



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN EN RESPUESTA AL ESTRÉS
HIPOTÉRMICO EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Autora

Pamela Mishell Mosquera Carrera

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN EN RESPUESTA AL ESTRÉS
HIPOTÉRMICO EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. Andrea Pala Cordero Arroyo

Autora

Pamela Mishell Mosquera Carrera

Año

2019

DECLARACIÓN DE LA PROFESORA GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Regulación de la replicación del ADN en respuesta al estrés hipotérmico en *Saccharomyces cerevisiae*, a través de reuniones periódicas con la estudiante Pamela Mishell Mosquera Carrera, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Andrea Paola Cordero Arroyo
MSc. en Células Madre y Medicina Regenerativa
CI:1714669825

DECLARACIÓN DE LA PROFESORA CORRECTORA

Declaro haber revisado este trabajo, Regulación de la replicación del ADN en respuesta al estrés hipotérmico en *Saccharomyces cerevisiae*, de Pamela Mishell Mosquera Carrera, en el semestre 201910 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Maria Isabel Baroja Oviedo
Máster en Biotecnología Biomédica
CI:1720077211

DECLARACIÓN DE LA DIRECTORA CIENTÍFICA

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Ph.D Ana María Poveda Gabaldon

Ph.D en Bioquímica

CI:1750668129

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Pamela Mishell Mosquera Carrera

CI:1724230378

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la fuerza y sabiduría para culminar mi carrera. A mis Padres Germán y Sofía, a mi hermano José por todo su apoyo. A la Universidad Central del Ecuador, el Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis (CIZ), de manera especial a PhD. Ana Poveda y MSc. Eliana Lara, quienes con mucha paciencia supieron guiarme durante este arduo camino y me acogieron como una estudiante más. Al laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, donde se desarrollo parte de este trabajo. A mis colegas de laboratorio Gaby, Jesse, Cris (mi pasante) y Caro por los gratos momentos.

DEDICATORIA

A mi familia, quienes me han apoyado siempre. A mi madre, sin su apoyo y paciencia no hubiera sido posible cumplir esta meta. A mi segunda madre, mi abuelita Lupe, quien con sus sabios consejos y amor supo hacer de mi una gran mujer.

RESUMEN

Se han realizado varios estudios en cuanto al ciclo celular, muchos de ellos encaminados a comprender los mecanismos de regulación de la replicación y reparación del ADN. En este trabajo se utilizó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para analizar la regulación de la replicación del ADN en respuesta al estrés hipotérmico. Se utilizaron diferentes cepas de *S. cerevisiae* que tienen deleciones en una o dos actividades enzimáticas de las rutas del *checkpoint* en la fase S del ciclo celular. Mediante el uso de técnicas microbiológicas se determinó el crecimiento de las diferentes cepas a 25°C y 4°C (*drop test* y curvas de crecimiento). Una vez establecido el tiempo de crecimiento de las diferentes cepas y su comportamiento a 4°C, se sincronizaron la cepa salvaje y las cepas mutantes con respecto a la fase S del ciclo celular para determinar si existían diferencias entre la replicación de ambas, se verificó el proceso mediante el análisis de muestras mediante citometría de flujo, medida de absorbancia a 600nm y monitoreo *budding index*. Posteriormente, se realizó electroforesis de campos pulsados (PFGE) con el fin de analizar el progreso de la replicación del ADN de la cepa salvaje y las mutantes *dot1Δ*, *hog1Δ* y *hog1Δ dot1Δ*; seguido de ello, se realizó Western Blot para observar la activación de Rad53, Hog1 y la metilación de la histona H3 a 25°C y 4°C. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa salvaje es más sensible al estrés hipotérmico que la cepa *dot1Δ* (*drop test*). Así mismo, en la cepa salvaje se observó un paro en la replicación (PFGE). No se encontró activación de la proteína Rad53 a 4°C, contrario a la activación de Hog1 a la misma temperatura. Estos datos en conjunto sugieren que la respuesta al estrés hipotérmico está regulada por Hog1 y Dot1, independiente de la ruta dependiente de Rad53.

ABSTRACT

Several studies have been carried out regarding the cell cycle, many of them aimed at understanding the mechanisms of regulation of DNA replication and repair. In this work, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as a model to analyze the regulation of DNA replication in response to hypothermic stress. Different strains of *S. cerevisiae* that have deletions in one or two enzymatic activities of the checkpoint routes in the S phase of the cell cycle were used. Through the use of microbiological techniques the growth of the different strains was determined at 25 ° C and 4 ° C (drop test and growth curves). Once established the growth time of the different strains and their behavior at 4 ° C, the wild strain and the mutant strains were synchronized with respect to the S phase of the cell cycle to determine if there were differences between the replication of both, it was verified the process by means of the analysis of samples by means of flow cytometry, measure of absorbance to 600nm and monitoring budding index. Subsequently, pulsed-field electrophoresis (PFGE) was performed in order to analyze the progress of DNA replication of the wild-type strain and the *dot1Δ*, *hog1Δ* and *hog1Δ dot1Δ* mutants; followed by a Western Blot to observe the activation of Rad53, Hog1 and methylation of histone H3 at 25 ° C and 4 ° C. The results obtained showed that the wild strain is more sensitive to hypothermic stress than the *dot1Δ* strain (drop test). Likewise, a stoppage in replication (PFGE) was observed in the wild strain. No activation of the Rad53 protein was found at 4 ° C, contrary to the activation of Hog1 at the same temperature. These data together suggest that the response to hypothermic stress is regulated by Hog1 and Dot1, independent of the Rad53-dependent pathway.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación de la investigación	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.2 Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	8
2.3 Ciclo de vida de la levadura	9
2.4 Ciclo celular	10
2.5 Sistemas de control en el ciclo celular	12
2.6 Fase S del ciclo celular	14
2.7 Rutas del <i>checkpoint</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.7.2 Proteínas adaptadoras del <i>Checkpoint</i>	18

2.7.3	Proteínas quinasas efectoras del <i>checkpoint</i>	19
2.7.9	<i>Replication Damage Checkpoint</i> (DCR).....	21
2.8	Ruta HOG en respuesta a los cambios de temperatura en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.8.1	Cambios de temperatura en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.	CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS	26
3.1.1	Población	26
3.1.2	Muestra	27
3.2	Materiales y métodos para la obtención de datos	29
3.2.1	Medios de cultivo	29
3.2.2	Determinación de la sensibilidad a diferentes temperaturas: goteos seriados (<i>Drop test</i>)	30
3.2.3	Curva de crecimiento	30
3.2.4	Sincronización celular con factor α	31
3.2.5	<i>Flow Cytometry Data Analysis</i> (FACs).....	31
3.2.6	<i>Budding Index</i>	32
3.2.7	Extracción de proteínas totales.....	32
3.2.8	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	33
3.2.10	Electroforesis de campos pulsados	35
3.3	Diagrama de flujo.....	37

3.4 Analisis estadístico de los resultados.....	38
3.4.1 Unidad de estudio	38
3.4.2 Variable de estudio	38
3.4.3 Factores controlables.....	38
3.4.4 Matriz de operacionalización de variables	39
3.4.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	39
3.4.6 Técnicas de procesamiento de análisis de datos	40
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1 Evaluación de la sensibilidad de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes temperaturas	41
4.2 Determinación de la ruta del <i>checkpoint</i> implicada en la respuesta al estrés hipotérmico.	47
4.3 Metilación de la histona H3 en respuesta al estrés hipotérmico.....	57
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
5.1 Conclusiones	61
5.2 Recomendaciones	62
REFERENCIAS.....	63
ANEXOS	73

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Se han realizado múltiples estudios de la fase de síntesis (fase S) del ciclo celular en diferentes organismos para comprender la regulación de la replicación y reparación de los daños que sufre el ADN durante esta fase. Dentro de estos se encuentran los relacionados con la ruta del *checkpoint* de fase S.

Se entiende como *checkpoint* a los mecanismos de vigilancia y control que aseguran el orden de los eventos en el ciclo celular y la supervivencia de la célula ante perturbaciones de distinta naturaleza (Hartwell & Weinert, 1989). En el ciclo celular existen varios puntos de control que son los que garantizan su correcta progresión. Si no existe ninguna alteración el ciclo continúa de forma normal, pero si hay algún tipo de inconveniente, las proteínas sensoras detectan el daño e inician una cascada de transducción de señales que llega hasta las proteínas efectoras que actúan sobre dianas, que ponen en marcha la respuesta celular. Como resultado se detiene del ciclo, se soluciona el problema y se reanuda para concluir con la división celular (Soriano, 2012).

Varios modelos de experimentación han sido utilizados para el estudio del *checkpoint* del ciclo celular. En este trabajo se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, misma que resulta muy interesante por el amplio conocimiento que se tiene acerca de su genoma y porque su manejo no implica problemas éticos. Además una gran parte de sus genes se encuentran evolutivamente conservados y se han identificado sus correspondientes homólogos en humanos (Sikorski & Hieter, 2013).

Estudios en *Saccharomyces cerevisiae* han identificado varios componentes que forman parte de la red encargada de preservar la integridad del ADN. Las principales rutas bioquímicas de señalización se encargan de detectar los daños

en la horquilla de replicación (DRC, *DNA Replication Checkpoint*) y los daños en el ADN (DDC, *DNA Damage Checkpoint*) (Pan, 2006).

La proteína Rad53 se activa como respuesta al daño en el ADN y es requerida para el bloqueo celular. Al fosforilarse se activa y así evita transiciones aberrantes en las horquillas de replicación. Esta proteína es homóloga a CHEK2 (relacionada con el cáncer de mama) en humanos (Schwartz, 2002). Se ha estudiado la respuesta de esta proteína frente a diferentes agentes genotóxicos como Hidroxiurea (HU) y Metilmetanosulfonato (MMS) (Ohouo, Bastos de Oliveira, Liu, Ma, & Smolka, 2012).

Otros de los procesos que regulan la progresión del ciclo celular son las modificaciones postraduccionales en la cromatina. Las proteínas implicadas en este proceso se utilizan como marcadores epigenéticos. Una de las modificaciones más estudiadas es la metilación de las histonas en la que se destaca la histona H3 metilada .

La temperatura óptima de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es 25 °C. Sin embargo, cuando la célula es sometida a estrés hipotérmico (temperaturas de 4 °C-16 °C) o estrés hiperosmótico, se activa la ruta de respuesta frente a la alta osmolaridad inducida por glicerol (HOG, *hyperosmolarity glicerol*), cuya proteína efectora es Hog1 (Hayashi & Maeda, 2006). El estrés hipotérmico es considerado como uno de los factores que puede despertar la respuesta de cientos de genes que son inducidos por la proteína Hog1. Se ha descrito en *S.cerevisiae* que la fosforilación por la proteína quinasa Hog1 para activar a Mrc1, proteína encargada de coordinar la replicación y la transcripción en respuesta a estrés (Duch, 2013), retrasa la activación de orígenes de replicación tempranos y tardíos, y que este proceso es independiente de Rad53 y Mec1, que es un transductor de señal necesario para la detención del ciclo celular en respuesta a estrés en el proceso de replicación. Por lo cual se ha definido a Hog1

y Mrc1 como un nuevo punto de control de la fase S independiente de la ruta de *checkpoint* encargada de detectar los daños en el ADN (Duch, 2012).

Estudios realizados en el Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador (A.P., comunicación personal) determinaron la sensibilidad de cepas de levadura con deficiencia en una o varias actividades enzimáticas de las rutas de *checkpoint* cuando crecieron a 25 °C (control), más la sensibilidad no se observa a 16 °C cuando se compara con la cepa salvaje. Estudios del laboratorio indicaron que estos dobles mutantes no son capaces de reprimir los orígenes de replicación tardíos y por tanto tienen un mayor número de orígenes de replicación activos, lo que puede explicar que estas cepas sobreviven mejor a bajas temperaturas porque son capaces de completar la replicación más rápidamente que los simples mutantes o el salvaje. Un análisis *Western Blot* sugiere que esta ruta no es regulada por Rad53, ya que no se determinó fosforilación a bajas temperaturas. En conjunto estos datos sugieren una posible activación de la ruta HOG, que regula la activación de los orígenes de replicación.

1.2 Planteamiento del problema

Las alteraciones que sufre el ADN durante su síntesis se ha convertido en un foco importante de estudio durante los últimos tiempos, puesto que las mismas se asocian a enfermedades genéticas y son tomadas en cuenta como una de las principales causas del cáncer (Lisby & Rothstein, 2009).

En la actualidad se ha incrementado el número de estudios en cuanto al metabolismo del cáncer y el vínculo que puede tener con la replicación/reparación del ADN. Sin embargo, no se ha explorado este campo de forma apreciable. De forma general, pueden existir problemas como metilaciones y

acetilaciones que afecten al plegamiento del ADN. Además, se puede ver afectada la síntesis de nucleótidos y finalmente, las especies reactivas del oxígeno pueden aumentar el daño oxidativo del ADN. Además, mientras el metabolismo afecta la reparación del ADN, el daño en esta molécula también puede inducir afecciones metabólicas (Turgeon, Perry, & Poulogiannis, 2018).

Una de las características de las células cancerosas es la velocidad acelerada con la que se replican, esto sucede comúnmente porque tienden a ignorar los puntos de control de la división y crecimiento celular. Este crecimiento se puede ver estimulado por varios factores que pueden ser químicos o físicos (BROOKES & LAWLEY, 1964).

Entre los factores físicos que han sido de poco estudio, la temperatura constituye una de las tensiones más comunes que experimentan varios tipos de organismos, desde bacterias hasta plantas y animales; es por ello que se ha estudiado el efecto del choque térmico en un gran número de organismos y sistemas celulares modelo (Al-Fageeh & Smales, 2006). Pero aun así la información proporcionada no es suficiente ya que pueden existir varios mecanismos moleculares que se estén ignorando.

Dentro de los mecanismos que no se encuentran claramente dilucidados se encuentra la posible relación de la ruta del *checkpoint* con la ruta HOG. Se debe determinar la relación entre las rutas de señalización intracelular ya que en muchas ocasiones la interacción entre ellas frente a algún tipo de estrés físico puede desencadenar en fenotipos que afecten la integridad del genoma.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Analizar la regulación de la replicación del ADN en respuesta al estrés hipotérmico en *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la sensibilidad y viabilidad de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes temperaturas.
- Determinar la ruta de *checkpoint* implicada en el estrés hipotérmico (determinación de la activación de Rad53 y/o Hog1 mediante *Western blot*).
- Analizar la replicación en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cuando son expuestas a diferentes temperaturas.
- Analizar las modificaciones de la cromatina en respuesta al estrés hipotérmico (metilación del ADN)

1.4 Justificación de la investigación

En el ADN constantemente ocurren cambios causados por mutaciones acumuladas, pero estos no repercuten en enfermedades debido a que existen sistemas de reparación que ayudan a controlar estas variaciones en el genoma. Si, por el contrario, los mecanismos de reparación no funcionan las mutaciones se heredan de la célula madre a las hijas.

Se conocen que varias enfermedades, entre ellas el cáncer, que se desarrollan en parte por la acumulación de múltiples mutaciones en genes relacionados con la división en una misma célula (Hang, 2010). Es allí, donde nace la necesidad de generar conocimiento acerca de los mecanismos de reparación y replicación del ADN, ya que con este conocimiento se puede dar paso a nuevas dianas terapéuticas y la generación de nuevos fármacos.

Las levaduras por su parte también han mostrado ser un modelo viable para el estudio del ADN y los procesos en los que este interviene. En cuanto al estudio del efecto del estrés hipotérmico en *Saccharomyces cerevisiae* se ha sugerido que la proteína Hog1 quien ayudaría a la supervivencia (Alonso-Monge, Ureña, Nombela, & Pla, 2007). Lo cual resulta de interés ya que esta proteína es homóloga a la proteína p38 MAPK en humanos. Esta proteína es la encargada de recibir varios estímulos que producen una respuesta frente a procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc. (Romanov, 2017). Por lo que, estudiar cómo está implicada la proteína Hog1 dentro de los procesos de reparación y replicación del ADN y la relación que existe con las rutas del *checkpoint* ayudaría al entendimiento de su homóloga en humanos. Además estudiar la metilación del ADN permitirá ampliar el conocimiento relacionado con el cáncer, puesto que patrones de hipo-metilación permiten que las células tumorales proliferen.

Con esta investigación se pretende contribuir con conocimiento en el área de la replicación del ADN cuando se somete a las células a estrés hipotérmico.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura unicelular, eucariota simple y su genoma contiene alrededor de seis mil genes distribuidos en dieciséis cromosomas (Geiser, John R. & Carrico, Pauline M., 2014).

Es conocida comúnmente como la levadura panadera o cervecera, estos nombres le fueron otorgados desde la antigüedad debido a su capacidad de fermentar azúcares (Mortimer, 2000). Sin embargo, en el mundo científico este microorganismo es utilizado como un modelo de célula eucariota que contiene organelos, sistema de endomembrana y mitocondria. Además, en condiciones normales de laboratorio se divide en un tiempo aproximado de 90 minutos. Debido a su forma de reproducción incluso en condiciones no óptimas, se la ha denominado “*budding yeast*” (figura 1), lo cual quiere decir que es una levadura de gemación. El tamaño de una célula de levadura es de aproximadamente 5µm de diámetro, el cual está entre el tamaño de células de bacterias y humanos, su manejo y mantenimiento en laboratorio no implica costos elevados y procesos complejos (Duina, Miller, & Keeney, 2014)

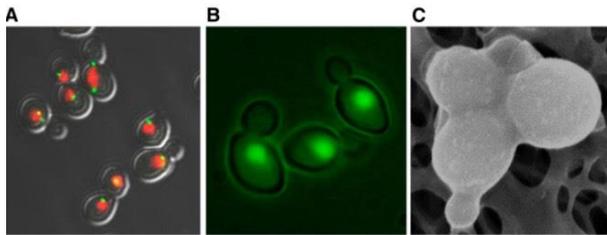


Figura 1. *Budding yeast*

(a) Microscopia confocal fluorescente de levaduras haploides que expresan el gen GFP.

(b) Microscopia epifluorescente de levaduras diploides.

(c) Microscopia electrónica de una levadura en proceso de división

Tomado de Duina, 2014

En 1996, se realizó la primera secuenciación de una célula eucariota y esta fue de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau, 1996). Esto proporcionó información de varios aspectos de la organización del genoma y la evolución. Una levadura haploide tiene alrededor de 12,000 kb de ADN que se encuentran subdivididos en 16 cromosomas (Kellis, Birren, & Lander, 2004). Con el pasar del tiempo se estudiaron varios de los genes que poseía este microorganismo, los mismos que

en la actualidad se encuentran registrados en la base de datos <http://www.yeastgenome.org/> (Duina, 2014).

2.2 Levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

Por varios años se ha utilizado a *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo en laboratorio por varias razones. En primer lugar, no es un organismo patógeno para humanos por lo cual facilita su manipulación en el laboratorio. No se requiere temperaturas extremas para su crecimiento puesto que crece de forma óptima en un rango de 25-30 °C; su tiempo de duplicación es de aproximadamente 90 minutos, lo que permite realizar experimentos en un día, y esta levadura tiene varias proteínas que son homólogas a las que se encuentran en humanos, muchas de ellas son de interés ya que están relacionadas con los procesos de división celular, por lo cual se puede realizar una correlación entre investigaciones para facilitar los procesos de comprensión en diferentes áreas de estudio (Geiser, John R. & Carrico, Pauline M., 2014).

En segundo lugar, la levadura aprovecha los marcadores auxotróficos para estudiar genes específicos y cromosomas asociados. Estos consisten en mutaciones en las rutas biosintéticas que se usan para sintetizar componentes celulares como aminoácidos y nucleótidos.

En tercer lugar, debido al conocimiento de su genoma y composición celular, las levaduras pueden ser fácilmente transformadas usando plásmidos. Todo lo que se requiere es un marcador auxotrófico para seguir al plásmido a través de las próximas generaciones, un origen replicativo de levadura y una región en la que se pueda insertar el gen de interés (Geiser, John R. & Carrico, Pauline M., 2014). Por otro lado, la levadura es el organismo de elección cuando se desea examinar e identificar la interacción entre proteínas.

Gracias a todos los estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, se han identificado varios genes y dilucidado varios mecanismos moleculares incluyendo la regulación del ciclo celular, procesos de replicación del ADN, transcripción de ADN y traducción de ARNm en proteínas. Sin embargo, aún hay mucho que aprender de la levadura y sin lugar a duda, este microorganismo continuará proporcionando información por los próximos años.

Es por todo lo antes mencionado que *Saccharomyces cerevisiae* posee una de las selecciones más avanzadas de herramientas genéticas disponibles para organismos eucarióticos, y ha servido como modelo para descubrimientos enfocados en los mecanismos de regulación de genes y otros procesos celulares en las últimas décadas (Duina, 2014).

2.3 Ciclo de vida de la levadura

La levadura tiene dos formas de reproducción, sexual y asexual. Cuando la reproducción sucede de forma asexual la célula pasa por un proceso denominado brotación en el cual todos los componentes de la célula madre se encuentran duplicados y de ella se comienza a generar la nueva célula (Geiser, John R. & Carrico, Pauline M., 2014).

La reproducción sexual se produce debido a que la célula de levadura se puede encontrar de manera estable como un organismo diploide o haploide, sin embargo solo el organismo haploide es capaz de aparearse e intercambiar información genética (Geiser, John R. & Carrico, Pauline M., 2014). Las células haploides pueden encontrarse de dos tipos MAT α y MAT a . El haploide del tipo MAT a produce la feromona “factor a”, mientras que la MAT α produce “factor α ”. Cada célula posee un receptor que le permite producir la feromona de la célula opuesta, mientras que la célula que posee “factor a” causa el arresto celular de las haploides α en la fase G1 del ciclo celular, el “factor α ” causa el mismo efecto

en las haploides a. La presencia de dos haploides diferentes, resulta en el contacto celular, fusión y formación de una célula diploide como se indica en la Figura 2 (Dickinson & Schweizer, 2004).

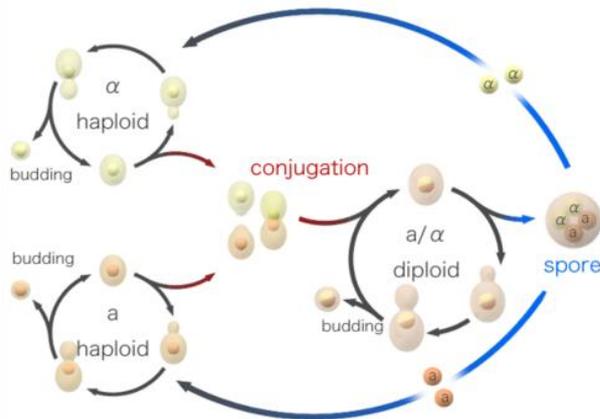


Figura 2. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Tomado de Dickinson & Schweizer, 2004

2.4 Ciclo celular

La reproducción de una célula conlleva la distribución del material genético en dos células hijas. Lo más notable en la división es la fidelidad con que el ADN pasa de una generación a la siguiente. Este proceso consiste, de forma general, en que la célula en división duplica su material genético, las dos copias se trasladan a los extremos opuestos de la célula y solo entonces se divide en dos células hijas (Campbell, Urry, & Reece, 2007, p. 73-74).

En el año 1882 el anatomista Walther Flemming desarrolló tinciones que permitieron observar por primera vez el comportamiento de los cromosomas durante el proceso de mitosis y la citocinesis. En los experimentos desarrollados por este científico, describió que simplemente existía una especie de crecimiento del tamaño de la célula entre fases, pero en la actualidad se conoce que existen

muchos más sucesos críticos que ocurren dentro del ciclo de vida de una célula (Paweletz, 2001).

El ciclo celular está compuesto por una fase de no división llamada interfase y una fase de división llamada mitosis, la cual ocupa únicamente un pequeño periodo de todo el proceso, durante esta etapa la célula crece y copia sus cromosomas como forma de preparación para la división celular. Se divide en fase G₁, fase S y fase G₂ en estas etapas la célula crece y produce proteínas y orgánulos citoplasmáticos, como la mitocondria y el retículo endoplasmático, pero es en la fase S que duplica el material genético. Una célula se desarrolla en la fase G₁, continua su crecimiento a medida que copia sus cromosomas (S), y completa la preparación para la división celular (G₂) y se divide en la fase mitótica (M) (Campbell, 2007, p.73-74). Las células hijas pueden repetir el ciclo como se indica en la Figura 3. Como resultado de la serie de eventos organizados que se llevan a cabo durante el ciclo celular, los componentes celulares se duplican y segregan en células hijas. En células eucariotas, la replicación del material genético ocurre en la fase S y la segregación cromosómica en la fase M o mitosis (Barnum & O'Connell, 2014).

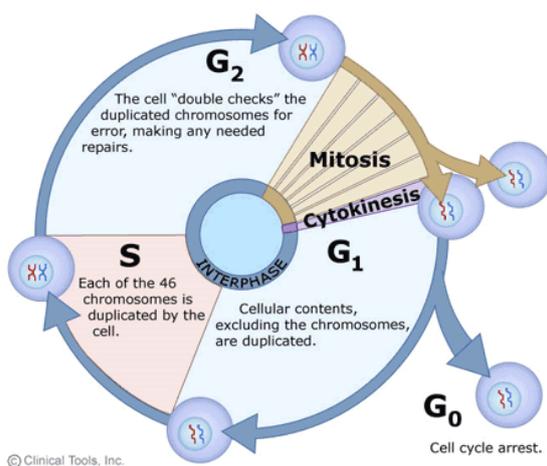


Figura 3. Etapas del ciclo celular

Tomado de University of Leicester, 2019.

2.5 Sistemas de control en el ciclo celular

Dentro del ciclo celular existen varios puntos de control. Uno de los primeros en activarse son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estas, son proteínas quinasas, que se encargan de fosforilar sustratos clave para promover la síntesis de ADN y la progresión mitótica (Barnum & O'Connell, 2014).

En el año 1990, Mitchison mediante ensayos con *Schizosaccharomyces pombe* determinó que el tamaño de la célula era un factor clave en la división celular (Mitchison, 1990). Posteriormente, Rao y Johnson mediante ensayos de fusión con células humanas observaron la dependencia entre la fase S y la mitosis ya que observaron que los núcleos en fase S pueden retrasar la entrada a mitosis de un núcleo G2 (Rao & Johnson, 1971). Para complementar estos estudios, Weinert y Hartwell indujeron daños en el ADN de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de identificar los primeros genes que cumplían la función de puntos de control del daño en el ADN, que posteriormente, se ha expandido en varios sistemas y vías de señalización detalladas (Weinert & Hartwell, 1989). Los investigadores concluyeron que, una superposición significativa de las señales hacen que la mitosis dependa de la finalización de la replicación del ADN (O'Connell & Cimprich, 2005).

En la actualidad, se conoce que para la progresión del ciclo tienen que estar en correcta armonía funcional varios factores en el ámbito de la biología estructural, cinética enzimática y modificaciones post-traduccionales (Barnum & O'Connell, 2014), Una representación de ello se observa en la figura 4.

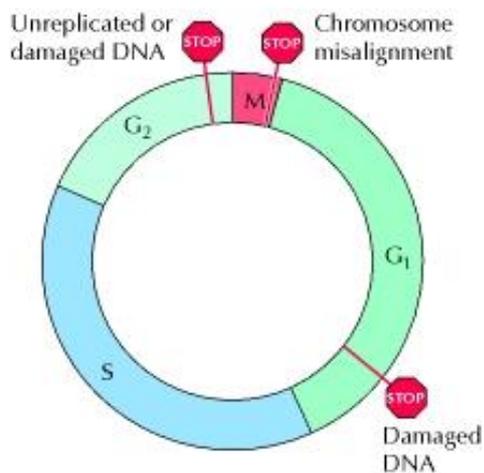


Figura 4. Representación de los puntos de control en el ciclo celular en células eucariotas.

Tomado de nature, 2000

Durante la interfase, el daño en el ADN puede parar el ciclo, es por ello que existen sistemas de reparación que ayudan a que esto no ocurra y no se comprometan posteriores fases. El daño en el ADN puede ser provocado por factores intrínsecos, como los intermediarios del metabolismo, el daño de los telómeros, la sobreexpresión de oncogenes y errores en la replicación del ADN. También existen factores extrínsecos como la luz solar, radiación ionizante y carcinógenos. Existen varios mecanismos para contrarrestar estos daños. Sin embargo, muchos de ellos activan puntos de control comunes cuyo objetivo es mantener las CDK en un estado inactivo hasta que se elimine la lesión. Estos puntos de control del daño en el ADN pueden ser separados en aquellos que son controlados por un supresor tumoral y la proteína p53 (Barnum & O'Connell, 2014).

En organismos superiores, p53 es un componente crítico dentro del punto de control del daño en el ADN, particularmente en la fase G₁ (Grallert & Boye,

2008). p53 es regulado por una gran cantidad de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación N-terminal en serina-15, la cual es catalizada por ATM (Ataxia telangiectasia mutada) y DNA-PKcs (Proteína dependiente de ADN quinasa). Estas quinasas están dirigidas a las roturas de ADN de doble cadena. Cuando se activa p53 se estabiliza a través de la protección de su ubiquitina ligasa y como un tetrámero transactiva la expresión de un gran número de genes, incluyendo el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CK1) p21. Debido a ello, CDK G1 se inhibe y el daño en el ADN se repara antes del proceso de replicación. Además p53 puede intervenir en la represión de la expresión de genes puede dirigir los destinos celulares alternativos de apoptosis o senescencia (Carvajal, Hamard, Tonnessen, & Manfredi, 2012).

2.6 Fase S del ciclo celular

La fase S del ciclo celular se define como aquella etapa en la cual se replica el genoma. El ADN recién sintetizado se organiza en los nucleosomas a través de interacciones con proteínas denominadas histonas. En este proceso refleja la relación que existe entre el momento de la síntesis de ADN y la expresión del gen (Schweinfest, 1997).

La fase S representa un momento particularmente vulnerable durante el ciclo ya que el ADN puede estar expuesto a varios daños. Es por ello, que se considera que no se deben reparar únicamente los daños que se puedan ocasionar en la fase G1 y G2 sino también los daños durante la replicación (Barnum & O'Connell, 2014).

La replicación del ADN comienza en sitios específicos, conocidos como orígenes de replicación que se replican solo una vez por ciclo celular. Esta activación está controlada por la fosforilación de dos proteínas principalmente Cdt1 y Cdc6. Este

proceso esta catalizado por CDK. La fosforilación no solo se encarga de iniciar la replicación, sino también la degradación de esas proteínas y de esa forma se controla el proceso de replicación (Nishitani & Lygerou, 2004).

En el proceso de replicación pueden encontrarse varios inconvenientes. Cuando la polimerasa junto con las proteínas que conforman el replisoma encuentran un bloqueo, es imperativo que el replisoma permanezca asociado de manera estable con la cromátida de modo que la replicación pueda reanudarse una vez que se haya superado el bloqueo. Las interrupciones durante el ciclo pueden ser por dNTPs modificados, sitios abásicos, complejo proteína-ADN o agotamiento de *Deoxyribonucleotide triphosphate* (dNTPs). Por estas razones la estabilización del replisoma es tomada como punto de control en la fase S del ciclo celular (Barnum & O'Connell, 2014).

La proteína efectora quinasa, considerada como punto de control, es conocida como Cds1 y en humanos como Chk2, tiene un dominio N-terminal fosfo-S seguido de un dominio quinasa. Tras el bloqueo en la replicación el componente Mrc1 se fosforila creando un sitio de unión para Cds1/Chk2 que luego es fosforilado y se activa completamente por un proceso de autofosforilación, la cual es importante para contrarrestar los posibles daños que puedan ocurrir en el ADN (Xu, Davenport, & Kelly, 2006).

Se han identificado los correspondientes genes homólogos de la ruta del *checkpoint* de la fase S del ciclo celular en humanos, algunos de ellos se indican en la Tabla 1

Tabla 1

Componentes principales de los checkpoint de las células eucariotas

Clase de proteína	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Función
Sensores	Mec1-Ddc2	ATR-ATRIP	Principal complejo sensor del daño en el ADN.
	Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX complex)	MRE11-RAD50-NBS1	Sensor inicial de DSBs.
	Ddc1-Rad17-Mec3	RAD9-RAD1-HUS1	También llamado 9-1-1. Sensor y reclutador de proteínas <i>checkpoint</i> .
	Rad24-Rfc2-5 (RFC-like complex)	RAD24-RFC2-5	Sensor del daño en el ADN. Enlaza a 9-1-1 al sitio del daño.
	Dpb11	TopBP1	Proteína de inicio de replicación y sensor de <i>checkpoint</i> . Activa a Mec1.
Procesadores de DSBs	Sae2	CalP	Endonucleasa. Funciona junto con complejo MRX.
	Exo1	EXO1	Exonucleasa 5'-3' involucrada en reparación del ADN.
Adaptadores/ Mediadores	Rad9	53BP1; BRCA1; MDC1	Transductor de la señal de daño en el ADN. Necesario para reparar DSBs y

			activar Rad53 y Chk1.
	Mrc1	Claspin	Necesario para la activación del <i>checkpoint</i> DRC y de Rad53 en respuesta al estrés replicativo.
Efectores	Rad53	CHK2	Quinasa efectora en DRC y DDC.
	Chk1	CHK1	Quinasa efectora involucrada en transducción de señales.

Adaptado de Finn, Lowndes, & Grenon, 2012

Nota: DSB- *Double Strand Break*

2.7 Rutas del *checkpoint* en *Saccharomyces cerevisiae*

2.7.1 Proteínas sensoras del *checkpoint*

Se puede definir como proteínas sensoras a las moléculas encargadas de la detección de señales que dan inicio a la cascada de transducción de la señal que llega a las proteínas efectoras (Soriano, 2012).

De acuerdo a la naturaleza de la señal del *checkpoint* en *Saccharomyces cerevisiae* se han establecido dos vías de reclutamiento. Una recluta a la proteína quinasa Mec1 y otra a la proteína quinasa Tel1. Dentro de la vía de Mec1, la señal de DNAss es detectada por el complejo Mec1-Ddc2 con ayuda del complejo abrazadera-cargador de abrazadera. Por otro lado, la vía Tel1 requiere del complejo Tel1-MRX. Se requiere de la correcta activación de estos complejos para la activación de la ruta del *Checkpoint* (Soriano, 2012).

2.7.2 Proteínas adaptadoras del *Checkpoint*

Una vez que las proteínas sensoras detectan el daño se requiere de proteínas mediadoras o adaptadoras para que envíen la señal hacia las proteínas efectoras. Las principales proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* son Rad9, Dot1, Tof1 y Mrc1 (Soriano, 2012).

La proteína Rad9 es un punto de control dependiente del daño en el ADN y esta detiene el ciclo celular en G1/S. También desempeña un papel importante en la vía de reparación post-replicación y transmite una señal a la proteína Rad53 (Abreu, 2013). Esta proteína tiene la capacidad de asociarse con roturas bicatenarias, se hiperfosforila por Mec1p y Tel1p en respuesta al daño en el ADN lo cual ayuda a diversos procesos asociados con el bloqueo celular. También, regula la transcripción de los genes de reparación del daño del ADN, interviene en la represión transcripcional de las ciclinas y la estabilización de las horquillas de replicación (Chen & Sanchez, 2004).

Por su parte, la proteína Dot1 está implicada en el control meiótico y la respuesta al daño del ADN. Otra de sus funciones es la metilación de la histona nucleosomal H3-lys79, la que es necesaria para el silenciamiento telomérico (Wysocki, 2005).

La proteína Tof1 es una subunidad de un complejo punto de control, cuando se une Tof1p-Mrc1p-Csm3p actúan en la horquilla de replicación estancada para promover la replicación después del daño (Bando, 2009).

La proteína Mrc1 es requerida para la replicación del ADN, ya que interactúa con la proteína Pol2p en horquillas de replicación que se encuentran estancadas durante el estrés, formando un complejo de pausa con Tof1p que es fosforilado

con Mec1p (Chini & Chen, 2004). Cuando Mrc1p interactúa con Hog1p coordina la replicación y transcripción del ADN en osmoestrés, protege a los telómeros destapados y es un mediador para la recuperación de los puntos de control (Fong, Arumugam, & Koepp, 2013).

2.7.3 Proteínas quinasas efectoras del *checkpoint*

Una vez que los complejos de las proteínas sensoras y adaptadoras se encargan de enviar la señal y se han reclutado en la zona de la lesión, esta llega a los transductores finales que son los encargados de hacer efectiva la respuesta. Las proteínas efectoras en *Saccharomyces cerevisiae* son Rad53 y Chk1 tienen homólogos en humanos que son CHK2 y CHK1 respectivamente (Soriano, 2012).

Rad53 es una proteína requerida como punto de control. Esta se encarga de amplificar las señales iniciales de las proteínas que reconocen el daño del ADN y los bloqueos de replicación (Sidorova & Breeden, 1997). Con su activación ocurre la detención de las células en G1/S, intra-S o G2/M. Además, participa en la regulación de los niveles excesivos de histonas, conduce a la inducción de ciclina G1, la activación de la ribonucleótido reductasa e inhibe la activación tardía de los orígenes de replicación. La activación de Rad53p ocurre tanto por autofosforilación como por fosforilación directa por Mec1p (Ma, Lee, Duong, & Stern, 2006).

La proteína Chk1 es punto de control del daño en el ADN, que se encarga de mediar la detención del ciclo celular a través de la fosforilación de Pds1p el mismo que es fosforilado por el punto de control Mec1p (Liu, Vidanes, Lin, Mori, & Siede, 2000).

2.7.8 DNA Damage Checkpoint (DDC)

El ADN está expuesto a factores tanto físicos como químicos que le pueden ocasionar daños en su estructura. Para poder contrarrestar las lesiones existen mecanismos de control y vigilancia que ayudan a garantizar la progresión del ciclo celular. Uno de ellos es *DNA Damage Checkpoint (DDC)*. De forma general, si existe alguna anomalía el ciclo se detiene y se activan los mecanismos de reparación. Las proteínas que intervienen en este proceso se identificaron porque su ausencia produce defectos como el descenso de la resistencia celular frente a diferentes tipos de estrés por ejemplo agentes genotóxicos (Soriano, 2012).

El primer paso en el punto de control es el reconocimiento del daño esto se lleva a cabo por las proteínas sensoras que en el caso de la vía de señalización (DDC) es la proteína Mec1. Una vez que recibe la señal recluta a las proteínas adaptadoras como Rad9 quien es la encargada de activar a Rad53 para empezar la transducción de señales que inicia el bloqueo del ciclo celular, la reparación del daño para continuar con el mismo (Figura 5) (Longhese, Foiani, Muzi-Falconi, Lucchini, & Plevani, 1998).

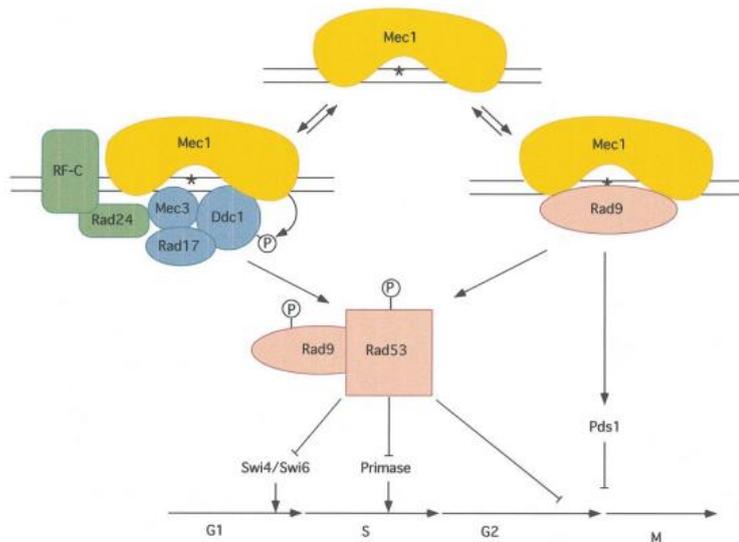


Figura 5. Modelo de la ruta del *checkpoint* en respuesta a los daños en el ADN en *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomado de Longhese, 1998

2.7.9 Replication Damage Checkpoint (DCR)

Durante la fase S del ciclo es necesario que las células realicen una duplicación fiable de su material genético. Para ello las células eucariotas establecen horquillas de replicación que son estructuras especializadas donde se lleva a cabo la síntesis de ADN (Bell & Dutta, 2002). Es por ello, que esta es una de las etapas más críticas y vulnerables durante el ciclo celular.

Las células eucariotas tienen mecanismos evolucionados con el fin de garantizar la replicación del ADN de forma correcta, denominados puntos de control de la replicación. Estos puntos de control de la fase S se encargan de controlar la aparición de cualquier tipo de estrés durante la replicación y desencadenan una respuesta celular destinada a mantener la integridad del genoma (Paulovich & Hartwell, 1995).

Cuando se estanca la horquilla, se activa una cascada de señalización mediada por puntos de control. Los factores implicados en la transducción de señales y en la detención del ciclo están altamente conservados en eucariotas. Dentro de estos factores se encuentran las proteínas sensoras Mec1, Tel 1, Ddc2, proteínas adaptadoras Mrc1 y Rad 9, y las proteínas efectoras Rad53, Chk1 y Dun1 (Jossen & Bermejo, 2013). Para la activación de estas proteínas se requiere algún tipo de estrés en la horquilla de replicación (Lupardus, Byun, Yee, Hekmat-Nejad, & Cimprich, 2002). Uno de los genotóxicos que afecta a la replicación es la Hidroxiurea que actúa como inhibidor de la replicación, ya sea debido al desacoplamiento del ADN por helicasas o por el desacoplamiento entre las polimerasas de cadena principal y retrasada debido a la presencia de plantillas dañadas. Por otro lado, también existen factores físicos que afectan a la replicación como es la radiación ionizante que lleva a la acumulación de especies reactivas del oxígeno y por lo tanto, induce inestabilidad genómica (Byun, Pacek, Yee, Walter, & Cimprich, 2005). Es allí, cuando es reclutado el complejo RPA este complejo recluta a Mec1 que a su vez, fosforila a varios factores incluyendo a Mrc1 y este hace un llamado a la proteína efectora Rad53 (Zou & Elledge, 2003). El proceso se lleva a cabo como se observa en la Figura 6.

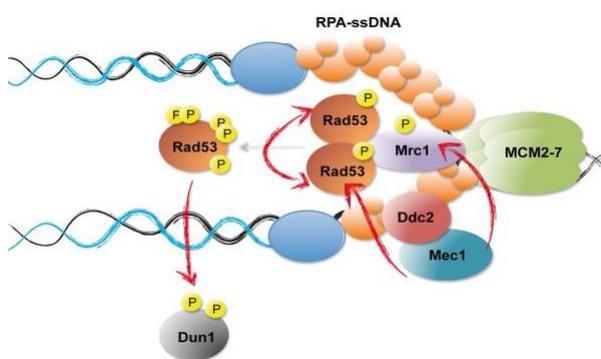


Figura 6. Modelo de la ruta del *Checkpoint* en respuesta a los daños en la horquilla de replicación en *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomado de Jossen & Bermejo, 2013

2.8 Ruta HOG en respuesta a los cambios de temperatura en *Saccharomyces cerevisiae*.

2.8.1 Cambios de temperatura en *Saccharomyces cerevisiae*.

Una de las características principales de los seres vivos es la capacidad de mantener sus funciones celulares a pesar de estar expuestos a diferentes tipos de estrés en el medio intracelular o extracelular. La resistencia se debe a la expresión de redes genéticas que permiten que la célula tolere un cierto nivel de perturbación ambiental o mutacional con poca pérdida de su capacidad física (Stelling, Sauer, Szallasi, Doyle, & Doyle, 2004). La respuesta más común frente a este tipo de factores es la expresión de diversas proteínas. Varios estudios muestran que la temperatura induce a la expresión de muchos genes que están implicados en los procesos de transcripción y traducción. Sin embargo, se sabe poco sobre la influencia del estrés hipotérmico en la expresión de genes (Aguilera, Randez-Gil, & Prieto, 2007).

El proceso de adaptación de diversos organismos consiste en tres fases, la primera es la percepción de la señal externa, seguida de la transmisión intracelular de esta señal que finalmente conduce a la tercera fase que es la adaptativa. Se han identificado varios mecanismos de transducción de señales que permiten que las células de levadura activen las respuestas apropiadas a los estímulos de estrés externos (Wuytswinkel, 2000). Por otro lado, cuando las células de levadura están expuestas a un aumento de osmolaridad externa se produce una detención inmediata del crecimiento. Posteriormente, se activan respuestas específicas para reparar el daño molecular e inducir la adaptación frente a las nuevas condiciones, para luego reanudar el crecimiento. Por lo tanto, el estrés hiperosmótico conduce a la transcripción de los genes que responden a este tipo de tensión y una acumulación intracelular de glicerol. Estas

respuestas están controladas principalmente por dos vías: la ruta HOG MAP quinasa y la vía de respuesta al estrés general (Gavin, 2006).

Saccharomyces cerevisiae crece en condiciones normales en un rango de temperatura de 25 °C-37 °C. Pero, si es sometido a una temperatura menor o a condiciones de osmoestrés despiertan ciertos mecanismos de adaptación, uno de ellos está la activación de la vía HOG, por aumento en la osmolaridad extracelular (Warringer, Hult, Regot, Posas, & Sunnerhagen, 2010).

2.8.2 Ruta de respuesta frente a la alta osmolaridad inducida por glicerol (HOG)

Como mecanismo adaptativo la célula de levadura tiende a activar la vía HOG por aumento en la osmolaridad extracelular lo aumenta la transcripción del gen de la glicerol deshidrogenasa GDP1 produciendo la acumulación de soluto soluble glicerol y la restauración de la turgencia. La activación de la ruta HOG a través de una cascada de señales conduce a la fosforilación de la proteína Hog1 (Maeda, Wurgler-Murphy, & Saito, 1994).

La proteína Hog1 fosforilada se acumula transitoriamente en el núcleo en donde activa factores de transcripción como Hot1, Sko1 y Sm1, y recluta componentes de la histona desacetilasa (Warringer, 2010). La activación de la proteína Hog1p, es homóloga a la proteína p38 de mamíferos y ha demostrado ser letal al participar en respuestas inflamatorias y de estrés. Por esa razón, una vez que la célula se ha equilibrado en el entorno hiperosmótico Hog1p se desfosforila por las fosfatasas y luego es exportada al núcleo (Raigneaud, 1995).

La fosforilación de Hog1 conduce al reclutamiento de otros factores de transcripción y a su vez fosforila a Mrc1p, que a su vez aumenta bajo el estrés en la replicación (Mao, Wang, Zhao, Xu, & Klionsky, 2011). El proceso de activación de la ruta HOG se indica en la Figura 7.

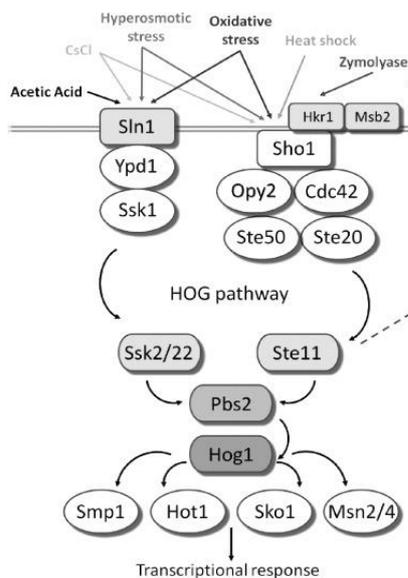


Figura 7. Modelo de la ruta en respuesta a la alta osmolaridad inducida por glicerol (HOG) en *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomado de Rodríguez-Peña, García, Nombela, & Arroyo, 2010

2.9 Modificaciones post-traduccionales de la cromatina durante el ciclo celular

La expresión génica es un proceso que debe mantenerse con el fin de conservar las diferencias estructurales y funcionales de las células. El empaquetamiento del ADN en la cromatina y sus modificaciones se consideran aspectos que en la expresión de genes. En este contexto, el término epigenética, se define como cambios heredables en la expresión génica que no son debido a la alteración en la secuencia de ADN. Estos cambios se dan por las modificaciones en las

histonas, el remodelado de la cromatina y la metilación del ADN (Dolores & Villar, 2013).

Se han encontrado al menos ocho formas de modificaciones que pueden ocurrir en las histonas. Entre las más conocidas se encuentran la acetilación, metilación y la fosforilación. La metilación puede ser mono, di o tri-metil lisina. Las modificaciones de histonas son dinámicas y cambian rápidamente en respuesta a estímulos celulares.

La metilación se lleva a cabo por la adición de grupos metilo a las cadenas laterales de las lisinas y argininas de las histonas. En particular, La metilación en residuos de lisina tiene lugar gracias a enzimas con actividad lisina-histona-metil-transferasa. Este proceso puede tener un efecto activador o represor de la expresión génica (Wysocki, 2005).

3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Población y muestra

3.1.1 Población

Las cepas utilizadas en este estudio forman parte de la colección de levaduras del Laboratorio de Replicación del ADN e inestabilidad del Genoma del Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador.

3.1.2 Muestra

En la tabla 2 se describe el genotipo y procedencia de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el estudio.

Tabla 2

Cepas de levaduras utilizadas en la investigación

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
APY 165 (WT)	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK ₇ bar1::NAT	CIZ
APY 166	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+ , RAD5, URA3::GPD-TK, tof1::HIS , rad9::LEU2 , bar1::NAT	CIZ
APY 167	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK, TOF1::HIS , bar1::NAT	CIZ
APY 169	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK, MRC1::HIS , bar1::NAT	CIZ

APY 170	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK, RAD9::HIS, bar1::NAT	CIZ
APY 171	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK ₇ , dot1::LEU, bar1::NAT	CIZ
APY 172	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK, TOF1::HIS, dot1::LEU, bar1::NAT	CIZ
APY 173	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK, RAD9::HIS, dot1::LEU, bar1::NAT	CIZ
APY 175	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5, URA3::GPD-TK ₇ bar1::NAT , hog1::LEU	CIZ
APY 177	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL, psi+, RAD5,	CIZ

	URA3::GPD-TK7, dot1::LEU, bar1::NAT , hog1::HIS	
APY 162	MATa ade2 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 hht1-hhf1D::LEU2 hht2-hhf2D::kanMX3 +pFvL87 hht2(K79A)-HHF2::TRP	CIZ
APY163	MATa ade2 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 hht1-hhf1D::LEU2 hht2-hhf2D::kanMX3 +pFvL88 hht2(K79R)-HHF2::TRP	CIZ
APY 155	MATa ade2 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 hht1-hhf1D::LEU2 hht2-hhf2D::kanMX3 +YCp50: HHT2-HHF2 (URA3)	CIZ

Tomado de Base de datos, Laboratorio de Replicación del ADN e Inestabilidad del Genoma-CIZ.

3.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

3.2.1 Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado en esta experimentación, para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, fue YPAD, un medio rico en nutrientes que contiene 1% de extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica, 2% de glucosa y adenina 0,5%. Para el medio sólido se añadió 2% de agar bacteriológico. Las levaduras se cultivaron a 25°C, 16°, 4°C y 37°C. Adicionalmente se realizaron medios NaCl 0,4 M, H₂O₂ 0,1 mM.

3.2.2 Determinación de la sensibilidad a diferentes temperaturas: goteos seriados (*Drop test*)

Con el fin de determinar la sensibilidad o resistencia de las cepas de estudio, a diferentes temperaturas se realizó *drop test* que consistió en la preparación de precultivos en 5 ml de YPAD líquido. Se realizó el cálculo con el fin de obtener 10 mL de un cultivo $OD_{600}= 0,5$ (1×10^7 células/ml). Al día siguiente se prepararon tres tubos *ependorf* por cada cepa, cada uno con 900 μ l de agua estéril. Se verificó la absorbancia y se ajustaron los cultivos a un $OD_{600}=0,5$ (1×10^7 células/ml). Se tomó 1 mL en un tubo *ependorf* y se centrifugó en microcentrifuga 5min a 3500rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de agua estéril. Se tomaron 100 μ l y se los colocó en el tubo a la razón 10^6 cel/ml. De la misma forma, se tomaron 100 μ l del tubo de la solución 10^6 cel/ml y se colocaron para una razón de 10^5 cel/ml. Se tomaron 100 μ l del tubo de suspensión 10^5 cel/ml y se colocaron en el tubo 10^4 cel/ml. Finalmente, Se tomaron 5 μ l de cada tubo y se los colocó en medio YPAD sólido. Las muestras que se incubaron a 4°C se fotodocumentaron durante 11 días mientras que las condiciones de 25°C, 37°C, NaCl 0,4 M, H₂O₂ 0,1Mm por el periodo de 3 días.

3.2.3 Curva de crecimiento

Con el fin de determinar el comportamiento de las ocho cepas en estudio, se realizó el monitoreo del crecimiento a 25°C y 4°C. Para ello se realizaron precultivos de 5mL y los cálculos correspondientes, con el fin de obtener 50 mL de un cultivo $OD_{600}= 0,05$ al siguiente día. Una vez verificada la absorbancia, se repartieron 15 mL de cada cepa en matraces de 100 mL. Se los colocó en la incubadora a 25°C y se tomó una muestra cada dos horas durante 48 horas, las cuales fueron medidas en el espectrofotómetro a 600nm. Se tomaron 35 mL de cada cepa del mismo cultivo y se colocaron en matraces de 250 mL. Estos fueron colocados en incubación a 4°C. Se tomaron muestras cada dos horas, durante 7 días y se midieron en el espectrofotómetro a 600nm.

3.2.4 Sincronización celular con factor α

Se trabajó con un cultivo líquido de YPD con $OD \approx 0,2$ al que se le añadió factor α (Cf 0,5 mg/mL) y posteriormente, se incubó por dos horas a 25°C. Luego, se recolectaron las células mediante centrifugación a 4000 rpm durante 3 minutos, y las mismas se colocaron en otro medio de cultivo líquido (YPAD) previamente atemperado a 4°C con factor α (Cf 0,5 mg/mL) se incubaron a esa temperatura durante dos horas. Al finalizar esta etapa, se tomó una primera muestra (G1) de 10 mL en tubos de 15 mL con azida de sodio (Cf 0,1%) para electroforesis de campos pulsados, 500 μ l *Flow Cytometry Data Analysis* (FACs), 1 mL *budding index* y 1 mL para media de OD_{600nm} . Se recolectaron nuevamente las células mediante centrifugación a 4000 rpm durante 3 minutos y se colocaron en otro medio de cultivo líquido al que previamente se adicionó Proteinasa k (Cf 0,01mg/mL), Buffer Fosfato 1M (Cf 50 mM). Luego de incubar a las células a 4°C por dos horas, se tomaron muestras durante 24 horas en intervalos de 2 horas.

3.2.5 *Flow Cytometry Data Analysis* (FACs)

Dentro del proceso de sincronización, se tomaron 500 μ l de medio de cultivo (en los intervalos indicados en el apartado de sincronización) y se colocaron en 1 mL de etanol al 100%, todas las muestras de almacenaron a -20°C. Una vez terminado el proceso de sincronización, se centrifugaron a máxima velocidad las muestras durante 2min a 15000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 500 μ l de Na-Citrato (50Mm). Se añadió RNasa (Cf 0,25 mg/ml), se incubó durante 1 hora a 50°C. Una vez transcurrido este tiempo se colocaron 10 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a 50°C. Posterior a ello, se centrifugó 2 minutos a 15000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 mL de Na-Citrato (50Mm). Se sónico 10'' 55% Amp. Se añadieron 500 μ l de la solución Na-Citrato (50Mm) con Yoduro de Propidio (24 μ g/ ml). Finalmente, las muestras fueron procesadas en el equipo Muse® Cell Analyzer.

3.2.6 Budding Index

Se tomó 1 mL de muestras sincronizadas en fase G1 con azida 0,1%. Se sónico por 3 segundos y se preparó un portaobjetos con 5µL del cultivo. Se observó al microscopio con aumento de 40x. Se contaron 300 células y se calculó el porcentaje de levaduras con *shmoo*. Se tomó también 1 mL de la muestra del cultivo de cepas sometidas a 4°C con azida 0,1%. Se obtuvo el porcentaje de levaduras con yema y sin yema. Se comprobó la progresión hacia fase S frente a 4°C.

3.2.7 Extracción de proteínas totales.

3.2.7.1 Extracción NaOH 0,2M

Para la extracción de proteínas se utilizó NaOH 0,2 M. En primer lugar, se verificó que las células se encuentren en la fase exponencial de crecimiento. Posterior a ello, se tomó 1 ml de muestra. Adicionalmente, se colocaron 200µl de NaOH 0,2M y se centrifugó 10 min a 6000rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 50µl de SDS 1X.

3.2.7.2 Extracción con Urea

Se tomaron 10ml de cultivo y se centrifugó durante 4 min a 3500 rpm, el pellet se resuspendió en 200µl de cracking buffer (urea 8M, 5%SDS, 40 mM Tris-HCl pH=6,8, EDTA 0,1 mM, azul bromofenol 0,4 mg/ml, NaF 50 mM, β-mercaptoetanol 150 mM, inhibidor de proteasa 1X, PMSF 2 mM) y se colocó en un tubo que contenía 200µl de perlas de vidrio. Posterior a ello, se colocó en un termobloque con agitación durante 20 min a 70°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.2.8 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

El estudio de proteínas se realizó utilizando geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). Los geles están conformados en dos partes el primero es un gel separador cuya concentración de acrilamida varía en función de la proteína que se desee observar en este caso se utilizó al 17%, 10%, 8% para la resolución de histonas, proteína Hog1 y proteína Rad53 respectivamente y un gel concentrador o pre-gel. El gel separador contiene acrilamida: bisacrilamida (37,5:1) al 17% (p/v), 10% (p/v), 8% (p/v); 0,1%(v/v) tetrametiletilendiamina (TEMED), 0,375m Tris-HCl pH8.8 y persulfato de amonio (APS) al 10%. El pre-gel contiene acrilamida: bisacrilamida (37,5:1) 2,5% (p/v), 0,1% TEMED, 0,125M Tris-HCl pH6.8 y APS al 10%.

3.2.9 Análisis *Western Blot*

Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia con un MINI TRAS-BLOT CELL de BIORAD. El tampón de transferencia contiene 2,5Mm Tris pH 8.3, 192Mm glicina, 0,1% (p/v) SDS y 20% (v/v) etanol. La transferencia se realizó con un voltaje de 80V durante 50min a temperatura ambiente.

Las proteínas transferidas se colorearon sumergiendo las membranas en una disolución de *Ponceau* 1% (p/v) en ácido acético 1%(v/v) durante 2 minutos. Con el fin de eliminar el exceso de colorante se realizaron varios lavados de la membrana en ácido acético 1% (v/v). Se obtuvo la imagen digitalizada de la membrana coloreada con la ayuda de un scanner y se guardó en formato electrónico. Para eliminar el *Ponceau* asociado a las proteínas se lavó la membrana con TBS 1X-0,1% Tween (20).

La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, en TBS1X-0,1% Tween -5% leche. El anticuerpo primario se diluyo en TBS1X-0,1% *Tween* y la membrana se incubo en esta disolución durante toda la noche a 4°C. A la

mañana siguiente se realizaron dos lavados a la membrana con TBS1X-0,1% Tween de 10 minutos cada uno. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido en TBS1X-0,1% Tween, durante 50 minutos a temperatura ambiente. La detección se realizó utilizando los reactivos de *Clarity Western ECL substrate* de HEALTH CARE, siguiendo las instrucciones del fabricante y se realizó la digitalización en el *scanner* (LI-COR). Las concentraciones de anticuerpos utilizadas y la de los geles para las diferentes proteínas analizadas se indican en la tabla 3.

Tabla 3.

Proteínas analizadas con sus respectivos anticuerpos y concentración de gel utilizadas en la experimentación.

Proteína	Anticuerpos	Gel
H3-METILADA	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-Histone H3 (Tri Methyl Lys 79) IgG monoclonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial. (1:5000), Abm • Anti-rabbit (1:20000), Santa Cruz 	17%
Rad53p	<ul style="list-style-type: none"> • Rad53 Antibody Es una IgG policlonal de cabra; 200 µg / ml (1:200), Santa Cruz • Anti-Goat IgG (1:1000) Santa Cruz 	8%
Hog1p	<ul style="list-style-type: none"> • p-p38 Antibody (Tyr 182) Es una IgG policlonal de conejo 50 µg / ml (1:5000), Santa Cruz • Anti-rabbit (1:20000), Santa Cruz 	10%

3.2.10 Electroforesis de campos pulsados

3.2.10.1 Preparación de los plugs de agarosa

El *pellet* obtenido en el proceso de sincronización se lavó con *Buffer 1* [Tris- HCl 10 mM pH 7,5 u 8, EDTA 50 mM pH 8] luego de lo cual, se resuspendió en una solución 1:1 *Low-melting point agarose* 1% y *SEC mix Buffer* [Buffer fosfato 50mM, Tris- HCl 10 mM pH 7,5 u 8, EDTA 100mM Ph 8, *Lyticase*, DTT 10 mM] e inmediatamente se vertió 100 μ L en un molde BIO-RAD. Luego de dejar solidificar el *plug* durante 5 minutos a 4 °C, se desmoldó en 400 μ L de *Buffer 1* y se incubó durante 24h a 37°C. A continuación, se reemplazó el *Buffer 1* por *PK-Burkhalter buffer* [Tris- HCl 10 mM pH 7,5 u 8, EDTA 50mM pH 8, N-lauroil sarcosina 1%, Proteinasa K (Roche) 2 mg/mL] y se incubó durante ~12h a 37°C. Finalmente, se lavaron los *plugs* con *Washing buffer* [EDTA 0,1 mM pH 8, Tris- HCl 10 mM pH 8] y estuvieron listos para la corrida electroforética (Figura 8).

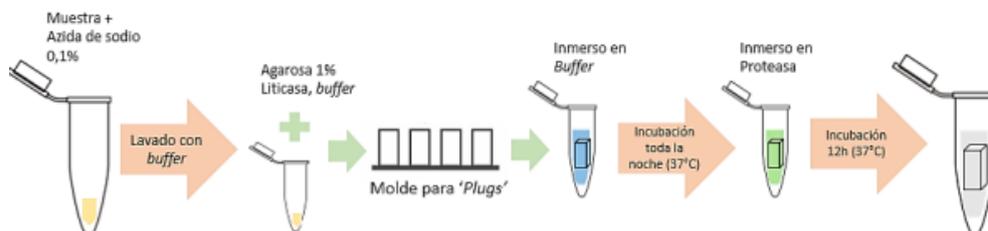


Figura 8. Preparación de los 'plugs' para PFGE.

Tomado de: (Rommel Emilio Guevara Santander, 2017)

3.2.10.2 Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo durante 20 horas en el equipo BIO-RAD CHEF-DR

III System del Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del

Ecuador, con programación de un bloque: pulse time de 60-120 segundos, voltaje de 6 V/cm. Se utilizó un gel de agarosa al 1% (*UltraPure Agarose Thermo*

Fisher Scientific) con 15 pocillos inmerso en *Buffer* TAE 0,5X (en agua ultra pura estéril).

3.2.10.3 Tinción y revelado del gel

Al término de la electroforesis, se colocó el gel en un recipiente que contiene 300 mL de SYBR® Gold 0,5 µg/mL diluido en TAE 0,5X. Luego de incubarlo a temperatura ambiente durante 30 minutos, se reveló utilizando un fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System del cual se obtuvo una fotografía con bandas electroforéticas.

3.3 Diagrama de flujo

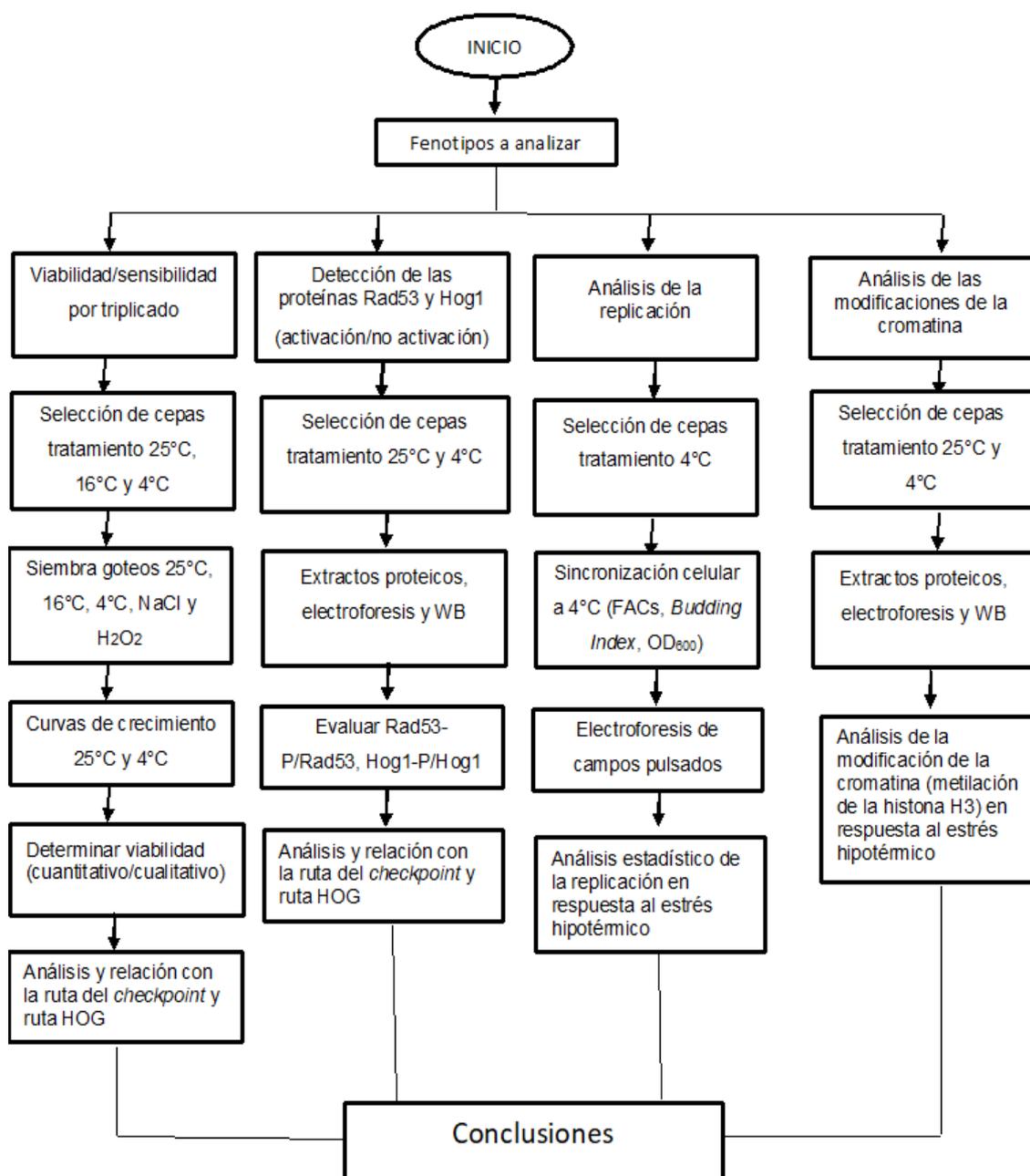


Figura 9. Diagrama de flujo.

3.4 Análisis estadístico de los resultados.

3.4.1 Unidad de estudio

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: control, cepa WT sin deleciones genéticas; cepas de estudio para electroforesis de campos pulsados, dos cepas con deleciones simples (*dot1Δ* y *hog1Δ*) y una cepa con deleciones dobles (*hog1 Δ dot1 Δ*).

3.4.2 Variable de estudio

Intensidad de la señal de las bandas electroforéticas en cada muestra analizada, equivalente al estado estructural de los cromosomas nucleares, y producto del efecto del estrés hipotérmico (4°C).

3.4.3 Factores controlables

- Deleciones genéticas
Las cepas utilizadas han sido previamente mutadas, con el fin de afectar a las rutas del *checkpoint* DDC a través del componente *dot1Δ* y la ruta HOG a través de *hog1 Δ*.
- Tiempo
El tiempo de exposición de las cepas al estrés hipotérmico (4°C), fue controlado a partir de su sincronización en fase G1 utilizando factor α .
- Temperatura
Todo el proceso se llevó a cabo controlando la temperatura de incubación de 4°C.

3.4.4 Matriz de operacionalización de variables

Tabla 4

Operacionalización de variables.

Variables	Dimensión	Indicadores
Intensidad de la señal de las bandas electroforéticas	Cepa no mutada (WT)	$\%Replicación$ $= \frac{\text{señal de la banda}}{\text{señal de la banda G1}} \times 100\%$
	Mutación simple: <i>dot1Δ</i>	$\%Replicación$ $= \frac{\text{señal de la banda}}{\text{señal de la banda G1}} \times 100\%$
	Mutación simple: <i>hog1Δ</i>	$\%Replicación$ $= \frac{\text{señal de la banda}}{\text{señal de la banda G1}} \times 100\%$
	Mutación en genes relacionados de ambas rutas <i>checkpoint</i> y HOG: <i>dot1Δ, hog1Δ</i>	$\%Replicación$ $= \frac{\text{señal de la banda}}{\text{señal de la banda G1}} \times 100\%$
	Comparación entre la cepa control y las cepas mutadas	¿ Existe diferencia significativa?

Adaptada de (Rommel Emilio Guevara Santander, 2017)

3.4.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

En el experimento se recolectaron siete muestras para cuatro cepas en estudio, identificadas como G1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 (horas) haciendo referencia a la etapa de sincronización a 4°C (Figura 10).

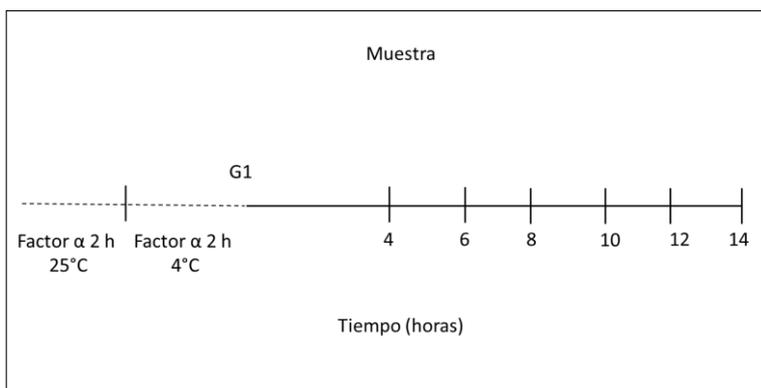


Figura 10. Esquematación del proceso de recolección de muestras.

La técnica utilizada para la recolección de datos es la observación de la intensidad de las bandas en el gel de agarosa las cuales se cuantificaron y observaron con el *software* Image J – NIH, el fotodocumentador utilizado fue *Doc™ XR+ System* de Bio-Rad con luz UV, en conjunto permitieron visualizar y capturar las bandas electroforéticas correspondientes al microorganismo en estudio sometido a electroforesis de campos pulsados (PFGE).

3.4.6 Técnicas de procesamiento de análisis de datos

Las bandas electroforéticas significativas correspondientes a los cromosomas III, IV y XIV fueron cuantificadas con el *software* Image J – NIH. Posterior a ello se cambió el dato numérico correspondiente a la intensidad de señal por un valor porcentual, donde se consideró a los datos de la banda G1 como el 100%, obteniendo el porcentaje de replicación. Las siete muestras de una misma cepa, denotan promedios y desviaciones estándar que abarcan los tres datos cuantitativos correspondientes a los tres cromosomas de estudio.

Puesto que el nivel de investigación es descriptivo, no se abarcaron diseños experimentales complejos, únicamente se busca establecer diferencias significativas entre la cepa WT y las cepas mutadas, en cada una de las siete muestras recolectadas.

La herramienta estadística utilizada es la prueba t no-pareada para varianzas diferentes, conocida como prueba t de Welch, a través del programa estadístico IBM SPSS - IBM Analytics Ver. 25, donde se comparan dos grupos independientes que pueden o no tener el mismo tamaño sin asumir que poseen desviaciones estándar similares (Pezzullo, 2013).

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la sensibilidad de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes temperaturas (25 °C, 16 °C y 4 °C)

Diferentes cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que contienen mutaciones en una o dos actividades enzimáticas de las rutas del *checkpoint* (mutantes) fueron analizadas en un estudio previo en el Laboratorio de Replicación del ADN e inestabilidad del Genoma del Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador (A.P). Con el fin de determinar la sensibilidad al frío (estrés hipotérmico), se realizaron diluciones seriadas de cultivos de las diferentes cepas y se inocularon gotas sobre placas de medio YPAD (*drop test*, ensayo semicuantitativo), por triplicado. Las placas fueron incubadas en paralelo a 25°C (control), a 16°C y a 4°C, tantos días como fue necesario para evaluar el crecimiento en cada una de las temperaturas seleccionadas. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Como era de esperar, la velocidad de crecimiento se vio afectada en función de la temperatura, de manera que cuanto más distante es la temperatura real de la temperatura óptima de crecimiento (25-28°C), más tiempo (indicado en días) tardaron en crecer las células. A 25°C, todas las cepas presentaron un crecimiento similar. A temperaturas por debajo de la óptima (16°C, 4°C), todas las cepas presentaron un crecimiento más lento y similar a la cepa salvaje

(control) en cuanto a sensibilidad, excepto las cepas mutantes en *dot1Δ*, que mostraron mayor crecimiento o resistencia al estrés hipotérmico (Figura 11).

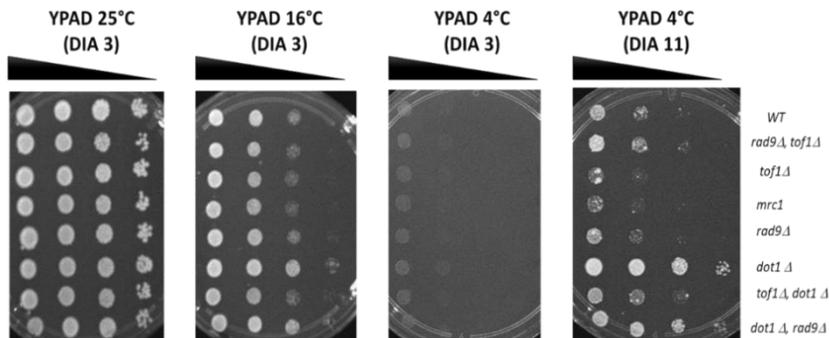


Figura 11. Prueba de sensibilidad de las cepas salvaje (WT) y sus correspondientes mutantes crecidas en YPAD e incubadas a 25°C, 16°C y 4°C por 3 u 11 días respectivamente.

En estudios realizados previamente en el Laboratorio se encontró que la cepa que tiene doble mutación en los genes *tof1Δ*, *dot1Δ*, genes involucrados en ambas rutas del *checkpoint*, es más sensible a genotóxicos, específicamente MMS (datos no mostrados). Sin embargo, la misma cepa no presenta sensibilidad al frío, lo que sugiere que la alteración de la replicación del ADN no es el proceso que explica la mayor tolerancia frente a este tipo de estrés físico.

Como en los resultados obtenidos de este primer ensayo se observó mayor diferencia a 4°C, se seleccionó esta temperatura para posteriores experimentos. Se determinó la velocidad de crecimiento en medio YPAD líquido, de las cepas salvaje y mutantes incubadas a 4°C y a 25°C (control). El seguimiento del crecimiento fue registrado midiendo la absorbancia a 600nm a diferentes tiempos. En las Figuras 11 y 12 se muestran las representaciones gráficas del crecimiento ($OD_{600\text{ nm}}$) vs. el tiempo (h) a 25°C y 4°C, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 12, a 25°C todas las cepas se comportaron de forma similar.

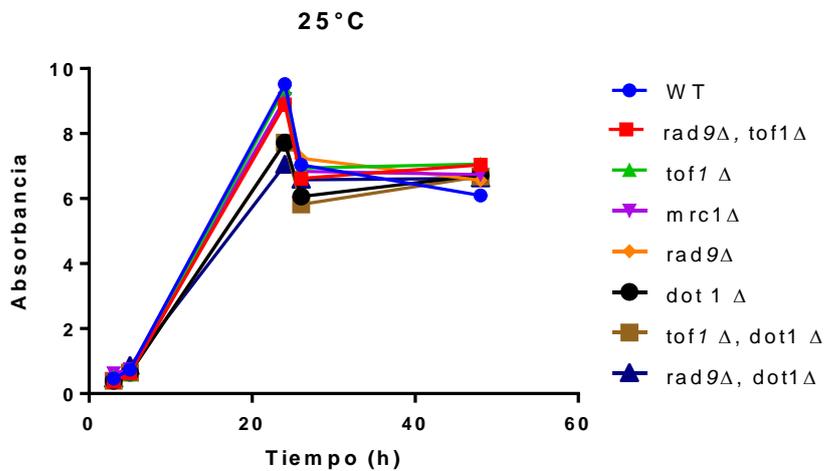


Figura 12. Cultivos celulares de la cepa salvaje y mutantes crecidos en YPDA a 25°C. A los tiempos indicados, medidas de absorbancia a 600nm.

Mientras que, cuando los cultivos fueron incubados a 4°C la cepa salvaje fue la que presentó un crecimiento más limitado, lo que sugiere la presencia de mecanismos capaces de detectar y responder al estrés hipotérmico (Figura 13). Las cepas que lograron una mayor tasa de crecimiento fueron la *dot1Δ*, y *dot1Δ tof1Δ* (Figura 13). Una posibilidad que podría explicar esta tolerancia a bajas temperaturas es la desrepresión de orígenes de replicación tardíos en estos mutantes.

Cuando una célula se replica, en fase S se activan secuencial y reguladamente cientos de orígenes de replicación, precoces y tardíos. Sin embargo, algunos mutantes no son capaces de mantener esta activación secuencial, y todos los orígenes de replicación se activan simultáneamente (Yeeles, Deegan, Janska, Early, & Diffley, 2015). Es posible que esta situación desventajosa en presencia de genotóxicos, sea ventajosa en presencia de bajas temperaturas; de manera que, al haber mayor número de orígenes activos la célula logra replicar antes su ADN, lo que representa mayores posibilidades de supervivencia. Si esta hipótesis fuera cierta, los mutantes *mrc1Δ* o *tof1Δ rad9Δ*; que no son capaces de reprimir sus orígenes tardíos (Bacal, 2018), deberían presentar mayor tolerancia

a las bajas temperaturas. Sin embargo, los resultados muestran que estos mutantes presentan una mayor tolerancia al frío pero no tan grande como el mutante *dot1* Δ , sugiriendo que la hipótesis de este trabajo podría explicar parcialmente, pero no totalmente la tolerancia a bajas temperaturas observada en el mutante *dot1* Δ .

Los efectos de los cambios repentinos de temperatura han sido de poco estudio en comparación con otros tipos de estrés; sin embargo, en la actualidad se conoce que cuando las levaduras se someten al frío tienden a acumular trehalosa, glicerol y proteínas de choque térmico. Los estudios también indican que los cambios en la fluidez de la membrana, son la principal señal que desencadena la respuesta al choque frío (Aguilera, 2007).

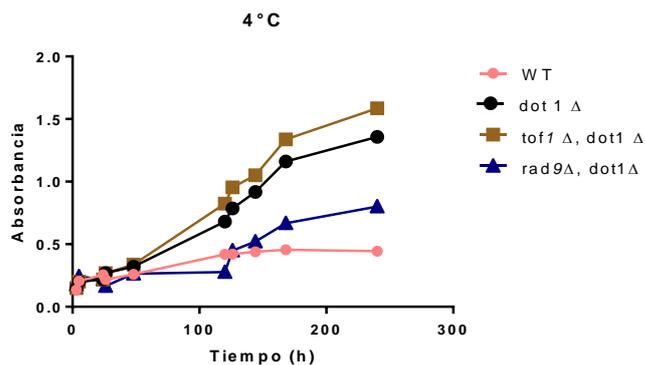


Figura 13. Cultivos celulares de la cepa salvaje y mutantes crecidos en YPDA a 4°C. A los tiempos indicados, medidos a una absorbancia de 600nm.

Aunque se han encontrado varios genes que responden a este tipo de estrés no todos ellos están relacionados con el crecimiento, a partir de estos resultados se puede sugerir que las cepas salvajes bloquean su crecimiento a 4°C porque activa mecanismos de *checkpoint* que detectan las bajas temperaturas como una condición adversa (Pan, 2006). No obstante, estos mecanismos no son correctamente activados en mutantes *dot1* Δ , que son incapaces de bloquear su crecimiento a pesar de la presencia de condiciones ambientales adversas (Conde & San-Segundo, 2008).

Por otro lado, en estudios anteriores se determinó que el tiempo de exposición al estrés es determinante para el crecimiento, y cuando el tiempo es extenso llega un punto en el que el crecimiento cesa porque se desactivan los mecanismos de defensa debido a que las maquinarias se reparan (Aguilera, 2007). Esto podría explicar de manera satisfactoria lo observado en el presente estudio en donde se evidencio que si la cepa salvaje posee toda su maquinaria de reparación íntegra entonces no requiere sobre expresar genes en forma de defensa por lo cual disminuye el crecimiento cuando la exposición al frío es prolongada.

Una vez determinado el comportamiento a 4°C y tomando en cuenta el rol de la ruta HOG en respuesta al estrés hipotérmico, se realizaron *drop test* en condiciones de estrés oxidativo (H₂O₂ 0,1mM), estrés osmótico (NaCl 0,4M) e hipertérmico (37°C) con el fin de observar si el mutante *dot1Δ* tenía la misma conducta que en condiciones de hipotermia, se seleccionaron las condiciones de estrés de acuerdo a lo descrito por Duch (2018), donde describe el rol de Hog1 en respuesta al estrés oxidativo, osmótico e hipertérmico. Como se indica en la Figura 14 el mutante *dot1Δ* no presentó una tolerancia a ninguno de estos tipos de estrés. Por lo que la tolerancia a bajas temperaturas parece ser una respuesta específica de este mutante.

Las células tienen diferentes mecanismos para responder a señales extracelulares con el fin de adaptarse a nuevos entornos ayudándose de las vías de señalización intracelular. En cuanto al estrés osmótico, oxidativo y térmico cientos de proteínas tienden a activarse y muchas de ellas actúan de forma dinámica para ayudar a la célula en su proceso de adaptación. Reportes indican que más de cien proteínas son moduladas por la proteína efectora Hog1 que es la que emite respuesta frente a estos tipos de estrés (Zhang, 2017). Las cepas utilizadas en este estudio tenían deleciones en genes que codifican para proteínas implicadas con las rutas de replicación y reparación del ADN, por lo que su crecimiento se debe a que poseen a la proteína Hog1, que es la que les

proporciona protección frente a las condiciones antes mencionadas. Así mismo, como se puede observar las cepas *hog1Δ* no crecieron en condiciones de estrés osmótico, como era de esperarse puesto que en ausencia de Hog1 existió un desequilibrio que hizo que la célula no pudiera continuar con su crecimiento tal como en el año 2010 lo sugirió Warringer.

En resumen, estos datos sugieren un rol específico de Dot1 en respuesta al estrés hipotérmico, independiente del estrés oxidativo, osmótico e hipertérmico. Por lo tanto, los siguientes esfuerzos se orientaron a determinar si el rol de Dot1 en respuesta al estrés hipotérmico depende o no de la ruta de Hog1.

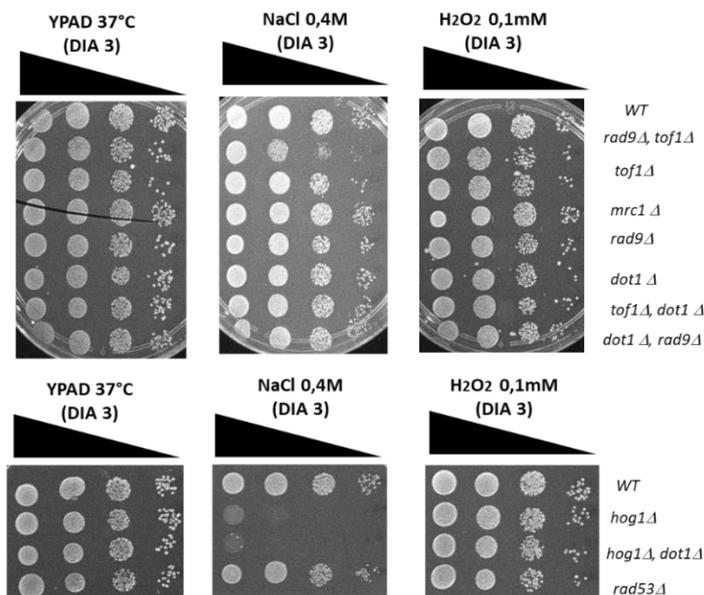


Figura 14. Prueba de sensibilidad a estrés oxidativo, hipertérmico y osmótico de las cepas salvaje (WT) y sus correspondientes mutantes crecidas en YPDA e incubadas por 3 días.

4.2 Determinación de la ruta del *checkpoint* implicada en la respuesta al estrés hipotérmico.

En respuesta a cualquier tipo de estrés (térmico, osmótico, genotóxico), una ruta del *checkpoint* se activa. Normalmente existe una proteína central que se activa por fosforilación. Así pues, Rad53 se fosforila en respuesta a estrés genotóxico (Soriano, 2012). Mientras que Hog1 se fosforila en respuesta a estrés térmico y osmótico (J. Lee & Levin, 2018). En este sentido, el interés de este trabajo es identificar si la función de Dot1 en respuesta al frío depende de la ruta del *checkpoint* de Rad53 o de Hog1.

Se ha descrito que Dot1 y Rad9 regulan la reparación de lesiones generadas en el ADN (estrés genotóxico), y esta respuesta está mediada por Rad53 (Conde et al., 2009). Para determinar si Rad53 participa en la respuesta al frío identificada en mutantes *dot1Δ*, se realizaron *drop test* a 4°C. Los mutantes *rad53Δ* crecen de manera similar al salvaje, mientras que los mutantes *dot1Δ* tienen mayor tolerancia (Figura 15A). Para determinar la fosforilación de Rad53 se realizó un análisis *Western blot* (14B). Como se puede observar en la Figura 15B en el carril dos, correspondiente a la muestra de 4°C de la cepa salvaje; no existió activación, en comparación con la señal observada en el control positivo (MMS 0,1%). Por lo tanto, estos resultados indican que Rad53 no está implicado en la respuesta al estrés hipotérmico.

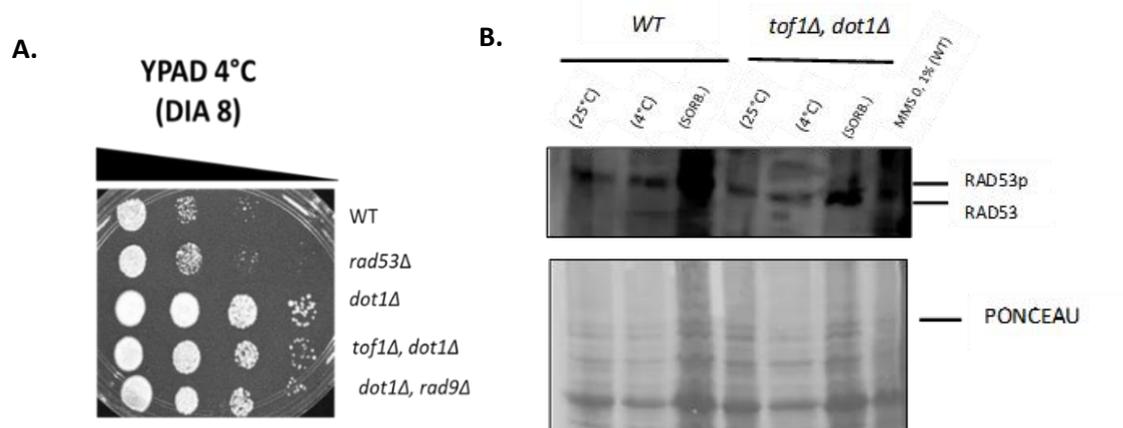


Figura 15. Western Blot Rad53

(a) Prueba de sensibilidad al estrés hipotérmico de las cepas salvaje (WT) y sus correspondientes mutantes crecidas en YPDA e incubadas a 4°C por 8 días.

(b) Análisis *Western blot* de Rad53 en células WT y mutantes tratadas con MMS (control positivo), 25°C (control negativo), sorbitol y sometidas a 4°C para verificar la activación del *checkpoint*. Un shift* en la banda corresponde a la fosforilación de Rad53, una característica de la activación del *checkpoint*. El control de carga es mostrado con la coloración Ponceau.

Con el fin de determinar si Hog1 participa en la respuesta al estrés hipotérmico observada en mutantes $dot1\Delta$, se realizaron análisis similares a los utilizados para estudiar la proteína Rad53 en este trabajo pero esta vez para la proteína Hog1. En primer lugar, se analizó la respuesta a estrés hipotérmico, por *drop test*, de cepas salvaje y mutantes ($hog1\Delta$, $dot1\Delta$ y $hog1\Delta dot1\Delta$). Las células fueron cultivadas en medio sólido YPAD a 4°C y a 25°C (control) durante diez y tres días respectivamente. Como se esperaba las cepas con delección $dot1\Delta$ son altamente tolerantes a bajas temperaturas (4°C), mientras que el mutante $hog1\Delta$ se comporta como un salvaje. Sin embargo, el doble mutante $hog1\Delta dot1\Delta$ se comporta igual que un salvaje, es decir, la tolerancia a bajas temperaturas del mutante $dot1\Delta$ depende de la presencia de la proteína Hog1 (Figura 16). Estos resultados correlacionan la función de estas dos enzimas.

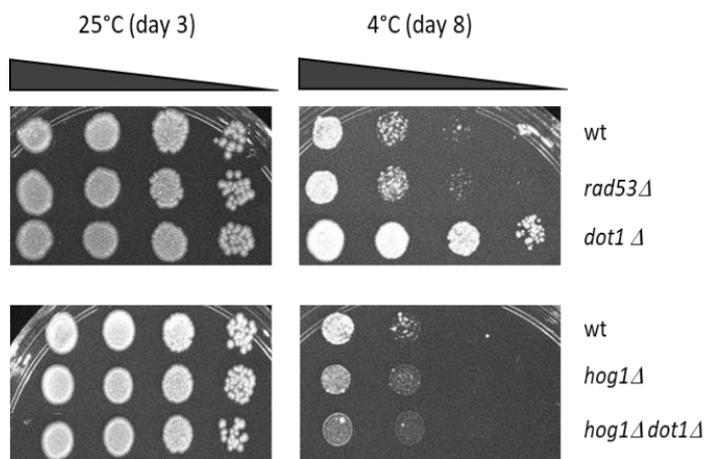


Figura 16. Prueba de sensibilidad al estrés hipotérmico de las cepas salvaje (WT) y sus correspondientes mutantes crecidas en YPDA e incubadas a 25°C y 4°C por 3 y 10 días respectivamente.

Con el objetivo de observar si la proteína Hog1 se activa en condiciones de estrés hipotérmico, se sometieron cultivos de células salvajes a dos tipos de estrés osmótico (Sorbitol y NaCl) y a estrés hipotérmico y se determinó la activación de Hog1 por *Western blot* (Figura 17). Los resultados indican que Hog1 se activa en respuesta a las condiciones de estrés seleccionadas, sustentando la idea de una función de la ruta HOG en respuesta al estrés hipotérmico.

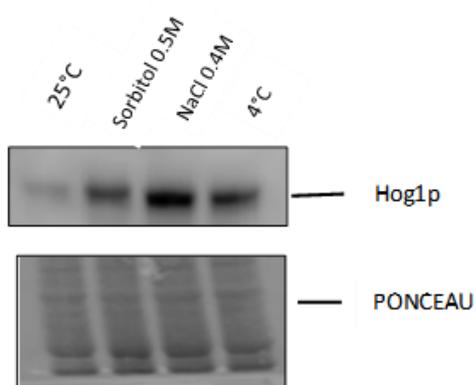


Figura 17. Análisis *Western blot* para la proteína Hog1 fue controlado en células WT a 25°C, con sorbitol 0,5M, NaCl 0,4M y 4°C. El control de carga es mostrado con la coloración Ponceau.

Dentro de los procesos que realiza una célula se encuentra la transcripción y la replicación. Es posible que el estrés hipotérmico provoque la colisión entre la replicación-transcripción (TAR; *transcription associated replication*). Esto es debido a que Hog1 se activa en respuesta a diferentes tipos de estrés, activando a su vez la expresión de cientos de genes y la activación de la proteína Mrc1. Entre las funciones de Mrc1 se encuentran el bloqueo de orígenes tardíos y la estabilización del replisoma (Duch, 2018). La sensibilidad que se observa en la doble mutante *hog1Δ dot1Δ* con relación a la simple mutante *dot1Δ* puede deberse a que se genera inestabilidad genómica en la horquilla de replicación por la colisión con la transcripción, ya que al no existir Hog1 que active a Mrc1 (estabilización del replisoma) y a su vez al no tener a Dot1, que se encuentra dentro de los mecanismos de reparación, la transcripción se ve alterada lo que resulta en la inhibición de la síntesis de ADN (Brambati, Colosio, Zardoni, Galanti, & Liberi, 2015). A diferencia de la simple mutante *dot1Δ* que cuenta con la estabilización del replisoma por lo cual continua con la replicación y a su vez, la simple mutante *hog1Δ* se comporta de forma similar que la cepa salvaje porque posee Dot1 y el resto de proteínas de la ruta del *checkpoint* que le permiten completar el ciclo celular.

El siguiente paso fue determinar el tiempo en el que las cepas se encontraban en fase exponencial tras sincronizar en G1 y liberar para que continúe el ciclo celular a 4°C. Tras varios procesos de sincronización y toma de muestras durante las primeras 24 h de liberación de G1 a 4°C, se logró identificar que la fase S tenía lugar entre 4-10 h, dependiendo del mutante. Como se observa en los análisis FACS de la Figura 18A la cepa salvaje se encuentra en replicación alrededor de las 8 h, el mutante *dot1Δ* a las 4 horas, y los mutantes *hog1Δ* y *hog1Δ dot1Δ* alrededor de las 6 h. Adicionalmente, se determinó el *budding index* y la OD₆₀₀ (Figuras 17B y C). Observándose que las cepas siguen el mismo patrón de crecimiento antes mencionado (Curva de crecimiento 4°C y drop test 4°C). Se detectó el inicio de la gemación a las 4 h para el mutante *dot1Δ*,

mientras que el WT inicio gemación alrededor de las 8 h. Las medidas de OD₆₀₀ indican que tras la liberación de G1 a 4°C, la cepa mutante en *dot1Δ* fue la primera en iniciar el crecimiento. Por lo tanto, los datos muestran que las células mutantes en *dot1Δ* no detienen su crecimiento a 4°C, lo que sugiere que Dot1 regula algún mecanismo que responde al estrés hipotérmico. Además, este mecanismo depende, al menos parcialmente, de Hog1, ya que en ausencia de Hog1 y Dot1 simultáneamente, las células responden parcialmente al estrés hipotérmico (4°C), deteniendo su crecimiento.

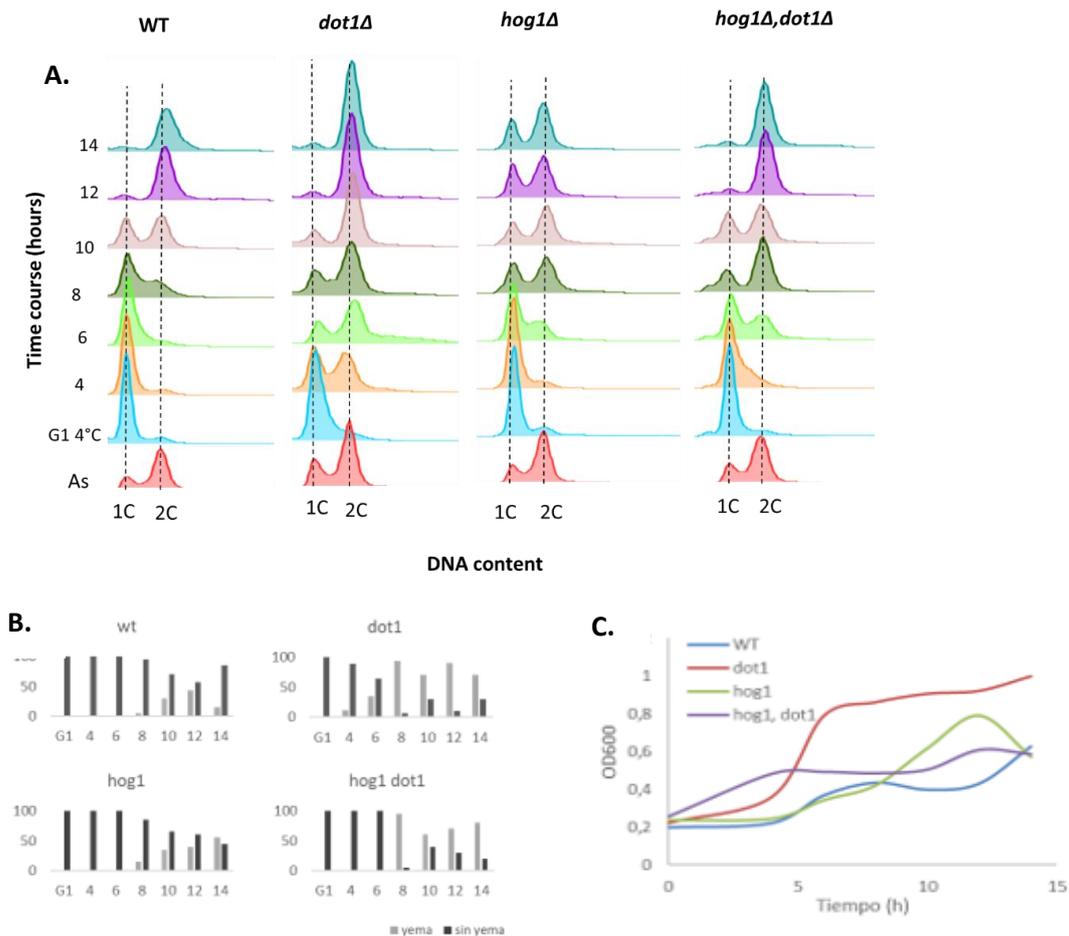


Figura 18. Sincronización celular.

- (a) Análisis FACS de células sincronizadas en fase G1 y liberadas en fase S a 4°C.
- (b) Análisis *budding index* de células sincronizadas en fase G1 y liberadas en fase S a 4°C.
- (c) Análisis OD₆₀₀ de células sincronizadas en fase G1 y liberadas en fase S a 4°C.

El siguiente paso fue determinar si existían diferencias en el proceso de replicación entre los mutantes y el WT, a 4°C, mediante electroforesis de campos pulsados. Esta técnica permite separar moléculas grandes de ADN (hasta 10 Mb). En este trabajo se utilizó esta técnica con el fin de observar si en algún punto de la progresión del ciclo, la célula se detenía o relentizaba en la fase S, basándonos en el hecho de que los cromosomas en la replicación no entran en el gel y quedan atrapados en el pocillo, disminuyendo la intensidad o desapareciendo las bandas de células que se están replicando. Los cromosomas que han completado su replicación sí logran penetrar en el gel, dando lugar a un patrón de bandas característico de especie (mayor intensidad). Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 19. A 4 h se puede observar que no existen bandas en el WT, sugiriendo que las células no han finalizado la replicación. El patrón de bandas se observa a partir de 6 y 8 h tras ser liberado de G1, a 4°C. Sin embargo, en los mutantes se observa replicación temprana a las 4 h, tal como se indica en la Figura 19.

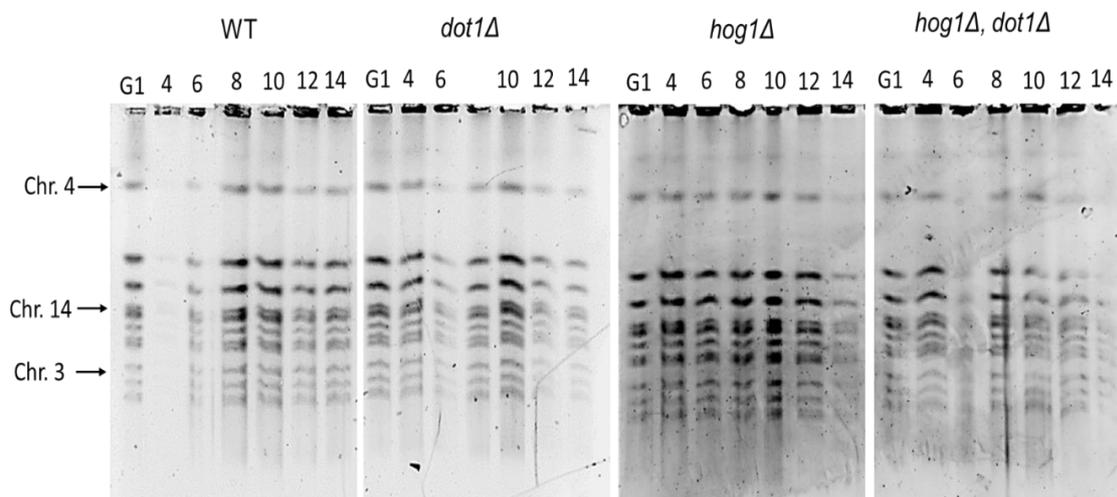


Figura 19. Electroforesis de campos pulsados, los números representan las diferentes horas en las que se tomaron las muestras una vez que el cultivo fue liberado de G1 a 4°C.

El porcentaje promedio corresponde a la intensidad de la señal en los tres cromosomas señalados en la Tabla 5. Fue “normalizado” con el índice de ADN

cuantificado por cada muestra, dando como resultado el porcentaje de la intensidad de la señal normalizado para todas las muestras. El resultado equivale al “porcentaje de replicación” de cada cepa (Figura 19 y tabla 5).

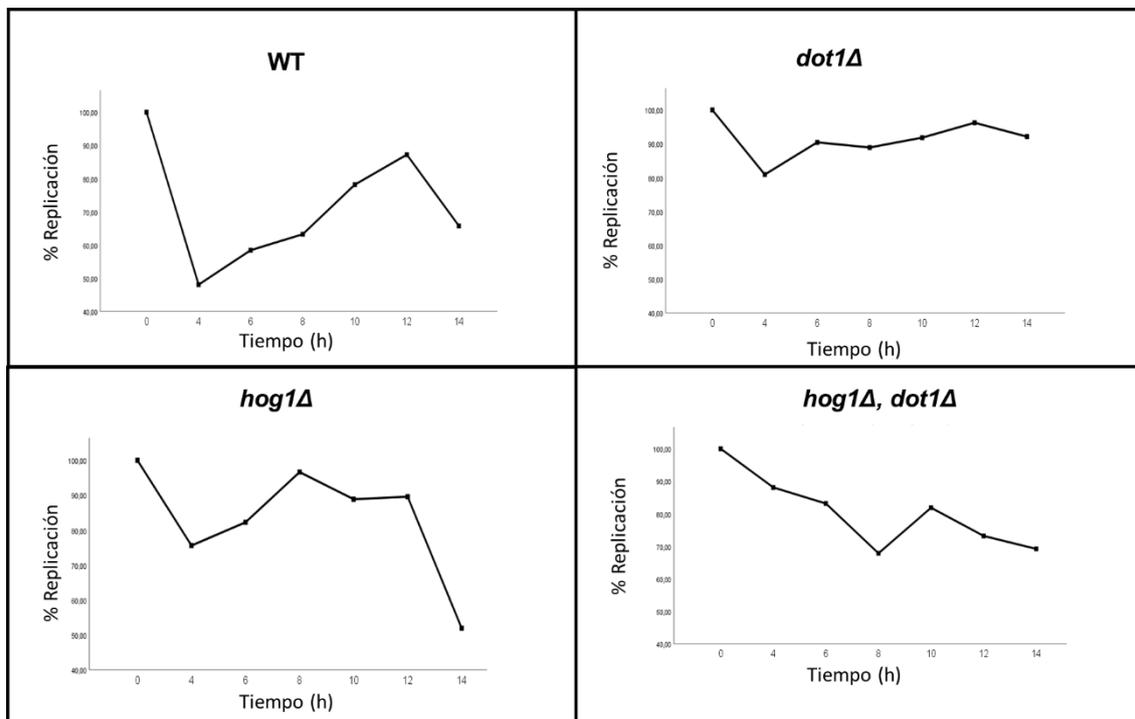


Figura 20. Porcentaje de replicación de las cepas WT, *dot1Δ*, *hog1Δ* y *dot1Δ hog1Δ* sometidas a 4°C.

Tabla 5

Porcentajes de la señal promedio: WT, *dot1Δ*, *hog1Δ* y *dot1Δ hog1Δ* sometidas a 4°C.

	WT	<i>dot1Δ</i>	<i>hog1Δ</i>	<i>dot1Δ hog1Δ</i>
	Señal %	Señal %	Señal %	Señal %
G1	100	100	100	100
4 h	48,00	80,92	75,6	88,12
6 h	58,47	90,44	82,25	83,17
8 h	63,27	88,92	96,63	67,86
10 h	78,20	91,82	88,87	81,87
12 h	87,22	96,23	89,57	73,2
14 h	65,77	92,12	51,92	69,21

Para establecer diferencias significativas entre las muestras de la cepa WT frente a las cepas mutadas, se utilizó la herramienta estadística t de Welch a través del software SPSS Ver 25. Los resultados se detallan en la Tabla 6 y se representan en la Figura 20. Esta prueba se realizó con el fin de observar si existían diferencias significativas (intensidad de las bandas) en una misma muestra (cepas) en diferentes tiempos. Como se puede observar en la Tabla 6, en la cepa WT existen diferencias a las 4, 6 y 8 horas lo que lleva concordancia con los análisis anteriores (FACS, *budding index*, OD₆₀₀) en los que claramente se indica que la replicación se relentiza en esta cepa en respuesta al estrés hipotérmico, comportamiento contrario a la de las mutantes en especial a *dot1Δ*. Más representaciones de ello se muestran en la Tabla 5 y la Figura 20 en la que se muestran los porcentajes de replicación de las diferentes cepas en estudio.

Tabla 6

Análisis estadístico entre WT y cepas mutantes sometidas a 4°C por prueba t de Welch.

		WT		<i>dot1Δ</i>		<i>hog1Δ</i>		<i>dot1Δ</i> <i>hog1Δ</i>	
diferencias significativas	G1	-	-	-	-	-	-	-	-
	4 h	SI	0,02	NO	0,117	NO	0,260	NO	0,153
	6 h	SI	0,005	NO	0,181	NO	0,289	NO	0,137
	8 h	SI	0,014	NO	0,271	NO	0,242	NO	0,026
	10 h	NO	0,267	SI	0,02	NO	0,068	NO	0,140
	12 h	NO	0,08	NO	0,317	NO	0,274	NO	0,092
	14 h	NO	0,106	SI	0,0300	NO	0,08	NO	0,082

Nota: *p<0,05

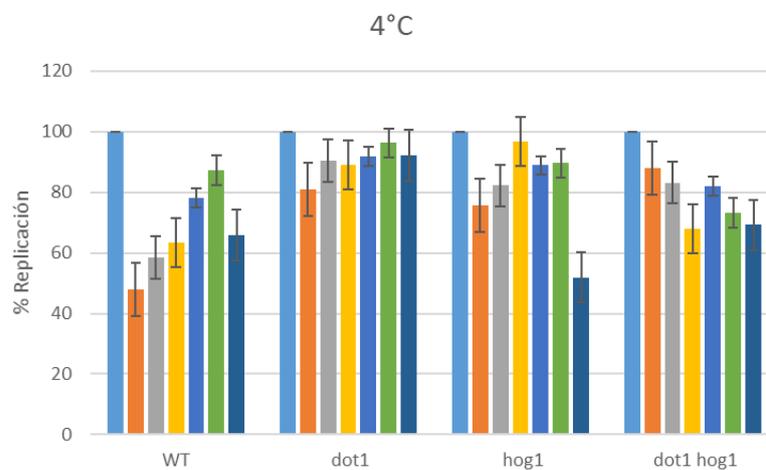


Figura 21. Representación gráfica del análisis estadístico de cepas sometidas a 4°C.

Por su lado la simple mutante *hog1Δ*, logra replicarse lo que indica que la ausencia de este gen no afecta en la replicación o existe la probabilidad que se este replicando con una tasa de mutagénesis alta como es el caso de la cepa *dot1Δ* lo que refuerza la hipótesis que existe el fenómeno de colisión entre la

replicación y transcripción. Si este fenómeno se sucita, la síntesis de ADN tiende a bloquearse o genera mayor inestabilidad genómica (Helmrich, Ballarino, Nudler, & Tora, 2013).

Todos estos datos en conjunto indican que el estrés hipotermico genera inestabilidad genómica y ésta es independiente de la respuesta de Rad53.

Como consecuencia, los resultados indican que a 4°C, los tres mutantes son capaces de replicar, poniendo de manifiesto que Hog1 y Dot1 tienen un rol en la respuesta a bajas temperaturas, que contribuyen a detener el ciclo cuando están presentes (WT). Sin embargo, pese a iniciar la replicación de forma precoz, la ausencia de Hog1 limita el crecimiento que se observa en los mutantes *dot1Δ* (*drop test*, Figura 16 y OD₆₀₀ Figura 18C). Se ha descrito que Hog1 controla la activación de Mrc1, que a su vez controla la activación de los orígenes tardíos, en respuesta a estrés osmótico (Duch, 2013). De manera que, en ausencia de Hog1 todos los orígenes se activan descontroladamente. Es posible que esto mismo suceda en estrés hipotérmico, por eso se observa replicación precoz (Figura 19, PFGE a 4 h). Sin embargo, en ausencia de Hog1 el crecimiento acaba deteniéndose, lo que podría deberse a la presencia de muchos eventos que inducen inestabilidad genómica: más horquillas de replicación activas, más colisión con horquillas de transcripción o TAR, y por tanto más lesiones que deben repararse. Pero llama la atención que la ausencia exclusiva de *dot1* permite que las células crezcan más a 4°C. Varias posibilidades podrían explicar esta situación:

Primero, es posible que Dot1 tenga un rol, directo o indirecto, sobre la replicación del ADN, puesto que las células replican más rápido (PFGE). Hasta la fecha este rol no ha sido descrito. Sin embargo, un fenotipo similar, crecimiento a 4°C no se observa en mutantes de replicación como *mrc1Δ*, *rad53Δ* o *rad9Δ tof1Δ*.

Otra posibilidad es la regulación negativa que Dot1 ejerce sobre las polimerasas de translesión (TLS) (Conde & San-Segundo, 2008). En ausencia de Dot1 las TLS son más activas, y reparan antes las lesiones. Si esto es cierto, la baja temperatura a 4°C debe inducir daños o lesiones en el ADN. En efecto resultados preliminares (Comunicación personal C.R y A.P), indican que a 4°C se acumulan focos de Rad52, un fenotipo indicativo de lesiones en el ADN.

Alternativamente, se ha descrito que a 4°C, las células salvajes detienen la traducción de proteínas (Hayashi & Maeda, 2006). Cabe la posibilidad de que Dot1 ejerza un rol sobre la traducción.

Finalmente, durante la experimentación se observó que las células WT desarrollan fenotipos cualitativos característicos de muerte: pérdida de estructura, lisis aparente o pérdida de contraste. Esta observación sugiere que las células WT entran en apoptosis tras ser expuestas a 4°C, por lo que un siguiente paso será determinar si Hog1/Dot1 tienen alguna función relacionada con una vía apoptótica.

4.3 Metilación de la histona H3 en respuesta al estrés hipotérmico.

Al margen de su función celular, se ha documentado ampliamente que Dot1 es una histonametiltransferasa cuya diana es la lisina 79 de la histona H3 (Farooq, Banday, Pandita, & Altaf, 2016). La metilación de histonas es una modificación post-traducciona que ha sido relacionada con algunos procesos celulares como el silenciamiento génico o la regulación de la respuesta a cambios de temperatura extremos que está mediada por la función histona-metil-transferasa de Dot1 (Nguyen & Zhang, 2011). Se realizaron *drop test* a 4°C de una cepa salvaje y de cepas con sustituciones en la lisina 79 de H3, cedidas por el Dr. San-Segundo (Salamanca, España, las mismas utilizadas en el estudio "*Role of Dot1 in the response to alkylating DNA damage in Saccharomyces cerevisiae: Regulation of DNA damage tolerance by the error-prone polymerases Polζ/Rev1*" (Conde & San-Segundo, 2008) . La cepa salvaje contiene el gen de la histona

H3 (HHT2, histone H three 2) en un plásmido, mientras que la copia salvaje ha sido eliminada. Una cepa contiene una sustitución de la lisina 79 por una arginina (K79R-H3), que mimetiza una metilación constitutiva. Los resultados de la Figura 22 revelan que no existe diferencia de crecimiento entre las diferentes cepas, ni a 25 °C ni a 4 °C.

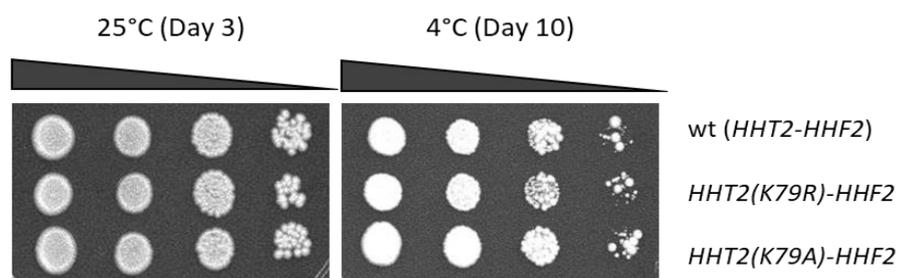


Figura 22. Prueba de sensibilidad al estrés hipotérmico de las cepas salvaje (WT) y sus correspondientes mutantes crecidas en YPDA e incubadas a 25°C y 4°C por 3 y 10 días respectivamente.

Continuando con la idea de investigar si la metilación es una de las modificaciones que regula la respuesta a cambios de temperatura extremos, se examinó el patrón de metilación de la histona H3 por *Western blot* en células salvajes y mutantes en fase exponencial de crecimiento, incubadas durante 24 horas a 25°C o 8 días a 4°C. Los resultados de *Western blot* de los extractos de proteínas analizados con anti-H3 metilada, son mostrados en la Figura 23. La histona H3 metilada se detecta en la cepa salvaje y en cepas con deleciones en un gen diferente a *dot1*, mientras que en las cepas *dot1Δ* no se observa metilación, ni a 25 ni a 4°C (Figura 23). Es posible que la falta de metilación en las cepas sometidas a 4°C y con deleción de la proteína Dot1 pueda explicar por qué el crecimiento de esta es mayor, pues estas células no son capaces de silenciar genes. Sin embargo, el objetivo de estos experimentos era determinar si la metilación de la histona H3 tiene efecto sobre el crecimiento (Figura 22) o es regulada en respuesta a los cambios de temperatura (Figura 22). Los resultados indican que el estado de metilación de la H3 no tiene relación con el

crecimiento a bajas temperaturas. Este resultado, si bien inesperado, sugeriría que la respuesta a bajas temperaturas es regulada por una función de Dot1, independiente de K79H3, su principal diana descrita.

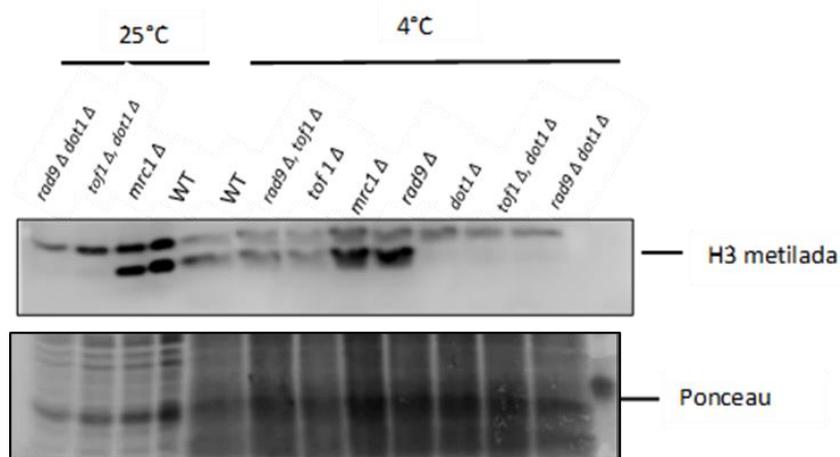
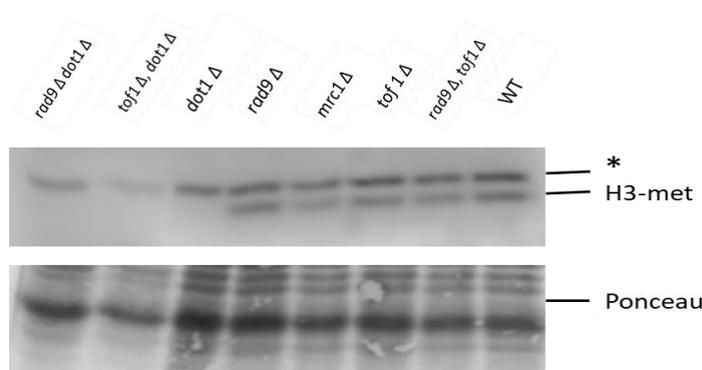


Figura 23. Metilación de la proteína H3 monitoreada por Western Blot usando α His-Me anticuerpo primario con anti-rabbit anticuerpo secundario. El control de carga es mostrado con la coloración Ponceau. Ambos ensayos fueron realizados con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que tienen deficiencias en una o dos actividades enzimáticas de las rutas del *checkpoint* de la replicación y reparación del ADN. Las células fueron sometidas a 25°C durante 24 horas y a 4°C durante ocho días.

Además de las funciones ya descritas de Dot1p, recientemente se ha encontrado que esta es particularmente importante para controlar la dinámica del

nucleosoma en las regiones transcritas (S. Lee, 2018). Lo que demuestra que en ausencia de esta proteína se genera inestabilidad en el genoma y aún más en respuesta al estrés hipotérmico.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Los análisis de sensibilidad y viabilidad muestran que la cepa salvaje (WT) es sensible al estrés hipotérmico, contrario a la mutante *dot1Δ* que presenta resistencia (*drop test*, OD₆₀₀).

Rad53 no se fosforila en respuesta al estrés hipotérmico (*Western blot*). Además el mutante *rad53Δ* presenta un crecimiento similar al WT (*drop test*). Estos datos sugieren que la respuesta al estrés hipotérmico no es regulada por la ruta de señalización dependiente de Rad53.

Hog1 se fosforila en respuesta al estrés hipotérmico (*Western blot*). Además, la mutación de *hog1Δ* suprime la resistencia al frío de un mutante *dot1Δ* (*drop test*). Estos datos sugieren que la respuesta al estrés hipotérmico es regulada por la ruta de señalización dependiente de Hog1.

Análisis para determinar el avance de la replicación revelan que células salvajes bloquean la entrada en replicación en respuesta a bajas temperaturas, y esta respuesta depende tanto de Dot1 como de Hog1. En ausencia de *dot1* o de *hog1*, las células inician de forma precoz la replicación (PFGE), sin embargo, mutantes *hog1Δ* acaban deteniendo el crecimiento, mientras que mutantes *dot1Δ* no (*drop test*, OD₆₀₀).

Las cepas *dot1Δ* no presentaron patrón de metilación a 25°C (control) y 4°C, mientras que las cepas que no tenían esta delección incluyendo a la cepa salvaje, sí presentaron patrón de metilación. Lo cual sugiere que la temperatura no es un factor que altere la metilación de la histona H3.

5.2 Recomendaciones

Dilucidar la razón por la cual se observan dos poblaciones diferentes en los análisis FACs.

Construir doble mutante *rad53* Δ *dot1* Δ para descartar definitivamente que la ruta Rad53 interviene en respuesta al estrés hipotérmico.

Realizar el proceso *DNA combing* para determinar la velocidad de la horquilla.

Analizar los focos de Rad52-GFP, ensayos TAR con plásmidos IN/OUT.

Realizar ensayos FOA y CAN para determinar si las enzimas de tras lesión tienen algún rol en la respuesta al estrés hipotérmico. Analizar si existe alguna respuesta en apoptosis (citometría) o en traducción.

REFERENCIAS

- Abreu, C. M., Kumar, R., Hamilton, D., Dawdy, A. W., Creavin, K., Eivers, S., ... Lowndes, N. F. (2013). Site-specific phosphorylation of the DNA damage response mediator rad9 by cyclin-dependent kinases regulates activation of checkpoint kinase 1. *PLoS Genics*, *9*(4), e1003310. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003310>
- Aguilera, J., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2007). Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *31*(3), 327–341. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00066.x>
- Bacal, J., Moriel-Carretero, M., Pardo, B., Barthe, A., Sharma, S., Chabes, A., ... Pasero, P. (2018). Mrc1 and Rad9 cooperate to regulate initiation and elongation of DNA replication in response to DNA damage. *The EMBO Journal*, *37*(21), e99319. <https://doi.org/10.15252/embj.201899319>
- Bando, M., Katou, Y., Komata, M., Tanaka, H., Itoh, T., Sutani, T., & Shirahige, K. (2009). Csm3, Tof1, and Mrc1 form a heterotrimeric mediator complex that associates with DNA replication forks. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(49), 34355–34365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065730>
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1170*, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- Bell, S. P., & Dutta, A. (2002). DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, *71*(1), 333–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425>
- Brambati, A., Colosio, A., Zardoni, L., Galanti, L., & Liberi, G. (2015). Replication and transcription on a collision course: eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability. *Frontiers in Genetics*, *6*, 166. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00166>

- BROOKES, P., & LAWLEY, P. D. (1964). Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin : Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and their Binding to Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, 202(4934), 781–784. <https://doi.org/10.1038/202781a0>
- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J. C., & Cimprich, K. A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & Development*, 19(9), 1040–1052. <https://doi.org/10.1101/gad.1301205>
- Campbell, N. A., Urry, L., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Brasil, Médica Panamericana. Cap. 5, 73-74.
- Carvajal, L. A., Hamard, P.-J., Tonnessen, C., & Manfredi, J. J. (2012). E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes & Development*, 26(14), 1533–1545. <https://doi.org/10.1101/gad.184911.111>
- Chen, Y., & Sanchez, Y. (2004). Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair*, 3(8–9), 1025–1032. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.003>
- Chini, C. C. S., & Chen, J. (2004). Claspin, a regulator of Chk1 in DNA replication stress pathway. *DNA Repair*, 3(8–9), 1033–1037. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.001>
- Conde, F., Refolio, E., Cerdón-Preciado, V., Cortés-Ledesma, F., Aragón, L., Aguilera, A., & San-Segundo, P. A. (2009). The Dot1 histone methyltransferase and the Rad9 checkpoint adaptor contribute to cohesin-dependent double-strand break repair by sister chromatid recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 182(2), 437–446. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.101899>
- Conde, F., & San-Segundo, P. A. (2008). Role of Dot1 in the response to alkylating DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of

DNA damage tolerance by the error-prone polymerases Pol ζ /Rev1. *Genetics*, 179(3), 1197–1210. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.089003>

Dickinson, J. R., & Schweizer, M. (2004). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press.

Dolores, M., & Villar, D. (n.d.). Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. Recuperado de <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/813/783> en 18 de abril de 2018.

Duch, A., Canal, B., Barroso, S. I., García-Rubio, M., Seisenbacher, G., Aguilera, A., ... Posas, F. (2018). Multiple signaling kinases target Mrc1 to prevent genomic instability triggered by transcription-replication conflicts. *Nature Communications*, 9(1), 379. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02756-x>

Duch, A., Felipe-Abrio, I., Barroso, S., Yaakov, G., García-Rubio, M., Aguilera, A., ... Posas, F. (2012). Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature*, 493(7430), 116–119. <https://doi.org/10.1038/nature11675>

Duch, A., Felipe-Abrio, I., Barroso, S., Yaakov, G., García-Rubio, M., Aguilera, A., ... Posas, F. (2013). Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature*, 493(7430), 116–119. <https://doi.org/10.1038/nature11675>

Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33–48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>

Farooq, Z., Banday, S., Pandita, T. K., & Altaf, M. (2016). The many faces of histone H3K79 methylation. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 768, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.005>

Figure 14.8, Cell cycle checkpoints. (2000). Recuperado de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/figure/A2444/?report=objectonly> en 20 de mayo de 2018.

- Finn, K., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(9), 1447–1473. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0875-3>
- Fong, C. M., Arumugam, A., & Koepf, D. M. (2013). The *Saccharomyces cerevisiae* F-box protein Dia2 is a mediator of S-phase checkpoint recovery from DNA damage. *Genetics*, *193*(2), 483–499. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146373>
- Gavin, A.-C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., ... Superti-Furga, G. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, *440*(7084), 631–636. <https://doi.org/10.1038/nature04532>
- Geiser, John R., P., & Carrico, Pauline M., P. (2014). *Saccharomyces cerevisiae*: Discovery Service. <https://doi.org/94416684>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5287), 546, 563–567. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849441> en 5 de marzo de 2018.
- Grallert, B., & Boye, E. (2008). The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle*, *7*(15), 2315–2320. <https://doi.org/10.4161/cc.6389>
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, *246*(4930), 629–634. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683079> en 3 de septiembre de 2018.
- Hayashi, M., & Maeda, T. (2006). Activation of the HOG Pathway upon Cold Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *803*, 797–803. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj089>

- Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., & Tora, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(4), 412–418. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2543>
- Jossen, R., & Bermejo, R. (2013). The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks. *Frontiers in Genetics*, 4, 26. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00026>
- Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428(6983), 617–624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>
- Lee, J., & Levin, D. E. (2018). Intracellular mechanism by which arsenite activates the yeast stress MAPK Hog1. *Molecular Biology of the Cell*, 29(15), 1904–1915. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-03-0185>
- Lee, S., Oh, S., Jeong, K., Jo, H., Choi, Y., Seo, H. D., Lee, D. (2018). Dot1 regulates nucleosome dynamics by its inherent histone chaperone activity in yeast. *Nature Communications*, 9(1), 240. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02759-8>
- Liu, Y., Vidanes, G., Lin, Y. C., Mori, S., & Siede, W. (2000). Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of *Schizosaccharomyces pombe* Chk1 involved in DNA-damage-induced M-phase arrest. *Molecular & General Genetics: MGG*, 262(6), 1132–1146. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660074> en 20 de junio de 2018.
- Longhese, M. P., Foiani, M., Muzi-Falconi, M., Lucchini, G., & Plevani, P. (1998). EMBO MEMBER'S REVIEW DNA damage checkpoint in budding yeast. *The EMBO Journal*, 17(19), 5525–5528. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170880/pdf/005525.pdf> en 30 de agosto de 2018.
- Lupardus, P. J., Byun, T., Yee, M.-C., Hekmat-Nejad, M., & Cimprich, K. A. (2002). A requirement for replication in activation of the ATR-

- dependent DNA damage checkpoint. *Genes & Development*, 16(18), 2327–2332. <https://doi.org/10.1101/gad.1013502>
- Ma, J.-L., Lee, S.-J., Duong, J. K., & Stern, D. F. (2006). Activation of the Checkpoint Kinase Rad53 by the Phosphatidyl Inositol Kinase-like Kinase Mec1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 3954–3963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507508200>
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., & Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), 242–245. <https://doi.org/10.1038/369242a0>
- Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Xu, T., & Klionsky, D. J. (2011). Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 193(4), 755–767. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102092>
- Mitchison, J. M. (1990). My favourite cell: The fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *BioEssays*, 12(4), 189–191. <https://doi.org/10.1002/bies.950120409>
- Mortimer, R. K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*, 10(4), 403–409. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779481> en 20 de septiembre de 2018.
- Nguyen, A. T., & Zhang, Y. (2011). The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes & Development*, 25(13), 1345–1358. <https://doi.org/10.1101/gad.2057811>
- Nishitani, H., & Lygerou, Z. (2004). DNA replication licensing. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 9, 2115–2132. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353274> en 15 de octubre de 2018.
- O'Connell, M. J., & Cimprich, K. A. (2005). G2 damage checkpoints: what is the turn-on? *Journal of Cell Science*, 118(1), 1–6.

<https://doi.org/10.1242/jcs.01626>

- Ohouo, P. Y., Bastos de Oliveira, F. M., Liu, Y., Ma, C. J., & Smolka, M. B. (2012). DNA-repair scaffolds dampen checkpoint signalling by counteracting the adaptor Rad9. *Nature*, *493*(7430), 120–124. <https://doi.org/10.1038/nature11658>
- Pan, X., Ye, P., Yuan, D. S., Wang, X., Bader, J. S., & Boeke, J. D. (2006). A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, *124*(5), 1069–1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.036>
- Paulovich, A. G., & Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*, *82*(5), 841–847. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7671311> en 20 de octubre de 2018.
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(1), 72–75. <https://doi.org/10.1038/35048077>
- Pezzullo, J. C. (2013). *Biostatistics for dummies*. Wiley. Recuperado de <https://www.wiley.com/en-us/Biostatistics+For+Dummies-p-9781118553985> en 15 de diciembre de 2018.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(13), 7420–7426. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535770> en 21 de diciembre de 2018.
- Rao, P. N., & Johnson, R. T. (1971). Mammalian cell fusion. IV. Regulation of chromosome formation from interphase nuclei by various chemical compounds. *Journal of Cellular Physiology*, *78*(2), 217–223. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040780208>

- Rodríguez-Peña, J. M., García, R., Nombela, C., & Arroyo, J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*, 27(8), 495–502. <https://doi.org/10.1002/yea.1792>
- Romanov, N., Hollenstein, D. M., Janschitz, M., Ammerer, G., Anrather, D., & Reiter, W. (2017). Identifying protein kinase-specific effectors of the osmostress response in yeast. *Science Signaling*, 10(469), eaag2435. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag2435>
- Rommel Emilio Guevara Santander, A. M. P. G. (2017). Interacción genética de las rutas checkpoint DDC y DRC en la regulación de la progresión de la replicación del ADN en *S. cerevisiae*, 43.
- Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., Morrow, J. S., Pradhan, D., & Stern, D. F. (2002). Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Molecular Cell*, 9(5), 1055–1065. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049741> en 24 de diciembre de 2018.
- Schweinfest, C. W., Graber, M. W., Chapman, J. M., Papas, T. S., Baron, P. L., Watson, D. K., ... Stein, G. S. (1997). CaSm: an Sm-like protein that contributes to the transformed state in cancer cells. *Cancer Research*, 57(14), 2961–2965. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230209> en 1 de enero de 2018.
- Sidorova, J. M., & Breeden, L. L. (1997). Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 11(22), 3032–3045. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9367985> en 2 de enero de 2018.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (2013). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Recuperado de

<http://www.genetics.org/content/genetics/122/1/19.full.pdf> en 5 de enero de 2018.

Soriano, M. (2012). Nueva función de la ruta de la proteína quinasa C en el mantenimiento de la integridad genómica. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia*, 200. Recuperado de [http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/24428/Tesis Doctoral MARIA SORIANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/24428/Tesis%20Doctoral%20MARIA%20SORIANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y) en 12 de marzo de 2018.

Stelling, J., Sauer, U., Szallasi, Z., Doyle, F. J., & Doyle, J. (2004). Robustness of Cellular Functions. *Cell*, 118(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.008>

Turgeon, M.-O., Perry, N. J. S., & Poulgiannis, G. (2018). DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Frontiers in Oncology*, 8, 15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00015>

University of Leicester. (n.d.). The Cell Cycle, Mitosis and Meiosis. Recuperado de <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/cellcycle-mitosis-meiosis> en 14 de mayo de 2018.

Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., & Sunnerhagen, P. (2010). The HOG pathway dictates the short-term translational response after hyperosmotic shock. *Molecular Biology of the Cell*, 21(17), 3080–3092. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0006>

Weinert, T., & Hartwell, L. (1989). Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science. Supplement*, 12, 145–148. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2699734> en 6 de abril de 2018.

Wuytswinkel, O. Van, Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M. C., Ammerer, G., Ruis, H., & Mager, W. H. (2000). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of

the HOG MAP kinase pathway. *Molecular Microbiology*, 37(2), 382–397. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2000.02002.X>

Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Côté, J., & Kron, S. J. (2005). Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), 8430–8443. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8430-8443.2005>

Xu, Y. -j., Davenport, M., & Kelly, T. J. (2006). Two-stage mechanism for activation of the DNA replication checkpoint kinase Cds1 in fission yeast. *Genes & Development*, 20(8), 990–1003. <https://doi.org/10.1101/gad.1406706>

Yeeles, J. T. P., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A., & Diffley, J. F. X. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature*, 519(7544), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature14285>

Zhang, R., Yuan, H., Wang, S., Ouyang, Q., Chen, Y., Hao, N., & Luo, C. (2017). High-throughput single-cell analysis for the proteomic dynamics study of the yeast osmotic stress response. *Scientific Reports*, 7(1), 42200. <https://doi.org/10.1038/srep42200>

Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*, 300(5625), 1542–1548. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>

ANEXOS

ANEXO 1

AUTORIZACIÓN

La alumna Pamela Mishell Mosquera Carrera con cédula de identidad 172423037-8, ha desarrollado el trabajo de investigación de fin de carrera titulado: "Regulación de la replicación del ADN en respuesta al estrés hipotérmico en *Saccharomyces cerevisiae*". Como requisito para la obtención del título de pregrado ingeniera en biotecnología conforme determinan las normas legales y reglamentarias propias de la Universidad de las Américas.

El trabajo de investigación ha sido ejecutado con la colaboración y acompañamiento del personal de la Universidad Central del Ecuador y financiado con fondos propios del laboratorio de replicación del ADN e inestabilidad del genoma, Instituto de investigación en Salud Pública y Zoonosis, Universidad Central del Ecuador, razón por la cual **se certifica** que:

La Universidad Central del Ecuador está autorizada a utilizar los datos obtenidos dentro del marco del mencionado trabajo de investigación de fin de carrera para cualquier actividad de divulgación científica (artículos nacionales o internacionales indexados o no indexados, y/o comunicaciones en congresos). Dichas publicaciones que reflejen los resultados presentados en el manuscrito de su trabajo de fin de carrera reconocerán los derechos de co-autoría de Pamela Mishell Mosquera Carrera, con su respectiva afiliación a la Universidad de las Américas.

Descripción de la obra:

Tipo de documento: Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de ingeniera en biotecnología.

Autor: Pamela Mishell Mosquera carrera, Universidad de las Américas, cédula de ciudadanía No. 1724230378.

Tutor académico: (con fines exclusivamente académicos internos de la Universidad de las Américas): Andrea Paola Cordero Arroyo, cédula de ciudadanía No. 1714669825, docente de la Universidad de las Américas.

Tutor científico: Ana María Poveda Gabaldón, cédula de ciudadanía No. 1750668129, docente de la Universidad Central del Ecuador.

Título de la obra: Regulación de la replicación del ADN en respuesta al estrés hipotérmico en *Saccharomyces cerevisiae*.

Técnicas empleadas: técnicas genéticas y de biología molecular.

Financiamiento: fondos propios de la Universidad Central del Ecuador (reactivos, insumos y utilización de equipos).

Quito 25 de febrero del 2019.

Ing. Diego Buenaño Fernandez, MSc

Decano facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas

ANEXO 2

RECONOCIMIENTOS



El presente proyecto de investigación se realizó en los laboratorios del Instituto de Investigación en salud pública y Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador. La investigación ha sido financiada por la Universidad Central del Ecuador, con fondos del proyecto “DESARROLLO DE TERAPIAS INNOVADORAS PARA EL TRATAMIENTO DE LEISHMANIASIS: IDENTIFICACION DE POTENCIALES DROGAS Y DE DIANAS MOLECULARES DEL METABOLISMO DEL DNA-DRUGLEISH/UCE”. Para realizar este trabajo la autora ha sido beneficiada con dos contratos en calidad de Asistente de laboratorio Universitario (No. 0023-DI-FP-2017 y No. 175-0018-6-DI-2018-008), financiado con fondos del mismo proyecto.

ANEXO 3

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ Delección genética

CDKs *Cyclin-Dependent Kinases*

DDC *DNA damage checkpoint*

DRC *DNA replication checkpoint*

DSB *Double Strand Break*

dsDNA *double strand DNA*

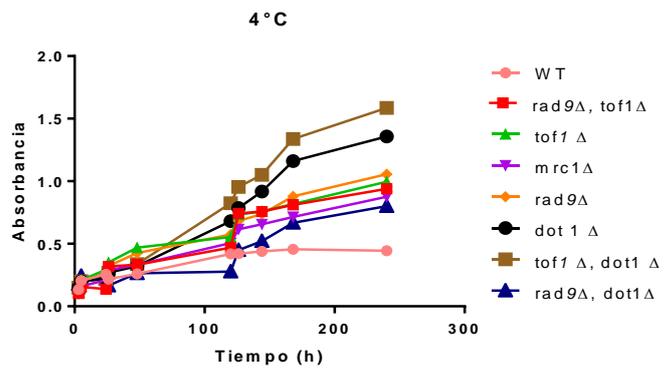
PFGE *Pulse Field Gel Electrophoresis*

ssDNA *single strand DNA*

WB Western Blot

ANEXO 4

Curva de crecimiento a 4 °C de los mutantes del *checkpoint*.



ANEXO 5

Flow Cytometry Data Analysis (FACs) de mutantes de la ruta del *checkpoint* y

ruta HOG

