciones de modo que los resultados obtenidos se pueden extrapolar a los humanos. Los organismos modelo son útiles para el descubrimiento de principios básicos de la biología al adquirir conocimientos aplicables en diferentes áreas como la medicina y la agricultura. En ocasiones los organismos modelo son empleados por su crecimiento acelerado como las bacterias (*E. coli*) o el uso de los ratones por su corto tiempo de gestación a diferencia de otros mamíferos (Clark, Pazdernik, y McGehee, 2018).

El hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*, también conocido como *Endomycopsis*, *Saccharomycopsis* y *Candida lipolytica*, se caracteriza por crecer tanto en forma de levadura como de micelio, dependiendo de las condiciones ambientales. *Y. lipolytica* es considerado como un organismo no patógeno o GRAS (Generalmente Reconocida como Segura) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Bremont, Hernández y Kessler, 2012; Cabrales, 2012; Gellissen et al., 2005; Richard, Kerrest, Lafontaine y Dujon, 2005). *Y. lipolytica* tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo que contienen diversas fuentes de carbono como: N-acetil-D-glucosamina, glucosa y alcoholes de azúcar (eritriol, D-manitol, D-glucitol y glicerol); sin embargo, su crecimiento varía al utilizar L-sorbosa, D-ribosa, ribitol y galactosa, y se ha descrito que al utilizar celobiosa y salicina como fuente de carbono, tiene una disminución -o nulo- crecimiento (Kurtzman et al., 2011). La temperatura óptima para el crecimiento de esta especie es de 28-34 °C, mostrando tiempos de duplicación cada 90 min (Cabrales, 2012). La morfología de las colonias de *Y. lipolytica* puede variar, algunas colonias son brillantes y otras opacas, se caracterizan por su forma elipsoidal o alargada formando hifas septadas (Harzevili, 2014).

Entre otras características de este organismo se conocen: su capacidad de degradar metales pesados, aceites, ácidos grasos e hidrocarburos alifáticos; secreción efectiva

de proteínas heterólogas y acumulación de ácidos orgánicos. Además, *Y. lipolytica*, tiene una elevada tasa de crecimiento, con requerimientos nutricionales mínimos y su manipulación en condiciones controladas es fácil. Estas facultades han permitido a *Y. lipolytica* destacar como un modelo de estudio en procesos biotecnológicos: síntesis de enzimas (fosfatasa, esterasas, lipasas y proteasas), tratamiento de aguas residuales y para estudios de dimorfismo. El genoma de *Y. lipolytica* está completamente secuenciado, su tamaño es de 20.5 Mb y está distribuido en 6 cromosomas con 6073 secuencias codificantes (Cabrales, 2012).

Todas estas características hacen de *Y. lipolytica* un modelo excelente de estudio, en biología molecular, ya que es un organismo eucariota de fácil manipulación (Mauersberger, Wang, Gaillardin, Barth, y Nicaud, 2001).

### **2.10 Mutante *gpa1-Δ* de *Yarrowia lipolytica***

En un trabajo previo realizado en el laboratorio de proteómica del CINSP, UANL; mediante el análisis del genoma de *Y. lipolytica*, se identificaron 2 genes que codifican para la proteína  $G\alpha$  (*GPA1* y *GPA2*) y en un esfuerzo para tratar de identificar la participación de la subunidad  $G\alpha$  en relación con el sensado de glucosa en esta especie, se generó la mutante de *Y. lipolytica* carente del gen *GPA1*. Como resultado del análisis fenotípico de esta mutante (*gpa1-Δ*) se observó que la eliminación del gen *GPA1* no afecta el crecimiento celular en diferentes concentraciones de glucosa (Huerta, 2014). El estudio posterior realizado por Briones (2017), mostró que el crecimiento de la cepa *gpa1-Δ* tampoco se vio afectado al utilizar el glicerol como fuente de carbono diferente a la glucosa. Estos resultados sugieren que la deleción de los genes *GPA* pueda ocasionar un cambio en las funciones biológicas de *Y. lipolytica*.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En células eucariotas la detección de nutrientes es mediada por los GPCRs, los cuales sufren un cambio conformacional en la región transmembrana del receptor, generando un intercambio de nucleótido de guanina (GDP/GTP), provocando con ello la activación de la proteína G heterotrimérica mediante la disociación de  $G\alpha$  del complejo  $G\beta\gamma$ . La subunidad  $G\alpha$  se desplaza por la superficie citoplásmica para activar a la enzima adenilato ciclasa, lo que estimula la síntesis de AMPc en el citosol y da inicio a una cascada de señalización conocida como vía PKA (Proteína Kinasa dependiente de AMPc). Dicha vía está implicada en diferentes procesos biológicos de la célula como crecimiento, diferenciación, proliferación y supervivencia.

En humanos existen 21 genes que codifican para  $G\alpha$ , cada uno de ellos tiene funciones específicas que intervienen en la activación de segundos mensajeros (AMPc), estos participan en la activación de diferentes procesos celulares como el metabolismo, la activación/inactivación de canales iónicos, expresión de genes, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular. Alteraciones en estos mecanismos de señalización pueden provocar daños en la salud de los individuos como la supresión del estado inmune que conlleva a un aumento en la susceptibilidad a contraer infecciones, cambios en el estado cognitivo, depresión, entre otros.

En eucariotas superiores, los mecanismos de sensado de nutrientes han evolucionado hasta alcanzar un elevado grado de especificidad de los componentes que participan en las diferentes vías de señalización; como consecuencia, el análisis de estos mecanismos representa una dificultad mayor y circunscribe el uso de organismos modelo. El hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica* se ha utilizado como organismo modelo para profundizar en el conocimiento de diferentes mecanismos biológicos. En esta especie se identificaron 2 genes (*GPA1* y *GPA2*) que codifican para  $G\alpha$ . Se ha descrito que la eliminación del gen *GPA1* (*gpa1-Δ*) no interfiere en el mecanismo de sensado de nutrientes (glucosa o glicerol), por lo que se especula que la eliminación de ambos genes (*GPA*) tenga un impacto tanto en procesos biológicos (morfología y crecimiento) como en el sensado de glucosa en *Y. lipolytica*.

## 4.JUSTIFICACIÓN

Las células eucariotas han diseñado mecanismos para detectar las moléculas que se encuentran en el entorno extracelular, por medio de receptores que están localizados en la superficie de la membrana conocidos como GPCRs, estos se caracterizan por estar acoplados a la proteína G (compuesta por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), cuya función es la transducción de señales mediante la activación de enzimas (adenilato ciclasa) y de segundos mensajeros (AMPc), que a su vez activan la vía PKA-AMPc. La vía PKA tiene un papel preponderante en el control de la homeostasis, el sensado de glucosa y el crecimiento y el desarrollo celular. En los mamíferos, el papel de los GPCR radica en la detección de hormonas, neurotransmisores, neuropéptidos, moléculas que estimulan el gusto y el olfato. Esta alta especificidad incrementa la dificultad de analizar estos mecanismos en organismos superiores y conlleva al uso de organismos modelo.

Las levaduras, por ser células eucariotas, se han utilizado como organismo modelo para el análisis de diferentes procesos biológicos como el crecimiento celular, vías metabólicas, producción de biocombustible, biorremediación y para la expresión de proteínas recombinantes, entre otros usos. Las levaduras utilizan un sistema de detección de glucosa mediado por los GPCRs a través de la vía PKA-AMPc, generando una respuesta a mecanismos de adaptación, estrés, fermentación y crecimiento.

Dada la importancia que la subunidad  $G\alpha$  tiene en el funcionamiento de la vía PKA y en la regulación de diferentes procesos celulares, en diferentes especies eucariotas se ha descrito la presencia de un número diferente de genes que codifican para esta proteína. Durante la evolución, las  $G\alpha$  han alcanzado diferentes grados de especialización entre las especies. En levaduras se han descrito diversos genes que codifican para proteínas  $G\alpha$ ; cada una de ellas con funciones específicas en procesos tales como crecimiento y diferenciación celular, apareamiento, sensado de nutrientes y patogenicidad.

Aunque los componentes moleculares que participan en esta vía se encuentran conservados en las diferentes especies, existen sutiles diferencias que hacen necesario el análisis del papel que las diferentes moléculas (genes y proteínas) tienen en estas vías, para profundizar en el conocimiento específico de la participación de dichos componentes.

En el hongo dimórfico *Y. lipolytica* no se ha demostrado plenamente cual es la participación de las proteínas  $G\alpha$  en la detección de nutrientes. Trabajos previos han demostrado que el gen *GPA1* de *Y. lipolytica* no está implicado en el sensado de nutrientes, pero se desconoce el efecto que tendrá la delección de los genes *GPA1* y *GPA2* en la morfología, crecimiento celular y en el sensado de nutrientes de *Y. lipolytica*. Los resultados obtenidos de este proyecto permitirán una mejor comprensión de los mecanismos de transducción de señales en respuesta a la presencia de nutrientes en el medio extracelular.

## 5. HIPÓTESIS

El estrés nutricional afecta la morfología y el crecimiento de las células de *Yarrowia lipolytica* en ausencia de los genes *GPA*.

## 6.OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Analizar el efecto del estrés nutricional en células mutantes de *Y. lipolytica* carentes de los genes *GPA*.

### 6.2 Objetivos específicos

- 1) Generar cepas mutantes de *Y. lipolytica*, por delección de los genes *GPA* (*GPA1* y *GPA2*).
- 2) Analizar el crecimiento y la diferenciación celular de la doble mutante de *Y. lipolytica*, en respuesta a diferentes condiciones nutricionales. .



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material biológico

#### **Cepas de *Yarrowia lipolytica***

Se utilizó la cepa P01a<sup>-Leu-Ura</sup> como control y para la generación de la doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) la cepa *gpa1-Δ*<sup>-Leu</sup> (carente del gen *GPA1*) de *Y. lipolytica*. Este proyecto se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

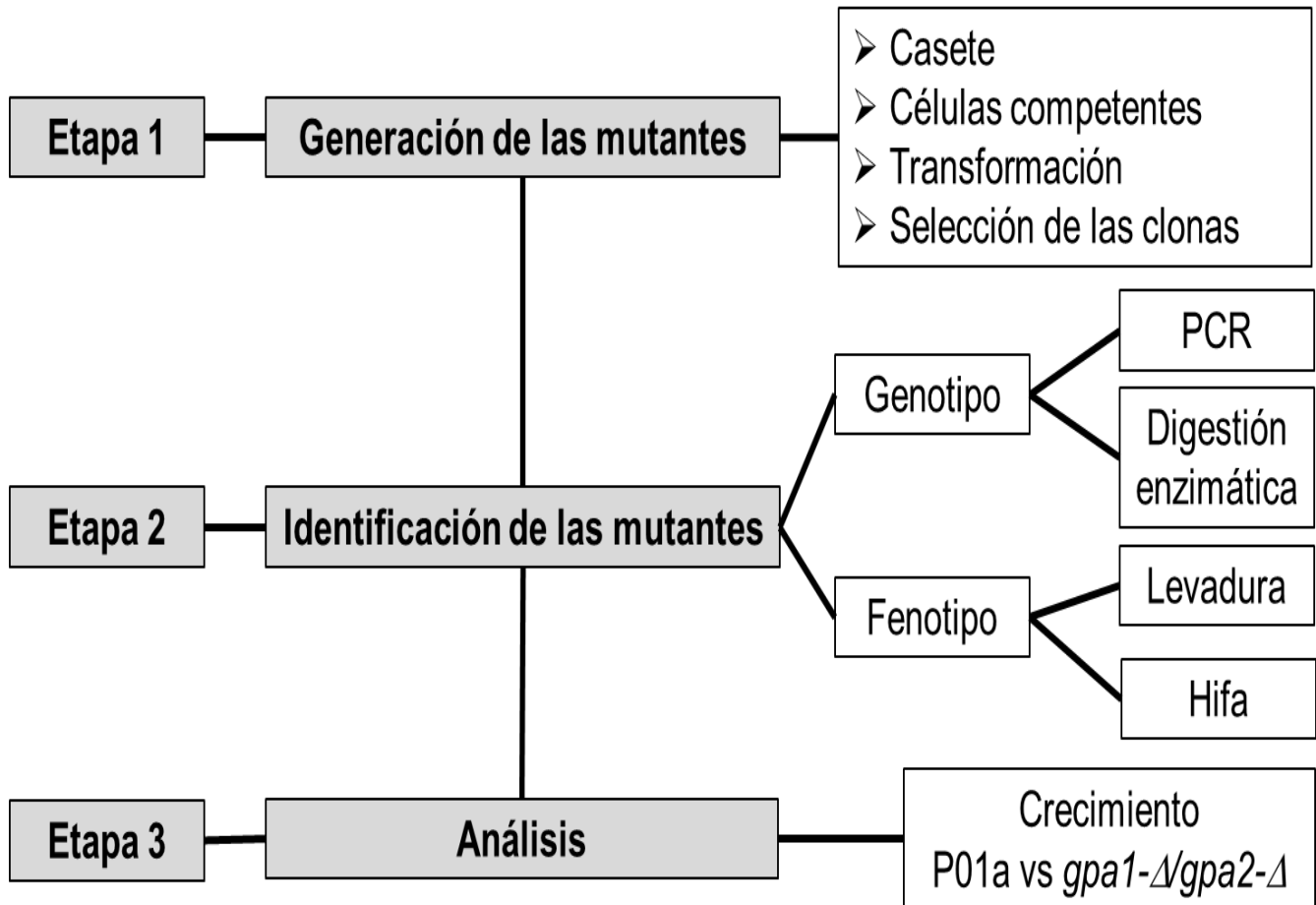
### 7.2 Métodos

#### 7.2.1 Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo experimental; se realizó de junio 2019 a diciembre 2020 en el CINSP (laboratorios de Proteómica, Genética y Biología Molecular y de Alimentos).

### 7.2.2 Estrategia de trabajo

En la figura 3 se muestra el esquema correspondiente a la estrategia general del trabajo que se desarrolló para cumplir con los objetivos planteados.



**Figura 3. Estrategia general de trabajo.** Cassettes: construcción genética *GPA2+LEU* ya clonado en Topo4 y *E. coli*. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. P01a: cepa control de *Y. lipolytica*. *GPA*: Gen codificante para la subunidad  $G\alpha$ .

### **7.3 Propagación de las células y obtención de los plásmidos**

El cassette de disrupción (*GPA2+LEU2*) se obtuvo a partir de células de *E. coli* ya clonadas en el plásmido pCR Topo 4 (Huerta, 2014), obtenidas del cepario del Laboratorio de Proteómica.

Las células de *E. coli* se reactivaron en placas con medio LB agar (3.7 g/mL de LB Broth agar Miller Powder) que contenía ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. A partir de estas placas, se inocularon 10 ml de medio LB líquido (2.5 g/mL de LB Broth Miller Powder) con ampicilina (100 µg/ml), en un tubo tipo Falcon (50 ml), bajo esterilidad (campana de flujo laminar: SG 403<sup>a</sup>, SterilGARD III Advance) y incubó a 37 °C/ 200 rpm/ 24 h (Modelo 1575, SL Shel Lab®) (Bertani, 1951).

### **7.4 Extracción del ADN plasmídico**

Para la extracción del ADNp (ADN plasmídico) se utilizaron las células previamente mencionadas. Se vertió 1.5 ml de cultivo celular en un tubo de polipropileno (Eppendorf) y se centrifugó durante 30 segundos a 12,000 rpm (microcentrífuga Eppendorf modelo 5415D), se recuperó el paquete celular y se le agregaron 100 µl de solución de lisis I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl y 10 mM EDTA), el paquete celular se homogeneizó con ayuda de vórtex y enseguida se adicionaron 200 µl de solución de lisis II (0.2 N NaOH y 1% SDS), se mezcló por inversión y se conservó en hielo hasta agregar 150 µl de solución de lisis III (3 M acetato de potasio y ácido acético 11.5%), el tubo se mezcló por inversión varias veces y se dejó en hielo 5 min, se centrifugó (12,000 rpm/ 5 min) y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo; para la precipitación de los ácidos nucleicos, se agregó etanol (1 ml) y se agitó por inversión; posteriormente se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente (TA), después, se centrifugó a 12,000rpm/5 min, se eliminó el sobrenadante y se recuperaron los ácidos nucleicos, enseguida se agregó 1 ml de etanol (70%), se mezcló por inversión y centrifugó (12,000 rpm/ 5 min), el sobrenadante se eliminó y se dejó reposar a temperatura ambiente, por último los ácidos nucleicos se

resuspendieron con 50 µl de agua inyectable estéril (marca PISA®) (Sambrook y Russell, 2001).

#### 7.4.1 Obtención del cassette de interrupción *GPA2+ LEU* por PCR

El cassette de interrupción *GPA2+LEU* se obtuvo por amplificación con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para lo cual se utilizaron los componentes que se describen en la tabla 1 y las condiciones mostradas en la tabla 2. Para esto, se emplearon 1000 ng de ADN plasmídico (ADNp) y los oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio de Proteómica: *GPA2-MuF* (GTAGTTACCAAGCTCAGAATCTCGAGG) y *GPA2-MuR* (GCCCTACATGGAGCCCAATATGAGG), para las reacciones de amplificación se utilizó el termociclador Sprint Thermal Cycle (Thermo Electron Corporation).

Tabla 1. Componentes de la PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Agua estéril	14.3
Buffer 10X	2.5
MgSO4 50 mM	1
dNTP mix 10 mM	1
DNAP (1000 ng/µl)	2
Oligonucleótido promotor (1µM) <i>GPA2-MuF</i>	2
Oligonucleótido reverso (1µM) <i>GPA2-MuR</i>	2
DNA Taq polimerasa de alta fidelidad (5U/µL)	0.2
<b>Volumen final</b>	<b>25</b>

Tabla 2. Condiciones para la reacción de PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5	1
<b>Desnaturalización</b>	95	1	35
<b>Alineamiento</b>	66	1	
<b>Extensión</b>	68	4	1
<b>Extensión Final</b>	68	10	
<b>Conservación</b>	4	∞	

#### **7.4.2 Electroforesis en geles de agarosa**

Para el análisis de los productos de PCR, se utilizó la técnica de electroforesis (separación) en geles de agarosa (Lee, Costumbrado, Hsu y Kim, 2012). La concentración de agarosa fue dependiente del tamaño esperado del fragmento de ADN, por lo que los porcentajes de agarosa oscilaron entre 0.7% y 2%.

La cantidad de agarosa necesaria para los diferentes geles se pesó en una balanza (BL1500, Startorius®) y se colocó en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 ml; se añadieron 100 ml de buffer TAE (1X) (Tris-Acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8), y en una placa térmica (pc-420, Corning Stirrer®) se agitó ocasionalmente hasta que la agarosa se disolviera por completo. A partir de la mezcla, se tomaron 20 ml de agarosa y se añadió 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), se homogeneizó y se vertió en un molde de plástico con un peine (que formó los pozos en donde se colocaron las muestras); se dejó gelificar a TA aproximadamente de 15 a 30 min.

Para la separación de los fragmentos de PCR, se utilizó una cámara de electroforesis (C. B. S. Scientific Co, BioRad®) en la cual se depositó el gel de agarosa y se agregó buffer TAE 1X para cubrirlo completamente, los productos de PCR y el buffer de carga (0.25% de azul de bromofenol y 40% de sacarosa) se mezclaron con ayuda de micropipeta y se agregaron a los pozos del gel de agarosa; para estimar el tamaño esperado de los productos, se utilizó el marcador de pares de bases 1 Kb (1 Kb DNA Ladder, Promega©).

La cámara se conectó a la fuente de poder (PowerPac 300 Bio Rad), donde se aplicaron las siguientes condiciones: corriente, 20 V/5 min y posteriormente un voltaje de 80 V durante 45 min, por último, el gel de agarosa se visualizó en el sistema GelDoc-It (Imaging System, UVP).

### **7.4.3 Recuperación del ADN a partir de los geles de agarosa por medio de extracción orgánica**

Se determinó y se recuperó el tamaño del fragmento de ADN esperado del cassette de disrupción de *GPA2+LEU* (3072 pb). Para la obtención del cassette, se utilizó un bisturí limpio para cortar la sección correspondiente a cada una de las bandas de interés, las cuales se depositaron en un filtro y se colocaron en tubos eppendorf nuevos y estériles, con capacidad de 1.5 ml; se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}/30$  min y se centrifugaron a 12,000 rpm/15 min/TA (microcentrífuga Eppendorf 5415D). Al sobrenadante se le agregó acetato de sodio 3 M (10% del vol. recuperado) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, a continuación, los tubos se incubaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}/1$  h, después de este tiempo los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm /5 min/TA, el sobrenadante se eliminó y a la pastilla de ácidos nucleicos se le agregaron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%; se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a TA, seguido de esto, el sobrenadante se eliminó por decantación y los tubos se dejaron secar a TA/10 min (tubos abiertos, con la finalidad de eliminar los residuos de etanol), por último; el ADN de las muestras se resuspendió en 12  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada y se cuantificó con el NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), los tubos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001; Vogelstein y Gillespie, 1979).

## **7.5 Generación de las mutantes de *Yarrowia lipolytica***

### **7.5.1 Células competentes de *Y. lipolytica***

Para la generación de las células litio-competentes, se tomó del cepario del Lab. de Proteómica a la cepa mutante *gpa1- $\Delta$*  de *Y. lipolytica* (Huerta, 2014), para utilizarlos como fondo genético. El pre-inóculo se preparó tomando una colonia aislada de la mutante *gpa1- $\Delta$*  a partir de una placa con YPD y se cultivó en un tubo falcón con 10 ml de medio líquido YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa), esto se realizó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar (SG 403A, SterilGARD III Advance) y se incubó toda la noche a 200 rpm/28  $^{\circ}\text{C}$ . Con la finalidad de tener un número de células uniforme en los cultivos posteriores, la

densidad óptica ( $OD_{600nm}$ ) de este cultivo se determinó utilizando un espectrofotómetro Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific), y se calculó el volumen del inóculo para obtener cultivos cuya  $OD_{600nm}$  inicial fuese de 0.2; utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen inicial} = \frac{\text{Vol. final} \times \text{Conc. final}}{\text{Conc. inicial}}$$

Vol. inicial = vol. necesario ( $\mu$ l) del pre-inóculo

Vol. Final = vol. deseado

Conc. final=  $OD_{(600nm)}$  deseada (0.2)

Conc. inicial=  $OD_{(600nm)}$  de los cultivos

A partir del preinóculo, un matraz Erlenmeyer (250 ml) que contenía 50 ml de medio YPD se inoculó con el volumen determinado y se incubó a 200 rpm/28°C/14 h, hasta obtener una  $OD_{600nm}$  de 1.0. El cultivo se trasvasó a un tubo de polipropileno (tubo falcón, de 50 ml) y se colocó en una centrifuga a 3500 rpm/5 min/TA, después se eliminó el sobrenadante por decantación hasta recuperar únicamente el paquete celular. Enseguida se realizaron dos lavados con 5 ml de buffer TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5), se centrifugó y recuperó nuevamente el paquete celular, el cual se resuspendió en 1.5 ml de buffer de acetato de litio (1 M; pH 6 y buffer TE pH 7.5) y se incubó a 70 rpm/28°C/1 h, por último las células competentes se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

### **7.5.2 Transformación de células litio-competentes de *Y. lipolytica* por choque térmico**

Se desnaturalizaron 10  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón (95°C/5 min; 5 mg/ml; Invitrogen™), después se agregaron 100  $\mu$ l de células litio-competentes (generadas a partir de la mutante *gpa1-Δ*), enseguida se adicionaron 500-1000 ng de ADN correspondiente al cassette de *GPA2+LEU2* (recuperados a partir de los geles de agarosa), estos componentes se mezclaron con movimientos lentos de forma circular y se incubaron a 28°C/30 min; posteriormente, se agregó Polietilenglicol (700  $\mu$ l) al 40% (PEG 4000, CARBOWAX™ (50% w/v)), buffer TE 10X, acetato de litio 10X y se incubó a 70 rpm/28°C/1 h.

Para que ocurra el proceso de transformación de las células mencionadas, éstas se incubaron a 37°C/10 min (placa de calentamiento Dry-Bath, Thermolyne™), posteriormente se colocaron a 4°C/15 min y se agregó buffer TE, por último, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm/2 min, y se eliminó el sobrenadante. Como producto de este proceso, se obtuvieron 600 µl de células, las cuales se sembraron en placas con medio selectivo(YNB + 2% glucosa).

### 7.5.3 Selección de las putativas dobles mutantes

Las células transformadas se cultivaron en placas con medio YNB (6.7 mg/ml) que contenían agarosa (8 mg/ml) y glucosa (8 mg/ml) como fuente de carbono (ver tabla 3). La siembra se realizó por estriado con asa bacteriológica para esparcir las células por toda la placa; por último se incubó a 28°C/6 días (Wang, Hung y Tsai, 2011; Dymond, 2013). Después se seleccionaron en total 20 colonias aisladas que se inocularon en tubos conicos de 50 ml que contenían 15 ml de medio YNB líquido y se incubaron a 200 rpm/28°C/48 h. Las células así cultivadas se utilizaron para comprobar la integración del cassette en el genoma de las células transformadas de *Y. lipolytica*.

**Tabla 3. Componentes y cantidades utilizados para la preparación de medio selectivo YNB**

Medio	YNB	
	Sólido	Líquido
Solución stock		
YNB 10x	10	10
Glucosa 4x	25	25
Agarosa 4x	25	X
Agua	40	65
Volumen final	100 ml	

### 7.6 Genotipificación de las células transformadas de *Y. lipolytica*

El ADN genómico (ADNg) de las células transformadas se obtuvo por el método modificado de Hoffman y Wiston (1987), el cual se describe a continuación:

Partiendo de los cultivos celulares correspondientes a las posibles clonas transformantes en medio selectivo YNB líquido (15 ml), se tomaron y centrifugaron 1.5



ml de cada cultivo (12,000 rpm/2 min; microcentrífuga 5415D, Eppendorf ) para recuperar la masa orgánica. Al pellet de células recuperadas se le añadieron 100 µl de perlas de vidrio estériles, 400 µl de buffer de lisis TSNT (Tris HCl 50 mM, EDTA [pH 8] 50 mM, SDS 1% y NaCl 50 mM) y 400 µL de fenol-cloroformo (v/v); las células se sometieron a disrupción con ayuda de un vortex usando ciclos de 1 min de agitación/1 min en hielo, hasta los 3 min; posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm/10 min; al término, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo eppendor, se añadió el 10% del vol. recuperado de acetato de sodio (3 M, pH 5.4), etanol absoluto frío (1 ml), se mezcló por inversión e incubó a -20°C/1 h, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm/10 min, se eliminó el sobrenadante por decantación y se agregaron 500 µl de etanol al 70%, se mezcló por inversión, una vez más se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, posteriormente se eliminó el exceso de etanol por decantación y los restos de este compuesto, con ayuda de micropipeta; las muestras se dejaron secar con el tubo abierto a temperatura ambiente (TA) por 15 min. Por ultimo los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 µl de agua bidestilada estéril, se cuantificaron utilizando el Nanodrop (Desjardins y Conklin, 2010) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Este proceso se realizó para obtener ácidos nucleicos correspondientes a las posibles dobles mutantes.

### **7.6.1 Diseño de oligonucleótidos para el análisis genotípico**

Las secuencias correspondientes a los genes *GPA* se localizaron en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se determinó que el gen *GPA1* (YALI0\_E11627g) está localizado en el cromosoma E y tiene un tamaño de 1233 pb; el gen *GPA2* (YALI0\_A09592g) en el cromosoma A, correspondió a un tamaño de 1329 pb. A las secuencias de los genes, se añadieron en los extremos 1000-1500 pb, con la finalidad de diseñar oligonucleótidos específicos en secciones no modificadas en el genoma de *Y. lipolytica*.

Los oligonucleótidos se diseñaron a partir del alineamiento de secuencias con el programa CLUSTAL W, identificando aquellas regiones con menor similitud entre ellas, considerando que el gen *GPA1* tiene un porcentaje de identidad muy similar al gen *GPA2*.

Para el diseño de oligonucleótidos se consideraron las siguientes características: contenido de GC (40-60%), longitud óptima (promedio 25 pb), una diferencia de temperatura de fusión de no más de 3°C, descartar la formación de dímeros y el tamaño deseado del fragmento a amplificar. Estas características se corroboraron utilizando programas bioinformáticos de libre acceso como: OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), OligoAnalyzer® tool IDT (Integrated DNA Technologies, <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados se utilizó el programa Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (tabla 4).

**Tabla 4. Oligonucleótidos específicos utilizados en el análisis genotípico**

Nombre	Secuencia 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)	Uso
<b>GPA2Ext-F</b>	CGGCACGGTTGTCCCCCTCTAC	66	Amplificación del gen <i>GPA2</i> y sus extremos
<b>GPA2Ext-R</b>	CTTGCAGTCTTGGTGATCGTTCTGGTC	66	
<b>GPA2Prom-F</b>	CCCCGGAAATGACCCTCAGGAGATTAG	62	Amplificación del gen <i>GPA2</i> y sus extremos
<b>GPA2Ter-R</b>	CTTCTCAAGATCCCCAAACAACCTCCACAG	61	
<b>GPA2int-F</b>	GTTGGATTGCGGTTCGGGCTCTGCTG	64	Comprobar la delección del gen <i>GPA2</i>
<b>GPA2int-R</b>	CTGGTTCTCTAGGGGCGAAAGAGG	60	

### 7.6.2 Reacción de PCR con oligonucleótidos específicos

Para identificar la presencia o ausencia del gen *GPA2* en las posibles mutantes, y corroborar la inserción de los cassettes en el locus correcto en el genoma de *Y. lipolytica*, se realizaron una serie de reacciones de PCR (tabla 5) con las condiciones mostradas en la tabla 6 Para visualizar los amplicones se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Tabla 5. Reacción convencional de PCR My Taq polimerasa

Reactivo	Volumen (μl)
Agua estéril	6.9
Buffer 5X	2.5
DNAg (50-100 ng/μl)	1
Oligonucleótido forward (1μM)	1
Oligonucleótido reverse (1μM)	1
My Taq DNA polimerasa (5 U/μL)	0.1
<b>Volumen final</b>	<b>12.5</b>

Tabla 6. Condiciones para una PCR convencional con My Taq polimerasa

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	35
Alineamiento	60-66	1	
Extensión	72	3-4	
Extensión Final	72	10	1
Conservación	4	∞	

### 7.6.3 Identificación del cassette de interrupción *GPA2+LEU* por digestión enzimática.

Para confirmar la inserción del cassette *GPA2+LEU* en el genoma de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, se realizó una digestión enzimática con la enzima EcoRV.

Posteriormente se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *GPA2* Ext-F y *GPA2* Ext-R con la finalidad de amplificar parte de los extremos no modificados del genoma de *Y. lipolytica* junto con el cassette *GPA2+LEU2* en el caso de la doble mutante.

Los productos de PCR amplificados se purificaron y se utilizaron 200-300 ng de ácidos nucleicos para la digestión enzimática, a continuación se agregaron los reactivos que

se muestran en la tabla 7, después la reacción se incubó a una temperatura de 37°C/2 h; los resultados de la digestión enzimática se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando un marcador de peso molecular 1Kb Ladder.

**Tabla 7. Componentes para la reacción de digestión enzimática**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Agua estéril	7.3
Buffer MULTI-CORE 10X	2
DNAg (200-300 ng/µl)	10
Bovine Serum Albumin, Acetylated (BSA) (10µg/µl)	0.2
EcoRV (10 U/µL)	0.5
Volumen final	20

## **7.7 Análisis fenotípico de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ***

### **7.7.1 Crecimiento y morfología celular en medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa**

Para determinar si las concentraciones de glucosa alteraban la capacidad de crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, se realizaron curvas de crecimiento de los cultivos en medio mínimo YNB sin glucosa y con diferentes concentraciones de glucosa (1, 2 ó 4%) los cultivos se incubaron en agitación 200 rpm/28°C y se monitoreó la OD<sub>600n</sub> cada 24 h hasta las 120 h.

Para evaluar la capacidad dimórfica (en forma de hifa o levadura) de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, se utilizó la técnica de microscopía (microscopio trinocular invertido AE21; Motic).

### **7.7.2 Comparación del crecimiento celular de las cepas de *Y. lipolytica* en diferentes condiciones nutricionales**

El crecimiento de la cepa P01a y la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* se comparó utilizando la siguiente metodología:

Se utilizaron las placas con YPD agar de la cepa P01a y la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, se seleccionó una colonia aislada y se inocularon en 25 ml de medio YPD líquido en dos matraces Erlenmeyer, y se incubaron a 200 rpm/28°C/18 h, el

cultivo se trasvasó a un tubo falcon el cual se centrifugó a 3000 rpm/5 min (centrifuge Z 206 A, HERMLE) y se eliminó por decantación se eliminó el sobrenadante; después, al paquete celular se le añadieron 25 ml de agua pura ultra estéril (este proceso se realizó por duplicado en condiciones de esterilidad), después los cultivos se incubaron a 200 rpm/2 h/28°C; estos cultivos se utilizaron para la preparación del pre-inóculo en medio mínimo YNB (6.7 mg/ml) sin y con diferentes concentraciones de glucosa (1, 2, ó 4%) sin agregar leucina o uracilo, los cultivos se aforaron a un volumen final de 50 ml, y se incubaron a 200 rpm/18 h/28°C.

Utilizando los cultivos de YNB, se preparó el inóculo ajustando a una OD<sub>600nm</sub> de 0.2, y se incubaron a 28°C/200 rpm durante 24 h; el crecimiento celular se determinó por el método modificado de Workman (2013) y por la técnica de filtrado al vacío (filtro de fibra de vidrio GF-A, WHATMAN®), los filtros con la masa celular se colocaron en una incubadora a 60°C por 2 h para eliminar la humedad, después se registró el peso obtenido de masa celular; también se determinó el crecimiento de la cepa P01a y la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.

En medio rico en nutrientes (YPD), los cultivos se incubaron a 28°C/200 rpm por 24 h con la técnica descrita para la obtención de masa celular.

## **7.8 Análisis estadístico**

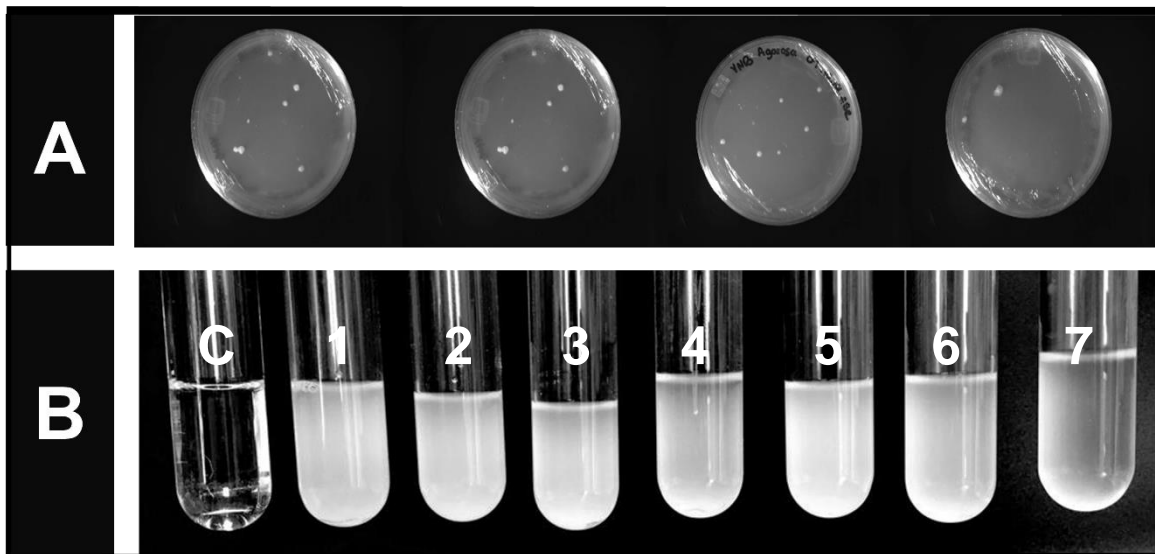
El análisis de crecimiento celular se realizó por triplicado (experimentos independientes), la normalidad de los datos se determinó con la prueba Shapiro-Wilks y se compararon con la prueba estadística T-Student para muestras independientes y ANOVA de un factor. Los datos fueron capturados y analizados con el software SPSS V.24.0 versión para Windows, considerando un valor  $p < 0.05$  como una diferencia estadísticamente significativa. En todas las etapas del análisis, tanto genotípico como fenotípico, se utilizó a la cepa P01a como control.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Selección y crecimiento de las células transformadas de *Y. lipolytica*

Las cepas *gpa1-Δ* y P01a de *Y. lipolytica* son auxotróficas; es decir, son incapaces de sintetizar compuestos orgánicos esenciales para su crecimiento (nutrientes). La cepa P01a carece de los genes que participan en la biosíntesis de leucina y uracilo y la cepa *gpa1-Δ* integra un gen que hace posible sintetizar uracilo, sin embargo; carece del gen que participa en la síntesis de leucina (Huerta, 2014).

Como resultado de la transformación, se observaron colonias aisladas correspondiente al crecimiento de las putativas dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ*; en las placas Petri con medio selectivo: YNB, sin leucina o uracilo, a los 6 días de incubación (figura 4A).



**Figura 4. Crecimiento de las posibles dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ* en medio selectivo YNB.** A) Crecimiento en placa después de 6 días de incubación B) 1- 7 cultivo en medio líquido después de 2 días de incubación de clonas que son producto de la transformación de la cepa *gpa1-Δ* con el cassette de disrupción *GPA2+LEU2*. C-: cepa P01a. Las clonas se cultivaron en medio YNB sin la adición de leucina o uracilo (placas adicionadas con agarosa) y se incubaron a 28°C/200 rpm. Imagen representativa de 26 clonas.

Las clonas de las posibles dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ* se cultivaron en medio selectivo YNB líquido sin adición de leucina o uracilo (figura 4B), por lo que se consideran células protótrofas (capaces de sintetizar leucina y uracilo); a diferencia de éstas, la cepa control P01a no es capaz de crecer en el medio carente tanto de leucina como de uracilo.

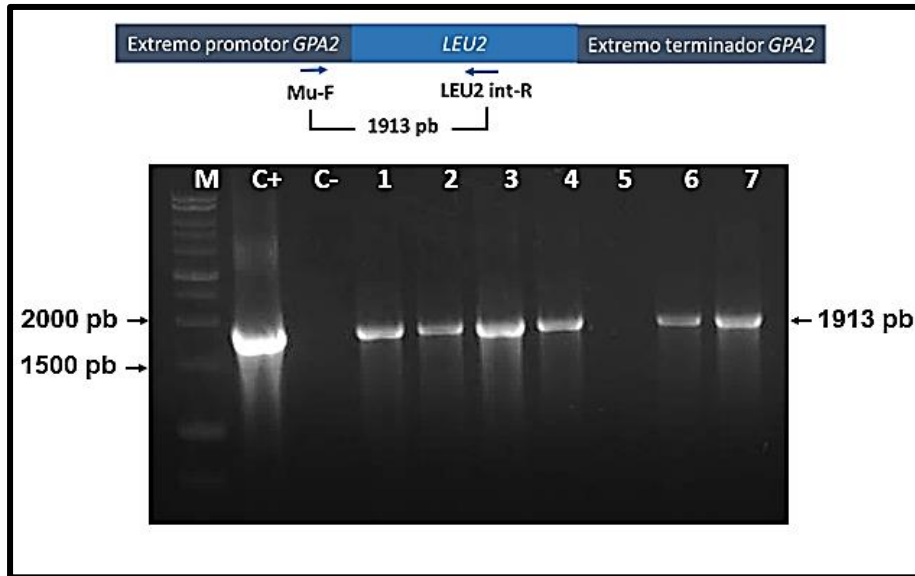
## 8.2 Análisis genotípico

### 8.2.1 Identificación del cassette de interrupción en las posibles dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*.

La presencia del cassette *GPA2+LEU2* se determinó en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica* de la siguiente forma:

Primero se extrajo el ADN genómico (ADNg) de las clonas que crecieron en medio selectivo, después, el ADNg se utilizó como templado en las reacciones de PCR y se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos diseñados en regiones no modificadas en el genoma (primer *GPA2*-MuF: GTAGTTACCAAGCTCAGAATCTCGAGG) y otros diseñados en la región codificante del gen marcador *LEU2* (primer LEU-intR: (CTCGTCGGAGATGAT ATCGCC) esperando un amplicón correspondiente a 1913 pb.

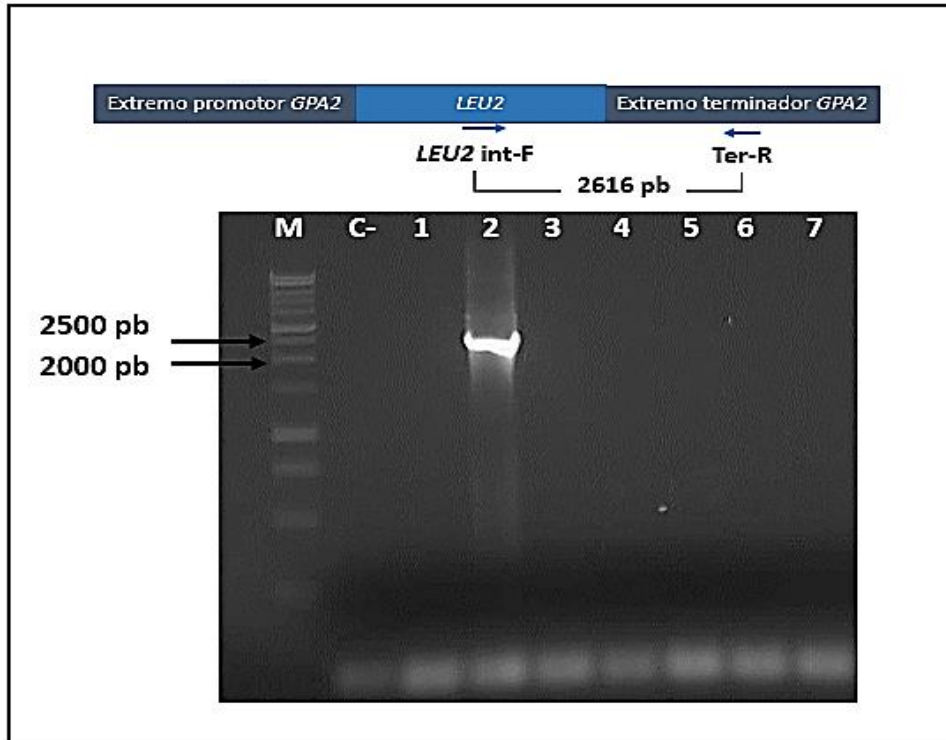
En la figura 5 se observan amplicones (productos de PCR) del tamaño esperado (1913 pb) que ponen de manifiesto la presencia del cassette *GPA2+LEU* en las posibles dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, confirmando así que la mayoría de las clonas tienen insertado el cassette en su genoma.



**Figura 5. Presencia o ausencia del cassette *GPA2+LEU2* en las transformantes de *Y. lipolytica*.** Carriles 1-7 productos de PCR de las posibles dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*. Combinación de oligonucleótidos *GPA2* MuF+*GPA2* MuR (1930 pb); C+: control positivo; ADNp con el cassette *GPA2+LEU2*. C-: control negativo; ADNg de la cepa P01a de *Y. lipolytica*. M: Marcador 1Kb Promega. Pb: pares de bases. Gel de agarosa al 1.5%. Imagen representativa de 20 clonas. El número indica la nomenclatura asignada para cada clona, durante los experimentos.

En un segundo análisis se identificó por medio de PCR la inserción del cassette *GPA2+LEU2* en el sitio correcto dentro del genoma de *Y. lipolytica*. Para ello se utilizó como templado el ADNg de las posibles dobles mutantes *gpa1-Δ/gpa2* y se combinaron los siguientes oligonucleótidos: *LEU2* Int-F (CCAACACCGTATGGACCACTCCC) y *GPA2* Ter-R (CTTCTCAAGATCCCC AAACA ACTCCACAG); como control negativo (C-), se utilizó el ADNg de la cepa P01a. En la figura 6 se observa que solo en una de las clonas (clona #2) se obtuvo un fragmento amplificado que muestra el tamaño esperado de 2610 pb, indicando la posible inserción correcta del cassette *GPA2+LEU2*.





**Figura 6. Identificación de la orientación del cassette *GPA2+LEU2* en las putativas mutantes *Y. lipolytica*.** Carriles 1-7 ADNg de las posibles mutantes *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, de *Y. lipolytica*; Combinaciones de oligonucleótidos *LEU2* int-F+ *GPA2* Ter-R (2616 pb); C-: control negativo; ADNg de la cepa P01a de *Y. lipolytica*. M:marcador 1Kb Promega. Pb: pares de bases. Gel de agarosa al 1.5%. Imagen representativa de 20 clones. El número indica la nomenclatura asignada para cada clona, durante los experimentos.

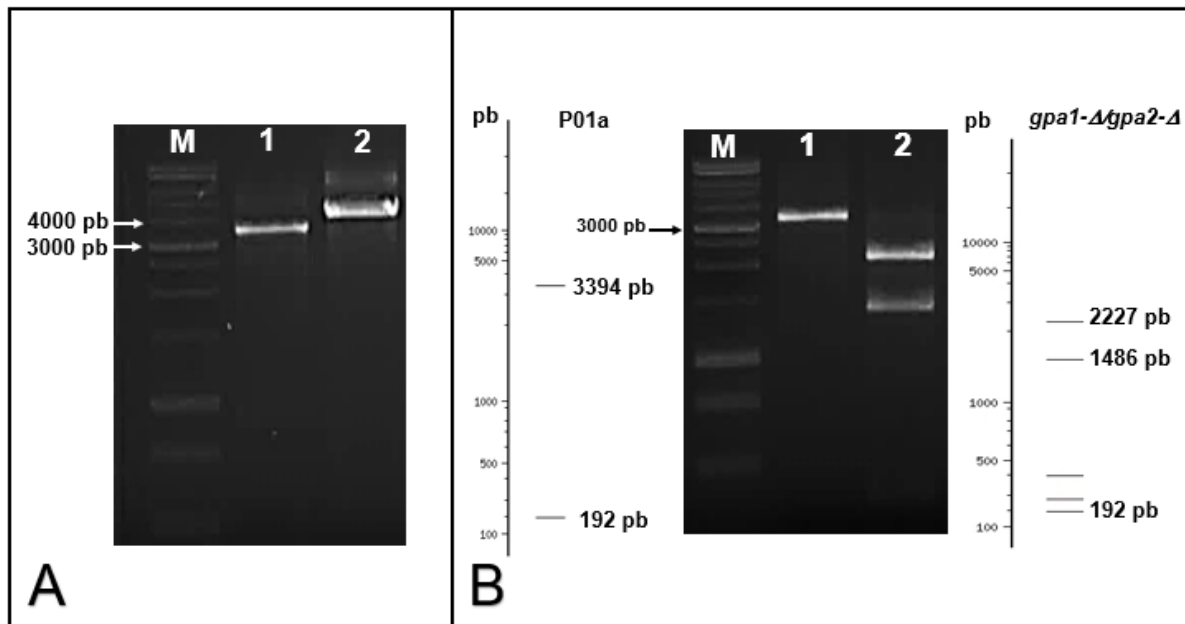
### 8.2.2 Comprobación de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* por digestión con enzimas de restricción.

La presencia del cassette en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* (clona #2) se confirmó también por digestión con enzimas de restricción utilizando la enzima EcoRV la cual fue seleccionada a partir de un análisis previo *in silico*. En tal análisis se identificaron cinco sitios de restricción para la enzima EcoRV sobre la secuencia de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* y para la control P01a, se identificaron dos sitios de cortes (figura 7B),

El resultado de los productos de PCR y de los productos obtenidos de su digestión se observa en la figura 7. En 7A se observa que en el DNAg de la cepa control P01a (C) se amplificó un fragmento de 3586 pb (carril 1), mientras que en la mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* se amplificó una banda de 4571 pb (carril 2), la diferencia de tamaño entre

los productos amplificados en cada cepa corresponde a lo esperado, considerando la inserción del cassette *GPA2+LEU* en la doble mutante.

En la figura 7B se observan los resultados de la digestión enzimática. Se identifica un patrón de digestión diferente entre la cepa control P01a y la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, correspondiendo a lo esperado en el patrón de digestión virtual obtenido con el programa NEBCutter.

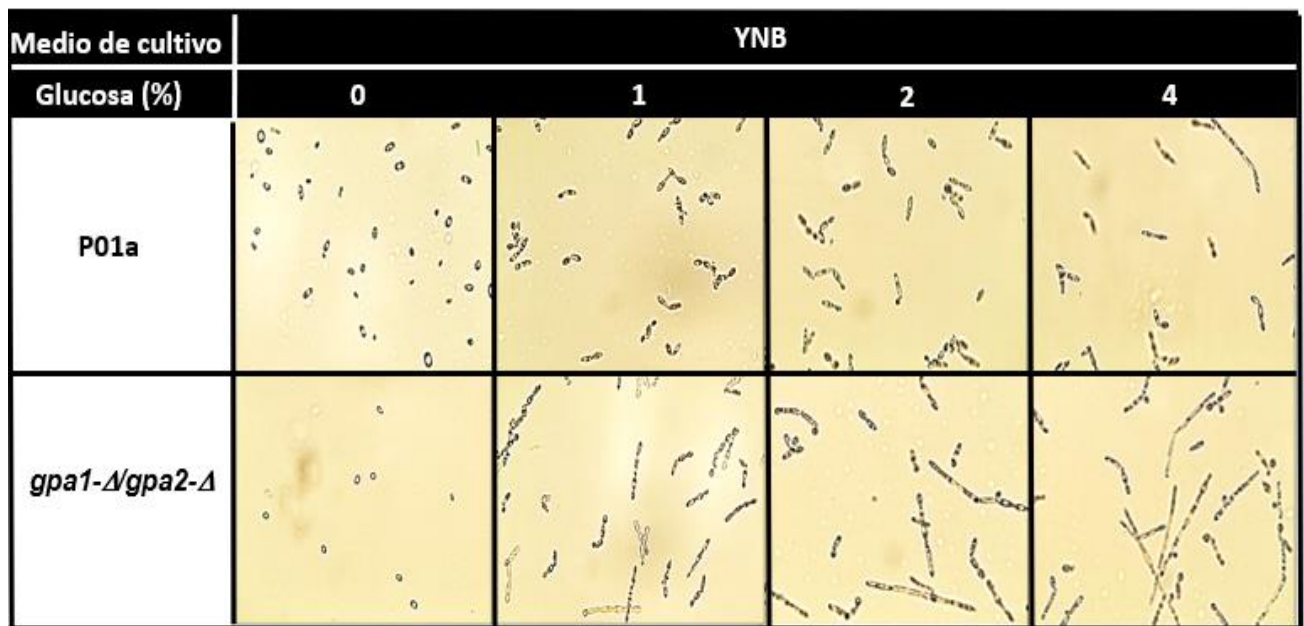


**Figura 7. Comprobación de la inserción del cassette en el genoma de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.** A) Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos *GPA2* Ext-F y *GPA2* Ext-R, sobre el DNAg de las cepas control (carril 1; 3586 pb) y doble mutante (carril 2; 4572 pb). B) A la izquierda y derecha del gel se representan los patrones de digestión (análisis *in silico*) con la enzima EcoRV sobre los fragmentos amplificados en las cepas control (izquierda) y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* (derecha). La figura del centro corresponde a los resultados experimentales obtenidos en la digestión enzimática: carril 1, cepa control y carril 2, doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*. M: marcador 1Kb Promega. Pb: pares de bases. Gel de agarosa al 1.5%.

### 8.3 Análisis fenotípico de la doble mutante

#### 8.3.1 Morfología de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* en medio limitado en nutrientes

La capacidad dimórfica de las células correspondientes a la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica* se comparó con la cepa parental P01a. Para este análisis ambas cepas se sembraron en medio de cultivo mínimo YNB que contenía diferentes concentraciones de glucosa (0, 1, 2 ó 4%). En la figura 8 se observa que tanto la cepa control P01a como la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* crecieron en forma de levadura en el medio sin glucosa (0%); por otra parte, en los medios de cultivo adicionados con glucosa (1, 2 ó 4%) las células de la cepa P01a crecieron tanto en forma de micelio como de levadura, mientras que en las células de la doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) la forma de hifa predominó en los medios adicionados con diferentes concentraciones de glucosa (figura 8).

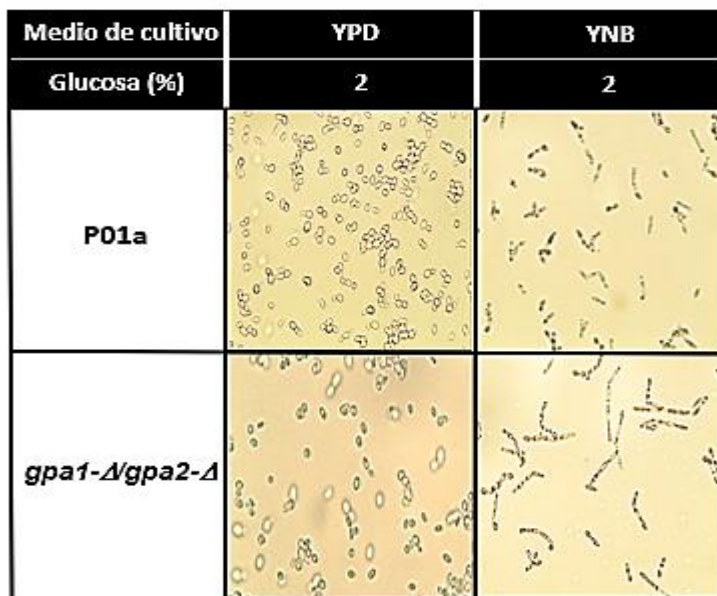


**Figura 8. Comparación de la morfología celular entre las cepas P01a y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*.** Las imágenes corresponden a células de la cepa control P01a y de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* cultivadas en medio YNB 0% y adicionado con diferentes concentraciones de glucosa (1, 2 ó 4%) , después de 24 h de incubación a 28 °C/200 rpm. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio trinocular invertido, utilizando el objetivo 40X.

### 8.3.2 Morfología de la cepa *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, en medio rico en nutrientes

La morfología de las células correspondientes a la cepa *gpa1-Δ/gpa2-Δ* también se analizó en el medio YPD, el cual es un medio rico en nutrientes y contiene una cantidad estándar (2%) de glucosa. Este medio es usado como medio de rutina para el cultivo de *Y. lipolytica*. Cuando se cultivaron en el medio YPD tanto las células de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* como las de la cepa control P01a crecieron en forma de levadura (figura 9).

La comparación de la morfología en medio completo (YPD) y restringido (YNB) en nutrientes (ambos con 2% de glucosa) mostró que en la cepa control P01a hay una mayor cantidad de células levaduriformes en medio YPD, mientras que en el medio YNB se identificaron células tanto en forma de levaduras como de hifas. Por el contrario, en los cultivos de la cepa doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) las células se observaron únicamente en forma de levadura en el medio YPD (medio rico en nutrientes) mientras que en el medio YNB (medio mínimo) predominaron células filamentosas (forma de hifa) (figura 9).




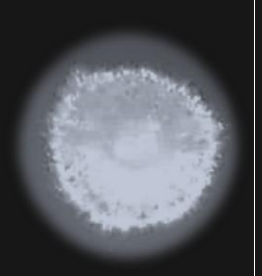
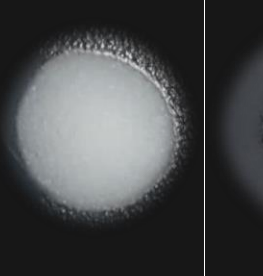
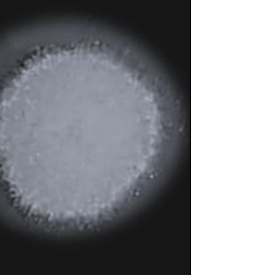
**Figura 9. Comparación de la morfología celular entre la cepa P01a y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica* cultivadas en medio YPD y YNB.** Las imágenes corresponden a células cultivadas de la cepa control P01a y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica* en medios YPD y YNB adicionado con 2% de glucosa. Los cultivos se incubaron a 28 °C/200 rpm durante 24 h. Se observaron a través de un microscopio trinocular invertido con el objetivo 40X.

### 8.3.3 Morfología colonial de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, en medio YNB

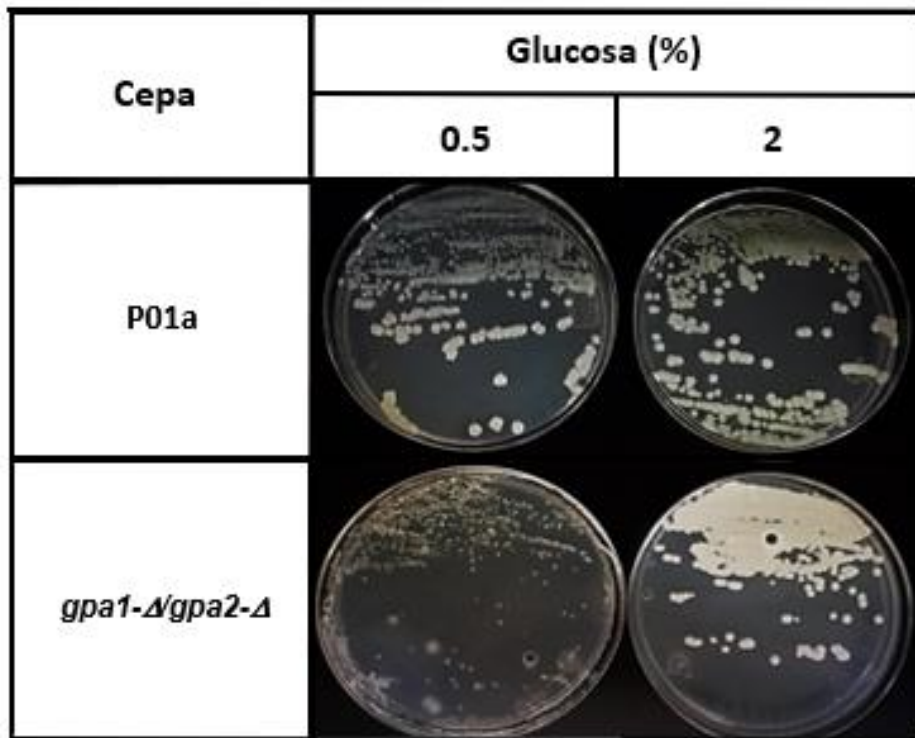
El análisis de la morfología colonial mostró que cuando se cultivaron en medio con restricción de glucosa, las colonias de la cepa control P01a presentaron una forma irregular y rugosa mientras que las colonias correspondientes a la cepa doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) presentan un tamaño menor y con filamentos (tabla 8).

Por otra parte, en el análisis de las colonias cultivadas en medio YNB con 2% de glucosa, se observó que las colonias de la cepa P01a tenían un contorno redondo y una textura lisa, a diferencia de las colonias de la cepa doble mutante que presentaron una forma ondulada y con filamentos.

Tabla 8. Características morfológicas de las colonias de las cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ*

Colonias en YNB				
Glucosa (%)	0.5		2	
	P01a	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> ,	P01a	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i> ,
<b>Característica</b>				
<b>Forma</b>	<u>Irregular</u>	Circular	Circular	Circular
<b>Contorno</b>	Ondulada	Ondulada	<u>Redonda</u>	Ondulada
<b>Elevación</b>	Cóncavas	Cóncavas	Cóncavas	Cóncavas
<b>Textura</b>	<u>Rugosa</u>	<u>Filamentosa</u>	<u>Lisa</u>	<u>Filamentosa</u>
<b>Apariencia</b>	Opacas	Opacas	Opacas	Opacas
<b>Pigmentación</b>	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
<b>Tamaño</b>	Normal	<u>Pequeño</u>	Normal	Normal

Las observaciones anteriores sugieren fuertemente que la concentración de glucosa tiene efecto sobre el crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*: una cantidad limitada de glucosa (0.5%) provoca un crecimiento lento (colonias pequeñas), mientras que una concentración estándar de glucosa (2%) induce el crecimiento de colonias con tamaño similar a lo observado en la cepa parental (figura 10).



**Figura 10. Análisis de las colonias correspondientes a la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*.** Crecimiento de la cepa control P01a y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* en placas con YNB-agarosa, adicionados con 0.5 y 2% de glucosa. Las placas sembradas con cada una de las cepas (control y doble mutante) se incubaron durante 7 días a 28 °C.

#### 8.4 Curva de crecimiento de la cepa *gpa1-Δ/gpa2-Δ*

El crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* y el de la cepa control P01a se estimó por lecturas de densidad óptica ( $OD_{600nm}$ ) cada 24 h durante 5 días, en medio de cultivo restringido en nutrientes (YNB) sin y con diferentes concentraciones de glucosa (1, 2 ó 4%).

En los resultados que se muestran en la figura 1 se observa que el crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* fue menor (con respecto a la cepa control) en el medio YNB sin adición de glucosa (figura 11A). El crecimiento de esta cepa se incrementó sustancialmente cuando las células se cultivaron en el medio YNB adicionado con 1, 2 ó 4% de glucosa, hasta alcanzar valores mayores a los observados en la cepa control (figura 11B, C y D). En todos los casos, el crecimiento celular tuvo un notorio repunte entre las 24 y 72 h de cultivo, y en el medio adicionado con 4% de glucosa, se observa otro repunte en el crecimiento, después de las 96 h de cultivo (Tabla 9).

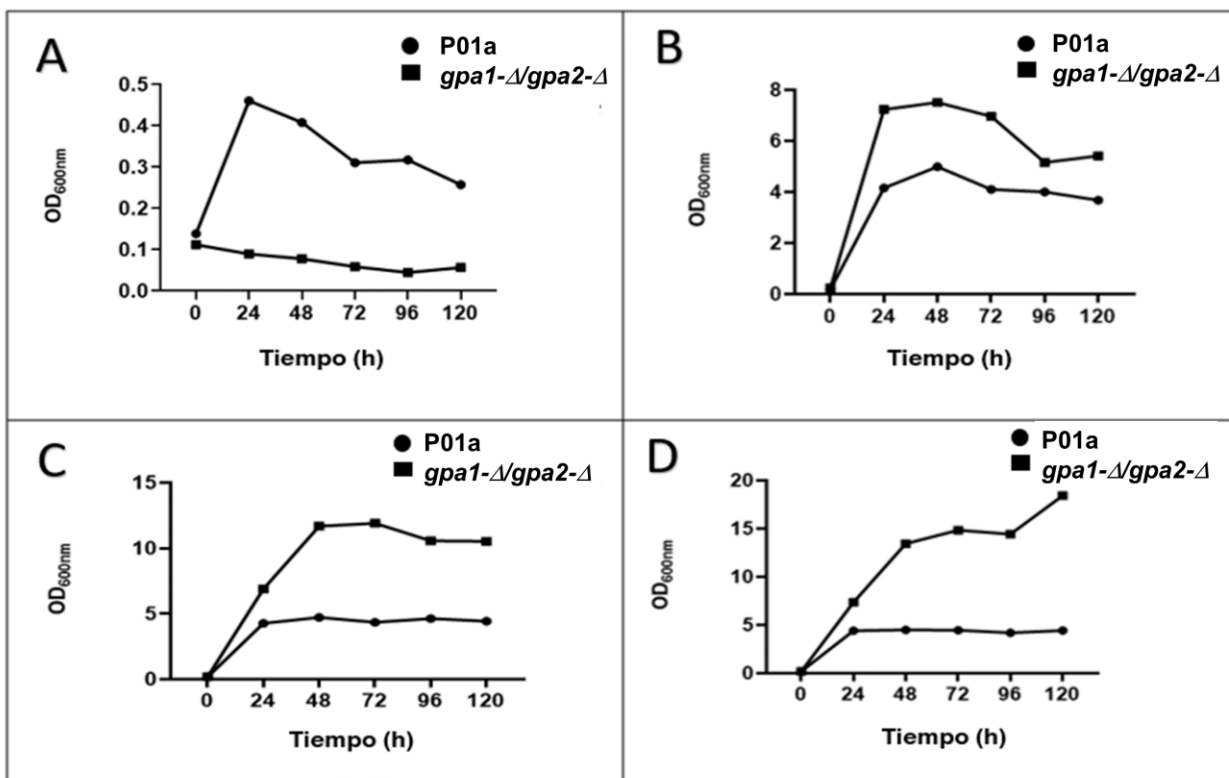


Figura 11. Crecimiento de la *gpa1-Δ/gpa2-Δ* y P01a en medio (YNB) adicionado o no con diferentes concentraciones de glucosa. A) medio YNB sin glucosa, B) medio YNB + 1% glucosa, C) YNB+ 2% glucosa, D) YNB + 4% glucosa. Los valores de OD corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

**Tabla 9. Comparación del crecimiento de las cepas P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ* en medio mínimo YNB adicionado con diferentes concentraciones de glucosa**

Glucosa (%)	Cepa	Tiempo (h)					
		0	24	48	72	96	120
0	P01a	0.13±0.01	0.46±0.07	0.40±0.03	0.31±0.03	0.31±0.06	0.25±0.03
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	0.11±0.00	0.08±0.02	0.07±0.02	0.05±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01
1	P01a	0.17±0.04	4.15±0.79	4.99±0.47	4.10±0.37	4±0.42	3.67±0.18
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	0.24±0.07	7.22±2.4	7.50±0.96	6.96±1.45	5.15±1.21	5.41±1.27
2	P01a	0.17±0.02	4.26±0.52	4.71±0.38	4.34±0.24	4.63±0.08	4.42±0.28
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	0.19±0.03	6.89±0.92	11.67±2.94	11.90±2.52	10.56±1.93	10.52±2.93
4	P01a	0.18±0.04	4.40±0.21	4.49±0.22	4.46±0.24	4.19±0.34	4.42±0.53
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	0.19±0.01	7.35±0.32	13.43±1.00	14.84±1.19	14.41±1.69	18.41±2.65

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de 3 experimentos independientes correspondientes a las lecturas de OD<sub>600nm</sub> obtenidas de los cultivos de las cepas doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) y control (P01a), cultivadas durante 5 días en medio mínimo YNB sin glucosa y con 1, 2 ó 4% de glucosa.

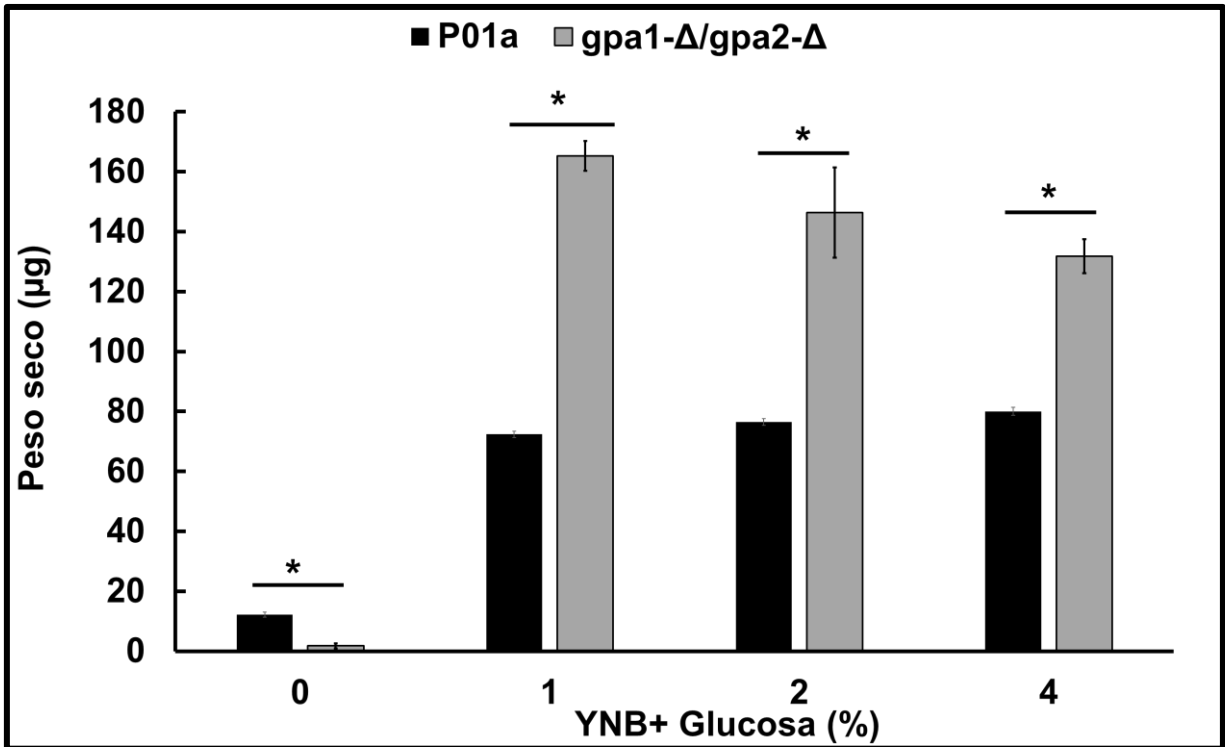
### 8.5 Análisis del crecimiento de la cepa P01a y la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* por peso seco.

Considerando que el incremento en el crecimiento celular observado en la doble mutante (determinado mediante el análisis por OD<sub>600nm</sub>) podría estar influenciado por la morfología que estas células presentan (crecimiento en forma de hifa, ver resultados 8.3.1 y 8.3.2) se decidió determinar el crecimiento de las cepas por medio de la determinación del peso seco, correspondiente al “paquete” celular.

Para llevar a cabo este análisis se realizó la técnica de filtración al vacío para obtener el peso seco de las células de ambas cepas cultivadas en medio YNB sin o con 1, 2 ó 4% de glucosa; la determinación del peso seco se realizó solamente en cultivos en fase de crecimiento exponencial (24 h).

En la figura 12 se muestra la comparación del peso seco de cultivos correspondientes a la cepa control P01a y a la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, los resultados obtenidos fueron similares a los observados por la OD.





**Figura 12. Comparación del crecimiento de las cepas P01a y doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, en medio YNB adicionado con glucosa.** Los valores graficados corresponden al valor del peso seco (µg) obtenido como promedio de 3 experimentos independientes. Las muestras corresponden a cultivos en YNB sin adición de glucosa (0), y YNB con 1, 2 ó 4% de glucosa, incubados a 28°C/200 rpm, durante 24 h. Prueba estadística: T-Student muestras independientes. (\*) indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cepas doble mutante y P01a.

Para el análisis estadístico de la comparación del peso seco entre los cultivos de las cepas doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) y control (P01a), primero se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk, y posteriormente se realizó una prueba de T-Student para muestras independientes. Los resultados obtenidos indican que el peso seco correspondiente al cultivo de la doble mutante fue menor ( $p < 0.001$ ) con respecto a la cepa control, cuando las células se cultivaron en medio YNB sin glucosa.

En los cultivos en medio YNB adicionado con 1, 2 ó 4% de glucosa, el peso seco correspondiente a la cepa doble mutante fue mayor con respecto al peso de los cultivos de la cepa control (tabla 10). En todas estas comparaciones, las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Tabla 10. Comparación del crecimiento celular (peso seco) entre las cepas doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* y P01a cultivadas en medio YNB con diferentes concentraciones de glucosa

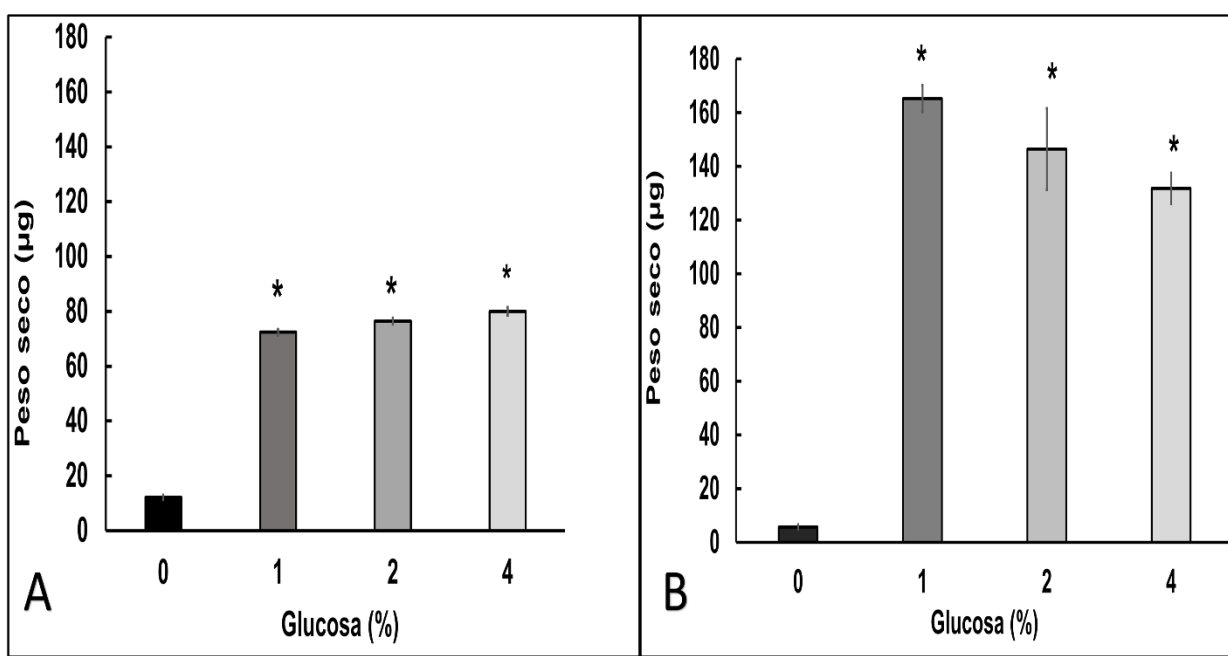
YNB + glucosa (%)	Cepa	Peso seco		Valor-P
		(mg)	DE	
0	P01a	12	$\pm 0$	0.000*
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	1	$\pm 0$	
1	P01a	72	$\pm 1$	0.000*
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	165	$\pm 0.4$	
2	P01a	76	$\pm 1$	0.015*
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	146	$\pm 15$	
4	P01a	80	$\pm 1$	0.003*
	<i>gpa1-Δ/gpa2-Δ</i>	131	$\pm 5$	

Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar (DE) obtenidos a partir de los datos de peso seco ( $\mu\text{g}$ ) de cultivos con 24 h de incubación. Prueba T para muestras independientes. (\*) indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Para determinar el efecto que diferentes concentraciones de glucosa ejercen sobre el crecimiento de la cepa doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) se comparó el crecimiento (peso seco) de las células cultivadas en medio YNB adicionado o no, con diferentes concentraciones de glucosa (1, 2 ó 4%), por medio del análisis estadístico ANOVA de un factor junto con una prueba post hoc Tukey (varianzas iguales) para los datos de la cepa control P01a, y Games-Howell (no son varianzas iguales) para los datos de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.

En la figura 13A, se muestra la comparación del crecimiento tanto de la cepa control (P01a) como de la cepa *gpa1-Δ/gpa2-Δ*. El análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA muestra que en la cepa control el crecimiento es significativamente mayor en presencia de glucosa con respecto al cultivo sin glucosa, aunque también se observan diferencias significativas en el crecimiento celular en los medios adicionados con las diferentes concentraciones de glucosa. En esta cepa (P01a) el aumento en el crecimiento es directamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio (Fig 13B).

En cuanto a la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, similar a lo observado con la cepa control, el crecimiento fue menor en el medio sin glucosa que el observado en medios adicionados con glucosa ( $p=0.001$ ). En los medios adicionados con glucosa se observó un crecimiento mayor que el de la cepa parental, a juzgar por los valores de peso seco obtenido; a diferencia de lo observado en la cepa P01a, en la doble mutante el crecimiento disminuyó a medida que se aumentó la concentración de glucosa, lo cual sugiere una relación inversamente proporcional entre el crecimiento celular y la concentración de glucosa.

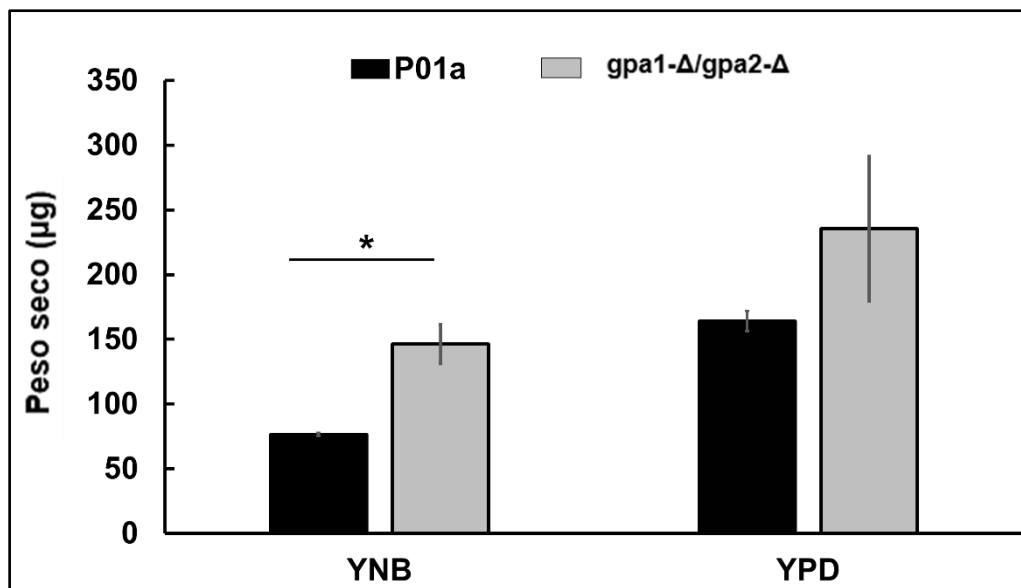


**Figura 13. Comparación del crecimiento de la cepa P01a y *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica* con diferentes concentraciones de glucosa.** A) Crecimiento de la cepa control P01a B) Crecimiento de la doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*). Los datos son obtenidos del promedio de 3 experimentos independientes al peso seco ( $\mu\text{g}$ )  $\pm$  desviación estándar. Los cultivos se realizaron en medio YNB sin y adicionado con 1, 2 ó 4% de glucosa. Prueba estadística: ANOVA un factor. (\*) indica diferencia significativa ( $p<0.05$ ) respecto al medio YNB 0% glucosa.

En general, estos resultados muestran 1) que la presencia de glucosa (como fuente de carbono) es esencial para el crecimiento tanto de la cepa P01a como de la doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) y 2) que la concentración de glucosa tiene un efecto diferente a lo observado en la cepa control, en las células que tienen eliminados los genes GPA. Al observar que en los medios limitados en nutrientes (YNB) se presentan diferencias en el crecimiento, se decidió realizar otra serie de experimentos que

permitieran comparar el crecimiento celular en medio rico en nutrientes (YPD: utilizado como medio de rutina para el cultivo de ésta y otras especies de levadura) y medio pobre en nutrientes (YNB: medio mínimo), ambos medios contenían 2% de glucosa. Para identificar una diferencia entre las cepas, se realizó una prueba T-Student para muestras independientes.

En la figura 14 se observan los resultados obtenidos de esta comparación. Aunque se observan diferencias en el crecimiento de ambas cepas en los diferentes medios (mayor crecimiento en el medio YPD, rico en nutrientes) las diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa control en el medio YPD no son estadísticamente significativas ( $p=0.093$ ), pero si lo son en el medio mínimo YNB ( $p = 0.015$ ). Esto sugiere que las células que presentan la delección de los genes *GPA* (cepa doble mutante) crecen más que la cepa control (P01a) tanto en medio rico como en medio limitado de nutrientes; sin embargo, las diferencias observadas en el crecimiento solo son significativas estadísticamente cuando las células se cultivan en medio restringido en nutrientes (medio mínimo YNB).



**Figura 14. Comparación del crecimiento de la cepa control y la doble mutante en medio YNB y YPD.** Los valores graficados son obtenidos del promedio de 3 experimentos independientes correspondientes al valor del peso seco en ( $\mu\text{g}$ ). YNB: Yeast Nitrogen Base; medio pobre en nutrientes. YPD: Yeast extract Peptone Dextrose; medio rico en nutrientes. Prueba estadística: T-Student. (\*) indica diferencia significativa ( $p=0.015$ ).

## 9. DISCUSIÓN

La proteína G heterotrimérica esta constituida por tres subunidades; alpha ( $G\alpha$ ), beta ( $G\beta$ ) y gama ( $G\gamma$ ). La subunidad  $G\alpha$  tiene unida una molécula de GDP que es intercambiable por GTP, esto permite la separación del complejo heterotrimérico en  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . La hidrólisis de la molécula de GTP a GDP produce un efecto opuesto e inactiva la proteína G, y la prepara para ser estimulada por acción de ligandos específicos. Por lo anterior, esta proteína se ha considerado como un regulador clave de procesos como el crecimiento y desarrollo de las células eucariotas (Tamaki, 2007).

La función y clasificación de la subunidad  $G\alpha$  depende de la especie, por ejemplo; el hongo *Fusarium oxysporum f sp cubense*, posee tres proteínas  $G\alpha$  (*fga1*, *fga2* y *fga3*) y la delección de los genes codificantes afecta la morfología de la colonia, la tolerancia al calor, reduce la virulencia y disminuye los niveles intracelulares de AMPc (Jain et al., 2002; Guo et al., 2016; Tong et al., 2020). En *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado dos genes que codifican para  $G\alpha$ : *GPA1* y *GPA2*, el gen *GPA1* regula la vía de la MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) estimulada por hormonas (Dietzel y Kurjan, 1987) y el gen *GPA2* regula la producción de AMPc; la sobre expresión del gen *GPA2* está relacionada con el aumento de los niveles de AMPc en presencia de glucosa (Colombo, 1987). La señalización de la proteína G heterotrimerica está vinculada con la activación de las vías fosfolipasa C y adenilato ciclasa, estas vías modifican la concentración de AMPc intracelular y provocan la activación de PKA y MAPK (García-Rico y Fierro, 2017) . Se ha reportado que las vías PKA y MAPK son dependientes tanto de la respuesta fisiológica a efectores específicos como de la especie, sugiriendo que los receptores implicados en estas vías también pudieran ser específicos para cada estímulo (Cervantes-Chavez et al., 2009).

En *Y. lipolytica* el proceso de diferenciación está relacionado con la nutrición celular, por ejemplo; las fuentes de nitrógeno, aminoácidos y de peptona tienen un rol fundamental en el crecimiento en forma de hifa. Para inducir el cambio de levadura a hifa se requiere de suficiente energía (fuente de carbono y nitrógeno) para obtener un crecimiento celular filamentoso que le permita buscar nutrientes con eficiencia.

También se ha reportado que el dimorfismo en *Y. lipolytica*, está modulado por la vía de la MAPK, relacionada con el crecimiento micelial, y la PKA para el crecimiento en forma de levadura (Szabo y Sitofanikova, 2002).

En el estudio realizado por Huerta y cols. (2017), se identificaron en el genoma de *Yarrowia lipolytica* dos genes que codifican para la subunidad G $\alpha$ : *GPA1* y *GPA2*. En ese mismo estudio se demostró que la delección del gen *GPA1* (*gpa1-Δ*) no afectó el crecimiento de las células cuando se cultivaron en medio con glucosa como fuente de carbono (Huerta, 2014). Posteriormente también se demostró que el crecimiento de las células de esta cepa no se ve afectado cuando su cultivan en medio adicionado con glicerol como fuente de carbono (Briones, 2017).

### **9.1 Comparación de la morfología en medio mínimo YNB**

En este trabajo se generó la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, la cual creció en forma de levadura al cultivarla en medio mínimo YNB sin glucosa. Los resultados son similares a los obtenidos por Szabo y Sitofanikova (2002), quienes identificaron que la morfología de las células de *Y. lipolytica*, cultivadas en un medio restringido de una fuente de energía, conservan una forma de levadura con la finalidad de mantener su proliferación.

Contrario a lo anterior, las células mutantes (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*) de *Y. lipolytica*, cultivadas en YNB adicionado con 1, 2 ó 4% de glucosa, se caracterizaron por crecer en forma de hifa. Al respecto, Ruiz-Herrera y Sentandreu (2002), reportaron que la mejor fuente de carbono para inducir el crecimiento micelial en *Y. lipolytica* es la glucosa, al comparar medios con diferentes valores de pH adicionados con glucosa o N-acetilglucosamina (GlcNAc, fuente de carbono inductora de la formación de micelio). Por otro lado, Szabo (1999) identificó que la relación entre levadura e hifa fueron similares en sus cultivos en YNB que contenía diferentes fuentes de carbono, identificando que en el medio mínimo predominaba la forma de levadura, mientras que en medio rico el crecimiento era en forma de hifa; concluyendo que las fuentes de carbono como glucosa, fructosa o acetato de sodio, no afectaban la morfología celular de *Y. lipolytica*.

Las levaduras tienen la capacidad de adaptarse a los nutrientes disponibles en el medio de cultivo necesarios para su supervivencia; en presencia de un agotamiento nutricional, se utilizan diversos mecanismos que les permiten la búsqueda de nutrientes en el medio, razón por lo cual, las células crecen en forma filamentosa. Bajo condiciones extremas de inanición o incluso la restricción de un solo nutriente obliga a las células a permanecer en estado de reposo reversible o mantenerse en estasis (Broach, 2012). Aunque queda de manifiesto que diferentes fuentes de carbono tienen efectos similares en la diferenciación de *Y. lipolytica*, es necesario aclarar que en nuestro trabajo, el análisis del fenotipo de las células de la cepa doble mutante se realizó únicamente en medio carente o adicionado de glucosa como fuente de carbono.

## **9.2 Comparación de la morfología en medio rico en nutrientes**

La doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* también se cultivó en medio rico en nutrientes YPD (con 2% de glucosa), mostrando un crecimiento celular en forma de levadura, similar a lo observado en la cepa control P01a. Este suceso puede vincularse a la influencia de la composición del medio rico y mínimo, conforme a lo reportado por Abelovska y cols. (2007), quienes al comparar medios mínimos y enriquecidos, identificaron que las cantidades de potasio, sodio, hierro y zinc, se duplicaron en el medio rico (YP), con respecto a las cantidades presentes en el medio mínimo (YNB). Como conclusión de este trabajo, los autores sugieren que la mayor cantidad de estos micronutrientes puede ser responsable de las variaciones fenotípicas observadas en algunas cepas microbianas. Adicionalmente, Szabo (1999) reporta que los aminoácidos presentes en el medio YP, se pueden utilizar como fuente de carbono. Probablemente, los resultados observados en nuestro estudio se deban también a que estos factores presentes en los componentes del medio YP interfieran en el proceso de diferenciación tanto de la cepa P01a como de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, a juzgar por lo observado en los cultivos en medio rico en nutrientes como el YPD.

### 9.3 Determinación del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* por OD y por peso seco.

El método más empleado para la estimación de crecimiento es por densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés), mediante la cuantificación de la dispersión de la luz ejercida por una población de células (Zakhartsev et al., 2018). En la primera parte de nuestro estudio se estimó el crecimiento por OD de las cepa control P01a y la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, cultivadas en medio YNB sin glucosa y con 1, 2 ó 4% de glucosa adicionada. Se determinó que el crecimiento de los cultivos fue menor en la cepa doble mutante en comparación a la cepa control P01a en YNB sin glucosa; a diferencia de los cultivos con glucosa, la OD fue mayor en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* pero menor en la control P01a.

Debido a que en experimentos subsecuentes observamos que el crecimiento de la doble mutante es en forma de micelio (hifa) bajo ciertas características del medio, y para descartar que los valores de OD observados estuviesen sobreestimados por la presencia de diferentes formas celulares, decidimos determinar el crecimiento celular considerando el peso seco de los paquetes celulares obtenidos de los diferentes cultivos.

En el estudio realizado por Borland y cols. (2020), se identificó una correlación débil entre la OD y el peso seco de *Y. lipolytica*, en células cultivadas en medio mínimo. Los autores describen que tal relación se debe a posibles cambios morfológicos celulares que desvían la lectura de absorbancia para las mediciones de OD<sub>600nm</sub>, por lo que las mediciones de OD no son consistentes en diferentes condiciones de crecimiento debido a que *Y. lipolytica* es sensible a cambios fisiológicos dependiendo del medio de cultivo. Los resultados obtenidos en nuestro estudio utilizando sendas técnicas (determinación de OD y peso seco) fueron similares, indicando un mayor crecimiento de la doble mutante, en relación a lo observado en la cepa control (P01a).



#### 9.4 Análisis del Crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* en medio mínimo YNB

El crecimiento de la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*, fue mayor en medio mínimo YNB sin glucosa, con respecto a la cepa control P01a; aunque en este medio el crecimiento de ambas cepas fue significativamente menor, con respecto al crecimiento en medios que contienen glucosa como fuente de carbono.

Este suceso se puede relacionar con lo reportado en células de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales activan sus transportadores de nutrientes específicos de alta afinidad para volver a agregar sustrato faltante provocando la activación rápida de la vía PKA durante procesos de inanición (Steyfkens et al., 2018). En el genoma de *Y. lipolytica* se identificaron 24 transportadores de los cuales 6 se han confirmado como transportadores de hexosas (Lazar et al., 2017). Tentativamente, la delección de los genes *GPA* tiene como consecuencia la inactivación de la vía PKA y por lo tanto el mecanismo de sensado de nutrientes (glucosa); es posible que las células de la cepa mutante, al no detectar la presencia de fuentes de carbono (glucosa) activen otras alternativas (sobrexpresión de transportadores de glucosa y de otros sustratos) como mecanismos para mantener su proliferación, lo cual no se vería en la cepa control P01a (con ambos genes *GPA*).

La principal fuente de carbono utilizada universalmente por células eucariotas (incluidas *Y. lipolytica* y otras levaduras como *S. cerevisiae*) es la glucosa. Esta molécula inicia la activación de vías de señalización relacionadas con el crecimiento y desarrollo a través de los receptores acoplados a las proteínas G, las vías adenilato ciclasa y PKA (Schmidt, 2013).

Se han descrito 3 vías que se activan en presencia de glucosa. En la primera, descrita tanto en células de *S. cerevisiae* como de especies de *Candida* participan dos proteínas *Sc Snf3* y *Sc Rgt2* (en *S. cerevisiae*) o *Ca Hgt4* y *Cg Snf3* (en *C. albicans* y *C. glabrata*, respectivamente) que detectan los niveles de glucosa y como resultado activan genes transportadores de hexosas. El segundo mecanismo es a través del receptor acoplado a proteína G (Gpcr 1) provocando la activación de la vía AMPc/PKA al detectar glucosa, este mecanismo también se encuentra conservado y se ha

descrito a profundidad en especies tales como *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata*. El tercer mecanismo es a través de la vía de represión de la glucosa; se ha descrito que en *S. cerevisiae* modula el uso de fuentes alternativas de carbono pero en las especies de *Candida* esta vía no es muy estudiada (Van Ende, Wijnants y Van Dijck, 2019).

En nuestro trabajo, en los cultivos en medios YNB con diferentes concentraciones de glucosa 1, 2 ó 4%, el crecimiento también fue mayor en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, con respecto a la cepa control P01a, lo que nos lleva a concluir que la adición de glucosa en el medio YNB tiene un impacto en el crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*, ya que sin este sustrato la célula no es capaz de crecer. En el estudio de Cervantes-Chavez y cols. (2009), utilizando una mutante de *Y. lipolytica* carente del gen que codifica para la subunidad catalítica de PKA (*tpk1*), reportando que la mutante *Δtpk1* presentó una pequeña disminución en el crecimiento al incubarla (36°C) en medio YNB adicionado con fuentes de carbono diferentes a la glucosa (acetato de sodio, glicerol o etanol).

Aunque la explicación mencionada anteriormente (activación de otras vías en ausencia de genes GPA) podría ser válida para entender el fenómeno observado en la cepa doble mutante (*gpa1-Δ/gpa2-Δ*), no debemos descartar la posibilidad de analizar el efecto de otros agentes que modifican tanto el dimorfismo como el crecimiento, sobre las células carentes de los genes GPA. Probablemente analizar otras variables como el pH, temperatura, expresión de genes involucrados en el sensado de nutrientes y otras fuentes de carbono, permita identificar algunos otros efectores del dimorfismo y crecimiento en la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*.

## 9.5 Crecimiento de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* en medio rico en nutrientes

Cuando se comparó el crecimiento (determinado por peso seco) de la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* con respecto al crecimiento de la control P01a (ambas se cultivaron en medio de cultivo YPD-2% glucosa), no se observaron diferencias en el crecimiento.

En un estudio realizado por Cervantes-Chavez y cols. (2009) al utilizar cepas mutantes diferentes a las nuestras, pero que participan en el mismo mecanismo de señalización (vía AMPc-PKA), no observaron diferencias en el crecimiento celular al comparar las cepas mutantes (P01a,  $\Delta ste11$ ,  $\Delta tpk1$ , doble mutante  $\Delta tpk1/\Delta ste11$ ) con la cepa control de *Y. lipolytica*. En su trabajo, los autores utilizaron placas con medio YNB adicionado con 2% de diferentes fuentes de carbono (glucosa, acetato de sodio, glicerol, etanol o galactosa) y YPD.

En un estudio mas reciente, Maslanka y Zadrag-Tecza (2019) analizaron el crecimiento de cepas mutantes de *S. cerevisiae* ( $\Delta gpa2$  y  $\Delta gpr1$ ) en medio YP (extracto de levadura 1% y peptona 1%) adicionado con diferentes concentraciones de glucosa (0.5, 2 ó 4%). Los autores compararon sus resultados utilizando como control a la cepa WT BY4741 y observaron un crecimiento menor de todas las cepas mutantes, en los cultivos con restricción calórica (0.5% de glucosa). Además, observaron que el crecimiento de la cepa silvestre fue directamente proporcional a la concentración de glucosa (0.5, 2 ó 4%), por el contrario, el crecimiento de las cepas mutantes  $\Delta gpa2$  y  $\Delta gpr1$  fue inversamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

Los resultados descritos obtenidos con las mutantes de *S. cerevisiae* y con mutantes de *Y. lipolytica* generadas por delección de otros genes cuyos productos tienen participación importante en estas vías de señalización son similares a los observados en el presente trabajo (con la cepa doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* de *Y. lipolytica*), lo cual sugiere que al bloquearse la continuidad de esta vía (por delección de los genes mencionados) las células pierden la capacidad de detectar la presencia de glucosa en el entorno, lo que trae como consecuencia la falta de modulación de algunos otros

mecanismos como la incorporación de glucosa a la célula; lo que podría explicar el hecho de que en ausencia de la vía PKA-AMPc (por delección de los genes *GPA*), las células no regulen de manera efectiva la incorporación de glucosa y que por lo tanto, haya una mayor incorporación de glucosa, lo que conlleva a un aumento en el metabolismo celular y por lo tanto, al aumento en la velocidad de crecimiento determinado en la cepa doble mutante. De la misma manera, es posible que al no sentir la presencia de glucosa, las células modifican su morfología, en respuesta a las condiciones presentes en el entorno.

Se ha descrito que las células eucariotas -desde levaduras hasta mamíferos- responden ante una restricción nutricional mediante la activación de vías de señalización conservadas en las diferentes especies; por ejemplo la vía activada por rapamicina (TOR: Target Of Rapamicine), las proteínas quinasa A (PKA) o B (PKB/Akt) y la proteína quinasa dependiente de AMPc (AMPK/Snf1) esta red de vías de señalización controlan los mecanismos de la defensa del estrés celular, mecanismos reguladores del ciclo y proteínas pro y antiapoptóticas (Ferretti, Larocca y Favre, 2012).

Tomados juntos, los resultados mostrados en este trabajo sugieren que para que se hagan notorios los cambios mencionados (aumento en la velocidad de crecimiento y cambios en la capacidad dimórfica) en las células de la cepa doble mutante, no solo se requiere la delección de los genes *GPA* (inactivación de la vía PKA-AMPc) sino que para que se manifiesten estos cambios, es necesario que la célula tenga restricción de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, a juzgar por los efectos observados en los cultivos en medio YPD (rico en nutrientes) y YNB (carente de nutrientes). Lo anterior nos permite concluir que se acepta la hipótesis propuesta en este proyecto de investigación: el estrés nutricional afecta la morfología y el crecimiento de las células de *Yarrowia lipolytica*, en ausencia de los genes *GPA*.

## 10. CONCLUSIONES

- Utilizando como fondo genético la cepa mutante *GPA1* de *Y. lipolytica*, se generó una doble mutante carente de los genes *GPA1* y *GPA2* que codifican para la subunidad Alpha de la proteína G heterotrimérica.
- La restricción de nutrientes en el medio de cultivo (YNB) condiciona la capacidad dimórfica de la doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ*.
- La doble mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* mantiene la forma de levadura en el medio de cultivo rico en nutrientes (YPD), y crece en forma de micelio en medio mínimo pobre en nutrientes (YNB).
- La mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* presenta un menor crecimiento, con respecto a la cepa control P01a en medio YNB sin adición de fuente de carbono (glucosa).
- El crecimiento de la cepa mutante *gpa1-Δ/gpa2-Δ* es mayor (en comparación a la cepa P01a) cuando al medio mínimo YNB se adiciona glucosa como fuente de carbono.
- El estrés nutricional afecta la morfología y el crecimiento de las células de *Yarrowia lipolytica*, en ausencia de los genes *GPA*

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abelovska, L., Bujdos, M., Kubova J., Petrezselyova S., Nosek, J. y Tomaska, L. (2007). Comparison of element levels in minimal and complex yeast media. *Canadian journal of microbiology*. 53(4), 533-535. <https://doi.org/10.1139/W07-012>.
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J., Bertoni, G. P., Azcoitia, E I. y Muñoz, C. A. (2007). *El mundo de la célula*. (6th ed.). Madrid: Pearson Educación.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. (62), 293–300. <https://jlb.asm.org/content/62/3/293.long>.
- Bremont, F., Hernández, A. y Kessler, M. (2012). Development and dimorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica*. En J. Ruiz Herrera (Ed.), *Dimorphic Fungi: Their Importance As Models For Differentiation And Fungal Pathogenesis* (pp. 58–66). Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/978160805364311201010058>.
- Briones, A. (2017). Efecto del glicerol como fuente de carbono sobre el crecimiento de *Yarrowia lipolytica*. (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192(1), 73–105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>.
- Cabralles, C. (2012). *Expresión de una proteína CRY1 Bacillus thuringiensis en la levadura Yarrowia lipolytica*. (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzone, M R y Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews*. (6), 765–781. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0026>.
- Campos, R. (2012). Receptores acoplados a proteínas G. *Revista Química PUCP*, (26), 1–2. <http://revistas.pucp.edu.pe/quimica>.
- Caretta, A. y Mucignat-Caretta, C. (2011). Protein kinase a in cancer. *Cancers*, 3(1), 913–926. <https://doi.org/10.3390/cancers3010913>.
- Cervantes-Chávez, J A., Kronberg, F., Passeron, S. y Ruiz-Herrera, J. (2009). Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*. 46(5), 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.005>.
- Chantranupong, L., Wolfson, R L. y Sabatini, D. M. (2015). Nutrient-Sensing mechanisms across evolution, *Cell*, 161(1), 67–83. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.041.
- Clark, D., Pazdernik, N J. y McGehee, M. R. (2018). *Molecular Biology* (3 th ed.). Academic Cell.

- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M y Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology*, 38(2), 254-299. doi: 10.1111/1574-6976.
- Desjardins, P y Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: Journal of Visualized Experiments*, (45), 2565. doi:10.3791/2565.
- Dymond, J. S. (2013). *Saccharomyces cerevisiae Growth Media. Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*. 191-204. doi:10.1016/b978-0-12-420067-8.00012-x.
- Engin A. (2017) Human protein kinases and obesity. *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 960. Springer. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-48382-5\\_5#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-48382-5_5#citeas).
- Ferretti, A. C., Larocca, M C. y Favre, C. (2012). Nutritional stress in eukaryotic cells: oxidative species and regulation of survival in time of scarceness. *Molecular genetics and metabolism*, 105(2), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.11.007>.
- García-Rico, R O. y Fierro, F. (2017). Role of G-protein alpha sub-units in the morphogenic processes of filamentous *Ascomycota* fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*. 34(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.06.005>
- Gautam, N., Downes, G., Yan, K. y Kisselev, O. (1998). The G-protein  $\beta\gamma$  complex. *Cellular Signalling*, 10(7), 447–455. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00006-0).
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J., Berardi, E., Veenhuis, M. y Vanderklei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*. 5(11), 1079–1096. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.06.004>.
- Guo, L., Yang, Y., Yang, L., Wang, F., Wang, G. y Huang, J. (2016). Functional analysis of the G-protein  $\alpha$  subunits *FGA1* and *FGA3* in the banana pathogen *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 94, 75–82. doi:10.1016/j.pmp.2016.04.003
- Hamm, H. (1998). The many faces of G protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 273(2), 669–672. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.669>.
- Harzevili, F. (2014). *Biotechnological Applications of the Yeast*. New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06437-6>.
- Heldin, Carl-Henrik., Lu, B., Evans, R. y Gutkind, J. S. (2016). Signals and receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4), 1-27. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005900>.

- Helper, J R. y Gilman, A. G. (1992). Second messenger generation and destruction. *Policy Studies Journal*, 20(1), 22–40. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0072.1992.tb01438.x>.
- Hilário-Souza, E., Cuillel, M., Mintz, E., Charbonnier, P., Vieyra, A., Cassio D. y Lowe, J. (2016). Modulation of hepatic copper-ATPase activity by insulin and glucagon involves protein kinase A (PKA) signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1862(11), 2086-2097. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.08.008.
- Huerta, J. (2014). Papel de la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica en el sensado de glucosa y en la diferenciación celular del hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*. (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T. y Takata, R. (2002). Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 41, 407–413. doi: 10.1007/s00294-002-0322-y
- Krejčí, A. (2012). Metabolic sensors and their interplay with cell signalling and transcription. *Biochemical Society Transactions*, 40(2), 311–323. <https://doi.org/10.1042/BST20110767>.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The Yeasts*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>.
- Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K. y Filipek, S. (2012). G protein-coupled receptors-recent advances. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 515–529. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>.
- Lazar, Z., Neuvéglise, C., Rossignol, T., Devillers, H., Morin, N., Robak, M., Nicaud, J M. y Crutz-Le Coq, A. M. (2017). Characterization of hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* reveals new groups of Sugar Porters involved in yeast growth. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 100, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.001>.
- Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C. y Kim, Y. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 1–5 <https://doi.org/10.3791/3923>.
- Lim, W., Mayer, B. y Pawson, T. (2015). *Cell signaling principles and mechanisms*. New York: Taylor y Francis group.
- Lima Martínez, M. M., Betancourt, L. y Bermúdez, A. (2011). Glucagón: ¿un simple espectador o un jugador clave en la fisiopatología de la diabetes?. *Avances En Diabetología*, 27(5), 160–167. doi: 10.1016/j.avdiab.2011.09.002.
- Liu, R., Wong, W y Jzerman, A. P. (2016). Human G protein-coupled receptor studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Pharmacology*, 114, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.02.010>.



- Maslanka, R. y Zadrąg-Tecza, R. (2019) .Less is more or more is less: Implications of glucose metabolism in the regulation of the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Journal of Cellular Physiology*.234(10). <https://doi.org/10.1002/jcp.28386>.
- Mauersberger, S., Wang, H. J., Gaillardin, C., Barth, G. y Nicaud, J. M. (2001). Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes Involved in hydrophobic substrate utilization. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 5102–5109. <https://doi.org/10.1128/JB.183.17.5102-5109.2001>.
- Mckee, T. y Mckee, J. (2014). *Bioquímica las bases moleculares de la vida* (5th ed.). McGraw Hill.
- Montes, B., Restrepo, A. y McEwen, J. G. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*. 23 (2), 213-214.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kenelly, P., Rodwell, V. y Weil, A. (2013). Harper. *Bioquímica ilustrada* (29th ed.). McGraw Hill.
- Oldham, W. y Hamm, H. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G protein coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>.
- Ortiz, M. (2009). Proteína quinasas como dianas farmacológicas. *Redes de señalización y estrategias terapéuticas*, (pp. 15–45). <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/808>.
- Peeters, K. y Thevelein, J. (2014). Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism. En J. Piškur y C. Compagno (Eds.). Berlin, Heidelberg: *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3>.
- Prieto, J., Solano, R., Carmena, M. y Sánchez-Chapado, M. (2005). Importancia de las proteínas G heterotriméricas en la biología molecular del cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 29, 948–954.
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T S y Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549–555. doi:10.1038/nature10361.
- Richard, G., Kerrest, A., Lafontaine, I. y Dujon, B. (2005). Comparative genomics of *hemiascomycete* yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 22(4), 1011–1023. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi083>.
- Ronchi, C. L. (2019). cAMP/PKA signaling pathway and adrenocortical adenomas. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.003>.

- Ruiz-Herrera, J. y Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol.* 178(6), 477-483. doi: 10.1007/s00203-002-0478-3.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual (3rd ed.). United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapio, L., Di Maiolo, F., Illiano, M., Esposito, A., Chiosi, E., Spina, A. y Naviglio, S. (2014). Targeting protein kinase A in cancer therapy: an update. *EXCLI Journal*, 13, 843–855. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417307> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4464521>.
- Schmidt M. C. (2013). Signaling crosstalk: integrating nutrient availability and sex. *Science signaling*, 6(291). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004589>
- Shpakov, A. (2013). Heterotrimeric G Proteins. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second*, 454–456. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00706-3>.
- Steyfkens, F., Zhang, Z., Van Zeebroeck, G. y Thevelein, J. M. (2018). Multiple transceptors for macro- and micro-nutrients control diverse cellular properties through the PKA pathway in yeast: a paradigm for the rapidly expanding world of eukaryotic nutrient transceptors up to those in human cells. *Frontiers in pharmacology*, 9, 191. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.0019>.
- Syrovatkina, V., Alegre, K., Dey, R. y Huang, X. (2017). Regulation, signaling and physiological functions of G-proteins. *J Mol Biol*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>.
- Szabo, R. y Stofaníková, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett.* 206(1), 45-50. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10984.x.
- Szabo, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol (Praha)*. 44(1), 19-24. doi: 10.1007/BF02816215.
- Tamaki, H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase a pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4), 245-250. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.245>.
- Tong, Y., Wu, H., Liu, Z., Wanf, Z. y Huang, B. (2020). G-Protein subunit Gai in mitochondria, MrGPA1, affects conidiation, stress resistance, and virulence of entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Frontiers in microbiology*, 11, 1251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01251>
- Valdespino, V., Valdespino, P. y Valdespino, V. (2015). Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugía y Cirujanos*, 83(2), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.015>.

- Van Ende, M., Wijnants, S. y Van Dijck, P. (2019). Sugar Sensing and Signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology*, 10, 99. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00099>.
- Vogelstein, B. y Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Biochemistry*, 76(2), 615–619. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC382999/pdf/pnas00002-0073.pdf>.
- Wang, H. J., Hung, W. y Tsai, S. H. (2011). High Efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Microbiology*, 49(3), 469–472.
- Wang, P. y Heitman, J. (1999). Signal transduction cascades regulating mating, filamentation, and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 2(4), 358–362. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80063-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80063-0).
- Weinstein, L. S. (2014). Role of G $\alpha$  in central regulation of energy and glucose metabolism. *Hormone and Metabolic Research*, 46(12), 841–844. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1387798>.
- Wellen, K. E. y Thompson, C. B. (2010). Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molecular Cell*, 40(2), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.004>.
- Yu, H., Seo, J., Kim, J., Han, K., Shim, W., Yun, S. y Lee, Y. (2008). Functional analyses of heterotrimeric G protein and subunits in *Gibberella zeae*. *Microbiology*, 154(2), 392–401. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012260-0>.
- Zakhartsev, M. y Reuss, M. (2018). Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS yeast research*, 18(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy052>.