

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Aplicación de técnicas de genética molecular  
y citometría de flujo para estudiar el  
envejecimiento celular de *Saccharomyces  
cerevisiae*

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Carolina do Pazo – 165302

Tutor: Pablo Aguilar

2014

# DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Carolina do Pazo, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Pudiendo asegurar que:

La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de grado;

Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;

Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;

En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;

Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;

Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. do Pazo', enclosed in a light blue rectangular box.

Carolina do Pazo

12 de Marzo, 2014.

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a todas las personas e instituciones que han contribuido en mi formación:

- A Pablo Aguilar por ayudarme a desarrollar este proyecto, darme la oportunidad y guiarme para llevarlo a cabo.
- A Cristián Favre por su ayuda en la discusión de resultados y el aporte tanto de información como de material para realizar el proyecto.
- A toda la Unidad de Biología Celular de Membranas, en especial a Valentina Salzman por la ayuda con el citometro de flujo y a Natalia Carbo por la ayuda con el análisis de imágenes de microscopía.
- A Marcela Díaz por la ayuda con el microscopio de epifluorescencia.
- A Sabina Victoria y a Valentina Porro de la Unidad de Biología Celular por la ayuda con el citometro de flujo.
- Al Institut Pasteur de Montevideo por permitirme usar de sus instalaciones para el desarrollo de mi trabajo y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por brindarme un apoyo financiero.

Además, me gustaría agradecer a todas las personas que han sido mi soporte emocional durante todo el periodo del trabajo:

- A mis padres y hermanos, que siempre me han apoyado desde comienzo de la carrera.
- A mis amigas, en especial a Natalia.

## ABSTRACT

Los eisosomas son grandes ensamblajes proteicos citoplasmáticos que organizan dominios de la membrana plasmática. Están compuestos principalmente por miles de copias de dos proteínas parálogas, Pil1 y Lsp1, constituyendo el núcleo estructural. Muchos estudios apuntan evidencias a que estas estructuras podrían estar implicadas en el envejecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que es de gran importancia su estudio ya que dicho proceso es uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad.

Por esta razón, el entendiendo de los fundamentos moleculares y las alteraciones metabólicas implicadas son cruciales para comprender el proceso de envejecimiento como para entender también, por ejemplo, la etiología de enfermedades neurodegenerativas relacionadas a la edad. En este contexto, el objetivo general del presente trabajo se enmarca en la función celular de los eisosomas en la levadura modelo *S. cerevisiae*, determinando si los mismos tienen un papel en el envejecimiento de tipo cronológico.

Para ello, se generaron ocho cepas en dos acervos genéticos diferentes, BY4741 y w303, de las cuales cuatro son mutantes eisosomales, de los genes *LSP1* y *PIL1*, y las cuatro restantes son mutantes en genes que están involucrados en el envejecimiento celular. La obtención de dichas mutantes se hizo por recombinación homóloga, es decir, se realizó la delección de los genes de interés por la incorporación de cassettes que codifiquen para una enzima implicada en la resistencia a un antibiótico o la biosíntesis de un aminoácido. Luego, se procedió a realizar los ensayos de envejecimiento cronológico, los cuales consisten en la determinación de la viabilidad celular a partir de un cultivo en fase estacionaria. La viabilidad se midió mediante citometría de flujo usando yoduro de propidio, fluoróforo que permite diferenciar células vivas de células muertas. Este estudio se llevó a cabo solo para las mutantes de los genes eisosomales (*pil1Δ*, *lsp1Δ* y *pil1Δ lsp1Δ*), junto a la cepa silvestre (*wild type*) y dos cepas control de envejecimiento cronológico.

Se determinó que las cepas mutantes *pil1Δ* y *pil1Δ lsp1Δ* son más longevas que la cepa *wild type* para ambos acervos genéticos, mientras que *lsp1Δ* no lo es, por lo que se concluye que podría ser la ausencia del gen *PIL1* lo que genera dicha longevidad en las células. Estos resultados abren las puertas a nuevos estudios para un mejor entendimiento de las bases celulares y moleculares del proceso de envejecimiento.

## PALABRAS CLAVE

*Saccharomyces cerevisiae*; Eisosomas; Envejecimiento; Citometría de flujo; recombinación homóloga.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>9</b>
1.1 Dominios de membrana plasmática en levaduras .....	9
1.2 Biogénesis y estructura de los eisosomas .....	10
1.3 Funciones de los eisosomas .....	12
1.3.1 Formación de dominios de membrana.....	12
1.3.2 Eisosomas y endocitosis .....	13
1.3.3 Participación en otras vías de señalización .....	14
1.4 Envejecimiento celular .....	16
1.4.1 Estudio de envejecimiento celular en <i>S. cerevisiae</i> .....	18
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
2.1 Objetivo general .....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
<b>3. Metodología</b> .....	<b>23</b>
3.1 Materiales .....	23
3.2 Métodos .....	24
3.2.1 Construcción de cepas simples mutantes.....	24
3.2.1.1 Purificación de ADN genómico .....	24
3.2.1.2 Construcción de <i>primers</i> para la amplificación de cassettes de deleción y para la confirmación de las cepas mutantes por PCR .....	25
3.2.1.3 Medidas de concentración de ADN genómico y plasmídico.....	25
3.2.1.4 PCR amplificación de los cassettes de deleción .....	26
3.2.1.5 Transformación de levaduras utilizando producto de PCR.....	26
3.2.1.6 Aislamiento de colonias a partir de colonias productos de transformación .....	27
3.2.1.7 PCR diagnóstica.....	27
3.2.1.8 Electroforesis en gel de agarosa.....	28
3.2.2 Construcción de cepas doble mutantes .....	28
3.2.2.1 <i>Background w303</i> .....	28

3.2.2.1.1 Apareamiento ( <i>mating</i> ) entre cepas MATa y MAT $\alpha$ .....	28
3.2.2.1.2 Selección de diploides y su esporulación .....	29
3.2.2.1.3 Desintegración del asco de las esporas .....	29
3.2.2.1.4 Disección de tétradas y selección de dobles mutantes .....	29
3.2.2.1.5 Determinación de <i>mating type</i> de cepas doble mutantes ..	30
3.2.2.2 <i>Background</i> BY4741 .....	31
3.2.3 Producción de <i>stocks</i> de las cepas generadas.....	31
3.2.4 Estudio de envejecimiento cronológico.....	31
3.2.4.1 Condiciones de crecimiento para los ensayos.....	32
3.2.4.2 Análisis por citometría de flujo .....	32
3.2.4.3 Procesamiento de datos y análisis estadístico .....	33
3.2.5 Determinación del volumen celular de levaduras usando herramientas bioinformáticas.....	34
3.2.5.1 Adquisición de imágenes por microscopía de epifluorescencia .....	35
3.2.5.2 Procesamiento de imágenes y determinación del volumen celular ...	35
<b>4. Resultados Obtenidos .....</b>	<b>38</b>
4.1 Obtención de cepas mutantes.....	38
4.1.1 Cepas generadas a partir de ADN genómico de otras cepas ya existentes .....	39
4.1.2 Cepas obtenidas a partir de ADN plasmídico .....	44
4.1.3 Cepa obtenida a partir de la disección de ascosporas .....	46
4.2 Resultados de los ensayos de envejecimiento cronológico.....	47
4.2.1 En el <i>background</i> w303.....	47
4.2.2 En el <i>background</i> BY4741.....	51
4.3 Determinación de volumen celular de cepas del experimento 3 en w303.....	54
<b>5. Discusión .....</b>	<b>56</b>
5.1 Pil1 afecta el envejecimiento cronológico en w303 y BY4741 .....	57
5.2 La ausencia de Pil1 y de Lsp1 no afecta el volumen celular en <i>S. cerevisiae</i> .....	61
<b>6. Análisis Económico .....</b>	<b>62</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>63</b>
<b>8. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>64</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>69</b>

9.1 Anexo 1: Composición de medios y soluciones usadas .....	69
9.2 Anexo 2: <i>Primers</i> utilizados para la construcción de cepas.....	71
9.3 Anexo 3: Estrategia de <i>gating</i> para el análisis por citometría de flujo .....	72
9.4 Anexo 4: Tabla usada para el test estadístico .....	74
9.5 Anexo 5: <i>Scripts</i> y líneas de comando usadas para el procesamiento de imágenes de microscopía .....	75

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Dominios de membrana plasmática en levaduras

La membrana plasmática cumple un rol crítico en la regulación de distintos procesos además de actuar como la barrera física más importante de la célula. Es mediadora de un gran rango de procesos esenciales incluyendo la importación de nutrientes, la transducción de señales, la secreción y la biogénesis de la pared celular, entre otros (1). En estudios recientes se ha demostrado que la membrana plasmática de hongos consiste de al menos tres distintos subdominios que parecen tener funciones especializadas, los cuales son: el compartimiento de membrana ocupado por Can1 (MCC) (2-4), el compartimiento de membrana ocupado por Pma1 (MCP) (4) y el compartimiento de membrana de TORC2 (MCT) (5). Sin embargo, uno de los últimos estudios reportados determinó la existencia de más de una docena de nanodominios con diferentes compartimientos dinámicos y formas, encontrando desde puntos discontinuos a redes continuas. Las membranas biológicas se auto-organizan en un mosaico de numerosos dominios coexistentes (6). La Figura 1 muestra una compleja interacción entre al menos cinco mecanismos diferentes de formación de nanodominios en la membrana plasmática, los cuales son la asociación preferencial de lípidos, interacciones proteína-lípido, interacción proteína-proteína, *picket fence* que se basa en el anclaje de proteínas transmembrana a una submembrana del citoesqueleto limitando la difusión de proteínas de membrana y por último el *scaffolding* de proteínas que es una especie de plataforma de proteínas periféricas que modifican localmente la topografía y la composición de la membrana. Por lo que, la formación de nanodominios ocurre a través del auto ensamblaje de diferentes componentes (7, 8).

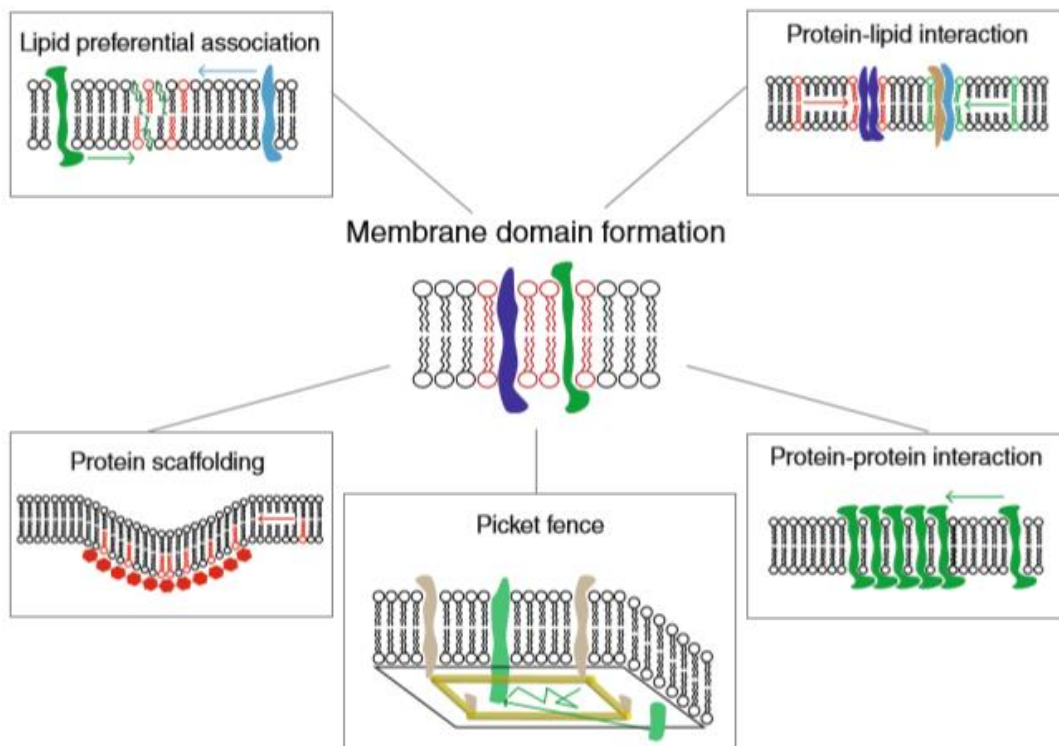


Figura 1. Mecanismos de formación de dominios de membrana plasmática (8).

## 1.2 Biogénesis y estructura de los eisosomas

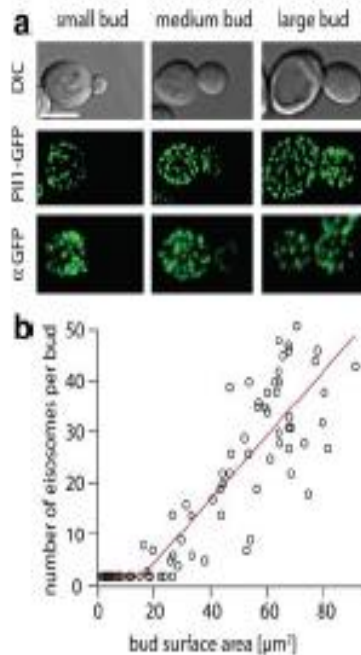
El primer subdominio nombrado, MCC, se ha visto que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se asocia con proteínas periféricas de membrana que forman un complejo en la superficie interior de la membrana plasmática, llamado eisosoma (9).

Estas estructuras ancladas firmemente por debajo de la membrana plasmática, se encuentran distribuidas en patrones de complejos espaciados a una mínima distancia uno del otro (10). También son extremadamente estables una vez formados, se ha visto que no intercambian subunidades, ni se mueven (9, 11-13). Una célula típica de levadura contiene aproximadamente 30 eisosomas, dependiendo de su área superficial. En estos, además de lípidos, se concentran al menos 25 proteínas, tanto integrales como asociadas a la misma (11, 14, 15).

A través de estudios de microscopía de fluorescencia *in vivo* se determinó que durante el proceso de división celular mitótica, por gemación en *S. cerevisiae*, los eisosomas de la célula madre no migran a la gema (Figura 2). Contrariamente, éstos se forman *de novo* en la gema en crecimiento a partir de subunidades proteicas recién sintetizadas, que se ensamblan sobre la membrana plasmática (10). Además, se ha demostrado que sus sitios de ensamblaje en la membrana plasmática no están pre-asignados sino que es de forma aleatoria (10). Un conjunto de evidencias genéticas, bioquímicas y de biología molecular de la célula permiten sostener que los eisosomas son nanodominios de membrana plasmática, con forma de invaginaciones estables donde se acumulan en forma selectiva lípidos y proteínas (8).

Las dos mayores subunidades de los eisosomas que constituyen su núcleo estructural son dos proteínas parálogas, es decir que son producto de una duplicación genética, Pil1 y Lsp1 (Figura 3) (9). Dichas proteínas comparten un 78% de identidad en 296 aminoácidos alineados, de un total de 341 aminoácidos en Lsp1 y 339 en Pil1, lo que indica que han sido altamente conservadas a nivel de secuencia. Hay más copias de Pil1 y Lsp1 (aproximadamente 115.000 y 104.000, respectivamente), que de tubulina (5.560 copias) y actina (60.000 copias). Así, se estima que por célula, cada eisosoma consta de entre 2.000 y 4.000 copias de cada una de estas proteínas parálogas (9, 15).

Hasta el momento, se ha descubierto que la estructura molecular de Pil1 y Lsp1 consiste en dominios BAR (13, 17). Dichos dominios están constituidos por una *coiled-coil* de tres largas alfa hélices que dimerizan para formar un dominio con forma de banana con una superficie cóncava cargada positivamente. Como consecuencia a la rígida forma cóncava de la superficie, el dominio BAR puede inducir curvatura de membranas, siendo esto requerido para una gran cantidad de procesos celulares como ser la invaginación endocítica o motilidad celular (18, 19). Los dominios BAR contenidos en las proteínas eisosomales Pil1 y Lsp1 son responsables de mediar el autoensamble y la unión a membranas lipídicas por parte de estas proteínas (11, 13, 14).



**Figura 2.** Los eisosomas se ensamblan *de novo*. (a) Pil1-GFP (Proteína verde fluorescente, del inglés *Green fluorescent protein*) refleja con exactitud la localización de los eisosomas. Las figuras de fluorescencia Pil1-GFP (fila de arriba) son comparadas con la tinción de inmunofluorescencia de Pil1-GFP frente a un anticuerpo GFP. Escala de barra 5 µm. (b) Los eisosomas son formados luego de una fase inicial lag y su número es directamente proporcional a la superficie celular (10).

Tanto para Pil1 como para Lsp1 se han descrito varios sitios de fosforilación y existen evidencias que apoyan la idea de que los niveles de fosforilación pueden regular la distribución de dichas proteínas entre las formas ensambladas en los eisosomas o solubles en el citosol (20). Varios estudios plantean que las serina/treonina quinasas Pkh1/2 están físicamente asociadas a los eisosomas y las proteínas que forman el núcleo estructural de los mismos, Pil1 y Lsp1 (19-21), parecen ser los substratos de Pkh por lo visto en estudios *in vitro*. Estas quinasas son homólogas a la quinasa en mamíferos PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), son funcionalmente redundantes, esenciales (22) y están implicadas en muchas funciones celulares esenciales (22, 23).

Actualmente, no hay evidencia de la presencia de eisosomas en organismos que no sean hongos. Sin embargo, dominios estructuralmente comparables llamados caveolas son encontrados en la membrana plasmática de células de mamíferos. Dichas estructuras son invaginaciones estables de 60-80 nm y su formación se debe principalmente a las proteínas integrales de membrana caveolinas y las proteínas asociadas a membrana cavininas. Al igual que los eisosomas, las caveolas concentran esteroides y fosfoinositoides y presentan varias funciones en la transducción de señales. Sin embargo, los componentes del núcleo estructural y el mecanismo de ensamblaje de las caveolas y los eisosomas son bastante diferentes (9). A pesar de estas diferencias moleculares, las similitudes a

nivel celular sugieren que los eisosomas y las caveolas podrían representar un caso de evolución convergente (8).

La conservación de diferentes componentes eisosomales a lo largo de todos los hongos es bastante dispar. Estos nanodominios se descubrieron en la levadura *S. cerevisiae*, pero se han realizado estudios en otros hongos y se ha logrado encontrar la presencia de dichas estructuras. Uno de los organismos modelo estudiado ha sido *Ashbya gossypii*, el cual es un hongo filamentoso, que actualmente está más relacionado fitogenéticamente con la levadura *S. cerevisiae* que con otro hongo filamentoso. Los eisosomas de este organismo son muy similares a los de la *S. cerevisiae*, incluyendo la localización de Pil1 y Lsp1 en un patrón puntuado en la membrana plasmática (24) y también son muy estables. De todas formas, se observan diferencias significativas entre los eisosomas de diferentes hongos, como por ejemplo la mutante *pil1Δ* en *A. gossypii* genera grandes defectos en el crecimiento polarizado, además algunos de los pares de genes parálogos presentes en *S. cerevisiae* (Slm1 y Slm2, Pkh1 y Pkh2 y Nce102 y Fhn1) están codificados por un solo gen en *A. gossypii* (24).

También han caracterizado eisosomas en *Aspergillus nidulans*, que es un hongo filamentoso. Esta mucho menos relacionado con *S. cerevisiae* que con *A. gossypii*, por lo que se observan muchas diferencias en estos eisosomas. Por ejemplo, los dos ortólogos a Pil1 presentes en *A. nidulans* (PilA y PilB) parecen haber aparecido a partir de un evento de duplicación que es distinto a la evolución de Pil1 y Lsp1 en *S. cerevisiae* (25). Además, se han encontrado eisosomas en los organismos *Schizosaccharomyces pombe*, que tiene estructuras mucho más grandes que las presentes en *S. cerevisiae* (14, 26-28) y en el patógeno humano *Candida albicans*.

### 1.3 Funciones de los eisosomas

#### 1.3.1 Formación de dominios de membrana

Los sitios en que Pil1/Lsp1 se asocian con la membrana plasmática corresponden a invaginaciones de membrana tipo surcos que son de 50 nm de profundidad y 200-300 nm de largo (29). Estas invaginaciones parecen estar enriquecidas de ergosterol que es el mayor esteroles en levaduras y requieren de esfingolípidos para una adecuada organización (19, 30).

A pesar de que las proteínas Pil1 y Lsp1 son casi idénticas, como también similares en abundancia, tienen diferentes roles en la estructura y biogénesis de los eisosomas (9, 10, 13). La proteína Lsp1 se une a la membrana plasmática con menor eficiencia que Pil1 y se ha visto que no son funcionalmente equivalentes (9, 13). Se encontró que el gen *PIL1* cumple un rol muy importante en la organización de estas estructuras. Se observa que disminuyendo o incrementando la dosis de dicho gen, lleva a la reducción del número de eisosomas o incremento en el tamaño del eisosoma, respectivamente (10). Estos resultados indican que los niveles de Pil1 son determinantes en la biogénesis de los eisosomas. Asimismo, la delección de *PIL1*, no de *LSP1*, lleva a la formación de agrupaciones periféricas llamadas *eisosome remnants*, es decir, en ausencia de Pil1 los componentes remanentes de los eisosomas se agrupan en uno o algunos sitios de la periferia celular lo que representa grandes

invaginaciones afectadas en la membrana plasmática. En cambio, la delección del gen *LSP1* produce eisosomas muy similares a los de la cepa silvestre (*wild type*), no afectando significativamente el fenotipo (9, 30). Estos resultados evidencian la incapacidad de Lsp1 de organizar eisosomas en ausencia de Pil1.

Además de estas principales proteínas de la estructura de los eisosomas, se ha encontrado que la composición de dichos dominios se compone de al menos dos docenas de proteínas y se espera que la lista crezca con el pasaje del tiempo. Se ha reportado que simportadores que importan nutrientes y protones a la célula, como ser Can1, Tat2 y Fur4 son proteínas integrales en la membrana que componen los eisosomas. También se encuentra la proteína Sur7 (Figura 3), Fmp45, Pun1 y Ynl194c, cuya presencia como proteínas integrales de membrana fue evidenciada a través de colocalización (8). Las delecciones simples de los genes *SUR7*, *FMP45* y *YNL194* causan leves defectos en la esporulación y cambios en la composición de membrana (31). En cambio la delección de *PUN1* conlleva a finas paredes celulares con un bajo contenido de  $\beta$ -glucano, crecimiento filamentoso afectado y un aumento de la sensibilidad al estrés por metales pesados. Esto sugiere que Pun1 es una proteína con función a respuesta a estrés que contribuye al mantenimiento de la integridad de la pared celular (8). Otra proteína integral de membrana que colocaliza con los eisosomas es Nce102. La delección del gen que codifica dicha proteína conlleva a un fenotipo muy similar a *pil1 $\Delta$*  (32, 33) y su concentración en los eisosomas depende de la disponibilidad de esfingolípidos e influencia la señalización por las quinasas Pkh, quienes también forman parte de estos dominios y serán mencionadas más adelante.

### 1.3.2 Eisosomas y endocitosis

Dentro de los roles funcionales de los eisosomas se encuentra la endocitosis. La endocitosis es un proceso por el cual la célula introduce moléculas grandes o partículas, englobándolas en una invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse para incorporarse al citoplasma. Se ha observado que Pil1 y Lsp1 son necesarias para una endocitosis eficiente, lo que lleva a una controversial propuesta de si los eisosomas son sitios de un tipo alternativo de vía endocítica.

Se ha observado que mutaciones simples y dobles de los genes que codifican a las proteínas Pil1 y Lsp1 resultaron en una disminución en la tasa de eventos endocíticos. A la vez, se realizó un seguimiento de la pinocitosis, observando las membranas celulares con la sonda fluorescente FM4-64, la cual tiñe lípidos de membrana, que permitió visualizar como la nucleación de los eventos endocíticos ocurría en sitios que colocalizaban con los eisosomas (6). Sin embargo, análisis de colocalización de diferentes marcadores de endocitosis mediada por clatrina-actina indicaron que los eventos endocíticos ocurren dentro de MCPs independientemente de la organización eisosomal (32, 34). Además, la delección de *PIL1* y *NCE102*, gen que codifica para una proteína involucrada en la fosforilación de Pil1, resultó en la aceleración de la internalización de Can1 y Fur1, apoyando la idea de que los eisosomas protegen estos simportadores de ser internalizados (32). Aunque, un análisis independiente de la tasa endocítica de Can1 y Tat2 no generó resultados diferentes entre células *pil1 $\Delta$*  y *wild type* (34). Por lo que a pesar de las diferencias entre estos reportes, ambos coinciden que los mediadores endocíticos dependientes de clatrina-actina no se apilan junto a los eisosomas. Tomando en cuenta todo lo anteriormente mencionado, el rol de los eisosomas en la endocitosis está bajo serias críticas y se requiere de mayor investigación para poder resolver esta interrogante.

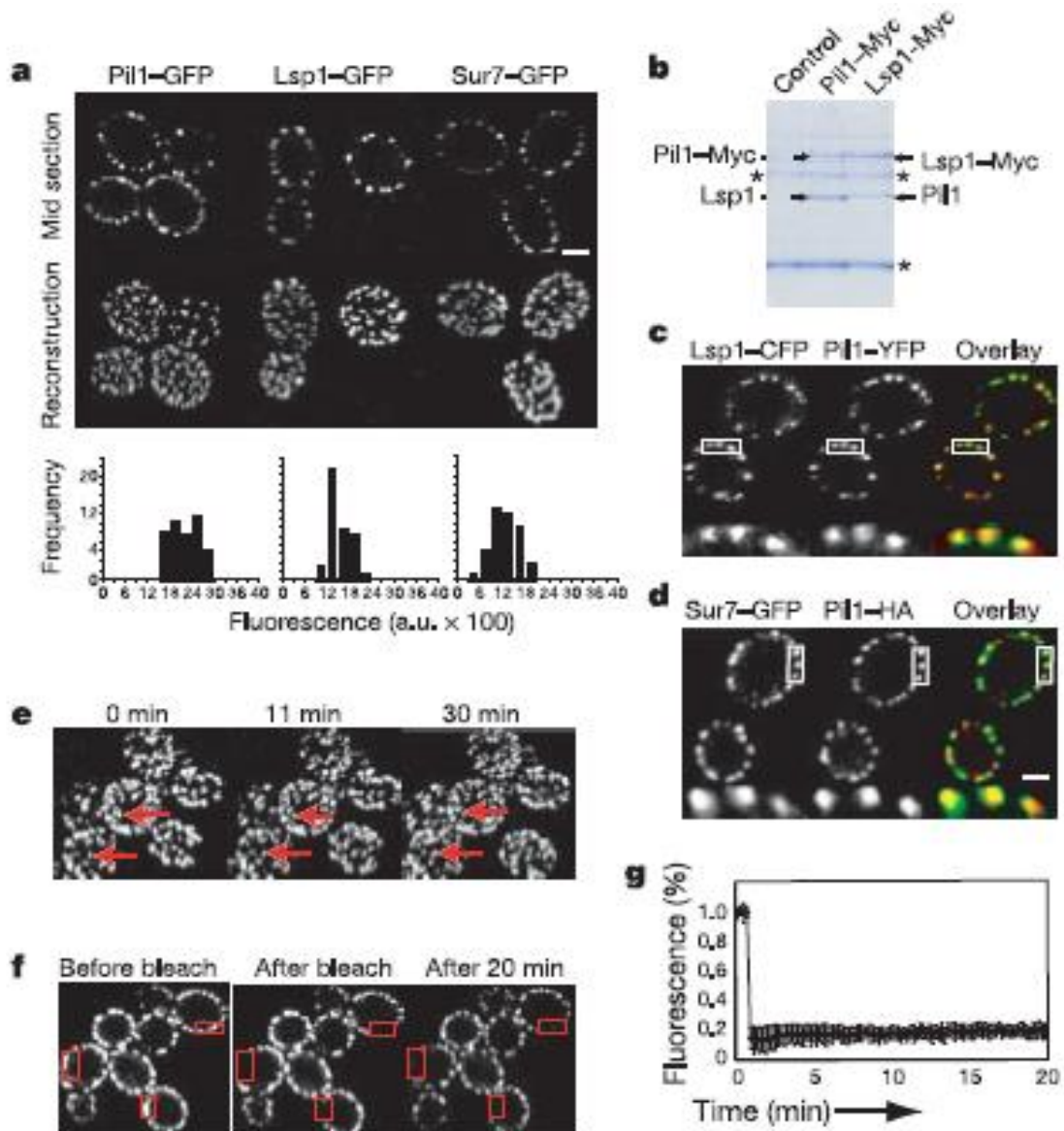
### 1.3.3 Participación en otras vías de señalización

Mutaciones en los genes de eisosomas/MCC han indicado que estos subdominios son necesarios para la adecuada organización celular y una eficiente respuesta a una variedad de estreses. Se ha sugerido que los dominios MCC/eisosoma están involucrados en la respuesta de shock osmótico y deshidratación. La exposición a condiciones hiperosmóticas de células de *S. cerevisiae* resulta en alteraciones de la membrana plasmática, incluyendo invaginaciones, que presuntamente ayudan a acomodar la rápida disminución del volumen celular. Se sugiere que la reorganización de los dominios MCC/eisosoma es parte del proceso por el cual la célula resiste a estas condiciones hiperosmóticas (1).

Además, se plantea que mutaciones en estos dominios afecten otro tipo de estreses. Por ejemplo, la mutación en el gen *SUR7* que codifica para una proteína de la membrana plasmática MCC que colocaliza con los eisosomas (Figura 3), genera defectos en la composición de esfingolípidos, esporulación y estrés osmótico (31, 35). Otro ejemplo son las quinasas Pkh1/2 que regulan otras proteínas quinasas importantes, como ser Pkc1, Sch9 y Ypk1, también tienen un rol en la integridad de la pared celular, la localización de la actina y la respuesta al estrés por calor (19, 20, 23).

Las proteínas Slm1 y Slm2 son esenciales para promover la organización de actina en el citoesqueleto, la homeostasis de esfingolípidos y el crecimiento celular. En un estudio reciente, se vio que dichas proteínas, son dinámicamente intercambiadas entre dos compartimientos, los eisosomas y el compartimiento de membrana ocupado por TORC2. Se observó que inhibiendo la síntesis de esfingolípidos, se produce la liberación de proteínas Slm de los eisosomas y así se incrementa la unión de dichas proteínas a TORC2, estimulando la actividad de este último y corriente abajo la síntesis de esfingolípidos. Esto contribuye al retorno de los niveles de esfingolípidos y a las condiciones homeostáticas de la membrana plasmática. (36)

Llamativamente, resultados preliminares nos indican que los eisosomas crecen en tamaño a medida que la célula envejece. Se ha reportado recientemente que la delección del gen *YGR130C*, que codifica para una proteína asociada a eisosomas, resulta en mutantes con mayor longevidad cronológica (37). Si bien la longevidad cronológica y la longevidad replicativa son distintas, las cuales más adelante se detallaran, poseen vías regulatorias y actores comunes y no está claro si los procesos son completamente independientes (15, 38, 39). Todo esto vuelve interesante estudiar la participación de los eisosomas en la acumulación asimétrica de proteínas y/o moléculas y sus posibles implicancias en el envejecimiento.



**Figura 3.** Los eisomas son grandes ensamblajes de proteínas en el cortex celular. (a) Pil1, Lsp1 y Sur7 colocalizan en áreas por debajo de la membrana plasmática. Se adquirieron *Z-stacks* de las tres proteínas unidas a GFP y a partir de eso se hizo una reconstrucción tridimensional de las células. La distribución de intensidad de fluorescencia de Pil1-GFP, Lsp1-GFP y Sur7-GFP se graficó en clases (eje y, número de puntos) de unidades arbitrarias de fluorescencia (eje x, 12 bit). (b) Pil1 y Lsp1 interactúan físicamente. Se unió el péptido Myc a Lsp1 y Pil1, los cuales se inmunoprecipitaron a partir de extractos de célula y las bandas marcadas fueron identificadas por espectrofotometría de masa. Los asteriscos indican las cadenas pesadas y livianas de IgG. (c) Pil1 y Lsp1 colocalizan en células vivas. (d) Sur7 colocaliza con Pil1. Sur7-GFP y Pil1-HA se observaron al microscopio confocal y por inmunofluorescencia indirecta. Escala de barra, 2  $\mu$ m. (e) Los eisomas son inmóviles. Las células que expresan Pil1-GFP fueron monitoreadas por un lapso de tiempo de 30 min en microscopio confocal. Las flechas marcan dos eisomas como puntos de referencia. (f) FRAP de Pil1-GFP. (g) Cuantificación de la recuperación de fluorescencia sobre el tiempo promedio entre tres experimentos independientes (9).

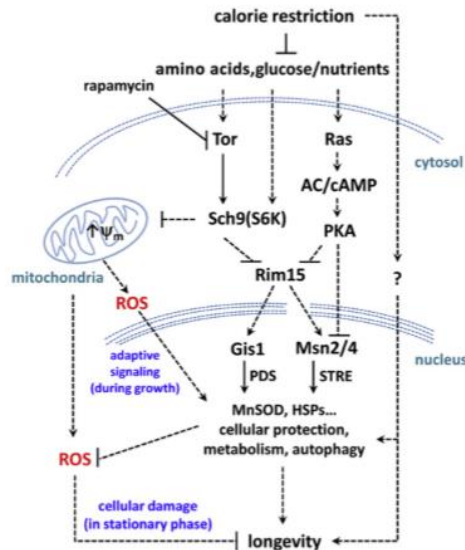
## 1.4 Envejecimiento celular

El envejecimiento es uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad. Por esta razón, entender los fundamentos moleculares y las alteraciones metabólicas que ocurren durante el envejecimiento de células post mitóticas, como ser neuronas, es crucial no solo para comprender el proceso de envejecimiento sino que para entender, por ejemplo, la etiología de enfermedades neurodegenerativas relacionadas a la edad. Si se pudiese comprender este proceso y modificar su velocidad, las consecuencias serían la reducción en la incidencia o progresión de enfermedades, resultaría en un aumento en la esperanza de vida y se evitarían altos costos para el cuidado de la salud (40).

El envejecimiento es un proceso multisistémico muy complejo. Uno de los descubrimientos más asombrosos en los últimos tiempos, es la posibilidad de administrar una droga clínicamente aprobada, rapamicina, a ratones de 20 meses de edad y de esta forma poder mejorar su salud y extenderles la esperanza de vida. Sorprendentemente, muchos de los recientes éxitos en la investigación del envejecimiento comienzan en un organismo modelo muy simple: la levadura del pan *S. cerevisiae*. Dos de las mayores vías estudiadas en el contexto de envejecimiento y enfermedades relacionadas a la edad, son las vías de la sirtuina y las vías de señalización TORC1, siendo *S. cerevisiae* la clave inicial para su descubrimiento (38).

En las últimas décadas, se han explorado diversos organismos como modelos para la investigación, de diversa complejidad, de forma de poder obtener mayor información acerca del mecanismo molecular del proceso de envejecimiento. Entre ellos, *S. cerevisiae* se ha convertido en una invaluable herramienta en la investigación de este proceso, dado a su simplicidad, la facilidad de llevar a cabo manipulaciones genéticas y moleculares siendo también muy importante su relativamente corta esperanza de vida, la cual oscila entre días hasta semanas, según la cepa y el medio (41, 42).

Muchos estudios se han centrado en estrategias para la extensión de longevidad, haciendo uso de la levadura como organismo modelo de envejecimiento. Los mismos han colaborado con conocimientos de los mecanismos reguladores del proceso de envejecimiento que son conservados desde las levaduras hasta los humanos (43). Un ejemplo claro es la restricción calórica, que es la intervención más robusta conocida en enlentecer el envejecimiento y extender la esperanza de vida en levaduras, gusanos, moscas, roedores y primates, a través de mecanismos conservados (43, 44). Estudios para comprender los mecanismos moleculares de la restricción calórica permitieron la identificación de unos cuantos genes que son claves en la longevidad. En levaduras, las vías de señalización Ras/cAMP/PKA, TOR (*target of rapamycin*) y Sch9, conservadas hasta en humanos, integran señales según la disponibilidad de nutrientes y otros indicadores ambientales para regular el crecimiento celular, división y envejecimiento (39, 44). Estas vías detectan la abundancia de nutrientes y controlan su utilización, la vía Tor/S6K es activada por aminoácidos y otros nutrientes y la vía Ras/cAMP/PKA es principalmente activada por glucosa pero también afectada por otros nutrientes (Figura 4). Estas dos vías de señalización se encuentran parcialmente superpuestas, aunque también tienen distintos efectos relacionados al envejecimiento. En el envejecimiento cronológico, que se discutirá con mayor profundidad más adelante, el modo primario de acción de estas vías es su convergencia en el regulón resistente a estrés que incluye a Rim15 y los factores de transcripción Msn2/Msn4 y Gis1 (Figura 4). En presencia de estrés, estos factores regulan el metabolismo, la acumulación y utilización de fuentes de carbono intra- y extracelulares.



**Figura 4.** Las mayores vías de señalización en el envejecimiento cronológico de levaduras. Las vías controladas por Sch9, Tor y Ras convergen en la proteína quinasa Rim15. Una gran porción del efecto de envejecimiento cronológico en longevidad parece ser mediado por la baja regulación de las vías Ras/AC/PKA y Tor/Sch9 y la consecuente activación del regulador Rim15 y los factores de transcripción respuesta a estrés Msn2/4 y Gis1. La reducción de la señalización de Tor/Sch9 (mutaciones genéticas o rapamicina) también incrementa la respiración mitocondrial y el potencial de membrana durante la fase de crecimiento, que lleva a una señal adaptativa mitocondrial (ROS, especies de oxígeno reactivas). Durante el envejecimiento cronológico, las deficiencias de Tor y Sch9 y la señalización adaptativa ROS, disminuyen la producción de ROS y aumentan las respuestas frente a estrés celular, llevando a la extensión del envejecimiento (38).

Se plantea que otra causa del envejecimiento (replicativo, ver más adelante) en las levaduras son los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) ribosomales (ADNr) circulares extacromosómicos (ERCs) (45). El ADNr consiste en aproximadamente 100 a 150 copias en tándem de una repetición de 9,1 kilobases (kb) conteniendo toda la información necesaria para codificar el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr). Los ERCs son formados por recombinación homóloga entre repeticiones de ADNr, son capaces de autorreplicarse y muestran una segregación asimétrica hacia las células madres cada vez que la célula se replica. La combinación de herencia asimétrica y autorreplicación conlleva a un aumento específico en la célula madre de número de copias de ERC con el tiempo. Por lo que, se cree que una vez que se llega a un nivel umbral de acumulación de ERCs en la célula madre ocurre la senescencia (46). De todas formas, también se ha sugerido que la inestabilidad de los ADNr en general, más que los ERCs, es el defecto primario causante de la senescencia. Se ha visto que la vía

de señalización de TOR lleva a la disminución de recombinación de ADNr y a la formación de ERCs (38).

Otro proceso distintivo del envejecimiento es el acortamiento de telómeros, el cual se ha observado en células somáticas envejecidas y en fibroblastos humanos a medida que se dividen en el cultivo. Esto ocurre dado a la ausencia de la enzima telomerasa en estas células, que lleva a una pérdida progresiva de secuencias de ADN al final de los cromosomas replicativos. Se ha sugerido que el acortamiento de telómeros sirve como un reloj mitótico, que eventualmente gatilla la senescencia. En un estudio realizado se usaron levaduras que mostraban una disminución progresiva del largo de los telómeros como también un incremento en la frecuencia de pérdida de cromosomas, las mismas presentaban una mutación nula en el gen *EST1* (47). Estas mostraban un fenotipo senescente dado por la pérdida gradual de secuencias esenciales, llevando a la disminución progresiva de la estabilidad cromosómica y subsecuentemente a la muerte celular (47). También se ha reportado que la telomerasa podría estar jugando un papel en la regulación del envejecimiento, ayudando a mantener a los telómeros con el largo necesario para obtener un potencial replicativo completo, como también inhibiendo la recombinación telomérica que de lo contrario resulta en una disminución de la capacidad replicativa celular (48).

Por último, la acumulación de proteínas no funcionales, entre otros factores, es un síntoma común de células envejecidas, se ha visto que al igual que los ERCs, las proteínas no funcionales son segregadas asimétricamente hacia la madre durante la división celular. Las alteraciones en las proteínas pueden estar presentes a nivel del largo o de la composición de la secuencia polipeptídica. Las mismas se generan por mutaciones a nivel de genes, errores en la transcripción o traducción, como también por fuentes espontáneas o metabólicas. Sin embargo, existen procesos homeostáticos que permiten la eliminación de la acumulación de proteínas no funcionales, por ejemplo, se ha reportado que un aumento en la inducción de actividad del proteosoma es capaz de extender el envejecimiento de las células (49).

#### **1.4.1 Estudio de envejecimiento celular en *S. cerevisiae***

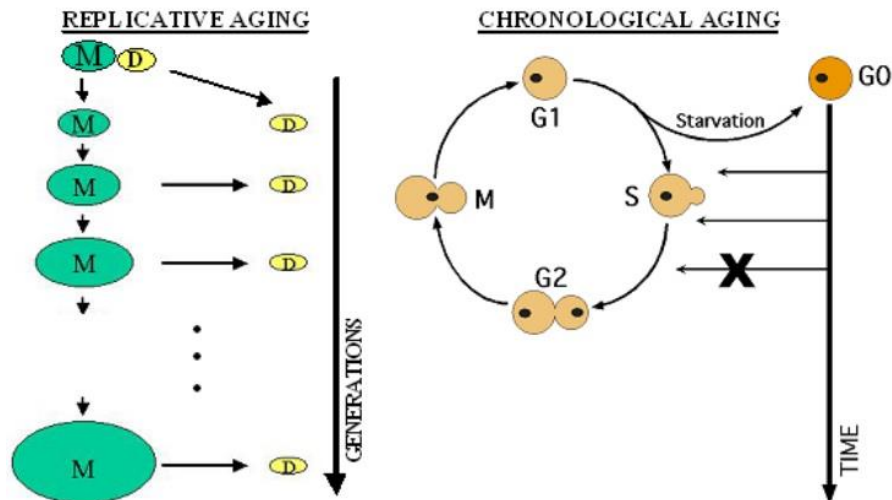
El envejecimiento en *S. cerevisiae* se ha estudiado en base a dos metodologías que miden la esperanza de vida de las células en diferentes contextos (Figura 5). Uno de los ensayos es el estudio del envejecimiento replicativo, que analiza el número de células hijas producidas por la célula madre antes de la senescencia, el cual está pensado como modelo de estudio del envejecimiento en células mitóticamente activas en organismos multicelulares. Este estudio se realiza a través de micromanipulación de levaduras con un microscopio, donde el número de células hijas producidas por una célula madre se puede contabilizar separando las células hijas luego de cada ciclo de replicación hasta que la célula madre no se divide más, este método es el considerado *gold-standard* (37, 38, 46). Sin embargo, han aparecido métodos alternativos que permiten automatizar y aumentar la capacidad del ensayo. Uno es el de *Mother Enrichment Program* que anula la capacidad replicativa de las células hijas, mientras que permite a las células madre replicarse mitóticamente y tener un envejecimiento replicativo normal. Esto es posible gracias a modificaciones genéticas que dictan, de manera dependiente del agregado de estradiol al medio de cultivo, la presencia de una enzima recombinasa sólo en células hijas. Esta recombinasa elimina del genoma de células hijas genes esenciales para la proliferación de dichas células dejando intacto el genoma de células madres (50). Otro método que se usa para muestras con grandes números de células viejas, es agregando una capa de biotina a la superficie de células de levadura. Luego durante la división celular, la biotina se

va a mantener específicamente en la pared celular de la célula madre, ya que la pared celular de la célula hija es sintetizada *de novo*. Transcurridas múltiples divisiones las madres envejecidas pueden ser separadas de las células no marcadas usando partículas magnéticas cubiertas por avidina. Esto permite el análisis bioquímico de las células envejecidas, pero no es suficiente para medir la esperanza de vida.

Por otro lado, como modelo propuesto para estudiar el envejecimiento en células post-mitóticas está el ensayo de envejecimiento cronológico (51, 52). Este refiere al lapso en que una célula de levadura que no se divide es capaz de sobrevivir en fase estacionaria (38). El envejecimiento de tipo cronológico es típicamente medido creciendo un cultivo de células de levaduras a un estado post-diáuxico, este es un período que comienza aproximadamente a las 24 horas después de la inoculación inicial cuando las células agotan la glucosa extracelular, el crecimiento celular se reduce drásticamente y cambia a un metabolismo basado en la respiración mitocondrial dependiente del etanol generado durante la fermentación (53). La fase estacionaria comienza al final de la fase post-diáuxica, entre los días 2-7, dependiendo del medio usado en el experimento. Esta última fase es caracterizada por tasas metabólicas menores y la sobreexpresión de vías resistentes al estrés.

Generalmente, el estudio de envejecimiento cronológico se determina por crecimiento de células en medios líquidos y determinando la viabilidad celular a lo largo del tiempo, la cual se realiza contando unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de una pequeña muestra de como máximo un poco de cientos de células en placas nutritivas de agar. Se ha comprobado que este método es útil, pero es muy laborioso, consume mucho tiempo y no es ideal para estudios de alto rendimiento (*high-throughput*) que incluyen un número significativo de cepas y/o condiciones de crecimiento. Además, este método no es capaz de discriminar situaciones en que las células todavía están vivas pero tienen la habilidad de reproducirse, parcialmente o completamente, comprometida. Para eliminar algunas de las desventajas que presenta el método de conteo de unidades formadoras de colonias, se usa la tinción fluorescente con yoduro de propidio para poder identificar las células muertas y se emplea la técnica de citometría de flujo para proveer una rápida, confiable, reproducible y precisa cuantificación de múltiples muestras (10-50 mil células) de poblaciones de levadura cronológicamente envejecidas (40). Este método, frecuentemente usado en microbiología, se basa en la exclusión del yoduro de propidio por células vivas en donde la membrana forma una barrera selectivamente permeable entre el contenido celular y el ambiente. Las células muertas pierden la integridad de membrana y se tiñen con yoduro de propidio, facilitando su identificación por la citometría de flujo (54). Dicha metodología es la que se empleó en este trabajo.

Además de las consideraciones ambientales que se tienen para llevar a cabo estudios de envejecimiento, cada vez es más sabido que los acervos (*backgrounds*) genéticos juegan un rol crítico en los resultados de ambos tipos de envejecimiento. El *background* genético es la base genotípica de una cepa, es decir, toda la información genética de esta. En este trabajo se van a utilizar dos *backgrounds* genéticos diferentes, w303 y BY4741. Según la bibliografía, hay muchos grupos de investigación que han usado diferentes *backgrounds* para llevar a cabo sus estudios y han observado una diferencia notoria de la longevidad de estos. Sin embargo, las variantes genéticas que causan estas diferencias todavía no han sido profundamente exploradas, aunque es muy probable que proporcionen información importante al conocimiento de los mecanismos de envejecimiento en levadura. De todas formas, el problema de las diferencias de cepa y longevidad es pertinente en todos los organismos modelo para el estudio de envejecimiento (38).



**Figura 5.** Dos ensayos de envejecimiento en levadura comúnmente usados. El ensayo de envejecimiento replicativo se refiere al número de divisiones mitóticas que pueden ocurrir de una célula madre. En el ensayo de envejecimiento cronológico se mide como el lapso de tiempo en el que células en un cultivo estacionario pueden mantenerse viables (55).

La mayoría de la investigación realizada en levaduras se ha centrado en determinar el envejecimiento de tipo replicativo y unas cuantas docenas de proteínas se conocen que juegan un rol en dicho proceso. Sin embargo, solo unos pocos genes han sido implicados en la regulación del envejecimiento cronológico en levaduras. Un aumento en la expresión de los genes que codifican para la superóxido dismutasa o catalasa pueden incrementar el envejecimiento cronológico (42), mientras que la delección de estos genes lo acorta dramáticamente (52), sugiriendo que la respuesta a estrés oxidativo es de gran importancia en este tipo de envejecimiento en la levadura. Mutaciones que disminuyen la actividad de la quinasa Sch9 en respuesta a nutrientes o la adenilato ciclasa (Cyr1), un activador de la proteína quinasa dependiente del AMP cíclico (PKA), también aumentan este tipo de envejecimiento (56, 57). Estas proteínas son normalmente activadas en la presencia de nutrientes, especialmente glucosa, Sch9 y PKA se cree que señalizan en vías paralelas el aumento de glucólisis, la biogénesis ribosomal, crecimiento y la progresión del ciclo celular e inhiben las vías de respuesta a estrés (38, 58).

La relación entre el envejecimiento de tipo replicativo y cronológico en levaduras no se ha descifrado aún. Muchos casos que aumentan el envejecimiento replicativo, incluyendo aquellos que conllevan a la activación de la histona desacetilasa Sir2 (59), no tienen el mismo efecto en el envejecimiento cronológico (60) y algunas mutaciones se han reportado tener el efecto contrario en los dos ensayos de envejecimiento (57, 61). Sin embargo, hay una razón para creer que ambos tipos de estudios están interconectados. Primero, células cronológicamente envejecidas muestran una reducción en el estudio replicativo (62), y segundo, la delección de Sch9 o delección de proteínas activadoras de la señalización de PKA extienden ambos estudios de envejecimiento en levaduras (56, 57). Sch9 tiene un 47% de identidad con AKT, una molécula clave involucrada en la traducción de señales *insulina-like*, senescencia celular (63, 64) y envejecimiento en eucariotas superiores (65, 66). Como la disminución de la señalización del péptido *insulina-like* ha sido asociado al aumento de esperanza de vida en gusanos, moscas y ratones, el descubrimiento que Sch9 y PKA juegan un rol en la determinación del envejecimiento replicativo y cronológico de levadura apoya la idea de que vías similares de señalización de nutrientes pueden influenciar el envejecimiento en especies evolutivamente diversas (46).

Teniendo en cuenta que los eisosomas funcionan como reservorios de proteínas en la membrana plasmática, que los mismos crecen a medida que la célula envejece y que se ha reportado que mutantes de proteínas que los componen poseen su longevidad alterada, este proyecto pretende investigar el posible papel de los eisosomas en el envejecimiento en la levadura modelo *S. cerevisiae* en diferentes *backgrounds* genéticos, a través del empleo de técnicas de genética molecular y citometría de flujo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

Este proyecto pretende investigar el posible papel de los eisosomas en el envejecimiento en *S. cerevisiae*, determinando si mutantes de los genes que codifican para el núcleo estructural de estos ensamblajes proteicos tienen alterado el envejecimiento de tipo cronológico.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Obtener un conjunto de cepas mutantes en genes eisosomales y en genes vinculados al envejecimiento en dos *backgrounds* genéticos.
- Ensayar la supervivencia cronológica de un grupo de dichas cepas mediante la técnica de citometría de flujo.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Materiales

Las cepas que fueron base para la construcción de cepas simple y doble mutantes son las descritas en la Tabla 1, las cuales se obtuvieron de la colección de levaduras del Laboratorio de Biología Celular de Membranas del Institut Pasteur de Montevideo, a excepción de *sir2::kanMX4* y *hvk2::kanMX4* que fueron obtenidas por colaboración con el Dr. Cristián Favre de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

**Tabla 1.** Lista de cepas mutantes usadas para la construcción de cepas de interés

Nombre	Background	Genotipo relevante	Fuente
#437	W303; MATa; <i>leu2-3, 112</i> <i>trp1-1 can1-100 ura3-1</i> <i>ade2-1 his3-11,15</i>	<i>pil1::LEUca</i>	Laboratorio de Biología Celular de Membranas, Instituto Pasteur de Montevideo (LBCM-IPMont)
#851	BY4741; MATa; <i>his3Δ1</i> <i>leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	-	LBCM-IPMont
#1110	W303; MATa	<i>isp1::NAT</i>	LBCM-IPMont
#1017	W303; MATa	-	LBCM-IPMont
#1196	BY4741	<i>sir2::kanMX4</i>	Dr Cristián Favre, Universidad Nacional de Rosario, Argentina
#1198	BY4741	<i>hvk2::kanMX4</i>	Dr Cristián Favre, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

Las únicas cepas que no fueron obtenidas en base a otras ya existentes fueron *sch9::NAT* en ambos *backgrounds* genéticos. En estos casos se usó el plásmido pFA6a natNT2 que se obtuvo de la colección de PCR *Toolbox* (67).

Los reactivos y equipos usados en la metodología del trabajo están nombrados a lo largo del ítem 3.2 Métodos. Por otro lado, la composición de medios y soluciones que se usaron se encuentran detalladas en el Anexo 1.

## 3.2 Métodos

Se realizó la construcción de las cepas simple y doble mutantes en dos *backgrounds* genéticos, w303 y BY4741 para luego proceder a la técnica de citometría de flujo con la que se llevó a cabo los experimentos de envejecimiento cronológico.

### 3.2.1 Construcción de cepas simple mutantes

La obtención de dichas mutantes se hizo por recombinación homóloga, generando la delección de cada uno de los genes de interés por la incorporación de cassettes con genes que codifican para enzimas que ofrecen resistencia a antibióticos o participan de la ruta biosintética de aminoácidos. Se realizó empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Primero, se amplificaron mediante PCR los marcadores de selección usando oligonucleótidos (*primers*) específicos para los genes que se quiso mutar. Luego, con el producto de PCR se transformaron las células de levadura y por último se tuvo que llevar a cabo una instancia de confirmación de la inserción de los cassettes a través de PCR diagnóstica, para comprobar que la recombinación homóloga fue exitosa (12, 67).

#### 3.2.1.1 Purificación de ADN genómico

Lo primero que se realizó para la construcción de cepas simple mutantes, a excepción de *sch9::NAT*, fue la purificación del ADN genómico de otras cepas con la misma mutación pero de un *background* genético distinto al de interés. Este paso se hizo usando el *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Para llevar a cabo la extracción, primero se creció un cultivo de levaduras en medio YPD por 20 horas, a 30°C con agitación 220 rpm. Luego se centrifugó a 16000 xg por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 20 µL de la solución EDTA (Sigma-Aldrich #EDS) 50mM y 20 µL de enzima Zymoliasa (Seikagaku Biobusiness Corporation). Se incubó la muestra a 37°C durante 30-60 minutos para digerir la pared celular y terminada la incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 16000 xg por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se añadió 300 µL de *Nuclei Lysis Solution*, se mezcló pipeteando suavemente, se agregó 100 µL de *Protein Precipitation Solution* y se vortexeo a alta velocidad por 20 segundos. La muestra se dejó decantar en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 16000 xg por 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante, que contiene el ADN, a un tubo eppendorf limpio ya conteniendo 300 µL de isopropanol (Droguería Industrial Uruguay) a temperatura ambiente y se mezcló gentilmente por inversión. Dicha mezcla se centrifugó a 16000 xg por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el tubo sobre un papel absorbente. Luego, se agregó 300 µL de etanol 70% (Droguería Industrial Uruguay) a temperatura ambiente y se invirtió el tubo suavemente. Se volvió a centrifugar la muestra a 16000 xg por 2 minutos, se quitó el sobrenadante y se dejó secar sobre un papel absorbente entre 10-15 minutos. Por último, se agregó 50 µL de *DNA Rehydration Solution* y 1,5 µL de *Rnase Solution* a la muestra con el ADN puro y se incubó a 37°C por 15 minutos. El ADN se rehidrató dejándolo *overnight* a temperatura ambiente y finalmente se guardó a 2-8°C.

### 3.2.1.2 Construcción de *primers* para la amplificación de cassettes de delección y para la confirmación de las cepas mutantes por PCR

Para la construcción de *primers* lo que se hizo fue obtener las secuencias de los genes que se quiso deletar junto a sus partes flanqueantes, 1 kb corriente arriba (*upstream*) y corriente abajo (*downstream*) del gen, de la cepa de referencia S288C a partir de la página web *Saccharomyces Genome Database* (68). Luego se usó el *software* ApE (*A plasmid Editor*) versión v2.0.45 para abrir las secuencias de ADN, donde lo primero que se hizo fue identificar el ORF (Marco abierto de lectura, del inglés *Open reading frame*) de cada gen de interés con la herramienta ORFs/*Find next* que brinda el *software*. Luego, los *primers* para la amplificación de cassettes se obtuvieron a partir de la herramienta *Find Primers* dentro de la opción *Tools* del *software*. Se eligieron los *primers* de acuerdo a los siguientes parámetros: que se encontrarán aproximadamente 200 pares de base (pb) *upstream* (*primer* hacia adelante (*forward*)) y *downstream* del ORF del gen (*primer* reverso (*reverse*)), que tuvieran un largo de 19 a 21 pb y una *Tm* de alrededor de 50°C (Anexo 2).

El procedimiento descrito anteriormente fue el que se siguió para realizar todos los *primers* de amplificación de todos los cassettes, a excepción de los *primers* requeridos para la construcción de la cepa mutante *sch9::NAT*. En este caso, no se trabajó a partir del ADN genómico, sino que a partir de un plásmido conteniendo el cassette del antibiótico nourseotricina (NAT, Jena Bioscience #AB-101S) (67). Por lo tanto, los *primers* de amplificación del cassette son distintos, estos son más largos, requieren de complementariedad de bases con el cassette que se quiso amplificar y con el lugar donde se insertó (Anexo 2). Para el *primer forward* se le agregaron desde 45 a 55 bases *upstream* del ATG del gen *SCH9*, seguido por la secuencia 5' -CGTACGCTGCAGGTCGAC-3', la cual es secuencia complementaria al cassette *NAT*. Por otro lado, para hacer el *primer reverse* se tomó el reverso complementario de 45 a 55 bases *downstream* del codón *STOP* del gen *SCH9*, incluyéndolo, seguido por 5'-ATCGATGAATTCGAGCTCG-3', la cual es secuencia complementaria al cassette.

La construcción de *primers* para la confirmación de cepas mutantes se hizo en base a los archivos generados en el *software* ApE cuando se construyeron los *primers* de amplificación de cassettes de delección. Para hacer la confirmación de la transformación solo se requirió de la construcción de *primers* que hibridaran 200 pb *upstream* de los *primer forward* que se habían hecho para amplificar los cassettes, ya que los otros requeridos para esta parte estaban disponibles de la colección de *primers* de levaduras y *primers* genéricos del laboratorio. La construcción se realizó usando la herramienta *Find Primers* de ApE, teniendo en cuenta un largo de 19 a 21 pb y una *Tm* de alrededor de 50°C (Anexo 2).

### 3.2.1.3 Medidas de concentración de ADN genómico y plasmídico.

Las concentraciones de ADN se determinaron usando el equipo NanoDrop 1000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Se debió configurar la opción para medir concentración de ADN, introducir un blanco con agua y luego la muestra. El equipo devolvió una concentración expresada en ng/μL.

### 3.2.1.4 PCR amplificación de los cassettes de delección

Para todas las reacciones de PCR se usó la *Taq DNA polymerase* (Thermo Scientific), la cual es una ADN polimerasa usada para PCRs de rutina con un límite de amplificación de 5kb. Las reacciones de PCR se prepararon de forma que en un volumen de 50  $\mu$ L se contenga:

- ADN Taq polimerasa con concentración final de 1,25 U.
- *Buffer* Taq a una concentración final de 1X.
- dNTPs estén en una concentración final de 0,25mM (Fermentas).
- *primers forward y reverse* (IDT) a una concentración final de 0,6microM.
- MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 2,5mM.
- ADN molde a una concentración final de 30ng/ $\mu$ L.
- Agua se lleva al volumen deseado.

Las condiciones de ciclado fueron:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	30
Unión de <i>primers</i> ( <i>annealing</i> )	56	45 seg	
Extensión	72	1 min/kb	
Extensión Final	72	5 min	1

### 3.2.1.5 Transformación de levaduras utilizando productos de PCR

Habiendo verificado que se logró amplificar los cassettes de delección mediante electroforesis de agarosa, mencionada más adelante, se realizaron las transformaciones de dichos productos en levaduras *wild type* de los correspondientes *backgrounds* genéticos, según la mutante a generar.

Para llevar a cabo la transformación se inocularon las cepas *wild type* en 5 mL de medio YPD y se crecieron *overnight* a 30°C con agitación 220 rpm. Al otro día, se diluyeron los cultivos a una OD<sub>600</sub> menor a 0,05 en 50 mL de medio YPD, la misma se determinó en el equipo BioPhotometer (Eppendorf). Cuando los cultivos llegaron a una OD<sub>600</sub> entre 0,4 y 0,8 se centrifugaron las células 3 minutos a 3000 rpm. El *pellet* de cada cultivo se resuspendió en 1mL de la solución 1X LiTE, se pasó

todo a tubos eppendorf y se volvió a centrifugar 2 minutos a 3000 rpm. Otra vez, el *pellet* se resuspendió en 300 µL de la solución 1X LiTE. Por transformación se usó 100 µL de células, a las cuales se le agregó 10 µL de *Salmon Sperm DNA Solution* 10X (Invitrogen), 10 µL de ADN transformante y 750 µL de la solución PEG LiTE, esto se incubó a 30°C por 30 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 100 µL de la solución DMSO (New England Biolabs, #BO515A) y se realizó un *heat shock* a 42°C por 10 minutos. Se centrifugó 2 minutos a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1mL de medio YPD. Luego, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 300 µL de medio YPD y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora para su recuperación. Por último, se plaquearon las células en placas con medio selectivo correspondiente a la resistencia que se les introduce con la transformación. Se hizo para todos los casos un control negativo de la transformación, es decir, se agregó agua en vez de ADN transformante.

### **3.2.1.6 Aislamiento de colonias a partir de colonias productos de la transformación.**

Se realizó el paso previo de aislar colonias a partir de las colonias crecidas en las placas de transformación, porque generalmente hay mucho crecimiento de fondo que no es de interés y de este modo se está seguro que se parte de una colonia. Por lo tanto, en placas de YPD se estríaron varias colonias seleccionadas de la placa de transformación de forma de obtener colonias aisladas. Se incubaron las placas en la estufa a 30°C por 48 horas.

Por último, se seleccionaron colonias aisladas, se estríaron en otra placa de YPD y se crecieron en la estufa a 30°C por 48 horas. Este paso se hizo para tener más cantidad crecida de la cepa proveniente de la colonia aislada por si luego de la verificación, paso siguiente, se quiere guardar la cepa.

### **3.2.1.7 PCR diagnóstica**

A partir de la placa de YPD con las cepas crecidas de colonias aisladas, las cuales son productos de transformación, se buscó confirmar la correcta inserción del cassette en el *locus* genómico de interés. Por lo que primero se extrajo ADN de dichas colonias, esto se realizó agregando con la ayuda de un tip una colonia seleccionada a un tubo eppendorf con 50 µL de la solución NaOH 20mM y se calentó a 95°C en el termobloque por 7 minutos. Luego, se centrifugó a 16000 xg por 2 minutos y se colocó el tubo en hielo.

Para todas las reacciones de PCR se usó la *Taq DNA polymerase* (Thermo Scientific), la misma usada para la PCR de amplificación de cassettes de delección. Se realizaron 3 mezclas de reacción distintas, una como control positivo usando ADN sin la mutación de interés, donde se usó un *primer reverse* que hibride en el *locus* que se quiso modificar. En las otras 2 mezclas de reacción se usó el ADN extraído de las colonias aisladas, donde un mix se utilizó como control negativo y se agrega el *primer reverse* que hibride en el *locus* que se quiso modificar, el mismo que para el control positivo. Por otro lado, el tercer mix de reacción contiene un *primer reverse* que hibrida en el cassette de delección. Todas las reacciones usaron el mismo *primer forward*, la construcción de dichos *primers* está descrita en el ítem 3.2.1.2.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25  $\mu$ L, las mismas son de igual concentración final de reactivos que la PCR de amplificación de cassettes de delección y las mismas condiciones de ciclado, detallado en el ítem 3.2.1.4.

### 3.2.1.8 Electroforesis en gel de agarosa

De manera de poder observar los resultados de las PCR, tanto para la de amplificación de cassettes de delección como para la confirmativa, se realizaron geles de agarosa (Sigma-Aldrich # A9539) al 0,7% en *buffer* TBE1X. Se utilizó el bromuro de etidio (BrEt, Applichem-Biologistica #A1151, 10 mg/mL) como marcador de ácidos nucleicos, que presentando una concentración inicial de 20.000X se diluyo para usarlo a una concentración final 1X.

Se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 1kb *DNA ladder* (Thermo Scientific #SM0311), cargando 5 $\mu$ L en el pocillo. Para sembrar todas las muestras en el gel se usó el *Loading Buffer* (Invitrogen) a una concentración final de 1X (concentración inicial 10X). El equipo GBOX SYNGENE fue usado como transiluminador para poder visualizar los geles de agarosa y registrar fotográficamente.

## 3.2.2 Construcción de cepas doble mutantes

Las dos cepas doble mutantes a construir son *lsp1::NAT pil1::LEU2* en los *background* w303 y BY4741.

### 3.2.2.1 *Background* w303

#### 3.2.2.1.1 Apareamiento (*mating*) entre cepas *MATa* y *MAT $\alpha$*

El *mating* sexual de las levaduras sólo puede ocurrir entre células haploides de distinto sexo. Se definen por tanto dos tipos sexuales (*mating types*) de levaduras, las células *MATa* y *MAT $\alpha$* . En el caso de las levaduras, la determinación sexual no se debe a un cromosoma distinto entre sexos sino más bien a una diferencia en un único *locus*. Dicho *locus* se conoce con el nombre de *MAT* y gobierna el comportamiento sexual entre células haploides y células diploides. Por lo tanto, para la generación de *pil1::LEU2 lsp1::NAT* se usaron cepas simples mutantes *pil1::LEU2* y *lsp1::NAT* de distinto sexo o *mating type* para que se pueda dar el apareamiento entre levaduras. Primero, se crecieron las cepas haploides en placas de medio YPD agar y se incubaron en la estufa a 30°C por 24 horas. Luego, en otra placa de medio YPD agar se estriaron de forma de que las células de los distintos *mating type* se encuentren y por separado cada cepa haploide, las cuales fueron usadas como control negativo del apareamiento. La placa se incubó en la estufa a 30°C por 24 horas, como mínimo 6 horas es requerido para que se de este proceso.

### 3.2.2.1.2 Selección de diploides y su esporulación

A las 24 horas de incubada la placa usada para el proceso de apareamiento, se hizo un *replica plating*, esta técnica consiste en la transferencia de réplicas de colonias entre dos placas colocando un tampón de terciopelo entre ambas placas y presionando ligeramente. Para este caso, se realizó la réplica de colonias a una placa de medio mínimo que contenga el antibiótico nourseotricina (NAT) y carezca del aminoácido leucina (LEU) para seleccionar las diploides, la placa se incubó a 30°C por 24 horas. Habiendo crecido las diploides se buscó obtener colonias aisladas, por lo tanto, se estiraron diploides en una nueva placa de medio YPD agar y se incubó a 30°C por 24 horas. A partir de una colonia aislada de la diploide heterocigota *pil1::LEU2 lsp1::NAT*, se inoculó un cultivo con medio de esporulación (SPO) y se incubó a 30°C con agitación a 220 rpm al menos 48 horas. También se largó un cultivo control negativo, el cual contiene solo medio.

Luego se confirmó por observación al microscopio en campo claro que el cultivo haya esporulado correctamente formando tétradas de ascosporas. Esto se realizó usando un microscopio con los objetivos 40X y 100X en campo claro, con este último se utilizó aceite de inmersión (Cargille #16242). Se procedió a tomar parte de este cultivo y tratarlo con Zymoliasa para digerir el asco que es la estructura que encierra las esporas del hongo.

### 3.2.2.1.3 Desintegración del asco de las esporas

Se tomó 1 mL de cultivo con esporas, se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 200 µL de *buffer* Zymoliasa 1X, se tomó 50 µL y se transfirió a otro tubo eppendorf volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Se procedió a descartar el sobrenadante, se agregó 5 µL de *buffer* Zymoliasa 1X y 5 µL de la enzima Zymoliasa, encargada de digerir el asco. El tubo se incubó a 30°C por 20 minutos, transcurrido este tiempo, se diluyó la muestra en 1 mL de *buffer* Zymoliasa 1X. Se tomó 20 µL de esta dilución y se sembró en una placa de YPD agar, de manera que las esporas quedaran depositadas en una línea recta dividiendo a la placa en dos.

### 3.2.2.1.4 Disección de tétradas y selección de dobles mutantes

La separación de las cuatro ascosporas por micromanipulación es requerido para el análisis genético de la meiosis y para la construcción de cepas con marcadores específicos. Por lo que habiendo digerido el asco que encierra a las tétradas de ascosporas, se procedió a usar el microscopio, llamado SporePlay (Singer Instruments), que posee un micromanipulador (69). Con el mismo se identificó y seleccionó tétradas de ascosporas en la placa donde fueron sembradas para poder llevar a cabo la disección de estas, que será descrita a continuación.

La micromanipulación se implementó directamente en la superficie de la placa de agar, ya teniendo sembrada la muestra en el medio. Primero, un grupo de cuatro esporas se toma con la microaguja, posicionando el borde de la misma al lado de las esporas en la superficie del agar. La microaguja se

debe mover en forma de barrida, primero tocando la superficie del agar y luego bajando la aguja en un solo movimiento. Entonces la ausencia de las cuatro esporas en la superficie del agar indica que las mismas han sido transferidas a la punta de la microaguja, la cual se usó como una plataforma de transporte de las esporas. Estas últimas son transferidas a una primera posición sobre el agar, para poder separar al menos una espora del resto y dejarla en dicho sitio. Una técnica que se usa para lograr hacer esto es moviendo la microaguja en la superficie del agar, formando una imagen nítida y un halo del instrumento directamente al lado del grupo de esporas y se hace vibrar la microaguja con un gentil golpeteo en el soporte del microscopio o en la mesa donde está apoyado. Las esporas generalmente van a separarse, por lo que tres esporas pueden ser recolectadas barriendo en la superficie del agar. El proceso se repite en las próximas tres posiciones, separando a las esporas en intervalos de 5 mm aproximadamente. El procedimiento de disección se realizó con un número grande de tétradas de esporas como para que la placa de agar se encuentre cubierta de disecciones.

Es muy importante que se puedan identificar las tétradas ya que van a ser los productos de un evento meiótico, entonces a partir de su disección se pudo seleccionar las dobles mutantes. Luego de haber incubado la placa con las esporas disectadas por 24 horas, se cortó con un bisturí la línea que divide a la mitad la placa, donde se habían sembrado las tétradas en un principio, esto se descartó a modo de que no haya mucho crecimiento y contamine lo demás. Se dejó 48 horas más la placa en la estufa a 30°C, transcurrido este tiempo, se hizo un replica plating en una placa de -LEU, medio mínimo que carece del aminoácido leucina, y en otra placa de YPD agar con antibiótico NAT. Se incubaron las placas a 30°C por 24 horas.

Para poder seleccionar las dobles mutantes, se debe cumplir que de las cuatro esporas disectadas, producto de un evento meiótico, dos de ellas sean las que den lugar a colonias en el medio en ausencia del aminoácido leucina y en el medio con la presencia del antibiótico NAT. Esto implicó el trabajo de comparar cada disección en las dos placas, observando que colonias crecieron, para poder dilucidar en que caso ocurre lo mismo en ambas placas y así seleccionar las dobles mutantes.

### **3.2.2.1.5 Determinación de *mating type* de cepas doble mutantes**

Por último, a partir del par de colonias doble mutantes se busca aislar colonias en una nueva placa de medio mínimo que presente resistencia al antibiótico NAT y no contenga del aminoácido leucina, esta se incuba por 24-48 horas en la estufa a 30°C. Luego se tomó una colonia aislada de cada doble mutante y se determinó su *mating type*, ya que el que nos interesa es el *MAT $\alpha$* . Por lo que, se va a realizar el mismo protocolo de *mating* que se describió en el punto 3.2.2.1.1 de la metodología para ambas cepas doble mutantes con otra cepa que se sabe que es haploide, *MAT $\alpha$*  y que contenga un cassette de selección diferente a los usados (no sea LEU2 ni NAT). Luego se hace la selección de colonias heterocigotas al igual que esta descrito en el punto 3.2.2.1.2, teniendo en cuenta los tres marcadores de selección utilizados, determinando cuál de las cepas doble mutante es *MAT $\alpha$*  dado a que se apareo con la otra cepa *MAT $\alpha$* .

### 3.2.2.2 Background BY4741

Para construir la cepa doble mutante en el *background* BY4741 no se siguió la misma metodología que se describió para w303, ya que las cepas *pil1::LEU2* y *lsp1::NAT* en BY4741 que se construyeron eran del mismo *mating type* (*MATa*), haciendo imposible el apareamiento entre las dos simple mutantes. Por lo que se usó el producto de amplificación del cassette de *NAT* para deletar *LSP1*, que se obtuvo para la construcción de la cepa simple mutante en BY4741 y se transformó en la cepa *pil1::LEU2* de BY4741. Luego se hizo la PCR confirmatoria usando ADN extraído de las colonias obtenidas de la transformación. El procedimiento esta descrito en mayor detalle en ítem 3.2.1 de la construcción de cepas simples mutantes, teniendo en cuenta las diferencias anteriormente mencionadas.

### 3.2.3 Producción de stocks de las cepas generadas

Para tener un *stock* de las cepas, se guardaron en el freezer a -80 °C en medio YPD con 15% de glicerol. Se agregó 2 mL de medio en un criotubo y en condiciones de esterilidad se tomó la cepa de interés con un tip, que fue crecida previamente en una placa YPD agar.

### 3.2.4 Estudio de envejecimiento cronológico

Se estudió el envejecimiento de tipo cronológico (40) en las mutantes de los genes eisosomales (*pil1Δ*, *lsp1Δ* y *pil1Δ lsp1Δ*), junto a la cepa *wild type* y dos cepas control de envejecimiento cronológico (*gph1Δ* y *sch9Δ*), tanto para el *background* genético w303 como para BY4741 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Lista de cepas usadas para los ensayos de envejecimiento cronológico.

Nombre	Background	Genotipo relevante	Fuente
#437	W303; <i>MATa</i>	<i>pil1::LEUca</i>	LBCM-IPMont
#700	W303; <i>MATa</i>	<i>gph1::HIS3</i>	LBCM-IPMont
#851	BY4741	-	LBCM-IPMont
#852	BY4741	<i>gph1::kanMX4</i>	LBCM-IPMont
#1110	W303; <i>MATa</i>	<i>lsp1::NAT</i>	LBCM-IPMont
#1017	W303; <i>MATa</i>	-	LBCM-IPMont
#1197	W303; <i>MATa</i>	<i>pil1::LEU2 lsp1::NAT</i>	Este trabajo
#1218	BY4741	<i>lsp1::NAT</i>	Este trabajo
#1224	BY4741	<i>pil1::LEU2</i>	Este trabajo
#1226	W303; <i>MATa</i>	<i>sch9::NAT</i>	Este trabajo
#1227	BY4741	<i>pil1::LEU2 lsp1::NAT</i>	Este trabajo
#1232	BY4741	<i>sch9::NAT</i>	Este trabajo

### 3.2.4.1 Condiciones de crecimiento para los ensayos

Todos los estudios de envejecimiento cronológico se realizaron en condiciones de cultivo líquido en medio sintético completo (SC). Primero, se sacaron las cepas de levadura congeladas del freezer para crecerlas en placas de YPD agar a 30°C. Al otro día, se inocularon las células en 10 mL de medio SC en tubos Falcons de 50mL y se crecieron *overnight*. Luego de 24 horas, las células se inocularon en 20mL de medio SC en tubos Falcons de 50mL a una OD<sub>600</sub> de 0,250. Los cultivos líquidos se crecieron en estufa a 30°C con agitación (aproximadamente 220rpm). La densidad óptica máxima se logró a las 48 horas de crecimiento en medio SC, por lo tanto, después de tres días de inoculación se consideró el Día 0 del estudio de envejecimiento cronológico.

### 3.2.4.2 Análisis por citometría de flujo

Para el estudio de envejecimiento cronológico se hicieron curvas de viabilidad celular, por lo que se tomaron muestras tres veces a la semana cada dos días hasta que las cepas llegaran a una viabilidad menor a la del 10%. La determinación de viabilidad se realizó tomando una muestra de cada cepa, la cual parte fue usada para medir la OD<sub>600</sub> y el resto para armar las muestras que se pasaron por el citómetro de flujo.

Entonces, primero se midió la OD<sub>600</sub> para poder determinar la concentración de células de levadura por mL de medio de cultivo. Esto se hizo con el fin de determinar que volumen se debe de tomar de la muestra inicial para que las muestras a pasar por el citómetro de flujo estén a una concentración celular de  $4 \times 10^6$  células de levadura por mL de la solución PBS 1X. Habiendo calculado los volúmenes para cada cepa, se procedió a armar dichas muestras con un volumen final de 300  $\mu$ L cada una. Para cada población de levadura, se analizaron tres muestras sin yoduro de propidio, para usar como blanco luego en el procesamiento de datos y tres muestras con el agregado de yoduro de propidio 1,5  $\mu$ M (Fluka #81845) treinta segundos antes de pasarlas por el citómetro.

El análisis de citometría de flujo se realizó en el equipo CyAn™ ADP (DakoCytomation). La excitación se hizo usando un láser a 488nm y la emisión se detectó usando un filtro *bandpass* de 20nm centrado a 613nm. Se estableció como parámetro general que se tomaran 10.000 eventos por muestra pasada en el equipo, a una velocidad entre 200 a 500 eventos por segundo. Se controló que no haya contaminación del cultivo al final del análisis por microscopía y chequeo visual constante.

La estrategia de *gating* que se llevó a cabo para la adquisición de información por citometría de flujo fue realizando un gráfico de *Side Scatter* (SS) en función del *Forward Scatter* (FS), que nos permitió obtener información acerca de la granularidad y el tamaño de cada evento, respectivamente. A partir de dicho gráfico se tomó un *gate* R1, es decir, se seleccionó una población de 10.000 eventos, los cuales se utilizaron para hacer un histograma. En este último, se graficaron los eventos seleccionados en función de la intensidad de la señal del yoduro de propidio. La determinación de los porcentajes de células vivas y células muertas se obtuvieron a partir de dicho histograma, donde se toma la población que genera una mayor intensidad de fluorescencia que corresponde a las células

mueras y la población que genera una menor intensidad de señal correspondiendo a las células vivas, siempre teniendo en cuenta los blancos (Ver Anexo 3).

### 3.2.4.3 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Todos los experimentos para cada *background* genético se realizaron tres veces. El procesamiento de datos generados por el equipo CyAn™ ADP se hizo con el *software* Summit™ versión V4.3, del cual se extrajeron los porcentajes de eventos ioduro de propidio negativos, que son las células viables. Entonces, teniendo como referencia el valor inicial del Día 0 de eventos ioduro de propidio negativos, al cual se lo consideró como un 100% de viabilidad celular de la cepa analizada, se pudo determinar para cada día la viabilidad. Los cálculos de viabilidad celular ( $S_n$ ) y la construcción de gráficas de viabilidad vs tiempo con el desvío estándar se hicieron en el *software* Excel 2010 de Microsoft Office.

$$\text{Viabilidad Día } n = \frac{(\text{IP negativas Día } n \times 100\%)}{\text{IP negativas Día } 0}$$

Además, se calculó el tiempo al que la viabilidad celular llegó a un 50% (*mean time*) y el tiempo máximo de supervivencia (10% de viabilidad) para cada experimento a partir de los gráficos de viabilidad en función del tiempo (44, 70). Ambos tiempos se calcularon usando la curva de ajuste sigmoide de Boltzmann, esto se llevó a cabo usando el *software* Graph Pad Prism 6 (71). El *mean time* es determinado de forma automática con el ajuste de la curva, en cambio el tiempo máximo se calculó usando la ecuación de Boltzmann y despejando X (tiempo), todas las otras variables de la ecuación son determinadas una vez que se hace el ajuste del gráfico.

$$\text{Ecuación de Boltzmann: } Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top}-\text{Bottom})}{1+\exp\left(\frac{V50-X}{\text{Slope}}\right)}$$

Siendo Y en este caso la viabilidad celular (%), *Top* y *Bottom* son los valores máximos y mínimos de viabilidad, V50 es el *mean time*, *Slope* la pendiente del gráfico y X equivale al tiempo en días. Para que no se genere un mal ajuste de curva, ya que no todas las gráficas de viabilidad se ajustan bien con una curva sigmoide, se tomaron solo los casos donde se obtenía una correlación cuadrática ( $R^2$ ) mayor o igual a 0,99. De todas formas, en los casos en que el ajuste falla, el *software* avisa con un cartel que dice que el resultado es ambiguo y da resultados aproximados de las variables. Esto sucedió en algunos casos por lo que no se pudo determinar dichos tiempos a través del ajuste con la ecuación de Boltzmann. En estos casos se tuvo que hacer en forma manual utilizando el gráfico de viabilidad (%) en función del tiempo (días).

La integral de supervivencia (SI) es definida como el área bajo la curva y puede ser estimada por la siguiente fórmula:

$$SI = \sum_{i=2}^n \left( \frac{S_{n-1} + S_n}{2} \right) (\text{día}_n - \text{día}_{n-1})$$

donde día<sub>n</sub> son los días de medición de viabilidad y S<sub>n</sub> es el porcentaje de células de levadura que han sobrevivido hasta ese día. Las curvas de supervivencia para dos cepas de levadura pueden ser comparadas. Para esto se calculó la SI de cada curva de supervivencia (usando S<sub>n</sub> de 100% a 10%) y luego las SIs de las diferentes cepas de levadura fueron comparadas usando la prueba t de dos muestras (40).

La prueba t de dos muestras sirve para comparar las respuestas de dos grupos diferentes de muestras. Las suposiciones que se hacen son que cada grupo es considerado ser una muestra de una población diferente, que las respuestas en cada grupo son independientes de aquellas en otro grupo y que la distribución de las variables de interés es normal (72). Para realizar el test se van a plantear dos hipótesis, una nula y otra alternativa a ser evaluadas con los datos. La hipótesis nula establece que la diferencia entre los dos grupos de datos es 0, en cambio, la alternativa plantea que existe una diferencia entre las medias observadas para las diferentes cepas de levadura. Una vez que se plantean las hipótesis se procede a calcular la estadística-t, para esto se necesita la media de SI ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar de SI (SD) y el número de experimentos (n) de ambas muestras.

Teniendo estos valores de cada muestra se determina t-valor a través de la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left( \frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2} \right)}}$$

Luego, teniendo en cuenta los grados de libertad (k), se compara el t-valor calculado con el t-valor crítico que se extrae de una tabla de distribución t con un nivel de confianza del 95% (Anexo 4, Figura 24) y con dicho resultado se decide cual hipótesis se acepta. La hipótesis nula se rechaza cuando el t-valor calculado > t-valor crítico (72). Los grados de libertad se calcularon como: k= n<sub>1</sub> + n<sub>2</sub> - 2.

### 3.2.5 Determinación del volumen celular de levaduras usando herramientas bioinformáticas

Para llevar a cabo este punto se usó un protocolo de microscopía de epifluorescencia (73, 74), seguido por el análisis de las imágenes adquiridas en los *softwares* (Fiji is Just) ImageJ, Cell-ID versión 0.4 y R versión 3.0.2, que se detalla a continuación (75).

### 3.2.5.1 Adquisición de imágenes por microscopía de epifluorescencia

La determinación de volumen se hizo solo para un ensayo de envejecimiento cronológico en el *background* w303. Para la adquisición de imágenes se usó un objetivo 60X con aceite de inmersión en un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS IX813, usando el *software* ScopePro™ versión 5.0.0.11.

Se enfocaron manualmente las células de levadura en el campo claro y se realizó un *Z-stack* de 8 planos a 0,4  $\mu\text{m}$  de distancia, es decir, se tomó una secuencia de 8 fotos en el plano Z en las condiciones dadas (73, 74). De forma de poder diferenciar las células vivas de las muertas para el posterior procesamiento de imagen, se tiñó antes la muestra con yoduro de propidio a una concentración final de 1,5  $\mu\text{M}$ . Entonces de cada campo que se realizó el *Z-stack* también se sacaron fotos usando el filtro de rodamina, que es a la longitud de onda que se excita el yoduro de propidio. Esta metodología se repitió para las 6 cepas del ensayo de envejecimiento cronológico.

### 3.2.5.2 Procesamiento de imágenes y determinación de volumen celular

Para facilitar el procesamiento de imágenes se hizo el análisis de cada *stack* por separado, teniendo en cuenta la cepa y el día al que corresponde. Se decidió solamente determinar el volumen celular para cuatro porcentajes diferentes de viabilidad celular y de cuatro de las seis cepas, excluyendo del análisis a *gph1 $\Delta$*  y *sch9 $\Delta$* .

Primero se usó el *software* ImageJ en el cual se corrió un filtro a cada *Z-stack*, es decir, en todas las imágenes adquiridas en campo claro. Esto se hizo para corregir iluminación desigual en las imágenes, ya que el siguiente *software* que se usó fue el Cell-ID, el cual trabaja mejor y mejora su desempeño si las imágenes se encuentran homogéneamente iluminadas. Luego, se convirtieron todas las imágenes, esta vez se incluyeron las de fluorescencia, a una calidad de 8 bits porque es lo que lee el *software* Cell-ID. Dicho paso se realizó con la opción *Image/Type*. Lo siguiente que se hizo fue extraer del ImageJ todas las imágenes de campo claro nombradas como BF\_PositionX\_timeY.tif, donde X va a ser el mismo para todas las imágenes dentro de un *Z-stack*, mientras que el Y corresponde al número de plano en el *stack*, como son 8, Y va a ir del 1 al 8. Esto se hizo usando la opción *File/Save as/Image Sequence*, donde se eligió el formato tiff, se escribió BF\_PositionX\_Time siendo X el número de *stack* como ya se explicó y luego se estableció que empiece en 1 y use solo 1 dígito para nombrar las imágenes. De cada imagen de fluorescencia que se tomó por *Z-stack* se generaron 8 copias y se nombraron RFP\_PositionX\_timeY.tif, usando el mismo criterio que para las imágenes de campo claro de forma que por cada imagen del *Z-stack* hubiera una imagen de fluorescencia que le corresponda.

Es importante tomar en cuenta que las imágenes a procesar en el *software* Cell-ID deben de estar dentro de una carpeta en el disco local (C:). Teniendo en cuenta esto último, se cargó las imágenes al *software* Cell-ID usando la opción *Setup/Load Images*, donde se dejan los parámetros que están por *default* en el *software* y se indica el camino donde está la carpeta conteniendo las imágenes del *Z-stack* y de fluorescencia. Como resultado se abrió en una ventana que dentro de la PositionX hay

diferentes timeY con un par de imágenes, una en campo claro y otra de fluorescencia (ver Anexo 5). Luego, se probó con cada timeY la segmentación, esto es la identificación de las células de levadura por el *software*. Entonces se usó la herramienta *Segmentation Setup* y se estableció dentro de *Frame alignment: no frame alignment* y dentro de *Cell alignment: align individual cells*, dejando el resto de los parámetros igual a lo que ya viene por *default* ya que funcionan muy bien para células de levadura y se realizó el *Test Cell-ID*. Este punto fue clave, ya que se hizo el *Test Cell-ID* para los distintos timeY dentro de las imágenes de un *stack* a modo de poder testear la segmentación en cada plano y elegir la mejor imagen para determinar el volumen. El *software Cell-ID* identifica células que estén desenfocadas por lo que se comparó entre los distintos planos cual es el que obtuvo una mejor segmentación, esto se observó viendo que el *software* no tome restos de células como células vivas o la forma en como las toma ya que a veces las selecciona generando una forma deforme que no es real.

Habiendo seleccionado la imagen en campo claro para seguir con la determinación del volumen celular, se realizó la segmentación del timeY que contiene dicha imagen elegida usando la herramienta *Segmentation Setup* pero en vez de seleccionar *Test Cell-ID* se seleccionó la opción *Show Run Dialog*. El *software Cell-ID* automáticamente generó imágenes idénticas a las del timeY escogido, pero se les añade al nombre “.out.tif”, por ejemplo, BF\_Position1\_time1.tif.out.tif y RFP\_Position1\_time1.tif.out.tif. Estas imágenes se guardan en la carpeta que se trabaja, es decir, en donde se seleccionaron las imágenes para cargar al *Cell-ID* inicialmente. Además de las imágenes se crea una carpeta dentro de la carpeta recién mencionada, que contiene archivos con información acerca de las imágenes segmentadas como ser cálculos de variables morfológicas (incluye el volumen) y otras variables específicas de la imagen de fluorescencia. Estos archivos son los que se analizaron en el *software* estadístico R usando el paquete Rcell.

En el paquete Rcell lo primero que se realizó fue el filtrado de las imágenes, ya que a veces cuando se segmentan las células no se puede eliminar la segmentación de otras cosas que no sean células, como por ejemplo una burbuja. También se filtra para solo tomar dentro del análisis las células que hayan sido bien segmentadas ya que es muy difícil que todas las células sean identificadas de la forma correcta y no generándoles otras formas irreales. Esto último ocurre generalmente si las imágenes adquiridas son de acumulaciones de células, por lo que para un mejor análisis es importante que las células no estén en racimos grandes. Luego se arreglaron los valores de fluorescencia de las células muertas, es decir, se les resta la fluorescencia que hay en el *background* de la imagen.

Por último, se extrajo una tabla en formato .csv que permite trabajar en el *software* de Microsoft Office-Excel 2010, la cual contiene el número para cada célula identificada en la imagen con información del volumen y la fluorescencia de la misma. Una gran ventaja que brinda el *software* R es que permite la visualización de las imágenes con todas las células numeradas y los filtros que se le aplican, facilitando así el análisis porque se puede comparar los valores de la tabla que se extrajo con las imágenes. Por último, se seleccionaron todos los volúmenes de las células que no presenten fluorescencia. En los casos que las células tienen valores de fluorescencia intermedios (comparado con fluorescencias altas que siempre corresponden a células muertas) se realizó la decisión de agregarlas al posterior análisis mirando las imágenes en campo claro y fluorescencia con las células numeradas.

Una vez que se obtuvieron un conjunto de valores de volumen de todos los campos tomados para una cepa en determinado día se realiza un promedio de todos los valores y su desvío estándar usando las funciones del Microsoft Office Excel 2010. También se hicieron gráficos de caja para representar la distribución de volumen por cepa a determinada viabilidad celular.

El volumen que es calculado en Cell-ID (variable= sphere.vol) es a través del método de la unión de esferas, el cual se basa en la distribución de esferas que están centradas en todos los posibles pixeles que se encuentran en el plano ecuatorial de la célula identificada en el campo claro y que sus radio son tales que los límites de las esferas solo tocan el límite de las células. La unión de todos los pixeles en estas esferas, encierra un espacio que su volumen es aproximadamente el volumen de la célula.

En el Anexo 5 se encuentran figuras que ayudan a la interpretación del protocolo y los códigos utilizados tanto en ImageJ para el filtro inicial de la iluminación de imágenes como el usado en R.

## 4. RESULTADOS OBTENIDOS

### 4.1 Obtención de cepas mutantes

Se logró obtener de forma exitosa las ocho cepas mutantes (Tabla 3) requeridas para el posterior estudio de envejecimiento.

**Tabla 3.** Lista de cepas mutantes generadas en los dos *backgrounds* genéticos.

Nombre	Background	Genotipo relevante	Fuente
#1197	W303; MATa	<i>pil1::LEU2 lsp1::NAT</i>	Este trabajo
#1217	W303; MATa	<i>sir2::kanMX4</i>	Este trabajo
#1218	BY4741	<i>lsp1::NAT</i>	Este trabajo
#1224	BY4741	<i>pil1::LEU2</i>	Este trabajo
#1225	W303; MATa	<i>hvk2::kanMX4</i>	Este trabajo
#1226	W303; MATa	<i>sch9::NAT</i>	Este trabajo
#1227	BY4741	<i>pil1::LEU2 lsp1::NAT</i>	Este trabajo
#1232	BY4741	<i>sch9::NAT</i>	Este trabajo

Las cepas mutantes que corresponden a la delección de los genes *LSP1* y *PIL1*, como ya se mencionó anteriormente, son los genes que codifican para las proteínas que conforman principalmente a los eisosomas. Por lo tanto, se estudiará y se verá si existe una relación entre dichos genes y el envejecimiento cronológico y replicativo (no en este proyecto) de la levadura. Una de las cepas mutantes de genes eisosomales va a ser doble (*pil1Δ lsp1Δ*). Se planteó generar un mutante de este tipo para poder estudiar el efecto que pueda tener en el envejecimiento y además poder compararlo con las mutantes simples, ya que se pueden observar resultados muy diferentes como ser que no se determine ningún efecto con un simple mutante pero si con el doble, o viceversa, entre otros efectos.

La cepa *sch9::NAT*, se utilizó como control de envejecimiento cronológico, ya que está reportado que las células con la delección en el gen *SCH9* son más longevas (56, 57). El otro control para el envejecimiento cronológico, es decir, la cepa que acorta dicho proceso ya estaba presente en la colección de levaduras del laboratorio (76).

Las cepas *sir2::kanMX4* y *hvk2::kanMX4*, están vinculadas al envejecimiento replicativo y se utilizan como controles, ya que por bibliografía se sabe que la delección de *SIR2* acorta la esperanza de vida (60) y mientras que la delección de *HVK2* la alarga (77). Los ensayos de envejecimiento replicativo no se realizaron en este trabajo, pero las cepas control y las tres mutantes de los genes eisosomales, van a ser usadas por el grupo de investigación de Brian Kennedy del *Buck Institute for Research on Aging*, en EEUU para poder estudiar este tipo de envejecimiento.

A continuación se detallan los resultados generados para llegar a la construcción de las mismas, agrupados dependiendo de la metodología usada para cada una.

#### 4.1.1 Cepas generadas a partir de ADN genómico de otras cepas ya existentes

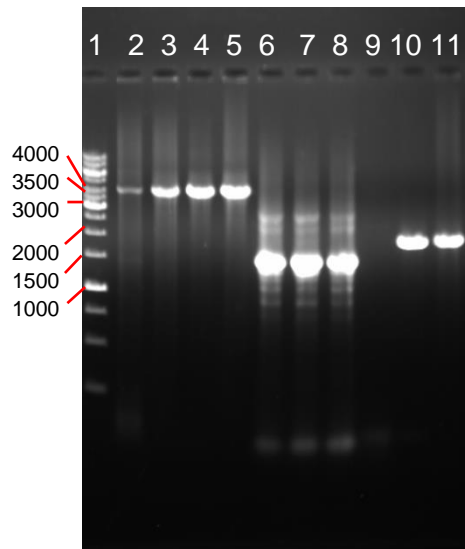
Este punto incluye la construcción de las cepas mutantes de genes eisosomales en BY4741 y *sir2::kanMX4* y *hxx2::kanMX4* en w303.

Para la obtención de las cepas *pil1::LEU2* y *lsp1::NAT* en BY4741 lo primero que se hizo fue la purificación del ADN genómico de las cepas *pil1::LEU2* y *lsp1::NAT* (w303), guardadas en la colección de levaduras del laboratorio. Luego de la extracción de ADN se procedió a determinar la concentración de dichas muestras. Esto dió 417,9 ng/μL para *pil1::LEU2*, 402,3 ng/μL para *lsp1::NAT*.

Se utilizó el cassette de un gen que codifica al aminoácido leucina (*LEU2*) y otro de resistencia a nourseotricina (*NAT*) para la construcción de dichas cepas porque luego en el paso de transformación de levaduras con los productos de amplificación de cassettes se seleccionaron colonias candidatas a ser confirmadas por PCR. La selección se hizo observando que colonias fueron capaces de crecer en un medio de cultivo en ausencia del aminoácido LEU o en un medio con el antibiótico NAT. *S. cerevisiae* tiene una alta capacidad de recombinación homóloga siendo suficientes solamente 45 pares de bases (pb) para que la misma ocurra con eficiencia compatible con su manipulación genética (78). Dado que ya contábamos con cepas delecionadas en los genes de interés, decidimos utilizarlas para obtener productos de PCR que contuvieran extensas zonas de homología (200-300 pb) con el sitio blanco de inserción a fines de aumentar el número de eventos de recombinación homóloga y por lo tanto el número de transformantes correctas obtenidas.

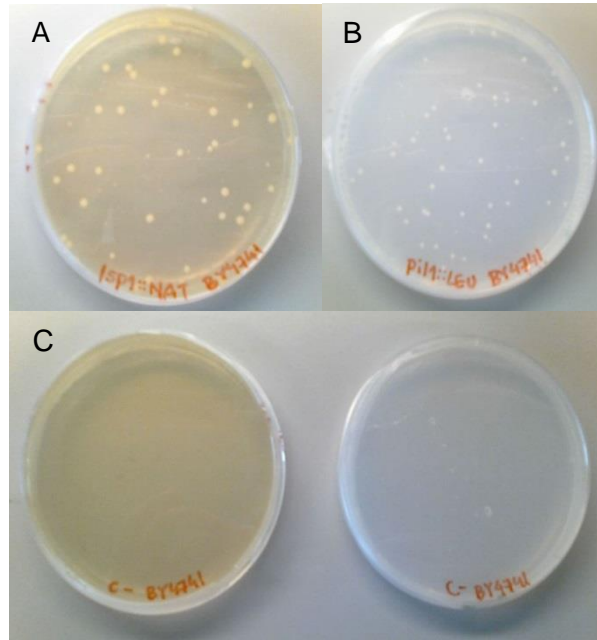
Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR del cassette *LEU2* con extremos homólogos al gen *PIL1* y del cassette de *NAT* con extremos homólogos al gen *LSP1* están representados en la Figura 6. La PCR se llevó a cabo utilizando los *primers* PIL1chkUP y Pil12230Rv, para la amplificación del cassette *pil1::LEU2* y los *primers* 768-LSP1-For y 2340-LSP1-Rev, para la amplificación del cassette *lsp1::NAT* (ver Anexo 2).

En los carriles 2 al 5 se sembraron productos de PCR del cassette completo de *LEU2* flanqueado por secuencias del *locus* del gen *PIL1*, este dio del tamaño de aproximadamente 4000 pb como era de esperarse, ya que si se hubiera amplificado el gen *PIL1* (partiendo de ADN genómico de una cepa *wild type*) el producto sería de un tamaño menor a 1500 pb. Por otro lado, en los carriles 6 al 8 se observan los resultados de los tres productos de amplificación para el cassette de *NAT* flanqueado por secuencias del *locus* del gen *SCH9*, los cuales se mencionarán más adelante para la construcción de *sch9::NAT* en ambos *backgrounds* a partir de ADN plasmídico. Por último, en los carriles 10 y 11 se sembraron los productos de PCR donde se buscó amplificar el cassette de selección *NAT* inserto en el *locus* del gen *LSP1*. El tamaño de la banda observada en el gel es un poco menor a 2000 pb, que es lo esperable ya que el producto debería de ser de 1902 pb. Además, si se hubiese amplificado el gen *LSP1* en vez del cassette de selección se esperaría un producto de tamaño de 1573 pb, por lo tanto se puede confirmar que dichos productos son los de interés. Como se observa en el gel, se realizó más de una reacción de PCR para amplificar los cassettes de deleción, esto se hizo con el fin de asegurarse que haya suficiente reactivo para el próximo paso de transformación. Estos resultados indican que, para cada caso, contamos con suficiente ADN lineal para transformar cepas de levaduras por un doble evento de recombinación homóloga.



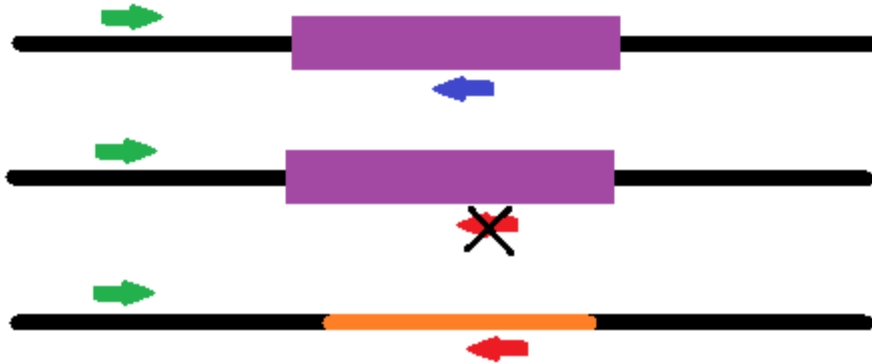
**Figura 6.** Gel de agarosa con los productos de la PCR de amplificación de cassettes de delección, se corrió 1 hora y media a 55 V - 27mA. Carril 1. Marcador de peso molecular (pb). Carriles 2-5. Productos de PCR del cassette de delección *LEU2* dirigido al gen *PIL1*. Carriles 6-8. Productos de PCR del cassette de delección *NAT* dirigido al gen *SCH9*. Carriles 10-11. Productos de PCR del cassette de delección *NAT* dirigido al gen *LSP1*.

Las transformaciones en la cepa *wild type* BY4741 con los productos de PCR *pil1::LEU2* y *lsp1::NAT* de fue exitosa, esto se puede observar en la Figura 7. Para cada caso se realizó la transformación de interés para obtener la cepa mutante y un control negativo.



**Figura 7.** Placas de medios selectivos con los resultados de las transformaciones utilizando los cassettes *lsp1::NAT* y *pil1::LEU2*. A. Placa de medio YPD NAT donde se plaquearon las células *wild type* transformadas con el cassette *lsp1::NAT* para deletar *LSP1*. B. Placa de medio mínimo -LEU donde se plaquearon las células *wild type* transformadas con el cassette *pil1::LEU2* para deletar *PIL1*. C. Placa de medio YPD NAT (izquierda) donde se plaquearon las células *wild type* transformadas con agua (control negativo de B) y placa de medio mínimo -LEU donde se plaquearon las células *wild type* transformadas con agua (control negativo C).

Con el fin de verificar la identidad de las transformantes obtenidas se tomaron algunas de las colonias de la placa de transformación para hacer PCRs confirmatorias. Estas PCRs consisten en tres reacciones: una dirigida a detectar la presencia del cassette mutagénico en la posición esperada usando el ADN de la colonia transformante y las otras están dirigidas a detectar la presencia del *locus* original sin modificar, una usando ADN de la colonia transformante (control negativo) y la otra usando ADN *wild type* (control positivo). Para la primera se utiliza un *primer upstream* del *locus* a modificar y como *primer downstream* se utiliza uno que hibrida solamente en el cassette mutagénico, dichos *primers* son 668-PIL1Check-For y Calb CHK DW para verificar colonias *pil1::LEU2* y 585-LSP1Check-For y NAT checkDW para verificar colonias *lsp1::NAT* (ver Anexo 2). Para las restantes se utiliza el mismo *primer upstream* y como *primer downstream* se utiliza uno que hibride en el *locus* a modificar, PIL1-594-RV y 2340-LSP1-Rev para *PIL1* y *LSP1*, respectivamente. La detección de una banda del peso molecular esperado para la primera PCR y la ausencia de un producto de PCR para el control negativo indica la obtención de la cepa esperada (Figura 8).



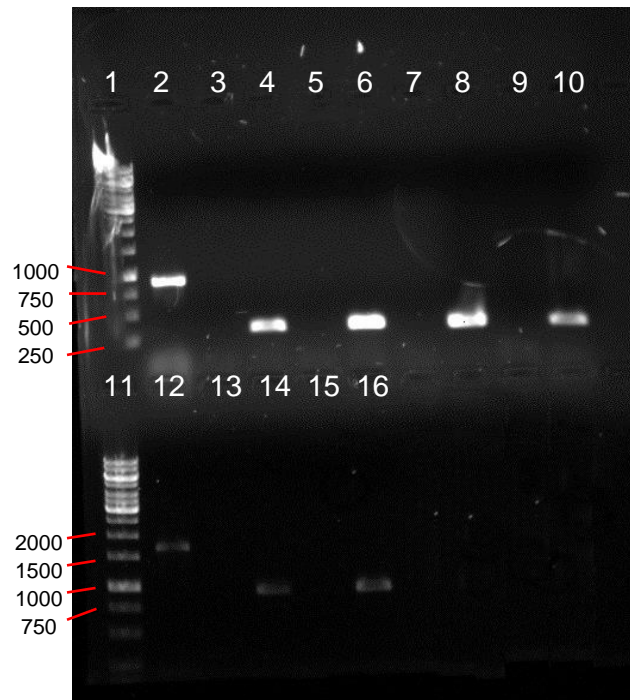
**Figura 8.** Esquema de reacciones de PCR diagnóstica si la colonia transformante es positiva. Para todos casos se usa el mismo *primer forward* (verde), lo que cambia es el *primer reverse* ya que en una se usa uno que hibride solo con el cassette mutagénico (arriba, cassette=violeta, *primer reverse* =azul) y en las otras uno que hibride con el *locus* de interés (medio y abajo, *locus*=naranja, *primer reverse*= rojo).

Los resultados de confirmación de cepas mutantes *pil1::LEU2* y *Isp1::NAT* se pueden observar en la Figura 9. En los carriles del 2 al 10 están los resultados de la confirmación de 4 colonias que tienen *PIL1* mutado. La reacción del control positivo dio del tamaño esperado (927 pb, carril 2). En los carriles donde se sembró las mezclas control negativas dieron ausencia de banda que es lo esperado, ya que si la recombinación homóloga no se hubiese dado se vería una banda de 927 pb. Para los carriles restantes del caso *pil1::LEU2*, donde se sembraron las reacciones de PCR que confirman si los cassettes de selección recombinaron adecuadamente o no, en todos los casos dio una banda de aproximadamente 450 pb. Esto era lo que se esperaba si el cassette recombinaba de forma correcta. En conclusión, las cuatro colonias verificadas por la PCR confirmatoria dieron positivas, se eligió una de las mismas para generar el *stock*.

En el caso de *Isp1::NAT*, se probó con 2 colonias que fueron productos de la transformación. El control positivo de la PCR dio como se esperaba un producto de tamaño de aproximadamente 1715 pb (carril 12). En los controles negativos se observa la ausencia de banda en ambos casos que es lo correcto si la recombinación homóloga del cassette se dio bien, de no ser así debería de haber aparecido una banda del mismo tamaño que la del control de la PCR.

Por último, en los carriles en los que se sembraron los productos de PCR que amplificaban contra el cassette de selección, dieron una banda de aproximadamente 944 pb indicando que dichos cassettes se introdujeron correctamente. Tomando en cuenta todos los resultados se concluye que ambas colonias son *Isp1::NAT*, por lo que se selecciona una y se congela como *stock*.

Para la construcción de *sir2::kanMX4*, *hxx2::kanMX4* en w303 y la doble mutante *pil1::LEU2 Isp1::NAT* en BY4741 se siguió la misma metodología (ver en métodos ítem 3.2.1 y ítem 3.2.2.2), por lo que los resultados obtenidos son muy similares a los presentados anteriormente para *pil1::LEU2* y *Isp1::NAT* en BY4741.

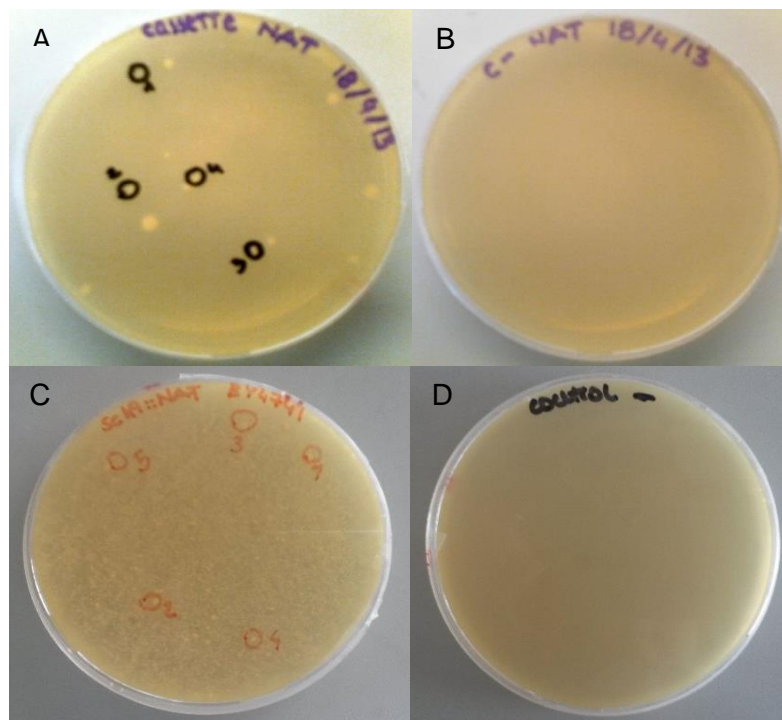


**Figura 9.** Gel de agarosa con resultados de la PCR confirmatoria de *pil1::LEU* y *lsp1::NAT* usando 4 y 2 colonias productos de la transformación, respectivamente, se corrió por 1 hora y 20 minutos a 55V-29 mA. Carril 1. Marcador de peso molecular (pb). Carril 2. Producto de PCR control positivo, donde se usa ADN sin la deleción de interés y un *primer reverse* contra el ORF de *PIL1*. Carril 3. Producto de PCR control negativo de la colonia 1, donde se usa el ADN extraído de dicha colonia y el mismo *primer reverse* del control positivo. Carril 4. Producto de PCR que uso como molde el ADN extraído de la colonia 1 y un *primer reverse* contra el cassette de deleción, por lo que confirma que dicho cassette se haya insertado de forma correcta. Carril 5. Producto de PCR control negativo de la colonia 2. Carril 6. Producto de PCR contra el cassette de deleción usando ADN extraído de la colonia 2. Carril 7. Producto de PCR control negativo de la colonia 3. Carril 8. Producto de PCR contra el cassette de deleción usando ADN extraído de la colonia 3. Carril 9. Producto de PCR control negativo de la colonia 4. Carril 10. Producto de PCR contra el cassette de deleción usando ADN extraído de la colonia 4. Dieron todas las colonias positivas a la mutación *pil1::LEU2*. Carril 11. Marcador de peso molecular (pb). Carril 12. Producto de PCR control positivo, donde se usa ADN sin la deleción de interés y un *primer reverse* contra el ORF de *LSP1*. Carril 13. Producto de PCR control negativo de la colonia 1. Carril 14. Producto de PCR contra el cassette de deleción usando ADN extraído de la colonia 1. Carril 15. Producto de PCR control negativo de la colonia 2. Carril 16. Producto de PCR contra el cassette de deleción usando ADN extraído de la colonia 2. Ambas colonias dieron positivas a la mutación *lsp1::NAT*.

#### 4.1.2 Cepas obtenidas a partir de ADN plasmídico

Las únicas cepas que se construyeron a partir del plásmido pFA6a natNT2 fueron *sch9::NAT* para ambos *backgrounds* genéticos, ya que no se contaba con una cepa de otro *background* con dicha mutación. El plásmido pFA6a-natNT2 porta el cassette que permite la resistencia al antibiótico NAT sin incluir secuencia homóloga alguna al gen *SCH9* (o cualquier otro gen en particular) por lo que las zonas de homología que posibilitan los dos eventos de recombinación homóloga necesarios para la mutagénesis son aportadas por los 45 nucleótidos del extremo 5' de cada *primer* utilizado para obtener el producto de PCR específico para deletar el gen *SCH9* (*primers* SCH9-S1 y SCH9-2, ver Anexo 2).

Primero, se determinó la concentración a la que estaba el plásmido en la solución de almacenamiento, que fue de 314 ng/μL. A partir de esto se hizo la PCR para amplificar el cassette de *sch9::NAT*. En la Figura 6, carriles del 6 al 8, se observan los resultados obtenidos de la amplificación del cassette *NAT* dirigido al gen *SCH9*. Las bandas dieron de un tamaño menor a las 1500pb, lo cual es correcto, ya que se espera que el tamaño del producto sea de 1450 pb. Seguido, se hizo la transformación con dichos productos de PCR en w303 y BY4741 (Figura 10).



**Figura 10.** Placas de medios selectivos con los resultados de las transformaciones utilizando el cassette *sch9::NAT*. A. Placa de medio YPD NAT donde se plaquearon las células w303 *wild type* transformadas con el cassette *sch9::NAT* para deletar *SCH9*. B. Placa de medio YPD NAT donde se plaquearon las células w303 *wild type* transformadas con agua (control negativo de A). C. Placa de medio YPD NAT donde se plaquearon las células BY4741 *wild type* transformadas con el cassette *sch9::NAT* para deletar *SCH9*. D. Placa de medio YPD NAT donde se plaquearon las células BY4741 *wild type* transformadas con agua (control negativo de C).

Con el fin de verificar la identidad de las transformantes obtenidas se realizaron PCRs confirmatorias con 4 colonias obtenidas de la placa de transformación de la cepa *sch9::NAT* en w303 (Figura 11).

El producto de la reacción control positivo dió una banda aproximada a 711 pb que es el tamaño esperado (carril 2). Luego en los carriles donde se sembraron los controles negativos de cada colonia se observa que en tres de ellos, los carriles 3, 6 y 9, se obtuvo una banda de aproximadamente 711 pb, lo que indica que el cassette de selección no recombinó en el *locus* de interés. En cambio, en el carril 12, correspondiente al control negativo de la colonia 4, no hay presencia de banda que es lo esperado si la delección en el gen *SCH9* se haya generado correctamente. Por último, en los carriles restantes que confirman la integración del cassette en el ORF del gen dieron ausencia de banda a excepción del 13, en el cual se observa un producto de tamaño mayor al antes observado que se aproxima a las 869 pb. Esto confirma que la única colonia *sch9::NAT* es la número 4.



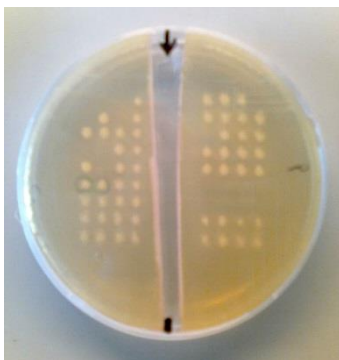
**Figura 11.** Gel de agarosa con resultados de la PCR confirmatoria de *sch9::NAT* usando 4 colonias productos de la transformación, se corrió por 1 hora y 10 minutos a 55V, 29mA. Carril 1. Marcador de peso molecular (pb). Carril 2. Producto de PCR control positivo. Carril 3. Producto de PCR control negativo de la colonia 1. Carril 4. Producto de PCR que uso como molde el ADN extraído de la colonia 1 y un primer reverse contra el cassette de delección, por lo que confirma que dicho cassette se haya insertado de forma correcta. Carril 6. Producto de PCR control negativo de la colonia 2. Carril 7. Producto de PCR contra el cassette de delección usando ADN extraído de la colonia 2. Carril 9. Producto de PCR control negativo de la colonia 3. Carril 10. Producto de PCR contra el cassette de delección usando ADN extraído de la colonia 3. Carril 12. Producto de PCR control negativo de la colonia 4. Carril 13. Producto de PCR contra el cassette de delección usando ADN extraído de la colonia 4. Solo dio positiva la colonia número 4.

Para la cepa *sch9::NAT* en BY4741 se obtienen resultados muy similares de la PCR confirmación, por lo que no se van detallar en el trabajo. En base a los resultados descritos concluimos que se ha logrado obtener las cepas con el gen SCH9 mutado en ambos *backgrounds* genéticos.

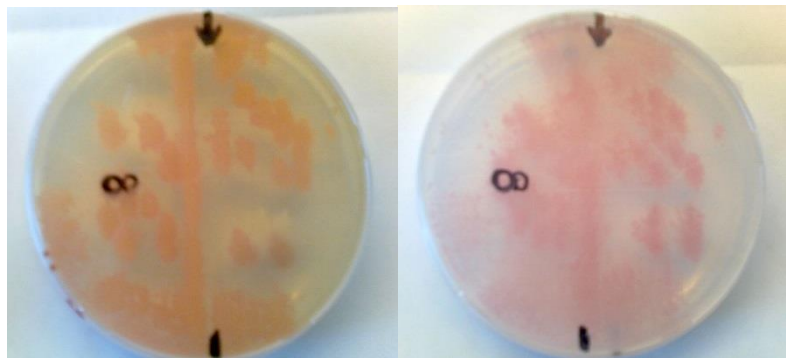
#### 4.1.3 Cepa obtenida a partir de la disección de ascosporas.

La cepa doble mutante para los genes *PIL1* y *LSP1* en el *background* genético w303, se hizo a través partir de método de apareamiento, selección de diploides seguido de esporulación y disección de esporas (ver ítem 3.2.2.1). En la Figura 12 se observa la placa de YPD con el crecimiento de colonias en los lugares donde se disecaron esporas. Al no ser un medio selectivo, se espera que por cada tétrada disecada, crezcan 4 colonias correspondientes a cada espora. Para realizar la selección de la cepa *pil1::LEU2 lsp1::NAT*, se compararon las placas de la Figura 13, que son las réplicas en medios selectivos, con la placa de la Figura 12, donde se debe cumplir que de las cuatro esporas disectadas, dos de ellas sean las que den lugar a colonias en el medio en ausencia del aminoácido LEU y en el medio con la presencia del antibiótico NAT.

Las fotos de las placas en la Figura 13 fueron tomadas dos días después de realizada la selección, por lo que hay un sobrecrecimiento de las colonias y no está muy claro a la vista para poder comparar cual par de colonias pertenecientes a una misma tétrada creció en ambos medios de selección. Sin embargo, en ambas placas se marcó la selección del par de doble mutante seleccionadas. Luego se re-aislaron en placas de medio selectivo y se determinó el *mating type* de cada una (ver ítem 3.2.2.1.5). Se concluye que se logró construir la cepa doble mutante de los genes eisosomales en el *background* w303 de forma exitosa.



**Figura 12.** Placa de YPD con colonias crecidas a partir de esporas disecadas.



**Figura 13.** Placas réplica de la placa de la Figura 12, a la izquierda la placa es de medio YPD NAT y a la derecha medio mínimo -LEU. Se seleccionan el par de dobles mutantes con los círculos en marcador negro, ya que son las colonias que a partir de la misma tétrada de esporas crecen en ambas placas.

## 4.2 Resultados de los ensayos de envejecimiento cronológico

Una vez obtenidas todas las cepas necesarias se ejecutaron los ensayos de envejecimiento cronológico mediante citometría de flujo. Es importante destacar que estos ensayos comprenden la instalación y seguimiento de cultivos celulares por el plazo de al menos 7 semanas. La obtención de datos de citometría de flujo se realizó en colaboración con la Unidad de Biología Celular del IPMont.

### 4.2.1 En el *background* w303.

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes en w303 y se observó que a pesar que los resultados son bastante variables si se comparan los experimentos, siempre existe la misma tendencia en las curvas de viabilidad de cada cepa (Figura 14).

**Tabla 4.** Promedio del tiempo máximo de supervivencia (Tiempo máximo) y tiempo al que la viabilidad celular es del 50% (*Mean Time*) entre los tres experimentos independientes para todas las cepas estudiadas en w303 con sus desvíos estándar (SD).

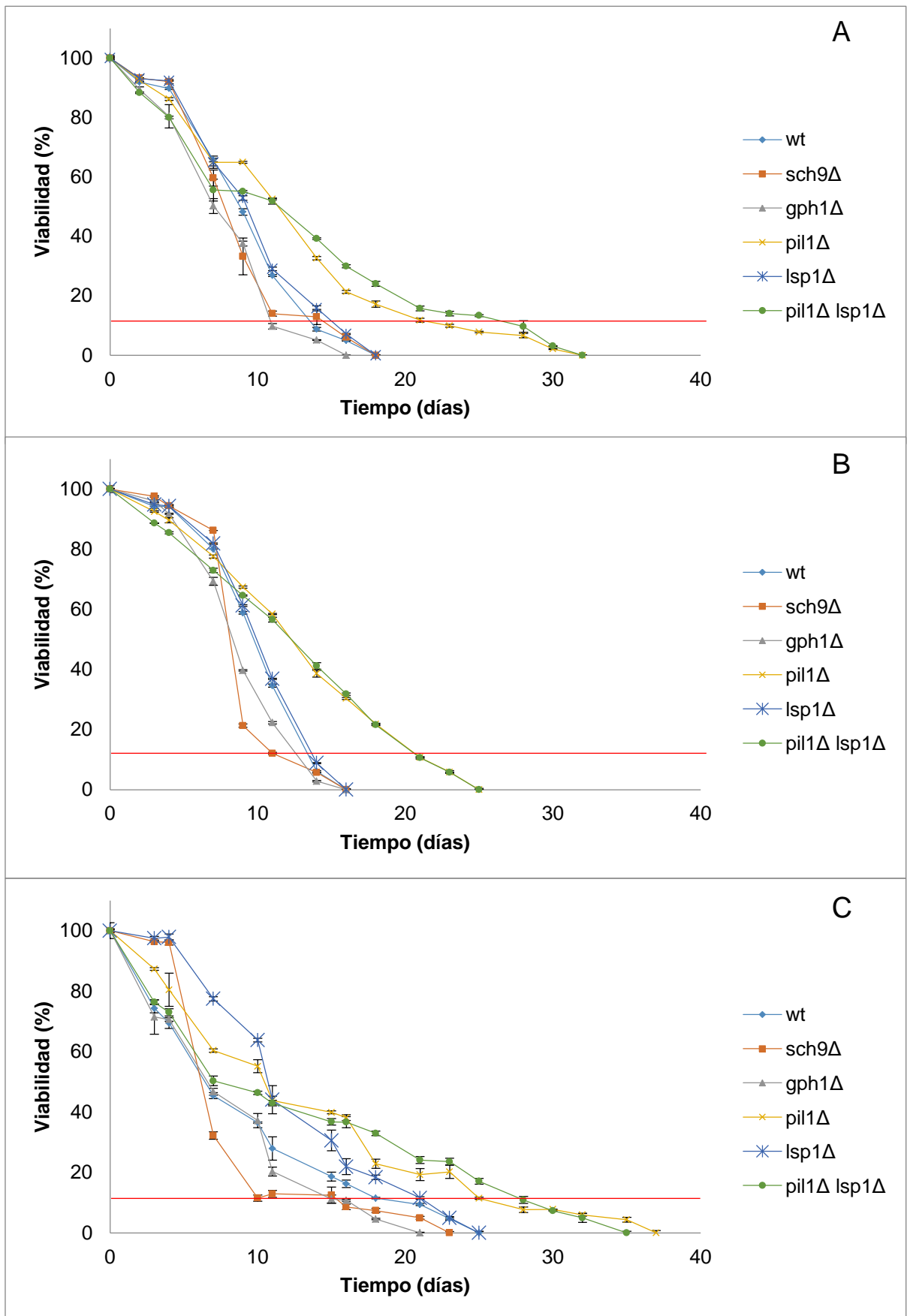
Cepa	Mean Time	SD mean time	Tiempo máximo	SD Tiempo máximo
<i>wild type</i>	8,5	1,8	15,8	3,9
<i>sch9Δ</i>	7,2	0,9	12,9	2,4
<i>gph1Δ</i>	7,2	1,2	12,9	2,1
<i>pil1Δ</i>	10,6	1,2	22,9	2,3
<i>lsp1Δ</i>	9,5	0,8	17,0	4,3
<i>pil1Δ lsp1Δ</i>	10,0	2,6	25,6	3,7

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos de los tres experimentos independientes. Los genes *SCH9* y *GPH1*, como ya se mencionó anteriormente, está reportado que son capaces de alterar el envejecimiento cronológico. Se ha descubierto que la delección en el gen *SCH9* permite una extensión en este tipo de envejecimiento (56, 57), mientras que la delección del gen *GPH1* lo acorta (76), por lo que se usaron como controles además de la cepa *wild type*. En los gráficos se observa que la cepa con la delección del gen *GPH1* (*gph1Δ*) acorta el envejecimiento cronológico, tal como la bibliografía lo describe (76). En cambio, para la cepa *sch9::NAT* no se logró reproducir lo visto en la bibliografía, ya que parece ser la cepa *sch9::NAT* tiene un promedio de tiempo máximo de supervivencia igual al de la cepa *gph1::HIS3* de aproximadamente 13 días, el cual es un poco menor al de la cepa *wild type* (Tabla 4). La cepa *wild type* w303 llega a un 10% de viabilidad entre los días 13 - 20 dependiendo del experimento, si se lo compara con la bibliografía se observa que los valores no son tan diferentes (40, 76).

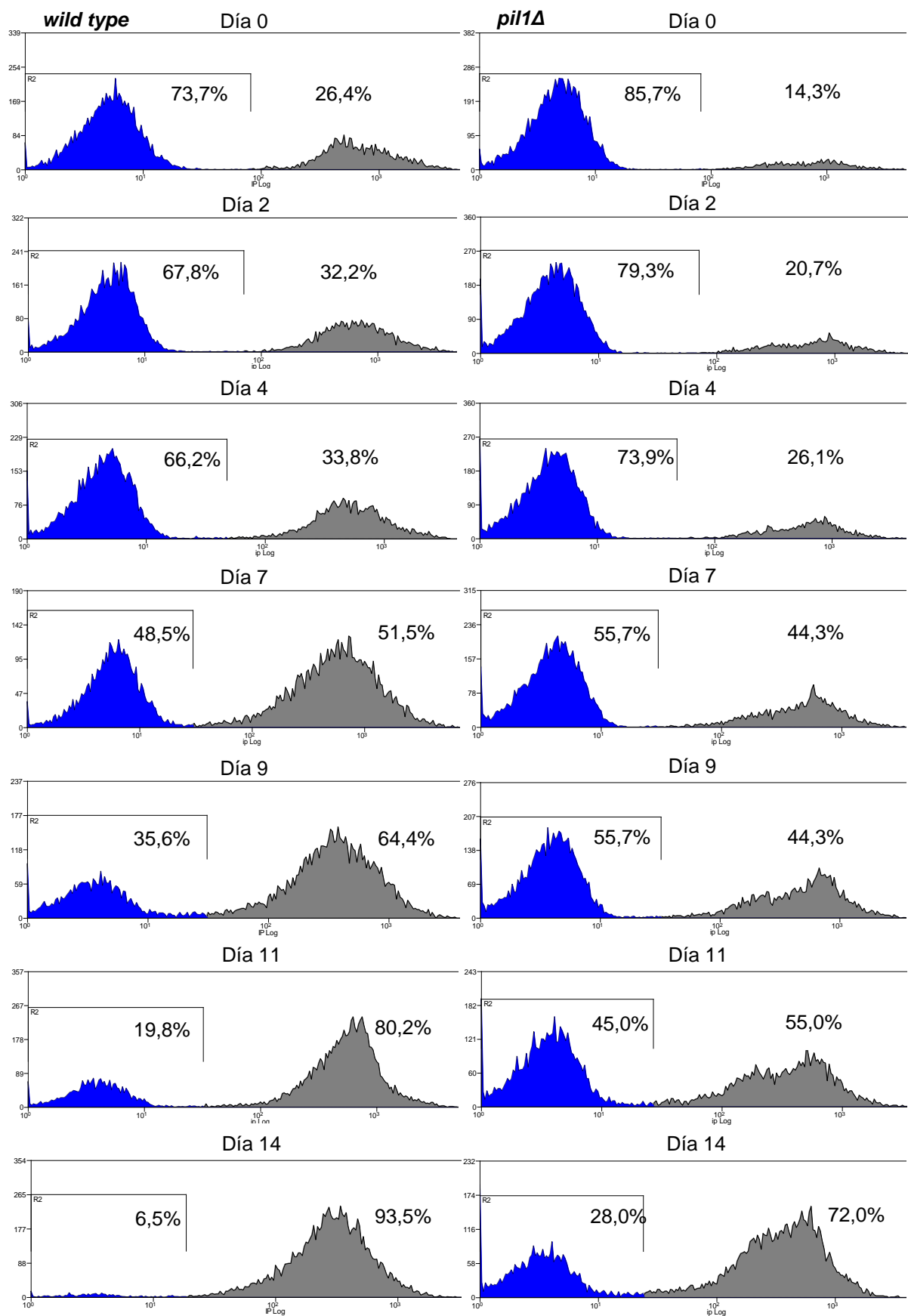
Por otro lado, las cepas mutantes de los genes que codifican para el núcleo estructural de los eisosomas dieron resultados interesantes. Según lo obtenido se puede extraer que la delección del gen *LSP1* no afecta el envejecimiento del tipo cronológico en w303, ya que la curva de viabilidad a lo largo de los días fue muy similar a la de la cepa *wild type*. Además, la comparación de los tiempos máximos y los tiempos a los que los cultivos llegan a un 50% de viabilidad son muy parecidos (Tabla

4). Esto último se verificó con el test estadístico, el cual dio que la hipótesis nula no se rechazaba, es decir, no hay una diferencia entre los datos obtenidos para ambas cepas ( $t_{\text{calculado}}=1,54 < t_{\text{valor crítico}}=2,132$ ; para  $k=4$  e  $IC=95\%$ ).

En cambio, cuando se deleta el gen *PIL1* se observa una extensión en el tiempo de vida cronológico en comparación con la cepa *wild type*. Este mismo comportamiento lo presenta la cepa doble mutante, por lo que se podría sugerir que es la ausencia de *PIL1* lo que genera dicha longevidad en las células. En la Figura 15 se puede observar como el cultivo de las células *wild type* vs *pil1::LEU2* va perdiendo viabilidad a lo largo de los días de uno de los experimentos, diagramado con histogramas de la distribución de intensidades de fluorescencia que es como se extrae la información que lee el citómetro. Se ve claramente como al Día 14 la viabilidad del cultivo de la cepa *wild type* es casi nula, en cambio, el cultivo con la cepa mutante con la delección en el gen *PIL1* tiene aproximadamente un 30% de células vivas y llega alrededor del Día 28 a tener una viabilidad comparable a la de la *wild type* en el Día 14. Se realizó la prueba t de dos muestras para ambas mutantes comparadas con la cepa *wild type* y se vio que en los dos casos la hipótesis que se cumple es la alternativa. Por lo que se puede concluir que en comparación con la cepa *wild type* de *background* genético w303 la ausencia de *PIL1* enlentece el envejecimiento cronológico ( $t_{\text{calculado } pil1\Delta/wt}=6,99 > t_{\text{valor crítico}}=2,132$ ;  $t_{\text{calculado } pil1\Delta/sp1\Delta/wt}=9,7 > t_{\text{valor crítico}}=2,132$ ; para  $k=4$  e  $IC=95\%$ ).



**Figura 24.** Gráficos de viabilidad celular (%) vs tiempo (días) de los ensayos de envejecimiento cronológico en el *background* w303. A, B y C corresponden a los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente y la línea horizontal roja indica el 10% de viabilidad celular.



**Figura 15.** Histograma de número de eventos vs LogIP (Intensidad de señal de Ioduro de Propidio) correspondiente al experimento 2, se indican los porcentajes de IP negativos (células vivas, indicadas en azul) y los IP positivos (células muertas, indicadas en gris) de los ensayos de envejecimiento cronológico en el *background* genético w303 para la cepa *wild type* (izquierda) y *pil1::LEU2* (derecha).

#### 4.2.2 En el *background* BY4741

De manera similar a lo hecho con el *background* w303, para el *background* BY4741 se realizaron tres experimentos independientes. Al igual que en w303 se observa una gran variabilidad entre cada ensayo en las curvas de viabilidad.

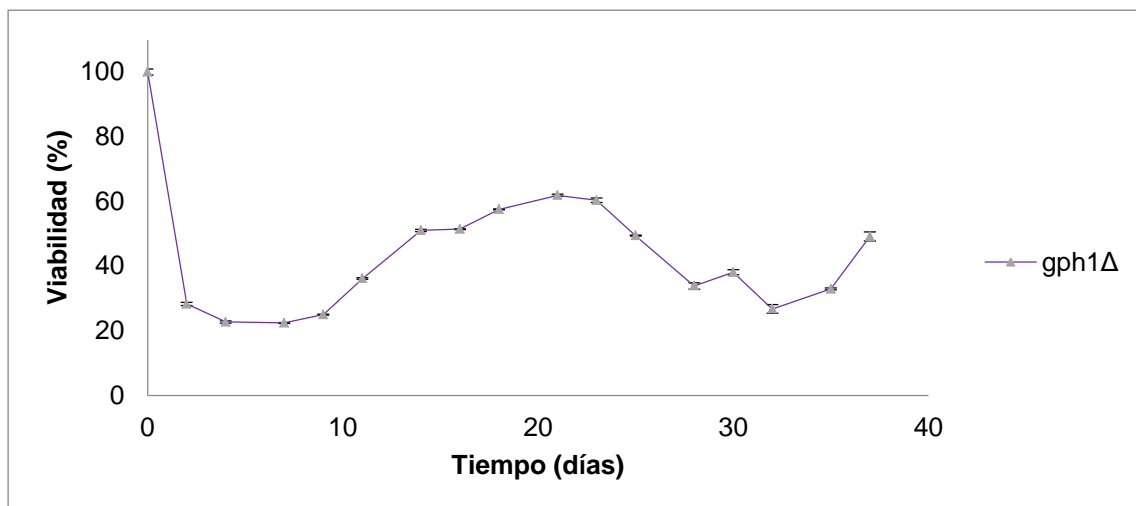
En primer lugar se vio que el envejecimiento de tipo cronológico de la cepa BY4741 *wild type* es más extenso que el de su equivalente en el *background* w303 (comparar valores de Tablas 4 y 5), lo cual no es lo visto en la bibliografía (40). Naturalmente esto llevó a que los experimentos de envejecimiento cronológico con esta cepa demandaran mayor tiempo de seguimiento, de 25-35 días para las cepas de *background* w303 a 60-70 días para las cepas de *background* BY4741.

**Tabla 5.** Promedio del tiempo máximo de supervivencia (Tiempo máximo) y tiempo al que la viabilidad celular es del 50% (*Mean Time*) entre los tres experimentos independientes para todas las cepas estudiadas en BY4741 con sus desvíos estándar (SD).

Cepa	<i>Mean Time</i>	SD <i>Mean Time</i>	Tiempo máximo	SD Tiempo máximo
<i>wild type</i>	18,0	5,7	38,6	13,5
<i>sch9Δ</i>	18,8	6,8	37,9	15,0
<i>pil1Δ</i>	38,5	2,6	61,3	1,4
<i>lsp1Δ</i>	20,3	5,5	49,7	17,3
<i>pil1Δ lsp1Δ</i>	27,7	9,5	65,3	2,1

Como en el otro *background*, la cepa *sch9::NAT* no tuvo un efecto más longevo como era de esperarse, sino que fue la cepa con el envejecimiento más acelerado, teniendo en cuenta el promedio de tiempo máximo calculado.

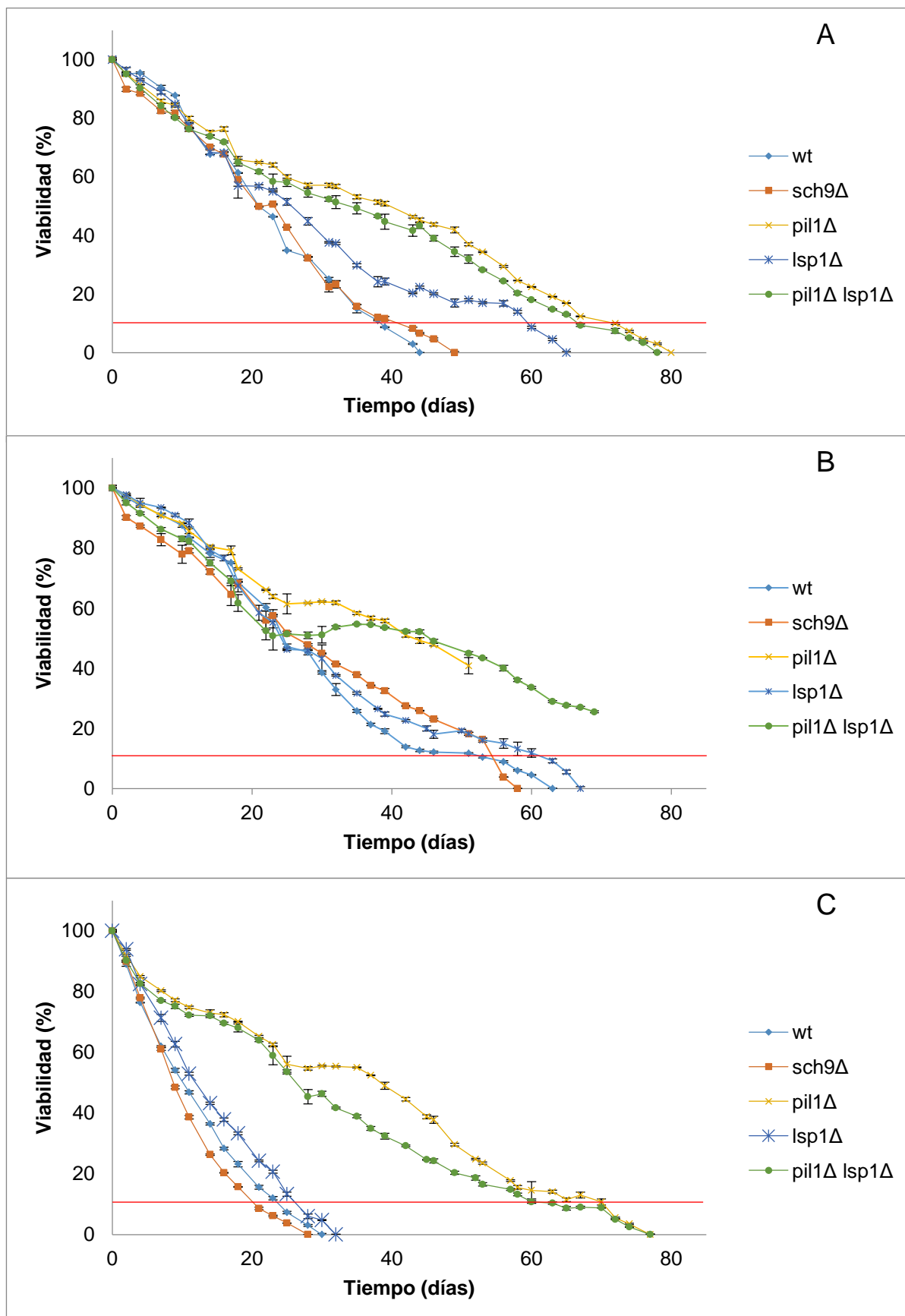
En ninguno de los ensayos se logró obtener una curva normal de envejecimiento para la mutante *gph1::kanMX4* (Figura 16). Esto se ha debido a que se registraron grandes oscilaciones en la viabilidad celular, es decir, la misma aumentó y disminuyó al pasaje del tiempo. Esto generó muchas interrogantes ya que se trabajó en condiciones de fase estacionaria, por lo cual no es normal observar aumentos de viabilidad tan pronunciados y además se descartó la posibilidad de la existencia de contaminación a través de los controles mencionados en el ítem 3.2. En la discusión se detallará más las razones por las cuales se cree que ha ocurrido esto.



**Figura 16.** Ensayo cronológico número 1 de la cepa *gph1::KanMX4* en BY4741, se observan las oscilaciones de % de viabilidad en función del tiempo.

Para el caso de las cepas mutantes de los genes que codifican el núcleo estructural de los eisosomas, se observaron resultados similares a los obtenidos con las mismas mutantes en el *background* genético w303 (comparar Figuras 14 y 17). El gen *LSP1* no afecta el envejecimiento cronológico ya que la cepa *Isp1::NAT* exhibe curvas de viabilidad muy similares a las de la cepa *wild type*, a excepción del primer ensayo donde dicha mutante muestra un envejecimiento más prolongado que la cepa *wild type*. Sin embargo, si se toman en cuenta los tres experimentos independientes no se observa en todos este mismo comportamiento, por lo que podría tratarse de que el cultivo utilizado en el primer experimento estuviese menos estresado que el resto de los cultivos empleados en el mismo experimento. Además, se realizó el test estadístico entre las cepas *Isp1::NAT* y *wild type*, obteniendo como resultado que se cumple la hipótesis nula, es decir, no hay diferencia significativa entre esas medidas ( $t_{\text{calculado}}=0,52 < t_{\text{valorcritico}}=2,132$ ; para  $k=4$  e  $IC=95\%$ ). En cambio, tanto las cepas *pil1Δ* como *pil1Δ Isp1Δ* presentan una extensión en este tipo de envejecimiento (Tabla 5, Figura 17). Para estos casos también se llevó a cabo el test estadístico para ver si realmente existe una diferencia entre la cepa *wild type* y las mutantes *pil1Δ* y *pil1Δ Isp1Δ*. El test dio como resultado, al igual que en el *background* w303, que hay una diferencia entre las medidas ( $t_{\text{calculado}pil1Δ/wt}=3,3 > t_{\text{valorcritico}}=2,353$ ;  $t_{\text{calculado}pil1ΔIsp1Δ/wt}=3,27 > t_{\text{valorcritico}}=2,353$ ; para  $k=3$  e  $IC=95\%$ ).

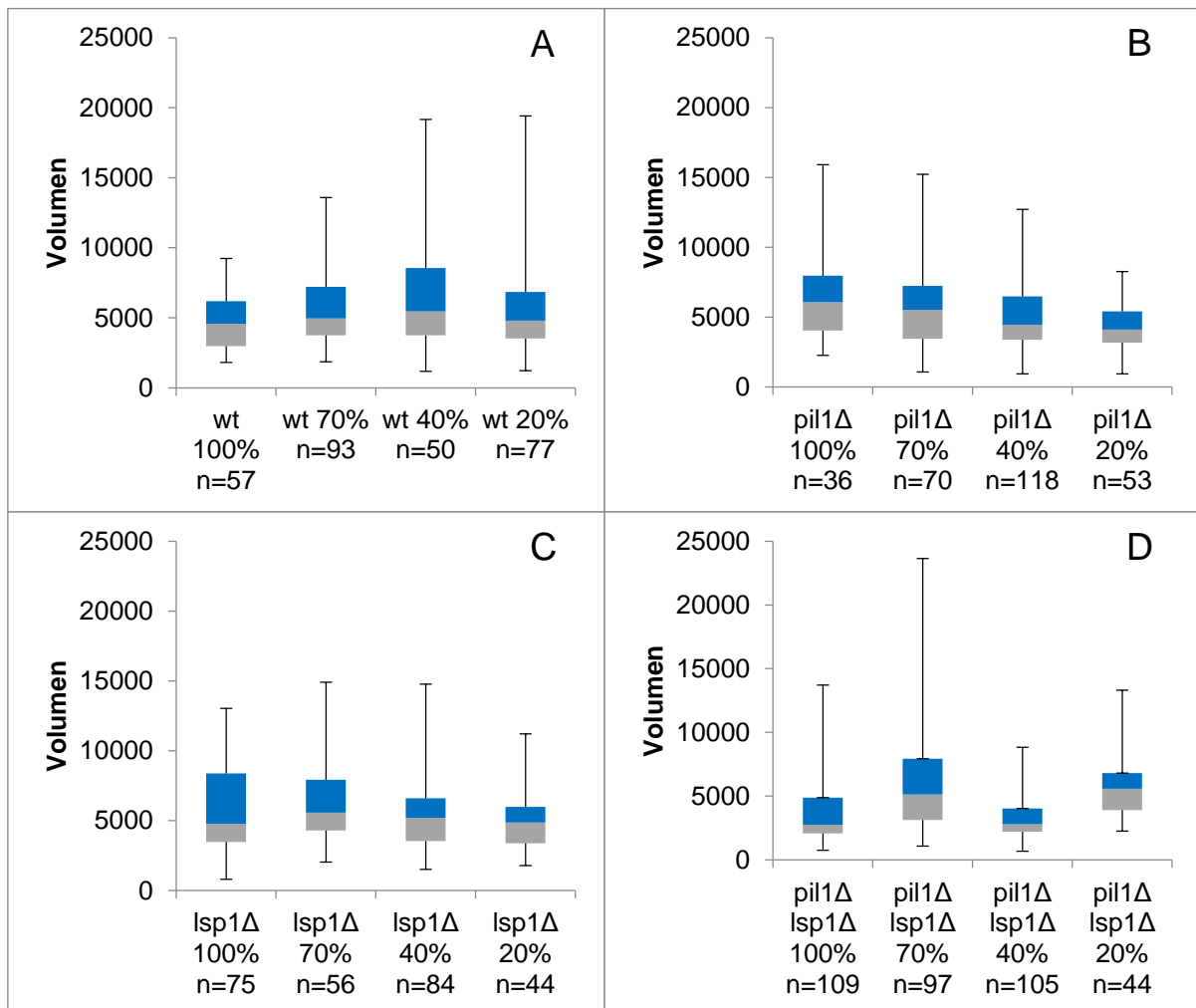
Si se comparan los ensayos se observa que en el primero y segundo las cepas en general tenían una mayor resistencia a la senescencia, al parecer no estaban tan estresadas las células como en el último ensayo. A diferencia de los estudios realizados en w303, se contaminaron algunas cepas en el transcurso de los experimentos, lo cual afecta el hecho de no poder tener la totalidad de las curvas de viabilidad de tres experimentos independientes de cada cepa para el análisis de datos. De todas formas, si hemos podido registrar para todas las cepas en todos los experimentos la viabilidad hasta llegar a un 50% llegando a las mismas conclusiones respecto a la influencia de la delección del gen *PIL1* sobre el envejecimiento cronológico. Por ejemplo, para el caso del segundo experimento con las curvas de las cepas *pil1Δ* y *pil1Δ Isp1Δ* sin terminar (ver Figura 17) se puede observar que las mismas disminuyen su viabilidad mucho más lento que las demás, lo cual es coherente con lo visto en los otros ensayos.



**Figura 37.** Gráficos de viabilidad celular (%) vs tiempo (días) de los ensayos de envejecimiento cronológico en el *background* genético BY4741. A, B y C corresponden a los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente y la línea roja horizontal indica el 10% de viabilidad celular.

### 4.3 Determinación de volumen celular de cepas del experimento 3 en w303.

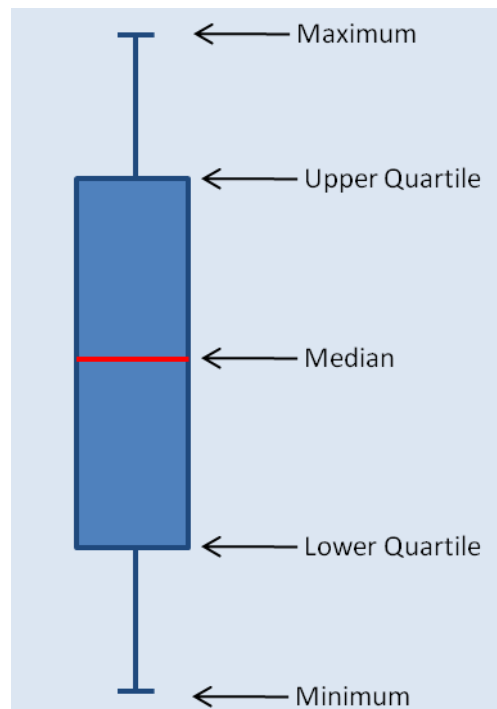
Al haber obtenido resultados interesantes con respecto a las mutantes eisosomales *pil1::LEU2* y *pil1::LEU2 lsp1::NAT* se investigó la morfología básica de las distintas cepas midiendo el volumen de las células sobrevivientes de manera de ver si variaciones en el mismo se relacionan al comportamiento visto en los ensayos de envejecimiento cronológico.



**Figura 18.** Gráficos de caja que muestra la distribución de células respecto al volumen celular (en unidades arbitrarias) a cuatro puntos de viabilidad diferentes (100%, 70%, 40% y 20%) de la cepa *wild type* (A), *pil1*Δ (B), *lsp1*Δ (C) y *pil1*Δ *lsp1*Δ (D). Los cultivos corresponden a los empleados para el ensayo número 3 de envejecimiento cronológico en w303. n=número de células usadas para el análisis.

Los resultados que corresponden a este punto se representaron en gráficos de caja (Figura 18). Se escogió esta representación de datos dado a que si se reportaba el promedio con su desvío estándar no sería un resultado representativo de las muestras, ya que la desviación estándar da números muy altos llegando al mismo orden que el promedio. Esto se debe a que se calculó el volumen tanto para células hijas como para células madres, por lo que es esperable esta gran variabilidad en los datos obtenidos.

Los gráficos de caja se basan en cuartiles, como se observa se compone de una caja y dos “brazos” (Figura 19). El extremo superior corresponde al valor máximo determinado de volumen, de forma contraria el extremo inferior del grafico es el valor mínimo de volumen calculado. La mediana, que está representada como la línea que divide la caja en dos colores, representa el valor de la variable de posición central en el conjunto de datos ordenados. Por último, los extremos de la caja (la cual representa el rango intercuartil o IQR) son el cuartil 3 o percentil 75 (superior) y el cuartil 1 o percentil 25 (inferior) que corresponden al 75% y al 25% de los datos, respectivamente. Por lo que los valores que se encuentran dentro de la caja son el 50% del total que se midió (79).



**Figura 19.** Interpretación de un gráfico de cajas (79).

Con respecto a lo observado en la Figura 18, los volúmenes de la cepa *wild type*, *isp1Δ*, *pil1Δ* y *pil1Δ /isp1Δ* no parecen presentar diferencias significativas a medida que la viabilidad celular disminuye. Además, si se comparan las distintas cepas a una misma viabilidad celular se va a observar que aproximadamente todas tienden a la misma medida de volumen. Por lo que de estos resultados se puede concluir que esta variable morfológica no parece estar relacionada al envejecimiento cronológico de las cepas de interés.

## 5. DISCUSIÓN

Los eisosomas son grandes ensamblajes proteicos citoplasmáticos que organizan dominios de la membrana plasmática de *S.cerevisiae*, compuestos por dos principales proteínas parálogas, Pil1 y Lsp1. Algunas evidencias, anteriormente nombradas, apuntan a que dichas estructuras puedan tener un papel en el proceso de envejecimiento, es por eso que en el presente trabajo se estudió el envejecimiento de tipo cronológico de cepas que tienen comprometida la capacidad de formar eisosomas, es decir, se estudia el lapso de tiempo que estas células mutantes son capaces de sobrevivir una vez que entraron a la fase estacionaria. En principio, los resultados indican que la ausencia de la proteína Pil1 enlentece el envejecimiento, al igual que cuando se eliminan los genes que codifican tanto Pil1 como Lsp1. A pesar de ser un componente estructural de los eisosomas, Lsp1 no parece ser responsable del cambio en la velocidad de envejecimiento ya que su ausencia no cambia este proceso, en comparación con la cepa *wild type*. Los mismos resultados se extrajeron de cepas con *background* genético w303 y BY4741.

Para llevar a cabo el estudio de envejecimiento cronológico se usaron tres cepas control, la cepa *wild type* junto a dos cepas que presentan la delección de un gen, *SCH9* y *GPH1*, las cuales afectan dicho envejecimiento enlenteciéndolo o acelerándolo, respectivamente.

La cepa con la delección del gen *SCH9* tanto para los estudios en w303 como en BY4741, no resultó en nuestros ensayos ser más longeva que la cepa *wild type*, como se había reportado en la bibliografía (56, 57). Los chequeos por PCR confirmatorias de dichas cepas dieron positivos evidenciando un producto de PCR generado por la interrupción del gen *SCH9* por el cassette *NAT* y por otro lado evidenciando la ausencia de un producto de PCR basado en un gen *SCH9* intacto (resultados mostrados solo para el *background* w303). Por alguna razón, aún desconocida para nosotros, la delección de *SCH9* no generó una cepa con longevidad cronológica incrementada. Resta volver a construir esta mutante en ambos *backgrounds* genéticos para repetir los ensayos de envejecimiento cronológico a fin de dilucidar esta controversia.

Por otro lado, el otro control usado además de las cepas *wild type*, fue la cepa mutante *gph1::kanMX4*. En el caso de los experimentos en el *background* w303 los resultados fueron acordes a los reportados en la bibliografía. No obstante, para la mutante construida en el *background* BY4741 no se pudo obtener una curva de viabilidad típica, como ya se mencionó en resultados por lo que no se agregó su curva dentro de los demás resultados. En la Figura 16 se muestra una de las curvas de viabilidad obtenida con dicha cepa, como se observa la viabilidad celular parece aumentar y disminuir a través del pasaje de los días. En el caso de esta mutante al Día 0 en el cultivo ya había un porcentaje muy bajo de células IP negativas (células vivas), promediando los tres experimentos este valor fue de 21,22%, cuando con las otras cepas por lo general este porcentaje estuvo entre un 98% y un 70%. Partir de un porcentaje tan bajo de células vivas el Día 0 en el caso de esta mutante introduce la posibilidad de obtener lecturas subsiguientes de viabilidad afectadas por un mayor error.

Es factible que el tiempo de incubación de 72 horas para que las células alcancen la fase estacionaria (40), resulte un poco excesivo para la cepa mutante *gph1Δ*. En efecto, en el caso de esta metodología se mantiene durante todo el experimento los inóculos envejecidos en medio SC -que es la elección más usada en los estudios de envejecimiento cronológico porque las longevidades son

bastante más cortas que en otras condiciones (38, 80). De manera que, al partir de este inóculo original, siempre están presentes las células que se van muriendo antes de empezar la curva de viabilidad. Alternativamente, hay autores que utilizan otra metodología en la que luego de alcanzar la fase estacionaria lavan y re inoculan las células en PBS o en agua, reajustando la densidad de los inóculos en este punto (Día 0) en el que, además, la viabilidad es del 100% (38, 81). Para este caso en que *gph1::kanMX4* tiene una alta velocidad de envejecimiento se podría cambiar la metodología para hacer más precisa la determinación de su viabilidad. Una posibilidad es comenzar las medidas de viabilidad (Día 0) unas 24 horas antes, de forma de obtener una curva más acampanada (con menor velocidad inicial de decaimiento de la viabilidad).

Tampoco puede descartarse en este caso la posibilidad de que, como puede ocurrir en algunos estudios de envejecimiento cronológico, una pequeña población escapa de la quiescencia y vuelve a entrar en el ciclo celular, fenómeno denominado *gasping* (38). Según la bibliografía hay metodologías para el estudio de envejecimiento cronológico como ser las que involucran la transferencia de las células a agua o el uso de placas con medio carente de triptófano que tienen como ventaja que este problema desaparece (38).

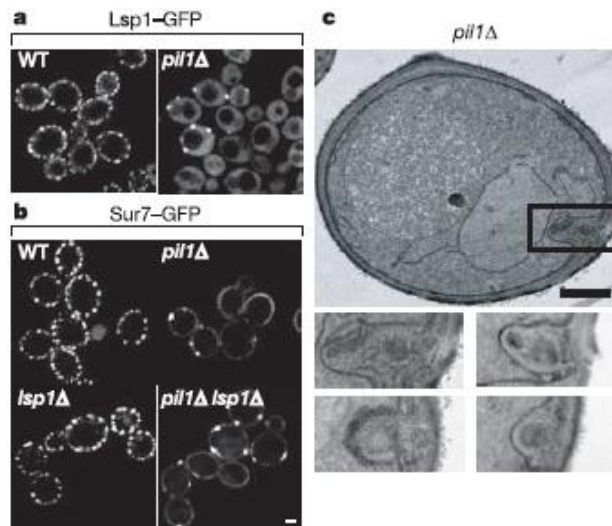
A pesar de haber tenido ciertos problemas con la reproducibilidad de los resultados reportados de las mutantes *sch9Δ* y *gph1Δ* (solo en BY4741), la comparación de los resultados obtenidos con las mutantes eisosomales y con las células *wild type* indican que la delección de *PIL1* afecta el envejecimiento cronológico en los dos *backgrounds* genéticos estudiados. En estudios futuros se podrían repetir los ensayos de envejecimiento cronológico de manera de obtener las curvas deseadas para los controles internos, *sch9Δ* y *gph1Δ*, probando hacer lo indicado anteriormente para cada caso en específico. De esta forma se podrá confirmar la sensibilidad de la técnica, como también se podrá comparar la mutante *sch9Δ* con *pil1Δ* y la doble mutante eisosomal.

Dadas las complejidades que se presentan en los ensayos de estudio de envejecimiento cronológico es recomendable la confirmación de dichos resultados empleando otros métodos y condiciones de estudio. Estas confirmaciones son muy importantes para poder identificar las mutantes que aparentan ser más longevas porque pasan por un crecimiento atrasado o un re-crecimiento durante la fase estacionaria, lo cual ayuda a remover falsos positivos que son generados por otras causas. Al menos hay tres métodos establecidos para medir este tipo de envejecimiento, como ya se mencionó anteriormente, el que se usó en este trabajo es generalmente el más común. Otro de los métodos, al que también hicimos mención antes, consiste en monitorear la viabilidad de células pasadas de medio SC ó YPD a agua a partir de la fase postdiauxica. El último método se basa en monitorear la viabilidad celular en placas de agar con 2% de glucosa conteniendo todos los nutrientes excepto triptófano, el cual es usado solo para células que carecen de la capacidad biosintética de dicho aminoácido.

## **5.1 Pil1 afecta el envejecimiento cronológico en w303 y BY4741**

A través del estudio del envejecimiento cronológico en dos *backgrounds* diferentes, w303 y BY4741, se observó que Pil1 afecta dicho tipo de envejecimiento. Como ya se mencionó, esta proteína es un componente fundamental de los eisosomas y su delección afecta la formación de dichas estructuras, el tamaño y causa la agrupación de los componentes remanentes de los eisosomas en uno o unos

pocos puntos de la periferia de la célula (Figura 20). La razón por la cual la ausencia de esta proteína parece extender el envejecimiento cronológico queda aún por esclarecerse, pero se pueden proponer diferentes hipótesis en base a otros estudios ya reportados.



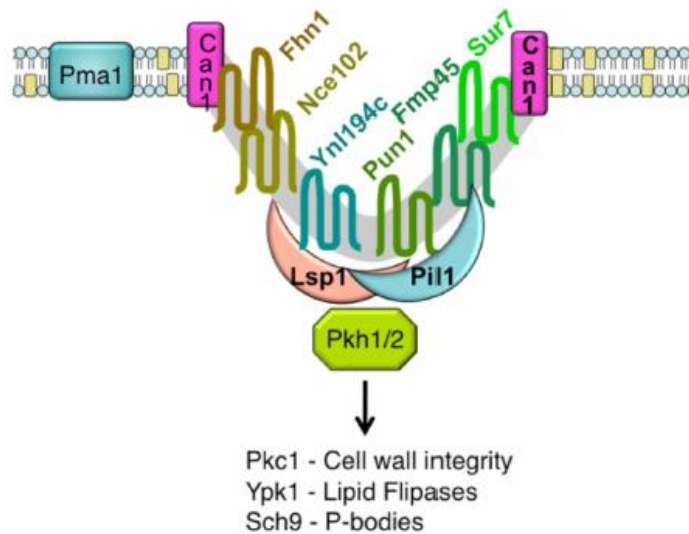
**Figura 20.** Pil1 es requerida para la localización de Lsp1 y Sur7. (a) Imagen confocal de la expresión de Lsp1-GFP en células *wild type* y *pil1Δ*. (b) Imágenes de microscopía confocal de la expresión de Sur7-GFP en cepas *wild type*, *pil1Δ*, *lsp1Δ* y *pil1Δ lsp1Δ*, escala de barra 2mm. (c) Grandes invaginaciones de membrana afectada solo vistas en células *pil1Δ*, escala de barra 0,5 mm (9).

En un estudio reciente (37) se reconstruyó una red de envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae*, donde se usó un algoritmo que integraba los términos de anotación de *Gene Ontology* (GO) con información de interacción proteína-proteína de forma automática. Se investigaron las vías que comienzan con proteínas que se sabe que regulan la longevidad como ser Tor1p, Sch9p y Rasp, homólogas a las de mamíferos mTOR, Akt/PKB y al proto-oncogen Ras, respectivamente. El análisis de estas vías reveló proteínas que tienen un rol intermediario en los eventos de señalización que llevan al envejecimiento cronológico, lo que se denominó como el “corazón” de la red. A partir de esto último se hallaron cuatro genes (*TCB3*, *SNA3*, *PST2* y *YGR130C*) que no habían sido previamente relacionados al envejecimiento cronológico en *S. cerevisiae*. La ausencia de la proteína Ygr130c, la cual forma parte del grupo de proteínas asociadas a la membrana de los eisosomas, fue capaz de extender el envejecimiento cronológico en comparación con la cepa *wild type* al igual que las otras tres proteínas encontradas en la red. Las cuatro proteínas comparten un rol en el transporte intracelular, principalmente en la vía endocítica y responden al tratamiento con rampamicina en células de levadura. En este estudio se propuso que dichas proteínas, afectan el envejecimiento cronológico a través de la alteración de la vía endosomal, dado que la endocitosis y el proceso de clasificación de proteínas de vacuola están involucrados en la regulación de este proceso en levaduras (37).

Teniendo en cuenta que Ygr130c, proteína asociada a los eisosomas, podría estar cumpliendo un rol en vías de señalización que afectan el envejecimiento, también se puede sugerir que los eisosomas *per se* formarían parte de una o varias vías de señalización. Debido a que en ausencia de Pil1 no hay

una buena formación de los eisosomas, como se explicó anteriormente, esto podría afectar a las vías de señalización de las que forman parte, como por ejemplo, generar respuestas de resistencia a distintos tipos de estrés.

Una de las vías de la que se cree que forman parte las proteínas Pil1 y Lsp1 es la vía de señalización Pkh, ya que se caracterizaron como proteínas modificadoras de la misma (Figura 21). Los componentes centrales de la señalización Pkh son dos quinasas Pkh1 y Pkh2, que como ya se mencionó antes, son homólogos funcionales de la quinasa PDK1 en mamíferos y las características de ambas vías de señalización están conservadas (19).



**Figura 21.** Modelo de la estructura de eisosomas/MCC (1).

A pesar de que los eventos moleculares que conllevan a la activación de las quinasas Pkh todavía están poco comprendidos, se sabe que están reguladas por bases de cadenas largas (LCBs), fitosfingosina (PHS) y dihidroesfingosina (DHS) (82). Hay muchas evidencias que apuntan a una conexión funcional entre los eisosomas y la señalización de Pkh, como ser que Pil1 y Lsp1 regulan negativamente las quinasas Pkh y vías de señalización *downstream* (21). También se encontró que ambas Pkh1/2 están al menos parcialmente localizadas en los eisosomas y que Pkh1, pero no Pkh2 requiere de Pil1 para esta asociación, además las quinasas Pkh son capaces de fosforilar Pil1 y Lsp1 *in vitro* e *in vivo* (19, 83).

Otros hallazgos demostraron que las quinasas Pkh1/2 activan las proteínas quinasas Ypk1/2, Pkc1 y Sch9 (Figura 21). Las vías de señalización Ypk1/2 y Pkc1 se han visto afectadas en células *pil1Δ*. Sorprendentemente Pkh1, pero no Pkh2, ha sido implicada en la regulación de envejecimiento celular en levaduras, más específicamente, la cepa mutante nula de *PKH1* es capaz de extender el envejecimiento cronológico al igual que lo que ocurre con la mutación nula de la proteína quinasa Sch9 (20, 84). Por lo que, es probable que Pil1 forme parte de una vía de señalización con Pkh1, al menos, que esté implicada en el envejecimiento cronológico celular. Dado que se ha reportado que Pil1 es un regulador negativo de la actividad de Pkh1 es difícil explicar por qué la delección de ambos genes por separado lleva al mismo fenotipo de envejecimiento cronológico (aumento de la longevidad) Así, será de sumo interés para resolver esta controversia estudiar que efecto tiene en la

longevidad cronológica la doble delección de los genes *PIL1* y *PKH1* y la sobre-expresión de un gen en ausencia del otro. También, de manera más general se puede estudiar el efecto sobre el envejecimiento cronológico que tiene la delección simultánea (o sobre-expresión) de *PIL1* junto a diferentes mutantes de genes que codifiquen proteínas involucradas en la vía de señalización Pkh.

Además ha sido sugerido que tanto Pil1 como Lsp1 podrían jugar un rol en otras vías de señalización ya que ambas proteínas se encontraron asociadas a muchas otras proteínas incluidas Pkh1/2 (20). En este sentido es necesario realizar una búsqueda de las proteínas con las que se encontraron asociadas, algunas de las cuales fueron nombradas en el ítem 1.3, de manera de poder hacer experimentos de envejecimiento que involucren a cepas mutantes del gen *PIL1* y de los genes que codifican las proteínas asociadas.

Por último, se podría también hipotetizar que Pil1 está involucrada en otra maquinaria de regulación que pueda resultar en un enlentecimiento del envejecimiento cronológico cuando dicha proteína está ausente. Un reciente estudio proteómico en *C. albicans* sugiere que Pil1 y Lsp1 son reguladas por SUMO, una modificadora post-traduccional (85). Se vio que Pil1 se modificó por la asociación con SUMO en el residuo Lys-63, que se piensa que está ubicado en la superficie de Pil1 que enfrenta a la membrana plasmática y podría tener un efecto en la asociación a membrana (13, 23). El residuo Lys-63 esta conservado en Pil1 y Lsp1 de otras especies, sugiriendo que el mismo es funcionalmente importante. Las proteínas SUMO son similares a la proteína ubiquitina, modifican covalentemente otras moléculas de la célula mediante un proceso denominado sumoilación, dirigido por una cascada enzimática análoga a la que involucra la ubiquitinación. En cambio a este último, el proceso de sumoilación no es usado para etiquetar proteínas para la degradación. Estas modificaciones están involucradas en varios procesos celulares, como ser transporte núcleo-citosol, regulación transcripcional, estabilidad de proteína, respuesta a estrés y progresión a través del ciclo celular. Las proteínas SUMO están altamente conservadas en todas las células eucariotas y en organismos superiores, están presentes en todos los tejidos y etapas de desarrollo (86).

La vía de acción de las proteínas SUMO recientemente ha sido implicada en el proceso de senescencia celular, un buen indicativo de esto ha sido la identificación de proteínas asociadas a la senescencia como blancos de la conjugación de SUMO. Además, como la modificación post-traduccional ha mostrado una gran influencia en la actividad proteica, estabilidad e interacción de substratos con otras macromoléculas, la participación activa de la vía SUMO en los mecanismos de inducción de senescencia y subsecuentemente envejecimiento es una suposición atractiva (86).

Por lo tanto, Pil1 podría relacionarse con el proceso de envejecimiento a través de la proteína SUMO Smt3, la cual se vio que es capaz de modificarla (85, 87), siendo ésta la única forma de SUMO que se codifica en *S.cerevisiae*. La sumoilación de proteínas blanco puede regular la localización subcelular, la modulación de interacciones proteína-proteína y la inhibición de la ubiquitinación o de otras modificaciones que tengan como blanco la lisina. En células de mamíferos la abundancia de las conjugaciones con proteínas SUMO aumenta en respuesta a la temperatura o estrés oxidativo. En levaduras, la deficiencia en homólogos de este tipo de proteínas y ligasas E3 de la familia PIAS provoca un significativo aumento en el largo de los telómeros. Estos resultados apuntan que SUMO tiene un rol en el mantenimiento del largo de los telómeros y sugiere que su vía podría ser un modulador negativo en este proceso (86).

Sería de gran interés estudiar si la proteína Pil1 tiene alguna relación con la vía de señalización de SUMO para el mantenimiento de los telómeros. Para ello en principio se debería de analizar con mayor profundidad la modificación de Smt3 en Pil1, y si genera un cambio en la unión a membrana o no. Para esto se podría hacer una cepa que exprese un fluoróforo unido a Pil1 y comparar la unión a membrana con otra cepa que tenga la proteína Pil1 modificada en el residuo Lys-63 también expresando un fluoróforo. Además sería esclarecedor analizar el impacto de la ausencia de Pil1 en el largo de los telómeros, usando la técnica de fragmento de restricción terminal (TRF) por *Southern blot* que es la *gold-standard* (88).

## 5.2 La ausencia de Pil1 y de Lsp1 no afecta el volumen celular en *S. cerevisiae*

Por otro lado, tomando en cuenta que los resultados de la delección del gen *PIL1* parecen alterar el envejecimiento cronológico en las células de levadura extendiéndolo, en el trabajo se planteó estudiar como varía el volumen celular a lo largo de los experimentos de envejecimiento con el fin de ver si esta variable morfológica compartía alguna relación con lo visto en dichos estudios.

Se ha reportado que las células sufren cambios en el volumen cuando se ven expuestas a diferentes tipos de estrés, como ser el osmótico (89). Por lo que se planteó que la ausencia del gen *PIL1* generará una respuesta a estrés diferente a la de la cepa *wild type* y a la que presenta la delección en *LSP1*, teniendo una repercusión en el volumen como a modo de resistencia.

Los resultados demostraron que no parece haber ninguna relación entre el volumen celular y la extensión cronológica de las cepas estudiadas, ya que todas dieron medidas aproximadamente similares.

Finalmente, se cree que Pil1 y Lsp1 podrían tener un rol en respuesta a diferentes tipos de estrés, dado a que el promotor de cada gen que las codifica contiene 3 elementos putativos en respuesta a estrés y su transcripción es inducida por diferentes tipos de estrés (90). Por lo que sería muy atractivo estudiar cómo responde el envejecimiento cronológico de *pil1Δ* a factores generales de modulación de esta longevidad, cepas mutantes de los elementos de respuesta a estrés como ser los factores transcripcionales Msn2/Msn4 y la proteína quinasa Rim15 (57).

## 6. ANÁLISIS ECONÓMICO

En el presente trabajo no corresponde hacer un análisis económico dado a que se trata de una investigación que a corto plazo no se espera ver ninguna aplicación de la misma en el mercado. Sin embargo, dado a los resultados motivadores que se obtuvieron esto podría ser la base de futuras aplicaciones en la salud humana.

Un mejor entendimiento de los mecanismos de función de los eisosomas podría servir como modelo de la organización de membranas plasmáticas en células de mamíferos, ya que por más que no haya una gran conservación de las proteínas que los componen fuera de los hongos, estas comparten fundamentos similares a las proteínas de membrana de las células de mamíferos.

Por ejemplo, los eisosomas están presentes en el patógeno humano *C. albicans*, el cual comúnmente existe como un organismo comensal no dañino presente en la piel y el tracto gastrointestinal. Intervenciones médicas o inmunosupresiones permiten la entrada de este organismo al torrente sanguíneo y a invadir tejidos, que puede llevar a la falla de algún órgano o a la muerte. Cambios en el cuidado médico han llevado al aumento en candidiasis y la falta de una droga anti fúngica eficiente hace difícil el tratamiento (91). Se ha reportado que la integridad de los eisosomas en *C. albicans* tiene implicancias claras en la patogenicidad de este microorganismo (92). Por lo que, un mejor entendimiento en los mecanismos que permiten la supervivencia de este organismo es necesario para desarrollar nuevas terapias. En particular, el conocimiento de la membrana plasmática de *C.albicans* es limitado, aunque se sabe que juega muchos roles en la patogenia de dicho organismo (1).

## 7. CONCLUSIONES

- Se ha logrado construir todas las cepas mutantes en genes eisosomales y en genes vinculados al envejecimiento en dos *backgrounds* genéticos, BY4741 y w303. Para llevar a cabo esto, se utilizaron técnicas de genética molecular, como la purificación de ADN genómico, PCR destinada a la amplificación de fragmentos y confirmación de cepas y transformación de levaduras. Además, se utilizó un microscopio con micromanipulador para la generación de la cepa doble mutante en el *background* w303.
- Se pudo ensayar la supervivencia cronológica de las cepas construídas. Para llevar a cabo esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes. Se concluyó que la ausencia del gen *PIL1* extiende este tipo de envejecimiento en ambos *backgrounds* genéticos, mientras que la ausencia del gen *LSP1* tiene un comportamiento similar a la cepa *wild type*, por lo que no altera dicho proceso.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Douglas LM, Wang HX, Li L, Konopka JB. Membrane compartment occupied by Can1 (MCC) and eisosome subdomains of the fungal plasma membrane. *Membranes*. 2011;1(4):394–411.
2. Malinská K, Malínský J, Opekarová M, Tanner W. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell*. 2003;14(11):4427–4436.
3. Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci*. 2004;117(25):6031–6041.
4. Malinsky J, Opekarová M, Tanner W. The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast*. 2010;27(8):473–478.
5. Berchtold D, Walther TC. TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell*. 2009;20(5):1565–1575.
6. Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Söldner R. Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol*. 2012;14(6):640-648.
7. Mueller NS, Wedlich-Söldner R, Spira F. From mosaic to patchwork: matching lipids and proteins in membrane organization. *Mol Membr Biol*. 2012;29(5):186-196.
8. Olivera-Couto A, Aguilar PS. Eisosomes and plasma membrane organization. *Mol Genet Genomics*. 2012;287(8):607-620.
9. Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. 2006;439(7079):998–1003.
10. Moreira KE, Walther TC, Aguilar PS, Walter P. Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 2009;20(3):809-818.
11. Karotki L, Huiskonen JT, Stefan CJ, Ziólkowska NE, Roth R, Surma MA, Krogan NJ, Emr SD, Heuser J, Grünewald K, et al. Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *J Cell Biol*. 2011;195(5):889–902.
12. Aguilar PS, Fröhlich F, Rehman M, Shales M, Ulitsky I, Olivera-Couto A, Braberg H, Shamir R, Walter P, Mann M, et al. A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(7):901-908.
13. Olivera-Couto A, Graña M, Harispe L, Aguilar PS. The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Mol Biol Cell*. 2011;22(13):2360-2372.
14. Kabeche R, Baldissard S, Hammond J, Howard L, Moseley JB. The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2011;22(21):4059-4067.
15. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003;425(6959):737-741.
16. Ziólkowska NE, Karotki L, Rehman M, Huiskonen JT, Walther TC. Eisosome-driven plasma membrane organization is mediated by BAR domains. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(7):854–856.
17. Gallop JL, McMahon HT. BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp*. 2005;72:223–231.
18. Suetsugu S, Toyooka K, Senju Y. Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(4):340–349.
19. Walther TC, Aguilar PS, Fröhlich F, Chu F, Moreira K, Burlingame AI, Walter P. Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J*. 2007;26(24):4946-4955.
20. Luo G, Gruhler A, Liu Y, Jensen ON, Dickson RC. The sphingolipid long-chain base-Phk1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10433-10444.

21. Zhang X, Lester RL, Dickson RC. Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem.* 2004;279(21):22030–22038.
22. Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol.* 1999;9(4):186-197.
23. Dickson RC, Sumanasekera C, Lester RL. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res.* 2006;45(6):447–465.
24. Seger S, Rischatsch R, Philippsen P. Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *J Cell Sci.* 2011;124(10):1629–1634.
25. Vangelatos I, Roumelioti K, Gournas C, Suarez T, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2010;9(10):1441–1454.
26. Moor H, Mühlethaler K. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J Cell Biol.* 1963;17(3):609-628.
27. Streiblová E. Surface structure of yeast protoplasts. *J Bacteriol.* 1968;95(2):700-707.
28. Takeo K. Lack of invaginations of the plasma membrane during budding and cell division of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett.* 1984;22(2):97-100.
29. Strádalová V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blazíková M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J. Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci.* 2009;122(16):2887–2894.
30. Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* 2007;26(1):1–8.
31. Young ME, Karpova TS, Brügger B, Moschenross DM, Wang GK, Schneiter R, Wieland FT, Cooper JA. The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(3):927–934.
32. Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarová M, Tanner W. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol.* 2008;183(6):1075–1088.
33. Fröhlich F, Moreira K, Aguilar PS, Hubner NC, Mann M, Walter P, Walther TC. A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1227-1242.
34. Brach T, Specht T, Kaksonen M. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J Cell Sci.* 2011;124(3):328-337.
35. Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, Nagahisa K, Hirasawa T, Shimizu H. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(1):32–44.
36. Berchtold D, Piccolis M, Chiaruttini N, Riezman I, Riezman H, Roux A, Walther TC, Loewith R. Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat Cell Biol.* 2012;14(5):542-547.
37. Borklu Yucel E, Ulgen KO. A network-based approach on elucidating the multi-faceted nature of chronological aging in *S. cerevisiae*. *PLoS One* [Internet]. 2011 [citado 2012 Diciembre 3];6(12):e29284. Disponible desde: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0029284>
38. Longo VD, Shadel GS, Kaerberlein M, Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* 2012;16(1):18–31.
39. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45099-45107.
40. Ocampo A, Barrientos A. Quick and reliable assessment of chronological life span in yeast cell populations by flow cytometry. *Mech Ageing Dev.* 2011;132(6-7):315-323.

41. Kaeberlein M, Burtner CR, Kennedy BK. Recent developments in yeast Aging. PLoS Genet [Internet]. 2007 [citado 2013 Junio 18];3(5):e84. Disponible desde: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.0030084>
42. Fabrizio P, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. Aging Cell. 2003;2(2):73-81.
43. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans. Science. 2010;328(5976):321-326.
44. Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. PLoS Genet [Internet]. 2008 [citado 2014 Enero 10];4(1):e13. Disponible desde: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.0040013>
45. Sinclair DA, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles- a cause of aging in yeast. Cell. 1997;91(7):1033-1042.
46. Steinkraus KA, Kaeberlein M, Kennedy BK. Replicative aging in yeast: the means to the end. Annu Rev Cell Dev Biol. 2008;24:29-54.
47. Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. Cell. 1989;57(4):633-643.
48. Chen XF, Meng FL, Zhou JQ. Telomere recombination accelerates cellular aging in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet [Internet]. 2009 [citado 2014 Febrero 15];5(6):e1000535. Disponible desde: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000535>
49. Hipkiss AR. Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. Exp Gerontol. 2006;41(5):464-473.
50. Lindstrom DL, Gottschling DE. The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 2009;183(2):413-422.
51. Fabrizio P, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. En: Tollefsbol TO, editor. Biological Aging Methods. Vol 371. Totowa (New Jersey): Humana Press; 2007. p 89-95.
52. Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. J Biol Chem. 1996;271(21):12275-12280.
53. Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 1996;19(6):1159-1166.
54. Deere D, Shen J, Vesey G, Bell P, Bissinger P, Veal D. Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. Yeast. 1998;14(2):147–160.
55. The Ellison Medical Foundation. Consortium for the determination of public pathways regulating longevity at the University of Washington [Internet]. Seattle (Washington): University of Washington; 2005 [citado 2014 Enero 12]. Disponible desde: <http://www.uwaging.org/ellison/>
56. Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. Science. 2001;292(5515):288–290.
57. Fabrizio P, Pletcher SD, Minois N, Vaupel JW, Longo VD. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 2004;557(1-3):136–142.
58. Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, Schneper L, Broach JR, Tyers M. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. Genes Dev. 2004;18(20):2491–2505.
59. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. Genes Dev. 1999;13(19):2570–2580.
60. Fabrizio P, Gattazzo C, Battistella L, Wei M, Cheng C, McGrew K, Longo VD. Sir2 blocks extreme life-span extension. Cell. 2005;123(4):655–667.

61. Harris N, Costa V, MacLean M, Mollapour M, Moradas-Ferreira P, Piper PW. Mnsod overexpression extends the yeast chronological (G(0)) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(12):1599-1606.
62. Ashrafi K, Sinclair D, Gordon JI, Guarente L. Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(16):9100–9105.
63. Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. Akt-induced cellular senescence: implication for human disease. *Cell Cycle.* 2004;3(4):449–451.
64. Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J.* 2004;23(1):212–220.
65. Hertweck M, Göbel C, Baumeister R. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell.* 2004;6(4):577–588.
66. Hamilton B, Dong Y, Shindo M, Liu W, Odell I, Ruvkun G, Lee SS. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2005;19(13):1544–1555.
67. Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast.* 2004;21(11):947–962.
68. SGD: *Saccharomyces* Genome Database [Internet]. Stanford (California): Stanford University; 2014 [citado 2013 Febrero 28]. Disponible desde: [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)
69. Steffen KK, Kennedy BK, Kaeberlein M. Measuring replicative life span in the budding yeast. *J Vis Exp* [Internet]. 2009 [citado 2013 Junio 1];(28):e1209. Disponible desde: <http://www.jove.com/video/1209/measuring-replicative-life-span-in-the-budding-yeast>
70. Wei M, Madia F, Longo VD. Studying age-dependent genomic instability using *S.cerevisiae* chronological lifespan model. *J Vis Exp* [Internet]. 2011 [citado 2014 Enero 10];(55):e3030. Disponible desde: <http://www.jove.com/video/3030/studying-age-dependent-genomic-instability-using-s-cerevisiae?id=3030>
71. Fabrizio P, Hoon S, Shamalnasab M, Galbani A, Wei M, Giaever G, Nislow C, Longo VD. Genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies vacuolar protein sorting, autophagy, biosynthetic, and tRNA methylation genes involved in life span regulation. *PLoS Genet* [Internet]. 2010 [citado 2013 Diciembre 15];6(7):e1001024. Disponible desde: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1001024>
72. Columbia Center for New Media Teaching and Learning. Quantitative Methods in Social Sciences (QMSS) e-Lessons, Two-Sample T-test [Internet]. New York (New York): Columbia University; 2003 [citado 2013 Noviembre 27]. Disponible desde: [http://ccnmtl.columbia.edu/projects/qmss/the\\_ttest/twosample\\_ttest.html](http://ccnmtl.columbia.edu/projects/qmss/the_ttest/twosample_ttest.html)
73. Baltanás R, Bush A, Couto A, Durrieu L, Hohmann S, Colman-Lerner A. Pheromone-induced morphogenesis improves osmoadaptation capacity by activating the HOG MAPK pathway. *Sci Signal.* 2013;6(272),ra26.
74. Schaber J, Baltanas R, Bush A, Klipp E, Colman-Lerner A. Modelling reveals novel roles of two parallel signalling pathways and homeostatic feedbacks in yeast. *Mol Syst Biol.* 2012;8(1):622.
75. Bush A, Chernomoretz A, Yu R, Gordon A, Colman-Lerner A. Using Cell-ID 1.4 with R for Microscope-Based Cytometry. En: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 100. Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons; 2012. p 14.18.1-14.18.26.
76. Favre C, Aguilar PS, Carrillo MC. Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(10):1446-1456.
77. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2000;289(5487):2126–2128.

78. Petes TD, Detloff P, Jinks-Robertson S, Judd SR, Kupiec M, Nag D, Stapleton A, Symington LS, Vincent A, White M. Recombination in yeast and the recombinant DNA technology. *Genome*. 1989;31(2):536-540.
79. Spitzer M, Wildenhain J, Rappsilber J, Tyers M. BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nat Methods*. 2014;11(2):121–122.
80. Wei M, Fabrizio P, Madia F, Hu J, Ge H, Li LM, Longo VD. Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet* [Internet]. 2009 [citado 2013 Noviembre 20];5(5):e1000467. Disponible desde: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000467>
81. Burtner CR, Murakami CJ, Kennedy BK, Kaeberlein M. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*. 2009;8(8):1256-1270.
82. Friant S, Lombardi R, Schmelzle T, Hall MN, Riezman H. Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J*. 2001;20(23):6783–6792.
83. Roelants FM, Torrance PD, Bezman N, Thorner J. Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol Biol Cell*. 2002;13(9):3005–3028.
84. Powers RW III, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*. 2006;20(2):174-184.
85. Leach MD, Stead DA, Argo E, Brown AJP. Identification of sumoylation targets, combined with inactivation of *SMT3*, reveals the impact of sumoylation upon growth, morphology, and stress resistance in the pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2011;22(5):687–702.
86. Andreou AM, Tavernarakis N. Roles for SUMO modification during senescence. En: Tavernarakis N, editor. *Protein metabolism and homeostasis in aging*. Springer: New York; 2010. p 160-171.
87. Sung MK, Lim G, Yi DG, Chang YJ, Yang EB, Lee K, Huh WK. Genome-wide bimolecular fluorescence complementation analysis of SUMO interactome in yeast. *Genome Res*. 2013;23(4):736-746.
88. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res*. 2012;730(1-2):59-67.
89. Petelenz-Kurdziel E, Eriksson E, Smedh M, Beck C, Hohmann S, Goksör M. Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(11):1120-1126.
90. Moskvina E, Schüller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast*. 1998;14(11):1041-1050.
91. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1–53.
92. Douglas LM, Wang HX, Keppler-Ross S, Dean N, Konopka JB. Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*. *MBio*. 2011;3(1):e00254-11.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo 1: Composición de medios y soluciones usadas

Medios:

YPD: 2% de peptona (Becton, Dickson and Company #211677), 1% de extracto de levadura (Becton, Dickson and Company #212750) y se agrega agua destilada hasta un 90% del volumen total del medio. Se autoclava y luego se agrega un 2% de dextrosa (Droguería Industrial Uruguaya).

YPD agar: 2% de peptona, 1% de extracto de levadura, 2% de agar (Fluka # 05040) y se agrega agua destilada hasta un 90% del volumen total del medio. Se autoclava y luego se agrega un 2% de dextrosa.

Los medios YPD/YPD agar con resistencia a antibiótico, ya sea G418-Gentamicina (Sigma-Aldrich #A1720) o nourseotricina, se agregan los mismos a lo último junto a la dextrosa para que haya una concentración final de 1x.

RICH-SPO (Medio de esporulación): 2,5g de extracto de levadura, 15g de KOAc (concentración final de 150mM, Sigma-Aldrich #P1190), 100mL de suplemento de aminoácidos 10x (concentración final de 1x) y se autoclava. Antes de usarlo se toma una alícuota de lo que se va a ser uso y se le agrega dextrosa a una concentración final de 0,05%.

Medio sintético completo, SC (500mL): 50mL 10x Drop Out –LEU –HIS –URA (Sunrise Science #1002), 50mL 10x Yeast Nitrogen Base (YNB, Sunrise Science #1500), 50mL 20% de dextrosa, 5mL L-Histidina 50x (Sigma-Aldrich # H8000), 5mL L-Leucina 50x (Sigma-Aldrich #L8000), 5mL Uracil 50x (Sigma-Aldrich #U0750) y el resto de agua estéril. No se autoclava, este medio ya se realiza con todos los componentes estériles y se agrega cada uno en condiciones de esterilidad.

SC –LEU: Se realiza de la misma forma que el medio SC, solo que no se le agrega el aminoácido L-Leucina a la solución.

Soluciones:

TBE 5x (1 Litro): 54g de Tris (Sigma-Aldrich # T1503), 27,5g de Ácido Bórico (Sigma-Aldrich #B9798) y 20mL de EDTA 0,5M pH 8 (Sigma-Aldrich #EDS). Luego se diluye 200mL de TBE 5x en 800 mL de agua destilada para obtener TBE 1x.

LiTE 5x: LiOAc 0,5M (Sigma-Aldrich #517992), Tris-HCl 50mM (HCl, Sigma-Aldrich # H7020) y EDTA 5mM pH 7,6. Se filtra luego de agitar la mezcla. Se realiza la dilución 1/5 para obtener LiTE 1x.

PEG LiTE: 20mL LiTE 5X, 20mL agua destilada y 40g PEG (PEG<sub>2000</sub>, Sigma-Aldrich #295906). Se filtra luego de agitar la mezcla.

PBS 1x: MgCl<sub>2</sub> 88,5mM (Sigma-Aldrich #M8266), KCl 0,2g/L (Sigma-Aldrich #P9541), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 0,2g/L (Sigma-Aldrich #P9791), NaCl 8g/L (Sigma-Aldrich #S3014), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15g/L (Sigma-Aldrich #71505).

## 9.2 Anexo 2: *Primers* utilizados para la construcción de cepas.

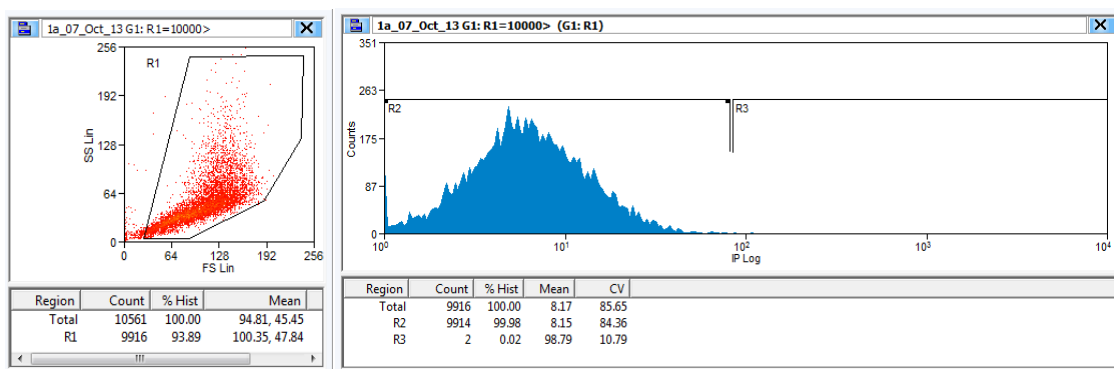
**Tabla 6.** *Primers* utilizados para la amplificación de cassettes de delección y para la confirmación de cepas mutantes.

<b>Primers usados para la amplificación de los cassette de delección</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (orientación 5'-3')</b>	<b>Fuente</b>
707-SIR2-For	AGCACTCCTTCCAACCATG	Este trabajo
2898-SIR2-Rev	TTTGTGAGAGCCTTGCGTC	Este trabajo
733-HXK2-For	CACCTTTGATTGCGAGATCC	Este trabajo
2892-HXK2-Rev	AAGTGCTTCCGTTTCGTTCC	Este trabajo
PIL1chkUP	CTGCTTTGGCTCATCTCTTTG	LBCM-IPMont
Pil12230Rv	AGGAGGGGGAAGAGATATTGA	LBCM-IPMont
768-LSP1-For	CGTTGCAGCCGAGTGAAAAG	LBCM-IPMont
2340-LSP1-Rev	TAAGTGCCCTGGCATTGG	LBCM-IPMont
SCH9-S1	GAGAATTATACTCGTATAAGCAAGAAATAAAGATACGAAT ATACAATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Este trabajo
SCH9-S2	AAAAGAAAAGGAAAAGAAGAGGAAGGGCAAGAGGAGCG ATTGAGAAATCAATCGATGAATTCGAGCTCG	Este trabajo
<b>Primers usados para la confirmación de las cepas</b>		
574-SIR2Check-For	CTGCAACTCCTCAATGTGTC	Este trabajo
2898-SIR2-Rev	TTTGTGAGAGCCTTGCGTC	Este trabajo
511-HXK2Check-For	AATGGCTATCATGCCGGAC	Este trabajo
2892-HXK2-Rev	AAGTGCTTCCGTTTCGTTCC	Este trabajo
kanB Rev	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	LBCM-IPMont
668-PIL1Check-For	TGGCCACAGGTCATATTG	Este trabajo
PIL1-594-RV	AGCAGCTCTCAACTTTGACC	LBCM-IPMont
Calb CHK DW	GGTCATAGCTGTTTCCTGTG	LBCM-IPMont
585-LSP1Check-For	ACTATCTTGGCCCAATGCTC	Este trabajo
2340-LSP1-Rev	TAAGTGCCCTGGCATTGG	LBCM-IPMont
660-SCH9-For	CGCTGGTCGCTTATATTC	Este trabajo
1370-SCH9-Rev	TTTCTTCTGTGACGTGG	Este trabajo
NAT checkDW	TGAAGGACCCATCCAGTG	LBCM-IPMont

### 9.3 Anexo 3: Estrategia de *gating* para el análisis por citometría de flujo.

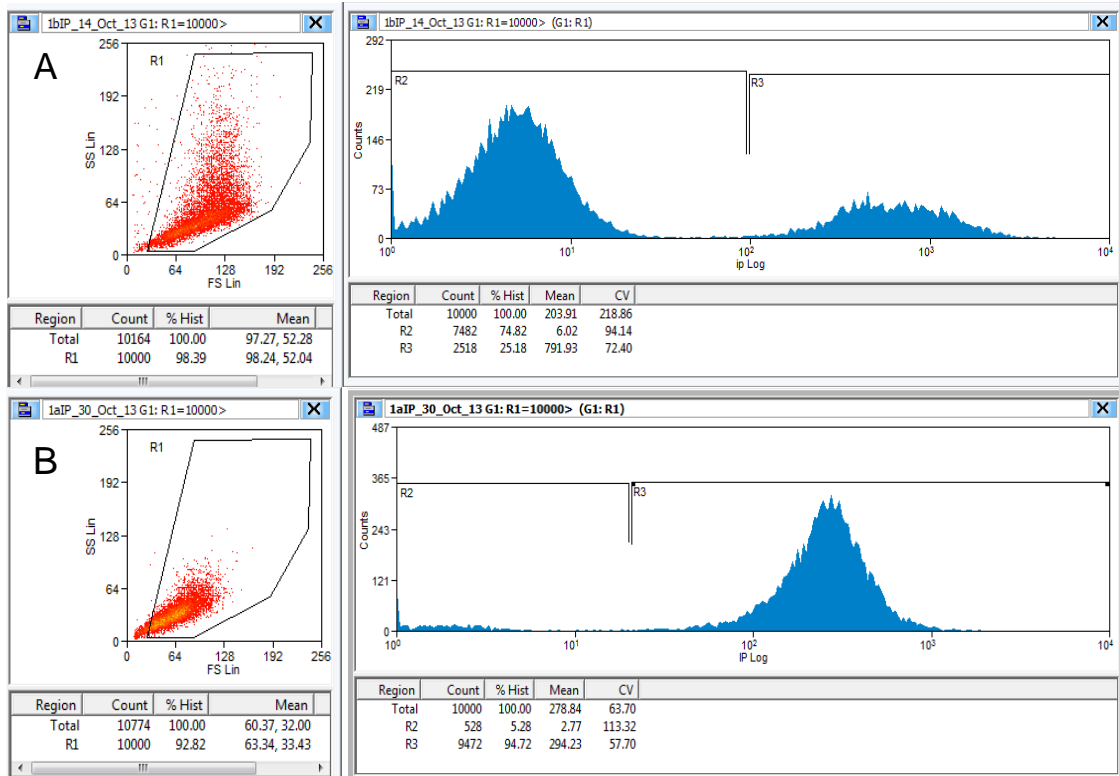
Para llevar a cabo el análisis por citometría de flujo, se utilizaron dos gráficos. El primero brinda información acerca de la granularidad en función del tamaño de cada evento que se midió en el citómetro, es decir, se hizo el *Side Scatter* (SS) en función del *Forward Scatter* (FS). En dicho gráfico se aplicó un *gate* R1, donde se seleccionaron 10.000 eventos, los cuales se van a aplicar en un histograma para estudiar dicha población. En el histograma se graficaron los eventos en función de la intensidad de señal del yoduro de propidio, del cual se obtiene el porcentaje de células vivas y de células muertas.

Para poder obtener estos porcentajes de células, primero se pasaron las muestras que no contenían yoduro de propidio por cada cepa a estudiar, que se utilizaron como blanco para todas las muestras con dicho fluoróforo agregado. Estas muestras se observan como aparece en la Figura 22, donde en el histograma no existe una población yoduro de propidio positiva, es decir, una población con una intensidad de fluorescencia alta. Por lo que se puede delimitar en el histograma el *gate* R2 y R3 que hacen referencia a la población de células vivas y células muertas en la muestra, respectivamente.



**Figura 22.** Análisis de datos de citometría para una muestra sin el agregado de yoduro de propidio (blanco). Se observa el gráfico de *Side Scatter* (SS) en función del *Forward Scatter* (FS) donde se selecciona una población (R1) y se estudia en un histograma los eventos de R1 en función de la Intensidad de señal del yoduro de Propidio (LogIP).

Luego de haber delimitado los *gates* R2 y R3 con las muestras blanco, anteriormente mencionadas, se pasaron las muestras que presentan yoduro de propidio. Con dichas muestras se logró obtener los eventos yoduro de propidio negativos (células vivas) y yoduro de propidio positivos (células muertas). A continuación se pueden ver en la Figura 23 dos muestras con yoduro de propidio de una misma cepa *wild type* (*background* w303), una correspondiente al Día 0 (A) y la otra correspondiente al Día 14 (B). Esto permite ver las diferencias significativas que existen entre los dos histogramas al principio y al final del ensayo cronológico, como es de esperar.



**Figura 23.** Gráficos de SS vs FS e histogramas de dos muestras de cepa *wild type* con Ioduro de propidio, al Día 0 (A) y al Día 14 (B) del ensayo de envejecimiento cronológico.

9.4 Anexo 4: Tabla usada para el test estadístico.

LA DISTRIBUCION  $t$

Si  $X$  tiene  $\nu$  grados de libertad, entonces  $Pr.(X \leq x) = P$ .

$\nu$	P=0.90	P=0.95	0.975	0.990	0.995	0.999	0.9995
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.302	636.619
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.598
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.941
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.859
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.405
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.611	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
50	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
80	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
100	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.391
200	1.286	1.653	1.972	2.345	2.601	3.131	3.340
$\infty$	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291

Figura 24. Distribución t para el test estadístico.

## 9.5 Anexo 5: *Scripts* y líneas de comando usadas para el procesamiento de imágenes de microscopía.

*Script* usado para filtrar las imágenes en campo claro de cada *Z-stack*, el cual fue desarrollado por el grupo de investigación de *Bush A et al, 2012 (75)*.

```
dir1 = getDirectory("Choose Source Directory ");
list = getFileList(dir1);
Dialog.create("Replacing files")
Dialog.addMessage("Are you sure you want to replace the BF files in the selected folder?")
Dialog.show()
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++) {
    if(startsWith(list[i],"BF") && endsWith(list[i],".tif") ){
open(dir1+list[i]);

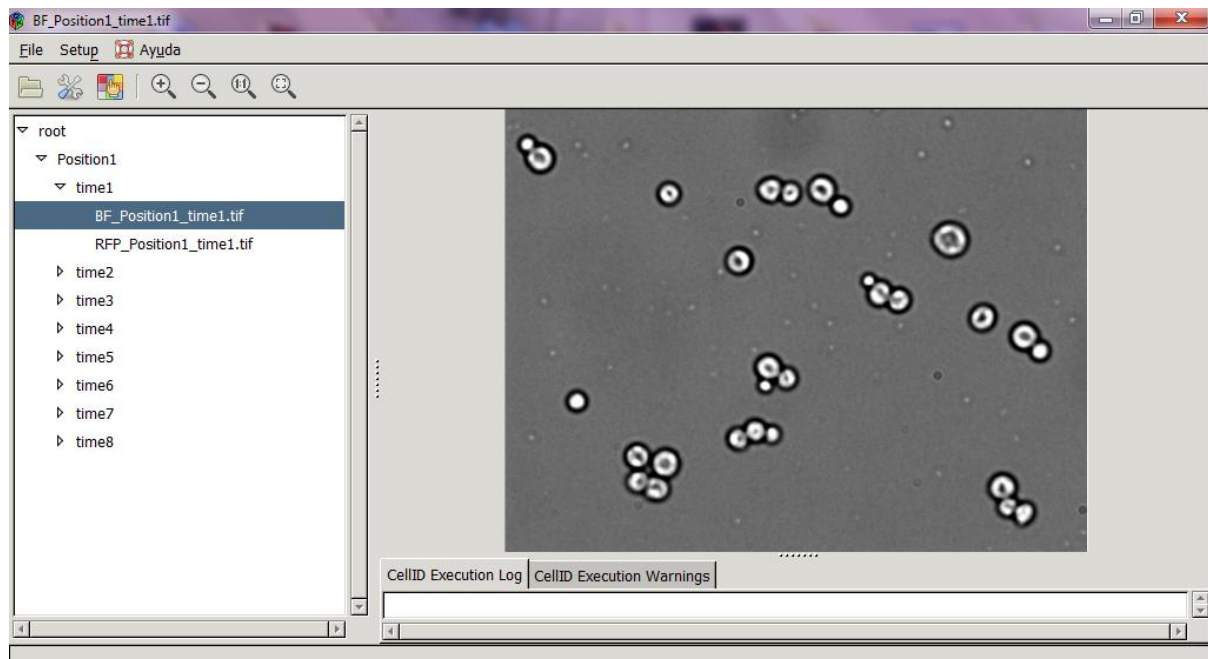
        run("Bandpass Filter...", "filter_large=80 filter_small=1 suppress=None tolerance=5
autoscale saturate");

        run("Save");

        close();

    }
}
```

Luego de pasarle los filtros a las imágenes de campo claro, cambiarles la calidad y los nombres a todas las imágenes se procede a utilizar el *software* Cell-ID. La interfase de este *software* se puede ver en la Figura 25.



**Figura 25.** La ventana principal de Cell-ID, a la izquierda se encuentra la guía donde están todas las imágenes ordenadas por plano (timeY) dentro de una PositionX.

Líneas de comando usadas en el *software* estadístico R para la determinación del volumen (todo lo que está escrito detrás de // y subrayado son comentarios de los comandos usados):

```
library("Rcell") // Se carga el paquete Rcell a R
```

```
library(EBImage) // Se carga el paquete EBImage, requerido para que Rcell funcione
```

```
setwd("C:\\Carpeta de interés") // Se carga la carpeta donde están las imágenes segmentadas ".out.tif" que además contiene una carpeta con archivos que contienen variables de interés calculadas
```

```
x<-load.cellID.data() // Esta función carga todos los archivos que pueden ser leídos en R de la carpeta
```

```
summary(x) // Se usa para ver rápidamente que contiene el objeto x
```

```
cplot(x,~fft.stat) // fft.stat es una medida de no-circularidad, acá se genera un gráfico donde se puede ver la distribución de las células circulares (valores pequeños) y las no circulares (valores mayores)
```

```
X<-QC.filter(x, fft.stat<0.3) // Se aplica un filtro de tomar células menores a un valor de 0,3 de circularidad que es lo suficiente para eliminar formas segmentadas que no son de interés.
```

Generalmente en células de levadura y mamífero es suficiente usar 0,3 como filtro para eliminar estas formas

show.img(X,pos=1) //Se observa la imagen en campo claro con el filtro aplicado, te marca que células elimino por lo que esto se mira como control del paso anterior

//Filtro a.tot : es una medida del tamaño de superficie. No se aplicó casi, solo en unas veces cuando se tenía formas segmentadas muy grandes que no eran células podrían ser por ejemplo una burbuja o una basura.

cplot(X,~a.tot) // Se grafica un histograma que muestra la distribución de tamaños de superficie de cada célula segmentada.

X<-QC.filter(X, a.tot<300) //Por ejemplo, acá se aplica el filtro para que tome solo las células con un tamaño superficial menor a 300, el valor se establece mirando el grafico.

show.img(X,pos=1)

X<-transform(X,f.total.r=f.tot.r-f.bg.r\*a.tot) //Terminados los filtros, se va a restar la fluorescencia existente en el fondo a la fluorescencia de cada célula

X<-transform(X,f.a=f.total.r/a.tot)

cplot(X, f.a~cellID, subset=pos==1) // Grafico que permite observar la fluorescencia en función a cada célula segmentada

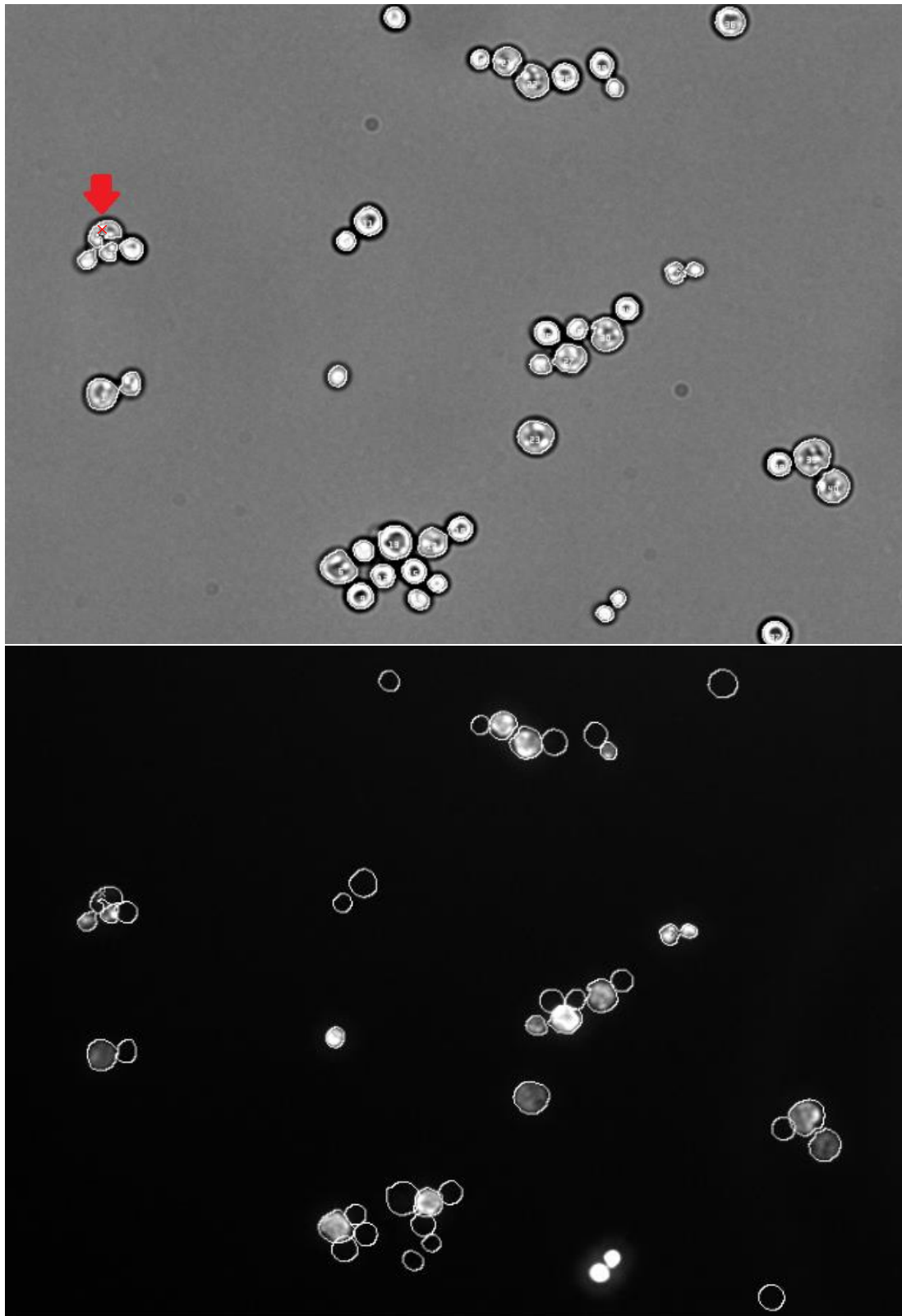
df<-X[[pos==1,c("cellID","sphere.vol","f.a")]] // Se genera un vector con la datos del número de célula segmentada (cellID), el volumen celular (sphere.vol) y la fluorescencia por célula (f.a)

write.csv(df,"tabla.csv") // Se extrae una tabla de formato csv con el vector df

show.img(X,pos=1) //Se abren las imágenes con las células segmentadas y con los filtros aplicados para corroborar de modo visual la selección de células vivas para la determinación del volumen

```
show.img(X,pos=1,channel="RFP.out") // Imagen de fluorescencia
```

En la Figura 26 se muestra un ejemplo de cómo se segmentan las células con el *software* Cell-ID, tanto imágenes de campo claro como de fluorescencia. Estas dos imágenes son las que se usaron para el análisis final por lo que ya se les aplicó los filtros en R, se observa a la izquierda arriba una célula con forma amorfa que el *software* eliminó del análisis (se ilustra con una cruz).



**Figura 26.** Imágenes con células segmentadas en el *software* Cell-ID. Imagen de arriba, de campo claro, se marcó un ejemplo de células que se filtran para el análisis. Con la foto de fluorescencia, abajo, se seleccionan las células vivas (no fluorescen).