

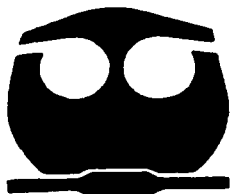


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Uso de la Proteína Verde Fluorescente para la Localización
Subcelular de Proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*".

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A
MARTIN ESCAMILLA DEL ARENAL



MEXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: MA. DEL CARMEN PARRA GONZÁLEZ.

VOCAL: IRMA OFELIA BERNAL LUGO.

SECRETARIO: MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ.

1^{er} SUP.: RUTH EDITH MARTÍN FUENTES.

2^{er} SUP.: MA. MANUELA NÁJERA MARTÍNEZ.

**ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL INSTITUTO DE
FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM.**


**DIRECTOR DE TESIS: DR.A. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ
MANJARREZ.**


SUPERVISOR TÉCNICO: BIÓL. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ.


SUSTENTANTE: MARTÍN ESCAMILLA DEL ARENAL.

Dedicada con todo mi cariño a mi madre

En cumplimiento a su deber y por las mil y un cosas más que a hecho por mi.

Agradecimientos.

A la Bióloga Lina Riego por su apoyo moral y académico durante la realización de esta tesis.

A la técnico Cristina Aranda por sus importantes consejos y participación activa en esta tesis.

A la Dra. Alicia González por dejarme ingresar a su grupo de trabajo y su apoyo académico.

Con cariño

A mi hermanita Yoame.

A mi padre Edgardo.

A mi mujer y amor de mi vida Vanesa.

A mis primitos Andrés (el tumba postes), Lalo, Fernando y Mariana.

A mis tíos Adriana, Eduardo y Gilberto.

A mi abuelita Mastelita.

A mi nueva familia Mario, Pilar, Mariana y Mario.

A Silvia J y Noé R.

A mi amiguita de toda la vida Maria Ana O.

A mis amigos y hermanos Marcos R, Santiago C, Daniel B, Itzam P, Daniel I, Mónica, Ricardo S, Diego C, Camilo R, Mariano G, Enrique O e Igor.

A mis amiguitas Yuridia, Samanta y Lucia.

A Cecilia P, José L y Valentina R.

A mis amiguitos del 301ote, Lina (de nuevo ya que tanto me a echado la mano), Fernando A, Alicia G, Alexander D, Paulina, Cristina A, Plinio, Mauricio R, Lourdes V, Amaranta A y Soledad G.

A mis nuevos amiguitos del 122N, Felix R, Blanca, Marco B, Viviana V, Francisco A, Georgina G, Héctor R, Inti A, Fabiola M y Bernardo.

A los amiguitos que están esparsidos, Adriana E, Alma S, Soledad F, Eréndida A, Juan e Ivette.

A la banda de la F. de Química, a Francisco G (el Charles), Ivette A, Claudia F, Carlos (el Charles original), Emiliano M, Blanca P, Marco V, Camilo C, Marco B, Ana y Dafne.

A Maripaz y Javier.

A Nuria C.

A Mercurio T.

A mi socio y amigo Juan J.

A la UNAM.

A la memoria de mis abuelos Mamá Luz, Carlos M y José E.

A la mar.

INDICE.	página.
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.1.1 El cromóforo la proteína verde fluorescente.....	5
1.1.2 Estructura tridimensional.....	8
1.1.3 Utilización de la GFP frente a otros marcadores subcelulares.....	10
1.1.4 Comparación de la GFP frente a otros marcadores subcelulares.....	11
1.1.5 Características del grupo al que pertenece la mutante S65T.....	12
1.2 Métodos de localización subcelular en levadura.....	13
1.3 Metabolismo nitrogenado en <i>S. cerevisiae</i>	14
2 HIPÓTESIS	20
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Resumen de los vectores y las cepas utilizadas en este estudio.....	21
4.2 Cepas bacterianas utilizadas para transformar.....	23
4.3. Vector de pGFP-MRCy.....	23
4.3.1 Mapas de restricción de pGFP-MRCy.....	24
4.4 Construcción de los diferentes vectores.....	26
4.4.1 Obtención de los vectores pGFP-MRCy-H1 y -H3.....	26
4.4.2 Obtención del vector pGFP-MRCy-M1.....	28
4.4.3 Obtención del vector pGAL01.....	30
4.4.4 Obtención del vector pGFP-MRCy-T1.....	32
4.4.5 Obtención del vector pGFP-MRCy-SK1.....	33
4.4.6 Obtención del vector pGFP-MRCy-SK2.....	34
4.5 Secuenciación de la región 5' de sGFP del vector de GFP-MRCy.....	36
4.6 Transformación de levadura.....	37
4.7 Condiciones de crecimiento.....	37
4.8 Determinación de la actividad enzimática de GOGAT-NAD ⁺ Y GDH-NADP ⁺	38
4.9 Determinación de proteína.....	39
4.10 Microscopía.....	40
5 DICUCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
5.1 Estudio del vector de pGFP-MRCy.....	41
5.1.1 Revisión bibliográfica del vector pGFP-MRCy.....	41
5.1.2 Análisis de restricción del vector de pGFP-MRCy.....	44
5.1.3 Secuenciación de la región comprendida entre el promGPD y la sGFP.....	47
5.1.4 Conclusión en la caracterización del vector de pGFP-MRCy.....	48
5.2 Construcción de los vectores.....	50
5.2.1 Fusión de <i>GDH1</i> a la GFP (vector pGFP-MRCy-H1).....	51
5.2.2 Fusión de <i>GDH3</i> a la GFP (vector pGFP-MRCy-H3).....	52
5.2.3 Fusión de un sitio de donación múltiple al vector de pGFP-MRCy.....	53
5.2.4 2 Fusión de <i>GLT1</i> a pGAL (vector pGAL01).....	54
5.2.5 Fusión de <i>GLT1</i> a la GFP (vector pGFP-MRCy-T1).....	57
5.2.6 Fusión del sitio SK al vector pGFP-MRCy (vector pGFP-MRCy-SK1).....	59
5.2.7 Construcción del vector pGFP-MRCy-SK2.....	61
5.3 Transformación levadura.....	62
5.4 Actividades de GDH y GOGAT.....	63
5.5 Observaciones al microscopio.....	66
6 CONSIDERACIONES FINALES	69
7 CONCLUSIONES	72
8. PRESPECTIVAS	72
Abreviaturas.....	74
Apendice 1.....	74
Medio SOC.	
Medio LB	
Medio MM.	

Buffer de extracción.	
Apendice 2.....	75
Minipreps fenol.	
Apendice 3.....	75
A. Preparación de productos de PCR.	
B. Preparación de vectores.	
LITERATURA CONSULTA.....	76

RESUMEN

El NH_4^+ al ser asimilado por *Saccharomyces cerevisiae* es incorporado inmediatamente en glutamato y glutamina, el primero ocupa una posición central en el metabolismo nitrogenado. En esta levadura se han descrito dos vías para la biosíntesis de glutamato, la enzima glutamato deshidrogenasa (NADP^+ -GDH1) cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato para formar glutamato y una segunda vía que consiste en el ciclo GS-GOGAT, donde la glutamato sintasa (GOGAT) a partir de glutamina forma glutamato. En 1997 se describió una tercera enzima (Avendaño, 1997) NADP^+ -GDH3 con una alta similitud a la NADP^+ -GDH1.

El objetivo de este trabajo es establecer una metodología que permita utilizar a la proteína verde fluorescente para la localización subcelular de las proteínas implicadas en la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato en *S. cerevisiae*. Las enzimas, NADP^+ -GDH1 y NADP^+ -GDH3 no presentan en su secuencia peptídica señales de localización evidentes, a diferencia de la GOGAT que muestra una preproteína, la cual se ha hipotetizado le serviría como una señal de localización, procesándose posteriormente para formar la proteína activa. En este trabajo se estableció una técnica con la cual se puede fusionar la GFP (proteína verde fluorescente) a la proteína de interés por estudiar. En los resultados se muestra la fusión de la GFP al extremo amino terminal de las enzimas NADP^+ -GDH1, NADP^+ -GDH3 y GOGAT. La localización parece ser citoplásmica.

1 INTRODUCCIÓN.

1.1 ANTECEDENTES.

En un primer intento por obtener el principio activo de la luz que emitía la medusa *Aequorea victoria* (*A.victoria*), Shimomura y cols, obtuvieron un extracto azul. Fue hasta 1962 cuando Shimomura y cols, logran purificar una sustancia capaz de emitir luz en presencia de Ca^{2+} (1962), la proteína fue nombrada aequorina. En un pie de nota describen “una proteína que da una solución ligeramente verdosa a la luz del sol pareciendo amarillenta solo a la luz del tungsteno, y exhibiendo una luz muy brillante, verde fluorescente al ultravioleta”.

En el mismo año Johnson (1962) publica el espectro de emisión con un pico a 460 nm para la aequorina y otro a 508 nm para la proteína que posteriormente sería conocida como proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés “Green Fluorescent Protein”).

En 1967 Ridgway y Ashley (1967) reportan la primera aplicación exitosa de la bioluminescencia de la aequorina, en un estudio donde la microinyectan para monitorear los cambios en la concentración de Ca^{2+} en fibras musculares. Este reporte demostró la importancia del uso de la GFP para la determinación de calcio intracelular y despertó un gran interés por el estudio de las diferentes propiedades de esta proteína.

Una de las principales interrogantes se encontraba en el hecho de que la medusa desprendía una luminiscencia verde mientras que la aequorina emitía una luz azul. En esos días se pensaba que la GFP absorbía la luz azul de la aequorina y posteriormente reemitía la luz absorbida como luz verde. Fue hasta 1974 cuando Morise y cols, publican un estudio donde hablan de la energía de transferencia que va de la aequorina a la GFP en presencia de Ca^{2+} , (Morise y cols, 1974). Este grupo encontró que la luminiscencia de la aequorina (máximo de emisión 460 nm) era absorbida por la GFP (máximo de absorción 480 nm); y posteriormente, la GFP emitía la luminiscencia verde que la caracteriza (máximo de emisión 509 nm.) (fig. 1).

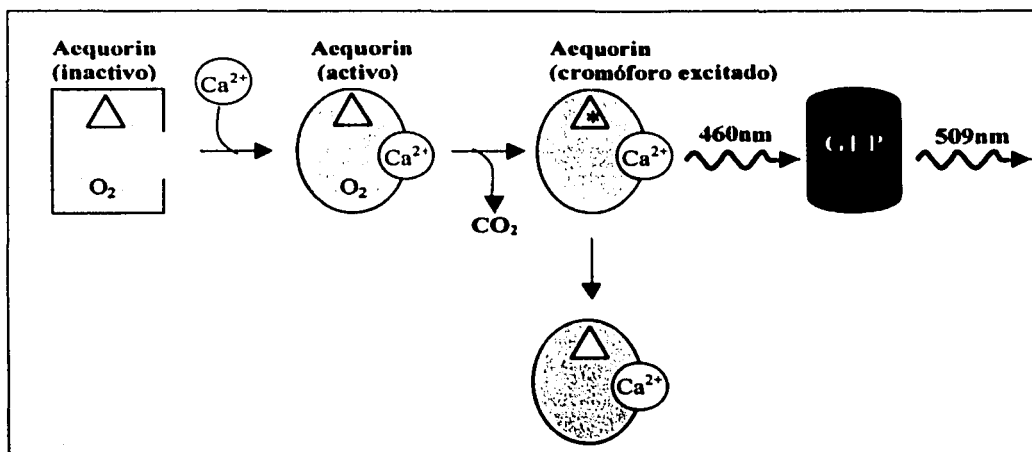


Figura 1. Aequorina (izquierda) es un complejo de 21.4 kDa, O_2 y coelenterazina (triángulo). Este es activado por Ca^{2+} el cual cataliza la oxidación de coelenterazina a coelenteramida (triángulo con asterisco), pasando a su estado oxidado. Coelenteramida regresa a su estado reducido (coelenterazina), emitiendo a 480nm (luz azul generada por aequorina). In vivo esta energía será transferida a la GFP, la cual será responsable de la fluorescencia verde observada.

El punto crucial en el estudio (y la posterior aplicación) de la proteína verde, fue la clonación de su gen por Prasher y cols (1992) y la demostración por Chalfie y cols (1994) e Inouye y Tsuji (1994) de que la expresión de ésta en otros organismos produce fluorescencia. Por lo anterior, el gen codifica en su secuencia la información necesaria para llevar a cabo la síntesis postraduccional del cromóforo.

```

1          10          20          30          40          50          60          70          80          90          100          110          120          130          140          150          160          170          180          190          200          210          220          230
ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA
met ser lys gly glu glu leu phe thr gly val val pro ile leu val glu
TTA GAT GGT GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT
leu asp gly asp val asn gly his lys phe ser val ser gly glu gly glu gly
GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTT AAA TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA
asp ala thr tyr gly lys leu thr leu lys phe ile cys thr thr gly lys leu
CCT GTT CCA TGG CCA ACA CTT GTC ACT ACT TTC TCT TAT GGT GTT CAA TGC TTT
pro val pro trp pro thr leu val thr thr phe ser tyr gly val gln cys phe
TCA AGA TAC CCA GAT CAT ATG AAA CAG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC
ser arg try pro asp his met lys gln his asp phe phe lys ser ala met pro
GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGA ACT ATA TTT TTC AAA GAT GAC GGG AAC TAC AAG
glu gly val val gln glu arg thr ile phe phe lys asp asp gly asn tyr lys
ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT AAT AGA ATC GAG TTA
thr arg ala glu val lys phe glu gly asp thr leu val asn arg ile glu leu
AAA GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA CAC AAA TTG GAA TAC
lys gly ile asp phe lys glu asp gly asn ile leu gly his lys leu glu tyr
AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC
asn tyr asn ser his asn val tyr ile met ala asp lys gln lys asn gly ile
AAA GTT AAC TTC AAA ATT AGA CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA
lys val asn phe lys ile arg his asn ile glu asp gly ser val gln leu ala
GAC CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC
asp his tyr gln gln asn thr pro ile gly asp gly pro val leu leu pro asp
AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA
asn his tyr leu ser thr gln scr ala leu ser lys asp pro asn glu lys arg
GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG
asp his met val leu leu glu phe val thr ala ala gly ile thr his gly met

GAT GAA CTA TAC AAA TAA TAA
asp glu leu tyr lys stop stop

```

Figura 2. Secuencia de la proteína verde fluorescente silvestre (GFP-WT). Originalmente clonada por Prasher y cols (1992). Línea 1, número de aminoácidos en la secuencia, línea 2, secuencia nucleotídica de la GFP-WT, línea 3, secuencia de aminoácidos. En el recuadro se muestra la secuencia Ser65-Tyr66-Gly67 perteneciente al cromóforo.

El gen de la GFP codifica para una proteína de 238 aminoácidos (aa.) (Fig. 2), correspondientes a 27 kDa, que se localiza en el citoplasma, absorbe la luz azul procedente de la proteína quimioluminiscente (que se localiza en la medusa de *A. victoria*) y la emite en forma de luz verde (amplificando la señal). Además de la luz azul (440-480 nm), la GFP absorbe luz UV (360-400 nm).

1.1.1 El cromóforo de la proteína verde fluorescente.

La proteína verde fluorescente es única entre las proteínas fluorescentes, ya que su fluoróforo no es sintetizado en forma independiente de la proteína como un grupo prostético; este es un residuo de aminoácido modificado en la cadena polipeptídica.

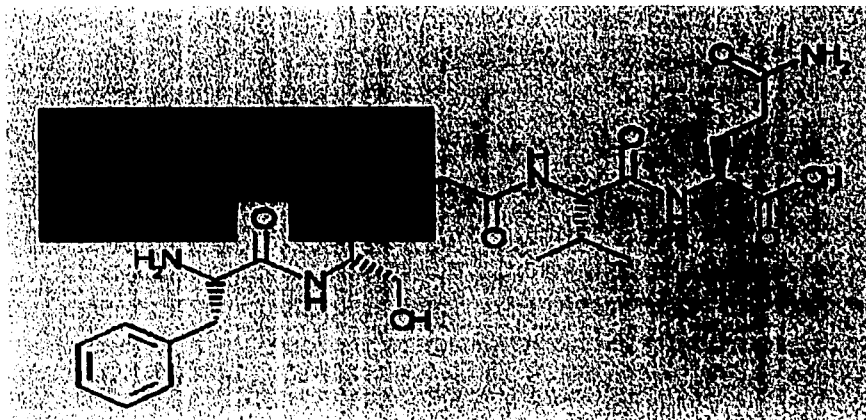


Figura 3 .Cromóforo de GFP. El recuadro representa el *p*-hidroxibenzilidina-imidazolinona. El esqueleto carbonado de estos residuos forma el anillo de imidazolidona. El esqueleto peptídico se muestra en un color mas claro.

El cromóforo de la GFP (fig. 3) es un grupo *p*-hidroxibenzilidina-imidazolinona (Prasher, y cols, 1992; Heim, y cols, 1994), formado por los residuos

65-67 (Ser-Tyr-Gly) en la proteína nativa. Aunque la secuencia SYG se ha encontrado en un gran número de proteínas, ésta no tiende a ciclizarse, lo que nos indica que la tendencia a formar el anillo no es intrínseca de la secuencia.

La formación del cromóforo es autocatalítica, necesita sólo de la presencia de oxígeno. En su estructura terciaria el cromóforo queda protegido del oxígeno y del agua. La figura 4 muestra el mecanismo aceptado de formación del cromóforo (Heim y cols, 1994, 1995; Reid y Flynn, 1997).

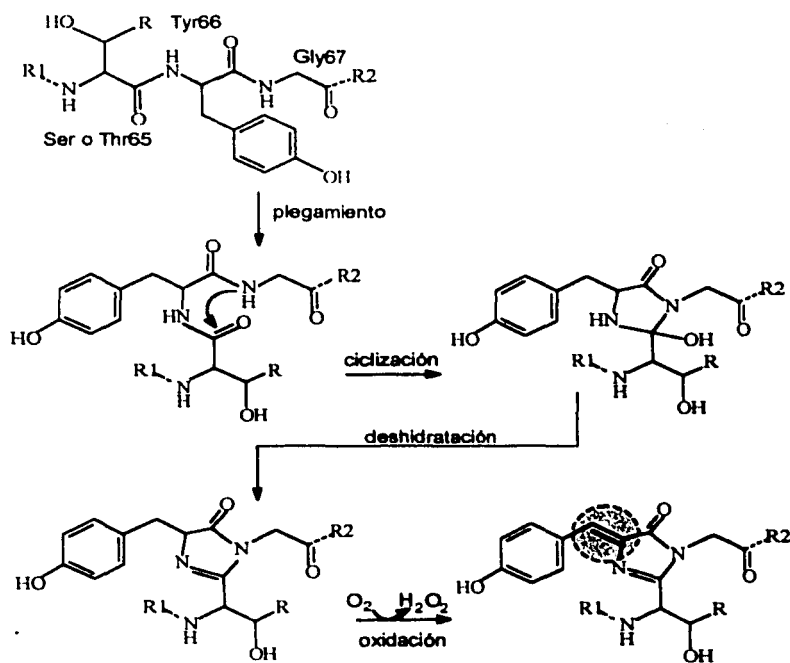


Figura 4. Mecanismo propuesto para la biosíntesis intramolecular del cromóforo de la GFP-WT. Aceptado también para la biosíntesis intramolecular del cromóforo de la mutante sGFP-S65T (Ser 65). En la segunda estructura se muestra el ataque nucleofílico que sufre el carbonilo de la Ser 65 por Gly 67. En el producto de formación se resalta con un círculo el enlace conjugado que se obtiene al formarse el cromóforo. R (H o Me), R1 (residuos 1-61), R2 (residuos 68-238).

El mecanismo de reacción inicia cuando la GFP se dobla en su forma pre-nativa, es seguido de un ataque nucleofílico de la amida de la Gly 67 al grupo carbonilo de la Ser 65 que formará la imidazolidona. Finalmente, el oxígeno molecular deshidrogenará al enlace α - β del residuo Tyr 66, formando el enlace doble que se encontrará conjugado con la imidazolina. Solamente en esta conformación, la GFP podrá absorber y fluorescer. Este mecanismo se encuentra apoyado por las siguientes observaciones:

- La expresión de GFP recombinante es posible (ej. en *Escherichia coli*) (ej. en *Escherichia coli*), por lo tanto el fluoróforo no necesita la presencia de ninguna enzima específica de *A. victoria*.
- Se necesita oxígeno molecular para el desarrollo de la fluorescencia (Reid y Flynn, 1997, Iouy y Tsuji, 1994).
- La proteína no fluorescerá en un medio anaerobio (Reid y Flynn, 1997, Heim y cols, 1995).
- La fluorescencia se da de manera exponencial después de que se permite la entrada de oxígeno (Reid y Flynn, 1997, Heim y cols, 1995), independientemente de la concentración de la GFP o de cofactores celulares (Niwa y cols, 1996).
- La ciclización propuesta es isostérica, basada en la tendencia de secuencias de Asp-Gly por ciclizarse en imidas (Wright, 1991).
- La Gly es el mejor nucleófilo en esta ciclización debido a su menor impedimento estérico (la Gly 67 está conservada en todas las mutantes que conservan fluorescencia).

- La espectroscopía de masas por electrospray en medio anaerobio, indica la pérdida de 1 ± 4 Da cuando la proteína se expone a oxígeno, lo cual es consistente con la pérdida de dos hidrógenos (Heim y cols, 1995).

De la reacción anterior, se puede predecir que el peróxido de hidrógeno se libera 1:1 con respecto a la proteína madura, este producto podría ser la explicación del efecto tóxico (ocasional) de la GFP a altos niveles de expresión (Roger, 1998).

Otros aspectos mecanísticos en la maduración del cromóforo continúan sin entenderse, como el significado de ciertas mutaciones que pueden mejorar la eficiencia estérica.

1.1.2 Estructura tridimensional.

La proteína verde fue cristalizada en 1974 (Morise y cols, 1974), sus patrones de difracción fueron reportados en 1988 (Perrozo y cols, 1998). Yang en 1996 resolvió la estructura de la GFP de *A. victoria* a una resolución de 1.9 Å (Yang y cols, 1996). La estructura tridimensional de la variante S65T fue resuelta a una resolución de 1.9 Å por Ormo y cols (1996).

La GFP muestra una estructura de barril $-\beta$ de 11-hebras, hilado por una α -hélice que corre hacia arriba del eje. El cromóforo se encuentra anclado a la α -

hélice justo en el centro del cilindro. Esta estructura ha sido llamada "beta-can" (fig. 5).

La estructura de la proteína verde con su cromóforo localizado en el centro de la estructura (protegido de su entorno), nos puede explicar diferentes características de la proteína.

- La GFP es muy resistente a la desnaturalización, requiere de tratamientos con 6M de hidróxido de guanidina a 90°C a pH menor a 4 ó mayor a 12 (Yang y cols, 1996).



Figura 5. Estructura 3D de la proteína verde fluorescente. Su plegamiento fué nombrado "beta-can" por Yang. En su exterior muestra 11 hebras β antiparalelas formando un cilindro compacto. En el centro se muestra un α -hélice en la cual se encuentra el cromóforo. El cilindro tiene un diámetro de 30 Å y una longitud de 40 Å.

- La pérdida de un solo aminoácido en el extremo N-terminal o de más de 7 en el extremo C-terminal, trae como consecuencia la pérdida de la fluorescencia. Posiblemente la estructura "beta-can" no se pueda formar al faltar estos aminoácidos.
- Los extremos N-terminal y C-terminal, pueden ser utilizados para ser fusionados a otra proteína debido a que se encuentran en la superficie.

Es importante resaltar que el cromóforo se encuentra encapsulado, impidiendo el acceso a enzimas que puedan estar catalizando la formación del cromóforo, lo que apoya la idea de que su formación es autocatalítica.

1.1.3 Utilización de la proteína verde fluorescente.

La GFP ha sido utilizada como marcador en células vivas, para la identificación de estructuras celulares, selección de tipos celulares, cálculo de la eficiencia de transformación e identificación de transformantes, determinación del movimiento y distribución de microorganismos. También ha sido utilizada como marcador genético, para la identificación de mutantes, estudio de líneas celulares, mapeo molecular, caracterización de fenómenos de recombinación, transporte y segregación génica y finalmente ha sido utilizada como marcador ecológico, identificación de organismos marcados y liberados al medio ambiente, detección precoz de ataques de patógenos marcados y el estudio de la dispersión no controlada de transgenes en el medio ambiente (Rodríguez, 1999_b).

1.1.4 Comparación de la GFP frente a otros marcadores subcelulares.

Ventajas:

- La formación del cromóforo es autocatalítica, no necesita cofactores.
- Su tamaño (pequeño) la hace apta para fusiones con otras proteínas.
- Tiene gran estabilidad. Resiste tratamientos con cloruro de guanidina 6M, urea 8M, SDS al 1%, altas temperaturas (65°C), un amplio rango de pH (5.5 – 12) y la presencia de proteasas.
- Permite la localización directa en células vivas.
- La localización es precisa.
- No es tóxica.

Desventajas:

- Tiene un solo cromóforo por molécula de proteína.
- A pesar de su pequeño tamaño, puede interferir en la localización de la proteína de fusión.
- Su elevada estabilidad hace difícil estudiar cambios rápidos.

La GFP se ha clasificado en siete clases, dependiendo de las diferentes mutaciones en su cromóforo:

- 1) WT (silvestre).
- 2) Anión fenolato.
- 3) Fenol neutro.

- 4) Anión fenolato con sistema de electrones π (fluorescencia amarilla).
- 5) Indol (fluorescencia cian).
- 6) Imidazol (fluorescencia azul).
- 7) Fenil.

En este trabajo se utiliza la sGFP (S65T) la cual cae dentro del segundo grupo. Esta mutante ha sido la mas utilizada ya que combina un alto nivel de emisión, es fácil su excitación y tiene un espectro muy similar al de la fluoresceína (el fluoróforo más pequeño y popular).

1.1.5 Características del grupo al que pertenece la mutante S65T.

- Es 6 veces más brillante que la GFP-WT (Roger, 1998).
- Es 4 veces más rápida en obtener su conformación activa (Roger y Tsien, 1998).
- No fotoisomeriza (Rodríguez, 1999).
- Su fotoatenuación es prácticamente nula (Rodríguez, 1999).
- Emite luz verde más intensa que la que emiten mutantes del mismo grupo (Rodríguez, 1999).

Tabla 1. Valores de excitación y emisión de la GFP-WT vs S65T.

Cepa	Máximo de excitación (nm).	Máximo de emisión (nm).
GFP-WT	<u>396</u> , 475	503 , 508
S65T	488	511
	UV-----azul-----verde	

Al igual que la WT, la mutante S65T se dobla eficientemente a temperatura ambiente, pero a mayores temperaturas tiende a fallar en la adquisición de su estructura terciaria. Entre los 20° y los 37°C, se ha reportado un decremento en la correcta maduración de esta proteína (a 78°C se desnaturaliza el 50% de las proteínas), generando productos que no fluorescen (Roger y.Tsien, 1998).

1.2 Métodos de localización subcelular en levadura.

Las técnicas de fraccionamiento celular e inmunofluorescencia, son dos métodos que se han utilizado en la localización subcelular en levadura, mostrando de entrada el inconveniente de que son dos métodos que no se trabajan *in vivo*.

Fraccionamiento Celular. Los esferoplastos se lisan en amortiguador 0.5 M de sorbitol y se licúan, el extracto celular se centrifuga y el botón se resuspende en PBS 1X, la proteína deseada se separa por una serie de extracciones. Este procedimiento presenta algunos inconvenientes: se ha reportado contaminación con material no mitocondrial de densidad "virtualmente idéntica" al de la mitocondria cuando se trata de separar esta de sus demás componentes (Perlman y cols, 1970), se han reportado tres tipos de membrana en la fracción mitocondrial, así como una pérdida de material soluble de la mitocondria en los lavados del botón mitocondrial (Stoner y cols, 1969).

Inmunofluorescencia. Las células previamente fijadas son incubadas con el anticuerpo contra la proteína por localizar, un segundo grupo de anticuerpos (etiquetados con la fluorescencia) reconocerá el primer anticuerpo. El segundo juego de anticuerpos incrementará la intensidad de la fluorescencia. Este método genera una señal intensa de fluorescencia, con la desventaja de que las células deberán ser fijadas y sus paredes removidas para permitir el acceso de los anticuerpos (Burke y cols, 2000).

1.3 Metabolismo nitrogenado en *S. cerevisiae*.

El nitrógeno molecular (N_2) es el componente mayoritario de la atmósfera de la tierra, constituyendo el 80% de ésta. El crecimiento y la reproducción de microorganismos procariontes y eucariontes, está limitado por su capacidad para utilizar el nitrógeno inorgánico. Todos los organismos pueden transformar el amonio a nitrógeno orgánico (Mathews, 1990), pero muy pocos pueden utilizar el nitrógeno atmosférico o el ion nitrato (NO_3^-). La reducción del nitrógeno a amonio se conoce como fijación de nitrógeno.

Aunque plantas, animales y bacterias obtienen el nitrógeno de diferentes fuentes, todos los organismos comparten algunas rutas de utilización. El N_2 , debe ser reducido a amonio (NH_4^+) para poder ser utilizado por la mayoría de los seres vivos. Esta reducción sólo pueden realizarla organismos procariontes, bacterias del suelo como *Klebsiella* y *Azotobacter*, cianobacterias como *Nostoc* y *Anabaena*, y bacterias simbióticas como *Rhizobium*. El NH_4^+ , al ser asimilado por los

organismos, es incorporado inmediatamente en dos aminoácidos: el glutamato y la glutamina, que posteriormente cederán sus grupos amino y amido, respectivamente, para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, aminoazúcares y otros compuestos nitrogenados.

El glutamato ocupa una posición central en el metabolismo nitrogenado de los organismos. En el caso de las bacterias entéricas y presumiblemente, también en levaduras, aproximadamente el 88% de todo el nitrógeno celular proviene del grupo amino del glutamato y un 12% del grupo amido de la glutamina (Reitzer y Magasanik, 1987).

Se han descrito dos vías para la biosíntesis de glutamato en bacterias, hongos, algas y plantas superiores (Bastarrachea y cols, 1980; Hulmet y Mora, 1980; Marqués y cols., 1992, Senior, 1975; Tempest y cols, 1970). En la primera vía, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato para formar glutamato (Holzer y Scheinder, 1975). La segunda vía, cuya existencia demostró Tempest (1970), consiste en el ciclo GS-GOGAT, donde la glutamato sintetasa (GS), a partir de glutamato y amonio produce glutamina, el grupo amido de la glutamina, lo toma la glutamato sintasa (GOGAT) al efectuar la transferencia reductiva a la posición 2 del 2-oxoglutarato, resultando en la conversión neta de amonio y 2-oxoglutarato en glutamato (Tempest y cols, 1970).

En *E. coli*, se ha propuesto que el ciclo GS-GOGAT puede tener por lo menos dos funciones que no pueden ser sustituidas por la enzima GDH: la primera es que GS-GOGAT asimila el amonio en moléculas orgánicas cuando la concentración externa de amonio es baja y la célula no está en condiciones de limitación de energía (Reitzer y cols, 1987, Helling y cols, 1994, Soga y cols, 1996); y la segunda es que regula los niveles intracelulares de glutamina (Reitzer y cols, 1987). La afinidad por amonio de la enzima GDH es baja y la reacción que cataliza se desplaza hacia la degradación de glutamato cuando la concentración de amonio es limitante (Miller y cols, 1972). Mientras que la afinidad de GS por amonio es alta y su reacción es prácticamente irreversible (Denton y cols, 1970). El ciclo GS-GOGAT en condiciones de escasez de amonio se encarga de asimilar este compuesto y sintetizar glutamato; la vía GS-GOGAT es más costosa que la vía GDH porque consume una molécula de ATP en cada ciclo.

Helling (Helling, 1994) sugiere que la vía GDH tiene un papel importante en la síntesis de glutamato, en condiciones de exceso de amonio y limitación de energía (y de carbono), al tener un costo energético menor al del ciclo GS-GOGAT. Por otro lado, el ciclo GS-GOGAT es el responsable de la síntesis de glutamato cuando el contenido energético es alto o cuando la concentración de amonio es limitante. Los experimentos de Saroja y Gowrishankar (1996) demostraron que la actividad de GDH aumenta en condiciones de limitación de carbono y nitrógeno, y en condiciones de estrés osmótico donde la concentración intracelular de glutamato se eleva como mecanismo de protección (Csonka, 1989). A partir de estos resultados, proponen un papel importante de GDH durante el

crecimiento y sobrevivencia de *E. coli* en su hábitat natural (intestino grueso de mamíferos, suelos, sedimentos o agua), donde existe limitación de carbono y de nitrógeno y posiblemente estrés por desecación. Estos autores extienden la conclusión de Helling, sugiriendo que *E. coli* puede asimilar eficientemente el amonio por vía GDH en condiciones de estrés osmótico, en condiciones de exceso de amonio y limitación de carbono, o bien, si está limitada simultáneamente de carbono y nitrógeno.

En plantas, el ciclo GS-GOGAT es la ruta principal de asimilación de amonio y síntesis de glutamato (Gregerson y *cols*, 1993). En plantas leguminosas se han descrito dos proteínas con actividad de GOGAT: la enzima Fd-GOGAT, que se encuentra en los cloroplastos y asimila el amonio que se produce por la reducción de nitratos dependientes de luz, y el que proviene de la fotorespiración; y la enzima NADH-GOGAT que se encuentra principalmente en tejidos no-verdes como raíces, brotes y nódulos. La actividad de la enzima NADH-GOGAT aumenta durante el desarrollo de los nódulos y está involucrada en la asimilación del amonio que proviene de la fijación bacteriana, por lo que se le ha identificado como una nodulina (Gregerson y *cols*, 1993). A diferencia de lo que ocurre en bacterias, donde la dirección de la reacción hacia la síntesis y degradación de glutamato depende de la actividad de una sola enzima.

Saccharomyces cerevisiae puede utilizar diferentes fuentes de nitrógeno, siendo amonio, glutamina y asparagina fuentes ricas, a diferencia de prolina y urea que son fuentes pobres. La levadura tomará el nitrógeno de estas moléculas para

formar glutamato y glutamina los cuales juegan un papel esencial en el metabolismo de nitrógeno.

En esta levadura se han descrito dos rutas metabólicas que llevan a cabo la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato, GDH1-NADP⁺ y GOGAT (Grenson y cols, 1974) (Fig. 6). Roon y cols (1974) detectaron por primera vez en *S. cerevisiae* la actividad de GOGAT. En 1972 se obtiene la primera mutante estructural en la GDH1-NADP⁺ (Drillien y Lacroute, 1972). En 1997 Avendaño obtiene mutantes estructurales en los genes de *GDH1* y *GLT1*, que codifican para la GDH1-NADP⁺ biosintética y la GOGAT de *S. cerevisiae*, respectivamente, esperando obtener una cepa auxótrofa de glutamato (Avendaño et al., 1997). Sin embargo, la doble mutante ($\Delta glt1$, $\Delta gdh1$), resultó ser apta para crecer en amonio como única fuente de nitrógeno, con un tiempo de duplicación tres veces mayor que la cepa silvestre. El que esta doble mutante presentara una actividad residual de GDH-NADP⁺ sugería la existencia de otra enzima capaz de realizar la misma reacción que el producto de *GDH1*. Al realizar una comparación de la secuencia nucleotídica de *GDH1* con el genoma completo de *S. cerevisiae*, se encontró un marco de lectura abierto, localizado en el brazo izquierdo del cromosoma I, con un 75.9% de identidad con *GDH1*, previamente denominado *GDH3*. Se realizó la interrupción génica de *GDH3* en la doble mutante ($\Delta glt1$, $\Delta gdh1$), lo cual resultó en la obtención del primer auxótrofo de glutamato en *S. cerevisiae* ($\Delta glt1$, $\Delta gdh1$, $\Delta gdh3$).

Nuestro grupo está realizando una labor conjunta para estudiar las vías de asimilación de amonio y la de biosíntesis de glutamato en la levadura *S. cerevisiae*. El trabajo de investigación desarrollado en esta tesis, tiene como objetivo central el implementar una técnica de localización subcelular, que en un futuro cercano nos sirva para localizar a *GDH1*, *GDH3* y *GOGAT*. De esta forma estaríamos contribuyendo al estudio y caracterización de las diferentes vías de asimilación y biosíntesis de glutamato en *S. cerevisiae*.

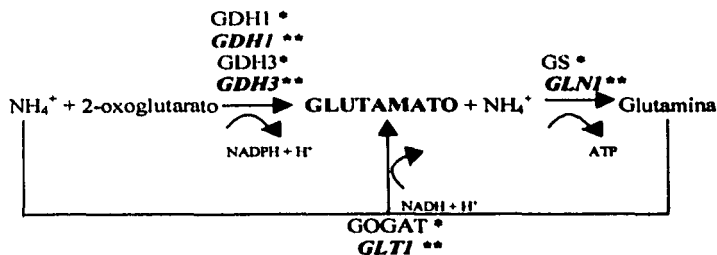


Figura 6. Vías metabólicas para la asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato en *Saccharomyces cerevisiae*. *ENZIMA participante. **gen codificante.

2 HIPÓTESIS.

Se logrará establecer una metodología general que permitirá utilizar a la GFP en el estudio subcelular de proteínas implicadas en la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato en *S.cerevisiae*.

3 OBJETIVO.

Establecer una metodología que permita utilizar a la proteína verde fluorescente para la localización subcelular de las proteínas implicadas en la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato en *S.cerevisiae*.

La metodología tendrá variantes, dependiendo de la proteína que se trate de localizar.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Resumen de los vectores y las cepas utilizadas en este estudio.

Tabla 2. Vectores utilizados en este trabajo.

VECTOR	FENOTIPO	FUENTE
PGFP-MRCy	Derivado del plásmido pJR1138(LEU2), portando el gen de la GFP (mutante S65T).	Rodríguez, 1999
PRS316	Derivado del plásmido pRS306, portando CEN6/ARSH4:	Yeast Genetic Stock Center
pBluescriptII-SK	Derivado del plásmido pUC19, portando una región de clonación múltiple (SK).	STRATAGENE
YCp50	Derivado del plásmido pBR322, portando el gen URA3, CEN4 y ARS1.	Yeast Genetic Stock Center
pGAL	Porta el gen URA3, CEN4 y ARS1. Figura 28	Yeast Genetic Stock Center
pGAL01	Derivado del plásmido pGAL, portando el gen de GLT1 de <i>S.cerevisiae</i> .	Este trabajo.
pGFP-MRCy-M1	Derivado del plásmido de pGFP-MRCy, portando una región de clonación múltiple.	Este trabajo
pGFP-MRCy-H1	Derivado del plásmido de pGFP-MRCy, portando el gen de GDH1 de <i>S.cerevisiae</i> .	Este trabajo
pGFP-MRCy-H3	Derivado del plásmido de pGFP-MRCy, portando el gen de GDH3 de <i>S.cerevisiae</i> .	Este trabajo
pGFP-MRCy-T1	Derivado del plásmido de pGFP-MRCy, portando el gen de GLT1 de <i>S.cerevisiae</i> .	Este trabajo
pGFP-MRCy-SK1	Derivado del plásmido de pGFP-MRCy, portando un fragmento de la región de clonación múltiple SK.	Este trabajo
pGFP-MRCy-SK2	Derivado del plásmido de pGFP-MRCy-SK1, portando un sitio de restricción BglII.	Este trabajo

En la tabla 2, se muestra la lista de vectores utilizados en este trabajo. En capítulos posteriores, se describirá el método por el cual se construyó cada uno de los vectores realizados en este trabajo. En la tabla 3 se muestra la lista de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. La cepa CLA3 muestra auxotrofia para leucina, esta fue transformada con los plásmidos de pGFP-MRCy (portador de la mutante S65T de la GFP), pGFP-MRCy-H1 (portando el gen de la GDH1 con la GFP fusionada en su extremo amino), pGFP-MRCy-H3 (portando el gen de la GDH3 con la GFP fusionada en su extremo amino) y pGFP-MRCy-T1 (portando el gen de la GLT1 con la GFP fusionada en su extremo amino), dando como

resultado las cepas CLA3GFP, CLA3H1, CLA3H3 y CLA3T1 (respectivamente), que complementan la auxotrofia para leucina. La cepa CLA04 muestra auxotrofia para leucina y un fenotipo $\Delta glt1$, ésta fue transformada con los plásmidos pGFP-MRCy, pGAL01 y pGFP-MRCy-T1, obteniéndose las cepas CLA04GFP, CLA04GAL y CLA04T1 (respectivamente), las tres complementan la auxotrofia para leucina; CLA04GAL y CLA04T1 complementan actividad para GOGAT. Finalmente la cepa CLA05 muestra auxotrofia para leucina y un fenotipo $\Delta gdh1\Delta gdh3$, ésta fue transformada con los plásmidos pGFP-MRCy, pGFP-MRCy-H1 y pGFP-MRCy-H3, obteniéndose las cepas CLA05GFP, CLA05H1 y CLA05H3 (respectivamente), las tres complementan la auxotrofia para leucina; CLA05H1 y CLA05H, complementan actividad para GDH (GDH1 y GDH3, respectivamente).

Tabla 3. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
CLA3	MATa GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Yip5 leu2	Avendaño y cols 1997
CLA04	$glt1\Delta::URA3$ GDH1 GDH3 leu2	Valenzuela y cols 1995
CLA05	GLT1 $gdh1\Delta::kanMX4$ $gdh3\Delta::URA$ leu2	Valenzuela y cols 1995
CLA3GFP	MATa GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Yip5 pGFP-MRCy::LEU2	Este trabajo
CLA3H1	MATa GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Yip5 pGFP-MRCy-H1::LEU2	Este trabajo
CLA3H3	MATa GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Yip5 pGFP-MRCy-H3::LEU2	Este trabajo
CLA3T1	MATa GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Yip5 pGFP-MRCy-T1::LEU2	Este trabajo
CLA04GFP	$glt1\Delta::URA3$ GDH1 GDH3 leu2 pGFP-MRCy::LEU2	Este trabajo
CLA04GAL	$glt1\Delta::URA3$ GDH1 GDH3 leu2 pGAL01::LEU2 GLT1	Este trabajo
CLA04T1	$glt1\Delta::URA3$ GDH1 GDH3 leu2 pGFP-MRCy-T1::LEU2 GLT1	Este trabajo
CLA05GFP	GLT1 $gdh1\Delta::kanMX4$ $gdh3\Delta::URA$ leu2 pGFP-MRCy::LEU2	Este trabajo
CLA05H1	GLT1 $gdh1\Delta::kanMX4$ $gdh3\Delta::URA$ leu2 pGFP-MRCy-H1::LEU2 GDH1	Este trabajo
CLA05H3	GLT1 $gdh1\Delta::kanMX4$ $gdh3\Delta::URA$ leu2 pGFP-MRCy-H3::LEU2 GDH3	Este trabajo

4.2 Cepas bacterianas utilizadas para transformar.

Tabla 4. Cepas de *E. coli* utilizadas en las transformaciones.

Cepa	Fenotipo	Condiciones de transformación	Eficiencia de transformación	Fuente.
TB1	Fara Δ (lac-proAB) rpsL (Str') [ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15] thi hsdR(r_k m_k +)	400 Ω , 25 μ F y 2.5V.	10 ⁷	BioLabs
DH5 α	F- ϕ 80dlacZ Δ M15(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(rK-rM+) deoR thi-1 phoA supE44 λ -gyrA96 relA1	Shock térmico 2 min a 45°C.	10 ⁷	GIBCO BRL
DH10B	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) - ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ -	400 Ω , 25 μ F y 2.5V.	10 ¹²	GIBCO BRL

En la tabla 4, se muestran las cepas de *E. coli* utilizadas en las transformaciones que se realizaron en la construcción de los plásmidos mostrados en la tabla 2. La cepa seleccionada para cada una de las transformaciones, se basó en la eficiencia de transformación que se requirió en cada uno de los casos, cuando la transformación no dio resultados positivos con TB1 o DH5 α , se utilizó la cepa DH10B, la cual presenta una eficiencia de transformación de 10¹² como se observa en el columna 4 de la tabla 4. El fenotipo y las condiciones de transformación utilizadas, se muestran en las columnas 2 y 3 respectivamente.

4.3. Vector de pGFP-MRCy.

El vector de pGFP-MRCy (mutante S65T), así como sus mapas de restricción, fueron obsequiadas por el Dr. Rodríguez del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Barcelona España.

4.3.1 Mapas de restricción del pGFP-MRCy.

En la figura 7, se muestran la estrategia utilizada por el grupo del Dr. Rodríguez en la obtención del vector pGFP-MRCy. El vector parental pJR1138 fue digerido *SmaI-NcoI* y rellenado con T4 DNA polimerasa. En la parte inferior se muestra el mapa de restricción del vector obtenido.

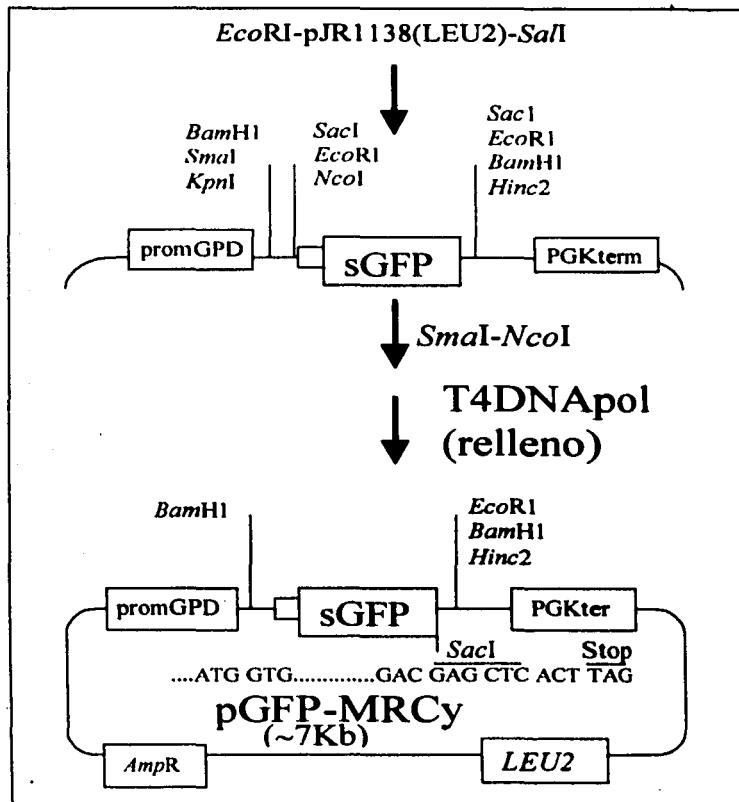


Figura 7. Construcción del vector de pGFP-MRCy. *promGPD*, promotor de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa-, *sGFP*, secuencia codificante de la mutante S65T, *PGKter*, terminador transcripcional para levadura, *LEU2*, marcador para levadura. En la parte inferior de la figura se muestra el mapa de restricción del vector de pGFP-MRCy, Se observa la secuencia del codón de inicio de la secuencia que codifica para la proteína mutante S65T y la secuencia de término de la misma proteína.

En la figura 8 se muestra la secuencia de la mutante S65T (Gene Bank Acc. No. U50 963). En recuadro se resalta la secuencia Thr66-Tyr67-Gly68 correspondientes al cromóforo.

```

1      11
ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC
met val ser lys gly glu glu leu phe thr gly val val pro ile leu val

      21      31
GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG
glu leu asp gly asp val asn gly his lys phe ser val ser gly glu gly glu

      41      51
GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG
gly asp ala thr tyr gly lys leu thr leu lys phe ile cys thr thr gly lys

      61      66 67 68      71
CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC ACC TAC GGC GTG CAG TGC
leu pro val pro trp pro thr leu val thr thr phe thr tyr gly val gln cys

      81
TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG
phe ser arg try pro asp his met lys gln his asp phe phe lys ser ala met

      91      101
CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC
pro glu gly tyr val gln glu arg thr ile phe phe lys asp asp gly asn tyr

      111      121
AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG
lys thr arg ala glu val lys phe glu gly asp thr leu val asn arg ile glu

      131      141
CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG
leu lys gly ile asp phe lys glu asp gly asn ile leu gly his lys leu glu

      161
TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC
tyr asn tyr asn ser his asn val tyr ile met ala asp lys gln lys asn gly

      171
ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC
ile lys val asn phe lys ile arg his asn ile glu asp gly ser val gln leu

      181      191
GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC
ala asp his tyr gln gln asn thr pro ile gly asp gly pro val leu leu pro

      201      211
GAC ACC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG ACG AAA GAC CCC AAC GAG AAG
asp asn his tyr leu ser thr gln ser ala leu ser lys asp pro asn glu lys

      221      231
CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGC ATC ACT CAC GGC
arg asp his met val leu leu glu phe val thr ala ala gly ile thr his gly

ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA
met asp glu leu tyr lys stop

```

Figura 8. Secuencia de la mutante S65T de la GFP. El primer carril muestra el número de aminoácido al que corresponde la secuencia nucleotídica mostrada en el segundo carril, en el tercer carril se muestra la secuencia de aminoácidos. En recuadro se muestra la secuencia perteneciente al cromóforo.

4.4 Construcción de los diferentes vectores.

Todos los desoxioligonucleótidos (oligos) que se utilizan en este trabajo, se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México DF.

4.4.1. Obtención de los vectores pGFP-MRCy-H1 Y -H3.

Estos se construyeron con la finalidad de tener a la GFP clonada en el extremo amino de los genes de *GDH1* y *GDH3*.

AMPLIFICACIÓN POR PCR.

Basados en las secuencias de *GDH1* y *GDH3* obtenidas en <http://genome-www2.stanford.edu/>, se diseñaron los desoxioligonucleótidos mostrados en la figura 9, para la amplificación de los genes correspondientes.

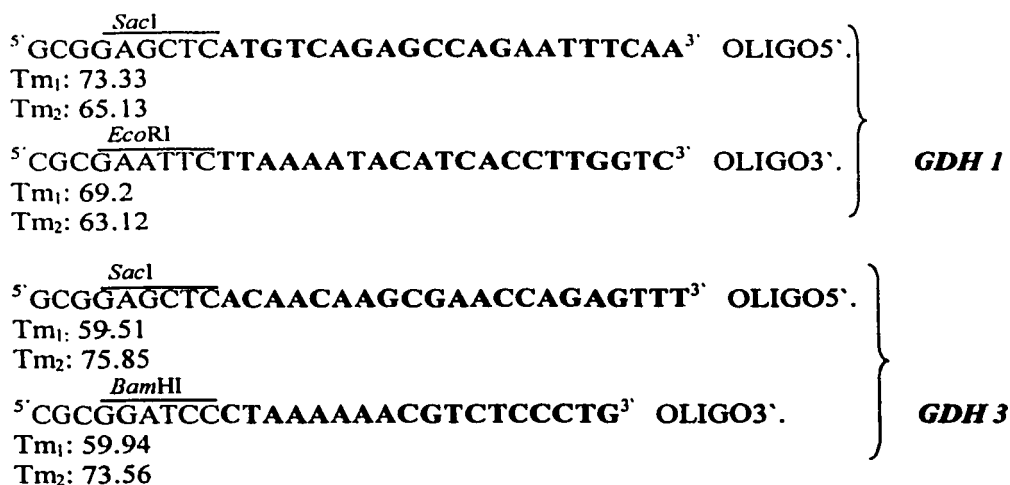


Figura 9. Desoxioligonucleótidos 5' y 3' que se utilizaron para la amplificación de *GDH1* y *GDH3*. En negritas se muestran las secuencias complementarias al gen por amplificar, también se muestra el sitio de restricción agregado.

Las amplificaciones se hicieron utilizando la técnica de PCR sobre DNA en los plásmidos pRS316 (para *GDH3*) y YCP50 (para *GDH1*). Esta se realizó en un termociclador RoboCycler 40 (Stratagene) según el programa mostrado en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de amplificación para *GDH1* y *GDH3*.

programa	
1	3 min. 95°C
2	1 min. 95°C
3	1.5 min. 60°C
4	2.5 min. 72°C
} 5 ciclos	
5	1 min. 95°C
6	1 min. 65°C
7	2 min. 72°C
} 40 ciclos	
8	10 min. 72°C
9	α 4°C

CLONACIÓN DE *GDH1* Y *GDH3* EN pGFP-MRCy.

Los productos de PCR de *GDH1* y *GDH3*, se purificaron en un gel de agarosa al 1% según lo indicado en el protocolo de "QIAEX gel purification". Estos se prepararon según el protocolo A (Apéndice 3). El vector de GFP-MRCy, se preparó según protocolo B (Apéndice 3). Las ligaciones se realizaron en un equipo BIOCHILLER, a un volumen final de 10µl, a 16°C, durante toda la noche. Se utilizó 1µl de ligasa (T4DNA ligasa de SIGMA) + 1µl de su amortiguador de ligasa por reacción. Las ligaciones se hicieron según las relaciones mostradas en la tabla 6. Estas se utilizaron para transformar *E. coli* (tabla 4). De las colonias obtenidas se hizo extracción de DNA según el protocolo de minipreps fenol

(Apéndice 2). Una vez confirmada la correcta clonación de los insertos protocolo C (Apéndice 3), se realizaron las maxipreps (Apéndice 2).

Tabla 6. Relaciones utilizadas en la reacciones de ligación de pGFP-MRCy con *GDH1* y *GDH3*. Todas las ligaciones se manejaron en un volumen final de 10 μ l, llevando 1 μ l ligasa T4DNA, 1 μ l de su amortiguador más la relación vector/inserto mencionada en la tabla. La ligaciones 4-6 son los controles.

No. De ligación	Vector (pGFP-MRCy)	Inserto	Relación
1	0.02 pmoles	0.05pmoles	1:2.5
2	0.012pmoles	0.05pmoles	1:4.2
3	0.006pmoles	0.05pmoles	1:8.4
4	-----	0.05pmoles	0:1
5	0.02pmoles	-----	1:0
6	-----	-----	0:0

4.4.2 Obtención del vector pGFP-MRCy-M1.

Este vector se construyó con la finalidad de disponer con un número mayor de sitios de clonación en el vector de pGFP-MRCy, para las construcciones en que se clonaron los diferentes genes en el extremo carboxilo de la GFP. El sitio de clonación múltiple ("multi cloning site" MCS) se sintetizó en la forma de dos oligos, un *forward* (representado por la parte superior del MCS, Figura 10) y un *reverse* (representado por la parte inferior del MCS, Figura 10), su diseño incluye los diferentes sitios de restricción que se pensó podrían ser útiles durante la realización de este trabajo.

LIGACIÓN DEL MCS (SITIO DE CLONACIÓN MÚLTIPLE).

El MCS se sintetizó en la forma de dos desoxioligonucleótidos, un forward (conc. 2.2 mg/ml) y un reverse (3.2 mg/ml). Estos se mezclaron en concentraciones equimolares en un tubo eppendorff. La mezcla se llevó a temperatura de ebullición por 5 min y se dejó enfriar lentamente (solución MCS). El vector de GFP-MRCy se preparó según el protocolo B (apéndice 3).

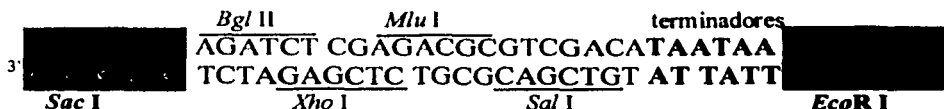


Figura 10. Sitio de clonación múltiple (MCS). En los extremos se resalta con un sombreado, los sitios *SacI* y *EcoRI*, por medio de los cuales fué clonado.

Las ligaciones se realizaron en un equipo BIOCHILLER, a un volumen final de 10µl, a 16°C, durante 12 h según las relaciones de la tabla 7 (todas las ligaciones llevan 1µl de ligasa + 1µl del amortiguador de ligasa). Estas se utilizaron para transformar *E.coli* (tabla 4). De las colonias obtenidas se hizo extracción de DNA según el protocolo de minipreps fenol (Apéndice 2). Una vez confirmada la correcta clonación del MCS (Resultados), se realizaron las maxipreps (Apéndice 2).

Tabla 7. Relaciones vector-inserto usadas en la ligación del MCS.

No de ligación	Vector pGFP-MRCy	Solución MCS	Relación
1	0.019pmol	4.45pmol	1:230
2	0.019pmol	0.44pmol	1:23
3	0.019pmol	0.04pmol	1:2.3
4	0.019pmol	--	1:0

4.4.3 Obtención del vector pGAL01.

Este se construyó con la finalidad de tener al gen de la GOGAT clonado en el vector de pGAL, con el cual pudiéramos transformar una cepa de *S. cerevisiae* $\Delta glt1$ y de esta forma pudiéramos comprobar si el gen amplificado por PCR generaba un producto funcional. Recordando que la amplificación de un gen tan grande (6.438 Kb) puede generar un error a nivel de secuencia nucleotídica que repercuta en la funcionalidad de la proteína. Una vez obtenida una cepa con actividad para GOGAT, se proseguiría con la clonación de esta amplificación en el vector de pGFP-MRCy.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DE *GLT1*.

Basándonos en la secuencia de *GLT1* (Filetici y cols, 1995), se diseñaron los desoxioligonucleótidos que se muestran en la Figura 11.



Figura 11. Desoxioligonucleótidos 5' y 3' que se utilizaron para la amplificación de *GLT1*. En negritas se muestran las secuencias complementarias al gen por amplificar. También se muestra el sitio de restricción agregado.

La amplificación se hizo utilizando la técnica de PCR sobre DNA genómico aislado (en una cepa CLA3), en un termociclador RoboCycler 40 (Stratagene), según el programa mostrado en la tabla 8.

Tabla 8. Programa de amplificación para *GLT1*.

Ciclo	programa
1	1 min. 94°C
2	1 min. 94°C
3	50 seg. 50°C
4	7 min. 68°C
	} 10 ciclos
5	1 min. 94°C
6	50 seg. 50°C
7	7 min. 68°C
	} 20 ciclos
	en el paso "7" se incrementan 20 seg. por ciclo.
8	7 min. 72°C
9	α 4°C

CLONACIÓN DEL GEN DE *GLT1* EN EL VECTOR *pGAL*.

El producto de PCR de *GLT1* se limpió en un gel de agarosa al 1% según lo indicado en el protocolo de "QIAEX gel purification" y se preparó de acuerdo a lo indicado en el protocolo A. El vector *pGAL* se preparó según lo indicado en el protocolo B. Las ligaciones se realizaron en un equipo BIOCHILLER, a un volumen final de 10 µl, a 16°C, durante toda la noche. Se utilizó 1µl de ligasa + 1µl de amortiguador de ligasa por reacción. Las ligaciones se hicieron según las relaciones de la tabla 9. Estas se utilizaron para transformar *E.coli* (tabla 4). De las colonias obtenidas se hizo extracción de DNA según el protocolo de minipreps

fenol (Apéndice 2). Una vez confirmada la correcta clonación del gen *GLT1* según protocolo C (Apéndice 3), se realizó la maxiprep (Apéndice 2).

Tabla 9. Relaciones vector- inserto en la ligación de *GLT1* en *pGAL*.

Ligación	Vector (pGFP-MRCy)	Inserto	Relación
1	0.0019pmol	0.011pmol	1:5.7
2	0.0028pmol	0.011pmol	1:4
3	0.0047pmol	0.011pmol	1:2.3
4	0.0095pmol	0.011pmol	1:1.1

4.4.4 Obtención del vector pGFP-MRCy-T1.

Del vector *pGAL01* se obtuvo el gen de *GLT1* por digestión con *Bam*HI durante 2 horas a 37°C en un volumen final de 100µl. El producto de interés, se purificó en un gel de agarosa al 1%, según lo indicado en el protocolo de "QIAEX gel purification". El vector de pGFP-MRCy-M1 se digirió con *Bg*II durante 3 horas a 37°C. Se desfosforiló con fofatasa de camarón (Roche 1758250) según lo indicado por la empresa. El producto se limpió en un gel de agarosa al 1%, según lo indicado en el protocolo de "QIAEX gel purification" y se resuspendió en 20µl de H₂O. Las ligaciones se realizaron en un equipo BIOCHILLER a un volumen final de 10µl, a 16°C, durante 12 h según las relaciones de la Tabla 10 (todas las ligaciones llevan 1µl de ligasa + 1µl del amortiguador de ligasa). Estas se utilizaron para transformar *E.coli* (tabla 4). De las colonias obtenidas se hizo extracción de DNA según el protocolo de minipreps fenol (Apéndice 2). Una vez confirmada la

correcta clonación del gen *GLT1* según protocolo C (Apéndice 3), se realizó la maxiprep (Apéndice 2).

Tabla 10. Relaciones vector- inserto en la ligación del gen de *GLT1* en el vector pGFP-MRCy-M1.

No de ligación	Vector GFP-MRCy-M1	<i>GLT1</i>	relación
1	0.019pmol	0.045pmol	1:2.4
2	0.013pmol	0.056pmol	1:4.3
3	0.046pmol	0.011pmol	4.2:1
4	0.019pmol	--	1:0
5	--	0.045pmol	0:1

4.4.5 Obtención del vector pGFP-MRCy-SK1.

Este vector se construyó con la finalidad de disponer con un número mayor de sitios de clonación en el vector pGFP-MRCy y como un paso previo a la construcción del vector pGFP-MRCy-SK2.

Se digirió el vector pBluescript-II-SK con *EcoRI*-*SacI* (de tal forma que se pudiera extraer la región del MCS: *SacI*, *BstXI*, *SstII*, *NotI*, *EagI*, *XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*) por 2 horas a 37°C. De la misma forma, se digirió el vector de GFP-MRCy. Los productos de digestión se limpiaron en un gel de agarosa al 2% según lo indicado en el protocolo de "QIAEX gel purification", y se resuspendió en 20µl de H₂O. El vector de GFP-MRCy se desfosforiló con 1µl de fosfatasa de camarón en un volumen final de 12µl por 1 hora a 37°C y 20 minutos a 65°C (para desactivar la enzima). Las ligaciones se realizaron en un equipo BIOCHILLER a un volumen final de 20µl, a 16°C, durante 12 h, según las

relaciones de la Tabla 11 (todas las ligaciones llevan 1 μ l de ligasa + 2 μ l de amortiguador de ligasa). Éstas se utilizaron para transformar *E. coli* (tabla 4). De las colonias obtenidas se hizo extracción de DNA según el protocolo de minipreps fenol (Apéndice 2). Una vez confirmada la correcta clonación del sitio de clonación múltiple SK según protocolo C (Apéndice 3), se realizó la maxiprep (Apéndice 2).

Tabla 11. Relaciones vector- inserto en la ligación de SK en el vector de pGFP-MRCy.

No de ligación	Vector GFP-MRCy	SK	relación
1	0.015pmol	5pmol	1:300
2	0.015pmol	---	1:0

4.4.6 Obtención del vector pGFP-MRCy-SK2.

Este vector se construyó con la finalidad de agregar un sitio de restricción en el vector de pGFP-MRCy en el extremo carboxilo de la GFP, de esta forma se facilitará el trabajo cuando en un futuro se desee realizar las construcciones con la proteína clonada del lado amino de los genes por estudiar.

Basándonos en las secuencia del promotor de GPD (Fig. 23), se diseñaron los desoxioligonucleótidos que se muestran en la Figura 12, con el fin de agregar un sitio de restricción *Bgl*I en el extremo 5' de la secuencia de la GFP.

HindIII

5' **CATGATTACGCCAAGCTTGGCTGC** 3' OLIGO5'

Tm₁: 70.87

BglII NcoI

5' **CGGATCCAGATCTCCCATGGTGAGCAAGGGC** 3' OLIGO3'

Tm₁: 78.5

Tm₂: 77.38

Figura 12. Desoxiligonucleótidos (oligo) 5' y 3' que se utilizaron para la amplificación del promotor de GPD en la que se añadió el sitio *Bgl*II. Oligo 5' es 100% idéntico a la secuencia correspondiente en el extremo 5' del promotor de GPD. Oligo 3' que muestra la secuencia correspondiente al extremo 5' de la secuencia codificante para la GFP, se muestra el sitio *Bgl* II el cual fué agregado.

La amplificación se hizo utilizando la técnica de PCR sobre DNA en el plásmido de GFP-MRCy. Esta se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) según el programa de amplificación mostrado en la Tabla 5.

CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN EN pGFP-MRCy.

El producto de PCR del promotor de GPD se limpió en un gel de agarosa al 1%, según lo indicado en el protocolo de "QIAEX gel purification". Se prepararon según el protocolo A (digiriendo *Hind*III-*Nco*I). Las ligaciones se realizaron en un equipo BIOCHILLER, a un volumen final de 10µl, a 16°C durante toda la noche. Se utilizó 1 µl de ligasa + 1 µl del amortiguador de ligasa, por reacción. Las ligaciones se realizaron según las relaciones de la tabla 12. Estas se utilizaron para transformar *E.coli* (tabla 4). De las colonias obtenidas se hizo extracción de DNA según el protocolo de minipreps fenol (Apéndice 2). Una vez confirmada la correcta clonación del inserto según protocolo C (Apéndice 3), se realizó la maxiprep (Apéndice 2).

Tabla 12. Relaciones vector- inserto en la ligación del promotor GPD+*Bgl*II en pGFP-MRCy.

Ligación	Vector (pGFP-MRCy)	Inserto	Relación
1	0.0263 pmoles	0.0242 pmoles	1:1
2	0.0263 pmoles	0.0484 pmoles	1:2
3	0.0263 pmoles	0.1212 pmoles	1:4.5
4	0.0263 pmoles	----	1:0

4.5 Secuenciación de la región 5' de sGFP del vector de pGFP-MRCy.

Basándonos en la secuencia del promotor de GPD obtenida en <http://genome-www2.stanford.edu/>, se diseñó el desoxioligonucleótido 3' uno (Fig. 15); basándonos en la secuencia del vector de la mutante S65T (Figura 8), se diseñó el desoxioligonucleótido 3' dos (Figura 15). La secuenciación se mando a hacer en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México DF.

5'-TCGAAACTAAGTTCTTGGTG^{3'} OLIGO3'uno
Tm:60.9

5'-GCATCGCCCTCGCCCTCGCC^{3'} OLIGO3'dos
Tm:77.3

Figura 15. Desoxioligonucleótidos que fueron utilizados para secuenciar la región comprendida entre el vector de GPD y sGFP.

4.6 Transformación de levadura.

Los vectores construidos en este trabajo, se utilizaron para transformar levadura, se realizaron las combinatorias indicadas en la Tabla 14.

Tabla 14. Transformación de levadura con los plásmidos construidos en este trabajo

plásmido cepa	pGFP-MRCy-H1	pGFP-MRCy-H3	pGFP-MRCy-T1	pGFP- MRCy	sin DNA	sin DNA en MMLeu
CLA3	X	X	X	X	X	X
CLA04			X	X	X	X
CLA05	X	X		X	X	X

En la primera fila se muestran los vectores construidos en este trabajo y dos controles (transformación sin DNA y transformación sin DNA en MM complementado con leucina), que fueron utilizados para transformar las cepas de levadura que se muestran en la primera columna. Con cruces se muestran las combinatorias realizadas.

4.7 Condiciones de crecimiento.

Cada una de las cepas se creció en 100 ml de MM en matraces con capacidad para 250 ml. En el caso de las tres cepas auxótrofas de leucina (*leu2*), se agregó 0.2 mM de leucina a cada cultivo. Los cultivos fueron inoculados a una densidad óptica de 0.03-0.04 a 600 nm, e incubados a 30°C con agitación constante (a 250 rpm). Se siguió una curva de crecimiento cada dos horas hasta las 48 h, de donde se determinaron las velocidades de duplicación. Un cultivo puesto en paralelo de cada cepa se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min cuando las

células alcanzaron una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm. Se lavaron con H₂O bidestilada, y se guardaron a -20°C.

4.8 Determinación de la actividad enzimática de GOGAT-NAD⁺ y GDH-NADP⁺.

Para realizar los ensayos enzimáticos, se descongelaron los botones celulares preparados como se describe en 4.7 y se resuspendieron en 1ml de buffer de extracción (Apendice 1), se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio (trabajando siempre a 4°C), dando 5 ciclos de 1 min. en vortex por uno 1 min. en hielo. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 20 min, recuperando el sobrenadante.

La actividad enzimática de GDH-NADP⁺ se determinó por el método de Doherty (1970). La concentración de sustratos en la reacción fue: 2-oxoglutarato 5mM, NH₄Cl 50mM y NADPH 0.14 mM, disueltos en amortiguador de Tris-Cl 1M, pH=8 y ajustado a pH=7.2 con HCl. La actividad para esta reacción se determina por medio de dos testigos negativos, uno sin 2-oxoglutarato (m₂) y uno sin NH₄Cl (m₃), las pendientes de los dos controles (a 340 nm) se suman y restan al ensayo completo (m₁, Figura 16), quedando:

$$m_{\text{real Abs min}^{-1}} = m_1 - (m_2 + m_3)$$

$$\text{Actividad Especifica} = \text{AE}$$

$$\text{AE} = ((m_{\text{real Abs min}^{-1}})(6.22\mu\text{M}^{-1}\text{min}))(\text{alícuota en ml})(\text{mg}^{-1}\text{ml de proteína})$$

Figura 16. Fórmulas utilizadas en la determinación de la actividad específica de GDH-NADP⁺.

La actividad enzimática de GOGAT-NAD⁺ se determinó por el método descrito por Roon y cols (1974). La concentración de sustratos en la reacción fue: 2-oxoglutarato 5.5 mM, glutamina 5.5 mM y NADH 0.18 mM, disueltos en amortiguador de Tris-Cl 1 M, pH=8 y ajustado a pH=7.2 con HCl. Se trabaja con un testigo negativo, un inhibidor no competitivo de amidotransferasas que se adiciona a la mezcla (100μl, de azaserina 5 mM). La actividad específica se determina de la resta de la pendiente del testigo negativo (m₂) al tubo de ensayo (m₁) (fig. 17) a 340 nm.

$$m_{\text{real(Abs/min)}} = m_2 - m_1$$

$$\text{AE} = ((m_{\text{real Abs min}^{-1}})(6.22\mu\text{M}^{-1}\text{min}))(\text{alícuota en ml})(\text{mg}^{-1}\text{ml de proteína})$$

Figura.17 Fórmulas utilizadas en la determinación de la actividad específica de GLT-NAD⁺.

4.9 Determinación de proteína.

La determinación se hizo según la técnica descrita por Lowry (1951), se usó como estándar albúmina de suero bovino.

4.10 Microscopía.

Las muestras se fijaron en una capa de agarosa al 1% y se observaron en un equipo BioRad 1024 con láser de Kr-Ar, con líneas en 488, 568 y 647 nm y microscopio invertido Nikon TMD 300.

5 DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El vector de pGFP-MRCy, muestra algunas inconsistencias entre las secuencias de restricción obtenidas experimentalmente y las observadas en los mapas de restricción que nos proporcionó el Dr Rodríguez C. (fig. 18), por lo anterior se decidió realizar un estudio bibliográfico de este vector, capítulo 5.1.1 y un estudio experimental, capítulo 5.5.2. Dentro de las inconsistencias observadas (las cuales serán discutidas a detalle posteriormente) encontramos:

- El análisis con enzimas de restricción no coincidió con el reportado (cap. 5.1.2).
- El vector de pGFP-MRCy (fig. 20) muestra un tamaño distinto al esperado teóricamente (análisis bibliográfico, cap. 5.1.1) y el obtenido experimentalmente (cap. 5.1.2).

Dado lo anterior, se decidió hacer una recharacterización del vector.

5.1 Estudio del vector de pGFP-MRCy.

5.1.1 Revisión bibliográfica del vector pGFP-MRCy.

El vector pGFP-MRCy es derivado del vector pJR1138 (LEU2), portando el gen de la GFP mutante S65T (Rodríguez, 1999).

En 1999, el Dr. Rodríguez C. publica: "el plásmido pJR1138 (no publicado) es idéntico al pJR1136 (Yalovsky, 1997) pero contiene el marcador *LEU2* en lugar de *TRP1*" (Rodríguez, 1999).

En 1988, Gietz y Prakash publicaron: "el vector multicopia pJR1136 de expresión para levadura, fué construido al ligar un fragmento de 3.4 Kb *HindIII-XbaI* del vector pG-3 (Schedena M.), con el vector parental YEplac112. Los sitios *BamHI-EcoRI* pertenecientes al MCS fueron destruidos" (Gietz y Prakash 1988).

El gen de la GFP fue insertado *EcoRI-SalI* en el vector pJR1138 (Rodríguez, 1999_b).

De lo anterior se extrapola que el vector pJR1138 de expresión para levadura, fué construido por la ligación de un fragmento de 3.4 Kb *HindIII-XbaI* del vector pG-3, en el vector parental YEplac181 (Gietz y Prakash, 1988) (fig. 18) de tal forma que se obtuvo el promotor GPD y el terminador PGK. Los sitios *BamHI-EcoRI* pertenecientes al MCS fueron destruidos, dando como resultado el vector pJR1138 (fig. 19).

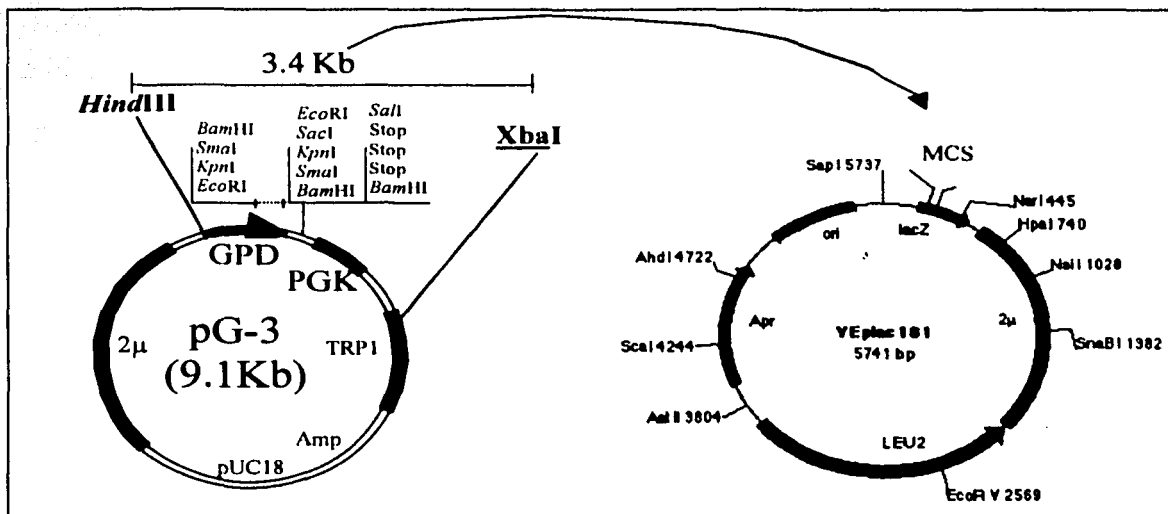


Figura 18. Construcción del vector pJR1138. Se muestra el vector pG-3 del cual fue extraído el fragmento de 3.4 Kb (promotor GPD y terminador PGK) comprendido entre *HindIII*-*XbaI*. También, se muestra el vector parental YEplac181 en el cual fue insertado el fragmento de 3.4 Kb de pG-3, en la región del MCS (este tiene los sitios de restricción-*HindIII*, *SphI*, *PstI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SstI*, *EcoRI*).

La secuencia que codifica para la proteína verde no se sabe de donde se obtuvo. El alineamiento de la región 5' de la secuencia de la mutante S65T de la GFP (fig. 8), con la región 3' del resultado obtenido en la secuenciación de la región comprendida entre el promGPD y la sGFP (cap. 5.1.3), nos indica que el vector de pGFP-MRCy tiene la secuencia perteneciente a la mutante S65T de la GFP. Esta secuencia se insertó en *EcoRI*-*SalI* (fig. 7), en el vector de pJR1138, obteniéndose como resultado el vector pGFP-MRCy* (fig. 19).

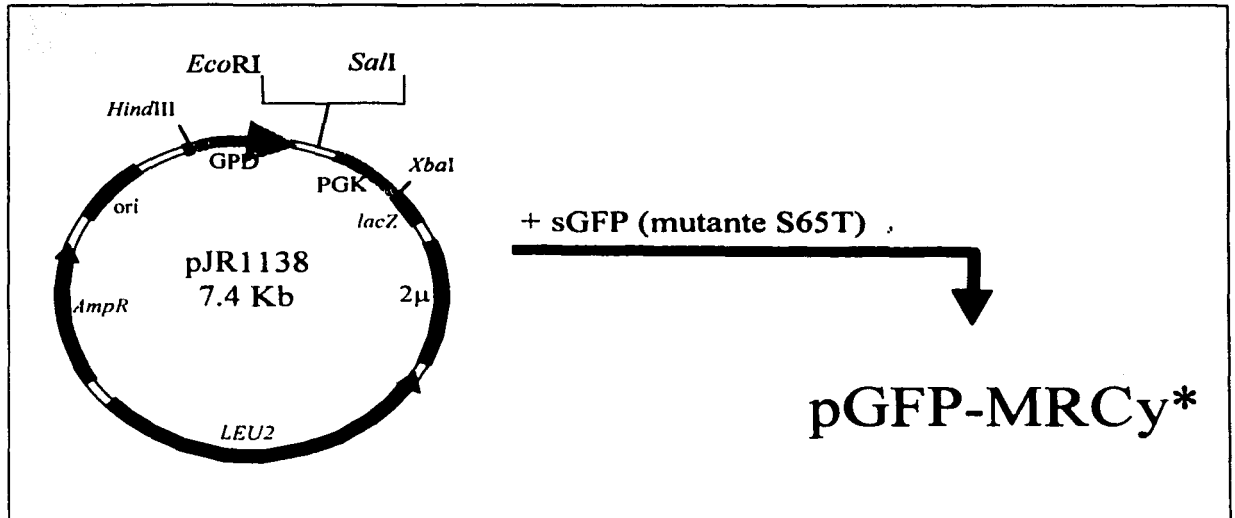


Figura 19. Construcción del vector pGFP-MRCy*. Se muestra el vector pJR1138. A este se le agregó la secuencia sGFP (secuencia codificante de la mutante S65T), en los sitios *EcoRI-Sall*, dando como resultado el vector de pGFP-MRCy*.

En la figura 20 (péneles A y B, respectivamente), se muestra un análisis comparativo entre el vector de pGFP-MRCy* (fig. 19) y el vector de pGFP-MRCy (fig. 7). En el se puede ver la diferencia en tamaños, el obtenido para pGFP-MRCy* coincide mejor con lo observado experimentalmente (cap. 5.2). Para la replicación en levadura es necesario un origen de replicación, el origen de replicación 2μ que se observa en el vector de pGFP-MRCy*, podría ser el que tiene el vector de pGFP-MRCy. Finalmente cabe resaltar que la región comprendida entre el promGPD y sGFP, muestra una gran inconsistencia entre los dos vectores con respecto a los sitios de restricción señalados. Dado lo anterior,

se decidió hacer un análisis experimental del vector obtenido en el curso impartido por el Dr. Rodríguez (1999_b).

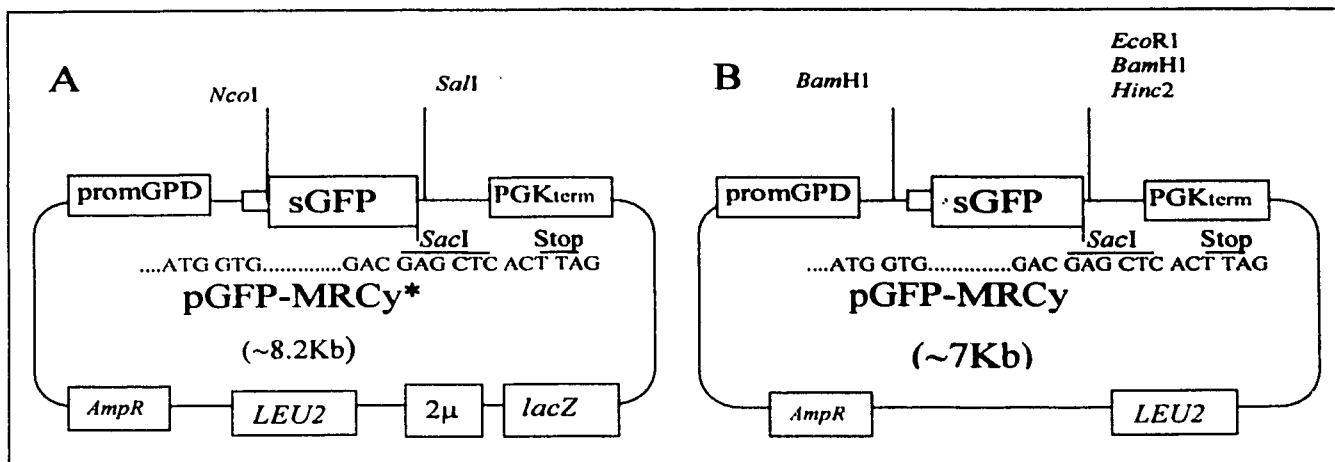


Figura 20. Comparación entre el mapa del vector obtenido por el análisis bibliográfico (A) y el mapa obtenido del grupo del Dr. Rodríguez (B).

5.1.2 Análisis de restricción del vector de pGFP-MRCy.

Con el fin de conocer los diferentes sitios de restricción con que contaba el vector de pGFP-MRCy, se realizó un análisis con enzimas de restricción.

En la figura 21, se puede observar que la digestión con las enzimas *NcoI* y *EcoRI* linearizan el vector de pGFP-MRCy (carriles A y B, respectivamente). La digestión *NcoI-EcoRI* (carril D) muestra un fragmento de 750 pb aproximadamente perteneciente a la secuencia de sGFP. De lo anterior se demuestra la existencia del sitio *NcoI* mostrado en el vector pGFP-MRCy* y del sitio *EcoRI* mostrado en el vector pGFP-MRCy.

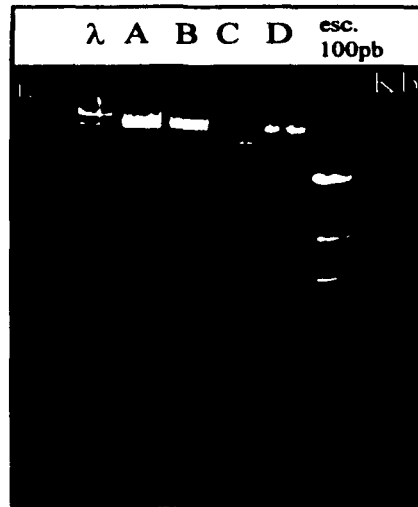


Figura 21. Análisis de restricción del vector de pGFP-MRCy. λ (fragmentos λ /HindIII, GIBCO), esc. 100pb (escalera 100pb), A (digestión con *NcoI*), B (digestión con *EcoRI*), C (digestión con *XhoI*) y D (digestión *NcoI-EcoRI*). En el recuadro se muestra una banda entre 700 y 800pb.

En la figura 22 panel B se muestra como con la digestión *NcoI-EcoRI* (carril 1) se obtiene el mismo resultado que en la figura 21, carril D. Las digestiones *NcoI-BglII* y *NcoI-SacI* (carriles 2 y 3) nos muestran un fragmento de 750pb, lo cual nos indica la existencia de los sitios *BglII* y *SacI* en el extremo carboxilo de la secuencia sGFP. Por el tamaño obtenido de cada banda, se puede concluir que el orden de los sitios de restricción en el vector de pGFP-MRCy es *SacI*, *BglII* y *EcoRI*. En esta figura también se puede observar que las enzimas *SmaI* y *KpnI* (carriles 7 y 8) no digieren al vector. En el panel A carril "a", se puede ver que la enzima de restricción *XhoI* no digiere. En el carril "b" la digestión *NcoI-SpeI*

lineariza el vector, en base a la digestión con *NcoI* mostrada en la figura 21 carril A, donde vemos que esta enzima lineariza, podemos concluir que *SpeI* no digiere, finalmente en el carril "c", se muestra que *Bg/II* digiere este vector.

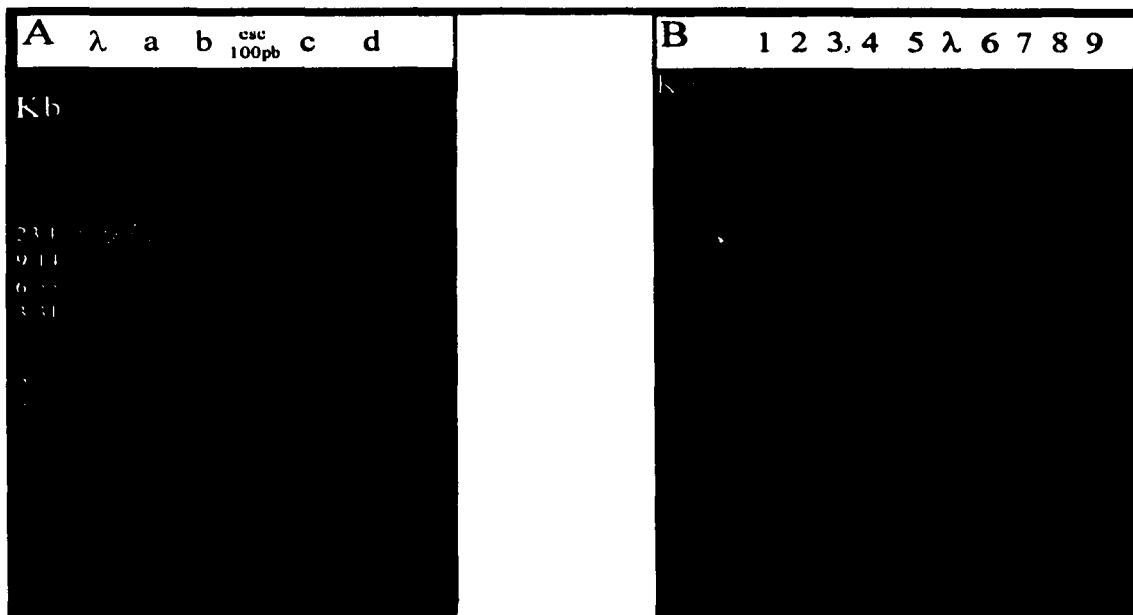


Figura 22. Análisis de restricción del vector de pGFP-MRCy. λ (fragmentos λ /HindIII), 100pb (escala 100pb). Izquierda, "a" (digestión con *XhoI*), "b" (digestión con *NcoI-SpeI*), "c" (digestión con *Bg/II*), "d" (vector sin digerir). Derecha, 1 (digestión *NcoI-EcoRI*), 2 (digestión *NcoI-Bg/II*), 3 (digestión *NcoI-SacI*), 4 (digestión *SacI-SmaI*), 5 (digestión *SacI-KpnI*), 6 (digestión *SacI*), 7 (digestión *SmaI*), 8 (digestión *KpnI*) y 9 (control sin digerir).

En la tabla 15 se muestra un resumen de las digestiones con una sola enzima que se le practicaron al vector de pGFP-MRCy. En la figura 25 carril C, se puede ver como con la digestión *BamHI* se obtiene una banda a 750pb, con lo

cual se demuestra la existencia de estos dos sitios, como se muestra en el vector de pGFP-MRCy (fig.20).

Tabla 15. Resumen del análisis de restricción con una sola enzima que se le practicó al vector de pGFP-MRCy.

Enzima	Patrón de digestión (aproximado)
<i>NcoI</i>	lineariza
<i>EcoRI</i>	lineariza
<i>XhoI</i>	∠
<i>BglII</i>	lineariza
<i>SacI</i>	lineariza
<i>SmaI</i>	∠
<i>KpnI</i>	∠
<i>DraI</i>	3 bandas (5.5, 1.8 y 0.7 Kb)
<i>BsmI</i>	∠
<i>PvuII</i>	2 bandas (5.5 y 2.5 Kb)
<i>BamHI</i>	2 bandas (7.2 y 0.75 Kb)
<i>XbaI</i>	Lineariza
<i>MluI</i>	∠
<i>Clal</i>	2 bandas (4.2 y 3.8 Kb)
<i>SalI</i>	∠
<i>SpeI</i>	∠

5.1.3 Secuenciación de la región comprendida entre el promGPD y la sGFP.

Al existir duda acerca en la secuencia comprendida entre el promGPD y sGFP, se secuenció esta región (figura 23). Se puede observar la existencia de los sitios de restricción *BamHI* (su isoesquisómero *BstI*) y *NcoI*, los cuales se encuentran separados por una base. En la tabla 16, se muestra un resumen del análisis de restricción que se le practicó a esta secuencia por medio del programa DNAMAN1.

1
 CCG CTT TTT AAG CTG GCA TCC AGA AAA AAA AAG AAT CCC AGC ACC **AAA ATA TTG** TTT TCT
 61
 TCA CCA ACC ATC AGT TCA TAG GTC CAT TCT CTT AGC GCA ACT ACA GAG AAC AGG GGC ACA
 121
 AAC AGG CAA AAA ACG GGC ACA ACC TCA ATG GAG TCA TGC AAC CTG CCT GGA GTA AAT GAT

181
MunI
 GAC ACA AGG **CAA TTG** ACC CAC GCA TGT ATC TAT CTC ATT TTC TTA CAC CTT CTA TTA CCT
 241
 TCT GCT CTC TCT GAT TTG GAA AAA GCT GAA AAA AAA GGT TGA AAC CAG TTC CCT GAA ATT
 301
 ATT CCC CTA CTT GAC TAA TAA GTA TAT AAA GAC GTG AGG TAT TGA TTG TAA TTC TGT AAA

361
DraI
 TCT ATT TCT TAA ACT TCT TAA ATT CTA CTT TTA TAG TTA TGC TTT TTT TTA **GTI TTA AAA**

421
BamHI
BstI **NcoI**
 CAC CAA GAA CTT AGT TTC GAC **GGA TCC** **CCC ATG** GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC
 481
 GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC

Figura 23. Resultado de la secuenciación de la región comprendida entre el promGPD y sGFP. Se señalan los sitios de restricción comprendidos en esta región. Dentro del sitio de restricción *NcoI*, se puede observar el codón de inicio de la GFP.

Tabla 16. Análisis de restricción en DNAMAN1.

Enzima	No de cortes	sitio	corte
<i>BamHI</i>	1	442	G⊕GATCC
<i>BstI</i>	1	442	G⊕GATCC
<i>DraI</i>	1	414	TTT⊕AAA
<i>MunI</i>	1	190	C⊕AATTG
<i>NcoI</i>	1	449	C⊕CATGG
<i>SspI</i>	1	48	AAT⊕ATT
Enzimas que no cortan	<i>ApaI</i> <i>BcmI</i> <i>BglII</i> <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i> <i>HindIII</i>	<i>KpnI</i> <i>MluI</i> <i>PstI</i> <i>SacI</i> <i>SalI</i> <i>SmaI</i>	

5.1.4 Conclusión en la caracterización del vector de pGFP-MRCy.

- La secuencia perteneciente al promotor de la gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa de *S. cerevisiae* (<http://genome-www2.stanford.edu/>), alinea

con la secuencia (región 5') mostrada en la figura 23, de lo anterior se reconfirma que; el vector de pGFP-MRCy, contiene el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa de *S. cerevisiae*.

- La secuencia perteneciente a la mutante S65T (fig. 8), alinea en su extremo 5', con la secuencia mostrada (región 3') en la figura 23, de lo anterior se concluye que; el vector de pGFP-MRCy contiene la secuencia de la mutante S65T de la GFP.
- En las transformaciones de *E. coli* (DH10B, TB1 y DH5 α), se utilizó como medio de selección LB+carbenicilina, de aquí se puede concluir que; el vector de pGFP-MRCy tiene la caja de resistencia para ampicilina.
- Para que el vector con que se transformó se duplique, se necesita de un origen de replicación, en base a lo anterior y al análisis bibliográfico, se puede concluir que el vector de pGFP-MRCy es portador del origen de replicación 2 μ para levadura.
- Al realizar las transformaciones con las diferentes construcciones que portan el vector de pGFP-MRCy en cepas con un genotipo leu2⁻, se observó que la auxotrofia para leucina se está complementando (cap. 5.4), de lo anterior se concluye; el vector de pGFP-MRCy es portador del gen de LEU2.
- Finalmente, el estudio con enzimas de restricción muestra que el vector de pGFP-MRCy, posee los sitios de restricción indicados en la figura 24.

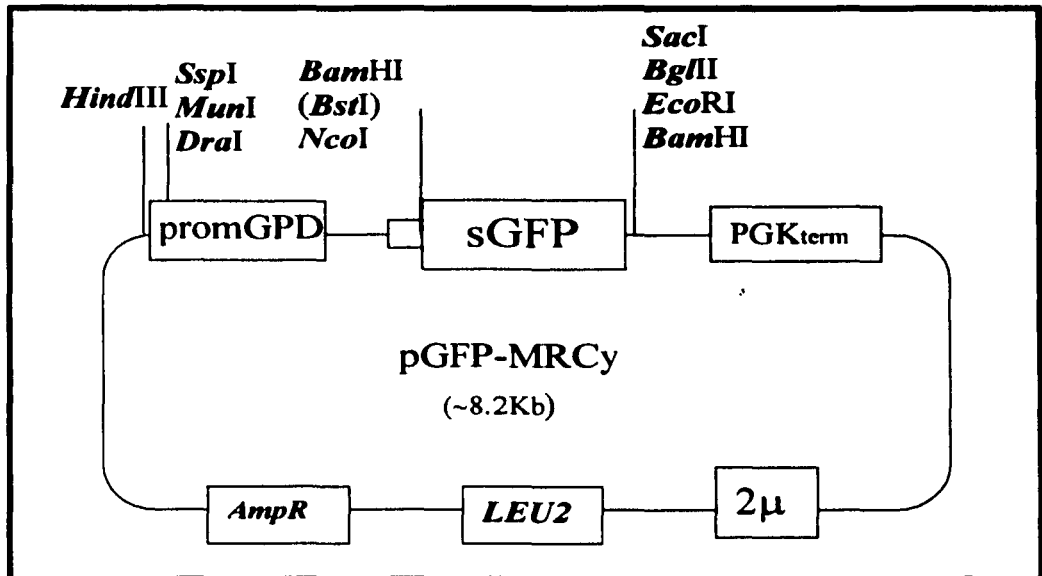


Figura 24. Vector conclusión.

Al encontrar que el número de sitios de restricción disponibles en este vector para introducir cualquier secuencia de DNA era reducido, se decidió construir los vectores pGFP-MRCy-M1 (para las construcciones con la GFP clonada en el extremo amino), GFP-MRCy-SK1 y GFP-MRCy-SK2 (para las construcciones con la GFP clonada en el extremo carboxilo).

5.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES.

La síntesis de todas las proteínas inicia con los ribosomas que se encuentran libres en el citosol. En la ausencia de alguna señal particular de localización, las proteínas serán liberadas en el citosol cuando la síntesis sea terminada. La señal mas común de localización la encontramos en el extremo N-

terminal, esta señal no es parte de la proteína madura. En el extremo C-carboxilo también tenemos señales de localización (Lewin B, 2000). Dado lo anterior es importante realizar la construcción con la GFP fusionada en el extremo amino de la proteína de interés y la construcción con la GFP fusionada en el extremo carboxilo. A continuación se muestran la metodología que se llevo a cabo para fusionar la GFP en el extremo amino de la GDH1, GDH3 y GOGAT.

5.2.1 Fusión de *GDH1* a la GFP (vector pGFP-MRCy-H1).

En la figura 25, se puede ver el mapa del vector de pGFP-MRCy-H1 y la comprobación de su correcta construcción, en el carril A se observa que la digestión con *Bam*HI, produce un fragmento de 2.1 Kb aprox. pertenecientes al fragmento sGFP-*GDH1*. En el carril B, la digestión *Sac*I-*Eco*RI produce una banda de 1.36 Kb pertenecientes al gen de *GDH1*, también se puede ver la presencia de otras 2 bandas, mismas que se ven en el control que se muestra en el carril D, estas bandas podrían ser producto de una digestión parcial o por la actividad estrella de alguna de las dos enzimas utilizadas. En el carril C, se presenta la digestión con *Bam*HI del vector de pGFP-MRCy (control), que muestra un fragmento de 750 pb perteneciente solamente al fragmento de sGFP. En el carril E, la digestión *Sac*I-*Eco*RI del vector de pGFP-MRCy no muestra la banda de 1.36 Kb perteneciente al gen de *GDH1* (control).

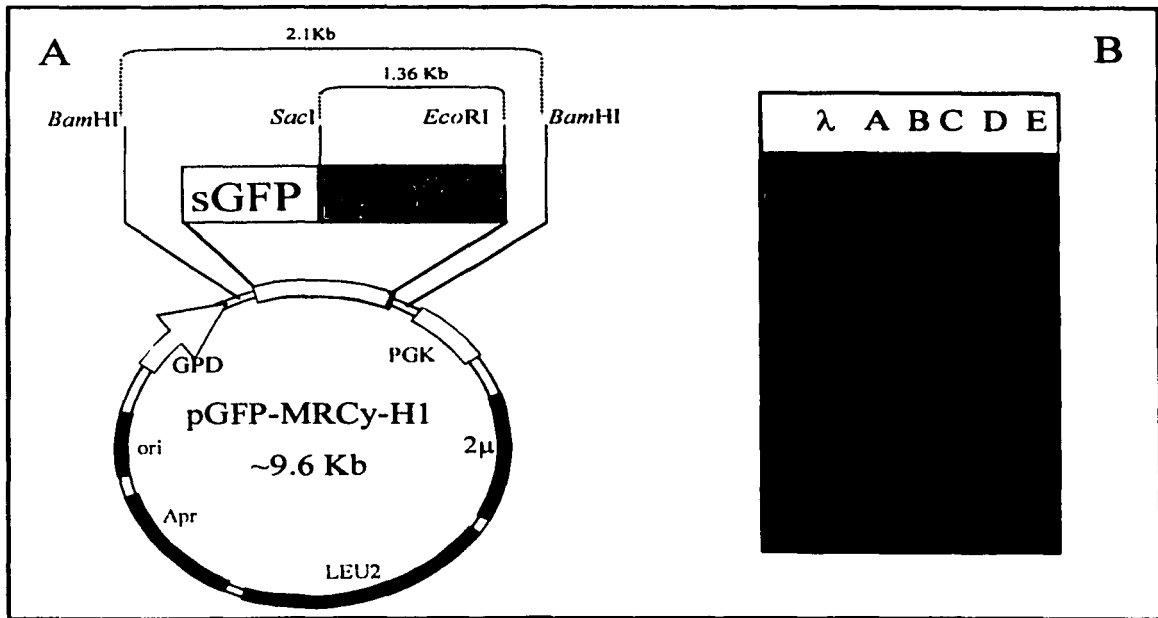


Figura 25. Vector de pGFP-MRCy-H1. Izquierda, se muestra el sitio donde fué clonado el gen de *GDH1* en los sitios *SacI*-*EcoRI* del vector de pGFP-MRCy. Derecha, se muestra un gel de agarosa al 1% con las diferentes digestiones por las cuales se comprobó la correcta construcción de este vector. Carril A, digestión con *Bam*HI. Carril B, digestión *SacI*-*EcoRI*. Carril C, digestión con *Bam*HI del vector de pGFP-MRCy (control). Carril D, digestión *SacI*-*EcoRI* del vector de pGFP-MRCy (control). Carril E vector pGFP-MRCy sin digerir.

5.2.2 Fusión de *GDH3* a la GFP (vector pGFP-MRCy-H3).

En la figura 26 se puede ver el mapa del vector de pGFP-MRCy-H3. Del lado derecho en el carril 1, se observa que la digestión con *Bam*HI, se obtiene un fragmento de 2.1 Kb aproximadamente pertenecientes al fragmento sGFP-*GDH3*. En el carril 2 la digestión *SacI* lineariza el vector. En el carril 3, se puede ver como la banda de 2.1 Kb que se muestra en el carril 1 perteneciente a la digestión

*Bam*HI, es dividida por el sitio de restricción *Sac*I que se muestra en el mapa del lado izquierdo.

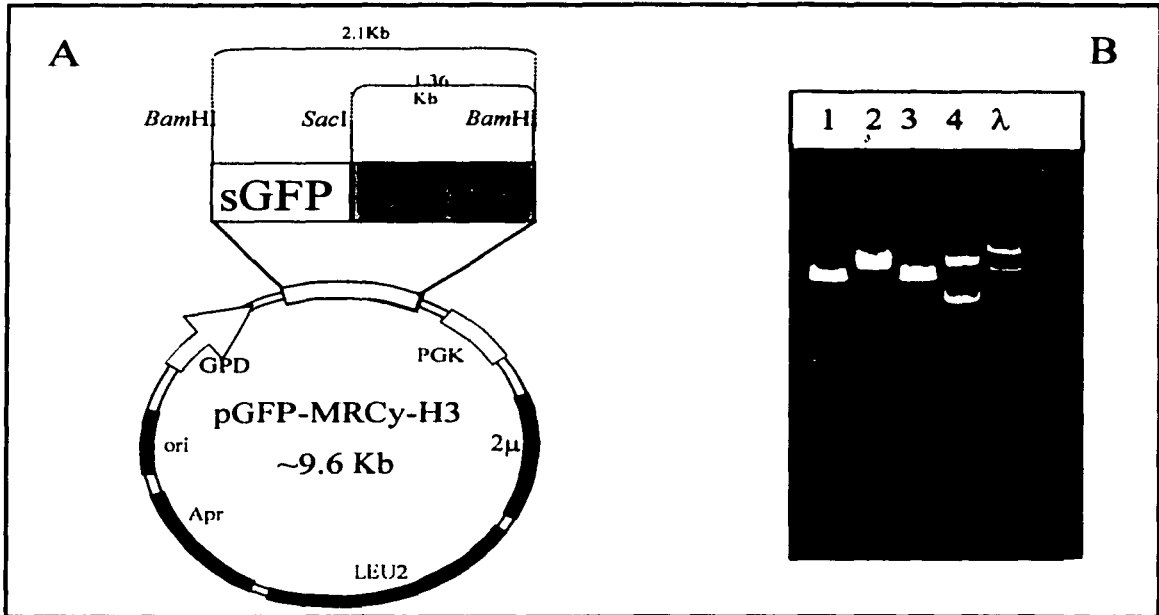


Figura 26. Vector de pGFP-MRCy-H3. Izquierda, se muestra el sitio donde fue ligado el gen de *GDH3* en los sitios *Sac*I-*Bam*HI del vector de pGFP-MRCy. Derecha, se muestra un gel de agarosa al 1% con las diferentes digestiones por las cuales se comprobó la correcta construcción de este vector. Carril 1, digestión con *Bam*HI. Carril 2, digestión *Sac*I. Carril 3, digestión con *Sac*I-*Bam*HI. Carril 4, control sin digerir.

5.2.3 Fusión de un sitio de clonación múltiple al vector pGFP-MRCy.

Al vector de pGFP-MRCy, se le agregó un sitio de clonación múltiple (materiales y métodos), con la finalidad incrementar el número de sitios posibles para la clonación de las proteínas, en el lado amino de la GFP.

En la figura 27, se puede observar en el panel A el mapa del vector pGFP-MRCy-M1, en el panel B se muestra por una digestión *NcoI-XhoI* (tres carriles de la derecha), la obtención de una banda de 750 pb aprox. perteneciente al fragmento de sGFP. Cabe mencionar que el sitio *XhoI* se encuentra dentro del MCS.

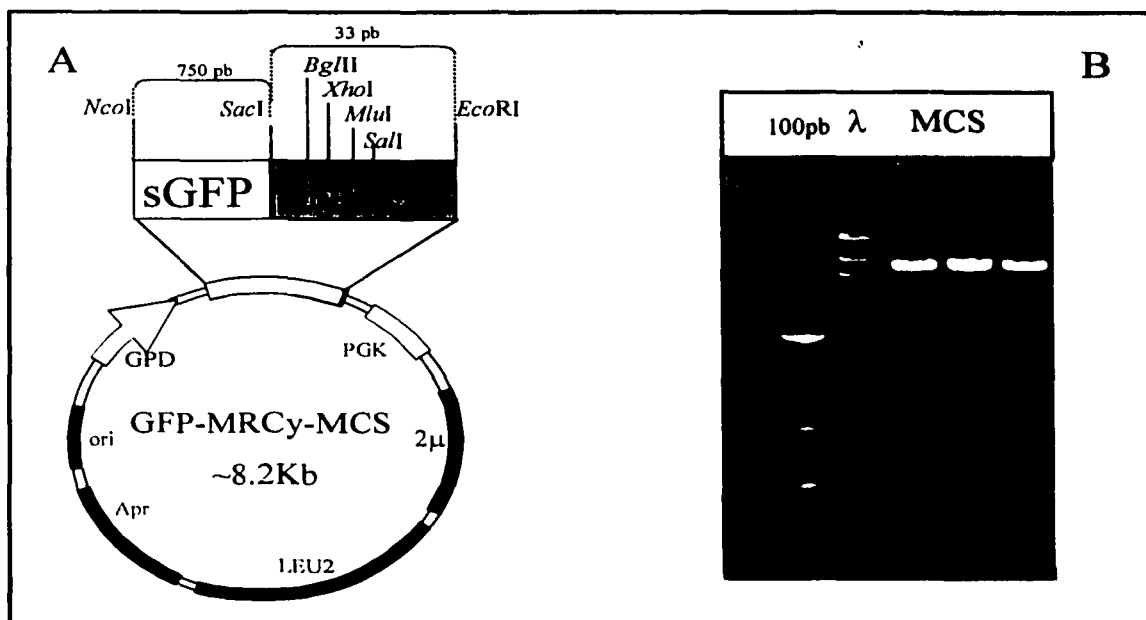


Figura 27. Vector de GFP-MRCy-MCS. A, se muestra el sitio donde fue ligado el sitio de clonación múltiple y el mapa de restricción de la zona sGFP-MCS. B, se muestra un gel de agarosa al 1% con la digestión *NcoI-XhoI* del vector de GFP-MRCy-MCS (tres carriles de la derecha). Carril 1 escalera 100pb. Carril 2 marcador de peso molecular λ *HindIII*.

5.2.4 Fusión de *GLT1* a pGAL (vector pGAL01).

Como ya se explicó, la amplificación por PCR de un gen tan grande como el de *GLT1* (6.438 Kb), puede provocar uno o más errores en la secuencia del gen, este error podría resultar en la pérdida de función de la GOGAT, por otro lado, en estudios previos (no publicados) con la GOGAT, se tiene el antecedente de que la

clonación del gen de *GLT1*, necesita concentraciones altas del inserto. Por lo anterior se decidió clonar este gen en un principio en el vector de pGAL, con el cual pudiéramos complementar una $\Delta glt1$ y asegurarnos de que el gen fuera funcional. Los sitios de restricción con que se clonó *GLT1* en pGAL, nos servirían para clonarlo posteriormente en pGFP-MRCy. De esta forma nos aseguramos de que el producto de amplificación fuera funcionalmente activo y al mismo tiempo se estaba aumentando la concentración y pureza de nuestro inserto para la ligación en pGFP-MRCy-M1.

Dado que clonamos el gen en los sitios *Bam*HI / *Bam*HI, fué necesario seleccionar la colonia que presentara la orientación correcta del gen de *GLT1*. En la figura 28 se puede observar, en el panel A, el mapa del vector pGAL+*GLT1*, panel B, se muestra el análisis de digestión con la enzima de restricción *Eco*RI en los carriles 1, 1', 3 y 3' encontramos el patrón de digestión esperado, con bandas a 9.692, 4.255, 0.605 y 0.328 Kb. Por el contrario en los carriles 2 y 2' se puede observar una banda extra a 1.255 Kb, este último patrón se obtiene de la orientación incorrecta del gen de *GLT1* en el vector de pGAL.

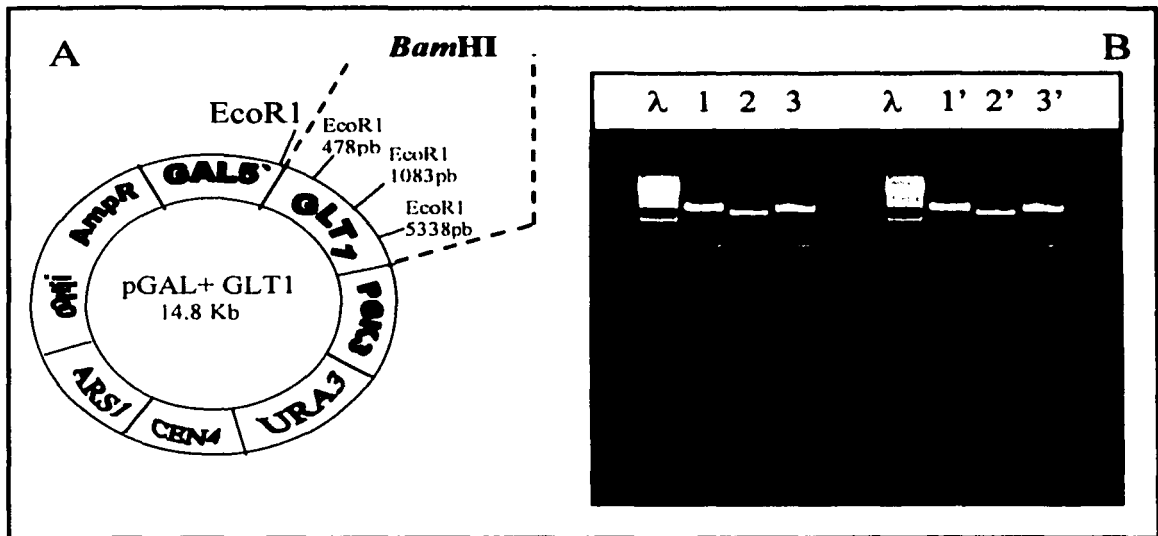


Figura 28. Vector de pGAL-GLT1. A, se muestran los sitios *Bam*HI/*Bam*HI donde fue insertado *GLT1*. Los sitios *Eco*RI representan los cortes esperados en el análisis de restricción del vector. B, se muestra un gel de agarosa al 1% con la digestión *Eco*RI del vector de pGAL+*GLT1*. Carril 1 y 3 muestran la orientación correcta del inserto de *GLT1* (perteneciente al mapa de la izquierda). Carril 2, muestran la orientación inversa del inserto. En números primos se muestra el mismo gel pero modificado con PhotoShop para resaltar la bandas menores a las 1000pb. Marcador de peso molecular λ HindIII.

Se seleccionó la construcción obtenida de la colonia 1 para transformar levadura y ver si el gen de *GLT1* era funcional. En la tabla 17, se muestran las actividades de GOGAT obtenidas con esta construcción. Se puede ver que la actividad para GOGAT se está complementando (fila 2, CLA04GAL), lo que nos dice que nuestra proteína es funcional. En la última fila se puede ver que la actividad específica de GOGAT para la cepa sin complementar (CLA04) en cero.

Tabla 17. Actividad específica de GOGAT del vector pGAL01 en la cepa CLA04.

cepa	ensayo 1	ensayo 2	ensayo 3
CLA04GAL	0.1	0.1	0.09
CLA04	0.0	0.0	---

5.2.5 Fusión de *GLT1* a la GFP (vector pGFP-MRCy-T1).

Una vez obtenido el vector de pGAL01 y después de haber comprobado que la proteína codificante era funcional, se construyó el vector de pGFP-MRCy-T1, el inserto se obtuvo del vector de pGAL01, por una digestión *Bam*HI / *Bam*HI. En la figura 29, se puede ver el mapa del vector de GFP-MRCy-T1 y su correspondiente comprobación. En el carril A se observa la digestión con *Bam*HI, con la cual se obtiene 4 fragmentos de 8.420, 4.255, 1.420 y 0.605 Kb. En el carril B, la digestión con *Xba*I, se esperaba obtener 4 fragmentos de 2.418 Kb, 1.119 Kb y dos de los cuales no se conocía el tamaño, lo anterior debido a que no se conoce la posición exacta de corte de *Xba*I en el vector de pGFP-MRCy-M1, pero solo se observaron 3 fragmentos de 10 Kb (aprox), 3.5 Kb (aprox.) y 1.119 Kb. La explicación se podría encontrar en la pérdida del sitio de restricción localizado en 2916 pb del gen de *GLT1*, si lo anterior fuera cierto, nos daría un fragmento de 3.537 Kb (de 498 pb a 4035 pb, fig. 30), que parece ser lo observado. En el carril C se muestra como control la digestión del vector de pGFP-MRCy-M1 con la enzima de restricción *Xba*I, en esta digestión se puede confirmar la existencia del sitio de restricción en el vector.

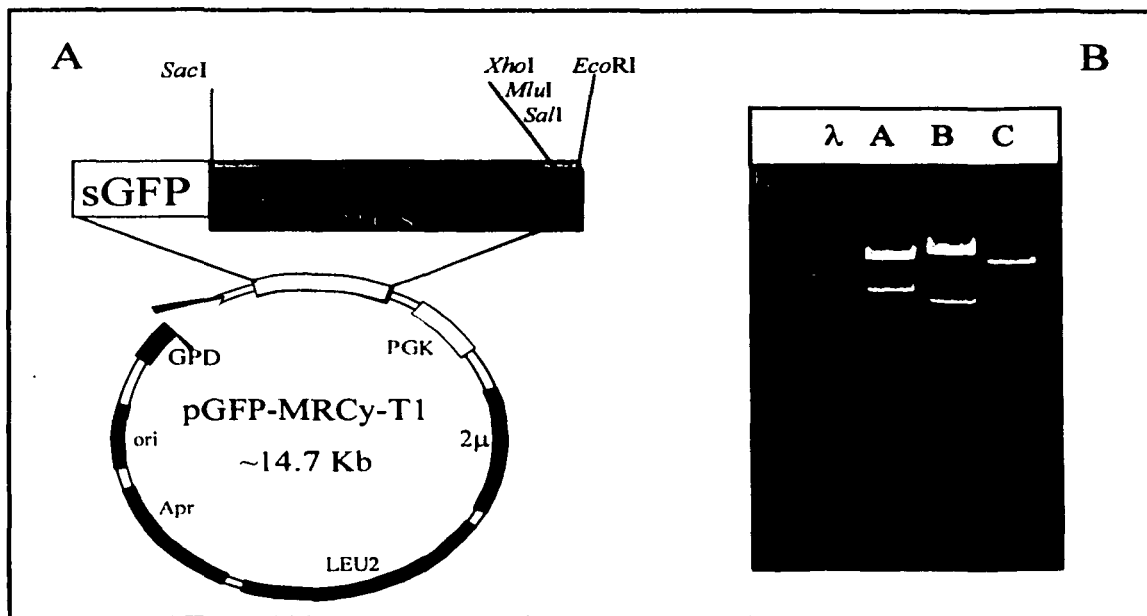


Figura 29. Vector de GFP-MRCy-T1. A, se muestra el MCS del vector pGFP-MRCy-M1, donde fue insertado el gen de *GLT1*, en un sitio *Bgl*I que fue destruido al ligarse el inserto con extremos *Bam*HI. B, se muestra un gel de agarosa al 1% las diferentes digestiones por las cuales se comprobó la correcta construcción de este vector. Carril A, digestión con *Eco*RI. Carril B, digestión *Xba*I. Carril C, vector pGFP-MRCy-M1 digerido con *Xba*I (control).

En la figura 30, se observa un diagrama que representa los diferentes patrones de digestión esperados y los obtenidos. Como se puede ver en el panel A, el gen de *GLT1* cuenta con 3 sitios de restricción *Eco*RI y el vector de pGFP-MRCy-M1 cuenta con un sitio *Eco*RI en el costado 3' del sitio de clonación de *GLT1*. En el panel B, se muestra la pérdida del sitio de restricción *Xba*I a 2916 pb.

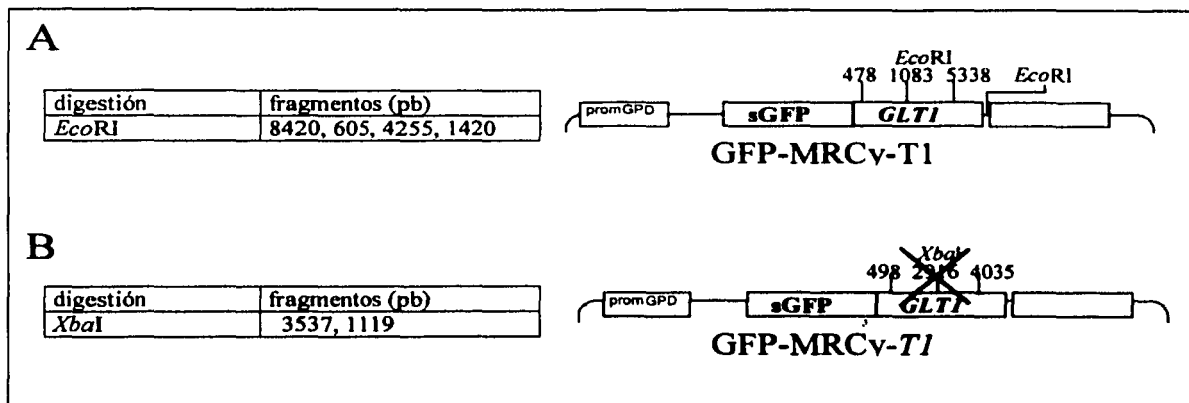


Figura 30. Esquema con los sitios de restricción del vector de pGFP-MRCy-T1 observados en la figura 29. Se muestran dos tablas con lo tamaños aproximados de las bandas observadas por las restricciones que se muestran en la derecha. A, *EcoRI* B, *XbaI*.

5.2.6 Fusión del sitio SK al vector pGFP-MRCy (vector pGFP-MRCy-SK1).

Al vector de pGFP-MRCY se le agregó la región comprendida entre los sitios *SacI-EcoRI* del sitio de clonación múltiple del vector pBluescriptII SK, con la finalidad de eliminar el sitio de restricción *BglII* localizado río abajo de la secuencia sGFP y de esta forma poder construir el vector de pGFP-MRCy-SK2 el cual portara un sitio *BglII* río arriba de la secuencia sGFP, este vector, permitirá en un futuro realizar las construcciones del lado carboxilo.

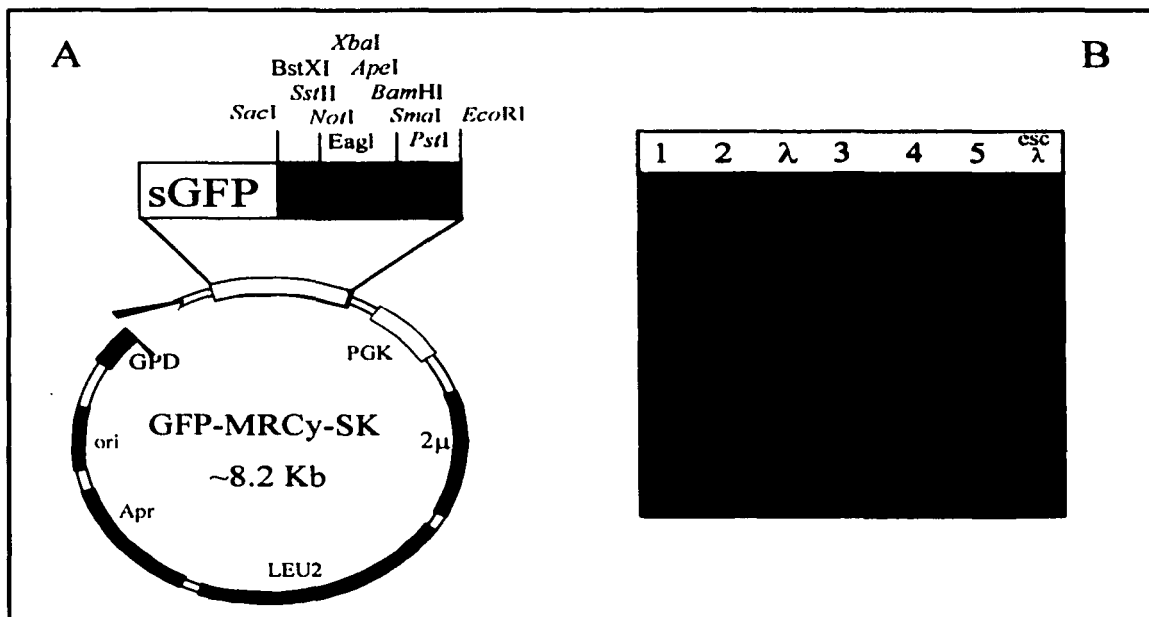


Figura 31. Vector de GFP-MRCy-SK. A, se muestra el lugar donde fué clonado el sitio de clonación múltiple SK y el mapa de restricción de la zona. B, se muestra un gel de agarosa al 1% con las diferentes digestiones por las cuales fue comprobada la correcta construcción del vector. Carriles 1-3 digestión *Bgl*II. Carriles 4-6 digestión *Sma*I.

En la figura 31 se muestra el mapa de restricción del vector de pGFP-MRCy-SK1, en el panel B, se puede observar en los carriles 1-3 la pérdida del sitio de restricción *Bgl*II. En los carriles 4-6 se puede observar la linealización del vector con la enzima *Sma*I, la cual corta en la región agregada del sitio de clonación múltiple SK. Una vez eliminado el sitio de restricción *Bgl*II, se procedió a la construcción del vector de pGFP-MRCy-SK2.

5.2.7 Construcción del vector pGFP-MRCy-SK2.

Al vector de pGFP-MRCy-SK1, se le agregó un sitio de restricción *Bgl*II en la región comprendida entre el promGPD y la secuencia sGFP, con la finalidad de facilitar las construcciones del lado carboxilo que se podrían realizar en un futuro.

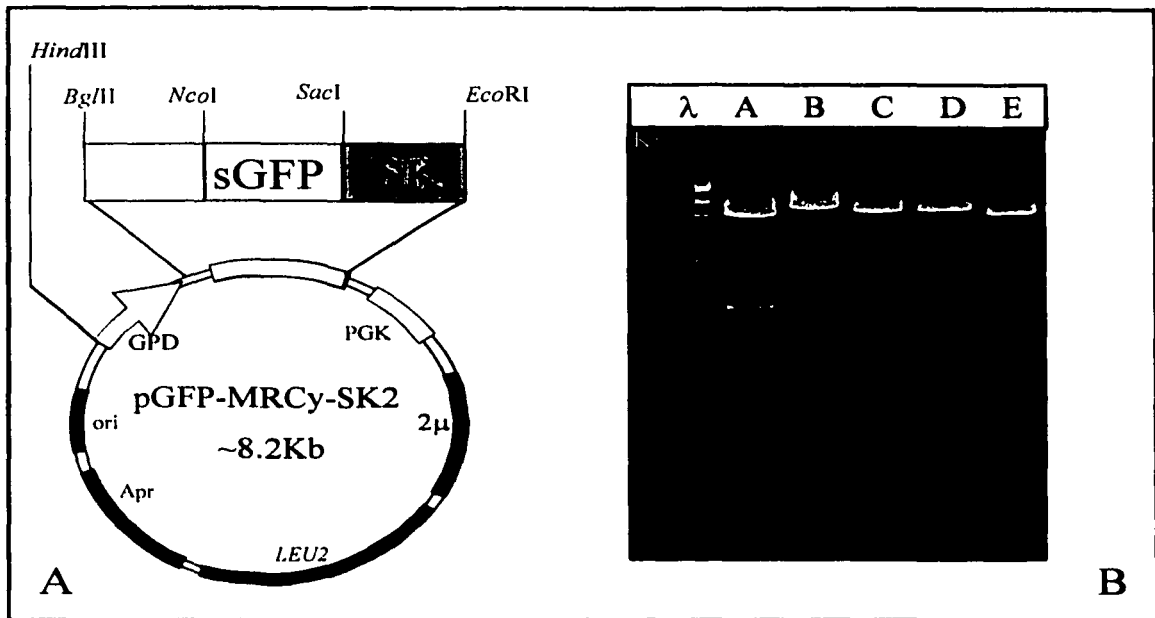


Figura 32. Vector de GFP-MRCy-SK2. A, se muestra la región que comprende el sitio de restricción agregado en el vector pGFP-MRCy-SK2. B, se muestra un gel de agarosa al 1% con las diferentes digestiones con las que se comprobó la correcta construcción del vector. Carril A, digestión *Bgl*II-*Hind*III del vector de pGFP-MRCy (control). Carril B, digestión *Bgl*II-*Hind*III del vector de pGFP-MRCy-SK1 (control). Carril C, digestión *Bgl*II-*Hind*III del vector de pGFP-MRCy-SK2. Carril D, digestión *Bgl*II-*Eco*RI del vector de pGFP-MRCy-SK2. Carril E, digestión *Eco*RI-*Hind*III del vector de pGFP-MRCy-SK2.

En la figura 32, se puede observar en el panel A, el mapa de restricción del vector de pGFP-MRCy-SK2, en el panel B se muestra con diferentes digestiones, la correcta construcción de este vector. En el carril A se puede observar que con la

digestión *Bgl*II-*Hind*III del vector de pGFP-MRCy, obtenemos un fragmento de 1.4 Kb (aprox.), que comprende el promGPD y la secuencia sGFP. En el carril B se puede observar la misma digestión que en A, pero en el vector de pGFP-MRCy-SK1, al haber eliminado el sitio de restricción *Bgl*II, ahora solo lineariza. En el carril C, se muestra nuevamente la misma digestión que en A y B pero ahora en el vector de pGFP-MRCy-SK2, al haber insertado un sitio de restricción *Bgl*II en la región que se encuentra entre el promGPD y sGFP, se observa una banda de 650 pb perteneciente al promGPD. En el carril D, por una digestión *Bgl*II-*Eco*RI se obtiene la región de sGFP y en el carril E por la digestión *Eco*RI-*Hind*III, se observó un fragmento de 1.4 Kb aproximadamente, que incluye el promGPD-sGFP-SK.

5.3 TRANSFORMACIÓN LEVADURA.

Con las construcciones antes descritas, se transformó levadura. La transformación de levadura nos permitirá visualizar *in-vivo*, la localización subcelular de las enzimas deseadas. En el primer renglón de la tabla 18, se muestran las construcciones con la proteína verde del lado amino, el vector de la GFP-MRCy y dos controles que se utilizaron para transformar las tres cepas de levadura que se muestran en la columna de la izquierda. En esta tabla, se puede ver por el número de colonias obtenidas que la eficiencia de transformación es baja, pero suficiente para tener material para examinar al microscopio.

Tabla 18. Transformaciones de levadura. Con números se muestra el número de colonias positivas obtenidas. Con una cruz (∠) se muestran las combinatorias que no dieron colonias y con una palomita (✓) las combinatorias que dieron mas de 100 colonias.

Construcciones	GFP-MRCy- GDH1a	GFP-MRCy- GDH3a	GFP-MRCy- GLT1a	GFP- MRCy	sin ADN sin acarreador	en MMLeu
Cepas						
CLA3	15, 12	2, 3	2	3, 3	∠	✓
CLA04			1, 2	14, 11	∠	✓
CLA05	6, 8	3, 8		9, 8	∠	✓

Una vez obtenidas las transformaciones de levadura, es necesario medir la actividad de GDH y GOGAT (según el caso), para comprobar la obtención de productos funcionales.

5.4 Actividades de GDH Y GOGAT.

En la tabla 19 se muestran las actividades para GDH y GOGAT que fueron determinadas para cada una de las transformantes de levadura que a continuación se mencionan. Este ensayo enzimático se realizó con el fin de determinar si las construcciones con que se transformó levadura, generan productos funcionales.

En la primera fila (misma tabla) se puede ver la actividad de GDH y GOGAT, así como el tiempo de duplicación de la cepa CLA3 (*leu2*), ésta fue transformada con el vector de pGFP-MRCy, así como con las construcciones que incluyen los genes de *GDH1*, *GDH3* y *GLT1* (carriles 3-5, respectivamente). Las transformantes se crecieron en MM. Podemos concluir que la auxotrofia para

leucina se está complementando; se puede observar que la utilización de las quimeras de GFP, aparentemente no está causando un efecto tóxico (carriles 1-5). Una vez confirmado lo anterior, se procedió a transformar las cepas que presentaban la interrupción de los genes de interés por estudiar.

Tabla 19. Actividad específica (AE) de GDH y GOGAT. En la segunda columna se muestran las cepas a las que se les determinó la AE de GDH y GOGAT (columnas 3 y 4, respectivamente) En la columna de la derecha se muestran los tiempos de duplicación.

	Cepas	AE GDH	AE GOGAT	tiempo de duplicación.
1	CLA3	1.641	0.047	2.54 h
2	CLA3GFP	1.895	0.062	2.15 h
3	CLA3H1	1.945	0.0515	1.93 h
4	CLA3H3	1.897	0.0568	2.67 h
5	CLA3T1	1.462	0.0693	2.96 h
7	CLA3GFP	2.035	0.0533	2.67 h
8	CLA04	1.61	0.00	2.78 h
9	CLA04T1	1.47	0.0418	4.05 h
10	CLA04GFP	1.56	00	3.33 h
11	CLA05	00	0.047	3.95 h
12	CLA05GFP	00	0.051	3.57 h
13	CLA05H1	0.49	0.064	2.97 h
14	CLA05H3	0.46	ND	3.09 h

En el renglón 8 (tabla 19) se puede ver la actividad de GDH y GOGAT, así como el tiempo de duplicación de la cepa CLA04, ésta presenta auxotrofia para leucina y un genotipo $\Delta glt1$. Como era de esperarse no presenta actividad para GOGAT. En los renglones 9 y 10 se muestran los productos de transformación de CLA04 con la construcción que incluye el gen de *GLT1* y el vector pGFP-MRCy, respectivamente. Como era de esperarse CLA04GFP no presenta actividad para GOGAT. La cepa CLA04T1 muestra actividad para GOGAT, lo anterior significa que el producto del vector pGTF-MRCy-T1, el cual codifica para la quimera GFP-

GOGAT, con la proteína verde fusionada en su extremo amino terminal, es funcional. El fenotipo de las cepas CLA04T1 y CLA04GFP con respecto a CLA04, se puede deber a que la cepa CLA04 es auxótrofa para leucina, por lo anterior se crece en MM complementado con dicho aminoácido, por el otro lado las cepas CLA04T1 y CLA04GFP, las cuales se crecen en un medio MM, deben producir su propia leucina.

En el renglón 11 misma tabla, se puede ver la actividad de GDH y GOGAT, así como el tiempo de duplicación de la cepa CLA05, ésta presenta auxotrofia para leucina y un genotipo $\Delta gdh1\Delta gdh3$. Como era de esperarse, no presenta actividad para GDH, presenta un tiempo de duplicación mayor con respecto a CLA3, lo anterior puede deberse a la interrupción de la vía de las GDH's, en especial a la interrupción del gen de *GDH1*, la cual ya se había mencionado presenta fenotipo. En el renglón 12, se puede ver el producto de transformación de la cepa CLA05 con el vector pGFP-MRCy, en este caso no se está complementando actividad para GDH, el tiempo de duplicación no varía mucho con respecto a CLA05. En los renglones 13 y 14 se está complementando actividad para GDH al transformar la cepa CLA05 con las construcciones que incluyen al gen de *GDH1* y *GDH3*, respectivamente. Se puede observar una recuperación del fenotipo con respecto a CLA3, esta recuperación era de esperarse en la cepa CLA05H1, en la cepa CLA05H3 la explicación a la recuperación en el fenotipo puede encontrarse en el cambio de promotor, hay que recordar que en estas dos construcciones las dos enzimas tienen el promotor de la

gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa, el cual es un promotor fuerte y la sobre expresión de las enzimas podría estar ayudando a la recuperación del fenotipo.

5.5. Observaciones al microscopio.

Con el objetivo de confirmar que las diferentes construcciones presentaran fluorescencia y tratando de hacer una primera aproximación en la determinación de la localización subcelular de las enzimas *GDH1*, *GDH3* y *GLT1*, las cepas CLA04T1, CLA05H1 y CLA05H3 se observaron al microscopio confocal y óptico.

En los tres casos se observa fluorescencia (fig. 33-35), las tres proteínas parecen tener una localización citosólica, sin embargo, es importante recordar que este trabajo no puede dar resultados concluyentes sobre la localización subcelular de las enzimas, para poder concluir con respecto a la localización, hacen falta las construcciones con la proteína verde fusionada al extremo carboxilo.

En la figura 33, podemos ver tres imágenes de la cepa CLA05H1, del lado izquierdo se muestra una imagen del campo visible de las células observadas, en las siguientes dos imágenes se muestran dos planos distintos del mismo campo irradiados con el láser de luz azul (longitud de onda 480-560 nm). En estos dos se puede observar que la proteína verde parece localizarse en el citosol.

CLA05H1



Figura 33. Imágenes al microscopio confocal de la cepa CLA05H1, obtenida por la transformación de la cepa CLA05 con el vector pGFP-MRCy-H1, el cual porta la secuencia que codifica para el gen de *GDH1* con la GFP fusionada en el extremo amino terminal.

CLA05H3



Figura 34. Imágenes al microscopio óptico de la cepa CLA05H3, obtenida por la transformación de la cepa CLA05 con el vector pGFP-MRCy-H3, el cual porta la secuencia que codifica para el gen de *GDH3* con la GFP fusionada en el extremo amino terminal.

En la figura 34 podemos ver dos imágenes de la cepa CLA05H3, del lado izquierdo se muestra una imagen del campo visible de las células observadas, del lado derecho se ve el mismo campo irradiado con el láser de luz azul (longitud de onda 480-560 nm). En esta imagen, la proteína verde parece localizarse en el citosol.

En la figura 35 podemos ver cuatro imágenes de la cepa CLA05T1, del lado izquierdo se muestra una imagen del campo visible de las células observadas, en las siguientes tres imágenes se muestran planos distintos del mismo campo irradiados con el láser de luz azul (longitud de onda 480-560 nm). En estos se puede observar que la proteína verde parece estar localizada en el citosol.

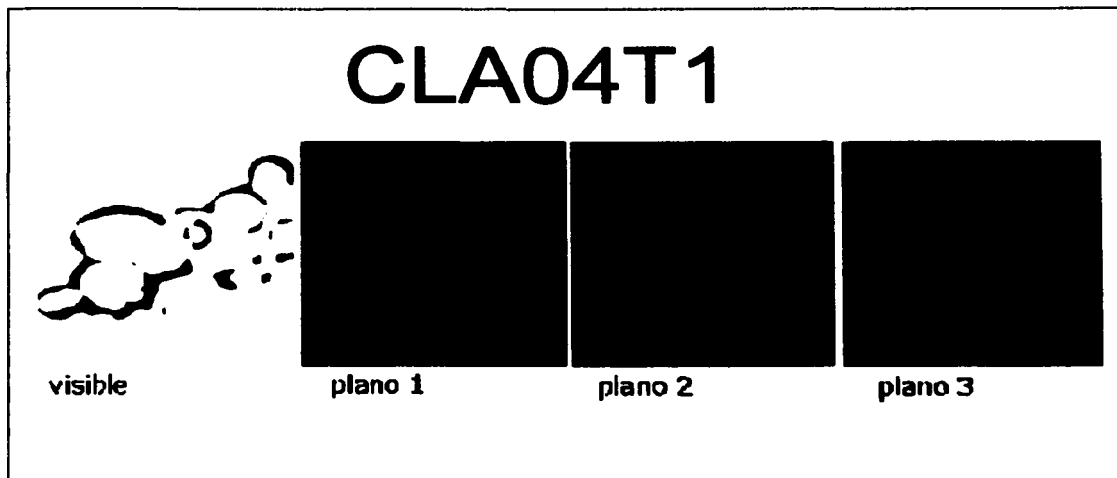


Figura 35. Imágenes al microscopio confocal de la cepa CLA04T1, obtenida por la transformación de la cepa CLA04 con el vector pGFP-MRCy-T1, el cual porta la secuencia que codifica para el gen de *GLT1* con la GFP fusionada en el extremo amino terminal.

6. CONSIDERACIONES FINALES.

En 1997 se reporta en *S.cerevisiae* la existencia de tres enzimas (*GDH1*, *GDH3* y *GLT1*) que realizan la biosíntesis del mismo aminoácido (glutamato), realizando (al parecer) las dos GDH's la misma función (Avendaño y cols, 1997); este parece ser un caso de redundancia genética tal como lo definen Howak y cols, la redundancia genética es un proceso en el que dos o más genes realizan la misma función, y donde la inactivación de uno de esos genes tiene un efecto nulo o casi nulo sobre el fenotipo silvestre del organismo. La ausencia de *GDH3* o *GLT1* por sí solos no causa auxotrofia por glutamato, siendo la mutante en *GDH1* la única que presenta fenotipo, pareciendo *GDH3* ser redundante a *GDH1*. Este antecedente trajo como consecuencia la necesidad por conocer la localización subcelular de las proteínas implicadas en la biosíntesis de glutamato. Una localización subcelular diferencial podría dar una explicación citológica a la redundancia genética encontrada en *S. cerevisiae*, de aquí surge la necesidad por implementar en el laboratorio, una metodología que permita utilizar a la proteína verde fluorescente para la localización subcelular de proteínas implicadas en la biosíntesis de glutamato en *S.cerevisiae*.

En este trabajo se presenta una descripción detallada de la metodología a seguir para poder lograr una localización subcelular de proteínas en *S.cerevisiae*. Ésta incluye los diferentes pasos por los cuales se podrá fusionar la GFP a la

proteína de interés por localizar. En la descripción se incluyen los siguientes puntos:

- Una descripción del diseño que deberán tener los oligos con los cuales se podrá amplificar los genes de interés (secuencia complementaria al gen de interés, sitio de restricción y secuencia que complementará el sitio de restricción).
- Dos programas que podrán ser utilizados para amplificar por la técnica de PCR sobre DNA, los genes de interés (tablas 5 y 6).
- La técnica por la cual podrán clonar los genes de interés en el vector de GFP-MRCy.
- Tres opciones (TB1, DH10B y DH5 α) para transformar bacterias.
- Una técnica por la cual podrán verificarse las diferentes clonas bacterianas (minipreps fenol).
- La técnica por la cual se podrá determinar actividad de GDH y GOGAT.
- Las condiciones en que se deberán hacer las observaciones al microscopio confocal.

Con lo anterior se cubre el objetivo planteado en este trabajo. Adicionalmente se presenta una caracterización del vector de pGFP-MRCy, la cual era absolutamente necesaria para su utilización. Se realiza la construcción de los

vectores de pGFP-MRCy-M1, pGFP-MRCy-SK1 y pGFP-MRCy-SK2, que facilitarán la obtención de posteriores construcciones.

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos para las proteínas GDH1, GDH3 y GLT1, con la proteína verde fluorescente fusionada en su extremo amino terminal, desafortunadamente las observaciones realizadas al microscopio confocal, no son concluyentes, para poder definir la localización subcelular utilizando a la proteína verde fluorescente, en el caso en que se desconoce la secuencia de localización subcelular, es necesario realizar la fusión de la GFP en el extremo amino y carboxilo terminal, de la proteína por localizar. En este trabajo se comprobó que las construcciones con la GFP fusionada en el extremo amino terminal complementan actividad de GDH y GOGAT. En estas se vió que la proteína verde se expresa, pero cabe señalar que si se quiere obtener resultados concluyentes de localización subcelular, falta:

- En el caso de las enzimas GDH, no sabemos si la señal de localización se presenta en el extremo carboxilo terminal o en el extremo amino terminal de la proteína (si es que la hay), con la construcciones que se incluyen en este trabajo, podríamos estar interfiriendo la señal de localización y como consecuencia, con la localización normal de la proteína.
- En el caso de la GOGAT, codifica en su secuencia nucleotídica para una preproteína que estaría fusionada en el extremo amino terminal de la GOGAT, se sospecha que esta preproteína podría estar dando un señal

de localización, posteriormente sería procesada y la GOGAT podría adquirir su conformación activa. En este trabajo, no sabemos si lo que estamos viendo es la localización de la preproteína o de la *GLT1* con todo y preproteína.

7. CONCLUSIONES.

- Se implementó en el laboratorio donde se realizó este trabajo, una técnica para poder localizar subcelularmente, las proteínas implicadas en la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato en *S.cerevisiae*.
- Se realizaron las construcciones que llevan a la GFP fusionada en su extremo amino, de las enzimas que participan en la biosíntesis de glutamato.
- Las construcciones producen productos enzimáticamente funcionales.
- Las construcciones producen productos fluorescentes..
- Se caracterizó el vector de pGFP-MRCy.

8. PERSPECTIVAS.

Para realizar la correcta localización de las proteína mencionadas en este trabajo, falta realizar las construcciones con la GFP fusionada al extremo carboxilo terminal. Para realizar ese trabajo, se han construido el vector pGFP-MRCy-SK2, al cual se le ha agregado un sitio de restricción *BglII*. Se recomienda utilizar este

sitio (y posiblemente el sitio *Nco*I localizado 5' de la GFP), para la clonación de los genes de *GDH1*, *GDH3* y *GLT1*.

ABREVIATURAS.

<i>A.victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>
DTT	D, L-ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia.coli</i>
GDH	glutamato deshidrogenasa
<i>gdh1</i>	mutante en GDH1
<i>gdh3</i>	mutante en GDH3
GFP	green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
GOGAT	glutamina amida 2-oxoglutarato amidotransferasa / glutamato
GPD	gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa.
GLT1	gen de la GOGAT
<i>glt1</i>	mutante en GLT1
GS	glutamino sintetasa
<i>leu2</i>	mutante en LEU2 auxotróficas para leucina
MM	medio mínimo para levadura
MM leu	medio mínimo para levadura complementado con leucina
MCS	Sitio de clonación múltiple
NAD ⁺	adenina B-nicotinamida dinucleotido
NADP ⁺	adenina B-nicotinamida dinucleotido 3'-fosfato

nm	nanómetro
pb	par de bases nucleotídicas
PCR	polimerasa Chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
promGPD	promotor de la gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa.
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
μ	origen de replicación para levadura.

APENDICE 1.

Medio SOC.

Glucosa	20mM
Bacto tryptone	2%
Bacto yeast extract	0.5%
NaCl	10mM
KCl	2.5mM
MgSO ₄ + MgCl ₂	10mM
Ajustar a un pH final de 6.8 a 7.0	

Medio LB.

Tryptona
Extracto de levadura
NaCl

Medio MM.

Este medio consiste en una mezcla de sales, elementos y vitaminas según la fórmula de la base nitrogenada para levadura (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan) como fuente de carbono se utilizó glucosa al 2% (p/v) y como fuente de nitrógeno se agregó sulfato de amonio

Amortiguador de extracción.

Fosfato de potasio	100 mM
EDTA	1 mM
DTT	1/1000
ajustado a pH=7.5 con KOH	

APENDICE 2.

Minipreps fenol.

(Método de lisis alcalina).

1. La noche anterior poner un precultivo en 4 ml de medio Lb+carbenicilina.
2. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5-8 min. (falcon).
3. Resuspender en 100 ml de solución 1 , transferir a eppendorf y dejar 5 min. a temperatura ambiente.
4. Agregar 200 ml de la solución 2 fresca (recién preparada). Mezclar por inversión y dejar 5 min. en hielo.
5. Agregar 150 ml de solución 3 fría, mezclar por inversión y dejar 10 min. en hielo.
6. centrifugar 10 min. a 14,000 rpm a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 1/10 de 1M Tris-HCl pH 8.0.
8. Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1).
9. Agitar en vortex por 15 segundos.
10. Centrifugar 2min. a 12,000 rpm.
11. Agregar 2.5 volúmenes de EtOH 100% frío. Mezclar por inverción.
12. Incubar 10min. a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 10min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar.
14. Lavar con EtOH 70% frío.
15. Centrifugar 10min a 14,000 rpm a 4°C. Decantar.
16. Dejar secar a temperatura ambiente.
17. Resuspender en 40µl de H₂O.

Solución 1	Solución 2	Solución 3	
50 mM glucosa	0.2N NaOH	5 M Acetato de potasio	60 ml
2 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1% SDS	Ácido acético glacial	11.5 ml
10 mM EDTA (pH 8.0)		H ₂ O	28.5
ml			

Maxipreps.

(QIAGEN)

Cotejar el protocolo especificado por la compañía.

APENDICE 3.

1. Todas las digestiones de este trabajo se realizaron con enzimas de la compañía SIGMA, de acuerdo a lo indicado en sus protocolos.

Protocolo A. Preparación de productos de PCR.

1. Se digieren los extremos de las PCR según los sitios de restricción agregados en los oligos con los que se amplificó.
2. Se precipita con 2.5 volúmenes de ETOH y 1/10 del volumen final de NaAc 3 M pH=5.2.

3. Se resuspende en un volumen de H₂O suficiente para que la concentración final de ADN este entre los 50 y 100 ng.

Protocolo B. Preparación de vectores.

1. El vector se digiere según el sitio (ó sitios) en que se vaya a meter el inserto.
2. Se desfosforila con defosfatasa según lo indicado en su protocolo.
3. Se precipita con 2.5 volúmenes de ETOH y 1/10 del volumen final de NaAc 3M pH=5.2.
4. Se resuspende en un volumen de H₂O suficiente para que la concentración final de ADN se encuentre entre los 50 y 100 ng.

Protocolo C. Verificación de la correcta construcción clonación.

1. Una vez obtenido el DNA según la técnica minipreps fenolo.
2. Hacer digestiones con enzimas de restricción que permitan verificar la existencia del inserto y su correcta clonación.
3. Para verificar la existencia del inserto, se recomienda digerir con las enzimas de restricción que se agregaron a los oligos.
4. Para verificar la correcta orientación, se recomienda digerir con una enzima que digiera dentro y fuera del inserto.
5. Correr en un gel de agarosa.

LITERATURA CONSULTADA.

Avendaño A, Deluna A, Hiram Olivera, Valenzuela L, y González Alicia. 1997. GDH3 Encodes a Glutamate Deshydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized Route for Glutamate Biosynthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Bacteriology* 179:5594-5597.

Bastarrachea F, Brom S, Covarrubias A, Osorio A y Bolivar F. 1980. Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and its regulation in *Escherichia coli* K12. In Mora J. y R. Palacios. (eds.), *Glutamine Metabolism, Enzymology and Regulation*. Academic Press, New York, pp 213-234.

Burke D, Dawson D y Stearns T 2000 "Methods in Yeast Genetics", 3-4.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW y Prasher DC.1994 "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* ;263(5148):802-5.

Csonka LN. 1989 "Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress". *Microbiol Rev* ;53(1):121-47.

Denton MD y Ginsburg A. 1970 "Some characteristics of the binding of substrates of glutamine synthetase from *Escherichia coli*". *Biochemistry*;9(3):617-32.

Doherty D 1970. L-glutamate deshydrogenases (yeast). *Methods Enzymol.* 17: 850-856.

Drillien R, y Lacroute F. 1972 "Uredosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation". *J Bacteriol*;109(1):203-8.

Filetici P, Martegani MP, Valenzuela L, Gonzalez A y Ballario P. 1996 "Sequence of the GLT1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the domain structure of yeast glutamate synthase". *Yeast*;12(13):1359-66.

Gietz RD y Prakash S. 1988 "Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD4 gene required for excision repair of UV-damaged DNA". *Gene*;74(2):535-41.

Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Gantt JS y Vance CP. 1993 "Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules". *Plant Cell.* (2):215-26.

Grenson M, Dubois E, Piotrowska M, Drillien R y Aigle M. 1974 "Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. Evidence for the *gdhA* locus being a structural gene for the NADP-dependent glutamate dehydrogenase". *Mol Gen Genet*;128(1):73-85.

Heim R, Prasher DC y Tsien RY. 1994 "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein". *Proc Natl Acad Sci USA*;91(26):12501-4.

Helm R, Cubitt AB y Tsien RY. 1995 "Improved green fluorescence". *Nature*; 373(6516):663-4.

Helling RB. 1994 "Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate?". *J Bacteriol*; 176(15):4664-8.

Holzer H y S Schneider. 1975. "Anreicherung und trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutamunosaure Deshydrogenase aus Hefe". *Bioche. Z.* 329: 361-367.

Hummelt, G y J Mora. 1980 "Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*". *J.Gen.Microbiol.* 133:2333-2340.

Inouye S y **Tsuji FI**. 1994 "Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein". *FEBS Lett*;351(2):211-4.

Johnson FH, **Shimomura O**, **Saig Y**, **Gerhman LC**, **Reynolds GT** y **Waters JR**. 1962, *J. Cell Comp. Physiol.* 60:85-103.

Lewin B, 2000."Genes VII", Ed Oxford, USA, ISBN 0-19-879280-8.

Lowry O, **Rosenbrough A**, **Farr A** y **Randall**. 1951 "Protein measurement with the Folin phenol reagen". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Marqués S, **Florencio FJ** y **Candau P**.1992 "Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthasa from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp.PCC 6301". *Eur.J.Biochem.* 206:69-77.

Mathews K y **van Holde K**, 1990, "Biochemistry", Ed Benjamin, USA, ISBN 0-8053-5015-2.

Miller RE y **Stadtman ER**. 1972 "Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein". *J Biol Chem*;247(22):7407-19.

Morise H, **Shimomura O**, **Johnson FH** y **Winant J**. 1974 "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*". *Biochemistry*;13(12):2656-62.

Niwa H, **Inouye S**, **Hirano T**, **Matsuno T**, **Kojima S**, **Kubota M**, **Ohashi M** y **Tsuji FI**. 1996 "Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein". *Proc Natl Acad Sci U S A*;93(24):13617-22.

Ormo M, **Cubitt AB**, **Kallio K**, **Gross LA**, **Tsien RY** y **Remington SJ**. 1996 "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein". *Science*;273(5280):1392-5.

Perlman PS y **Mahler HR**. 1970 "Intracellular localization of enzymes in yeast". *Arch Biochem Biophys*;136(1):245-59.

Perozzo MA, **Ward KB**, **Thompson RB** y **Ward WW**. 1988 "X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals". *J Biol Chem.* ;263(16):7713-6.

Prasher DC, **Eckenrode VK**, **Ward WW**, **Prendergast FG** y **Comier MJ**. 1992 "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein". *Gene*;111(2):229-33.

Reid BG y Flynn GC. 1997 "Chromophore formation in green fluorescent protein". *Biochemistry*;36(22):6786-91.

Reirzer LJ y Magasanik B. 1987 "Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamatamine, glutamate, aspartate, asparagina, L-alanina and D-alanina. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*" Cellular and molecular biology (F.C.Neidhart y cols.), p. 302. American Society for Microbiology.

Ridgway EB y Ashley CC. 1997 "Calcium transients in single muscle fibers". *Biochem Biophys Res Commun*; 29(2):229-34.

Rodríguez C. 1999 "The Prenylation Status of a Novel Plant Calmodulin Directs Plasma Membrane or Nuclear Localization of the Protein", *EMBO J.*

Rodríguez C, 1999, Curso teórico-práctico "Uso de fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP) para el estudio de localización subcelular de proteínas", impartido por el Dr. Rodríguez C., dentro del programa de Posgrado en Ciencias Químicas, impartido en la Facultad de Química, conjunto E.

Roger Y y Tsien. 1998 "The Green Fluorescent Protein" *Annu.Rev.Biochem.* 67: 509-44.

Roon R, Even HL y Larimore F. 1974 "Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*". *J.Bacteriol*". 188: 89-95.

Senior PJ. 1975 "Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J.Bacteriol*". 123:407-418.

Shimomura O, Johson FH y Saig Y. 1962, *J. Cell. Comp. Physiol.* 59. 223-39.

Saroja GN y Gowrishankar J. 1996 "Roles of SpoT and FNR in NH₄⁺ assimilation and osmoregulation in GOGAT (glutamate synthase)-deficient mutants of *Escherichia coli*". *J Bacteriol*;178(14):4105-14.

Stoner CD y Sirak HD. 1969 "Passive induction of the "energized-twisted" conformational state in bovine heart mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun*;35(1):59-66.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tempest DW, Meers JL y Brown CM. 1970 "Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route". *Biochem. J.* 117: 405-407.

Valenzuela L, Guzman-Leon S, Coria R, Ramirez J, Aranda C y Gonzalez A. 1995 "A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis* uses the glutamine synthetase-glutamatesynthase pathway for glutamate biosynthesis". *Microbiology*;141 (Pt 10):2443-7.

Wright HT. 1991 "Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins". *Crit Rev Biochem Mol Biol*;26(1):1-52.

Yalovsky S, Trueblood C, Callan K, Narita J, Jenkins S, Rine J y Grusse W. 1997 "Plant farnesyltransferase can restore yeast Ras signaling and mating". *Mol Cell Biol*, 1986-94.

Yang F, Moss LG y Phillips GN Jr. 1996 "The molecular structure of green fluorescent protein". *Nat Biotechnol*;14(10):1246-51.