



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA MUTACIÓN PUNTUAL c.308A>C DEL GEN
TUF1 EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN

LUIS ENRIQUE DÁVILA JUÁREZ

JOSÉ HÉCTOR GIBRÁN FRITZ GARCÍA

DIRIGIDA POR

DRA. LUCÍA GUADALUPE MORALES REYES

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA MUTACIÓN PUNTUAL c.308A>C DEL GEN
TUF1 EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN

LUIS ENRIQUE DÁVILA JUÁREZ

JOSÉ HÉCTOR GIBRÁN FRITZ GARCÍA

DIRIGIDA POR

DRA. LUCÍA GUADALUPE MORALES REYES

SINODALES

DRA. LUCÍA GUADALUPE MORALES REYES

DIRECTOR

DR. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ

ASESOR INTERNO

DRA. ANA GABRIELA HERNÁNDEZ PUGA

SINODAL

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, extendemos nuestros agradecimientos a la Dra. Lucía G. Morales Reyes, quien hace tres años creyó en dos voluntarios y los adjuntó al Laboratorio de Evolución de Genoma de Levadura en el Laboratorio Internacional de Investigación del Genoma Humano (LIIGH) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Gracias a su mentoría y apoyo incondicional, nos hemos convertido en los profesionistas que somos hoy en día.

Al Dr. Rafael Palacios, por trabajar incansablemente para convertir al LIIGH en un instituto de talla mundial en el cual el ambiente científico inspira a dar lo mejor de sí.

A la Ing. Artemiza Martínez, por haber cimentado este proyecto, por haber sido un modelo a seguir, por contagiarnos su pasión en el laboratorio y por guiarnos en la planeación y ejecución de experimentos. Al M. en C. Jorge Cuamatzi por haber sido nuestro amigo durante la realización de la tesis y por su experiencia que sin duda nos sacó de más de un apuro en los experimentos. A la Dra. Maritrini Colón, por su crítica constructiva y ayuda en la realización de correcciones finales que ayudaron a elevar la calidad del presente trabajo. A los demás miembros del grupo de investigación de la Dra. Lucía, quienes hicieron los días largos en el laboratorio más agradables.

A las técnicas de laboratorio, la Ing. Alejandra Castillo y la Ing. Carina Uribe, por su capacitación en la utilización de equipos, su excelente gestión del laboratorio y su gentil actitud de servicio.

Al equipo del Dr. Alexander de Luna y al Ing. Porfirio Gallegos por su valioso apoyo con las curvas de crecimiento con medición automatizada llevadas a cabo en el LANGEBIO así como al Instituto de Neurobiología por la donación de cepas bacterianas.

A las instituciones que financiaron este proyecto. A CONACYT por el fondo para el proyecto 284992 y la beca de Ayudante de Investigador Emérito, a los proyectos PAPIIT de DGAPA-UNAM con números IA201019 y IN209021, y a la Universidad

Autónoma de Querétaro por el Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER-2020-FQU02029).

A nuestros sinodales, por las grandes sugerencias, correcciones y comentarios que mejoraron demasiado nuestro trabajo. En especial, al Dr. Jorge Gracida por su ayuda para obtener el financiamiento FOPER, con el cual se pudo realizar este trabajo.

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por ser nuestra casa de estudios, en cuyas aulas adquirimos conocimientos valiosos, en cuyos laboratorios los pusimos en práctica y en cuyos pasillos hicimos amistades excepcionales como Paola Rodríguez y Diana Téllez, con quienes compartimos las mejores carcajadas pero también incontables horas de estudio.

De manera personal, yo Luis Dávila, agradezco a mis padres Enrique Dávila y Verónica Juárez por todo el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de toda mi vida. Gracias por proveerme con herramientas para lograr mis sueños y mis metas. También por la educación que me dieron, ya que soy el reflejo de los valores que inculcaron en mí. A mi hermano Adrián Dávila, por siempre estar ahí para mí y sacarme una sonrisa hasta en los momentos más difíciles. A Gigi, por ser mi compañera de desveladas, paseos y por demostrarme que el amor también puede estar cubierto de pelos y tener cuatro patitas. Igualmente quiero agradecer a la Dra. Lucía por su acompañamiento más allá de la tutoría de tesis. Gracias por ser una inspiración para mí y por demostrarme que es una persona en la que puedo contar.

Agradezco a mi compañero de tesis y novio, Héctor Fritz por tantos años de amor, felicidad, logros y fracasos. Es un honor poder crecer con alguien como tú a mi lado y espero que la vida nos mantenga juntos por muchos años más.

Por otro lado, yo Héctor Fritz, agradezco a mis padres Patricia García y Héctor Fritz y a mis abuelitos maternos quienes me han brindado y forjado las cualidades y valores que me han permitido concluir este trabajo, por el amor incondicional y por siempre poner mis sueños por delante de los suyos. A mis hermanas Karla y Karen Fritz, y cuñado Chema Sarmiento (más como un hermano) a quienes he admirado desde pequeño y quienes siempre me han querido y apoyado en cualquier decisión.

A Mati y a Lola, quienes me ayudaron a mantenerme positivo y con ganas de seguir aún en los momentos más difíciles. A Sofía Mendoza, por siempre escucharme y darme consejos de cualquier cosa. A ti, mamá Regis, te agradezco por siempre apoyarme en todo y por motivarme a continuar con mi carrera en la ciencia. Especialmente agradezco a la Dra. Lucía, gracias por siempre escucharme y a ayudarme con la más mínima inquietud; por darme la libertad de aprender y perseguir mis ideas; por apoyarme en cualquier momento y por siempre motivarme a ser mejor.

Finalmente, a Luis Dávila, por siempre brindarme amor incondicional y estar en los momentos más felices y más duros. Gracias por hacerme una mejor persona cada día en todos los sentidos y por hacerme sentir especial.

Dirección General de Bibliotecas de la UNQ

RESUMEN

Las enfermedades mitocondriales (EMs) son desórdenes heterogéneos causados por mutaciones en el ADN mitocondrial o nuclear que dan lugar a un mal funcionamiento de la mitocondria, resultando en una deficiencia energética. Las EMs tienen un alto índice de letalidad, además de promover el desarrollo de miopatías, acidosis, diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington, entre otras. A pesar de haber sido descritas desde la década de 1960, en la actualidad las EMs siguen presentando un reto en su diagnóstico y tratamiento. Recientemente, se ha empleado a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estudiar la etiología de EMs debido a la homología que tiene con genes mitocondriales humanos. El objetivo de este trabajo fue verificar experimentalmente el efecto de la mutación c.A344>C reportada en el gen humano *TUFM* utilizando como modelo el gen homólogo en *S. cerevisiae*, *TUF1*, con la mutación c.A308>C. Se realizaron dos cepas mutantes, una imitando la mutación puntual utilizando CRISPR-Cas9, y otra mutante *tuf1Δ::kanMX4* mediante recombinación homóloga. Se compararon las diferencias en su crecimiento contra la cepa silvestre BY4741 tanto en medio sólido como líquido. Se observó que la mutante *tuf1Δ::kanMX4* fue incapaz de crecer mediante respiración aeróbica. Por otro lado, la mutante *tuf1^{H103P}* mostró un retraso en el crecimiento mediante respiración aeróbica de aproximadamente 24 horas en una fuente de carbono no fermentable, después de las cuales comenzó a tener una tasa de crecimiento similar al tipo silvestre. Finalmente, se comprobó que la disminución de la función mitocondrial en ambas mutantes con respecto a la cepa parental con sondas de fluorescencia, siendo menor la mutante *tuf1Δ::kanMX4*. En conclusión, se determinó que el efecto de la mutación puntual tiene un efecto retardante en el crecimiento pero no es comparable a no poseer el gen en su totalidad.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Evolución mitocondrial: un origen endosimbiótico	1
1.2 La bioenergética mitocondrial	4
1.3 Enfermedades mitocondriales	6
1.4 Historia de las enfermedades mitocondriales, su diagnóstico y tratamiento	8
1.5 <i>TUFM/TUF1</i>	11
1.6 Descripción de la mutación c.344A>C en el gen <i>TUFM</i>	13
1.7 Levaduras como modelo de estudio de enfermedades mitocondriales	14
1.8 El sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética	18
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 General	23
3.2 Específicos	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1 Materiales	24
4.1.1 Cepas	24
4.1.2 Medios de cultivo	25
4.1.3 Kits moleculares	26

4.1.4	Reactivos	27
4.1.5	Oligonucleótidos	28
4.1.6	Plásmidos	29
4.1.7	Enzimas de restricción	30
4.1.8	Soluciones	30
4.2	Métodos	31
4.2.1	Cultivos y conservación de cepas bacterianas	31
4.2.2	Cultivos y conservación de cepas de levaduras	31
4.2.3	Protocolo de transformación de células bacterianas competentes	31
4.2.4	Protocolo de transformación de levaduras por acetato de litio	32
4.2.5	Protocolo de extracción y purificación de plásmidos con kit	32
4.2.6	Protocolo de purificación de productos de PCR	32
4.2.7	Protocolo de extracción de ADN de levaduras usando kit	33
4.2.8	Protocolo de extracción de ADN de levaduras por el método de perlas	33
4.2.9	Protocolo de digestión de plásmidos	33
4.2.10	Protocolo de ligación de ADN	33
4.2.11	Protocolo de hibridación de oligonucleótidos	34
4.2.12	Protocolo de cuantificación de ADN	34
4.2.13	Protocolo de electroforesis de ADN	34
4.2.14	Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
4.2.15	Protocolo para curvas de crecimiento	35
4.2.16	Protocolo para ensayo de supervivencia	36
4.2.17	Protocolo para la medición del potencial de membrana mitocondrial	36
4.3	Diseño experimental	37
4.3.1	Obtención de mutante nula (<i>tuf1Δ::kanMX4</i>)	37
4.3.2	Obtención de mutante puntual (<i>tuf1^{H103P}</i>)	38

4.3.3 Evaluación de crecimiento celular	41
4.3.4 Funcionamiento mitocondrial	41
4.4 Análisis estadístico para curvas de crecimiento	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Obtención de la mutante nula	43
5.1.1 Amplificación de <i>kanMX4</i> y adición de secuencias flanqueantes	43
5.1.2 Transformación con el módulo de resistencia	44
5.1.3 Verificación de la delección del gen <i>TUF1</i>	46
5.2 Construcción del vector pML104	48
5.2.1 Diseño del ARNs y ligación al vector	48
5.2.2 Edición del gen <i>TUF1</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9	51
5.3 Evaluación del efecto de las mutaciones mediante curvas de crecimiento	57
5.4 Verificación del crecimiento mediante ensayo spot	63
5.5 Evaluación del funcionamiento mitocondrial	65
6. DISCUSIÓN	67
7. CONCLUSIONES	77
8. REFERENCIAS	78
ANEXOS	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Proporción de material genético mitocondrial y nuclear en levadura y en humano	3
2	Modelo experimentales de levaduras	24
3	Modelos experimentales bacterianos	25
4	Medios de cultivo para el crecimiento de levadura y bacterias	25
5	Kits moleculares	26
6	Reactivos	27
7	Oligonucleótidos para PCR, ARNGs y molécula de reemplazo	28
8	Plásmido CRISPR/Cas9 para edición del genoma de levaduras	29
9	Enzimas de restricción para digestión del vector pML104	30
10	Preparación de soluciones	30
11	Reacciones de PCR	35
12	Programa de PCR	35
13	Transformantes en medio YPD-G418	45
14	Transformantes de levadura resistentes a geneticina	46
15	Eficiencia de transformación de la mutante nula	46
16	Transformantes en medio LB amp	50
17	Concentraciones de cada molécula de reemplazo	52
18	Transformantes en medio YNB Ura-	53
19	Colonias de levaduras seleccionadas para análisis de edición	53
20	Colonias de levadura con las mutaciones deseadas	56
21	Parámetros de crecimiento de las curvas manuales	61
22	Conteo de células a las 14 horas	61

23	Conteo de células a las 38 horas	63
24	Células/mL en cultivos para ensayo spot	63

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comparación del ADN mitocondrial en <i>Homo sapiens</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2	La mitocondria y sus componentes principales	4
3	Proceso de la respiración celular	5
4	Modelo tridimensional propuesto para EF-Tu	12
5	Efecto de mutaciones en ADNn y ADNmt sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en diferentes fuentes de carbono (C)	16
6	Comparación de la secuencia de aminoácidos entre <i>TUFM</i> y <i>TUF1</i>	17
7	Alineamiento de la secuencia de EF-Tu en diferentes especies	17
8	Localización y función de proteínas mitocondriales	18
9	Esquema de la función del sistema CRISPR-Cas	20
10	Mapa del vector pML104 para la edición del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
11	Amplificación del módulo <i>kanMX4</i>	44
12	Adición de secuencias flanqueantes a <i>kanMX4</i>	44
13	Colonias resistentes a genética	45
14	Identificación de las colonias <i>tuf1Δ::kanMX4</i> mediante PCR	47
15	Digestión del vector pML104	49
16	Verificación de la ligación del ARNs al vector pML104	50
17	Colonias de la cepa BY4741 de <i>S. cerevisiae</i> seleccionadas para secuenciación	54
18	Colonias de la cepa BY4742 de <i>S. cerevisiae</i> seleccionadas para secuenciación	55
19	Verificación de la amplificación de <i>TUF1</i> para secuenciación	56

20	Electroferogramas del cambio de base c.308A>C	56
21	Curvas de crecimiento en YPD	58
22	Curvas de crecimiento en YPG	59
23	Curvas de crecimiento en medios con fuentes de carbono no fermentables	60
24	Siembra de curvas de crecimiento	62
25	Ensayo spot	64
26	Histogramas de fluorescencia	66

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

1. ANTECEDENTES

1.1 Evolución mitocondrial: un origen endosimbiótico

El origen de la mitocondrias se basa en el principio de la endosimbiosis seriada propuesta por la bióloga Lynn Margulis, la cual describe cómo se dio la eucariogénesis. Esta teoría postula que, inicialmente, hubo una unión de arqueobacterias con eubacterias tipo espiroquetas, que poseían la capacidad de nadar hacia el medio celular (núcleo-citoplasma); sin embargo, esta simbiosis era anaeróbica. El proceso continuó, promoviendo la fusión de estos cuerpos con organismos aeróbicos, permitiendo que pudieran sobrevivir a las crecientes concentraciones de oxígeno atmosférico. En el caso de las mitocondrias, un hospedero procariótico brindó protección y nutrientes a una alfa-proteobacteria fagocitada que a cambio le otorgaba energía producida mediante la oxidación de oxígeno (Witzany, 2006; Malina y col., 2018).

Uno de los hechos que avala la teoría de la endosimbiosis como el origen de la mitocondria es la presencia del ADN mitocondrial (ADNmt), cuyo código genético difiere del ADN nuclear (ADNn). De hecho, el ADNmt tiene más similitudes con el genoma bacteriano. En primer lugar, el ADNmt es bicatenario circular – aunque también puede ser lineal –, con alto contenido de enlaces G::C y con múltiples copias en cada mitocondria. Respecto a la localización y estado del ADN, el ADNmt no se encuentra dentro de una membrana y tampoco se encuentra condensado en cromatina, sino que se encuentra asociado a proteínas que forman nucleoides (proteínas TFAM en las mitocondrias y proteínas NAP en bacterias). En cuanto a la expresión de genes, el ADNmt tiene una alta proporción de regiones codificantes (97% en humanos) y, como en las bacterias, resulta en una correspondencia entre el tamaño del genoma y del proteoma. La maquinaria de expresión mitocondrial es distinta a la nuclear y hay evidencia de haber descendido de la maquinaria de los bacteriófagos. Adicionalmente, el código genético mitocondrial en vertebrados y otras especies principalmente del reino Animalia tiene cambios en los codones, siendo los más importantes en los de término (Free y col., 2015; Boguszewska y col., 2020).

El tamaño del ADNmt es más comparable en tamaño con el genoma bacteriano, sin embargo, el cambio en su tamaño ocurrió debido a la transferencia de genes al ADNn; por lo tanto, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear. La transferencia en esa dirección ha sido favorecida a lo largo del proceso evolutivo, por la protección que ofrece el núcleo al material genético, sin embargo no todos los genes se han transferido y algunos se han perdido. El proceso que permite que algunos genes se hayan conservado en el genoma mitocondrial se explica con la hipótesis de la colocalización de regulación de óxido-reducción, la cual propone que es indispensable la expresión de algunos genes bajo la regulación del estado de oxidación de sus productos génicos, ya que esto proporciona una respuesta más eficiente ante cambios en el microambiente mitocondrial que permite un mantenimiento óptimo de la fosforilación oxidativa (Allen, 2015; Free y col., 2015; Boguszezwska y col., 2020).

El tamaño del genoma mitocondrial varía entre los organismos pertenecientes al dominio Eukarya. En humanos, el ADNmt consta de 16,569 pares de bases (pb) con 37 genes que codifican para 13 proteínas de los complejos mitocondriales respiratorios I a IV incrustadas en la membrana mitocondrial interna, 22 ARNs de transferencia (ARNt) y 2 ARNs ribosomales (ARNr). Tanto las subunidades restantes de los complejos respiratorios como las proteínas relacionadas con el mantenimiento, la expresión, la transcripción y la traducción del ADNmt provienen del ADNn (Anderson y col., 1981; Malina y col., 2018).

En 1998, Foury y Lecrenier publicaron la secuencia completa del genoma mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un cromosoma que puede ser circular o lineal, de 85,779 pb que codifica para ocho proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones, la fosforilación oxidativa, una proteína ribosomal, 24 ARNt y 2 ARNr (Foury y col., 1998; Free y col., 2015).

El número de copias de ADNmt entre levaduras y humanos es variable (Cuadro 1). En *S. cerevisiae*, este número se ve influenciado por la ploidía celular y las condiciones específicas de crecimiento, ya que se ha demostrado que levaduras

diploides que crecen en medio enriquecido poseen más copias de ADNmt, posiblemente por una mayor estabilidad de esta molécula, mientras que en mamíferos depende del tipo celular y de la etapa de desarrollo. Las diferencias entre el genoma mitocondrial de humano y de levadura se pueden observar en la Figura 1 (Sia y col., 2003; Freel y col., 2015; Zhang y col., 2018).

Cuadro 1. Proporción de material genético mitocondrial y nuclear en levadura y en humano (Dujon, 2015; Freel y col., 2015; Malina y col., 2018; Zhang y col., 2018).

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Tamaño de ADNmt (pb)	85,779	16,569
Tamaño de ADNn (Mb)	13.3	3,300
Copias de ADNmt por una copia de ADNn	50 – 200	100 - 10,000

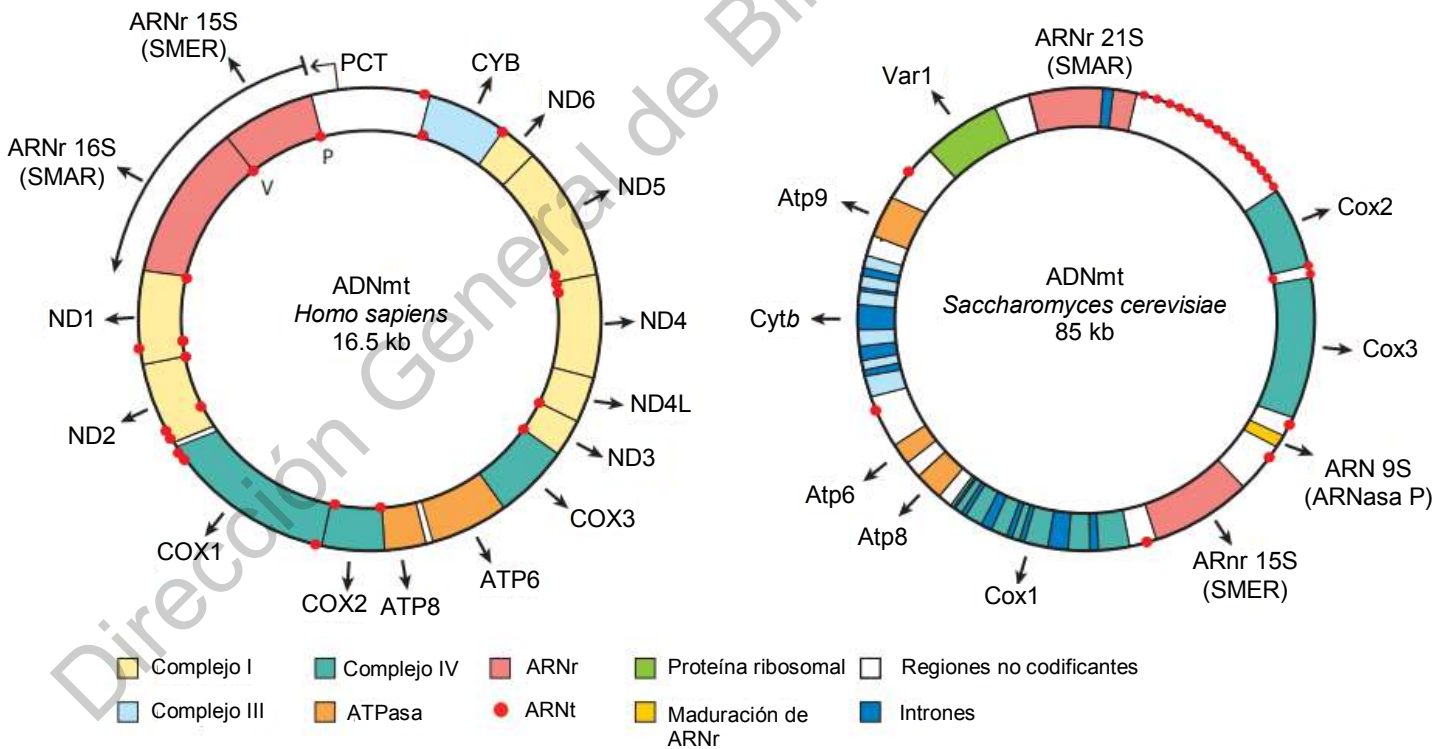


Figura 1. Comparación del ADN mitocondrial en *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. SMAR: Subunidad Mayor Ribosomal; SMER: Subunidad Menor Ribosomal. Modificada de Ott y col., 2016.

1.2 La bioenergética mitocondrial

La mitocondria es un organelo que se encuentra en la mayoría de las células eucariotas (Figura 2). Este organelo es de suma importancia ya que está involucrado en diferentes procesos biológicos como metabolismo de ácidos grasos, biosíntesis de cofactores, regulación del potencial de membrana, termogénesis, señalización y programación de muerte celular, sin embargo el más importante es la respiración celular (Knorre y col., 2016; Malina y col., 2018).

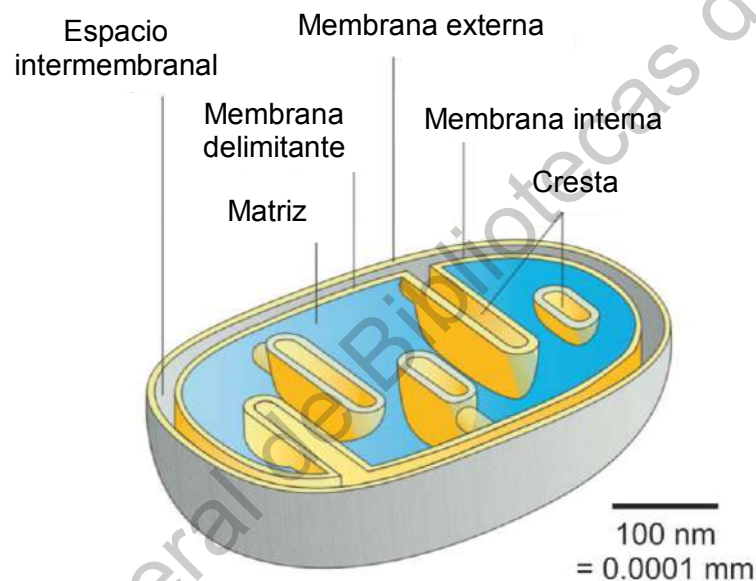


Figura 2. La mitocondria y sus componentes principales. Modificada de Kühlbrandt, 2015.

La respiración celular se puede definir como la serie de reacciones catabólicas por medio de las cuales las células convierten la energía proveniente de los enlaces covalentes de los nutrientes en adenosín trifosfato (ATP), la molécula energética de la célula. Esta energía es necesaria para el sustento de procesos celulares básicos, para las reacciones bioquímicas, para la estructura celular, para el transporte de moléculas y, a grandes rasgos, para la vida (Wilson, 2017).

En organismos aeróbicos, la respiración celular involucra tres etapas fundamentales (Figura 3): las macromoléculas deben ser degradadas a monómeros (etapa 1) para que puedan ser convertidas a piruvato a través de la glucólisis (etapa 2); finalmente, el piruvato es convertido a acetil coenzima A (acetil CoA), molécula que se usa en el ciclo del ácido cítrico para producir poder reductor (NADH y FADH₂) que servirá para la fosforilación oxidativa (etapa 3). A diferencia de la fermentación y la glucólisis anaeróbica, la fosforilación oxidativa produce una cantidad mayor de energía, en forma de ATP (Wilson, 2017; Alberts y col., 2019).

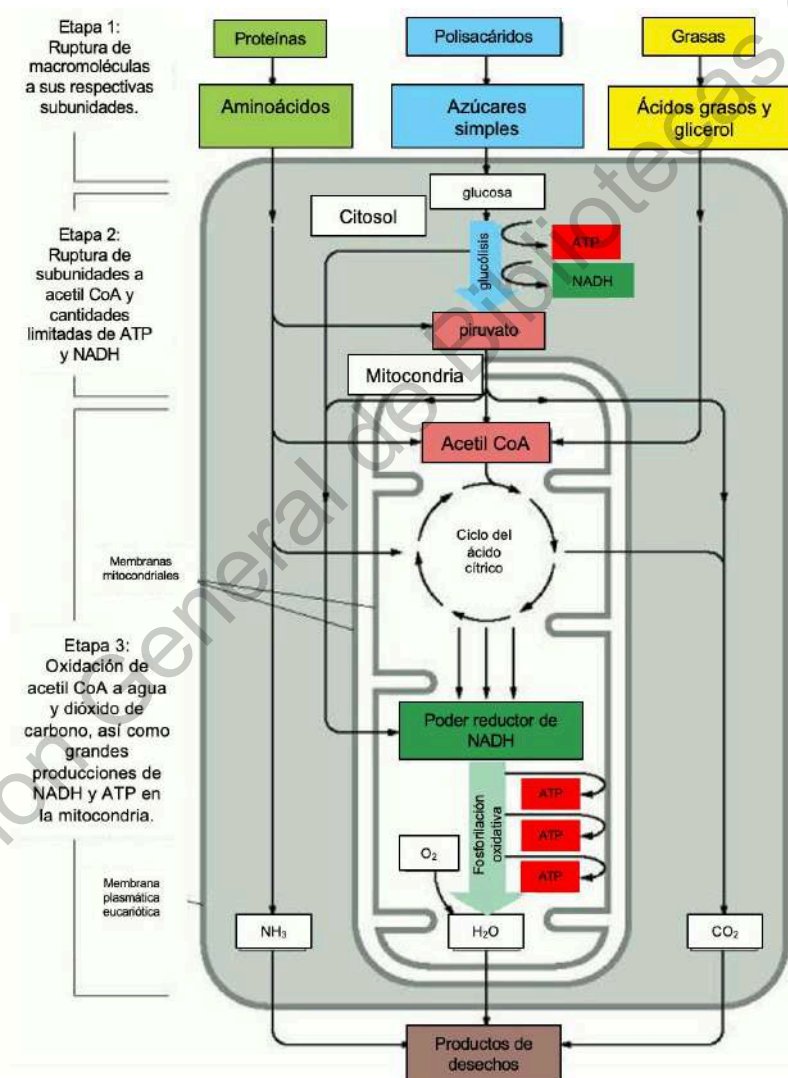


Figura 3. Proceso de la respiración celular. Modificada de Alberts y col., 2019.

La generación de ATP en organismos anaerobios puede darse en presencia y/o ausencia de oxígeno. Cuando no hay oxígeno presente, tanto los organismos anaeróbicos facultativos como estrictos son capaces de producir energía mediante la reducción de moléculas aceptoras de electrones diferentes al oxígeno como el nitrato, sin embargo también pueden obtener ATP mediante la fermentación. En dicho caso, la mayor fuente de energía se da mediante la glucólisis y es un proceso muy común en algunas especies de bacterias, en levaduras y en tipos celulares como eritrocitos y células musculares (Madigan y col., 2017).

1.3 Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales (EMs) son desórdenes heterogéneos que afectan la función mitocondrial. En su mayoría, las EMs surgen por un mal funcionamiento bioquímico en la cadena respiratoria mitocondrial causando así una deficiencia energética de ATP, sin embargo fallas en procesos mitocondriales diferentes a la producción de ATP, como el metabolismo de ácidos grasos y la fusión y fisión de las mitocondrias, también son consideradas como EM. Dichas enfermedades son causadas por mutaciones en el ADNmt o en el ADNn (DiMauro y Schon, 2003; Scarpelli y col., 2017).

Las EMs se pueden dividir en primarias y secundarias. Las EMs primarias se caracterizan por mutaciones en (1) genes relacionados con la fosforilación oxidativa, ya sea en el ADNmt o ADNn y que son estrictamente transmitidas mediante línea germinal, y en (2) genes relacionados con el mantenimiento del ADNmt, como el gen codificante para la subunidad gamma de la ADN polimerasa (*POLG*). Por otro lado, las EMs secundarias incluyen mutaciones en genes no relacionados con la fosforilación oxidativa pero que disminuyen el rendimiento de ATP y que pueden ser heredadas o adquiridas por mutaciones que surgieron después del nacimiento.

Dado el ambiente oxidativo de la mitocondria, se ha postulado que una EM puede causar más mutaciones en el ADNmt al haber un incremento en las especies reactivas de oxígeno, teoría conocida como el ciclo vicioso. Sin embargo, a la fecha

no se ha demostrado que los pacientes con EM tienen una mayor tasa de mutación en el ADNmt (Kirkinezos y Moraes, 2001; Niyazov y col., 2016).

En pacientes mayores de 16 años (adultos), las mutaciones en el ADNm son más prevalentes que las mutaciones encontradas en el ADNn, mientras que en pacientes menores a 16 años (infantes) ocurre lo contrario. La prevalencia estimada de EMs en pacientes adultos es de 1 en 5,000 mientras que en infantes la frecuencia es 1 en 35,000, aproximadamente (Gorman y col., 2015; Ng y Turnbull, 2016). No existen datos reportados sobre la letalidad fetal de las EM, pero el diagnóstico prenatal de mutaciones en el ADNmt y ADNn ha contribuido al término de embarazos de fetos con mutaciones presentes (Nesbitt y col., 2014).

Sin embargo, las EMs se pueden presentar a cualquier edad y con un amplio número de síntomas, haciendo que los obstáculos más grandes que estas enfermedades presentan sean su diagnóstico y tratamiento. En infantes, existen síntomas que se comparten entre EMs, como la disminución del tono muscular (hipotonía), la contracción involuntaria de músculos (distonía), la encefalopatía y la pérdida de peso que son característicos del síndrome de Leigh y el síndrome tipo Leigh de aciduria 3-metilglutacónica con sordera y encefalopatía (MEDGEL). En adultos ocurre lo mismo con la presencia sordera y diabetes mellitus en el síndrome de miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios semejantes a apoplejías (MELAS) y la oftalmoplejía externa progresiva crónica. La necesidad de poder estudiar estas EMs para un mejor diagnóstico y tratamiento ha hecho que se usen diferentes modelos de estudio y líneas celulares para entender las consecuencias de ciertas mutaciones implicadas en su etiología (Taylor y Turnbull, 2005; Gorman y col., 2016).

Las EMs se pueden transmitir mediante mutaciones en línea germinal que pueden provenir de origen materno, a través de la mitocondria, o de origen materno y paterno, mediante mutaciones en el genoma nuclear. Las mutaciones en el ADNn hacen que las EMs se hereden de forma autosómica y ligada al cromosoma X (Gorman y col., 2016; Niyazov y col., 2016).

Las EMs se pueden presentar a nivel sistémico o en tejidos específicos, principalmente en aquellos con una alta demanda energética como el nervioso, el muscular, el ocular, el cardíaco, el pulmonar, el hepático, el renal y el endócrino (DiMauro y Schon, 2003; Scarpelli y col., 2017).

No obstante para que una EM que se da por mutaciones en el ADNmt se manifieste la cantidad de energía producida para el buen funcionamiento celular debe estar por debajo del umbral energético (cantidad de mínima de energía que una célula necesita para funcionar correctamente), el cual es dependiente del tipo celular, siendo menor en tejidos con alta demanda energética. Adicionalmente, la heteroplasmia – existencia de ADNmt tipo silvestre y ADNmt mutante en la célula – juega un papel importante en la manifestación de una EM al disminuir el umbral energético (Wallace, 1999; DiMauro y Schon, 2003).

Las manifestaciones clínicas más comunes de las EMs son miopatías, acidosis, ictus, diabetes mellitus, síndrome de Leigh, sordera, anemia y epilepsia, por mencionar algunas. Además, se ha demostrado que el malfuncionamiento mitocondrial es uno de los procesos patológicos etiológicos en desórdenes neurodegenerativos como Alzheimer, Parkinson, la enfermedad de Huntington y esclerosis (Ng y Turnbull, 2016; Wu y col. 2019).

1.4 Historia de las enfermedades mitocondriales, su diagnóstico y tratamiento

El término de EM fue empleado por primera vez en 1962 por Rolf Luft, Lars Ernster y Björn Afzelius, investigadores de la Universidad Karolinska de Estocolmo, al describir el caso de una paciente sueca con hipermetabolismo. Después de diversos estudios, se determinó que la causa de su padecimiento estaba relacionada con mitocondrias anormales aisladas de músculo esquelético, las cuales presentaban desacoplamiento en la fosforilación oxidativa, así como metabolismo muscular incontrolado. Este fue el primer caso documentado de la enfermedad de Luft, denominada así por el investigador quien la descubrió, uno de los desórdenes mitocondriales con menos casos reportados y cuyas bases moleculares aún son

inciertas. Este hallazgo fue un hito en la medicina ya que gracias a él se inició el estudio de enfermedades relacionadas a un solo organelo celular (Luft y col., 1962; DiMauro, 2011).

Posteriormente, en 1963 King Engel de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) desarrolló un ensayo histoquímico, que permitió la detección de proliferación mitocondrial anormal en tejido muscular. Esta técnica se basa en una modificación de la tinción tricrómica de Gomori, la cual usa hematoxilina con mordiente de aluminio en lugar de hierro y sin fijación previa, lo cual hace que las mitocondrias luzcan como parches púrpuras, facilitando así su identificación (Engel y Cunningham, 1963).

En la década de los 70s, comenzó la inclusión de estudios bioquímicos que ayudaron a describir un creciente número de defectos metabólicos como las deficiencias en el complejo de piruvato deshidrogenasa, de carnitina palmitoiltransferasa, de carnitina y de los complejos III y IV de la cadena respiratoria. Otro avance importante fue la clasificación bioquímica de EMs considerando la región del metabolismo mitocondrial que se afectaba, incluyendo: 1) defectos en el transporte, 2) defectos en la utilización del sustrato, 3) defectos en el ciclo de Krebs, 4) defectos en la cadena de transporte de electrones y 5) defectos en el acoplamiento de la fosforilación oxidativa (DiMauro y col., 1985; DiMauro, 2011).

La era molecular de las EMs comenzó en 1988, cuando se empezaron a describir mutaciones en el ADNmt cuyas expresiones resultaban en la aparición de una enfermedad. Una de las primeras anomalías que se encontraron fueron mutaciones puntuales en la subunidad 6 de la ATPasa, la cual provoca ataxia, convulsiones y demencia. Además, se descubrieron mutaciones puntuales en la subunidad 4 del complejo I de la cadena de transporte de electrones, causantes de la neuropatía óptica heredada de Leber. A partir de estos descubrimientos, la adición de rearrreglos y mutaciones patogénicas del ADNmt ha ido en rápido aumento, con más de 250 identificaciones en 2016 (Holt y col., 1988; Wallace y col., 1988; Kohda y col., 2016).

Con un año de diferencia, empezó el estudio del ADNn como causante de EMs gracias a un padecimiento mitocondrial autosómico de herencia dominante resultante en oftalmoplejía externa progresiva y deleciones del ADNmt. Tras años de estudio se identificaron tres genes nucleares responsables que se encontraban mutados, *SLC25A4*, *PEO1* y *POLG*. A lo largo de los años se han descrito otros genes asociados con síndromes de deleción del ADNmt como *TK2*, *DGUOK*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*, *TYMP* y *MPV17* (DiMauro, 2011).

Se han reportado otros genes nucleares asociados a EMs, entre ellos componentes de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria (*UQCRB*, *COQ1*, *COQ2*, *PDSS1*, *COQ8A*, *COQ9*, por mencionar algunos), genes involucrados en el ensamblaje de este complejos (*SURF1*, *SCO2*, *COX10*, *LRPPRC*, *ETHE1*, entre otros), en la traducción de genes mitocontrales (*MRPS16*, *GFM1*, *TUFM*, *PUS1*, *DARS2*, *RARS2*). Además de mutaciones en el ADN, existen otras causas de las EMs. Una de ellas son defectos en el importe de proteínas consecuencia de mutaciones de genes como el *HSP60*, que codifica una chaperonina mitocondrial. Otra causa, es la deficiencia de cardiolipina ya que este lípido funge como molécula estructural y funcional en el medio interno mitocondrial. Finalmente, mutaciones en genes involucrados procesos de motilidad (*KIF5A*), fusión (*OPA1*) y división mitocondrial también se han reportado como causantes de EMs (DiMauro, 2011).

Actualmente, el diagnóstico de las EMs se inicia cuando los médicos tienen evidencia bioquímica, como aumento en los niveles de ácido láctico en suero, para sospechar que un paciente sufre de una EM. Posteriormente, se hace una biopsia de los tejidos con sospecha de deficiencia mitocondrial para hacer una evaluación morfológica, bioquímica y molecular. La disponibilidad de tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS), de secuenciación de exoma completo (WES) y de estudios proteómicos ha abierto mejores oportunidades para el diagnóstico, pues permiten estudiar el genoma de los pacientes e identificar mutaciones y/o diferencias en los niveles de expresión proteicos respecto a quienes no presentan la enfermedad. Por ejemplo, mediante WES se pudieron identificar dos nuevas

mutaciones en el gen *AGK*, causantes del síndrome de Sengers, encontradas en un recién nacido. Esta revolución en el diagnóstico de EMs ha permitido la valoración de casos no resueltos previamente y ha revelado mecanismos genéticos no descubiertos con anterioridad (DiMauro y Schon, 2003; Mayr y col., 2012; Parikh y col., 2015; Legati y col., 2016; Scarpelli y col., 2017).

Para familias con historial de EM, cuyas mutaciones nucleares y mitocondriales han sido identificadas, el diagnóstico genético preimplantacional y el diagnóstico prenatal se han utilizado con éxito como medidas de prevención para disminuir los niveles de heteroplasmia y evaluar posibles mutaciones en el ADNn en embriones y fetos. Después del nacimiento, existen tratamientos para disminuir las consecuencias de las EMs, los cuales se basan en la administración de suplementos nutricionales, vitaminas y cofactores; sin embargo, tienden a ser inadecuados por la falta de reproducibilidad de tratamientos disponibles y por la falta de pacientes con sintomatología similar. Adicionalmente, el uso de terapias enzimáticas y farmacológicas podría ayudar a tratar las EMs, como es el caso de la administración de timidina fosforilasa cuando la enzima está mutada y origina la encefalomiopatía neurogastrointestinal. Aunque estos tratamientos son limitados, el desarrollo de nuevas metodologías permitirá mejoras en las terapias para EMs (DiMauro y Schon, 2003; Lightowlers y col., 2015; Craven y col., 2017; Sallevelt y col., 2017; Scarpelli y col., 2017).

1.5 *TUFM/TUF1*

El gen nuclear *TUFM* codifica para el factor de elongación mitocondrial EF-Tu, una GTPasa que forma un complejo con los aminoacil-ARNt (aa-ARNt) y GTP en la mitocondria. Su función es unir al aa-ARNt al sitio A en el mitorribosoma para que inicie el reconocimiento del codón. Una vez que el anticodón está anclado al codón de ARN mensajero (ARNm), el ribosoma sufre un cambio conformacional en el dominio GTPasa de EF-Tu, cuyo efecto es la hidrólisis de GTP y la disociación del aa-ARNt del complejo ribosomal (Burnett y col., 2013). La estructura proteica de EF-Tu de humanos no se ha determinado por cristalografía, sin embargo se han

construido modelos 3D basados en la secuencia de aminoácidos gracias a las estructuras determinadas por cristalografía de sus ortólogos en *Bos taurus*, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus* y *Thermus aquaticus* (Figura 4). EF-Tu contiene tres dominios: el primero sirve como sitio de unión para GTP, GDP y Mg^{2+} y ayuda a la unión del factor de elongación Ts (EF-Ts), contiene cinco láminas beta paralelas y una antiparalela, rodeadas por seis alfa hélices; los dominios dos y tres se componen de láminas beta antiparalelas y participan en la unión entre EF-Tu, el ARNt y EF-Ts (Berchtold y col., 1993; Di Nottia y col., 2017).

Variantes patogénicas en *TUFM* han mostrado interferencia con la síntesis de proteínas a partir de ADNmt, generando una disminución en la traducción de proteínas, incluyendo aquellas de los complejos de la cadena respiratoria. Hasta la fecha se han descrito casos clínicos de cinco pacientes con mutaciones bialélicas en *TUFM*, las cuales han sido causantes de deficiencia combinada de fosforilación oxidativa tipo 4 caracterizada por acidosis láctica y cardiomiopatía (Valente y col., 2007; Wortmann y col., 2015; Kohda y col., 2016; Di Nottia y col., 2017; Hershkovitz y col., 2019).

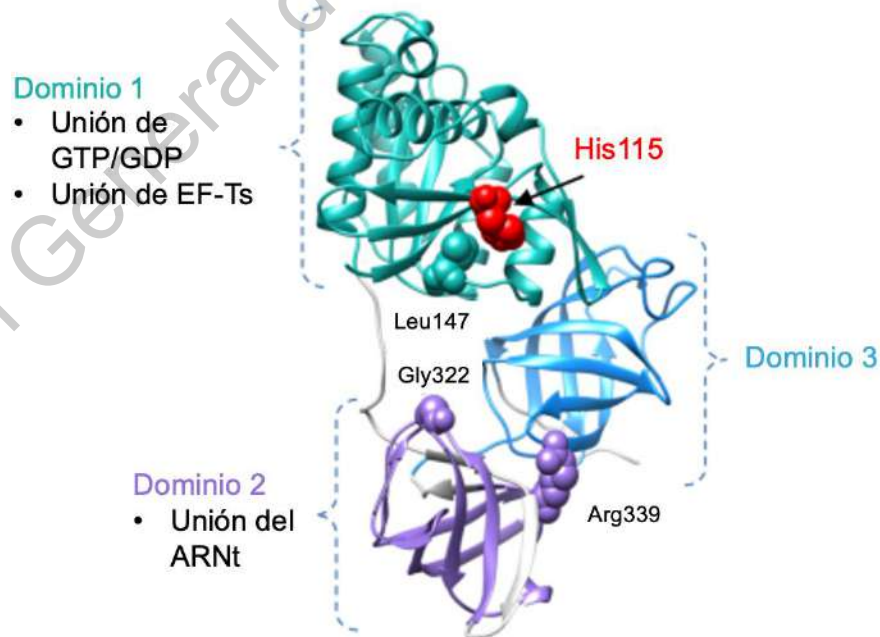


Figura 4. Modelo tridimensional de EF-Tu. Se muestran las mutaciones identificadas previamente; en rojo se encuentra la mutación más reciente. Modificada de Hershkovitz y col., 2019.

En 2007, se reportó una transición homocigota c.G1016A (p.R339Q) en el dominio II de la proteína en un lactante. 7 años más tarde, se describió una mutación que generaba un codón de paro prematuro en la posición c.Y162* (p.Tyr54*). En 2016, se identificó una transversión homocigótica c.T440A (p.L147H) en dos hermanos que presentaban defectos en el ensamblado de los complejos mitocondriales I y II. En el 2017, se reportó una nueva mutación homocigota c.G964A (p.G322R) en un paciente de 10 meses de edad; este cambio de nucleótido se encontró en el dominio proteico II. La mutación más reciente es una transversión homocigota c.A344C (p.H115P) reportada en 2019 (Valente y col., 2007; Wortmann y col., 2015; Kohda y col., 2016; Di Nottia y col., 2017; Hershkovitz y col., 2019).

1.6 Descripción de la mutación c.344A>C en el gen *TUFM*

Recientemente, se describió una nueva variante homocigótica en el gen *TUFM* en un paciente masculino fallecido a los siete meses de edad. El caso índice presentó complicaciones de salud a los seis meses, entre las cuales se encontraban síntomas parecidos a aquellos de la gripe así como taquicardia, hipotensión, hipotermia, cardiomiopatía, aciduria dicarboxílica, aciduria 3-hidroxiisovalérica y acidosis (pH 6.8). Además, se encontraron niveles altos de lactato y de cetonas, niveles indetectables de bicarbonato y glucosa en sangre y metabolitos del ciclo de Krebs en orina. También hubo evidencia de fallo hepático incluyendo hipoalbuminemia y coagulopatía (Hershkovitz y col., 2019).

Tras un análisis de WES se detectó una sustitución de adenina (A) por citosina (C), en la posición 344, que al ser expresada cambia de una histidina (His) en la posición 115 a una prolina (Pro; c.344A>C; p. His115Pro). Este residuo se encuentra en el dominio I de la proteína, esencial para la unión de GTP/GDP/Mg²⁺, que permite pasar de la forma inactiva a la forma activa (Hershkovitz y col., 2019).

Sin embargo, no se realizaron estudios funcionales, dejando sin evidencia los efectos que la mutación provoca a nivel celular. Conocer el fenotipo que genera esta

mutación permitiría obtener información valiosa sobre la función proteica, el desarrollo de la EM que causa y posiblemente podría dar luz hacia posibles tratamientos.

1.7 Levaduras como modelo de estudio de enfermedades mitocondriales

Con el objetivo de estudiar las EMs, se han realizado diferentes intentos por manipular genéticamente mitocondrias en diversos organismos. En el 2008, Xu y colaboradores intentaron modificarlas directamente en líneas germinales de *Drosophila melanogaster*. Otros grupos de investigación han intentado usar ratones. Dado que obtener mutantes de estos organismos es muy laborioso y algunas mutaciones son altamente letales, ninguno de ellos se ha posicionado como un modelo útil para estudiar EMs (Xu y col., 2008; Chen y col., 2019).

En este contexto, las levaduras — organismos eucarióticos unicelulares del reino Fungi — son fácilmente manipulables e ideales para crear y analizar las mutaciones deseadas, tiene un tiempo de generación desde 1 hora y 15 minutos a 2 horas en su temperatura óptima, la cual va de 30 a 35 °C. Además, alrededor del 40% de los genes mutados que dan lugar a EMs en humanos están altamente conservados en dichos organismos. En especial, *S. cerevisiae* se ha coronado como el organismo eucariótico modelo de estudio genético por excelencia, su genoma nuclear y mitocondrial están totalmente secuenciados, hay un amplio conocimiento de su proceso de recombinación y de su dinámica genómica (Herskowitz, 1988; Barrientos, 2003; Turcotte y col., 2010).

S. cerevisiae es un organismo anaerobio facultativo que prefiere obtener energía a través de la fermentación de glucosa incluso en presencia de oxígeno (efecto Crabtree) y también es capaz de crecer en fuentes de carbono no fermentables, como glicerol y etanol, en presencia de oxígeno. Debido a esta peculiaridad, *S. cerevisiae* es un modelo idóneo para el estudio de EMs ya que mutantes afectadas en el metabolismo respiratorio o con otros defectos en el ADNmt pueden crecer y

analizarse en fuentes fermentables (Herskowitz, 1988; Barrientos, 2003; Turcotte y col., 2010).

El fenotipo de *S. cerevisiae* también es indicativo de defectos mitocondriales. Cuando las células sufren un daño mitocondrial, las colonias tienen un crecimiento menor denominado petite. Estas colonias se utilizan para diferenciar células con defectos respiratorios y se comprueba por su incapacidad para crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables como el glicerol. La explicación detrás de esta prueba es que el glicerol no se puede fermentar ya que su conversión a etanol produce una molécula más de NADH que no se puede oxidar a NAD⁺ en condiciones anaeróbicas, provocando un desbalance de óxido-reducción (Figura 5) (Day, 2013; Xiberras y col., 2019).

En *S. cerevisiae*, el homólogo del gen de interés *TUFM* es *TUF1*, el cual tiene una longitud de 1,314 pb y la proteína que codifica es de 437 aminoácidos (SGD ID: SGD:S000005713). Entre humanos y levaduras, EF-Tu tiene una identidad del 62% (Figura 6). Además, el residuo de histidina que se encontró recientemente mutado en un paciente, está altamente conservado entre especies, lo cual sugiere que ese aminoácido es necesario para la función de la proteína (Figura 7) (Herskowitz y col., 2019).

En la Figura 8 se pueden observar las mutaciones identificadas que están relacionadas con EMS, mismas que podrían ser estudiadas usando a *S. cerevisiae* como modelo de estudio; solamente *GTP3BP*, *AGK*, *CARS2*, *PARS2* y *PTCD1* no tienen un gen homólogo en la levadura.

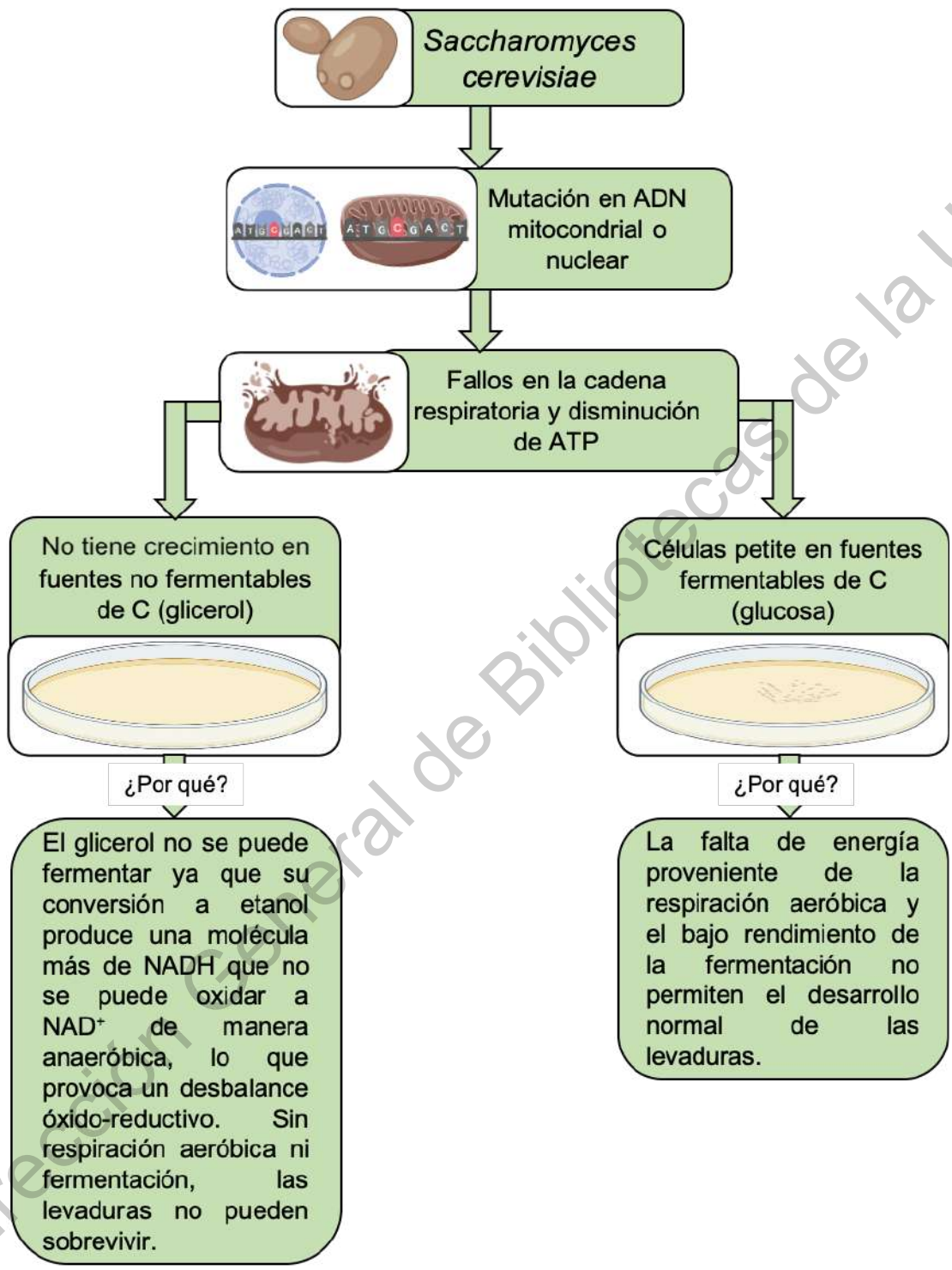


Figura 5. Efecto de mutaciones en ADNn y ADNmt sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes fuentes de carbono (C). Generada en BioRender.com.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
516 bits(1330)	0.0	Compositional matrix adjust.	245/395(62%)	304/395(76%)	5/395(1%)
Query 54		YVRDKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAAITKILAEGGGAKFKKYEEIDNAPEERARGITINA			113
Sbjct 42		+ R KPHVN+GTIGHVDHGKTTLTAAITK LA GGA F Y ID APEERARGITI+			101
Query 114		AHVEYSTAARHYAHTDCPGHADYVKNMITGTAPLDGCILVVAANDGMPQTREHLLARQ			173
Sbjct 102		AHVEY TA RHY+H DCPGHADY+KNMITG A +DG I+VVAA DG MPQTREHLLARQ			161
Query 174		IGVEHVVVYVKNADAVQDSEMVELVELEIRELLTEFGYKGEETPVIVGSALCALEGRDPE			233
Sbjct 162		+GV+H+VV+VNK D + D EM+ELVE+E+RELL E+G+ G+ P+I+GSALCALEGR PE			221
Query 234		LGLKSVQKLLDAVDYIIPVPARDLEKPFLLPVEAVYSVPRGTVVTGLTERGILKKGDEC			293
Sbjct 222		+G +++ KLLDAVD YIP P RDL KPFL+PVE ++S+ GRGTVVTG +ERG LKKG+E			281
Query 294		ELLGH-SKNIRTVVTGIEMFHKSLERAEGDNLGALVRGLKREDLRRGLVMVKPGSIKPH			352
Sbjct 282		E++GH S ++T VTGIEMF K L+ A AGDN G L+RG++R+ L+RG+V+ KPG++K H			341
Query 353		KQVEAQVYILSKEEGGRHKPFVSHFMPVMFSLTWDMACRIILPPEKE---LAMPGEDLK			408
Sbjct 342		K+ A +YILSKEEGGRH F ++ P MF T D+ + P E E MPG++++			401
Query 409		FNLILRQPMILEKQRFTRLRDNRTIGTGLVTNTL 443			
Sbjct 402		L P LE GQRF +R+G RT+GTGL+T + MECDLIHPTPLVEVGQRFNIREGGRTVGTGLITRII 436			

Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos entre *TUFM* y *TUF1*. Query: secuencia *TUFM* (*Homo sapiens*); Sbjct: secuencia *TUF1* (*Saccharomyces cerevisiae*). Se resalta la conservación del aminoácido correspondiente.

Caenorhabditis	DIDNAPEEKARGITINAFHLEYETAKRHYAHIDCPGHADYIKNMITGAAQMEGAILVVAA	146
Saccharomyces	AIDKAPEERARGITISTAHVEYETAKRHYSHVDCPGHADYIKNMITGAAQMDGAIIVVAA	144
Drosophila	EIDNAPEEKARGITINVAHVEYQTETRHYGHTDCPGHADYIKNMITGTAQMDGAILVVAA	178
Danio	DIDNAPEEKARGITINASHVEYTTANRHYAHTDCPGHADYVKNMITGTAQMDGCILVVAA	148
Homo	EIDNAPEERARGITINAAHVEYSTAARHYAHTDCPGHADYVKNMITGTAPLDGCILVVAA	156
Mus	EIDNAPEERARGITINAAHVEYSTAARHYAHTDCPGHADYVKNMITGTAPLDGCILVVAA	153

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de EF-Tu en diferentes especies. De arriba hacia abajo se encuentran *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *H. sapiens* y *M. musculus*. Se resalta la conservación del aminoácido correspondiente en la mutación His115Pro (His103Pro en *S. cerevisiae*) en las diferentes especies.

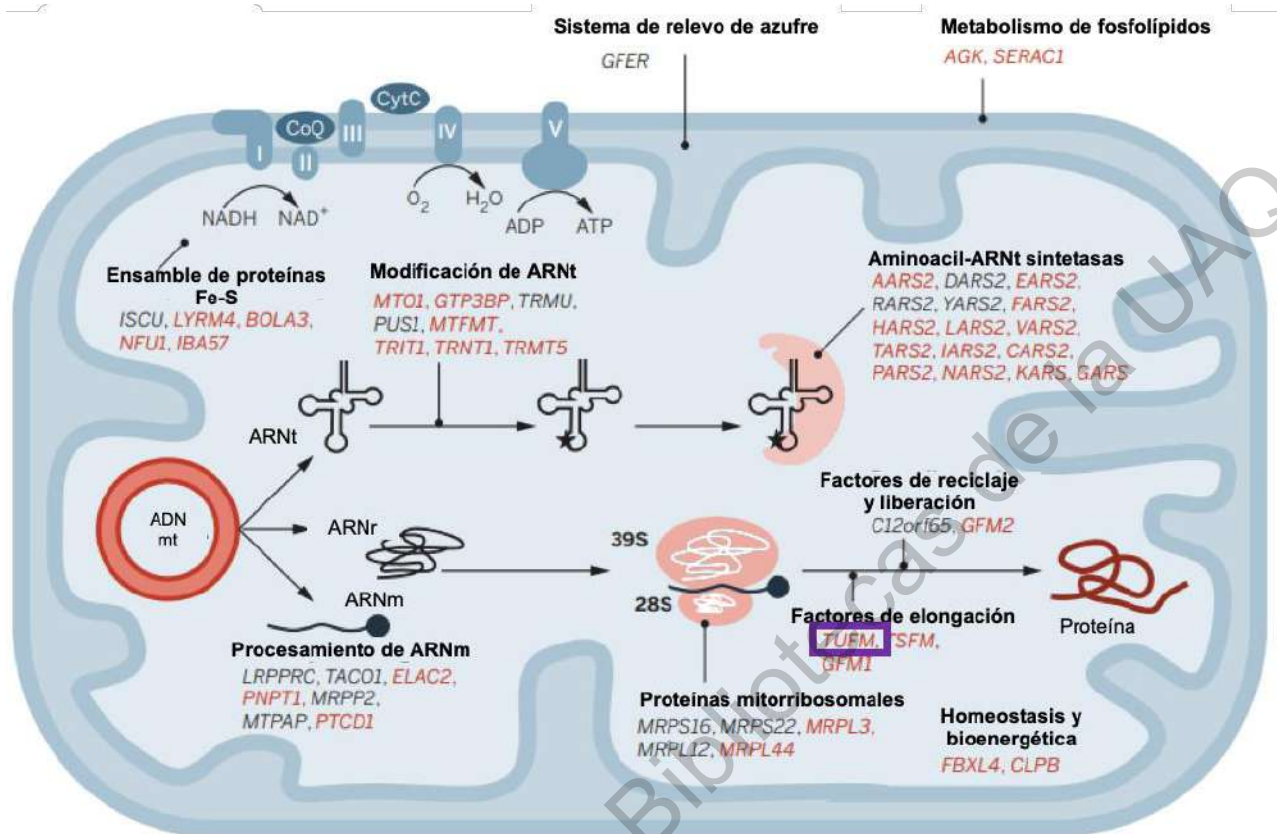


Figura 8. Localización y función de proteínas mitocondriales. En rojo se muestran genes identificados por secuenciación como causantes de EMs. Se resalta TUFM. Modificada de Lightowers y col., 2015.

1.8 El sistema CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genética

El sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) como parte del sistema inmunológico procarionte fue descubierto por Francisco Mojica y sus colaboradores en 2003. Estas son secuencias de ADN presentes en bacterias y arqueas que derivan de secuencias de ADN viral (bacteriófagos) que los han infectado previamente y que guían a la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9) para realizar un corte de doble cadena. CRISPR-Cas es una forma de inmunidad adquirida, pues confiere protección a los procariontes contra elementos genéticos externos (Stovicek y col., 2017; Rodríguez-Rodríguez y col., 2019).

Se han identificado seis grupos CRISPR (I-VI), siendo el II el más estudiado. Las secuencias interespaciadas y las secuencias repetitivas (conjunto CRISPR), el operón *cas* y las secuencias ARN trans-activadoras (*tracr*-ARN) se encuentran dentro un locus CRISPR. Cuando se da una nueva infección viral, una parte de este material genético se introduce en el locus CRISPR convirtiéndose en un espaciador, que es separado por secuencias repetitivas. En infecciones posteriores, el arreglo CRISPR se transcribe en un solo ARN asociándose con moléculas de ARN*tracr* (este conjunto se conoce como pre-ARNcr). El complejo pre-ARNcr madura a ARNcr individuales mediante su digestión con una RNasa III y dependiendo del sistema CRISPR, se asocia a una endonucleasa Cas diferente; en el sistema II, la endonucleasa generalmente usada por *Streptococcus pyogenes* es Cas9. El conjunto ARNcr-Cas9 ahora puede aparearse con la secuencia exógena en infecciones posteriores para provocar un corte en esta cadena y degradar la molécula. La especificidad del conjunto ARNcr-Cas9 se da por la presencia del motivo adyacente de protoespaciador (PAM, por su siglas en inglés) secuencia de 2 a 5 pb que se encuentre en el ADN invasor. Para evitar que Cas9 corte el genoma de la célula hospedera, el material genético usado como espaciador no contiene la secuencia PAM, haciendo que la especificidad del conjunto ARNcr-Cas9 se dé solamente hacia el material genético invasor (Figura 9) (Jiang y Doudna, 2017).

En los últimos años, la tecnología CRISPR-Cas9 ha ganado una enorme popularidad como herramienta de edición de genomas, como regulador transcripcional y modulador epigenético. La modificación de este sistema ha permitido generar un ARN de guía sencillo (ARNgs) que combina el crARN con el *tracr*ARN en un transcrito simple de ARN que facilita el sistema y retiene la función de Cas9. Cambiar el ARNgs hace que básicamente cualquier secuencia genómica pueda ser editada. Esto se logra al tener una secuencia de ARNgs complementaria a la región diana con una secuencia PAM de 3 nucleótidos 5'- NGG -3', específica para Cas9 de *S. pyogenes*. Dentro de una célula, el ARNgs se ensambla a Cas9 y el complejo busca secuencias PAM en el genoma; cuando encuentra una, Cas9 rompe los enlaces fosfodiéster del ADN y verifica la complementación del ARNgs con las secuencias adyacentes a la

región PAM, generando un corte de doble cadena 3 nucleótidos río arriba de la secuencia PAM cuando existe dicha complementariedad de bases. El corte puede ser reparado mediante la unión de extremos no homólogos o por recombinación homóloga directa usando una molécula de ADN que sirva como cadena molde (Jiang y Doudna, 2017; Rodríguez-Rodríguez y col., 2019).

En la presente tesis se empleó la tecnología CRISPR/Cas9 para generar la mutación puntual c.344A>C identificada previamente en humanos por Hershkovitz y colaboradores, usando a *S. cerevisiae* como modelo de estudio (Hershkovitz y col., 2019).

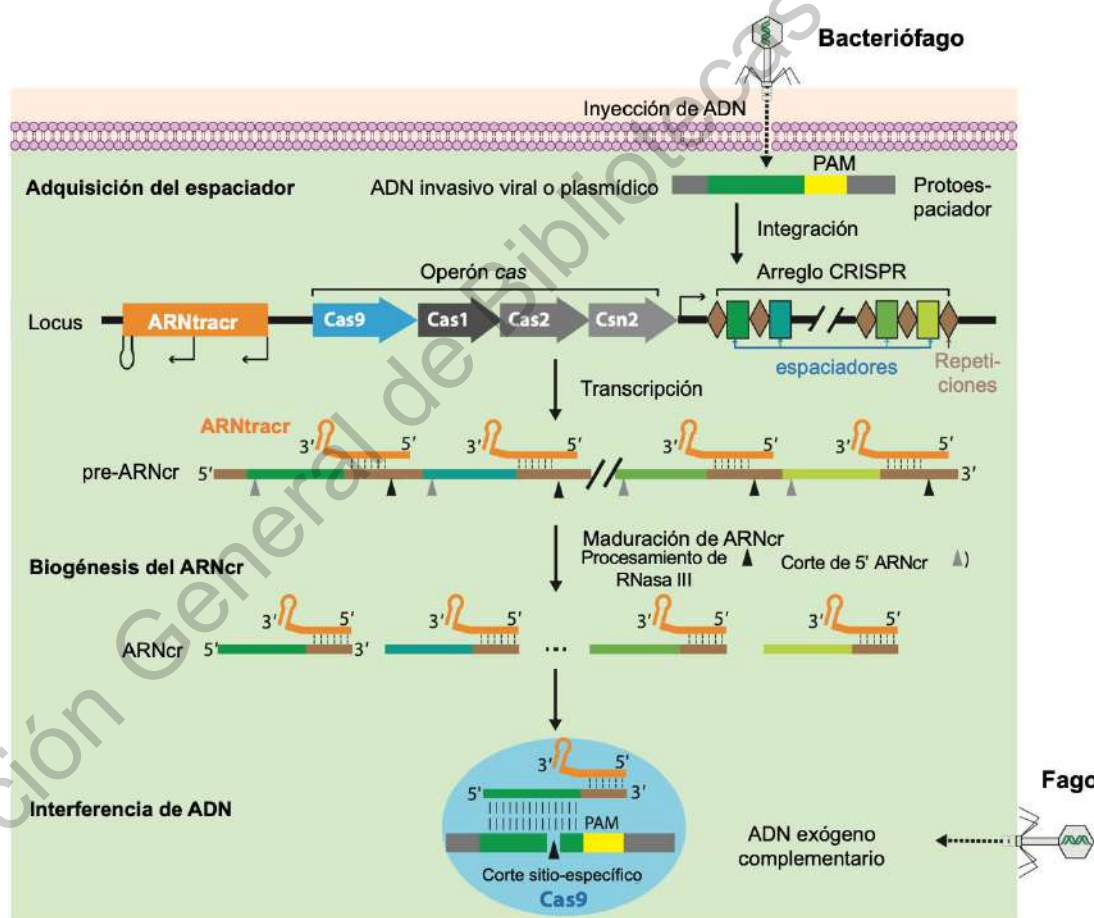


Figura 9. Esquema de la función del sistema CRISPR-Cas. Modificada de Jiang y Doudna, 2017.

El sistema CRISPR-Cas9 nos brindó la facilidad de generar un corte de doble cadena en el ortólogo de levadura (*TUF1*) que fue reparado usando una molécula de reemplazo, la cual contuvo los cambio de base necesarios: uno fue el cambio de A a

C en el nucleótido 308 y el otro cambio en la secuencia PAM para evitar que el corte se repitiera con cada ciclo celular; es importante señalar que el cambio en la secuencia PAM no afectó la secuencia proteica. La endonucleasa (Cas9) identificó la secuencia diana a través de un ARNs y la secuencia PAM adyacente (5' – NGG – 3') específica para dicha endonucleasa (Laughery y col., 2015).

La justificación de este trabajo se basa en la evidencia científica sobre la idoneidad de *S. cerevisiae* para el estudio de las EMs debido a que las mutaciones puntuales humanas relacionadas con EMs también producen defectos en la cadena respiratoria de este microorganismo. Mediante la edición genética de *S. cerevisiae* se evaluó experimentalmente el efecto negativo en la actividad mitocondrial causado por la mutación c.A308C (p. His103Pro) en el gen *TUF1* reportada previamente. De igual manera, se comprobó la importancia de dicho gen para la respiración celular, evaluando el efecto de su reemplazo por recombinación homóloga por el módulo *kanMX4* (Berardo, 2011; Hershkovitz y col., 2019).

2. HIPÓTESIS

El reemplazo de *TUF1* afectará el crecimiento de la levadura drásticamente, siendo un gen importante para la respiración celular. No obstante, la mutación puntual c.A308C (p. His103Pro) provocará una disminución en la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae* aunque menor que el reemplazo del gen. Dada la dependencia de la actividad mitocondrial por el potencial de membrana mitocondrial, ambas mutaciones inducirán su disminución.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar el efecto de la mutación puntual c.A308C (p. His103Pro) en el gen *TUF1* en el crecimiento y en el potencial de membrana mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Específicos

- Construir la mutante nula mediante el reemplazo por recombinación homóloga de *TUF1* por el módulo *kanMX4*
- Construir la mutante puntual (c.A308C; p. His103Pro)
- Determinar la tasa de crecimiento de la mutante nula y la mutante puntual contra el crecimiento del tipo silvestre en medios que promuevan el metabolismo fermentativo o respiratorio (YPD y YPG) tanto líquidos como sólidos
- Observar el efecto de la delección del gen así como de la mutación puntual en el potencial de membrana mitocondrial de ambas mutantes

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Cepas

Se emplearon las cepas de levaduras y bacterianas especificadas en los Cuadros 2 y 3, respectivamente.

Cuadro 2. Modelos experimentales de levaduras.

Nombre	Especie	Genotipo	Ploidía	Característica	Procedencia
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ, ura3Δ0, GAL2+</i>	Haploide	Derivadas de S288C	Colección del laboratorio
BY4742		<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, GAL2+</i>			
<i>tuf1Δ::kanMX4</i>		BY4741; <i>tuf1Δ::kanMX4</i>		Reemplazo de <i>TUF1</i> por el módulo <i>kanMX4</i>	Elaboradas en este trabajo
<i>tuf1^{H103P}</i>		BY4741; c.308A>C, c.312G>A		Cambio de nucleótidos 308 (CAC a CCC) y 312 (GTG a GTA). La primera mutación cambia de histidina a prolina mientras que en la segunda se mantiene el aminoácido valina	
YSCAU003.1	<i>S. paradoxus</i>	<i>ura3::kanMX-GAATC, ho::HygMX</i>		Derivada de NCYC3689	Colección del laboratorio

Cuadro 3. Modelos experimentales bacterianos.

Nombre	Especie	Genotipo	Característica	Procedencia
YLM3129	<i>E. coli</i>	<i>dam-/dcm-</i>	Cepa con el vector pML104	Colección del laboratorio
XL1-Blue		<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, lac, [F', proAB+, lac^qZΔM15,::Tn10(Tet^r)]</i>	Cepa usada generalmente para clonaciones	Donada por el Instituto de Neurobiología, UNAM
CRISPR-Cas9 <i>TUF1</i>		XL1-Blue transformada con el vector pML104 que codifica para Cas9 y el ARNGs	Cepa con el vector pML104- <i>TUF1</i>	Elaborada en este trabajo

4.1.2 Medios de cultivo

En el Cuadro 4, se enlistan los medios de cultivo que se usaron así como la descripción de su procedencia y/o preparación.

La base agar para los medios sólidos fue obtenida de Invitrogen 30391023. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Todas las soluciones de antibióticos se esterilizaron con filtros de 0.22 μm y se añadieron después en el medio esterilizado una vez que enfrió.

Cuadro 4. Medios de cultivo para el crecimiento de levaduras y bacterias.

Medio	Abreviatura	Preparación y/o procedencia
Luria-Bertani	LB	Sigma-Aldrich. 1 kg. General supply. REF B00005.
Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito	SOC	New England Biolabs. 25 mL. REF B9020S.
Caldo de extracto de levadura, peptona y dextrosa	YPD	Gibco. 1000 mL. REF A13745-01.
Agar de extracto de levadura, peptona y dextrosa		Sigma-Aldrich. 1 kg. Por cada litro se añadió agar YPD 6.5%. REF Y1375.

Extracto de levadura, peptona y glicerol.	YPG	Por cada litro se mezclaron bactopectona 1%, extracto de levadura 1% y glicerol 2% (v/v). Adicionalmente para medio sólido se agregó agar 2%.
Medio sintético completo	YNB	Por cada litro se mezclaron Yeast Nitrogen Base W/O aa 0.67% y glucosa 2%.
Base de aminoácidos para medio selectivo sin uracilo	YNB Ura-	Por cada litro, se mezcló medio YNB más mezcla de aminoácidos 0.2% de Sigma-Aldrich, sin uracilo.
LB con ampicilina (100 mg/L)	LB amp	Por cada litro se añadieron medio LB 2% y ampicilina 100 mg/mL. Adicionalmente para medio sólido, se agregaron agar 1.5%.
YPD con geneticina (200 mg/L)	YPD-G418	Por cada 100 mL de agar YPD se agregó geneticina 50 mg/mL.
YPD con 5-FOA	YPD-5-FOA	Por cada litro de medio YPD, se agregó de 5-FOA 0.1%.

4.1.3 Kits moleculares

Los kits moleculares que se usaron están especificados en el Cuadro 5. De igual manera, se tomaron en cuenta los protocolos proporcionados por el fabricante. Además, se muestran las especificaciones y descripciones.

Cuadro 5. Kits moleculares.

Nombre del Kit	Especificaciones	Descripción
Extracción y purificación de ADN genómico		
YeaStar™ Genomic DNA Kit	Extracción por lisis enzimática y columna fast-spin. Cada preparación produce de 7-20 µg de ADN con tamaños de 35-60 kb.	Marca ZYMO RESERCH. REF D2002
Extracción y purificación de productos de PCR		
MinElute® PCR Purification Kit	Purificación por columna de sílica, hasta 5 µg de productos de PCR de 70 pb a 4 kb en bajos volúmenes de elución.	QIAGEN® REF 28604.
Extracción y purificación de plásmidos		

QIAprep Spin Miniprep Kit	Purificación de hasta 25 µg de plásmido por columnas de sílica.	QIAGEN® REF 27106.
Cuantificación de ADN		
Qubit®. dsDNA BR Assay Kit	Ensayo de alta sensibilidad para cuantificar ADN por fluorescencia, entre un rango de 100 pg/µL a 1000 ng/µL.	Invitrogen. 500 pruebas. REF Q32853.

4.1.4 Reactivos

Los reactivos empleados en los diferentes protocolos se desglosan con sus especificaciones en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Reactivos

Reactivo	Descripción
Buffer TBE	UltraPure™ 10x TBE Buffer 10x. Invitrogen. 15581044. 100 mL
ARNasa	Thermo Scientific. 10 mg/mL. REF #EN0531.
SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen. 10,000x concentrado en DMSO. 400 µL. REF S33102.
10x BlueJuice™	Invitrogen. Buffer de carga para gel. 3 x 1 mL. REF 10816-015.
1 Kb Plus DNA ladder	Invitrogen. 250 µg (1.0 µg/µL). REF 10787018
Platinum™ Hot Start PCR 2x Master Mix	Invitrogen. 1.25 mL. REF 13000013
T4 DNA ligase, LC	Thermo Scientific. 1 weiss U/µL. REF #EL0016
Ampicilina	Sigma-Aldrich. 10 mL. REF A5354
Geneticina	Sigma-Aldrich. G418 disulfate salt. 1g. REF A1720
Ácido 5-fluoroorotico (5-FOA)	Sigma-Aldrich. 50 mg REF F5013
Tampón TE 10 mM pH 8	Invitrogen. 500 mL. REF AM9849
Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	Sigma-Aldrich. 500 mL. REF BCBT6636
Etanol absoluto	Sigma-Aldrich. 1 L. REF 459836
EDTA 0.5 M pH 8	Invitrogen. 500 mL. REF 00413535
Acetato de sodio 3 M pH 5.5	Invitrogen. 500 mL. REF 124979
Bactopeptona	Affymetrix. 1 kg. REF 73049737
Base agar	Invitrogen. 500 g. REF 30391023

Extracto de levadura	Affymetrix. 1 kg. REF 4220471
Glicerol	Sigma-Aldrich. 500 mL. REF SHBF6478V
Ultrapure agarose	Invitrogen. 100 g. REF 16500100
DMSO	Invitrogen. 10 x 3 mL. REF D12345
HEPES 1 M pH 7-7.5	Gibco. 20 mL. REF 15630106
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich. 250 g. REF G7528-250
MitoTracker Green	Invitrogen. 20 x 50 µg. REF M7514
MitoTracker Deep Red	Invitrogen. 20 x 50 µg. REF M22426

4.1.5 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se utilizaron como cebadores para las reacciones de PCR, como fragmentos para clonación en plásmidos y para la molécula de reemplazo que contuvieron la mutación a estudiar y el cambio en la secuencia PAM. Para el diseño de los oligonucleótidos del ARNgs se utilizó la herramienta web <http://wyrickbioinfo2.smb.wsu.edu/crispr.html>. Una vez obtenidos, se hibridaron y se ligaron al plásmido de interés. Los oligonucleótidos fueron adquiridos de la casa comercial T4OLIGO® con una purificación de HPLC a una escala de 50 nM y sus secuencias se detallan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Oligonucleótidos para PCR, ARNgs y molécula de reemplazo.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Función
TUF1_FKAN	GACATGGAGGCCCAAGAATACCCT	Amplificación de <i>kanMX4</i>
TUF1_RKAN	CAGTATAGCGACCAGCATTACA	
TUF1_F10_KAN	TATTCTAGCTCGACAAAGGTAACAGACAAAA gacatggaggcccagaatac	Adición de secuencias flanqueantes a <i>kanMX4</i>
TUF1_R10_KAN	TAGAAATATACTCCAGTTGCATCAATAAGTca gtatagcgaccagcattc	
TUF1_F9	TTTCTCAA ACTACTACTTCCTAT	Verificación de la delección de <i>TUF1</i> junto con TUF1_R5
TUF1_ARNgs1_1	GATCTACAATTTCTACTGCACACGGTTTTAG AGCTAG	Generación del ARNgs
TUF1_ARNgs1_2	CTAGCTCTAAAACCGTGTGCAGTAGAAATTG TA	

TUF1_mol_mut_1	GCTCCGGAAGAAAGAGCTCGTGGTATTACA ATTTCTACTGCACCCGTAGAATACGAAACGG CCAAGAGAC	Generación de la molécula de reemplazo con los cambios de nucleótidos necesarios
TUF1_mol_mut_2	ACAGTCGACGTGAGAATAATGTCTCTTGGCC GTTTCGTATTCTACGGGTGCAGTAGAAATTG TAATACCA	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Verificación de la ligación del vector pML104 junto con el oligonucleótido TUF1_ARNGs 1_1 como cebador reverso
TUF1_F3	TCCGACCTCAGTCAATATATCCT	Verificación de cambios de nucleótidos
TUF1_R5	AATACGCCGGAAGTAAACAAAT	
TUF1_F4	TGTGAGCACTTCTCTATTCTCGAT	
TUF1_R7	AATACGCCGGAAGTAAACAAAT	Verificación de las mutaciones después de algunos experimentos

4.1.6 Plásmido

El vector pML104 fue adquirido previamente de la casa Addgene. Este plásmido sirvió para la edición genética mediante el sistema CRISPR-Cas9 en cepas de levadura deficientes en *URA3*. Sus características se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Plásmido CRISPR-Cas9 para la edición del genoma de levaduras.

Nombre	Tamaño	Características	Contenido
pML104	11,251 pb	Plásmido CRISPR-Cas9 para la edición de genoma de levadura. Addgene REF 67638 (Laughery y col., 2015).	Marcador de selección <i>URA3</i> y de ampicilina, gen Cas9 y casete de expresión del ARNGs.

4.1.7 Enzimas de restricción

Se utilizaron dos enzimas de restricción para verificar el tamaño de los plásmidos, la no metilación y prepararlos para la ligación del ARNGs. Sus nombres e información detallada están presentes en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Enzimas de restricción para digestión del vector pML104.

Enzima de restricción	Uso	Características
<i>Bcl</i>	Preparar sitio de integración del ARNGs	Roche. REF 10693952001. 500 U (10U/μL). Usado con Buffer H
<i>Swa</i>		Roche. REF 11371517001. 200 U (10 U/μL). Usado con Buffer H

4.1.8 Soluciones

En algunos de los experimentos de este trabajo se utilizaron las soluciones enlistadas en el Cuadro 10. Se incluye su respectiva preparación.

Cuadro 10. Preparación de soluciones.

Nombre	Protocolo	Preparación
Tampón de lisis	Extracción de ADN genómico por el método de perlas	Para 25 mL de solución, se mezclaron Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM y agua grado biología molecular. Se esterilizó por filtrado.
MitoTracker Green	Potencial de membrana mitocondrial	Por vial, se mezclaron 74.42 μL de DMSO en 50 μg de la sonda liofilizada.
MitoTracker Deep Red		Por vial, se mezclaron 91.98 μL de DMSO en 50 μg de la sonda liofilizada.
HEPES-glucosa		Para 50 mL de solución, se mezclaron HEPES 10 mM, glucosa 20% y agua grado biología molecular.

HEPES-glucosa-sondas		Para 20 mL de solución, se mezclaron HEPES 10 mM, glucosa 2%, solución MitoTracker Green 0.01%, solución MitoTracker Deep Red 0.002% y agua grado biología molecular.
----------------------	--	---

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivos y conservación de cepas bacterianas

Se crecieron las cepas de *E. coli* durante 16 a 18 horas a 37 °C en placas LB y cuando fueron cultivos en medio LB líquido se realizaron en tubos con agitación. Cuando fue necesario seleccionar bacterias, se crecieron en medio LB adicionado con ampicilina durante 16 a 18 horas a 37 °C, ya sea en placa o en tubos. La conservación de las cepas bacterianas se realizó a -80 °C en el ultracongelador REVCO mezclando glicerol al 50% con LB líquido (adicionado antibiótico en caso necesario).

4.2.2 Cultivos y conservación de cepas de levaduras

Las cepas de levaduras se crecieron a 30 °C en placas YPD y cuando fueron cultivos en medio YPD líquido se realizaron en matraces o tubos (dependiendo del experimento) con agitación; esto aplicó también para el medio YPG. En algunos experimentos fue necesario adicionar geneticina para obtener medio YPD-G418; en otros, se añadió 5-FOA, obteniendo medio YPD-5-FOA. La conservación se realizó congelando a -80 °C en REVCO en una preparación de glicerol al 50% y YPD líquido o agua (más el antibiótico, en caso necesario). Para la obtención de cultivos en fases exponenciales, se hizo un pre-cultivo con una incubación de 12 a 24 horas y se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.2 y se dejó crecer en medio fresco hasta la DO_{600nm} requerida.

4.2.3 Protocolo de transformación de células bacterianas competentes

Este protocolo genera poros en la membrana bacteriana mediante choque térmico, permitiendo el paso del plásmido de interés.

Se incubaron las células en hielo y después se adicionó el plásmido en un rango de concentración de 95 ng a 200 ng. Se agitó suavemente, dejando reposar en hielo. Después se realizó un cambio de temperatura rápido a 42 °C y luego se incubó rápidamente en hielo. Se adicionó medio SOC y se incubó a 37 °C en agitación. Finalmente, se centrifugó y resuspendió de nuevo en medio SOC. Posteriormente, se homogeneizó por inversión y se sembró la mezcla en cajas LB amp.

4.2.4 Protocolo de transformación de levaduras por acetato de litio

La transformación con el método de acetato de litio permite desestabilizar la membrana temporalmente permitiendo el paso de ADN. Se utilizó el protocolo publicado previamente (Chen y col., 1992).

4.2.5 Protocolo de extracción y purificación de plásmidos con kit

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit”. Este método se basa en una lisis alcalina para células bacterianas, seguida por la adsorción de ADN de plásmido a la membrana de sílica en bajo contenido de sal adecuado. ARN, proteínas y metabolitos se eliminaron mediante un lavado con sal. El ADN del plásmido se eluyó en un tampón de baja salinidad sin necesidad de precipitar, concentrar ni remover sales. Este kit es ideal para plásmidos de hasta 50 kb. Se utilizará el protocolo recomendado por el fabricante.

4.2.6 Protocolo de purificación de productos de PCR

Para la purificación de productos de PCR se utilizó “MinElute® PCR purification Kit”. Este kit contiene una columna con una membrana de sílice para la adsorción de ADN en presencia de una solución tampón de alta salinidad dejando pasar cualquier contaminante. La elución se realizó con un tampón Tris o agua. Es ideal para purificar fragmentos de entre 70 pb y 4 kb. Se realizará el protocolo recomendado por el fabricante.

4.2.7 Protocolo de extracción de ADN de levaduras usando kit

Para aislar ADN genómico, se usó el YeaStar Genomic DNA Kit™, el cual se basa en una lisis enzimática y columnas fast spin. De cada preparación se obtuvieron de 7 a 20 µg de ADN con un tamaño de 35 a 60 kb. Se usó el protocolo del fabricante.

4.2.8 Protocolo de extracción de ADN de levaduras por el método de perlas

Las células de un cultivo nocturno de levaduras se centrifugaron y la pastilla se resuspendió en TE, transfiriendo la mezcla a un tubo de rosca 2 con 0.3 g de perlas. Se añadió tampón de lisis y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, mezclando en un disruptor celular. Después se centrifugó y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló, se centrifugó y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. El ADN se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubando a -20 °C. Se centrifugó a 4 °C y la pastilla se lavó con etanol frío al 70%, mezclando por inversión 50 veces; se volvió a centrifugar a 4 °C, desechando el sobrenadante, repitiendo una vez. La pastilla resultante se secó a 30 °C y se disolvió el pellet en agua. Finalmente se añadió ARNasa A y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

4.2.9 Protocolo de digestión de plásmidos

En NEBuffer 1x, se agregó la enzima *Swa*I, ADN plasmídico (usando concentraciones de 5.4 ng/µL a 314 ng/µL) y agua, incubando durante toda la noche a 25 °C. Después se agregó la enzima *Bcl*I en los mismos tubos y se incubaron a 50 °C durante 3 horas. Cada reacción se realizó en un volumen de 20 µL.

4.2.10 Protocolo de ligación de ADN

Para esta metodología se usó la ligasa de ADN T4, enzima que ayudó a la formación de uniones en enlaces fosfodiéster. Adicionalmente, unió fragmentos de ADN con extremos cohesivos o romos. Se realizó el protocolo recomendado por Thermo Scientific T4 DNA ligase.

4.2.11 Protocolo de hibridación de oligonucleótidos

Para la generación del ARNGs mediante la hibridación de los oligonucleótidos se usó el protocolo previamente reportado. Se modificó la concentración equimolar para la hibridación a 10 μM y la relación molar vector:inserto (Laughery y col., 2015).

4.2.12 Protocolo de cuantificación de ADN

Para cuantificar ADN cromosómico, ADN plasmídico y producto de PCR (antes y después de purificar) se utilizó el equipo Qubit® junto con los reactivos de Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit así como el protocolo recomendado por el fabricante. Este tipo de cuantificación se basa en la detección de fluorescencia de un intercalante provisto por el proveedor.

4.2.13 Protocolo de electroforesis de ADN

Se prepararon geles de agarosa al 0.8% con tampón TBE 1x, adicionando SYBR Safe® como intercalante siguiendo el protocolo descrito previamente. Las muestras se mezclaron con tampón de carga, se corrieron entre 90 y 100 volts y el tiempo fue dependiente del tipo de muestra a verificar. Los geles se revelaron en el equipo ChemiDoc XRS+ System (Makovets, 2013).

4.2.14 Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron seis tipos de PCR, mostradas en el Cuadro 11. Para la amplificación de moléculas pre-existentes se utilizó la polimerasa "Platinum™ Hot Start", usando el protocolo recomendado por el fabricante para las reacciones 1 a 4; las reacciones 5 y 6 se complementaron para obtener una concentración final de 2.5 mM de MgCl_2 . Los programas para las diferentes reacciones se muestran en el Cuadro 12. Para las PCR 1 y 6 las temperaturas de alineación fue de 60 y 53 °C; para las restantes se usó una temperatura de 55 °C. Adicionalmente, las reacciones 1 a 5 se realizaron durante 30 ciclos con una extensión final de 10 min mientras que la 6 se hizo con 35 ciclos y una extensión final de 7 min. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μL .

Cuadro 11. Reacciones de PCR.

PCR	Finalidad
1	Amplificación de <i>kanMX4</i>
2	Adición de secuencias flanqueantes a <i>kanMX4</i>
3	Verificación de eliminación de <i>TUF1</i>
4	Verificación de la correcta ligación del vector pML104
5	Verificación de cambios de nucleótidos después de la edición con CRISPR-Cas9
6	Verificación de las mutaciones puntuales después de las curvas de crecimiento

Cuadro 12. Programa de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo
CONTROL		
Tapa	105 °C	
Esperar		
0 Pre calentado	98 °C	Infinito
1 Iniciación	94 °C	2 min
2 Desnaturalización	94 °C	30 s
3 Alineación	53-60 °C	30 s
4 Extensión	72 °C	60 s/kb
2-4 30/35 veces		
5 Extensión final	72 °C	7-10 min
6 Enfriamiento	4 °C	Infinito

4.2.15 Protocolo para curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento por triplicado en medios YPD y YPG para evaluar el efecto de la mutación. Tanto las mutantes como la cepa silvestre se crecieron en placas YPD a 30 °C de 2 a 5 días. Se tomó una colonia de cada placa y se inocularon matraces con caldo YPD a 30 °C con 210 rpm de agitación durante 20 horas. Se midió la DO_{600nm} de cada medio y se tomó la cantidad necesaria de medio para obtener una DO_{600nm} final de 0.2. Los matraces con YPD y YPG líquidos se inocularon, incubando a las levaduras por un tiempo total de 50 horas, midiendo la

DO_{600nm} cada hora. 14 y 36 horas después de empezar las curvas se sembraron diluciones 1:10,000 y 1:100,000 en YPD y YPG agares de cada uno de los tubos, contando las colonias que crecieron en ambas cajas.

4.2.16 Protocolo para ensayo de supervivencia

Mediante diluciones seriales, se evaluó la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas. Tanto las mutantes como la cepa silvestre se crecieron en placas YPD a 30 °C de 2 a 5 días y se tomó una colonia de cada placa para inocular tubos con YPD líquido. Los matraces se incubaron a 30 °C con 210 rpm de agitación durante 24 horas. Previo al inicio de los experimentos, los tubos necesarios se lavaron de dos a tres veces con YPG líquido. Se midió la DO_{600nm} y el número de células de cada tubo, ajustando a 6×10^7 células/mL. A partir de estos nuevos cultivos, se generaron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , sembrando 5 µL de cada dilución en YPD y YPG agares e incubando a 30 °C durante 72 horas.

4.2.17 Protocolo para la medición del potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se hizo uso del MitoTracker Green y MitoTracker Deep Red *para medir el volumen mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial, respectivamente. Se crecieron células en YPD líquido a partir de colonias aisladas en agar YPD y se llevaron a una concentración final de 1×10^6 células/mL tanto en YPD como en YPG, lavando previamente en los medios necesarios. Se incubaron durante 5 horas a 30 °C, lavando después dos veces con la solución HEPES-glucosa; los pellets se resuspendieron en 1 mL de la solución HEPES-glucosa-sondas y se incubaron a 30 °C en la oscuridad. Finalmente, las células se analizaron mediante citometría de flujo (Attune™ NxT Accoustic Focusing Flow Cytometry) usando los láseres de excitación azul (488 nm) y rojo (638 nm) y los detectores de emisión BL1 (530/30 nm) y RL2 (720/30 nm), respectivamente; las gráficas se obtuvieron con el programa FlowJo™.*

4.3 Diseño experimental

Para este trabajo, se utilizó a la levadura *S. cerevisiae* en estado haploide, por la facilidad de obtener mutantes, al solamente tener que editar una copia del gen *TUF1*. Se diseñaron y se mandaron a sintetizar los oligonucleótidos para las PCR, la generación del ARNs necesario para que Cas9 realizara el corte en el gen *TUF1* así como la molécula de reemplazo para que las células repararan el daño generado por Cas9 mediante recombinación homóloga.

Tanto en las PCR como en las transformaciones, para los controles negativos las cadenas molde o la molécula a transformar se sustituyeron por agua (estéril en el caso de transformaciones), a menos que se especifique lo contrario.

4.3.1 Obtención de mutante nula (*tuf1* Δ :*kanMX4*)

Para el reemplazo de *TUF1* por *kanMX4*, se creció la cepa YSCAU300.1 de *S. paradoxus* (ver protocolo 4.2.2) ya que esta cepa contiene el módulo *kanMX4* en el gen *URA3*, se extrajo el ADN genómico (ver protocolo 4.2.7) y se usaron 20.3 ng por reacción para amplificar el módulo de resistencia, al cual se le añadieron secuencias flanqueantes (20 ng por reacción) que hibridaron con secuencias adyacentes al gen *TUF1* (ver protocolo 4.2.14). La integridad de la molécula se verificó mediante geles de agarosa (ver protocolo 4.2.13), se cuantificó (ver protocolo 4.2.12) y se purificó (ver protocolo 4.2.6).

Esta molécula se transformó en dos cepas de *S. cerevisiae* (BY4741 y BY4742) por el método de choque térmico con acetato de litio (ver protocolo 4.2.4), sembrando la cantidad total en dos cajas por reacción de transformación (una con 50 μ l de mezcla y la otra con 300 μ l de la mezcla restante), excepto en los controles negativos, en los cuales se sembró la transformación completa en agar YPD. Después de 24 horas, se hizo una réplica en placa en medio YPD-G418 para seleccionar aquellas que hayan integrado el módulo a su genoma. Las células resultantes se volvieron a sembrar en cajas YPD-G418 y YPD (en ese orden) usando una misma asa por colonia. Las colonias que crecieron en ambas cajas se usaron para inocular medio

YPD, guardando una parte en glicerol (ver protocolo 4.2.2). A la cantidad restante se le extrajo el ADN genómico (ver protocolo 4.2.7) y se hicieron una serie de PCR para comprobar el reemplazo del gen *TUF1* por *kanMX4* (ver protocolo 4.2.14). Únicamente se guardaron las mutantes deseadas (*tuf1Δ::kanMX4*), pues fueron las colonias correctas. Adicionalmente, se calculó la eficiencia de transformación usando la siguiente fórmula.

$$\text{Eficiencia de transformación} = \left(\frac{\text{colonias}}{\mu\text{g de ADN}} \right) \left(\frac{1}{\text{dilución}} \right)$$

4.3.2 Obtención de mutante puntual (*tuf^{H103P}*)

Para la mutante con el cambio de base, se usó el vector pML104 (adquirido de la casa Addgene) y se clonó en *E. coli* competentes (protocolo 4.2.3). El vector contiene resistencia a ampicilina para seleccionar bacterias transformadas, el marcador de selección *URA3* para levaduras, el módulo de expresión del ARNgs y el gen completo de Cas9 (Figura 10) (Laughery y col., 2015).

De la cepa YLM3129, la cual ya contenían el plásmido, se purificó (protocolo 4.2.5) y se verificó el tamaño y la identidad del vector con enzimas de restricción (protocolo 4.2.9), cuyas secuencias de corte se encuentran ubicadas en la región del módulo de expresión del ARNgs. Primero se incubó con *SwaI* (durante toda la noche a 25 °C) y luego con *BclI* (3 horas a 50 °C).

Los oligonucleótidos para la generación del ARNgs se hibridaron (protocolo 4.2.11) y se ligaron (protocolo 4.2.10) al plásmido pML104 previamente linealizado usando la T4 ligasa para la edición de *TUF1* mediante el sistema CRISPR-Cas9. De la misma manera, se hibridaron los oligonucleótidos para la molécula de reemplazo (protocolo 4.2.11).

Para la ligación del vector, se mezclaron 111.11 ng del plásmido digerido con 732.30 ng de ARNgs en tampón de DNA T4 Ligasa 1x y con 1 U de DNA T4 Ligasa Se

realizaron varias transformaciones de este vector ligado en cepas competentes de *E. coli* XL1-Blue (protocolo 4.2.3).

Las células transformadas se sembraron en dos cajas de agar LB amp por reacción de transformación (una con 10 μ L de mezcla y la otra con 90 μ L de la mezcla restante) excepto en los controles negativos, en los cuales se sembró la transformación completa. Para verificar la correcta ligación del vector, las colonias que crecieron se usaron para inocular LB amp líquido, guardando una cantidad en glicerol (protocolo 4.2.1). A la cantidad restante se le extrajo el ADN plasmídico (protocolo 4.2.5) y se hizo una PCR para comprobar la ligación del ARNs al vector (protocolo 4.2.14). Adicionalmente, el vector se secuenció por el método Sanger con el oligonucleótido T7. Los tubos de las colonias correctas se guardaron en ultracongelación.

Se realizó la extracción del vector correctamente ligado (protocolo 4.2.5) y se transformaron 556 μ g de plásmido con concentración variable de molécula de reemplazo y con 25 μ g de ADN de espermatozoos de salmón – para aumentar la eficiencia de transformación – por reacción de transformación en ambas cepas de *S. cerevisiae*, (ver genotipos en el Cuadro 3; protocolo 4.2.4). Las células transformadas se sembraron en dos cajas de agar YNB Ura- por reacción de transformación (una con 50 μ l de mezcla y la otra con 350 μ l de la mezcla restante) excepto en los controles negativos, en los cuales se sembró la transformación completa.

Las células resultantes se volvieron a sembrar en agares YNB Ura-, YPG y YPD (en ese orden) usando una misma asa por colonia. Las colonias que crecieron en YNB Ura- y en YPD y que tuvieron un crecimiento nulo o pobre en YPG, se usaron para inocular cajas YPD-5-FOA. La finalidad de este medio fue seleccionar a las levaduras que no heredaron el plásmido y que tentativamente hayan editado su genoma. Las colonias resultantes se usaron para inocular YPD líquido, guardando una cantidad en glicerol (protocolo 4.2.2). A la cantidad restante se le extrajo el ADN genómico (protocolo 4.2.7) y se hizo una PCR para comprobar el cambio de nucleótidos

mediante secuenciación Sanger, usando de 12.5 a 69.4 ng de ADN como cadena molde. Los tubos de las colonias editas correctamente en el gen *TUF1* se guardaron.

Una vez que las mutantes fueron obtenidas y verificadas, se procedió con la evaluación del crecimiento de ambas mutantes contra la cepa silvestre, en medios YPD y YPG.

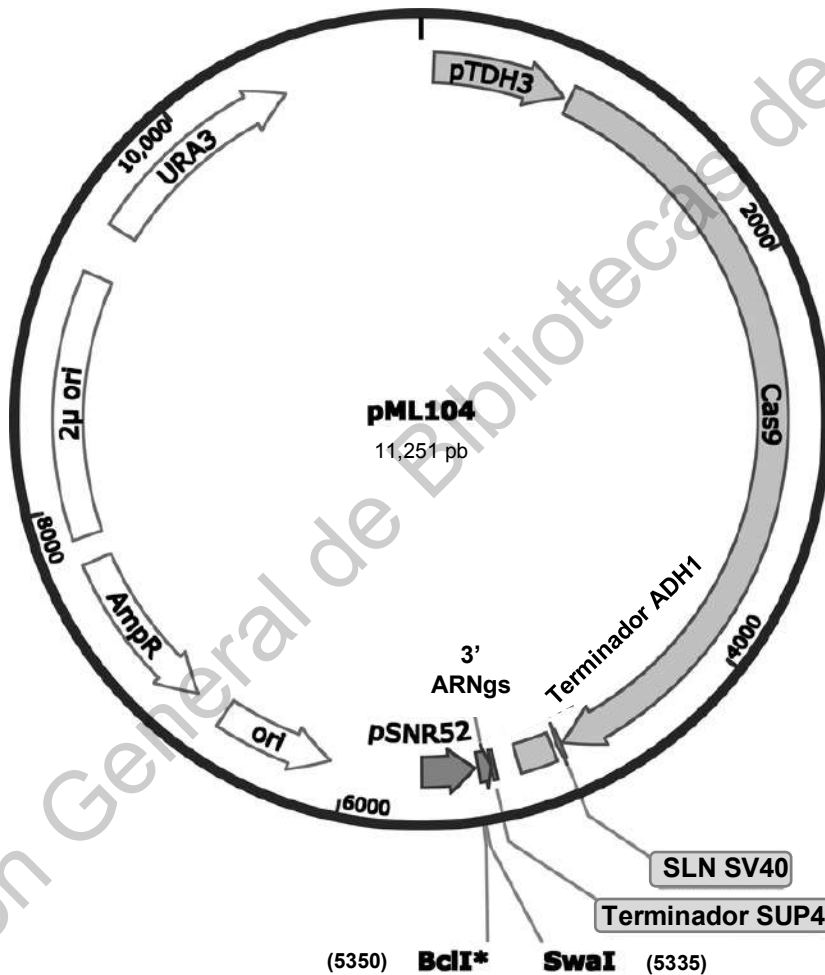


Figura 10. Mapa del vector pML104 para la edición del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. El plásmido contiene el marcador de selección para levaduras (*URA3*), el marcador de selección para bacterias (*AmpR*), la secuencia codificante para Cas9 y el módulo de expresión para el ARNGs. El sitio de restricción *BclI** es sensible a metilación. Modificada de Laughery y col., 2015.

4.3.3 Evaluación de crecimiento celular

Las tres cepas de levadura (BY4741, *tuf1Δ::kanMX4*, *tuf^{H103P}*) se crecieron en cajas YPD de 2 a 5 días dependiendo del tiempo que les tomó formar colonias.

Se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó en 20 mL medio YPD en un matraz de 100 mL por 12 horas a 210 rpm (pre-cultivo). Posteriormente se midió la DO_{600nm} y se inocularon en YPD líquido o YPG líquido para obtener una concentración final de 0.2 DO_{600nm} por cada cepa. A partir de este momento, los matraces se incubaron a 37 °C en agitación por 50 horas. Se tomaron muestras cada dos horas y se midió el progreso de la absorbancia en cada matraz. Estos experimentos se realizaron por triplicado y con los datos obtenidos se construyeron curvas de crecimiento para las tres cepas (protocolo 4.2.15).

Dado que no se lavaron los cultivos previo a la inoculación en YPG, la medición se repitió durante 20 horas creciendo en microplaca en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en YPD, YPG, etanol, YPG + etanol y lactato.

Para la evaluación del crecimiento en medio sólido se llevaron cultivos en fase exponencial a una concentración de 6×10^7 células/mL. De estos cultivos, se hicieron diluciones seriales (de 10^{-1} a 10^{-4}) y se llevó a cabo un ensayo spot, que consistió en inocular 5 μ L de cada dilución en placas de YPD y YPG para ver el cambio de crecimiento dependiendo del número de células por diluciones, mutante y medio de cultivo (protocolo 4.2.16).

4.3.4 Funcionamiento mitocondrial

MitoTracker Green y MitoTracker Deep Red son sondas que sirven para evaluar el volumen mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial, respectivamente. Específicamente con MitoTracker Deep Red es posible estudiar un cambio en el potencial de membrana mitocondrial. Para este ensayo se realizó un cultivo nocturno de las tres cepas en medio YPD a 30 °C en agitación constante. Al día siguiente se

diluyeron a una concentración final de 1×10^6 células/mL lavando previamente con YPG para cultivos destinados a este medio. Los cultivos se incubaron durante 5 horas a $30\text{ }^\circ\text{C}$ y después se lavaron e incubaron con las sondas (protocolo 4.2.17). A los controles negativos no se les añadió sonda.

Usando el citómetro de flujo *Attune™ NxT Acoustic Focusing Flow Cytometry* se obtuvieron gráficas, que relacionan la intensidad fluorescencia con el número de eventos (abscisas y ordenadas, respectivamente), para cada uno de los detectores (BL1 y RL2) y medios empleados.

4.4 Análisis estadístico para curvas de crecimiento manuales

Las curvas de crecimiento se graficaron en Origin Pro 2021, en donde las ordenadas estuvieron dadas en escala logarítmica. Se seleccionaron los puntos en donde se encontró la fase exponencial y se hizo una regresión lineal para obtener la pendiente. Una vez obtenido este valor se usaron las siguientes fórmulas para obtener la velocidad específica de crecimiento (μ). Posteriormente se realizó la prueba estadística t de Student. Los valores menores a 0.05 se consideraron significantes.

$$td = \frac{\log 2}{m}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{td}$$

td - Tiempo de duplicación (h)

m - Pendiente en la fase exponencial

μ - Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

5. RESULTADOS

El propósito de este trabajo consistió en estudiar el efecto que tiene la mutación c.A308C (p. His103Pro) en el gen *TUF1* sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fue recientemente identificada en un paciente y consiste en un cambio de base nucleotídica. Para alcanzar nuestro objetivo, se generó una mutante sin el gen diana (*tuf1Δ::kanMX4*) y una mutante con la transversión c.308A>C (*tuf1^{H103P}*). La comparación entre la mutante nula y la mutante puntual permitió hacer una evaluación fenotípica del papel de EF-Tu (Hershkovitz y col., 2019).

5.1 Obtención de la mutante nula

La eliminación del gen *TUF1* se logró al sustituir dicho gen por el módulo *kanMX4*, el cual confiere resistencia al antibiótico G418 (geneticina), mediante recombinación homóloga.

5.1.1 Amplificación de *kanMX4* y adición de secuencias flanqueantes

Inicialmente, se creció la cepa YSCAU003.1 de *S. paradoxus* la cual es resistente a geneticina y se aisló el ADN genómico para amplificar dicho módulo de resistencia mediante PCR usando los oligonucleótidos TUF1_FKAN y TUF1_RKAN (Figura 11). Dicho producto de PCR se purificó por columnas de membrana de sílice y se usó como cadena molde para añadir las regiones 5' UTR y 3' UTR adyacentes al gen *TUF1*, con los oligonucleótidos TUF1_F10_KAN y TUF1_R10_KAN, con el propósito de generar una molécula que se integrara al genoma de la levadura mediante reemplazo por recombinación homóloga (Figura 12).

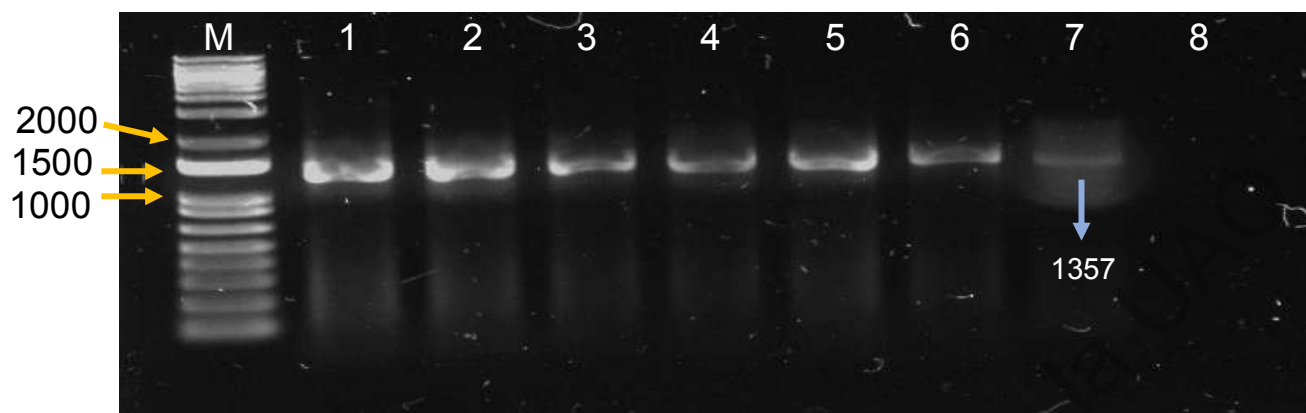


Figura 11. Amplificación del módulo *kanMX4*. Se obtuvieron 7 muestras (carriles 1 a 7) con el amplicón esperado (1357 pb); el carril 8 es un control negativo. Se cargaron 1 μ l de marcador de peso molecular (M) y 2 μ l de muestras diluidos en 9 μ l y 8 μ l de BlueJuice 1X, respectivamente.

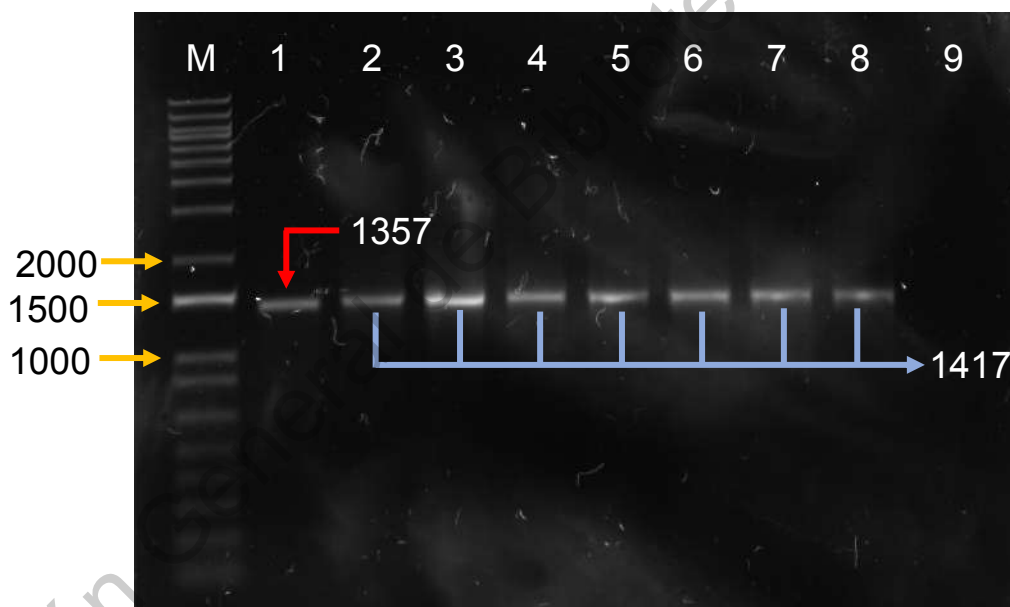


Figura 12. Adición de secuencias flanqueantes a *kanMX4*. Se obtuvieron 7 productos (carriles 2-8) con el tamaño esperado (1417 pb). La muestra 1 es la cadena molde usada (*kanMX4*; 1357 pb); el carril 9 es un control negativo. Se cargaron 1 μ l de de peso molecular (M) y 2 μ l de muestras diluidos en 9 μ l y 8 μ l de BlueJuice 1X, respectivamente.

5.1.2 Transformación con el módulo de resistencia

Una vez obtenido el módulo *kanMX4* con las secuencias flanqueantes, se procedió a la transformación en las cepas BY4741 y BY4742 de *S. cerevisiae*. Se realizaron 6

transformaciones sembrando en YPD, de las cuales cuatro se trataron con diferentes concentraciones del módulo mientras que las dos restantes sirvieron como control negativo. 24 horas después, se hizo una réplica en placa en medio YPD-G418 obteniendo 24 colonias (Cuadro 13).

Cuadro 13. Transformantes en medio YPD-G418.

Cepa	Transformación	Producto de PCR purificado (ng)	Colonias por 50 µl	Colonias por 300 µl	Colonias totales
BY4741	1	1644	0	4	4
	2	4012	0	3	3
	3 (control negativo)	0	0	0	0
BY4742	4	1100	7	5	12
	5	2304	0	5	5
	6 (control negativo)	0	0	0	0

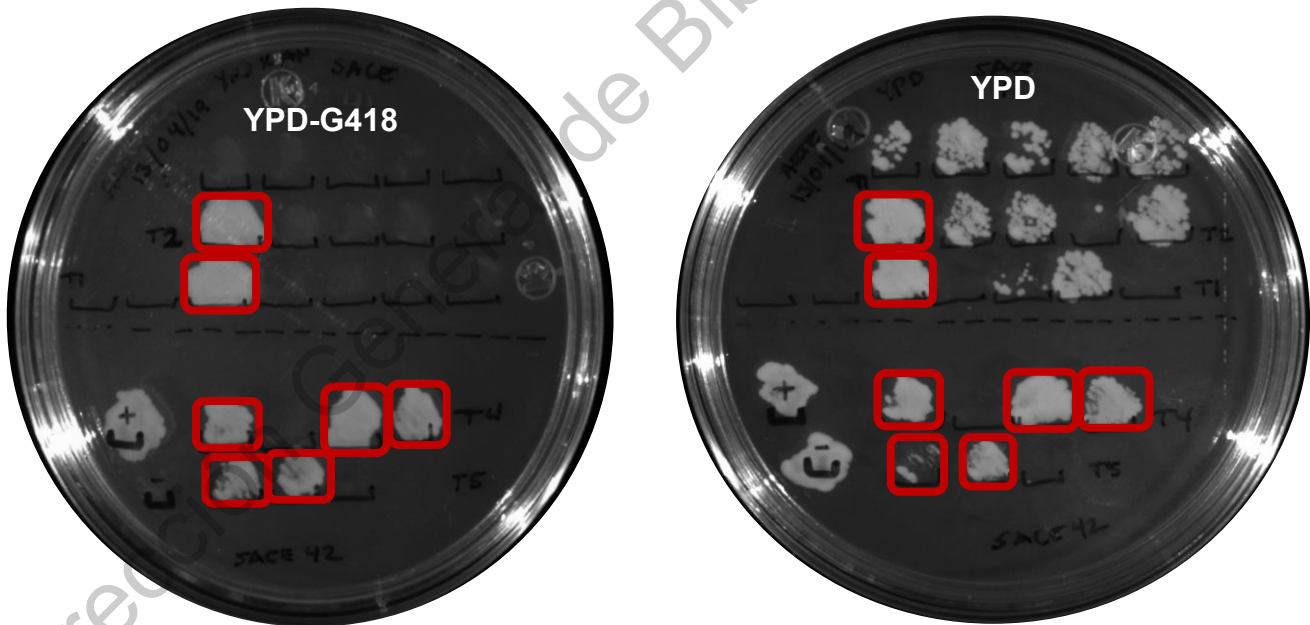


Figura 13. Colonias resistentes a geneticina. De las 24 transformantes, las siete colonias marcadas en rojo fueron resistentes al antibiótico. Como control positivo (+) se usó la cepa NCYC3662 de *S. paradoxus* y como control negativo (-) la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*.

Para comprobar la integración de *kanMX4*, cada colonia se tomó con un asa de cultivo y se sembró primero en medio selectivo YPD-G418 y después en medio YPD. Las transformantes que crecieron en ambas cajas se usaron para análisis posteriores (Figura 13 y Cuadro 14).

Cuadro 14. Transformantes de levadura resistentes a geneticina.

Cepa	Transformación	Colonias totales en YPD-G418	Colonias resistentes	Nombre
BY4741	1	4	3	C1, C2, C3
	2	3	2	C4, C5
	3	0	0	No aplica
BY4742	4	12	1	C6
	5	5	1	C7
	6	0	0	No aplica

5.1.3 Verificación de la delección del gen *TUF1*

Usando las siete colonias resistentes a geneticina (C1 a C7), se realizaron tres reacciones de PCR para seleccionar las colonias *tuf1Δ::kanMX4*, como se describe a continuación.

En la primera aproximación, se amplificó *kanMX4* de las colonias usando los oligonucleótidos TUF1_FKAN y TUF1_RKAN que son complementarios al módulo *kanMX4* y por tanto únicamente habrá amplificado en las colonias que tengan insertado el módulo. Como se observa en la Figura 14A, la clona C2 no tenía insertado dicho módulo. Se calculó la eficiencia de transformación de las 6 clonas restantes, usando la siguiente fórmula (Cuadro 15).

Cuadro 15. Eficiencia de transformación de la mutante nula

Cepa	Colonia transformante	Eficiencia de transformación (UFC/μg)
BY4741	C1, C3	1.21
	C4, C5	0.49
BY4742	C6	0.91
	C7	0.43

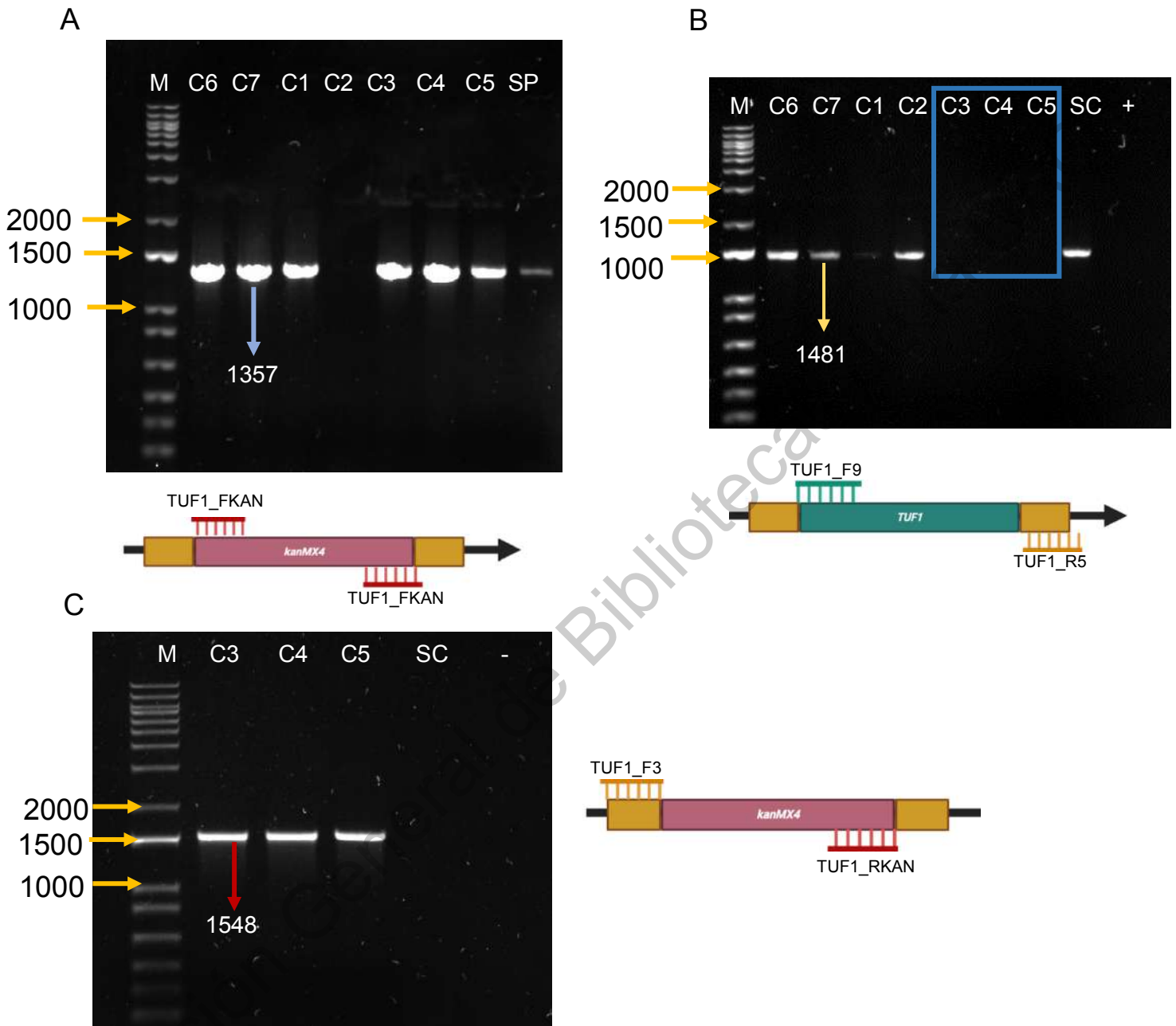


Figura 14. Identificación de las colonias *tuf1Δ::kanMX4* mediante PCR. Para A y B, la aproximación usada se muestra debajo de los geles de agarosa mientras que para C se muestra a la derecha. (A) De las siete colonias, C2 no contenía el módulo *kanMX4* por la falta de la banda esperada (1357 pb); como control positivo se empleó a la cepa YSCAU003.1 (SP). (B) De las siete colonias sólo C3, C4 y C5 no generaron amplicón (1481 pb); BY4741 (SC) fue el control negativo y como control positivo (+) agua. (C) De las tres colonias sin banda de B, todas mostraron la banda esperada (1548 pb); como controles negativos se usaron SC y agua (-). En cada gel se cargaron 1 μ l de marcador de peso molecular (M) y 3 μ l de muestras diluidos en 9 μ l y 7 μ l de BlueJuice 1X, respectivamente.

En la segunda aproximación, se usaron los oligonucleótidos TUF1_F9 y TUF1_R5. El primer oligonucleótido se diseñó para unirse a una secuencia específica dentro del gen *TUF1*, por lo tanto, en colonias *tuf1Δ::kanMX4* el oligonucleótido no se uniría. Por otro lado, el oligonucleótido TUF1_R5 se diseñó para hibridar con una secuencia fuera del gen *TUF1* en dirección 3', de esta manera siempre se unirá a su secuencia diana aunque *TUF1* no esté presente. Usando esta metodología se identificaron a las colonias C3, C4 y C5 sin amplicón, lo cual podría significar que *TUF1* fue reemplazado (Figura 14B).

En la tercera aproximación, se usaron los oligonucleótidos TUF1_F3 y TUF1_RKAN. El primer oligonucleótido se une en la región 5' UTR del gen *TUF1* en dirección 5', independientemente de la presencia o ausencia del gen. El oligonucleótido TUF1_RKAN hibrida con una secuencia final de *kanMX4*, por lo tanto hibridaría con la secuencia blanco cuando el módulo de resistencia esté presente. En este experimento se usaron las tres colonias positivas de la segunda aproximación (C3, C4 y C5), obteniendo amplificaciones de dichas colonias (Figura 14C). Dichos experimentos nos permitieron identificar a las colonias C3, C4 y C5 como aquellas que habían reemplazado *TUF1* por *kanMX4*, provenientes de la cepa parental BY4741.

5.2 Construcción del vector pML104

Para generar la mutante puntual, se usó el vector pML104, el cual contiene la secuencia codificante para la endonucleasa Cas9, marcador de selección *URA3* para levaduras, marcador de resistencia a ampicilina para bacterias y sistema de expresión de ARNgs (Laughery y col., 2015).

5.2.1 Diseño del ARNgs y ligación al vector

Se creció la cepa bacteriana YLM3129 y se aisló el ADN plasmídico, dado que este microorganismo poseía previamente el vector pML104 y se digirió con las enzimas de restricción necesarias con el propósito de verificar que el vector no estuviera metilado y linealizarlo para la inserción del ARNgs (Figura 15).

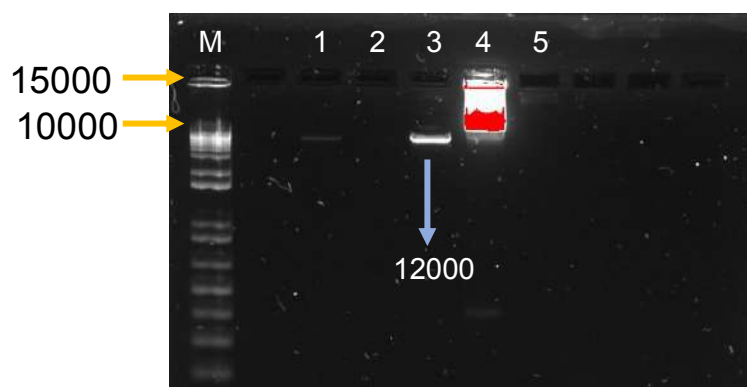


Figura 15. Digestión del vector pML104. El plásmido se linealizó con *Bcl*I y *Swa*I. Se digirieron 4 muestras (carriles 1 a 4) de los cuales los carriles 1 y 3 contuvieron fragmentos del tamaño esperado (12 kpb). El carril 4 fue un plásmido obtenido de una cepa *dam*⁺/*dcm*⁺ y el carril 5 fue un control negativo con agua. Se cargaron 1 μ L del marcador de peso molecular (M) y 3 μ L de muestras, diluidos en 5 μ L y 7.5 μ L de BlueJuice 1X, respectivamente. Los píxeles saturados se muestran en rojo.

El ARNGs se obtuvo mediante la hibridación de los oligonucleótidos TUF1_ARNGs1_1 y TUF1_ARNGs1_2 en un termociclador en concentraciones equimolares. De la misma manera, los oligonucleótidos TUF1_mol_mut_1 y TUF1_mol_mut_2 se hibridaron a la misma concentración para obtener la molécula de reemplazo, la cual contenía la mutación a estudiar, así como el cambio en la secuencia PAM. Ambas reacciones se realizaron usando tampón de DNA T4 Ligasa 1x.

Una vez que se ligó el ARNGs al vector, se realizaron siete transformaciones en células competentes de *E. coli*, de las cuales una sirvió como control negativo y se sembraron en medio LB amp. De las 182 colonias obtenidas solamente se escogieron 19 para los experimentos posteriores; de la transformación 2, las colonias tomadas crecieron en la caja inoculada con 90 μ L de reacción de transformación (Cuadro 16).

Las 19 colonias elegidas se amplificaron clonalmente y se les extrajo el vector; de las 19 colonias, solamente 10 contenían el plásmido. Se hizo una PCR con los cebadores T7 y TUF1_ARNGs1_1 para comprobar la integración del inserto al

plásmido usando como molde a los plásmidos de cada colonia (Figura 16A). De las 10 colonias, todas habían integrado el vector con el inserto posicionado en la dirección correcta (Figura 16B).

Cuadro 16. Transformantes en medio LB amp.

Cepa	Transformación	pML104-TUF1(ng)	Colonias por 10 μ l	Colonias por 90 μ l	Colonias totales	Colonias tomadas
XL1-Blue	1	100.2	0	0	0	0
	2	142.4	2	36	38	4
	3	193	0	18	18	6
	4	97.8	0	0	0	0
	5	143.6	73	73	73	6
	6	170	53	53	53	3
	7 (control negativo)	0	0	0	0	0

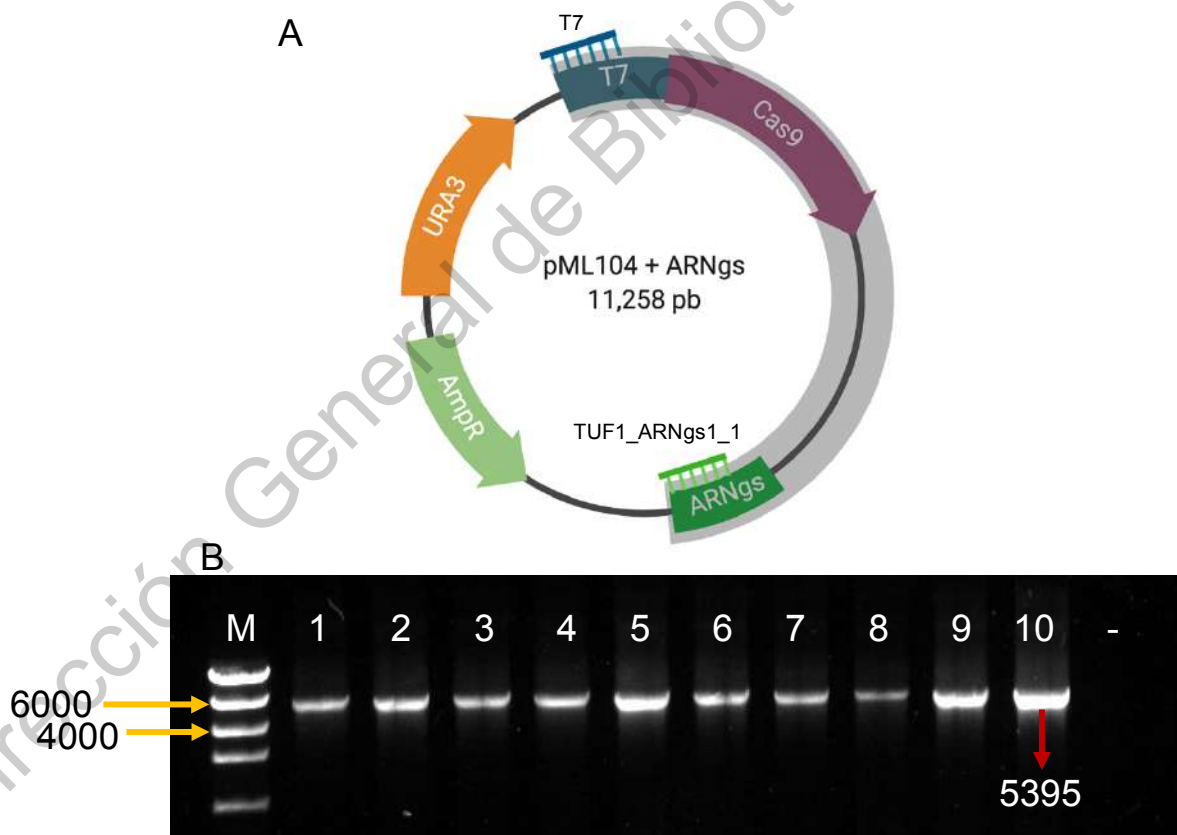


Figura 16. Verificación de la ligación del ARNg al vector pML104. (A) Mapa del vector con el ARNg ligado; en gris se muestra la región que se amplificó. (B) Verificación de la correcta integración del ARNg al vector, obteniendo el tamaño esperado. Se cargaron 1 μ l de marcador (M) y 3 μ l de muestras diluidos en 9 μ l y 7 μ l de BlueJuice 1X, respectivamente.

5.2.2 Edición del gen *TUF1* mediante el sistema CRISPR/Cas9

Para editar el gen *TUF1*, se crecieron las cepas BY4741 y BY4742 de *S. cerevisiae* y una de las diez colonias transformadas de *E. coli* con el vector pML104 en YPD y LB amp, respectivamente. El vector se purificó y se usó para cotransformar a *S. cerevisiae* junto con la molecular de reemplazo, sembrando en YNB Ura-. Se realizaron 7 transformaciones por cepa, de las cuales 2 sirvieron como control negativo. Por reacción, se varió la concentración de la molécula de reemplazo; en estas reacciones, también se usaron a los oligonucleótidos TUF1_mol_mut_1 y TUF1_mol_mut_2 como cadena molde de cadena sencilla para reparar el corte de doble cadena generado por Cas9 (Cuadro 17).

Se obtuvieron aproximadamente 3790 transformantes, las cuales se dividieron en pequeñas o grandes, dependiendo del tamaño de la colonia (Cuadro 18). Dado que se desconocía el fenotipo de las colonias que tenían la mutación esperada en el gen *TUF1*, se seleccionaron 147 colonias al azar (Cuadro 19).

Para reducir la cantidad de transformantes, cada colonia se tomó con un asa de cultivo y se sembró primeramente en cajas YNB Ura-, después en YPG y finalmente en YPD. Las transformantes que crecieron YNB Ura-, en YPD y que presentaron un crecimiento reducido o nulo en YPG fueron seleccionadas para secuenciación, obteniendo así un total de 19 muestras (10 de la cepa BY4741 y 9 de la cepa BY4742). Algunas de las colonias para secuenciación no crecieron en YPD, posiblemente porque la cantidad de células no fue suficiente para generar crecimiento (Figuras 17 y 18).

Cuadro 17. Concentraciones de cada molécula de reemplazo.

Cepa	Transformación	Molécula cotransformada	Concentración usada de la molécula (ng)
BY4741	1	TUF1_mol_mut_1	5100
	2		2550
	3	TUF1_mol_mut_2	4886
	4		2792
	5	Molécula de reemplazo	4836
	6		2418
	7 (control negativo)	0	0
BY4742	8	TUF1_mol_mut_1	5100
	9		2550
	10	TUF1_mol_mut_2	4886
	11		2792
	12	Molécula de reemplazo	4836
	13		2418
	14 (control negativo)	0	0

Para eliminar el plásmido, se crecieron las colonias seleccionadas en medio YPD-5-FOA y posteriormente se les extrajo el ADN para amplificar el gen *TUF1*, verificando el tamaño mediante geles de agarosa (Figura 19). El amplicón se purificó y se secuenció mediante el método Sanger.

De las 20 colonias, 12 contenían el cambio de A a C en la posición 308 del gen *TUF1*, que al ser transcrito y traducido cambiaría de histidina (CAC) a prolina (CCC) en la posición 103 de la proteína. Adicionalmente, se encontró el cambio de G a A en la secuencia PAM en la posición 312, sin embargo, tanto el codón GTG como el codón GTA codifican para valina. Por lo tanto, el único cambio en la secuencia de proteínas se generó en el sitio 308 del gen a editar (Figura 20) (Cuadro 20).

Dado que de la mutante *tuf1Δ::kanMX4* solamente se obtuvieron colonias de la cepa BY4741, los experimentos siguientes se basaron en mutantes y tipos silvestres provenientes de la misma cepa parental.

Cuadro 18. Transformantes en medio YNB Ura-.

Transformación	Colonias grandes por 50 μ l	Colonias pequeñas por 50 μ l	Colonias grandes por 300 μ l	Colonias pequeñas por 300 μ l	Colonias totales
1	4	34	84	600	722
2	13	11	36	400	460
3	1	22	41	500	564
4	1	0	6	220	227
5	1	7	24	250	282
6	3	13	19	150	185
7 (control negativo)	0	0	0	0	0
8	0	0	1	23	24
9	1	5	10	200	216
10	0	18	8	240	266
11	0	1	1	300	302
12	0	0	2	24	26
13	11	54	51	400	516
14 (control negativo)	0	0	0	0	0

Cuadro 19. Colonias de levaduras seleccionadas para análisis de edición.

Transformación	Colonias grandes seleccionadas	Colonias pequeñas seleccionadas
1	10	4
2	10	4
3	10	4
4	7	4
5	6	4
6	6	6
8	1	4
9	10	4
10	9	4
11	2	4
12	2	4
13	24	4

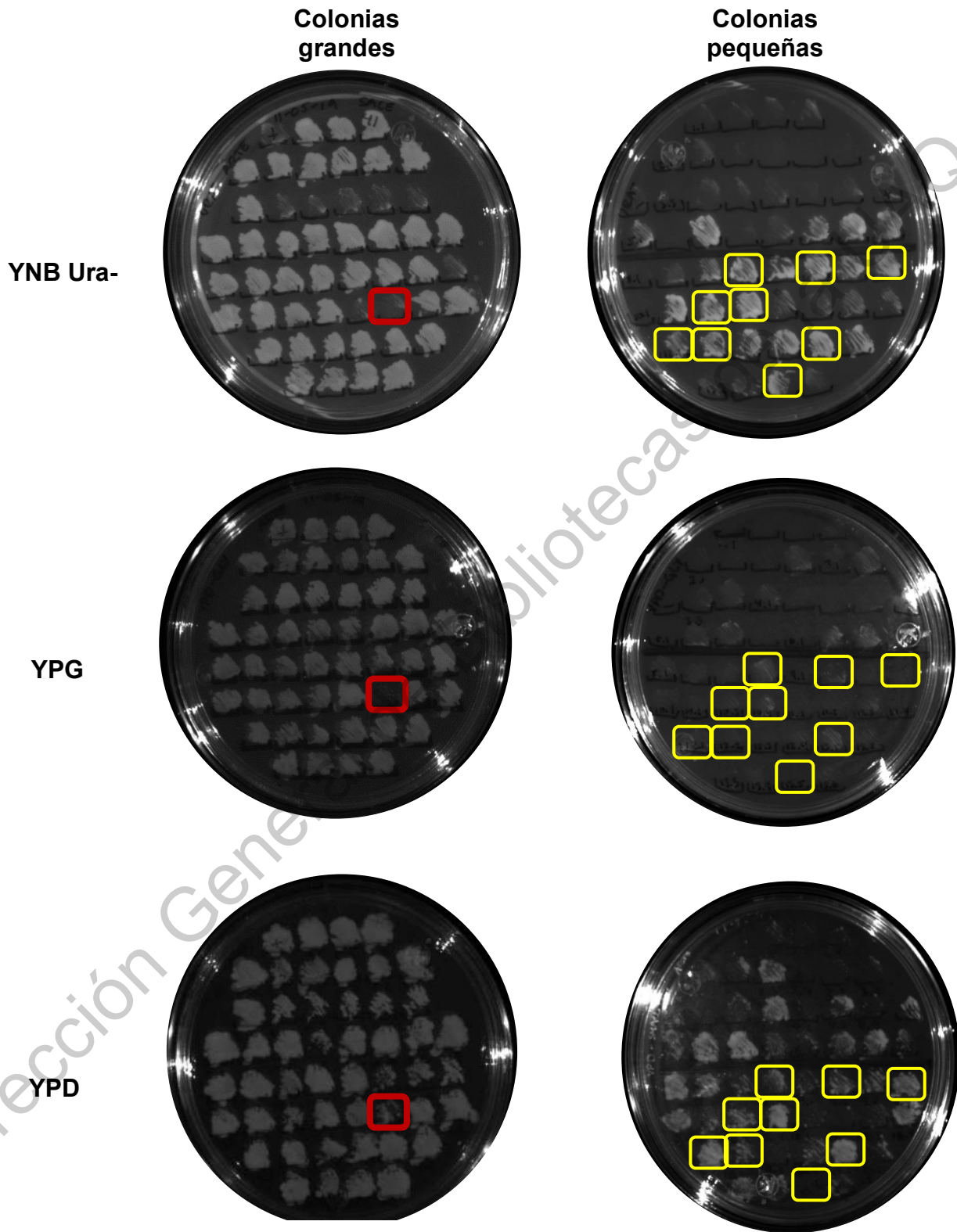


Figura 17. Colonias de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* seleccionadas para secuenciación. En rojo se encuentran las colonias grandes y en amarillo las colonias pequeñas. Se muestran los medios selectivos.

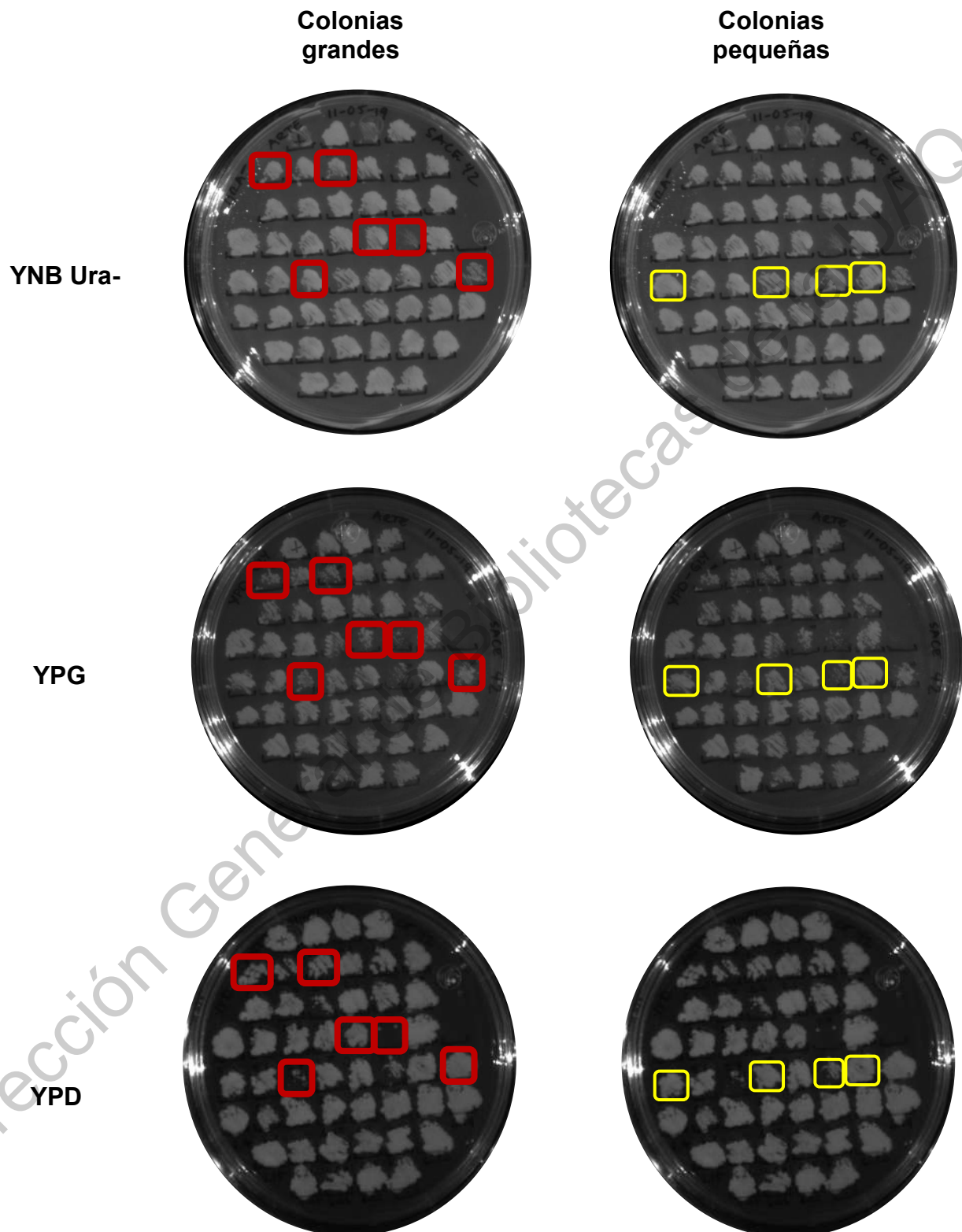


Figura 18. Colonias de la cepa BY4742 de *S. cerevisiae* seleccionadas para secuenciación. En rojo se encuentran las colonias grandes y en amarillo las colonias pequeñas. Se muestran los medios selectivos.

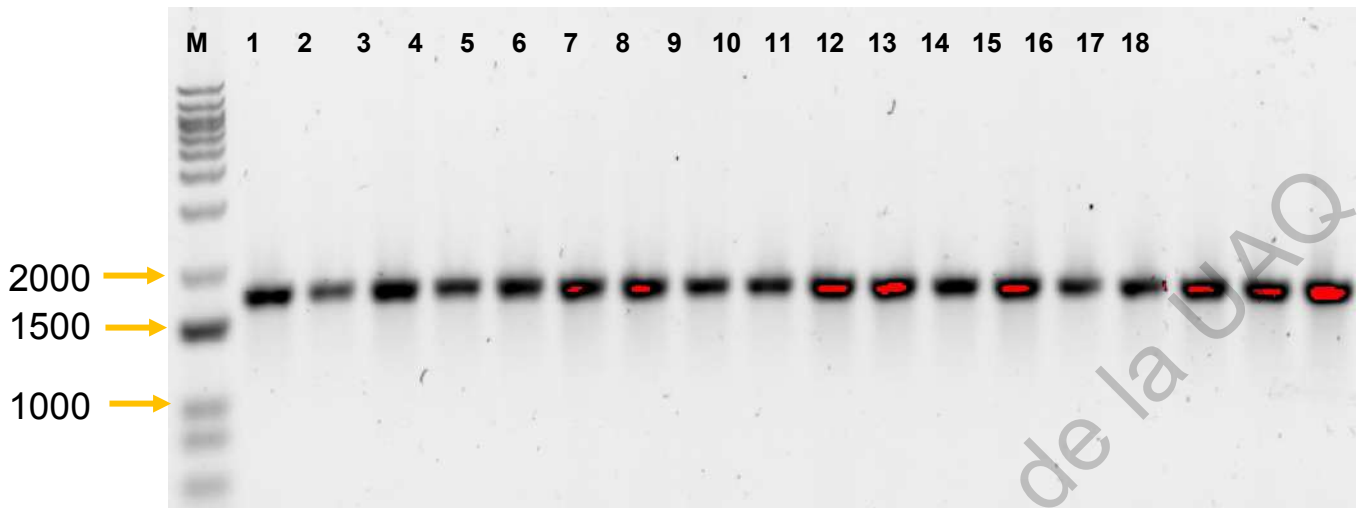


Figura 19. Verificación de la amplificación de *TUF1* para secuenciación. Se muestran 18 colonias amplificadas con el tamaño de banda esperado (1740 pb). Se cargaron 1 μ l de marcador (M) y 3 μ l de muestras diluidos en 9 μ l y 7 μ l de BlueJuice 1X, respectivamente. Los píxeles saturados se muestran en rojo.

Cuadro 20. Colonias de levadura con las mutaciones deseadas.

Cepa	Colonias secuenciadas	Colonias editadas correctamente
BY4741	10	9
BY4742	9	3

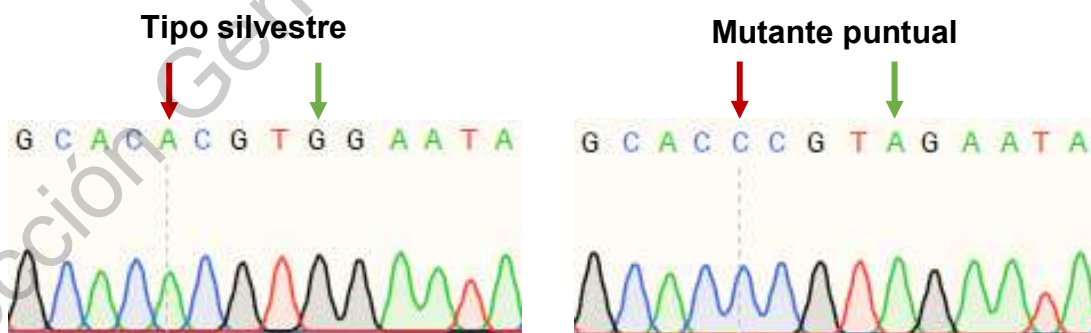


Figura 20. Electroferogramas del cambio de base c.308A>C. Se muestra el cambio de base de A a C en la posición 308 así como el cambio de la secuencia PAM de G a A en la posición 312. Se especifica la secuencia del tipo silvestre y de la mutante generada con el sistema CRISPR/Cas9.

5.3 Evaluación del efecto de las mutaciones mediante curvas de crecimiento

Para estimar cómo las mutaciones generadas afectan el crecimiento de *S. cerevisiae*, se realizaron curvas de crecimientos en caldos YPD y YPG discontinuos en tres experimentos independientes.

Cada hora, se midió la DO_{600nm} del cultivo respectivo por un total de 50 horas, obteniendo dos gráficas, una por cada medio de cultivo, las cuales muestran la relación entre el tiempo (en horas) y el crecimiento obtenido (unidades de DO_{600nm}) (Figuras 21A y 22A). Usando el tiempo de duplicación y la velocidad máxima específica (Cuadro 21), la gráfica de la cepa *tuf1Δ::kanMX4* se comparó con el de BY4741 para saber qué tanto afecta en el crecimiento que el organismo no tenga el gen *TUF1*. De igual forma, la curva para la mutante *tuf*^{#1103P} se comparó con la gráfica de la cepa silvestre para identificar el efecto que tiene el cambio de base sobre el crecimiento; adicionalmente, comparar con el diagrama de la mutante *tuf1Δ::kanMX4* sirvió para saber si este efecto en el crecimiento es menor que no tener el gen en su totalidad.

Dados que no se realizaron lavados al diluir los pre-cultivos en medio YPG a partir de medio YPD, se repitieron las curvas de crecimiento en medio YPD, medio YPG y en medios adicionales con fuentes de carbono no fermentables, incluyendo etanol, etanol con glicerol y lactato (Figuras 21B, 22B y 23). Estas nuevas curvas se realizaron a partir de mediciones automatizadas con TECAN en el LANGEBIO; no se obtuvieron los parámetros anteriores debido a la ausencia de la fase exponencial por el tiempo de incubación.

En las curvas de crecimiento mediante mediciones manuales, a las 14 y 38 horas de cada cultivo se sembraron 1:10,000 y 1:100,000 diluciones, respectivamente, en cajas YPD y YPG y se contaron las células resultantes (Cuadros 22 y 23).

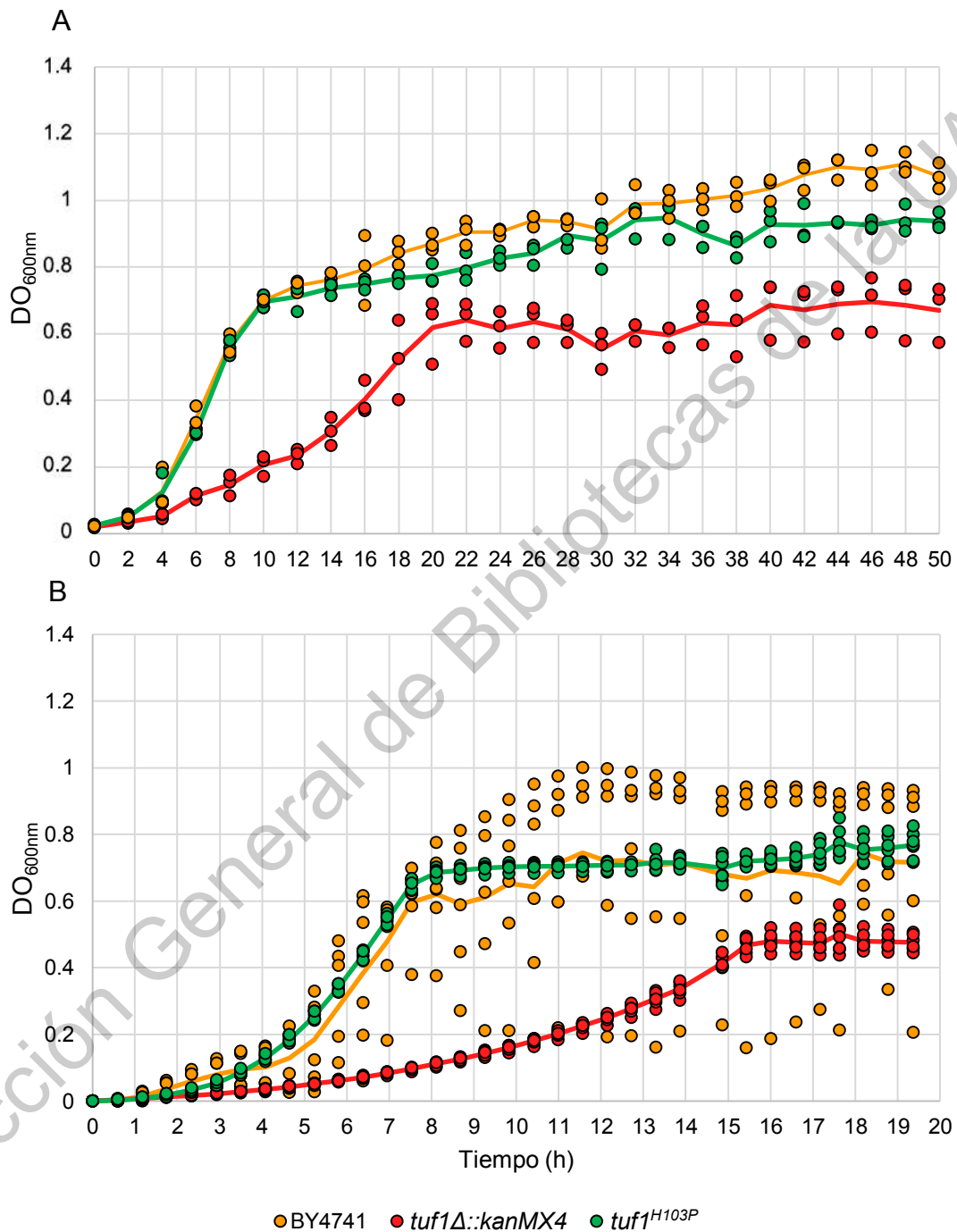


Figura 21. Curvas de crecimiento en medio YPD. Se graficaron las tres réplicas de cada mutante y tipo silvestre así como el promedio representado por la línea continua. En A se muestra la gráfica construida a través de mediciones manuales y en B con mediciones automatizadas.

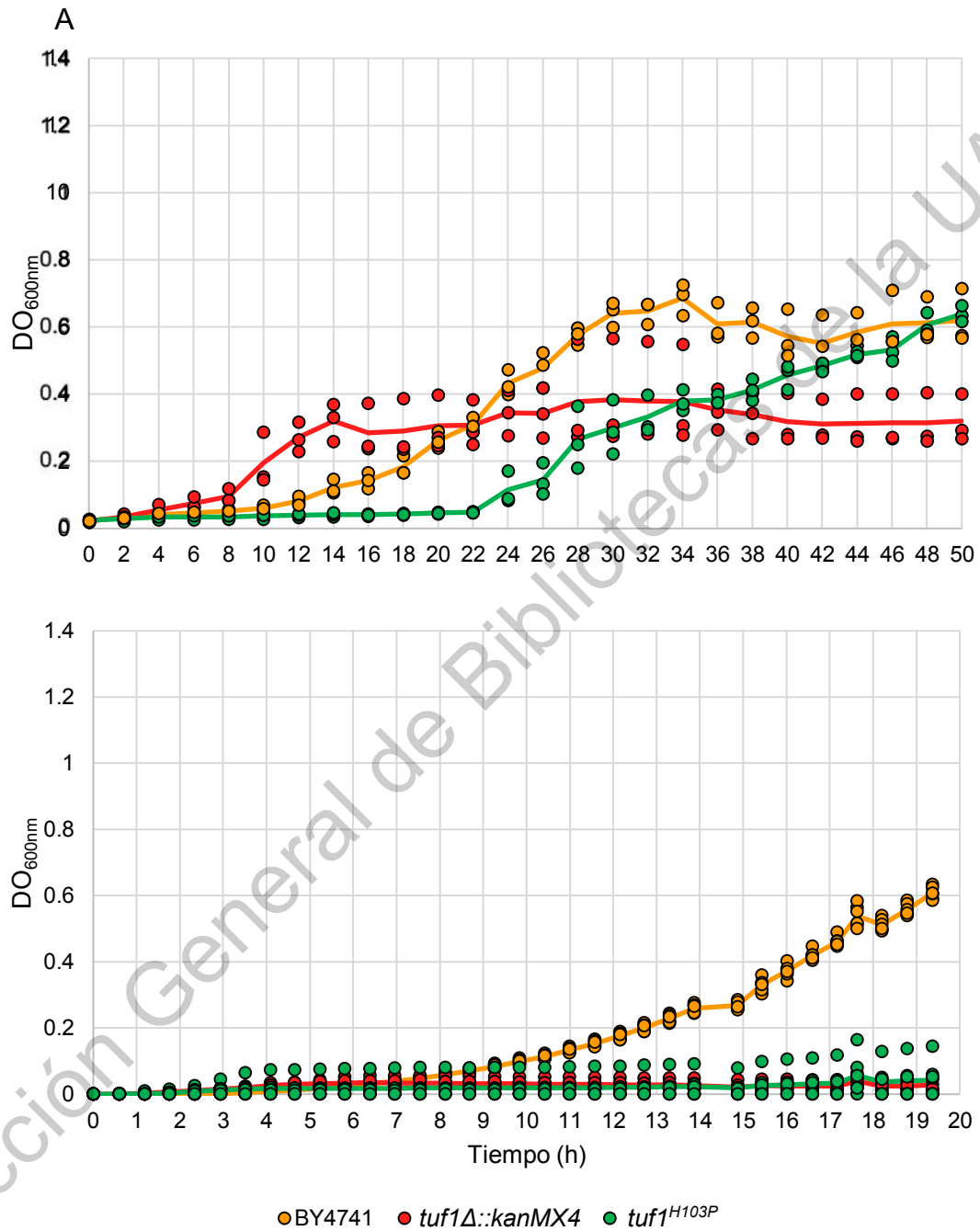


Figura 22. Curvas de crecimiento en medio YPG. Se graficaron las tres réplicas de cada mutante y tipo silvestre así como el promedio representado por la línea continua. En A se muestra la gráfica construida a través de mediciones manuales y en B con mediciones automatizadas.

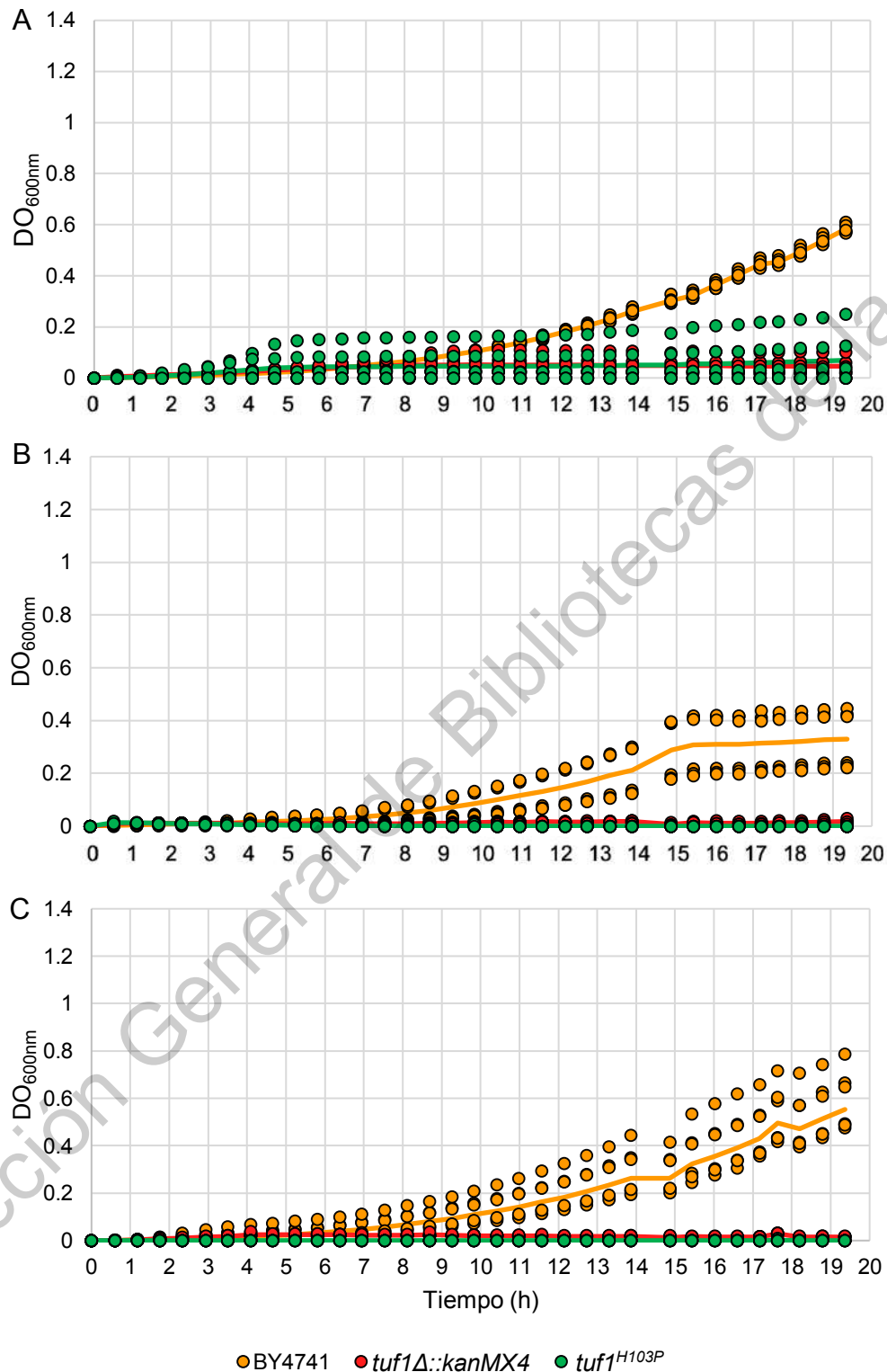


Figura 23. Curvas de crecimiento en medios con fuentes de carbono no fermentables. (A) YPG + etanol, (B) etanol y (C) lactato. Se graficaron las seis réplicas automatizadas de cada mutante y tipo silvestre así como el promedio representado por la línea continua.

Cuadro 21. Parámetros de crecimiento de las curvas manuales

Medio	Muestra	td (h)	μ (h ⁻¹)
YPD	BY4741	1.699 ± 0.159	0.418 ± 0.038
	<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	2.340 ± 0.066	0.296 ± 0.008
	<i>tuf1</i> ^{H103P}	1.712 ± 0.098	0.406 ± 0.023
YPG	BY4741	5.084 ± 0.213	0.136 ± 0.006
	<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i> (0 -14 h)	2.838 ± 0.306	0.246 ± 0.028
	<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i> (14 -50 h)	29.821 ± 15.865	0.032 ± 0.024
	<i>tuf1</i> ^{H103P}	2.811 ± 0.741	0.257 ± 0.062

Dado que las curvas de crecimiento se hicieron mediante dos cultivos discontinuos, las horas 12, 14, 24, 26, 36 y 38 estuvieron duplicadas. Para dichos casos, se promediaron las densidades ópticas de los cultivos en cada réplica y esos datos se usaron para las curvas de crecimiento. Por la misma razón se hizo la siembra y conteo de células a las 14 y 38 horas dos veces. En la Figura 24 se muestra una ejemplificación de uno de los dos cultivos a 38 horas usados para el conteo, tanto en placas YPD como en YPG.

Cuadro 22. Conteo de células a las 14 horas

Siembra	Réplica	Muestra	Células contadas		Células/mL	
			YPD	YPG	YPD	YPG
1	1	BY4741	1562	459	7.81E+07	2.30E+07
		<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	66	0	3.30E+06	0.00E+00
		<i>tuf1</i> ^{H103P}	1074	89	5.37E+07	4.45E+06
	2	BY4741	1780	447	8.90E+07	2.24E+07
		<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	808	0	4.04E+07	0.00E+00
		<i>tuf1</i> ^{H103P}	950	85	4.75E+07	4.25E+06
	3	BY4741	2130	563	1.07E+08	2.82E+07
		<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	536	0	2.68E+07	0.00E+00
		<i>tuf1</i> ^{H103P}	780	78	3.90E+07	3.90E+06
2	1	BY4741	857	410	4.29E+07	2.05E+07
		<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	70	0	3.50E+06	0.00E+00
		<i>tuf1</i> ^{H103P}	1513	101	7.57E+07	5.05E+06
	2	BY4741	904	283	4.52E+07	1.42E+07
		<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	157	0	7.85E+06	0.00E+00
		<i>tuf1</i> ^{H103P}	660	71	3.30E+07	3.55E+06
	3	BY4741	813	572	4.07E+07	2.86E+07
		<i>tuf1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	196	0	9.80E+06	0.00E+00
		<i>tuf1</i> ^{H103P}	1570	202	7.85E+07	1.01E+07

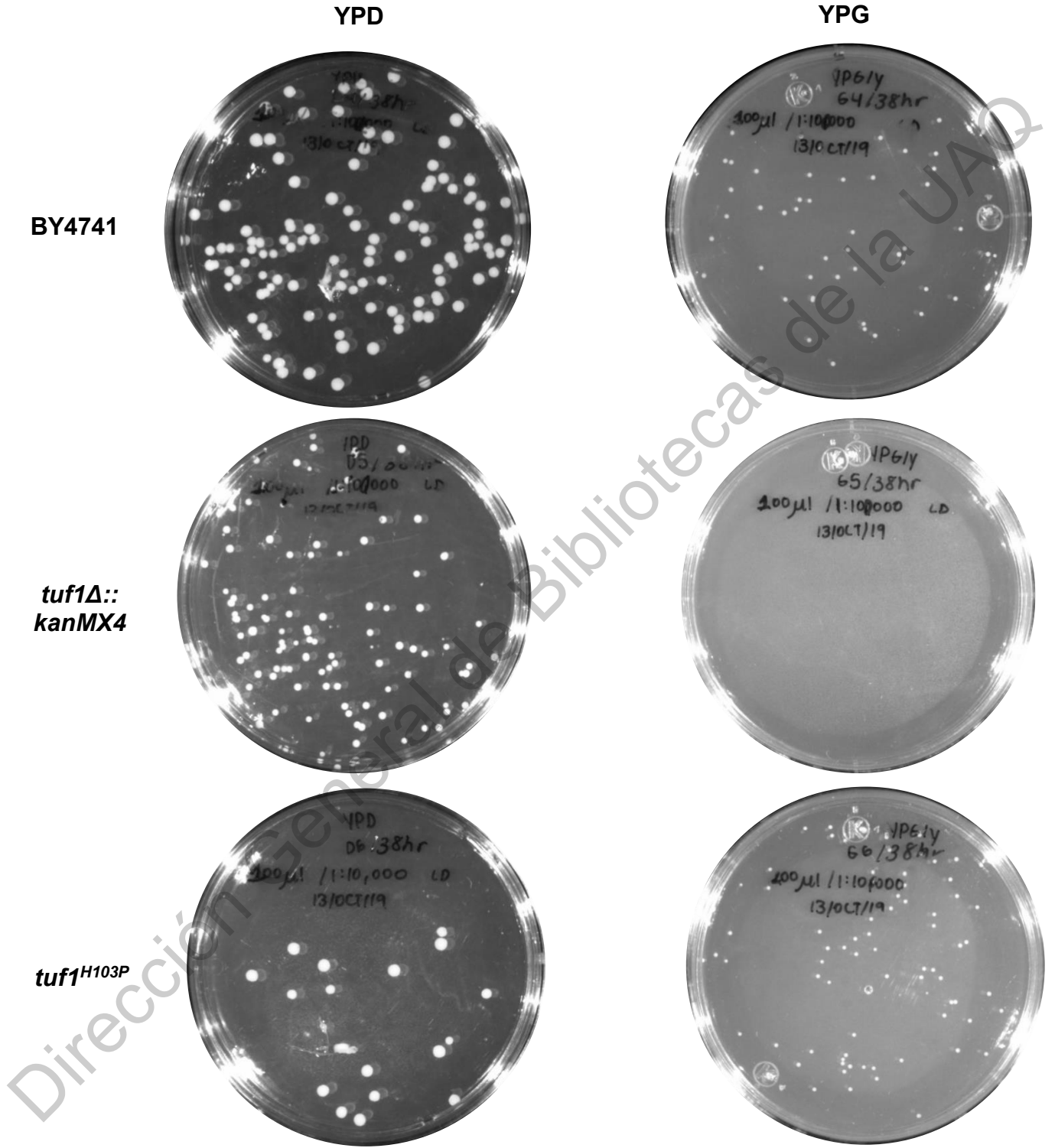


Figura 24. Siembra de curvas de crecimiento. Se muestran las mutantes y tipo silvestre plaqueadas a las 38 horas en diferentes medios.

Cuadro 23. Conteo de células a las 38 horas

Siembra	Réplica	Muestra	Células contadas		Células/mL	
			YPD	YPG	YPD	YPG
1	1	BY4741	143	56	1.43E+08	5.60E+07
		<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	17	0	1.70E+07	0.00E+00
		<i>tuf1^{H103P}</i>	33	73	3.30E+07	7.30E+07
	2	BY4741	121	50	1.21E+08	5.00E+07
		<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	106	0	1.06E+08	0.00E+00
		<i>tuf1^{H103P}</i>	20	75	2.00E+07	7.50E+07
	3	BY4741	150	92	1.50E+08	9.20E+07
		<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	123	0	1.23E+08	0.00E+00
		<i>tuf1^{H103P}</i>	19	63	1.90E+07	6.30E+07
2	1	BY4741	83	77	8.30E+07	7.70E+07
		<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	8	0	8.00E+06	0.00E+00
		<i>tuf1^{H103P}</i>	83	73	8.30E+07	7.30E+07
	2	BY4741	64	218	6.40E+07	2.18E+08
		<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	13	0	1.30E+07	0.00E+00
		<i>tuf1^{H103P}</i>	14	588	1.40E+07	5.88E+08
	3	BY4741	52	190	5.20E+07	1.90E+08
		<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	11	0	1.10E+07	0.00E+00
		<i>tuf1^{H103P}</i>	87	253	8.70E+07	2.53E+08

5.4 Verificación del crecimiento mediante ensayo spot

Para estimar el crecimiento de cada mutante y tipo silvestre en placas YPD y YPG se partió de cultivos de 6×10^7 células/mL o concentraciones lo más cercanas posibles (Cuadro 24). Se documentó el crecimiento de las colonias a partir de las diluciones generadas de los cultivos previos (Figura 25).

Cuadro 24. Células/mL en cultivos para ensayo spot

Medio	Muestra	Células/mL en cultivos iniciales	Células/mL en cultivos finales
YPD	BY4741	6.92×10^7	6.20×10^7
	<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	6.61×10^7	5.85×10^7
	<i>tuf1^{H103P}</i>	6.15×10^7	6.15×10^7
YPG	BY4741	7.03×10^7	5.95×10^7
	<i>tuf1Δ::kanMX4</i>	6.07×10^7	6.07×10^7
	<i>tuf1^{H103P}</i>	6.82×10^7	6.60×10^7

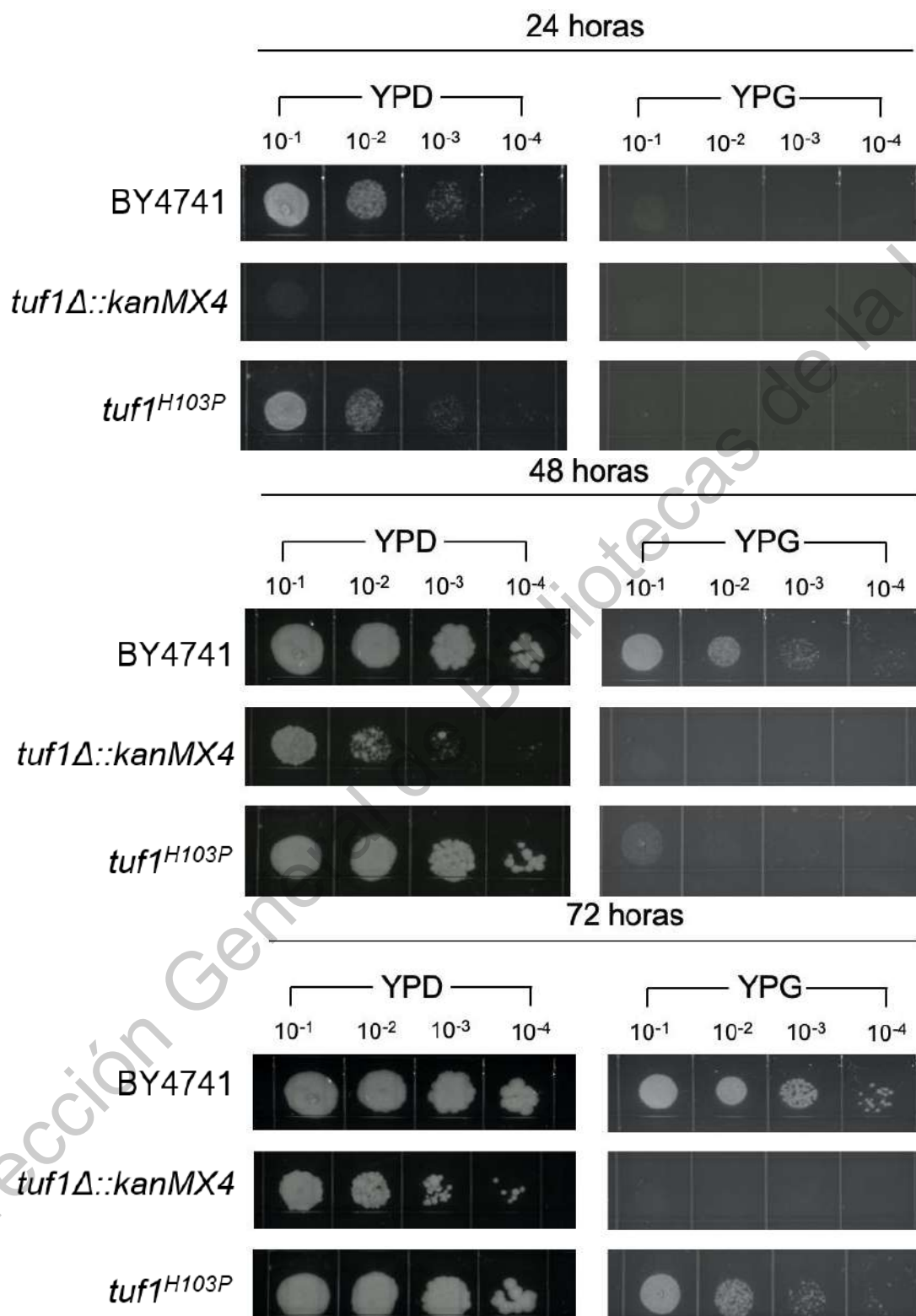


Figura 25. Ensayo spot. Se muestra el crecimiento de las mutantes y tipo silvestre a diferentes concentraciones en YPD y YPG durante 72 horas.

5.5 Evaluación del funcionamiento mitocondrial

Se utilizaron dos sondas fluorescentes, MitoTracker Green y MitoTracker Deep Red, con el objetivo de evaluar el volumen y potencial de membrana mitocondrial, respectivamente. Se adquirieron 10,000 eventos por muestra en un volumen de 50 μL y una velocidad de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se estandarizaron los voltajes FSC, SSC y para los canales RL2 y BL1 usando un control negativo que consistió en la cepa parental sin las sondas de fluorescencia.

Los láseres usados se escogieron con base en las longitudes de onda de excitación de cada sonda especificadas por el proveedor. Para MitoTracker Green, el cual tiene una excitación máxima a 644 nm, se usó el láser azul ya que provee una longitud de onda de 488 nm; para MitoTracker Deep Red, con una excitación máxima a 638 nm, se usó el láser rojo ya que excita a una longitud de onda de 644 nm.

Los datos adquiridos fueron analizados con el programa FlowJo™. Se realizó un gating para mostrar singlets de levadura viables, y se sobrelaparon los histogramas de fluorescencia para comparar las diferencias entre las cepas (Figura 26).

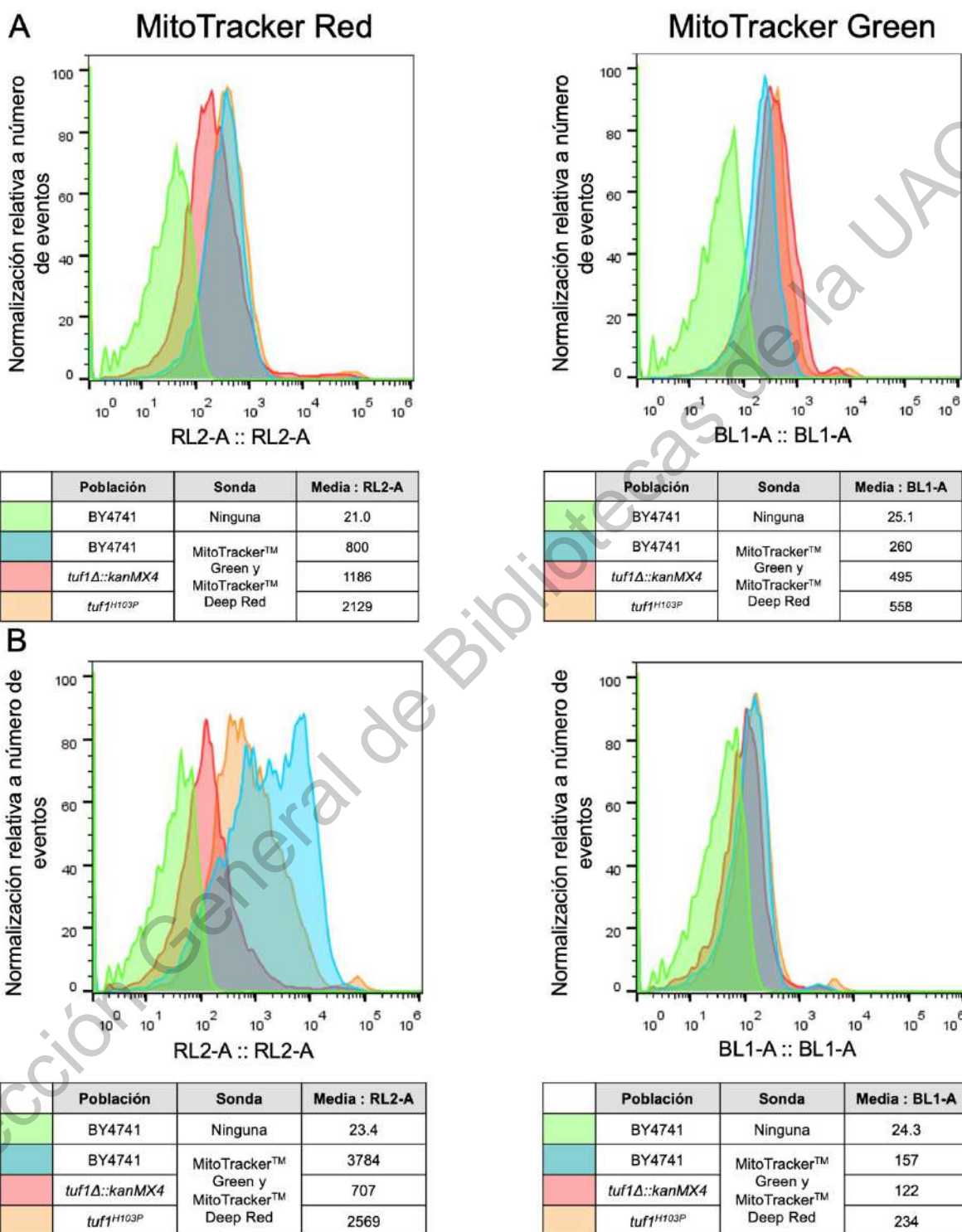


Figura 26. Histogramas de fluorescencia. En la columna de la izquierda se observa la fluorescencia de la sonda MitoTracker Red captada por RL2, y en la derecha de MitoTracker Green captada por BL1. (A) El medio de incubación fue YPD y en (B) fue YPG.

6. DISCUSIÓN

El avance en las tecnologías de secuenciación ha permitido, entre otras cosas, la identificación de variantes genéticas causantes de enfermedad. Específicamente, su aplicación para el diagnóstico de EMs ha sido de gran ayuda para descubrir mutaciones involucradas en dichas patologías, sin embargo los tratamientos siguen siendo aún limitados. El entender cómo mutaciones específicas promueven el desarrollo de una EM es vital para proveer tratamientos efectivos.

Dado que las EMs afectan principalmente a las mitocondrias, su estudio en organismos eucarióticos pluricelulares es limitado debido a su dependencia energética por este organelo. Para sobrepasar estas limitaciones, se ha explotado a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para el estudio de mutaciones involucradas en EMs y su relación con la bioenergética mitocondrial de crecer aún en ausencia de mitocondrias a través de la glucosa.

De las cinco mutaciones identificadas en el gen *TUFM* como causantes de EMs sólo se ha reportado que dos de ellas tienen un efecto negativo en el crecimiento de *S. cerevisiae*. Dada la importancia de EF-Tu como factor de elongación para el funcionamiento mitocondrial, nuestro objetivo fue determinar el efecto de la nueva mutación identificada en dicho gen, c.A308C (p. His103Pro) sobre fuentes de carbono fermentables y no fermentables, usando a *S. cerevisiae* como modelo de estudio (Valente y col., 2007; Wortmann y col., 2015; Kohda y col., 2016; Di Nottia y col., 2017; Hershkovitz y col., 2019).

Para analizar el fenotipo de las mutaciones se evaluó el crecimiento de la mutante nula *tuf1Δ::kanMX4* y puntual *tuf1^{H103P}* en comparación con la cepa silvestre BY4741. En la mutante nula se reemplazó el gen *TUF1* mediante recombinación homóloga con un módulo de resistencia a geneticina, obteniendo tres transformantes. Para construir la mutante puntual se usó la endonucleasa Cas9, acoplada al ARNGs, para inducir un corte de doble cadena cerca del nucleótido a mutar, reparando el daño con una molécula de reemplazo que contenía un cambio en la posición 308 y otro en la posición 312. Aunque las mutaciones puntuales obtenidas mediante el sistema

CRISPR-Cas9 se verificaron por secuenciación Sanger, no podemos excluir la posibilidad de que los fenotipos reportados en este trabajo pudieran estar relacionados con cortes inespecíficos de la endonucleasa en loci no analizados. La secuenciación del genoma completo de dicha mutante y análisis bioinformáticos, así como una complementación clonando el gen silvestre en un plásmido, nos permitirían identificar posibles ediciones no deseadas así.

Una vez que las mutantes fueron obtenidas, se evaluaron las mutaciones con respecto a la cepa silvestre empleando dos medios con diferentes fuentes de carbono. Cuando las células fueron cultivadas en medio YPD (metabolismo fermentativo), tanto en la medición manual como en la automatizada, la mutante nula *tuf1Δ::kanMX4* presentó una disminución en la capacidad de utilizar esta fuente de carbono para dividirse, mientras que la mutante puntual *tuf1^{H103P}* tuvo un crecimiento muy similar a BY4741 (Figura 21). Por otro lado, cuando fueron cultivadas en medio YPG (metabolismo respiratorio) durante la medición manual, la cepa puntual presentó un crecimiento reducido usando glicerol como fuente de carbono, comparada con la cepa silvestre, posiblemente por una modificación en el metabolismo de una fuente de carbono no fermentable.

Usando los parámetros de crecimiento, se comprobó que la disminución en el crecimiento de la mutante *tuf1Δ::kanMX4* en medio YPD fue por un aumento en el tiempo de duplicación y disminución en la velocidad específica de crecimiento (2.340 ± 0.066 h y 0.296 ± 0.008 h⁻¹, respectivamente) en relación a la cepa silvestre, cambios estadísticamente significativos (P=0.002 y P=0.005, respectivamente). Entre la mutante *tuf1^{H103P}* y el tipo silvestre los cambios no fueron significativos (P=0.710 para el tiempo de duplicación y P=0.665 para la velocidad). Por otro lado, dada la similitud de crecimiento entre la mutante puntual y BY4741, también hubo un cambio significativo en estos parámetros de crecimiento entre *tuf1^{H103P}* y *tuf1Δ::kanMX4* (P<0.001 para ambos parámetros).

Durante el metabolismo respiratorio, reportamos dos tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento para la mutante *tuf1Δ::kanMX4*, los cuales

relacionan la presencia o ausencia de moléculas de glucosa presentes por las faltas de lavado. Durante la utilización de glucosa (0 – 14 h; Cuadro 21), los parámetros fueron similares a aquellos obtenidos en un medio suplementado completamente con glucosa y únicamente hubo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el tipo silvestre ($P < 0.001$ para el tiempo de duplicación y $P = 0.002$ para la velocidad). Al terminarse la glucosa y tener que usar tanto el glicerol suplementado como el etanol (resultado de la glucólisis de hexosa) las células presentaron un aumento en el tiempo de generación y velocidad. Dado que los cultivos de las mediciones manuales contenían glucosa, es necesario especificar que los parámetros de crecimiento podrían ser diferentes a los reales.

El glicerol es una molécula que al entrar a la célula a través de un simportador glicerol/ H^+ ubicado en la membrana citoplasmática es fosforilado a glicerol-3-fosfato, el cual se transloca a la mitocondria para ser oxidado a dihidroxiacetona fosfato y ser usada para la glucólisis; los electrones obtenidos reducen FAD^+ a $FADH_2$, poder reductor usado en el transporte de electrones de la cadena respiratoria. Se ha reportado que mutantes nulas de *TUF1* presentan defectos en crecimiento en condiciones respiratorias, por ello, se esperaba que la mutante nula *tuf1 Δ ::kanMX4* no creciera en YPG dada la posible ausencia de actividad mitocondrial por la eliminación del factor de elongación EF-Tu necesario para la traducción mitocondrial. Sin embargo, en la medición manual hubo un ligero aumento en la densidad óptica resultado de no lavar los pre-cultivos previos a la inoculación en medio con glicerol, generando que estas mutantes usaran la glucosa disponible en el medio como fuente de carbono durante 14 horas, no habiendo aumento en la densidad óptica una vez que la hexosa se terminó (Figura 22). Esta mutante no presentó crecimiento durante 20 horas en la medición automatizada, por la realización de lavados previos, de acuerdo con la incapacidad de usar fuentes de carbono no fermentables por parte de las mutantes petite (Valente y col., 2007; Montanari y col., 2013; Di Nottia y col., 2017; Xiberras y col., 2019;).

La mutante *tuf1^{H103P}* tuvo un crecimiento particular en el medio de cultivo YPG. Durante las mediciones manuales, presentó una fase de latencia de 22 horas,

seguido de un crecimiento exponencial, el cual no se reportó en la medición automatizada, realizada durante 20 horas, posiblemente porque el tiempo de medición no fue el suficiente para que las células llegaran a una fase exponencial. Adicionalmente, se debe tomar en cuenta que esta fase se presentó con anticipación en la medición manual dada la presencia de algunas moléculas de glucosa que pudieran haber estado presentes en el medio. Los fenotipos obtenidos en las curvas de crecimiento en YPG son similares a las obtenidas en otras fuentes de carbono no fermentables durante 20 horas (Figura 23). Finalmente, esta mutante presentó un menor tiempo de generación y una mayor velocidad de crecimiento que el tipo silvestre por razones que se desconocen, sin embargo solamente el primer parámetro fue estadísticamente significativo ($P=.006$ y $P=.07$, respectivamente).

Estos resultados son similares a los obtenidos en el ensayo spot. Se pudo comprobar que tanto BY4741 como la mutante *tuf1^{H103P}* presentaron un crecimiento similar en YPD mientras que *tuf1Δ::kanMX4* creció lentamente, con colonias visibles 48 horas después del plaqueo y con un fenotipo petite. Por otro lado, usando una fuente de carbono no fermentable como el glicerol, *tuf1Δ::kanMX4* no presentó crecimiento como se anticipaba; 48 horas después hubieron colonias visibles de la cepa BY4741 y ligeramente visibles para *tuf1^{H103P}* sin embargo 72 horas después se apreciaron claramente, ambas con el fenotipo petite.

EF-Tu es una proteína necesaria para la traducción de ARNm provenientes del ADNmt, entre ellos los mensajeros que codifican para las subunidades de los complejos respiratorios I, III, IV y V (en *S. cerevisiae* el ADNmt no cuenta con secuencias codificantes para subunidades del complejo I), necesarios para el transporte de electrones, fuerza protón motriz y la generación de ATP mediante la reducción de oxígeno molecular a agua. El efecto de eliminar *TUF1* ocasiona que la célula no cuente con un transporte de electrones, debido a que no hay una transcripción ni traducción de las subunidades de los complejos respiratorios. Esto genera que la célula sea incapaz de utilizar el glicerol, el cual participa en una reacción de oxidación en la membrana mitocondrial interna (Couvillon y col., 2016; Ott y col., 2016; Xiberras y col., 2019).

Por otro lado, aunque la mutación puntual presentó una deficiencia en el crecimiento oxidativo – debido al tiempo que le tomó formar colonias en medio con glicerol –, la mutante creció, posiblemente por una funcionalidad residual en el dominio de unión a GTP/GDP/Mg²⁺. Asimismo, la cantidad de proteína necesaria para tener una función más allá del requerimiento basal podría jugar un papel importante en la viabilidad de *tuf1*^{H103P}. Nuestros resultados son similares a los de Valente y colaboradores en 2007, y Di Nottia y colaboradores en 2017, quienes analizaron mutaciones encontradas en el dominio II de *TUFM* en pacientes diagnosticados con EM. Di Nottia y colaboradores estudiaron el efecto de la transición c.G964A (p.G322R) usando una mutante deficiente en *TUF1* transformada con un plásmido centromérico y uno episomal, los cuales contenían la mutación equivalente en la levadura, habiendo sólo crecimiento de dicha mutante cuando las células fueron transformadas con el plásmido episomal.

El potencial de membrana mitocondrial es una característica de la función mitocondrial que surge del movimiento de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, así como de la energía que se acumula por el transporte de electrones por parte de los complejos respiratorios haciendo que la matriz esté cargada negativamente. Esta energía es usada por la ATP sintasa para promover un flujo de protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, generando la síntesis de ATP, a partir de ADP, durante el proceso. Debido a la importancia del potencial de membrana mitocondrial en la generación de energía, así como en la regulación de Ca²⁺ y el importe de moléculas para la síntesis de diferentes productos, se puede considerar como un indicador de actividad (y posiblemente de “salud”) mitocondrial (Zorova y col., 2018).

La detección del potencial de membrana mitocondrial se puede estudiar mediante sondas fluorescentes, ya sea por citometría de flujo y/o microscopía. Estos fluoróforos pueden ser estructurales, si tiñen a la mitocondria independientemente de un cambio en el potencial mitocondrial, mientras que se consideran funcionales si su fluorescencia depende del potencial. Las sondas convencionales tienden a ser removidas después de ciertos lavados, afectando la interpretación de resultados;

como alternativas, los colorantes MitoTracker contienen grupos clorometil que reaccionan con grupos tiol libres encontrados en las proteínas mitocondriales, haciendo que se mantengan asociados al organelo, incluso después de ciertas fijaciones necesarias para microscopía. Específicamente, MitoTracker Green es considerado un colorante estructural mientras que MitoTracker Deep Red es uno funcional. Por su estructura, son compuestos lipofílicos capaces de atravesar las membranas celulares y al ser catiónicos tienen una alta especificidad por el ambiente reductor en este organelo (Cottet-Rousselle y col., 2011).

Por la importancia del potencial de membrana mitocondrial sobre la homeostasis y viabilidad celular y la disponibilidad de sondas para estudiar este fenómeno, se tiñeron cultivos celulares de BY4741 y de las mutantes incubadas en medios de cultivo YPD y YPG. En condiciones fermentativas, el potencial de membrana (cuantificado con MitoTracker Deep Red) fue similar entre la cepa silvestre y *tuf1^{H103P}* por el empalme de los histogramas, respaldando el comportamiento de crecimiento entre ambas poblaciones, mientras que el potencial disminuyó en la mutante *tuf1Δ::kanMX4*. Al cambiar a una fuente de carbono estrictamente respiratoria, el potencial incrementó en la cepa silvestre y en la mutante puntual ya que es necesario un aumento en la actividad mitocondrial para la obtención de ATP mediante la cadena de transporte de electrones (respiración). Esto se logra por un incremento en la transcripción de las proteínas que forman parte de los complejos respiratorios, necesarias para la oxidación de esta molécula. Por otro lado, en la mutante deficiente en *TUF1* el potencial mitocondrial disminuyó, revelando un efecto negativo en la mitocondria, posiblemente por la falta del importe de proteínas a la mitocondrias necesarias para la función mitocondrial, entre ellas EF-Tu. Basados en estos resultados podemos afirmar que el cambio de nucleótido afecta, aunque en menor cantidad que la delección del gen, la función mitocondrial (Couvillon y col., 2016; May y col., 2020).

El volumen mitocondrial fue analizado con MitoTracker Green. En este trabajo, en ambos medios de cultivo los resultados fueron similares entre las tres poblaciones aunque se obtuvo ligeramente menor fluorescencia de la cepa silvestre y de

tuf1Δ::kanMX4 en YPD y YPG, respectivamente. Se sabe que las células eliminan a las mitocondrias viejas y a aquellas con falla mitocondrial; en este último escenario, se puede presentar un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, comprometiendo la viabilidad celular. Las mitocondrias se degradan por un proceso conocido como autofagia; específicamente, la eliminación de estos organelos por autofagia se denomina mitofagia. Los resultados obtenidos con esta sonda son un tanto inesperados puesto que se anticiparía que el volumen mitocondrial disminuyera en la mutante nula ya que teóricamente las mitocondrias *tuf1Δ::kanMX4* tendrían que ser eliminadas para evitar la muerte de las levaduras. Sin embargo en medio de cultivo YPD el volumen es mayor al tipo silvestre, posiblemente al no haber disminución en el número de mitocondrias (Villanueva y col., 2018; Lin y col., 2020).

Debido a lo anterior, nos preguntamos, ¿por qué la mitofagia no estaría funcionando en la mutante nula? Una hipótesis radica en el propio proceso mitofágico. PINK1 es una serina/treonina quinasa que en condiciones de homeostasis es degradada en el espacio intermembranal mitocondrial. Cuando las mitocondrias fallan, hay un cambio en el potencial de membrana, lo cual provoca la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial externa, reclutando y fosforilando a Parkin, una ligasa de ubiquitina. La interacción PINK1/Parkin promueve la transferencia de ubiquitinas a las proteínas mitocondriales haciendo que puedan ser fagocitadas y eliminadas de la célula (Villanueva y col., 2018; Lin y col., 2020).

En 2011, se descubrió que EF-Tu interactúa directamente con PINK1. Curiosamente, en un estudio recién publicado por Lin y colaboradores se demostró, por primera vez, la función de EF-Tu como una proteína que promueve y regula la mitofagia mediante la interacción con PINK1. Aunque este descubrimiento se describió en *D. melanogaster* y células HeLa, esta nueva actividad proteica podría estar conservada hasta la levadura y posiblemente es la razón por la cual se ve fluorescencia en la mutante nula. En medio de cultivo YPG, pese a que esta mutante no puede usar dicha fuente de carbono y el potencial de membrana es bajo, se detectó fluorescencia, debido a la cantidad de células provenientes del pre-cultivo en YPD (Rakovic y col., 2011; Villanueva y col., 2018; Lin y col., 2020).

En medio de cultivo YPD, la mutante puntual tuvo un mayor volumen mitocondrial que la cepa silvestre, sin embargo ambas presentaron un potencial de membrana muy semejante. La relación de estos resultados se desconoce aunque posiblemente la célula podría estar promoviendo la fisión de nuevas mitocondrias para contrarrestar los efectos de la mutación puntual. Por otro lado, en glicerol el volumen mitocondrial entre ambos grupos fue similar mientras que el potencial mayor en la cepa silvestre. Tomando en cuenta estos resultados podríamos concluir que no hay una relación entre volumen y la funcionalidad mitocondrial.

Aunque las evidencias presentadas en este trabajo muestran un efecto negativo de la mutante *tuf1^{H103P}* sobre el crecimiento y actividad mitocondrial de *S. cerevisiae*, menos severo que la eliminación de *TUF1*, nuestro trabajo alberga ciertas limitaciones. Es necesario evaluar la complementariedad de introducir la copia silvestre de *TUF1* en la mutante *tuf1Δ::kanMX4* para asegurar un restablecimiento de la actividad mitocondrial y del fenotipo celular.

Estudiar por qué la cepa *tuf1^{H103P}* tiene una fase de latencia muy grande en un medio respiratorio es esencial para entender la adaptación de dicha mutante. Por los resultados de Di Nottia y colaboradores se puede hipotetizar que es necesaria una cantidad específica mínima de proteína mutada para que las células puedan crecer en un ambiente respiratorio. Una ralentización de la translocación de la proteína a la mitocondria podría provocar un incremento en la fase de latencia sin embargo esta teoría es menos válida ya que en los resultados de secuenciación de *TUF1*, después de editar mediante CRISPR-Cas9, sólo se encontraron los cambios de nucleótidos esperados, sin ediciones en la secuencia del péptido señal. Dentro de las hipótesis más probables son 1. un decremento en la tasa de producción de las subunidades de los complejos respiratorios codificados por el ADNmt y 2. un defecto en la segregación de mitocondrias durante la gemación de *S. cerevisiae* (MacInnes y col., 2013; Di Nottia y col., 2017).

En un medio con glucosa, los genes asociados a respiración en levadura son inhibidos, pero al pasar ambiente no fermentativo (por ende, de respiración) se

necesita inducir su transcripción para adaptarse a un nuevo medio. Cuando las células están en un estado silvestre, esta adaptación tiende a ser un poco larga y previos estudios han demostrado que mutantes con deficiencia respiratoria tienen fases de latencia aún más largas (en comparación al tipo silvestre) cuando necesitan activar la respiración. En específico, se ha correlacionado este incremento con una disminución en los niveles de las subunidades de los complejos III y IV – *ambos codificados por el ADNmt* –. Asimismo, se ha comprobado que el tiempo de adaptación depende del tiempo de incubación en el medio inicial; por ejemplo, células que crecen en glucosa por 12 horas o más, presentan fases de latencia más largas que las células que crecieron menos tiempo en el mismo medio. Para alcanzar una densidad celular necesaria para las curvas de crecimiento manuales y el ensayo spot, los pre-cultivos se crecieron por aproximadamente 12 horas, lo cual pudo influir en una fase de adaptación larga en la mutante *tuf1^{H103P}* cuando la células se transfirieron a medio con glicerol. Para determinar si este factor es clave en el fenotipo adaptativo los pre-cultivos podrían cambiarse a un ambiente respiratorio 6 horas después de la inoculación inicial (Couvillon y col., 2016; Cerulus y col., 2018; Perez-Samper y col., 2018).

De igual manera, un estudio ha demostrado que la serina es un aminoácido importante en la transcripción mitocondrial cuando células de levadura, provenientes de un crecimiento fermentativo, necesitan adaptarse a un crecimiento respiratorio; la producción de este aminoácido para satisfacer las necesidades metabólicas de la levadura se obtiene por la degradación de proteínas, mediada por la inducción de autofagia. Del mismo modo, se tiene evidencia que la transferencia de levaduras de glucosa a glicerol genera que las mitocondrias adaptadas a un ambiente fermentativo no sean directamente heredadas las células hijas por el estado oxidativo en el que se encuentran, restaurando dicha transferencia de organelos entre células madre-hija una vez que las mitocondrias se encuentran en un estado reductivo (MacInnes y col., 2013; May y col., 2020).

Dado el rol de EF-Tu en la traducción mitocondrial, es posible que una reducción de las proteínas de los complejos respiratorios sea la causa por la cual las células

necesitan más tiempo para adaptarse a glicerol por una disminución en la actividad proteica. En consecuencia, habría un incremento en el potencial de membrana mitocondrial y un cambio en el ambiente mitocondrial una vez que los niveles de las subunidades respiratorias superan un límite basal. Adicionalmente, una desregulación en la producción de serina podría estar involucrada en la fase de latencia larga, sin embargo se desconoce si EF-Tu participa en procesos de autofagia diferentes a la mitofagia.

Otro aspecto a considerar son las sondas MitoTracker empleadas. Se ha comprobado que tienen una especificidad por las proteínas mitocondriales, especialmente por aquellas con grupos tioles libres y aunque el MitoTracker Green se considera insensible al potencial de membrana mitocondrial, existen reportes contradictorios sobre su relación con dicho proceso biológico. Adicionalmente, esa sonda se acumula en la membrana mitocondrial interna lo cual podría generar resultados variables ya que la fluorescencia percibida cuantificaría más el volumen mitocondrial interno que el volumen mitocondrial total; esto es importante ya que estudios previos corroboran que la membrana mitocondrial interna varía dependiendo de la especie y de transiciones metabólicas que podría estar sufriendo una célula en un momento determinado. Para evitar resultados inespecíficos, se podría comparar la fluorescencia de las sondas con agentes desacopladores (Keij y col., 2000; Presley y col., 2003; Pendergrass y col., 2003; Mannella, 2006; Cottet-Rousselle y col., 2011; Dong y col., 2013).

En conclusión, en el presente trabajo se comprobó que la mutación puntual c.308A>C del gen *TUF1* sí tuvo un efecto en la función mitocondrial de la levadura y que este fue menor que la delección del gen completo. No obstante es necesario comprobar la posible existencia de ediciones inespecíficas de Cas9 así como indagar en la fase de latencia de la mutante mediante proteínas de fusión, curvas de crecimiento con un pre-cultivo menor a 12 horas, evaluación de la forma, la segregación y autofagia de mitocondrias así como la complementariedad de *TUF1* en la mutante nula.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el efecto de una mutación encontrada en un paciente diagnosticado con una EM, usando a la levadura como modelo de estudio, mediante de la generación de una mutante nula y una mutante con la transversión usando técnicas de ingeniería genética.

Se encontró que la mutación potencial afectó el crecimiento de la levadura cuando se usa la respiración, sin embargo el efecto fue menor a aquel percibido por la mutante nula. El cambio en la tasa de crecimiento de la mutante puntual con respecto a la cepa parental fue causado por una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, necesario para la generación de ATP por los complejos respiratorios.

Los resultados obtenidos a partir de este trabajo sentarán las bases para entender los mecanismos detrás de un incremento en el tiempo de adaptación de la mutante puntual cuando las levaduras son transferidas de un medio fermentable a uno no fermentable (respiratorio).

8. REFERENCIAS

Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. Essential cell biology. 5ta. Edición. Nueva York: W. W. Norton & Company, **2019**:864.

Allen J. Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: colocation for redox regulation of gene expression. Proc Natl Acad Sci USA **2015**;112:10231-10238.

Anderson S, Bankier A, Barrell B, de Bruijn H, Coulson A, Drouin J, Eperon I, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Staden R, Young I. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature **1981**;290:457–465.

Barrientos A. Yeast models of human mitochondrial diseases. IUBMB Life **2003**;55:83-95.

Berardo A, Musumeci O, Toscano A. Cardiological manifestations of mitochondrial respiratory chain disorders. Acta Myol **2011**;30:9-15.

Berchtold H, Reshetnikova L, Reiser C, Schirmer N, Sprinzl M, Hilgenfeld R. Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. Nature **1993**;365:126-132.

BioRender. [serie en internet] 2017 [consultado 2020 junio 29]; [aprox. 2 pp]. Disponible en: <https://biorender.com/>

Boguszewska K, Szewczuk M, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski B. The similarities between human mitochondria and bacteria in the context of structure, genome, and base excision repair system. Molecules. **2020**;25:2857-2887.

Burnett B, Altman R, Ferrao R, Alejo J, Kaur N, Kanji J. Elongation factor Ts directly facilitates the formation and disassembly of the *Escherichia coli* elongation factor Tu-GTP-aminoacyl-tRNA ternary complex. J Biol Chem **2013**;288:13917-13928.

Cerulus B, Jariani A, Perez-Samper G, Vermeersch L, Pietsch J, Crane M, New A, Gallone B, Roncoroni M, Dzialo M, Govers S, Hendrickx J, Galle E, Coomans M, Berden P, Verbandt S, Swain P, Verstrepen K. Transition between fermentation and respiration determines history-dependent behavior in fluctuating carbon sources. *Elife* **2018**;7:e39234.

Chen D, Yang B, Kuo T. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* **1992**;21:83–84.

Chen Z, Zhang F, Xu H. Human mitochondrial DNA diseases and *Drosophila* models. *J Genet Genomics* **2019**;46:201-212.

Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol J. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* **2011**;79:405-425.

Couvillon M, Soto I, Shipkovenska G, Churchman L. Synchronized mitochondrial and cytosolic translational programs. *Nature* **2016**;533:499-503.

Craven L, Alston C, Taylor R, Turnbull D. Recent advances in mitochondrial disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2017**;18:257-275.

Day M. Yeast petites and small colony variants: for everything there is a season. *Adv Appl Microbiol* **2013**;85:1-41.

DiMauro S. A history of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis* **2011**;34:261-276.

DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo C. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* **1985**;17:521–538.

DiMauro S, Schon A. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* **2003**;348: 2656-68.

Di Nottia M, Montanari A, Verrigni D, Oliva R, Torraco A, Fernandez-Vizarra E, Diodato D, Rizza T, Bianchi M, Catteruccia M, Zeviani M, Dionisi-Vici C, Francisci S,

Bertini E, Carrozzo R. Novel mutation in mitochondrial elongation factor EF-Tu associated to dysplastic leukoencephalopathy and defective mitochondrial DNA translation. *Biochim Biophys Acta* **2017**;1863:961-967.

Dong H, Cheung S, Liang Y, Wang B, Ramalingam R, Wang P, Sun H, Cheng S, Lam Y. "Stainomics": identification of mitotracker labeled proteins in mammalian cells. *Electrophoresis* **2013**;34:1957-1964.

Dujon B. Basic principles of yeast genomics, a personal recollection. *FEMS Yeast Res* **2015**;15:fov047.

Engel W, Cunningham C. Rapid examination of muscle tissue: an improved trichrome stain method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* **1963**;13:919-923.

Freel K, Friedrich A, Schacherer J. Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view. *FEMS Yeast Res* **2015**;15:fov023.

Fourey F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **1998**;440:325-331.

Gorman G, Chinnery P, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A, Thorburn D, Zeviani M, Turnbull D. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primer* **2016** Oct 20;2:16080.

Gorman G, Schaefer A, Ng Y, Gomez N, Blakely E, Alston C, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery P, Taylor R, Turnbull D, McFarland R. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* **2015** May;77:753-759.

Hershkovitz T, Kurolap A, Gonzaga-Jauregui C, Paperna T, Mory A, Wolf S, Regeneron Genetics Center, Overton J, Shuldiner A, Saada A, Mandel H, Feldman H. A novel *TUFM* homozygous variant in a child with mitochondrial cardiomyopathy expands the phenotype of combined oxidative phosphorylation deficiency 4. *J Hum Genet* **2019**;64:589-595.

Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev **1988**;52:536-553.

Holt I, Harding A, Petty R, Morgan J. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. Am J Hum Genet **1990**;46:428–433.

Jiang F, Doudna J. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. Annu Rev Biophys **2017**;46:505-529.

Keij J, Bell-Prince C, Steinkamp J. Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. Cytometry **2000**;39:203-210.

Kirkinezos I, Moraes C. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Semin Cell Dev Bio **2001**;12:449-457

Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y. A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. PLoS Genet **2016**;12:1-31.

Knorre D, Sokolov S, Zyrina A, Severin F. How do yeast sense mitochondrial dysfunction? Microbial Cell **2016**;3:532-539.

Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. BMC Biol **2015**;19:89.

Laughery M, Hunte T, Brown A, Hoopes J, Ostbye T, Shumaker T, Wyrick J. New vectors for simple and streamlined CRISPR–Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **2015**;32:711–720.

Legati A, Reyes A, Nasca A, Invernizzi F, Lamantea E, Tiranti V, Garavaglia B, Lamperti C, Ardisson A, Moroni I, Robinson A, Ghezzi D, Zeviani M. New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. Biochim Biophys Acta **2016**;1857:1326-1335.

Lightowers R, Taylor R, Tumbull D. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science* **2015**;349:1494-1499.

Lin J, Chen K, Chen W, Yao Y, Ni S, Ye M, Zhuang G, Hu M, Gao J, Gao C, Liu Y, Yang M, Zhang Z, Zhang X, Huang J, Chen F, Sun L, Zhang X, Yu S, Chen Y, Jiang Y, Wang S, Yang X, Liu K, Zhou H, Deng H, Hague M, Li J, Mi L, Li Y, Yang Y. Paradoxical mitophagy regulation by PINK1 and TUFm. *Mol Cell* **2020**;80:607-620.

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* **1962**;41:1776-1804.

MacInnes J, Rehders M, McFaline-Figueroa J, Brix K, Pon L, Nevoigt E. Defects in mitochondrial distribution during the prolonged lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* preceding growth in glycerol as the sole source of carbon. *FEMS Yeast Res* **2013**;13:706-710.

Madigan M, Bender K, Buckley D, Sattley M, Stahl D. Brock biology of microorganisms. 15a. edición. Londres: Pearson, **2017**:375.

Makovets, S. Basic DNA electrophoresis in molecular cloning: a comprehensive guide for beginners. En: Makovets, SA, Ed. DNA electrophoresis methods and protocols. Nueva York: Editorial Humana Press de Springer Science+Business Media, **2013**;vol1054:15-19.

Malina C, Larsson C, Nielsen J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Res* **2018**;18.

Mannella C. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* **2006**;1762:140-147.

May A, Prescott M, Ohsumi Y. Autophagy facilitates adaptation of budding yeast to respiratory growth by recycling serine for one-carbon metabolism. *Nat Commun* **2020**;11:5052.

Mayr J, Haack T, Graf E, Zimmermann F, Wieland T, Haberberger B, Superti-Furga A, Kirschner J, Steinmann B, Baumgartner M, Moroni I, Lamantea E, Zeviani M, Rodenburg R, Smeitink J, Strom T, Meitinger T, Sperl W, Prokisch H. Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *Am J Hum Genet* **2012**;90:314-320.

Montanari A, Zhou Y, D'Orsi M, Bolotin-Fukuhara, Frontali L, Francisci S. Analyzing the suppression of respiratory defects in the yeast model of human mitochondrial tRNA diseases. *Gene* **2013**;527:1-9.

NCBI. *Homo sapiens* Tu translation elongation factor mitochondrial (*TUFM*), RefSeqGene on chromosome 16; nuclear gene for mitochondrial product [serie en internet] 2012 [consultado 2020 abril 18]; [aprox. 5 pp]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_008964.1.

Nesbitt V, Alston C, Blakely E. A national perspective on prenatal testing for mitochondrial disease. *Eur J Hum Genet* **2014**;22:1255-1259.

Ng Y, Turnbull D. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol* **2016**;263:179-191.

Niyazov D, Kahler S, Frye R. Primary mitochondrial disease and secondary mitochondrial dysfunction: importance of distinction for diagnosis and treatment. *Mol Syndromol* **2016**;7:122-37.

Ott M, Amunts A, Brown A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem* **2016**;85:77-101.

Parikh S, Goldstein A, Koenig M, Scaglia F, Enns G, Saneto R, Anselm I, Cohen B, Falk M, Greene C, Gropman A, Haas R, Hirano M, Morgan P, Sims K, Tarnopolsky

M, Van Hove J, Wolfe L, DiMauro S. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the mitochondrial medicine society. *Genet Med* 2015 Sep;17:689-701.

Pendergrass W, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 2004;61:162-169.

Perez-Samper G, Cerulus B, Jariani A, Vermeersch L, Simancas N, Bisschops M, van den Brink J, Solis-Escalante D, Gallone B, De Maeyer D, van Bael E, Wenseleers T, Michiels J, Marchal K, Daran-Lapujade P, Verstrepen K. The crabtree effect shapes the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase during the switch between different carbon sources. *mBio* 2018;9:e01331

Presley A, Fuller K, Arriaga E. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;793:141-150.

Rakovic A, Grümewald A, Voges L, Hofmann S, Orolicki S, Lohmann K, Klein C. PINK1-interacting proteins: proteomic analysis of overexpressed PINK1. *Parkinsons Dis* 2011;153979.

Rodríguez-Rodríguez D, Ramírez-Solís R, Garza-Elizondo M, Garza-Rodríguez M, Barrera-Saldaña H. Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (review). *Int J Mol Med* 2019;43:1559-1574.

Saccharomyces Genome Database. *TUF1* / YOR187W overview [serie en internet] 2012 [consultado 2020 abril 18]; [aprox. 7 pp]. Disponible en: <https://www.yeastgenome.org/locus/S000005713>

Sallevelt S, Dreesen, J, Drüsedau M, Hellebrekers D, Paulussen A, Coonen E, Die-Smulders C. PGD for the m.14487 T>C mitochondrial DNA mutation resulted in the birth of a healthy boy. *Human Reprod* 2017;32:698-703.

Scarpelli M, Todeschini A, Volonghi I, Padovani A, Filosto M. Mitochondrial diseases: advances and issues. *Appl Clin Genet* **2017**;10:21-26.

Sia R, Urbonas B, Sia E. Effects of ploidy, growth conditions and the mitochondrial nucleoid-associated protein Iiv5p on the rate of mutation of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **2003**;44:26-37.

Stovicek V, Hohenbrink C, Borodina I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. *FEMS Yeast Res* **2017**;1;17:fox030.

Taylor R, Turnbull D. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* **2005**;6:389-402.

Turcotte B, Liang X, Robert F, Soontornngun N. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* **2010**;10:2-13.

UniprotKB. P49411 (EFTU_HUMAN) [serie en internet] 2012 [consultado 2020 abril 18]; [aprox. 9 pp]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P49411>

Valente L, Tiranti V, Marsano R, Malfatti E, Fernandez-Vizarra E, Donnini C, Mereghetti P, De Gioia L, Burlina A, Castellan C, Comi G, Savasta S, Ferrero I, Zeviani M. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* **2007**;80:44-58.

Villanueva M, Cotán D, Cordero M, Garrido J, Oropesa-Ávila M, De la Mata M, et al. Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection and aging. Nueva Jersey: Academic Press, **2018**;vol.8:155-172.

Wallace D. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **1999**;283:1482-1488.

Wallace D, Singh G, Lott M, Hodge J, Schurr T, Lezza A. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **1988**;242:1427-1430.

Wilson D. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol* **2017**;595:7023-7038.

Witzany, G. Serial endosymbiotic theory (Set): the biosemiotic update. *Acta Biotheor* **2006**;54:103-117.

Wortmann S, Koolen D, Smeitink J, van de Heuvel L, Rodenburg R. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inherit Metab Dis* **2015**;38:437-443

Wu Y, Chen M, Jiang J. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. *Mitochondrion* **2019**;49:35-45.

Xiberras J, Klein M, Nevoigt E. Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this 'non-fermentable' carbon source. *Biotechnol Adv* **2019**;37:107378.

Xu H, DeLuca S, O'Farrell P. Manipulating the metazoan mitochondrial genome with targeted restriction enzymes. *Science* **2008**;321:575-7.

Zhang P, Lehmann B, Samuels D, Zhao S, Zhao Y, Shyr Y, Guo Y. Estimating relative mitochondrial DNA copy number using high throughput sequencing data. *Genomics* **2017**;109:457-462.

Zorova L, Popkov V, Plotnikov E, Silachev D, Pevzner I, Jankauskas S, Babenko V, Zorov S, Balakireva A, Juhaszova M, Sollot S, Zorov D. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* **2018**;552:50-59.

Zymo research. 5-Fluoroorotic Acid (5-FOA). Zymo research [serie en internet] 2017 [consultado 2017 febrero 20]; [aprox. 1 pp]. Disponible en: <http://www.zymoresearch.com/buffers-solutions/chemicals/5-fluoroorotic-acid-5-foa>

ANEXOS

Dictamen del comité de bioética.

C.U., Querétaro, 31 de agosto de 2020
No. de oficio. CBQ20/099

Dra. Lucía G. Morales Reyes
Facultad de Química
Presente

At'n. Luis Enrique Dávila Juárez y José Héctor Gibrán Fritz García

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado "**Efecto de la mutación puntual c.309A>C del gen *TUF1* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae***", del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente

M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Representante investigador

Ccp archivo