

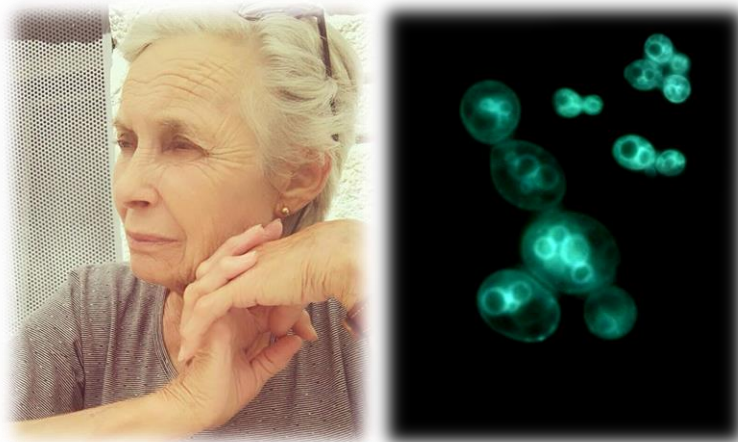
## Máster en Neurociencia

### Memoria do Traballo de Fin de Máster

**Expresión de xenes involucrados en enfermidades neurodexenerativas en especies de lévedos sometidos a estrés.**

**Expresión de genes involucrados en enfermidades neurodegenerativas en especies de levaduras sometidas a estrés.**

**Expression of genes involved in neurodegenerative diseases in yeast species subjected to stress.**



**Alejandro Peixoto Rodríguez**

Febrero, 2018

Tutora: Dra. M<sup>a</sup> Jesús Manso Revilla

Directora: Dra. María Ángeles Freire Picos



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dedicar este trabajo a cinco pilares fundamentales en mi vida. En primer lugar agradecer a mis abuelos por haber ejercido de padres durante 18 años, especialmente a mi abuela que se ofreció a dar humanidad a esta portada. En segundo lugar dar las gracias a mis padres por inculcarme que con sacrificio y esfuerzo se puede llegar muy lejos. El apoyo moral y la confianza en mí mismo, muy esencial en momentos críticos, se la debo a mi hermana. A toda mi familia en general y amigos. Por último, a mi directora M<sup>a</sup> Ángeles que sin ella este trabajo jamás se habría realizado.



# ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>1</b>
INTRODUCCIÓN .....	2
1. EL CADMIO Y SUS FUENTES .....	2
2. EFECTOS DEL CADMIO EN EL SER HUMANO .....	3
3. INVESTIGACIÓN EN SALUD Y CADMIO .....	4
4. LA TRANSCRIPTÓMICA Y EL ESTUDIO DE PATRONES DE EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE CADMIO.....	6
OBJETIVOS .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS <i>MICROARRAYS</i> .....	9
2. CEPAS DE LEVADURA.....	9
3. MEDIOS DE CULTIVO .....	9
4. EXTRACCIÓN DE RNA.....	10
5. PREPARACIÓN DE SONDAS.....	11
6. ANÁLISIS MEDIANTE NORTHERN BLOT .....	12
7. ANÁLISIS DE VACUOLAS POR MICROSCOPIA .....	13
8. ANÁLISIS DE DATOS .....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GENES QUE VARÍAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE CADMIO.....	16
2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE YPK9 EN LEVADURAS .....	21
3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DEL EFECTO DEL CADMIO EN LAS VACUOLAS DE LEVADURA .....	22
4. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA TOTAL .....	26
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28



## RESUMO

As enfermidades neurodexenerativas causadas polos factores ambientais, teñen unha alta incidencia na poboación humana actual. Os metais pesados como o cadmio afectan a expresión de xenes relacionados coa manifestación destas enfermidades. Partindo de datos de análises global de expresión de xenen do lévedo *Kluyveromyces lactis* en presenza de cadmio buscáronse aqueles xenes cuxos homólogos en humanos están relacionados con afeccións neurodexenerativas e que tiveran modificada a súa expresión. Estes datos foron comparados con outros xa publicados de *Saccharomyces cerevisiae* baixo as mesmas condicións. O noso análise identificou un maior número de xenes que cambian a súa expresión en *K. lactis*, incluído YPK9(Parkin) e permitiu comprobar que esta é unha boa especie modelo para o estudo de factores asociados a enfermidades neurodexenerativas. Comprobamos por microscopía que o cadmio afecta a integridade vacuolar pero este efecto é común con *S. cerevisiae*.

## RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas causadas por factores ambientales, tienen una alta incidencia en la población humana actual. Los metales pesados como el cadmio afectan a la expresión de genes relacionados con la manifestación de estas enfermedades. Partiendo de datos de análisis global de expresión de genes de la levadura *Kluyveromyces lactis* en presencia de cadmio, se buscaron aquellos genes cuyos homólogos en humanos están relacionados con afecciones neurodegenerativas y que tuvieran modificada su expresión. Estos datos fueron comparados con otros ya publicados de *Saccharomyces cerevisiae* bajo las mismas condiciones. Nuestro análisis identificó un mayor número de genes que cambian su expresión en *K. lactis*, incluido YPK9 (Parkin) y permitió comprobar que ésta es una buena especie modelo para el estudio de factores asociados a enfermedades neurodegenerativas. Comprobamos por microscopía que el cadmio afecta a la integridad vacuolar pero este efecto es común con *S. cerevisiae*.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases caused by environmental factors, have a high incidence in the current human population. Heavy metals such as cadmium affect the expression of genes related to the manifestation of these diseases. Based on the data from global analysis of gene expression from the yeast *Kluyveromyces lactis* in the presence of cadmium, we searched for those genes whose homologous in humans are related to neurodegenerative conditions and which have modified their expression. These data were compared with others already published of *Saccharomyces cerevisiae* under the same conditions. Our analysis identified a greater number of genes that change their expression in *K. lactis*, including YPK9 (Parkin) and showed that this is a good model species for the study of factors associated with neurodegenerative diseases. We verified by microscopy that cadmium affects the vacuolar integrity but this effect is common with *S. cerevisiae*.

## PALABRAS CLAVE

Levaduras, expresión génica, cadmio, vacuolas, enfermidades neurodegenerativas, Parkinson, Alzheimer, tráfico vesicular, organismo modelo.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un elevado número de personas que padecen algún tipo de enfermedad neurodegenerativa, tan sólo el grupo de demencias abarca a 50 millones de personas y se estima que su número siga aumentando, 10 millones de casos cada año (Chihyun P. et al., 2016; OMS). Ciertas modificaciones genéticas desempeñan un papel crítico en el desarrollo de distintas enfermedades neurodegenerativas. Se demostró que en la enfermedad de Alzheimer (AD), mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (PPA) y los genes de las presenilinas 1 y 2 tienen como consecuencia es la aparición de AD (Park C. et al., 2016, Elliott et al., 2016). También se ha asociado a la patología de las enfermedades neurodegenerativas, la expresión de forma diferenciada de varios microRNAs (miRNAs) (Chatterjee P. et al., 2017).

La expresión génica puede ser regulada al exponer las células a distintos factores ambientales, incluyendo agentes nocivos como metales pesados. Así el mercurio, el plomo o el cadmio entre otros, están relacionados con la aparición de diferentes enfermedades y trastornos neurológicos, como la esclerosis múltiple, el autismo, o alzhéimer, siendo responsables de causar también alteraciones durante el desarrollo neurológico en etapas prenatales (Jeong et al., 2017, El-Ansary et al., 2017, Aliomrani et., al 2017).

### 1. EL CADMIO Y SUS FUENTES

El cadmio ( $Cd^{+2}$ ) es un elemento químico que comúnmente se engloba en el grupo de metales pesados, que generalmente no se halla en el ambiente como un metal puro, es más abundante en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos con el cinc, plomo y menas de cobre. Al ser un subproducto del procesamiento de metales más valiosos, como el cinc o el cobre, resulta un metal muy barato y por ello ampliamente utilizado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) establecieron el valor límite tolerable, para el ser humano, en 7  $\mu g$ /semana por kg de peso, un consumo a partir de los 350 mg se considera potencialmente mortal (Pérez García et al., 2012).

Existen dos causas responsables de la presencia del  $Cd^{+2}$  en ambiente, el natural y el antropogénico. De modo natural, el cadmio se encuentra presente formando parte rocas que liberan cadmio al medio (Amjad Khan M. et al., 2017). Artificialmente se incorpora al medio ambiente en forma de fertilizantes, a través de la metalurgia y la minería entre otros. Existe una mayor incidencia de estas enfermedades neurodegenerativas en los empleados de las industrias del automóvil y de la pintura,



además de otras fábricas que utilizan metales (Mitra J. et al, 2014). Tan sólo el 5% del cadmio puede ser reciclado pudiendo permanecer en los suelos aproximadamente 300 años.

En nuestro organismo introducimos el  $Cd^{+2}$  principalmente, a través de la comida y los cigarrillos. Solamente el  $Cd^{+2}$  del tabaco aumenta en un 10% la probabilidad de padecer cáncer de pulmón. Además, es común adquirirlo mediante la ingesta de agua que ha sido contaminada con este metal (Pérez García et al., 2012; Sereroa A. et al., 2008).

## **2. EFECTOS DEL CADMIO EN EL SER HUMANO**

### **2.1 INGESTA Y EXPOSICIÓN**

En el organismo, bajo condiciones normales, el  $Cd^{+2}$  permanece principalmente unido a la metalotioneína (MT), una proteína de bajo peso molecular y rica en cisteínas, a la cual se une el metal evitando así su circulación y distribución por el cuerpo. En el intestino, cuando las concentraciones de  $Cd^{+2}$  no son muy elevadas, la MT se acumula en la mucosa intestinal siendo eliminada por la descamación periódica que sufre el tejido (Manahan 2000, Nava-Ruíz C et al., 2011). En caso de una alta concentración, este metal tiende a acumularse en el organismo permaneciendo entre 10 y 30 años en él (Pérez García P.E. et al, Sereroa A. et al 2008).

La fuente de exposición más común es mediante la ingesta de alimentos contaminados estas intoxicaciones son de carácter crónico, generando daños en los túbulos renales, anemia, alteraciones hepáticas y diferentes tipos de cáncer (Hernández-Martínez 2012).

### **2.2 EFECTOS EN EL SISTEMA NERVIOSO**

A nivel celular, el cadmio es un metal altamente tóxico que causa daños en el DNA, provoca estrés oxidativo y apoptosis (Gardarin A. et al., 2010). Entra libremente en la célula a través de los canales de calcio, esto se debe a que ambos comparten un radio iónico muy similar (Nava-Ruíz C et al., 2011). Causa "hipermutabilidad" por la inhibición de los sistemas de reparación del ADN, inhibiendo enzimas de reparación, además, se ha demostrado que el cadmio aumenta los niveles intracelulares de ROS (especies reactivas de oxígeno) dando como resultado una mayor peroxidación lipídica y un daño al DNA. Este elemento atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y tiende a acumularse en el cerebro, lo que genera un efecto neurotóxico (Wang et al., 2016 y Nava-Ruíz C et al., 2011). Existe una relación entre la acumulación anormal de metales en el cerebro y el envejecimiento asociado a diversos trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson (PD), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Wilson o el accidente cerebrovascular. Por

otra parte, también se observaron efectos más a corto plazo como cefalea, vértigo, disfunción olfativa y síntomas parkinsonianos entre otros (Wang et al., 2016).

### **3. INVESTIGACIÓN EN SALUD Y CADMIO**

#### **3.1 TRÁFICO VESICULAR**

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas, están relacionadas con defectos a nivel del tráfico vesicular. En el PD la  $\alpha$ -sinucleína produce graves alteraciones en la formación de las vesículas sinápticas, esto hace disminuir la neurotransmisión y elevar el nivel de los neurotransmisores citosólicos, llegando a producir daños en la neurona (Higuchi et al., 2003, Auluck et al., 2010). La proteína TAU juega un papel clave en el transporte vesicular neuronal, esta cuando sufre proteólisis desintegra la red de transporte a través de los microtúbulos y queda libre en el citosol desintegrando el sistema de transporte vesicular de la neurona, generándose así las neurofibrillas que aparecen en la enfermedad de Alzheimer (Higuchi et al., 2003; Elliott et al., 2016; Menezes et al., 2015).

#### **3.2 YPK9 Y SÍNDROME DE KUFOR RAKEB**

PARK9 (Parkin, YPK9) es uno de los genes asociados con PD, Parkin expresa, de manera ubicua, la ubiquitin ligasa E3 la cual marca proteínas para su transporte y degradación en el proteosoma (Pereira et al., 2016; Menezes R. et al., 2015). Además presenta homología con el gen ATP13A2 que codifica para una ATPasa (tipo P) del lisosoma que juega un papel clave en la captación de metales pesados, causando acumulaciones en la célula cuando está mutado. Estas acumulaciones junto con las deficiencias en la degradación de proteínas son responsables de la aparición de enfermedades como el síndrome de Kufor Rakeb (KRS). Se trata de una forma rara de Parkinsonismo juvenil que sigue una herencia autosómica recesiva, descrita por primera vez en 1994 (Al-Din et al.). Entre otros síntomas se incluyen una neurodegeneración generalizada que da como resultado hiperreflexia, hepaticidad, signo de Babinski positivo, paresia aguda y demencia, aunque carecen del temblor típico de los trastornos del parkinsonismo (Schmidt K. et al., 2009).

#### **3.3 EL COMPLEJO RETRÓMERO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

El retrómero es un complejo proteico que participa en la clasificación y tráfico retrógrado de endosomas en el complejo Golgi y la superficie celular, así como la recuperación de receptores transmembrana (Li et al., 2016; Bergman et al., 2014)

El retrómero, identificado por primera vez en levaduras, está altamente conservado en eucariotas. Se encuentra unido a los lípidos en la membrana endosomal y está encargado del reconocimiento de carga, es importante para la clasificación de proteínas vacuolares que se conocen como VPS (*vacuolar*

*protein sorting*), VPS35, VPS29 y VPS26, que son importantes biomarcadores de AD. Se observó que cuando una de estas subunidades sufre modificaciones, produce cambios en las interacciones de las demás, es decir, en todo el retrómero, por lo que las modificaciones que sufran son claves en la función, estabilidad y tiempo de vida del retrómero (Li et al., 2016; Bergman et al. 2014; Sadigh-Eteghad et al., 2015; Menezes et al., 2015).

En las neuronas el retrómero tiene la función de transportar a la Proteína Precursora Amiloide (PPA), el incorrecto funcionamiento del mismo facilita el procesamiento de PPA en fragmentos oligoméricos de  $\beta$ -amiloide que aparecen en la enfermedad de Alzheimer. Deficiencias en el complejo retrómero están relacionadas con varias enfermedades neurológicas en la que se incluye también el PD. Por ello el complejo retrómero es considerado como una posible diana de nuevos fármacos que luchen contra estas enfermedades neurodegenerativas (Bergman et al., 2014; Sadigh-Eteghad et al., 2015; Li C. et al., 2016).

Estudios histopatológicos demostraron que los afectados por AD mostraban en sus neuronas unos endosomas agrandados durante los primeros estadios de la enfermedad causados por un, el deterioro del complejo retrómero que interrumpe el reciclado endosómico. En AD es de gran importancia ya que es en estos endosomas donde la PPA se divide en fragmentos neurotóxicos como el  $\beta$ -amiloide (Bergman et al., 2014; Sadigh-Eteghad et al., 2015).

La mutación en gen VPS35 está es una causante genética de aparición del PD. Un déficit de VPS35 genera la desintegración mitocondrial por ubiquitinación con la consiguiente muerte de la neurona dopaminérgica. Además, el silenciamiento de VPS35 en células cultivadas conduce a la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en los lisosomas que contribuye a la patogénesis del PD. Estos resultados sugieren que el retrómero juega un papel crucial en el desarrollo del Parkinson (Li et al., 2016; Menezes et al., 2015).

### 3.4 LOS ORGANISMOS MODELO Y LAS LEVADURAS EN EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Los organismos modelo aportan muchas ventajas en la investigación molecular por su fácil mantenimiento, la obtención rápida de nuevas generaciones o la disponibilidad de herramientas moleculares para análisis genéticos.

El Parkinson es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. Se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la *pars compacta*. Un déficit de la

actividad en el complejo I, de la cadena de transporte de electrones, produce un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y procesos de autofagia mitocondrial (Tymans et al., 2015).

Estudios genéticos utilizando *Drosophila melanogaster* sugieren que Parkin actúa en la misma vía, que la proteína Pink1 crucial para modular la degradación mitocondrial. La eliminación de las mitocondrias dañadas es beneficiosa para la célula, ya que reduce la producción de ROS tóxicos y la liberación de inductores apoptóticos. De hecho, Parkin ofrece protección contra una diversa gama de agentes dañinos celulares, incluyendo la enfermedad de Parkinson (Pereira C. et al 2016).

Los estudios con levaduras como organismos modelo, nos permite inducir mutaciones y observar los daños celulares a lo largo de generaciones en pocos días, la experimentación con fármacos con rápidos resultados, además de acarrear menos problemas éticos ya que no sienten dolor al carecer de sistema nervioso (Heinisch et al. 2016)

En *Saccharomyces cerevisiae* se han desarrollado varios modelos para estudiar la toxicidad de  $\alpha$ -sinucleína que recapitulan muchos fenotipos relevantes para la enfermedad tales como defectos de tráfico vesicular, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Pereira C. et al., 2016; Tymans J. et al., 2015).

Por lo expuesto en este apartado se comprueba que el metabolismo aerobio y la integridad mitocondrial son un aspecto esencial en las enfermedades neurodegenerativas.

Las especies de levaduras difieren en su metabolismo respiro fermentativo. *S. cerevisiae* es predominantemente fermentativa y comúnmente utilizada como organismo modelo, la utilización de *Kluyveromyces lactis*, una levadura que es predominantemente respiradora en condiciones aerobias, hace que resulte interesante considerar su utilización como organismo modelo ya que mitocondrias y estrés oxidativo juegan un papel clave en la enfermedad de Parkinson.

#### **4. LA TRANSCRIPTÓMICA Y EL ESTUDIO DE PATRONES DE EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE CADMIO**

Los *arrays* de DNA, también conocido como DNA-chips y *microarrays* (cuando el número de genes es elevado) son unas herramientas ampliamente utilizadas para conocer la expresión de un alto número de genes en una condición dada. La transcriptómica permite el estudio de ARNm o trascritos, mostrando los genes que se expresan en el momento del análisis.

El DNA microarray es una técnica que se ayuda de una superficie sólida con unas coordenadas en las que se encuentra inmovilizadas e identificadas, secuencias de DNA de un organismo. En nuestro caso de *S. cerevisiae*, que es hibridado con cDNA de *K. lactis*, marcado radioactivamente. La lectura del

*array* es mediante análisis de imagen por ordenador y nos permite identificar las coordenadas y los cambios en el nivel de expresión bajo las condiciones de presencia o ausencia de cadmio.

Esta tecnología desde sus inicios fue ampliamente utilizada para establecer una relación entre estados celulares y expresión génica. En humanos permite identificar genes que aumentan o disminuyen su expresión en determinadas enfermedades como el cáncer de mama, próstata o pulmón. Además de esto, el uso de *microarrays* también abarca la detección de modificaciones en el número de copias de un gen así como el descubrimiento de aberraciones en los patrones de metilación (Trevino et al., 2007).

En nuestro caso, nos permitió estudiar el patrón de expresión de genes de *K. lactis* que sufrían variaciones en su expresión en presencia de cadmio. En el laboratorio existe experiencia de análisis transcriptómico en levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Becerra et al., 2002; Blanco et al., 2007). Gracias a ello disponemos de datos crudos de hibridación de los cDNA de *K. lactis* para el estudio del efecto del cadmio en el transcriptoma de esta levadura. Por lo expuesto en esta introducción consideramos que su análisis puede ser de gran interés para estudios relacionados con enfermedades neurodegenerativas.

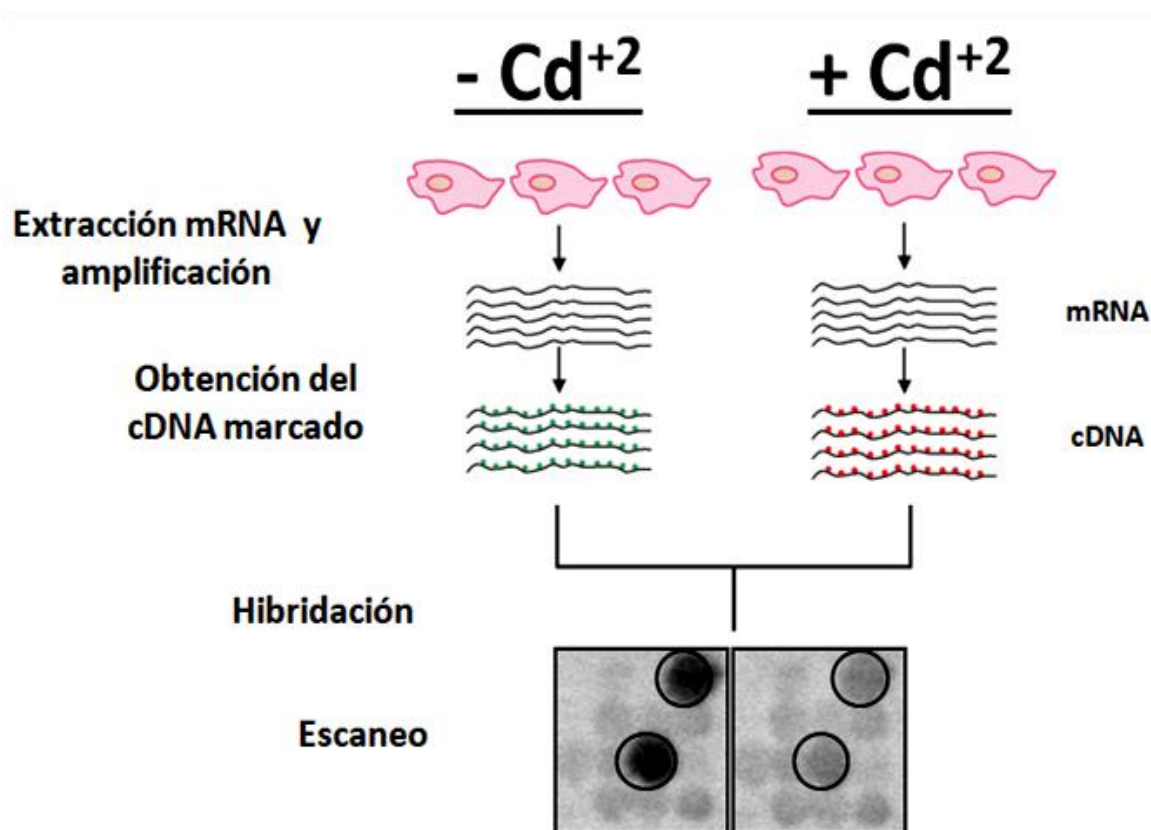


Figura 1. Esquema de la técnica de microarrays (modificado de Trevino et al., 2007)

## OBJETIVOS

La investigación con organismos modelo en biomedicina, busca aquellas especies con un mayor parecido a la maquinaria molecular humana. Pensamos que la levadura *K. lactis* debido a su naturaleza predominantemente aerobia, tengan una respuesta transcripcional más similar a los modelos de tejidos humanos que *S. cerevisiae*. Por ello nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Emplear datos de *microarrays* para identificar genes que varían su expresión en respuesta a estrés por cadmio con el fin de comprobar cuál de los perfiles de expresión se aproxima más a lo conocido en el patrón humano, gracias a la expresión diferencial en las especies *S. cerevisiae* y *K. lactis*.
2. Iniciar el análisis de tráfico vesicular en las dos especies de levaduras en células sometidas a estrés causado por la presencia de cadmio, comenzando por la puesta a punto de la técnica para visualizar vacuolas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS *MICROARRAYS*

Los datos de los arrays fueron obtenidos en el laboratorio del siguiente modo: la síntesis de cDNA e hibridación de la membrana se realizó según Becerra et al., 2002. La cuantificación de las señales se realizó con el programa *ArrayVisionTM (MOLECULAR DINAMICS)*, teniendo en cuenta la presencia por duplicado de cada gen en un mismo array. Los valores de expresión obtenidos en cada experimento se normalizaron respecto a la intensidad total que representa cada array.

### 2. CEPAS DE LEVADURA

Línea	Genotipo	Fuente
BY4741	<i>Mat a his4Δ0leu2 Δ0Met15 Δ0 ura3 Δ0</i>	Euroscarf
FY23	<i>Mat a ura3-52 trp163 leu2-1</i>	Winston et al., 1995
NRRL-Y1140	<i>Mat a wild type</i>	CBS2359

**Tabla 1. Cepas de levadura utilizadas en el desarrollo experimental**

### 3. MEDIOS DE CULTIVO

#### YPD

Se trata de un medio general para el crecimiento para levaduras. Su composición incluye bacto peptona al 2%, extracto de levadura al 1% y dextrosa al 2%. Este medio fue elaborado en dos formatos, uno líquido para cultivos con aireación y otros sólidos con un 1,5% de de Bacto-agar para realizar cultivos en placa. Las condiciones de esterilización de los medios en autoclave fueron de 20 min a 121°C a 1 atm de presión.

#### 4. EXTRACCIÓN DE RNA

Se realizaron para la obtención de muestras de biológicas cultivos de cepas de levaduras en un volumen total de 100 mL incubados a 30°C. Se observó su Absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ), esta debe tener un valor de 0,1. Tras esto, de cada cultivo se extrajo dos replicas de 0,6 mL que fueron depositadas en un matraz con 200mL de YPD estéril. En uno de ellos, se añadió cadmio (sulfato de cadmio) hasta conseguir una concentración de 3 mM, dejándolo incubar durante 2h para generar un efecto en las células.

Al alcanzar un valor de 0,6 las células se precipitan mediante centrifugación de 200 mL de cultivo durante 5 min. a 5.000 rpm. El pellet celular se resuspendió en 400  $\mu$ L de Buffer AE (Acetato sódico 50 mM, EDTA 10 mM a pH= 5,2) y se pasó a un tubo Eppendorf añadiendo 40  $\mu$ L de SDS al 10%. Se añadió un volumen igual de Fenol-Buffer AE (50mL fenol + 50mL cloroformo + 10mL Buffer AE) realizando un agitado con el vortex y se incubaron durante 4 min a 65°C. Rápidamente los tubos se pasaron a nitrógeno líquido donde el fenol cristalizó en segundos. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 5 min se extrajo la fase acuosa repitiendo el proceso a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, nos quedamos con la fase acuosa y libre de proteínas precipitamos el RNA con 1/10 de volumen de acetato sódico 0,3 mM pH=5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Tras precipitar el ARN, centrifugando 10 min a 13000 rpm, el pellet se lavó con etanol al 70% dejándolo secar. Se resuspendió el RNA en 20 $\mu$ l de agua tratada estéril y se calculó la concentración.

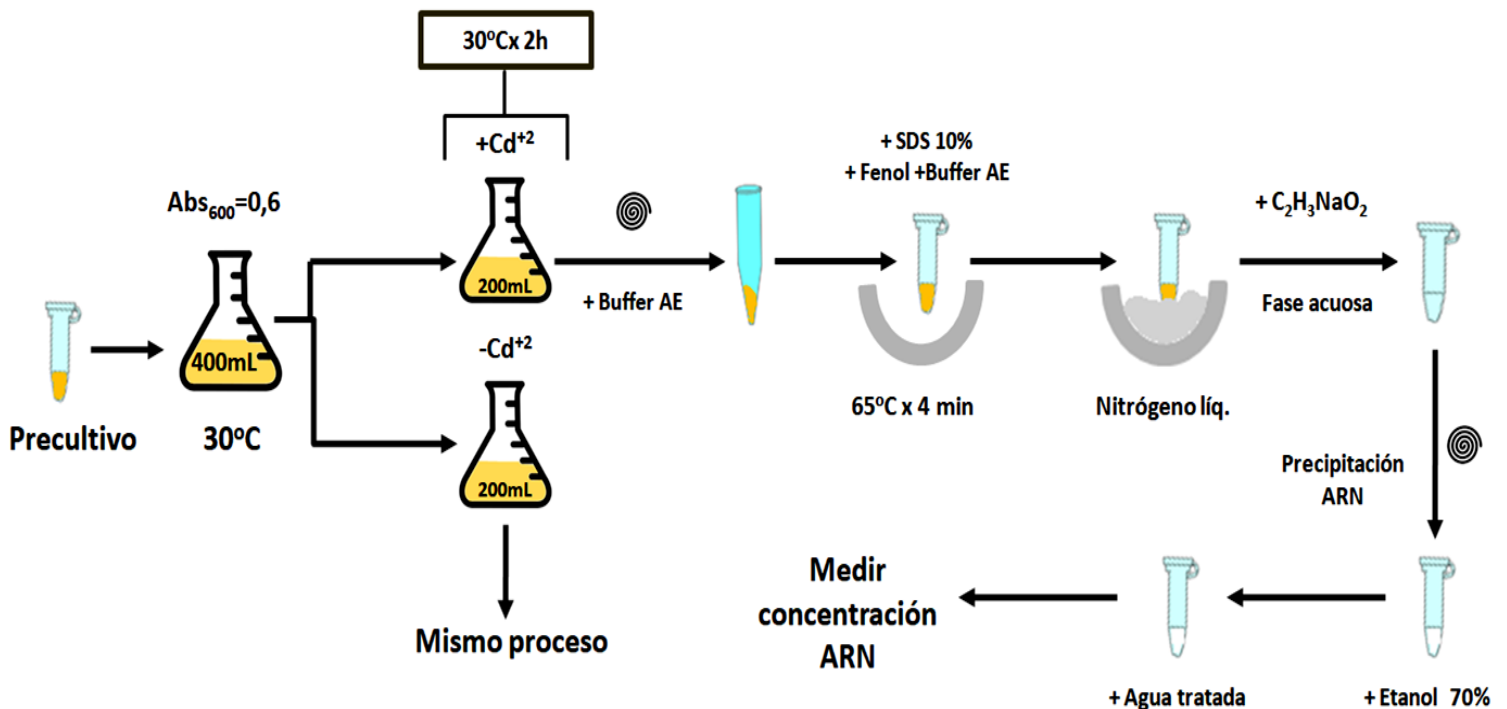


Figura 2. Esquema simplificado del diseño experimental y método de extracción de RNA



#### 4.1 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA

Para medir de la concentración del RNA extraído, se tomaron 4 µL de la muestra y se llevaron a un volumen final de 1 mL con agua bidestilada. La absorbancia se midió a 260nm en un espectrofotómetro (*BioSpectrometer kinetic*) y se calculó la concentración teniendo en cuenta que  $A_{260}=1$  es equivalente a una concentración de 40 µg/mL de RNA.

### 5. PREPARACIÓN DE SONDAS

#### 5.1 OBTENCIÓN DE LAS SONDAS PARA PCR

Para amplificar el DNA de los genes que empleamos como sondas mediante PCR se utilizó un termociclador (*Primus MWG-Biotech*) incubando el DNA molde (20 pM de cada uno de los cebadores) además de dNTPS, DNA polimerasa y buffer de la casa comercial hasta un volumen final de 50µL.

La Tª utilizada varía en función a la temperatura de fusión (Tm) de cada cebador utilizado.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Tm
KIYPK9F	TGTCATCATTGACAGCAGA	57,22 °C
KIYPK9R	TTTAGCTGTTGCTGCTTCCT	56,45 °C
U3F	CGACGTA CTT CAGTATGTAA	45,5 °C
U3R	ATTTGTACCCACCCATAGAG	50,7 °C

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo**

#### 5.2 MARCAJE DE SONDAS PARA NORTHEN BLOT

Las sondas de *YPK9* y *U3* se prepararon con el *Kit Prime Gene Labelling System* (Promega). Se marcaron 1-2 µg de DNA por sonda siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras 1 hora de marcaje a 37°C, el isótopo no incorporado se separó de la sonda por cromatografía en columnas de Sephadex-G50 hidratado con tampón STE (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM).

La medida de la radioactividad incorporada en las diferentes fracciones eluidas fue medida mediante un contador de partículas de centelleo, correspondiendo el primer pico de aumento de radioactividad con las fracciones de muestra que contenían la sonda marcada.

## 6. ANÁLISIS MEDIANTE NORTHEN BLOT

### 6.1 ELECTROFORESIS

Para separar los RNAs en función de su peso molecular es necesario trabajar en condiciones desnaturalizantes. Se preparó un gel de agarosa al 1,5% en tampón 1xMOPS (4-morfolin ácido propanosulfónico). Tras fundir la agarosa se enfrió hasta unos 65°C aproximadamente y a esa temperatura se añadió formaldehído al 6% antes de verter el gel en la cubeta.

Es necesario desnaturalizar nuestras muestras para que el RNA migre en función de su peso molecular, para ello, se llevo cada muestra de RNA hasta un volumen final de 10µL, se añadieron 20µL de buffer de muestra y se incubó durante 5 min a 65°C. Pasado este tiempo, los tubos fueron enfriados rápidamente en hielo y se añadió 1,5µL de azul de carga. Las muestras se cargaron en el gel y se sometieron a una electroforesis (100V) entre 3 y 4 horas.

	1mL dietil pirocarbonato (DEPC)
Agua tratada con DEPC	1L de agua Dejar actuar 12 horas y esterilizar en autoclave
Tampón 20XMOPS	0,1M acetato sódico 20mM EDTA pH=7 0,4M MOPS Agua tratada con DEPC
Buffer de muestra	24% formamida desionizada 10% 20 x MOPS 8,9% formaldehído 57,1% agua tratada con DEPC
Azul de carga	Azul de bromofenol Xileno cianol

**Tabla 4. Soluciones y buffers empleadas en la electroforesis**

## 6.2 TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN

Tras la electroforesis, el RNA se transfirió a una membrana de nylon (*Hybond Roche*) con carga (+) con la ayuda del sistema *VacuGene* a 50-60mBa durante 1h, utilizando un tampón de transferencia 10X SSC (a partir de 20X SSC y agua tratada). Para fijar el RNA se utilizó un transiluminador de luz UV durante 3 min.

Las membranas se prehibridan en botellas con 50mL de solución de hibridación entre 20 y 30 min a 60°C. Pasado el tiempo, se añadieron entre 10 y 15mL de solución de hibridación con la sonda que previamente se desnaturaliza a 100°C durante 5 min. Las hibridamos toda la noche a 60°C.

	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M pH=7,2
Solución de hibridación	7% SDS
	EDTA 1mM
Solución de lavado	2X SCC
	0,1% SDS

**Tabla 5. Soluciones empleadas en la hibridación**

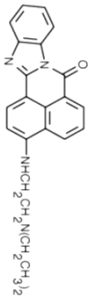
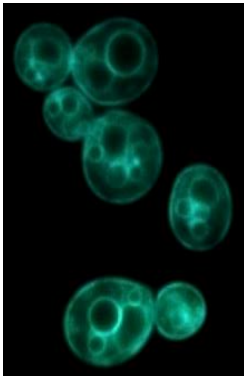
Las incubaciones se realizaron con solución de lavado a la misma temperatura de la hibridación. A posteriori, se realizó la autoradiografía entre 12h y varios días, dependiendo de la intensidad de señal que queremos obtener.

La normalización de señales de los transcritos se calculó dividiendo los valores de la densidad de la banda estudiada entre el correspondiente valor de señal de U3 en esa muestra y una vez normalizados se escogió un valor como la unidad, los demás valores se hacen relativos a esta señal.

## 7. ANÁLISIS DE VACUOLAS POR MICROSCOPIA

Con el objetivo de encontrar posibles efectos del cadmio en la morfología de la vacuola, se empleó el microscopio óptico de fluorescencia (Nikon H600L).

Si bien la vacuola suele ser un orgánulo voluminoso en levaduras, empleamos un marcador fluorescente de vacuolas. MDY-64 (*Molecular Probes*) que marca las membranas de las vacuolas de levaduras emitiendo una fluorescencia verde. La longitud de onda de excitación y emisión es 451 y 497 respectivamente por lo que utilizamos el filtro GFPHQ que abarca estos rangos.

Molécula	Observación
 <p>Fórmula molecular: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O  Peso molecular: 384.4798  CAS Nombre / Número:</p>	

**Figura 3. Características del marcador MDY-64 tomadas de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Y7536>.  
Fotografía Peixoto et al., 2017.**

En primer lugar, se realizaron tres precultivos, uno por cada cepa, de 30mL de YPD a 30°C durante 12h, pasado este tiempo se extrajo 1mL de cada precultivo que se añadió a 30mL de YPD estéril. Se dejó crecer a 30°C hasta alcanzar una  $A_{600} = 0,1$ , a continuación se extrajeron 0,6 mL de cada cultivo realizando dos replicas de cada uno que fue añadido a 15 mL de YPD estéril, obteniendo un total de seis matraces. Para terminar, a uno de los dos matraces de cada cultivo se le añadieron 45  $\mu$ L de Cd 1M para alcanzar una concentración final de 0,3M. Se incubaron a 30°C durante 1h y 30 min. Pasado ese tiempo se midió la absorbancia  $A_{600}$  cuyos valores deben rondar entre 0,1/0,2 aprox. A continuación, se resuspendieron  $10^6$  células de cada cultivo en 1mL de solución stock de buffer HEPES (10mM), pH 7.4, con 5% glucosa.

<i>K. lactis</i>	55,4 x 10 <sup>6</sup> Cél/mL
<i>S. cerevisiae</i>	3x10 <sup>6</sup> Cél/mL

**Tabla 7. Concentración de cada especie para la normalización previa a la tinción.**

Para 10mL HEPES	
HEPES (1M)	0,01M
Glucosa 25%	5%
Agua bidestilada	

**Tabla 8. Composición de soluciones para elaborar 10mL de buffer HEPES.**

Posteriormente se añadieron 0,7 $\mu$ L de marcador MDY-64 y se incubaron las células 5min a T<sup>a</sup> ambiente, en condiciones de oscuridad para evitar perder fluorescencia, se centrifugaron las muestras 30 seg a 13000 rpm, se extrajo el sobrenadante y con 30 $\mu$ L de buffer HEPES se resuspendió el pellet y se añadió 1  $\mu$ L a un portaobjetos. Finalmente se observó al microscopio de fluorescencia bajo un filtro GFPHQ de rango 451-497nm.

## **8. ANÁLISIS DE DATOS**

### **8.1 MICROARRAYS**

En el análisis de los datos de arrays de DNA (Becerra et al., 2002; Blanco et al 2007) para la cuantificación de la señal se empleó ARRAYVISION software (Molecular Dynamics), que localiza sobre cada elemento de la matriz un círculo delimitador ajustado al tamaño de la mancha de ADN. El fondo del área local se definió colocando manualmente 10 círculos delimitadores en todo el filtro. Para cada condición, se analizaron los datos de cuatro hibridaciones independientes, utilizando dos matrices y muestras de ARN diferentes (un total de ocho puntos de réplica por ORF). Las tablas de partida para éste trabajo incluían ORFs cuyas diferencias de expresión eran significativas.

Los datos crudos (Freire Picos y Becerra, datos no publicados) utilizados para el análisis comparativo con las categorías funcionales de las bases de datos MIPS y SGD. Estos datos fueron incluidos en hojas de cálculo que nos ayudó a la hora de agrupar el amplio número de genes por su función.

### **8.2 MICROSCOPÍA**

En el análisis de las alteraciones vacuolares por microscopia el número de células analizadas en cada caso es de 100 (n=100). Los datos se obtuvieron haciendo dos recuentos en cada caso aplicando el error típico de la media en cada uno (Microsoft Excel 2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GENES QUE VARÍAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE CADMIO.

Con objetivo de identificar genes de respuesta a cadmio con expresión diferencial entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* y determinar cuál de las dos especies se aproxima mejor al patrón de expresión humano en los genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas. Comenzamos por analizar los datos de la expresión de los genes de la levadura *K. lactis* previamente obtenidos en el laboratorio mediante la hibridación heteróloga de microarrays de *S. cerevisiae* a cDNA de células de *K. lactis*.

#### 1.1 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO EN *K. lactis*

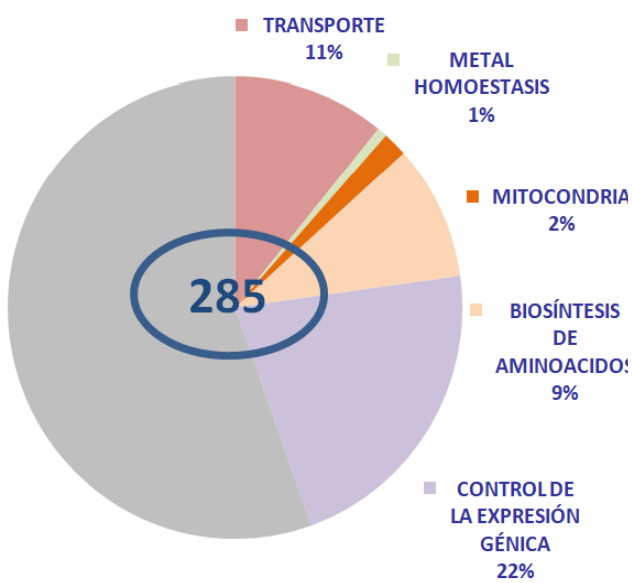
Se permitió identificar un total de 903 genes de *K. lactis* que variaron su expresión en presencia de cadmio 3mM en el medio. En concreto, 285 genes descienden su expresión y mientras 618 la aumentan. Se aprecia que el número total de genes, que aumentan su expresión es más del doble de aquellos que la expresión disminuye en presencia de cadmio (Peixoto et al 2017).

Dado que el número de genes es elevado, los agrupamos en función de sus categorías funcionales siguiendo el mismo criterio que Serero y colaboradores, para el posterior análisis comparativo que se muestran en la figura (6).

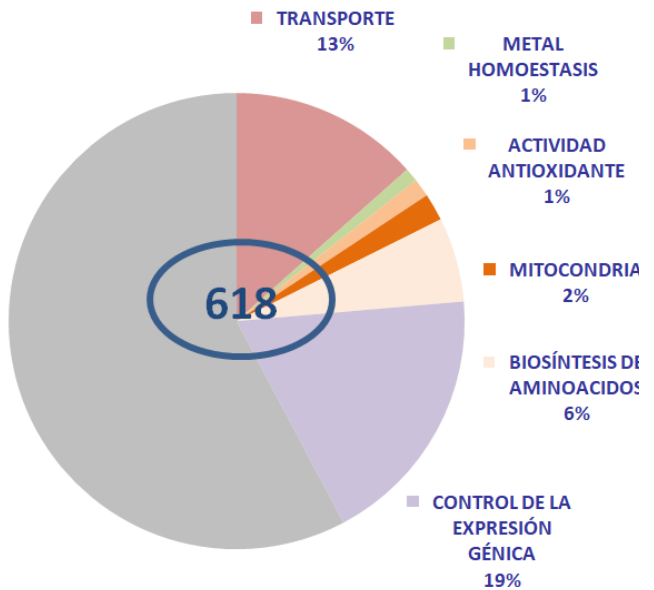
Los diagramas de la figura 5 (A y B), cabe destacar la presencia de genes de actividad antioxidante analizados exclusivamente en la categoría de los genes que aumentan su expresión, posiblemente como respuesta de la maquinaria celular para contrarrestar los efectos que pueden ser causados por el cadmio.

Nuestros resultados de *K. lactis* fueron comparados con los datos de expresión de genes de *S. cerevisiae* implicados en la respuesta al cadmio obtenidos por Serero et al., (2008). Los datos de estos autores tan solo muestran los genes que aumentan su expresión necesaria para el crecimiento en un medio con Cd<sup>+2</sup> (Figura 6C). Empleamos diagramas de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) para buscar genes comunes en ambas especies.

### A DISMINUYEN - K.I



### B AUMENTAN - K.I



### C AUMENTAN - S.c

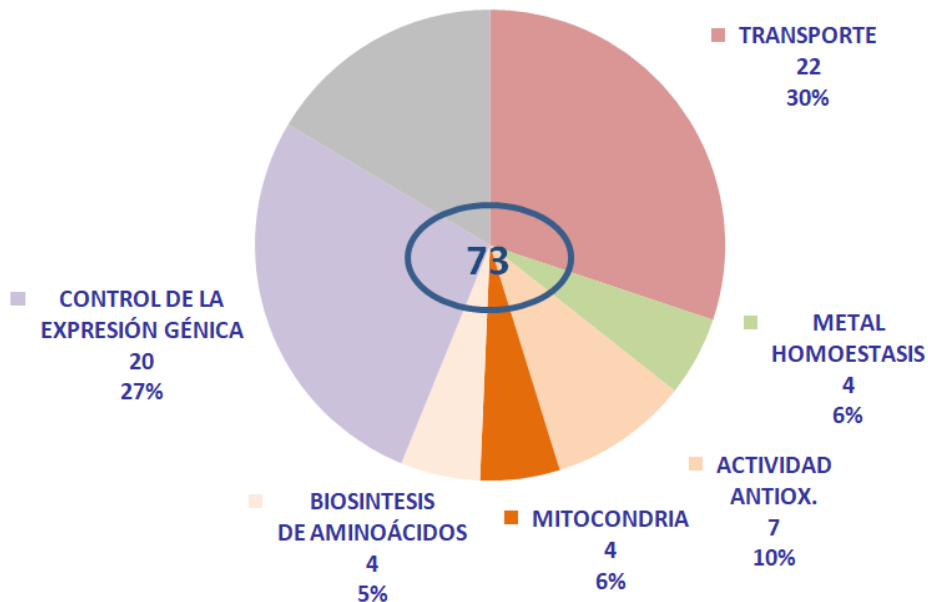
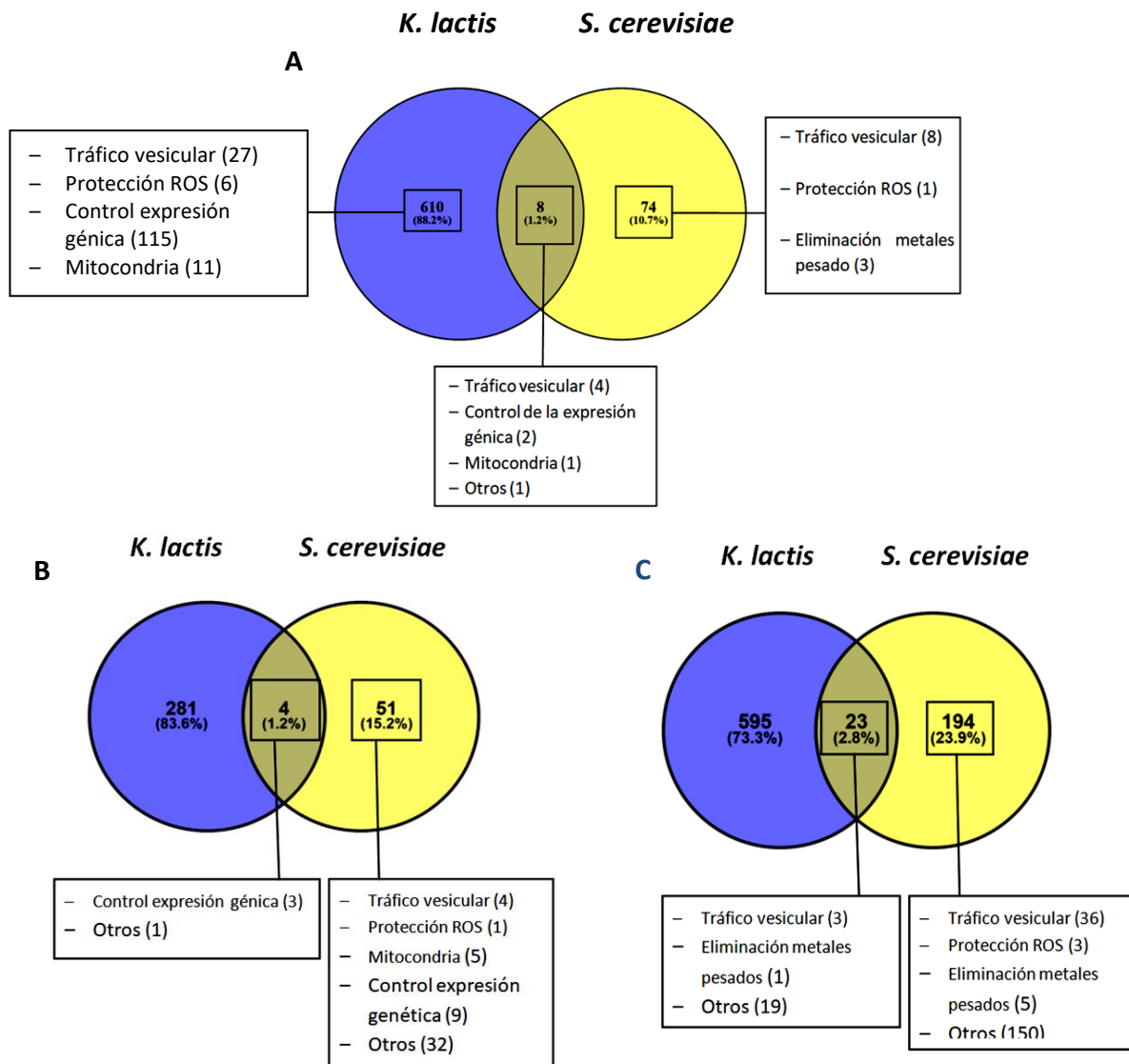


Figura 5. Diagramas mostrando los porcentajes de genes de diferentes categorías funcionales que varían su expresión en respuesta a cadmio en *K. lactis*, A) Disminuyen su expresión, B) Aumentan su expresión y C) Porcentaje de genes que aumentan en *S. cerevisiae* (según Serero et al., 2008). En el interior de cada gráfico circular se indica el número total de genes de cada uno de ellos.

## 1.2 ANÁLISIS COMPARATIVO EN *Saccharomyces cerevisiae*



**Figura 6. Diagrama de Venn comparando de genes que varían su expresión en presencia de Cd<sup>+2</sup> entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*. A) nuestros datos y los de Serero et al 2008. Diagrama comparativo entre nuestros datos y los de Yu et al. 2012. B) disminuyen su expresión. C) aumentan su expresión.**

Pudimos comprobar que del total de genes que aumentan su expresión en ambas especies, en la intersección tan solo coincidieron ocho, mientras que existen 74 genes que sólo cambian su expresión en *S. cerevisiae* (Figura 6A). De estos últimos, ocho tienen una relación directa con el tráfico vesicular, uno está relacionado con protección contra especies reactivas del oxígeno y tres asociados a la eliminación de metales pesados. Por otro lado, tan sólo existen ocho genes en común entre los datos de ambas especies, de los cuales cuatro están relacionados con el tráfico vesicular.



Como se aprecia en la figura, el número de genes que varían su expresión en *K. lactis* es ocho veces mayor que en *S. cerevisiae*. Esto sugiere que *K. lactis* tiene una respuesta al cadmio mucho más compleja a nivel trascricional, probablemente por su metabolismo oxidativo.

Decidimos ampliar nuestra comparación con los datos de Yu y colaboradores (2012), porque en *S.cerevisiae* su análisis incluye más genes que disminuyen su expresión. En este caso un total de cuatro genes en común (Figura 5B) que disminuyen su expresión. Aparece un mayor número de genes de *S.cerevisiae* que aumentan su expresión si los comparas con los datos de Serero y colaboradores. En este caso 194 genes son exclusivos de *S. cerevisiae* y 23 de ellos son comunes con *K. lactis* (Figura 6C).

Existe una variación en el número de genes de *S. cerevisiae* que aumentan su expresión relacionados con el tráfico vesicular (4 veces) en comparación con Serero y colaboradores, sin embargo no, estos no coinciden con *K. lactis*.

### 1.3 Análisis de genes implicados en el tráfico vesicular

El tráfico vesicular juega un papel clave en las enfermedades neurodegenerativas (Li C. et al., 2016, Bergman et al., 2014; Sadigh-Eteghad et al., 2015). Tras el análisis comparativo entre ambas especies, se agruparon aquellos genes de *K. lactis* relacionados con la vacuola y el tráfico vesicular (Tabla 9 y 10). En contra, hay 12 genes en los que disminuye su expresión (4% del total que disminuyen) y 31 genes vacuolares en los que aumentan su expresión (5% del total de genes respectivamente). Los datos aparecen reflejados en la siguiente tabla.

DISMINUYEN SU EXPRESIÓN		
GEN/ALIAS	FUNCIÓN ESPECÍFICA	FUNCIÓN GENRAL
VNX1	vacuolar na+/h+ exchanger	6 TRANSPORTADORES GENERALES
TMN3	vacuolar transport. copper ion homeostasis	
VOA1	protein complex assembly vacuolar and er	
VMA22	vacuolar acidification	
BET5	ER to golgi vesicle-mediated transport	
VPH2	vacuolar acidification	
APM3 YKS6	vacuolar protein targeting	4 SEÑALIZACIÓN
VID27	vacuolar protein targeting (putative)	
RCR2 SSH5	vesicle-mediated transport. vacuolar portein	
TRS130	secretion /protein targeting to vacuole	
VAB2 VAB31	vacuolar protein targeting and endosome organization	2 TRANSPORTE VESICULAR
MON2	secretion/protein targeting to vacuole	

**Tabla 9. Genes relacionados con la vacuola que disminuyen su expresión Cd<sup>+2</sup> en *K. lactis*.**

**AUMENTAN SU EXPRESIÓN**

<b>GEN/ALIAS</b>	<b>FUNCIÓN ESPECÍFICA</b>	<b>FUNCIÓN GENREAL</b>
APL6 YKS5	vacuolar protein targeting	8 transportadores
YPK9	vacuolar	
ZRT3	zinc ion transmembrane transporter activity	
AVT4	amino acid vacuolar transport	
TFP3 VMA11	vacuolar acidification	
CLS9		
VMA5 CSL5 VAT3	vacuolar acidification	
YPQ1	basic amino acid transmembrane export from vacuole	
SMP2 PAH1	respiration; multiple. vacuolar homeostasis	5 asociados a DNA
VBA5	transport, related to vacuolar	
AIM20	unknown	
IRC19 / RRG4	unknown	
YNR061C	vacuolar stress related.	
YKL222C	unknown	
VPS75	recombinación and nucleosome remodeling	
ATG27 ETF1	autophagic vacuolar assembly	
APE4	proteolysis. fungal-type vacuole lumen	
TRE2	protein targeting to vacuole involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	
VID22	vacuolar protein targeting	
VPS63	vacuolar protein sorting	
PFA3	protein palmitoylation. vacuole fusion (non-autophagic)	
SVL3	unknown endocytosis	
PAU22	unknown	
VPS29 VPT6	vacuolar protein targeting	9 transporte vesicular
PEP11		
VAM9	vacuolar protein targeting	
EMP70 p24a	endosomal and vacuolar transport	
TMN1		
MRL1	vacuolar transport	
VAC14	protein binding component of vacuolar membran	
TRE1	protein targeting to vacuole	
YOR292C	unknown	
YOR102W	unknown	
SEA4	vacuolar / nuclear pore/ signaling	
VPS35 GRD9	vacuolar protein targeting	
VPT7		
VAC8 YEB3	vacuolar protein targeting	

**Tabla 10. Genes relacionados con la vacuola que aumentan su expresión en presencia de Cd<sup>+2</sup> en *K. lactis*.**

Comprobamos que existe un aumento de la expresión en YPK9, VPS29 y VPS35 en *K. lactis*, que como se explicó en la introducción, en humanos están directamente involucrados en distintas patologías neurológicas (Tabla 11). De ellos, YPK9 y VPS35 solo modificaron su expresión en *K. lactis* mientras que VPS29 varía su expresión en ambas especies.

Gen	Descripción
YPK9	Proteína vacuolar homóloga de ATP13A2 humano (PARK9)
VPS29	Subunidad del retrómero; transporte retrógrado endosoma - Golgi, reconocimiento de carga.
VPS35	Subunidad del retrómero. Su sobreexpresión está asociada a Alzheimer y Parkinson.

Tabla 11. Genes de *K. lactis* implicados en tráfico vesicular y enfermedades neurodegenerativas.

## 2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE YPK9 EN LEVADURAS

Dada la diferente respuesta de gene que aumentan su expresión en *K. lactis* decidimos comprobar, mediante northern blot, las variaciones en la expresión de YPK9 en *K. lactis* y *S. cerevisiae*. Se utilizó la levadura NRLL-Y1140 puesto que es la misma utilizada para el análisis de *microarrays* y dos cepas de *S. cerevisiae* BY4741 y FY23.

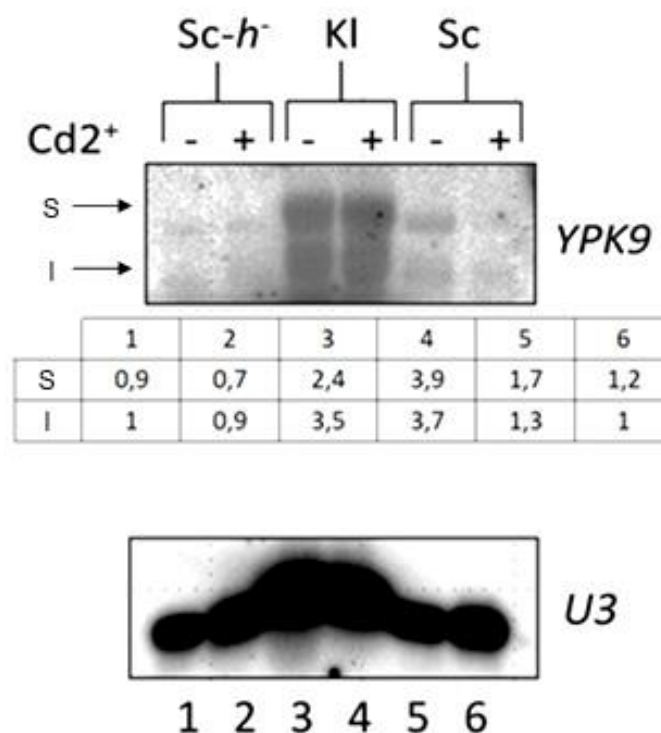


Figura 7. Análisis mediante *northern blot* de la expresión del gen YPK9 en *K. lactis* (KI) y dos cepas de *S. cerevisiae* FY23 (Sc-h<sup>-</sup>) y BY4741 (Sc). Las flechas señalan las posiciones de las bandas de hibridación de YPK9 en las dos especies. Datos normalizados respecto a U3.

Como se puede ver en la figura aparecen dos bandas de hibridación (S, I), los niveles de expresión confirman los datos de los microarrays de *K. lactis*, *YPK9* prácticamente duplica su expresión en presencia de  $Cd^{2+}$ , (Fig. 6 pocillos 3/4). Sin embargo, en las dos cepas analizadas de *S. cerevisiae* no se produce aumento transcripcional (Fig. 7 pocillos 5/6). En BY4741, *YPK9* disminuye su expresión en presencia de  $Cd^{2+}$ , especialmente el del transcrito de menor tamaño, mientras que en FY23 aunque débil se mantiene (Fig. 7 pocillos 1/2). Los datos en *S. cerevisiae* refleja variaciones cepa específicas. Por tanto el aumento transcripcional de *YPK9* es una característica diferenciada de *K. lactis* frente a *S. cerevisiae*.

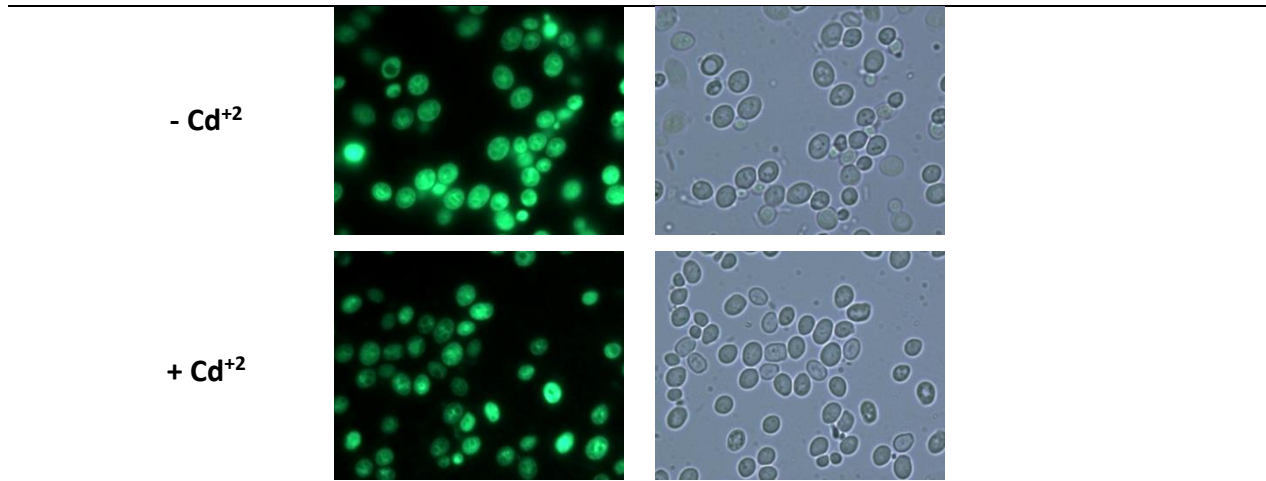
### **3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DEL EFECTO DEL CADMIO EN LAS VACUOLAS DE LEVADURA**

Dado que en *K. lactis* encontramos 43 genes relacionados con funciones vacuolares cuya expresión varía en *K. lactis* a causa de la presencia de  $Cd^{+2}$  (Tablas 4-5), decidimos analizar los efectos de este metal en la morfología de la vacuola. Analizamos las mismas cepas que fueron estudiados en el northen ya que tienen distinta respuesta.

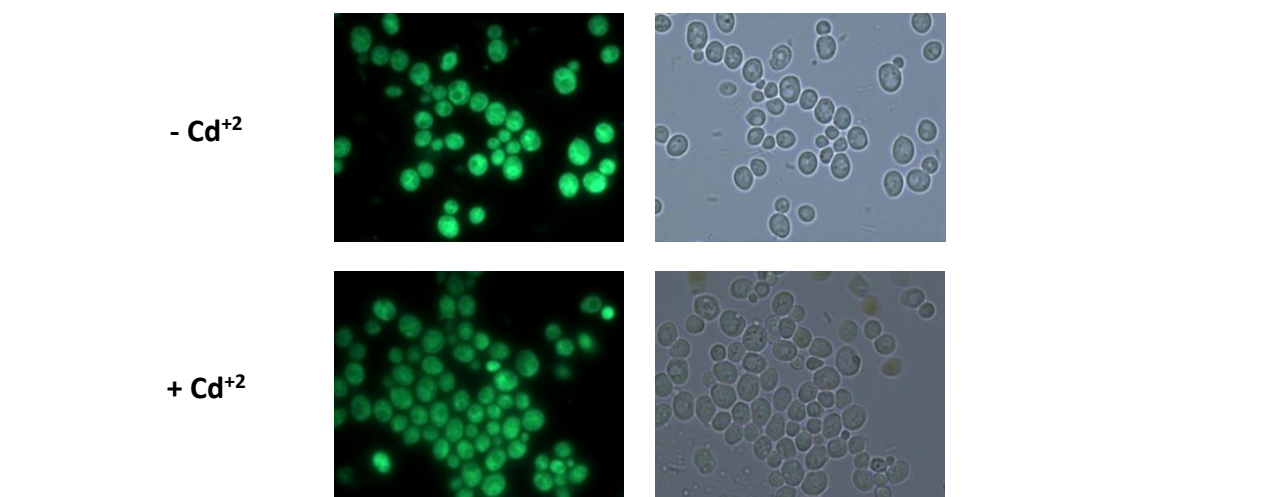
Por ello se efectuó la puesta a punto de la tinción de vacuolas, en nuestro caso probamos distintas concentraciones de marcador para la correcta visualización de la vacuolar, permitiéndonos visualizar alteraciones que pueda causar el cadmio al microscopio de fluorescencia con la ayuda del marcador MDY-64 que se une a membranas vacuolares. Este análisis permitió identificar algunas alteraciones que pasamos a comentar.

Con fluorescencia Sin fluorescencia

BY4741



FY23



Y1140

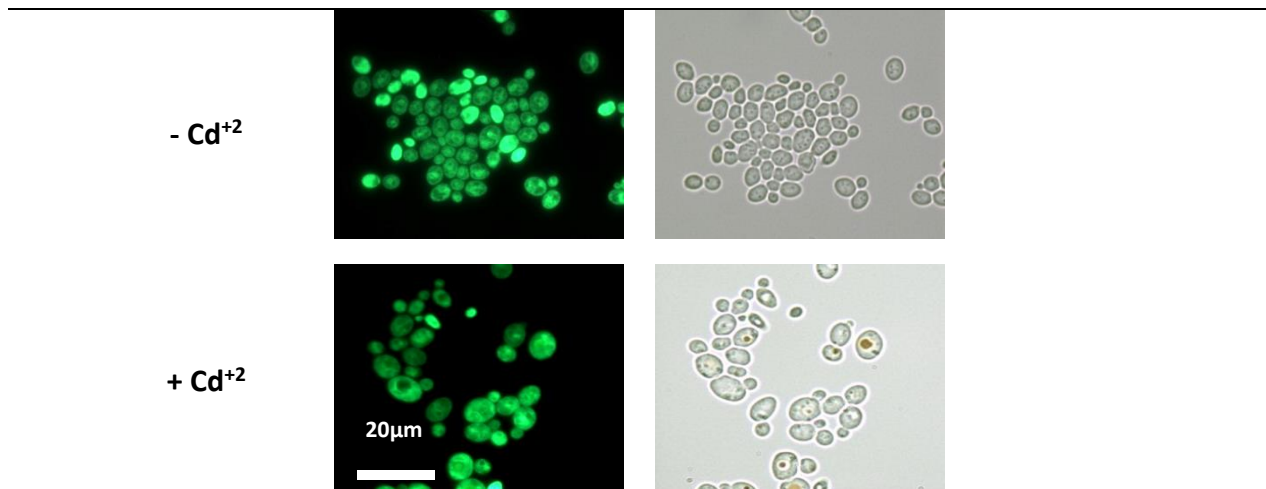


Figura 8. Identificación de vacuolas por microscopio de fluorescencia en células de tres cepas de levaduras marcadas con MDY-64 tratados con cadmio (+ Cd<sup>+2</sup>) o sin él (- Cd<sup>+2</sup>).

### 3.1 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DEL $Cd^{+2}$ EN LA MORFOLOGÍA VACUOLAR

El primer parámetro que se analizó fue el tamaño de las vacuolas. Una única vacuola grande se relaciona con un buen estado de la levadura, de ahí que una vacuola fragmentada o múltiples vesículas podría estar relacionada con el estrés celular o una mayor actividad del tráfico celular interno. Para nuestro análisis vacuolar tomaremos como referencia las siguientes imágenes:

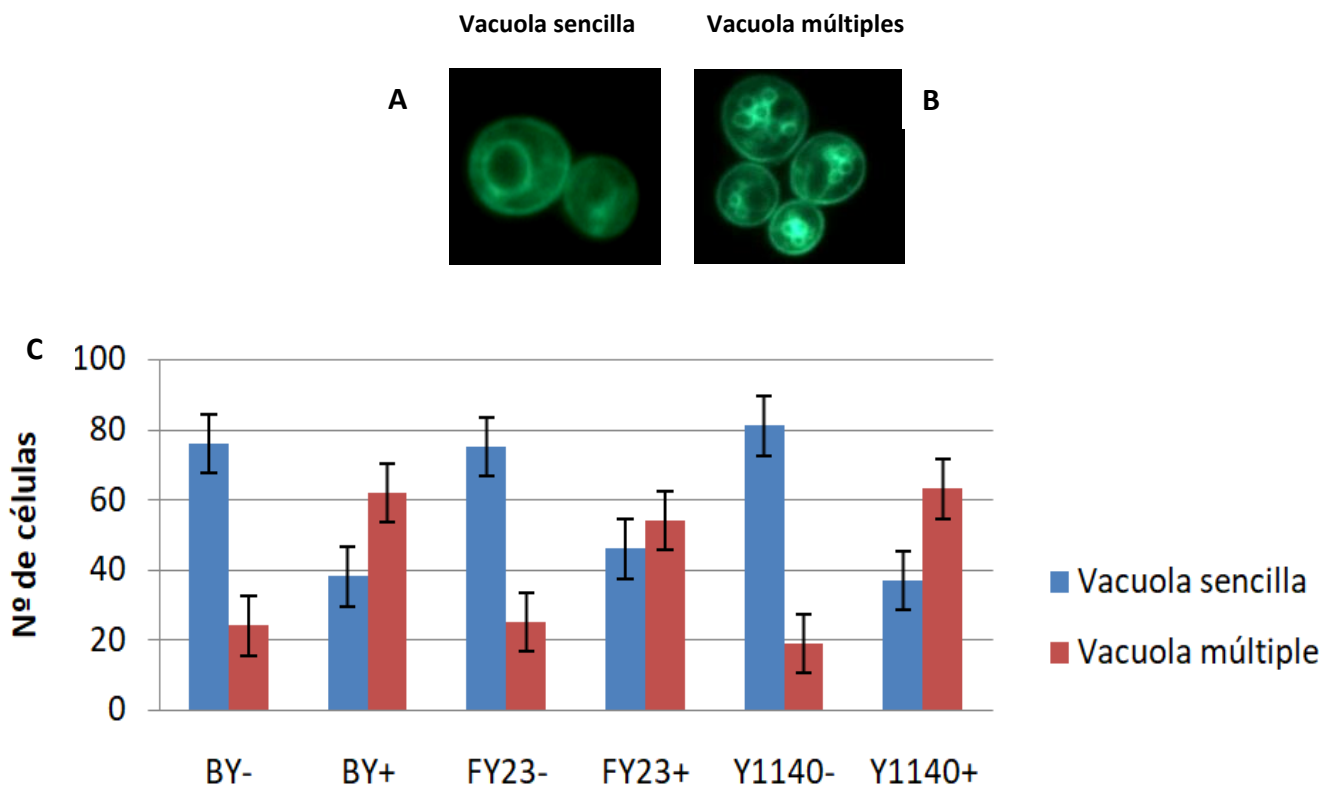


Figura 9. Referencia fotográfica para el análisis morfológico vacuolar 100x. A) Vacuola grande. B) Vacuol múltiple. C) Gráfico con los datos obtenidos en el conteo del número de células por cepa, (+) con cadmio y (-) sin cadmio, con la barra de error típico.

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de cadmio hay un mayor número de células con vacuolas múltiples. Por el contrario, las células que no fueron tratadas con cadmio, muestran unas vacuolas individuales y de gran tamaño. Este resultado es independiente de la especie. Además de este efecto general podemos hacer las siguientes afirmaciones:

La cepa FY23 en presencia de  $Cd^{+2}$  tiene un número similar de células con vacuolas grandes y múltiples. El  $Cd^{+2}$  no provoca la alteración de la vacuola, posiblemente sea por el menor metabolismo aerobio.

En las cepas BY4741 e Y1140 se da un patrón común, la inversión del porcentaje en el número de células con vacuolas grandes y múltiples causado por la presencia de cadmio.

En resumen, el cadmio causa alteraciones en la morfología vacuolar y este fenómeno es cepa dependiente.

### 3.2 OTROS EFECTOS

Cabe comentar la aparición de inclusiones de color oscuro en el interior del citoplasma en las levaduras, se observan con el microscopio sin filtro para la fluorescencia. Estas estructuras opacas de color pardo, que parecen cuerpos inclusión, se muestran como ejemplo en la figura siguiente (Fig. 9). Analizamos su abundancia para comprobar si su presencia tenía alguna relación con el cadmio.

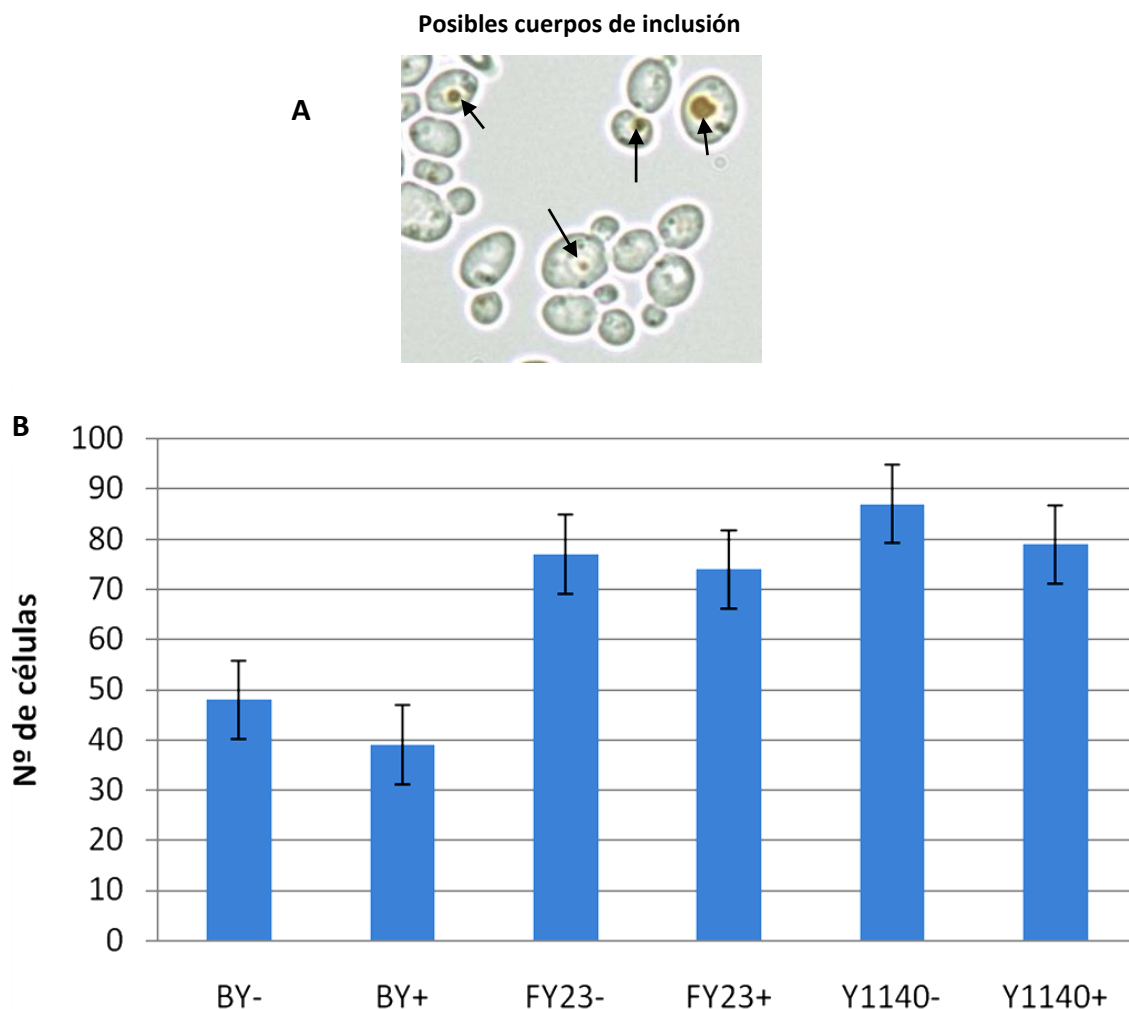


Figura 10. A) Referencia fotográfica para el análisis de los cuerpos de inclusión. B) Gráfico con los datos y error típico del conteo de células de las tres cepas con cuerpos de inclusión, (+) con cadmio y (-) sin cadmio.

Al comparar los resultados de cada cepa vemos que hay un solapamiento de los errores típicos por lo que la presencia de cadmio no está relacionada con la aparición de los cuerpos de inclusión, además, estos no son fluorescentes, por lo tanto tampoco tienen membrana vacuolar. Por otro lado, la cepa BY4741 presenta menor número que las otras dos, pudiendo ser una característica cepa dependiente pero no especie dependiente.

#### 4. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA TOTAL

Dado que MDY-64 marca todas las membranas vacuolares, la intensidad de fluorescencia total permitirá cuantificar el contenido en membranas de las cepas, independientemente del tamaño de las vacuolas. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos mediante análisis por fluorimetría.

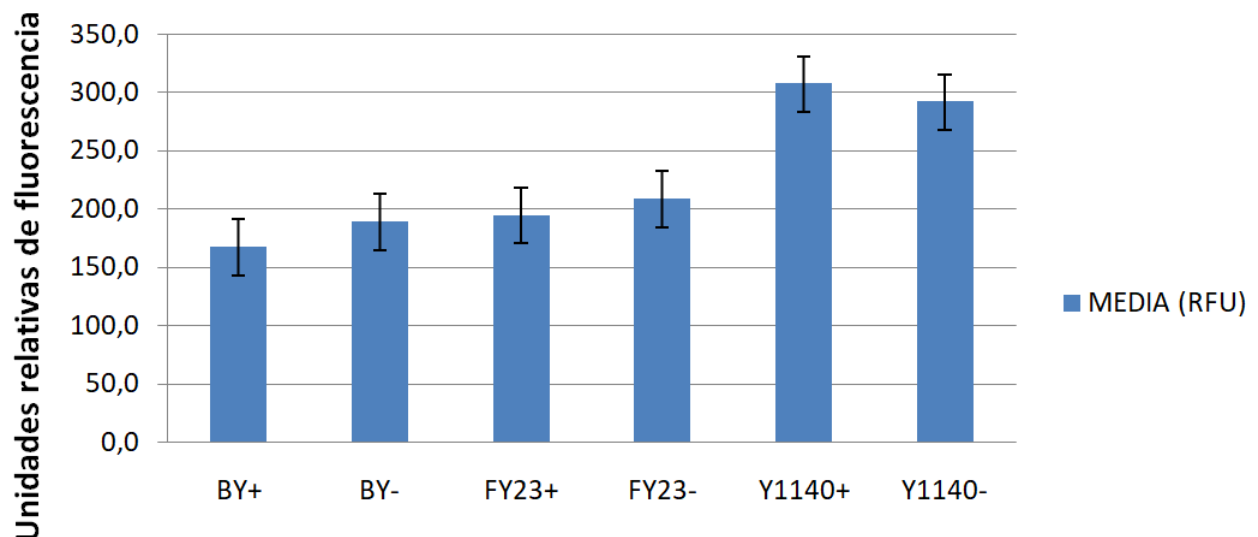


Figura 11. Gráfico con las variaciones de fluorescencia de las tres cepas de levaduras en RFU con el error típico.

Los datos obtenidos muestran que, los valores de fluorescencia total son muy similares entre cepas de *S. cerevisiae*. En todos los casos la fluorescencia se mantiene igual bajo las dos condiciones (con y sin cadmio). Esto junto con los datos obtenidos en el análisis morfológico vacuolar (Figura 8, Tabla 5), nos permite sugerir que buena parte de la fluorescencia se debió a la formación de múltiples vacuolas probablemente procedentes de la disgregación de una vacuola de mayor tamaño a causa del cadmio.

Por todo lo analizado, a lo largo del trabajo consideramos que la levadura *Kluyveromyces lactis* es una buena especie modelo para el estudio de las respuestas a tóxicos como el cadmio, o el análisis masivo del efecto de posibles medicamentos, que se aproxima a respuestas de estudios en tejidos humanos con un metabolismo aerobio. Por otro lado, la combinación del análisis en las dos especies da una información mucho más completa de diferentes respuestas según el metabolismo predominante del tejido.



## CONCLUSIONES

Tras la realización de un estudio comparativo de la expresión de genes de dos especies de levaduras, podemos concluir que:

1. La levadura *K. lactis* presenta un mayor número de genes que varían su expresión en respuesta a cadmio que *S. cerevisiae*, destacando los implicados en efecto antioxidante y tráfico vesicular.
2. En *K. lactis* la presencia de cadmio en el medio de cultivo aumenta la expresión de genes relacionados con enfermedades en el sistema nervioso humano como YPK9 y VPS35. Estos genes no aumentan su expresión en *S. cerevisiae*. Por tanto, consideramos que *K. lactis* es una buena especie para utilizar como organismo modelo en el estudio de enfermedades neurodegenerativas.
3. Análisis de microscopía mostraron que el cadmio afecta a la integridad vacuolar generando un aumento de las vacuolas múltiples sin afectar a la cantidad de membrana vacuolar total. Por tanto, el efecto del cadmio es causar formación de vacuolas múltiples. Este efecto no es exclusivo de *K. lactis*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aliomrani M., Sahraian M.A., Shirkhanloo H. , Sharifzadeh M. et al. (2016) Correlation between heavy metal exposure and GSTM1 polymorphism in Iranian multiple sclerosis patients. Springer, *Neurological Sciences*, 38:1271–1278.
2. Amjad Khan M., Khan S., Khana A. and Alam M. (2017) Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. Elsevier, *Science of the Total Environment*, 601–602:1591–1605.
3. Auluck K.P and Caraveo G. and Lindquist S. (2010)  $\alpha$ -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. *Annual Reviews. Cell and Developmental Biology* 26:211–33.
4. Berman E. D., Ringe D., Petsko A. G. and Small A. S. (2015) The Use of Pharmacological Retromer Chaperones in Alzheimer's Disease and other Endosomal-related Disorders. *Neurotherapeutics*, 12:12-18.
5. Chatterjee P., Roy D., Bhattacharyya M. and Bandyopadhyay S. (2016) Biological networks in Parkinson's disease: an insight into the epigenetic mechanisms associated with this disease. *BMC Genomics*. 18:721.
6. Chihyun P., Youngmi Y., Oh M., Seok J. Y. et al. (2016) Systematic Identification of Differential Gene Network to Elucidate Alzheimer's Disease. Elsevier. *Expert Systems With Applications*. Vol. 85 , pp 249-260.
7. El-Ansary A., Geir Bjørklund G., Tinkov A.A., V. Skalny V.A. et al. (2017) Relationship between selenium, lead, and mercury in red blood cells of Saudi autistic children. Springer, *Metabolic Brain Disease*, 32:1073–1080.
8. Elliott J. M., Milos D. I., Scott E. C., Sylvia E. P. et al. (2016) Molecular and cellular pathophysiology of preclinical Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 311:54-69
9. Gardarin A., Chédin S., Lagniel G., Aude J. et al. (2010) Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Molecular Microbiology*, 76:1034–1048
10. Hernández-Martínez R and Navarro-Blasco I. (2012) Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. Elsevier, *Food Control*, 26:6-14.

11. Higuchi M., Trojanowski Q. J. and Lee M.Y.V. (2003) Pathobiological features in neurodegenerative diseases: an overview. *International Congress Series*, 1260:69– 75.
12. Jeong K. S., Ha E., Shin J.Y., Park H. et al. (2017) Blood heavy metal concentrations in pregnant Korean women and their children up to age 5 years: Mothers' and Children's Environmental Health (MOCEH) birth cohort study. *Elsevier, Science of the Total Environment*, 605-606:784-791.
13. Li C., Zahid Ali Shah S., Zhao D. and Yang L. (2016). Role of the Retromer Complex in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8:42.
14. M. Becerra, L. J. Lombardía, M. I. González-Siso, E. Rodríguez-Belmonte, N. C. Hauser and M. E. Cerdán (2003) Genome-wide analysis of the yeast transcriptome upon heat and cold shock. *Comp Funct Genom* 4:366–375.
15. Manahan S. *Environmental chemistry*. 7ª ed. Boca Raton Florida: Lewis Publishers, 2000
16. Manuel Becerra, Luis J. Lombardía-Ferreira, Nicole C. Hauser, Jörg D. Hoheisel, Belén Tizon, and M. Esperanza Cerdán (2002). The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of hap1, rox1, rox3 and srb10 deletions. *Molecular Microbiology* 43:545-555.
17. Menezes R., Tenreiro S., Macedo D. and Santos C. N. et al. (2015) From the baket to the bedside: yeast models of Parkinson's disease. *Microbial cel.*, 2: 8.
18. Mitra J., Vasquez V., Hegde P.M., Boldogh I., et al. (2014) Revisiting Metal Toxicity in Neurodegenerative Diseases and Stroke: Therapeutic Potential. *Neurol Res Ther*, 1:107
19. Moisés Blanco, Laura Núñez, Nuria Tarrío, Elena Canto, Manuel Becerra, M. Isabel González-Siso, M. Esperanza Cerdán (2007). An approach to the hypoxic and oxidative stress responses in *Kluyveromyces lactis* by analysis of mRNA levels *FEMS Yeast Research*, 7: 702–714.
20. Nava-Ruíz C. and Méndez-Armenta M. (2011) Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio,plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencia*, 16: 140-147.
21. Pereira C. and Costa V. (2015) A yeast model of the Parkinson's disease-associated protein Parkin. *Elsevier*, 333:73-79.
22. Pérez García P. E and Azcona Cruz M.I. (2012) Los efectos del cadmio en la salud .*Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17:199-205.

23. Sadigh-Eteghad S., Askari-Nejad M. S., Mahmoudi J. and 1 Alireza Majdi A. (2015) Cargo trafficking in Alzheimer's disease: the possible role of retromer. Springer-Verlag Italia , 37:12-22.
24. Schmidt K., M. Wolfe D., Barbara Stiller B., and David A Pearce D.A (2009) Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Se<sup>2+</sup> toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochem Biophys Res Commun*, 383:198–202.
25. Sereroa A., Lopes J. Nicolasb A. and Boiteuxa S. (2008) Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. Elsevier, *DNA Repair*. 7: 1262–1275.
26. Trevino V., Falciani F. and Barrera-Saldaña H.A. (2007) DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Molecular Medicine*, 13:527–541.
27. Tymans J., Baekelandt V. and Harvey K. (2015) Regulation and targeting of enzymes mediating Parkinson's disease pathogenesis: focus on Parkinson's disease Kinases, GTPases and ATPases. *Frontiers Media S.A*, 7:71.
28. Wang B. and Du Y. (2013) *Cadmium and Its Neurotoxic Effects*. Hindawi Publishing Corporation, 2013:12.