



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ENSAYO MULTICOLOR DE CO-LOCALIZACIÓN CELULAR *in vivo* PARA
PROTEÍNAS EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA**

P R E S E N T A

CYNTHIA HERNÁNDEZ GARDUÑO



MÉXICO D.F.

AÑO 2016



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: Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa

VOCAL: Dr. Samuel Canizales Quinteros

SECRETARIO: Dr. José Francisco Torres Quiroz

1er. SUPLENTE: Dr. José de Jesús García Trejo

2° SUPLENTE: Dra. María del Carmen Urzúa Hernández

ESTA TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 101 DEL EDIFICIO ORIENTE, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: _____
Dr. José Francisco Torres Quiroz

SUSTENTANTE: _____
Cynthia Hernández Garduño

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. José Francisco Torres Quiroz en el laboratorio 101-Oriente del departamento de Bioquímica y Biología Estructural en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Paola Moreno Álvarez.

Se agradece al Dr. Roberto Coria Ortega y a los miembros de su equipo de trabajo: la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y la M. en C. Mariana Hernández-Elvira por las facilidades otorgadas con el equipo de microscopía de epifluorescencia, la asistencia y el préstamo de cepas y reactivos.

Este proyecto contó con asesoría técnica del personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, la Dra. Laura Ongay Larios, la Biól. María Guadalupe Codiz Huerta y la M. en C. Minerva Mora Cabrera.

Se reconoce el apoyo técnico de la Dra. Ruth Rincón Heredia y del Dr. Genaro Vázquez Victorio para el uso de microscopía confocal.

Este trabajo se realizó gracias a DGAPA-UNAM a través del proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA200315 y a CONACyT por su donativo al proyecto CONACyT CB 2014-238681.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por dejarme soñar. Por cobijarme y brindarme tanto.

A la Facultad de Química, espacio donde se concibe un mundo diferente.

Al Instituto de Fisiología Celular, de donde nace todo esto.

Al Dr. José Francisco Torres Quiroz, por nunca pausar la labor de ser tutor y guía.

A la Dra. Paola Moreno por su invaluable asistencia en el laboratorio.

Al Dr. Ismael Hernández Lucas, por la oportunidad de formarme tempranamente en la ciencia y por siempre procurar mi aprendizaje.

Al M. en C. Esteban Rebollar y la M. en C. Liliana Medina, por cada experiencia y conocimiento compartido durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A Paco, Garnie y Anaid, por hacer de nuestro equipo de trabajo un ambiente de respeto y apoyo incondicional.

A Alan, por ser el mejor compañero y camarada, por su infinita ayuda y cariño.

A Anava, David y Aislim, por estar siempre al pendiente de mí, por ser personas honestas, por su afecto y por mostrarme que una familia también se forma con amigos.

A todos quienes han estado, y quienes están.

Dedicatoria

Con profundo amor, respeto y admiración a mis padres, de quienes aprendí que la constancia, esfuerzo, humildad y dedicación son imprescindibles para culminar grandes proyectos. Pokjú ka gi dyakúji, pokjú ka gi pjojkúji, pokjú ko gi jitskoji.

A Sandra y Edith, que me quieren y motivan

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN.....	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de la localización subcelular de proteínas.	1
1.2 La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental.....	5
1.3 El uso de vectores en levadura.	6
2. ANTECEDENTES	7
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVOS	10
4.1 Objetivo general	10
4.1.1 Objetivos particulares	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	11
5.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	16
5.3 Construcción de plásmido pBS35+25.....	16
5.4 Construcción de plásmido pGEMmCh14.....	17
5.5 Obtención de marcadores de selección y proteínas fluorescentes.	17
5.5.1 Extracción de fragmento <i>hph</i> para la construcción del plásmido pCH54	19
5.6 Construcción de plásmidos (marcador de selección – proteína fluorescente).....	25
5.7 Comprobación de inserción de marcador de selección al vector correspondiente para cada plásmido construido.	26
5.8 Fusión de plásmidos con genes de proteínas específicas de estructuras celulares.	28
5.9 Transformación en células BY4742, elaboración de cepas con marcadores de estructuras celulares.	29
5.10 Obtención de cepas diploides	30
5.11 Localización de estructuras subcelulares marcadas en células de <i>S. cerevisiae</i> BY4742	31
5.12 Cinética de crecimiento	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Construcción de plásmidos	33
6.1.1 Obtención de marcadores de selección para levadura	33
6.1.2 Clonación de marcadores de selección a vectores	36
6.1.3 Transformación de plásmidos construidos a <i>E. coli</i> TOP 10.....	48
6.2 Fusión de plásmidos con genes de proteínas específicas de estructuras celulares	60
6.3 Transformación de productos de PCR a células BY4742 de <i>S. cerevisiae</i>	65
6.4 Apareamiento de células haploides con distintas proteínas etiquetadas con proteínas fluorescentes.....	69
6.4 Localización de estructuras subcelulares marcadas en células wild type de <i>S. cerevisiae</i>	70
6.4.1 Uso de microscopía de epifluorescencia	70
6.4.2 Uso de microscopía confocal	73
6.5 Cinética de crecimiento de cepas elaboradas	74
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	82
8. CONCLUSIONES	91
9. PERSPECTIVAS	93
10. REFERENCIAS	94

ABREVIATURAS

yEGFP	Proteína verde fluorescente
yEYFP	Proteína amarillo fluorescente
yECFP	Proteína cian fluorescente
mCh	Proteína fluorescente mCherry
Cit	Proteína citrine fluorescente
G418	Geneticina
clonNAT	Nourseotricina N-acetil-transferasa
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
RNA	Ácido Ribonucleico
tRNA	RNA de transferencia
mRNA	RNA mensajero
Sod1	Superóxido dismutasa 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PKA	Proteín cinasa A
cAMP	Adenosín fosfato cíclico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
TF	Factor de transcripción
Msx	Inhibidor de la glutamina sintetasa metionina sulfoximina
PKC	Proteín cinasa C
LB	Medio rico para bacteria
Amp	Ampicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
YPD	Medio rico para levadura
DMSO	Dimetil sulfóxido
LiOAc	Acetato de litio
PEG	Polietilén glicol
DTT	Dithiothreitol
CPN	Complejo del poro nuclear
SRP	Partícula de reconocimiento de señal
snoRNA	RNA pequeño nucleolar (Small nucleolar RNA)
snRNA	RNA pequeño nuclear (Small nuclear RNA)
Cbp	Cuanto baste para

RESUMEN

Desde el inicio del estudio de la estructura y función celular el análisis de las proteínas se ha dificultado, esto debido a que la actividad de las proteínas y su regulación se encuentran estrechamente relacionadas con su localización celular. Dentro de los métodos más comunes para el análisis de la localización celular se conoce la adición de etiquetas y el uso de la microscopía de fluorescencia, sin embargo la visualización *in vivo* de la dinámica de proteínas dentro de diferentes compartimentos ha sido difícil. Otro método es el uso de compuestos químicos para la tinción de organelos, lo cual ha generado problemas cuando no hay disponibilidad de estas sustancias, además de que no existen compuestos específicos para todos los compartimentos celulares. Es por esto que es necesario desarrollar una herramienta para facilitar el estudio de la localización de proteínas *in vivo* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En este proyecto se desarrolló una metodología para el estudio de la localización de proteínas *in vivo* por medio de la co-localización con marcadores de estructuras celulares. El método consistió en la elaboración de plásmidos que contienen las proteínas fluorescentes yEYFP, yEGFP, yECFP, yEmCitrine y mCherry, además de diferentes marcadores de selección, dentro de los cuales se encuentran antibióticos como Nourseotricina (clonNAT), geneticina (KnMX) e higromicina B (*hph*), además de los marcadores de selección utilizados generalmente en *S. cerevisiae*, *URA3* e *HIS3*. Los distintos plásmidos se fusionaron mediante PCR al marco de lectura abierto de genes cuyas proteínas son específicas para alguna estructura celular, *VMA1* que codifica para una proteína específica en la vacuola, *LEU9* de mitocondria, *NRD1* de núcleo, *NUP49* de porinas nucleares, *SEC63* de retículo endoplásmico, *SEC7* para trans Golgi, y *PDR5* para membrana plásmica. Las fusiones se transformaron a células BY4742 para la evaluación de fluorescencia y la correspondiente localización de acuerdo a cada estructura celular con el fin de contar con una referencia para la co-localización de proteínas de interés de manera sistemática.

Esta herramienta podría estar asociada con las cepas de la colección de proteínas etiquetadas con la proteína verde fluorescente (yEGFP) y podría ayudar a la determinación de la localización precisa de una proteína en diferentes condiciones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la localización subcelular de proteínas.

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes, además de encontrarse en todas las células y en todas las partes de la célula, son quienes fungen como mediadores de diversas funciones moleculares y son los productos más importantes de las rutas de expresión de la información genética. En la actualidad los métodos de secuenciación de genomas completos reportan datos precisos que incluyen características de proteínas responsables de la regulación celular, sin embargo, no se revelan las funciones específicas de cada proteína, ni la forma en que se ensamblan en las maquinarias moleculares y redes funcionales que controlan el comportamiento celular. La regulación de muchos de los diferentes procesos celulares necesita de la interacción proteína-proteína, así como también de otro tipo de moléculas como iones, ácidos nucleicos, cofactores, entre otros. Estas interacciones actúan como elementos clave en la construcción de complejos proteicos funcionales y están mediadas por dominios estructurales que pueden funcionar como andamiajes para complejos proteicos, dirigir proteínas a localizaciones subcelulares específicas, contribuir al reconocimiento de modificaciones post-traduccionales o colaborar en la especificidad de sustrato, entre algunas otras funciones (1). Por mencionar un ejemplo, esto ocurre en la transducción de señales, donde enzimas como cinasas, modifican químicamente aminoácidos en sus sustratos que posteriormente son reconocidos por los módulos de interacción, este tipo de señales controlan el estado dinámico de la célula.

La modulación de procesos químicos dentro de la célula ha tomado gran relevancia en la búsqueda del entendimiento de las vías bioquímicas y las funciones moleculares que controlan el comportamiento celular. Desde hace 50 años se sabe que existen receptores de membrana y que las células responden a estímulos como la interacción con moléculas citoplasmáticas o a la regulación de respuestas específicas en compartimentos subcelulares. La especificidad en la función celular mediada por proteínas se describe de acuerdo a su interacción con receptores y como se pueden localizar a partir de señalizaciones, lo que sugiere que si las proteínas pueden responder a diferentes estímulos no regulan una sola sino diversas funciones biológicas de acuerdo a las variaciones en respuestas que provocan cambios en su ubicación subcelular.

Dentro de algunos ejemplos, se encuentra la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima importante en la vía glicolítica que cataliza la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a 1, 3 bifosfoglicerato en presencia de NAD⁺. En estudios recientes se ha descrito que no sólo actúa como una

proteína glucolítica sencilla sino que tiene múltiples roles en la replicación y reparación del DNA como lo son la iniciación de la apoptosis, la fusión y transporte de membrana, la exportación de tRNA y la estabilidad de la regulación del mRNA, procesos llevados a cabo en el núcleo, reportando así, una nueva localización de GAPDH (3).

Otro caso, es una nueva función descrita para la superóxido dismutasa 1 (Sod1) quien en respuesta a altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) endógenas y exógenas rápidamente se re-localiza en el núcleo realizando funciones importantes para el mantenimiento de la estabilidad genómica donde Sod1 se une a promotores regulando la expresión de genes de reparación y de resistencia oxidativa, confirmando a Sod1 como un factor de transcripción (4).

Un fenómeno más para describir esta característica de las proteínas, es la localización de la subunidad reguladora de la Protein cinasa A (PKA) una enzima que consta de dos subunidades catalíticas unidas con un homodímero de subunidades reguladoras, el cual se disocia al unirse el cAMP y activa las subunidades catalíticas; en la levadura la isoforma de la subunidad reguladora, Bcy1 responde a la glucosa lo que aumenta la concentración de cAMP. Estudios de localización de la subunidad catalítica de PKA, TPK1, y la subunidad reguladora Bcy1 han revelado que la localización subcelular de ambos tipos de subunidades se regula por cAMP, donde en las células creciendo en un medio con glucosa la subunidad reguladora está fuertemente concentrada en el núcleo, y en las células creciendo en fuentes de carbono no fermentables, está presente tanto en núcleo como en citoplasma. El aumento de la localización citoplasmática de Bcy1 parece ser importante para la regulación de sustratos citoplasmáticos como lo son las enzimas que son reguladas por la PKA, de forma relevante la localización adecuada de Bcy1 regula procesos importantes tales como la esporulación, la viabilidad y proliferación de células en fase estacionaria (5).

Diversas facetas en la célula pueden explicar un cambio en la localización de proteínas, incluyendo la respuesta a daño al DNA, quien puede navegar por diferentes rutas según la extensión del daño, basándose tanto en la expresión como cambios de localización de proteínas específicas. Los factores de transcripción (TF) por ejemplo, juegan un papel importante en la respuesta a daño celular conduciéndose a diferentes blancos para la regulación de su actividad dando como respuestas la inhibición en la síntesis de proteínas, la represión de genes de las proteínas ribosomales y las modificaciones postraduccionales, determinando así nuevas localizaciones para el control de su actividad. Análisis realizados mediante gene ontology e interacciones proteína-proteína, han revelado que dentro de los diversos procesos controlados por distintos TF se encuentran el remodelamiento de

la cromatina, el procesamiento de mRNA, la transcripción por la RNA polimerasa II, proteólisis, la biogénesis de ribosomas, el metabolismo, la síntesis de lípidos, la reparación del DNA y la regulación del ciclo celular (6). Se puede mencionar como ejemplo al factor de transcripción Gln3 un activador transcripcional de genes cuyos productos generan los precursores nitrogenados para la síntesis de proteínas. En exceso de nitrógeno Gln3 se encuentra en citoplasma y cuando hay bajas condiciones de nitrógeno y en tratamiento con inhibidor de la glutamina sintetasa metionina sulfoximina (Mlx), Gln3 se va al núcleo y activan la transcripción (7).

A pesar de la noción que se tenía de la estructura de estas proteínas, nadie imaginaba todas las funciones en que están involucradas, de esta manera, estos nuevos hallazgos ponen en duda el conocimiento de la relación entre la estructura y función, es decir, proteínas funcionales que tienen estructuras iguales no siempre están involucradas en los mismos procesos biológicos. En años recientes **Constance J. Jeffery asigna a este tipo de proteínas el término "proteínas moonlighting" (8), refiriéndose a proteínas que son multifuncionales debido a que una sola cadena polipeptídica realiza múltiples funciones bioquímicas o biofísicas fisiológicamente relevantes.** Esta idea ha terminado con el concepto de que un gen codifica para una proteína que tiene únicamente una función. Se han descrito casi 300 proteínas moonlighting dentro de las cuales se incluyen receptores, enzimas, factores de transcripción, adhesinas realizando diferentes combinaciones de funciones. Las proteínas moonlighting no incluyen proteínas que son el resultado de fusiones de genes, familias de proteínas homólogas, variantes de empalme o actividades enzimáticas promiscuas, tampoco se incluyen proteínas que tienen la misma función en diferentes tipos de células o en diferentes localizaciones subcelulares. Estas proteínas se encuentran en todas las especies y desarrollan funciones en diversas vías bioquímicas donde pueden mediar distintas funciones al mismo tiempo o bien responder a cambios en el medio ambiente y cambiar de una función a otra, además de que se han conservado a través del paso evolutivo (8). Se han descrito distintos métodos para identificar proteínas moonlighting como lo son la secreción al espacio extracelular, interacciones con DNA o RNA, cambios en la temperatura, cambios en el estado redox de la célula, cambios en el estado oligomérico de la proteína, interacciones con diferentes cadenas de polipéptidos en diferentes complejos de proteínas, interacción con una membrana, o cambios en la concentración celular de un ligando, sustrato, cofactor, o producto (9).

Dentro de las llamadas proteínas moonlighting también se ha revelado una función alterna de la galactocinasa (**GAL1**), enzima que fosforila la galactosa produciendo galactosa-1-fosfato tanto en ***Saccharomyces cerevisiae*** como en ***Kluyveromyces fragilis***. Las levaduras, tienen la propiedad de utilizar galactosa como fuente de carbono y para la utilización de este azúcar se requiere de la inducción de los

genes **GAL**, dentro de los cuales se encuentran un gen que codifica para un transportador y tres que codifican para enzimas intracelulares que metabolizan la galactosa hasta glucosa-6-fosfato. La inducción de los genes **GAL** en *S. cerevisiae* se activa por Gal4 y se inhibe por Gal80, y la liberación de Gal4 reprimida por Gal80 se debe a la proteína de traducción de señales Gal3 (10) quien presenta gran similitud con **GAL1** aunque Gal3 no presenta actividad de galactocinasa. En un experimento Adam Platt y Richard J. Reece vieron que cuando a mutantes en Gal3 se les crecía en medio con galactosa, las células crecían varios días después lo que adjudicaron a que el exceso de producción de **GAL1** que *in vivo* promueve la expresión de los genes **GAL en citosol** (11), hecho que les llevo a concluir que bajo ciertas condiciones **GAL1** puede actuar como regulador de la transcripción de los genes **GAL** en *S. cerevisiae*. Una actividad distinta ocurre en *K. lactis* donde la transcripción de genes homólogos a los **GAL** en *S. cerevisiae*, **KIGAL** en núcleo, requieren la expresión de **KIGAL1** (homólogo de **GAL1**) pero su acción no es necesaria para la liberación de KIGal80 en KIGal4. En *K. lactis* es necesario un complejo **KIGAL1**-KIGal80 para que se pueda dar la liberación de KIGal4, por lo tanto, **KIGAL1** en *K. lactis* realiza una función equivalente a la de Gal3 en *S. cerevisiae* (12). Estos resultados concluyeron considerando a **KIGAL1** como una proteína moonlighting por su dualidad de actuar como galactocinasa y además en complejo con KIGal80 liberar a KIGal4 de KIGal80, lo que la diferencia de **GAL1** de *S. cerevisiae*.

Otra proteína moonlighting descrita, es la proteína RACK1 (receptor de la cinasa C activada) la cual sirve como proteína de andamiaje para una amplia gama de cinasas en citoplasma y para la unión con receptores de membrana y también es un componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S). El homólogo de RACK1 en *S. cerevisiae* es Asc1p y es una proteína altamente conservada en las eucariotas. Recientemente se determinó por espectrometría de masas que RACK1 es un componente en la subunidad pequeña de los ribosomas en las células eucariotas y que además parece ser una proteína ribosomal integral. Por si fuera poco, también se le ha relacionado con el inicio de la traducción tanto en levadura como en mamíferos. En mamíferos, RACK1 estimula la traducción por el reclutamiento de PKC activa, lo que induce la fosforilación de eIF6 y estimula su asociación a la subunidad, en adición, PKC activa fosforila a proteínas asociadas a poli A-mRNA lo que desencadena la síntesis de proteínas en la sinapsis. En eucariotas más simples como *S. cerevisiae*, RACK1 no es necesaria para la traducción de proteínas pero se ha reportado como control de la traducción de mRNAs específicos, hecho que esta mediado por la interacción entre RACK1 y la proteína de unión a mRNA, Sc160p la cual une a mRNAs específicos. Por espectrometría de masas de proteínas en *S. cerevisiae* se liga a RACK1 con dos factores, eIF4G y eIFb (subunidad de eIF) (13), lo que la propone como proteína moonlighting al estar involucrada

en dos procesos distintos, como lo son el andamiaje de cinasas y la unión a factores del inicio de la traducción.

La capacidad de una sola proteína de tener múltiples funciones y estar involucrado en diferentes complejos multiproteicos o vías bioquímicas pueden ayudar a explicar los resultados inesperados de distintos proyectos, así como estudios de funciones de proteínas, localización, interacciones y niveles de expresión, inclusive el análisis de funciones adicionales pueden resultar en el entendimiento de los patrones que sigue una proteína dependiendo del estímulo recibido. Una proteína moonlighting puede proporcionar una conexión o un interruptor entre vías, y ayuda a la célula para responder a los cambios en su entorno, además de que también puede estar involucrada en la comunicación entre diferentes tipos de células dentro de un organismo. De este modo, conjuntando todos los ejemplos anteriores se comprende que el objetivo central del análisis de las proteínas es aclarar el mecanismo por el cual cada proteína en un determinado tipo de células lleva a cabo su función. Si se logra elucidar la ubicación subcelular de las proteínas por microscopía de fluorescencia se puede cumplir este objetivo puesto que la ubicación subcelular de una proteína es fundamental para comprender su función debido a que cada compartimento subcelular tiene un entorno bioquímico único.

1.2 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene muchas ventajas intrínsecas como un sistema modelo para estudiar una amplia gama de procesos biológicos. Más allá de la investigación, la levadura se utiliza para la producción sintética de proteínas y compuestos en la industria. Es una célula eucariota simple, es un hongo unicelular y una de sus características más conocidas es la capacidad de fermentar azúcares para la producción de etanol. *S. cerevisiae* funciona como un modelo único para la investigación, su genoma es relativamente pequeño y con pocos intrones, su crecimiento en cultivos resulta barato y fácil, además de que necesita de tiempos de generación cortos. En 1996, el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer genoma eucariótico secuenciado, lo que ha contribuido en su conocimiento genético y bioquímico detallado por medio de la aplicación de técnicas moleculares para su manipulación durante muchos años de investigación. Es un sistema adecuado para estudiar procesos biológicos que son relevantes para muchos otros eucariotas superiores, debido a que muchos procesos celulares básicos como la regulación del ciclo celular, el metabolismo, la respuesta a estrés, entre otros son procesos sumamente conservados a lo largo de evolución. Utilizando a la levadura como un modelo de estudio se puede lograr la comprensión de organismos más complejos como los mamíferos a través de la comparación de los genomas de diferentes especies determinando el fin específico de genes y la organización y la evolución de las vías biológicas y los módulos de regulación.

S. cerevisiae difiere de otros organismos en que puede presentar un estado haploide o diploide estable. En los últimos años, el desarrollo de la transformación del DNA de levadura ha facilitado la clonación de genes, los plásmidos, por ejemplo, pueden introducirse en células de levadura, ya sea como moléculas de replicación o mediante integración en el genoma. Esta recombinación integrativa o la transformación de DNA en la levadura procede exclusivamente a través de recombinación homóloga, por lo tanto, DNA exógeno con segmentos parciales homólogos se puede dirigir a lugares específicos en el genoma y es así que los fenotipos dados después de la interrupción de los genes de levadura ha contribuido de manera significativa hacia la comprensión de la función de ciertas proteínas *in vivo* (14).

1.3 El uso de vectores en levadura.

El análisis funcional de genes en *S. cerevisiae*, se ha facilitado debido a que las herramientas de biología molecular han facilitado la manipulación de las moléculas de DNA para la inserción, mutación y eliminación de secuencias de DNA, así como la expresión de genes por medio de recombinación homóloga con el uso de vectores. En la investigación, se han desarrollado cassettes que son utilizados para el marcado de genes de una amplia gama de secuencias incluyendo etiquetas epítopes para reacciones inmunoquímicas, etiquetas con proteínas puras y el uso de la proteína verde fluorescente (yEGFP) así como sus variantes utilizadas para la microscopía de epifluorescencia. Estas etiquetas son introducidas con dirección de recombinación en el genoma y es por ello que estos cassettes permiten la modificación de la proteína específica aun en su contexto nativo sin perturbar su regulación (15). Los plásmidos más utilizados en levadura, son los llamados vectores shuttle, los cuales contienen secuencias que permiten ser seleccionados y propagados en *E. coli* (16). Estos vectores utilizados en levadura, además contienen marcadores de selección que ayudan en la selección de transformantes que contienen los plásmidos deseados. Dentro de los marcadores más utilizados en la levadura, se incluyen ***URA3***, ***HIS3***, ***LEU2***, ***TRP1*** y ***LYS2*** quienes complementan específicamente auxotrofías en levaduras mutantes como lo son *ura3-52*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ1*, *trp1-Δ1* y *lys2-201*, respectivamente. Hoy en día, los vectores shuttle más comúnmente usados se clasifican en: 1. YIp, vectores integrativos, que carecen de orígenes de replicación de levadura y necesariamente deben integrarse en el genoma de la levadura; 2. los plásmidos del centrómero, YCp, que contienen tanto un centrómero de levadura (CEN) y una secuencia de replicación autónoma (ARS), con bajo número de copias; 3. Plásmidos episomales de levadura (YEp), que contienen un origen de replicación y se replican de forma autónoma en la levadura, son plásmidos de alto número de copias y 4. YACs que son útiles para la clonación de largos fragmentos (Yeast Artificial Chromosomes) (16).

2. ANTECEDENTES

Se han descrito distintos métodos para el estudio de la localización subcelular de proteínas de interés dentro de los cuales se encuentran el fraccionamiento celular, el uso de inmunofluorescencia y la adición de etiquetas. En la actualidad con el uso de fluoróforos de naturaleza proteica, la microscopía de fluorescencia ofrece la oportunidad de observar los cambios tanto a nivel de proteína como la localización subcelular de forma simultánea, siendo la proteína verde fluorescente (yEGFP) quien se ha convertido en una herramienta muy valiosa en la investigación biológica y ha resultado muy útil para el estudio de la localización de proteínas para el entendimiento de su función y la señalización de distintos procesos celulares (17). El gen que codifica para la yEGFP se ha utilizado como marcador de procesos biológicos como actividad y regulación génica, de plegamiento y localización celular de proteínas y seguimiento *in vitro* e *in vivo* de células marcadas (18).

En el 2003 Huh y colaboradores (19), desarrollaron una colección que consta de una serie de cepas de levadura haploides que se encuentran etiquetadas en diferentes ORF de manera individual, es decir, 4156 proteínas completas fusionadas en su extremo COOH terminal con la proteína verde fluorescente cuya expresión es impulsada por su promotor endógeno. Este repertorio de proteínas marcadas, ha sido de utilidad para el desarrollo de proyectos como CYCLOPS una base de datos completa automatizada de la abundancia de proteínas y patrones de localización subcelular en *Saccharomyces cerevisiae* (20) y de otros estudios donde se analiza la localización de proteínas en específico. En los últimos años, numerosas proteínas parecidas a GFP con emisión de colores que van desde cian a rojo presentan diversas propiedades moleculares y han facilitado su aplicación como marcadores. Las variantes de los genes que codifican para proteínas fluorescentes mediante formación autocatalítica del fluoróforo también son ideales para ser empleados como marcadores en la evaluación de expresión génica y para un amplio intervalo de procedimientos de biología molecular, dentro de los cuales fungen como marcadores de la actividad de los genes y como etiquetas de proteínas así como también de compartimentos subcelulares dentro de células vivas (21).

Considerándose lo discutido en esta sección, en el presente trabajo se desarrolló una nueva colección de plásmidos integrativos que contienen en todas las combinaciones posibles a las proteínas fluorescentes yEGFP, yEYFP, yECFP, yECitrine y mCherry en conjunto con los marcadores de selección Nourseotricina (clonNAT), geneticina (*KnMX*) e higromicina B (*hph*), además de los marcadores de auxotrofia *URA3* e *HIS3*. Estos plásmidos al fusionarlos al marco de lectura abierto de genes de proteínas específicas para alguna estructura celular son de utilidad para la correspondiente localización de acuerdo

a cada estructura celular con el fin de contar con una referencia para la co-localización de proteínas de interés de manera sistemática por medio de fluorescencia.

3. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, un amplio conocimiento de la ubicación de proteínas dentro de microambientes celulares es fundamental para la comprensión de sus funciones e interacciones. Los datos de localización pueden confirmar y predecir tendencias; si proteínas agrupadas en un conjunto de datos tienen en común la localización, la predicción de la función común se confirma y además posibilita categorizar a las proteínas relacionadas, lo que indica que un grupo puede estar compuesto de subconjuntos de proteínas con funciones biológicas aún más específicas e individuales (18). El estudio de una aproximación de la localización de proteínas en un estudio en particular puede revelar importantes características de los procesos celulares básicos, y mejorar la comprensión de *S. cerevisiae* y de las proteínas y vías conservadas entre las eucariotas. El uso de las diferentes metodologías descritas en la sección anterior han sido de gran relevancia para dichos estudios, sin embargo, se carece de una metodología que nos provea de una base de co-localización de proteínas utilizando como marcadores a proteínas fluorescentes, que además de marcar a las proteínas de interés, marquen también a estructuras subcelulares con el fin de prescindir de agentes químicos para colorearlas debido a que al utilizarlos estos pueden proveer de cierta toxicidad a las células afectando así la visualización *in vivo*. Es por ello que en este trabajo se establecerá una nueva metodología para el estudio de la localización subcelular de proteínas de interés *in vivo* de manera sistemática por medio del marcaje de estructuras subcelulares con proteínas fluorescentes que en conjunto con las cepas de la colección de proteínas fusionadas a la proteína verde fluorescente y podría ayudar a la determinación de la localización precisa de una proteína en diferentes condiciones.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Desarrollo de una metodología para el estudio de la localización de proteínas *in vivo* por medio de la co-localización con marcadores de estructuras celulares.

4.1.1 Objetivos particulares

- Construcción de plásmidos que contengan una proteína fluorescente (yEGFP, yEYFP, yECFP, mCherry y citrine) asociada a un marcador de selección (*HIS3*, *URA3*, KnMX, *hph*, y *NAT1*).
- Transformar las cepas silvestres con cada uno de los marcadores de estructuras subcelulares.
- Construir cepas que tengan uno, dos o tres marcadores de estructuras subcelulares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas y plásmidos utilizados para este proyecto se encuentran enlistadas en la tabla 5.1 y 5.2 respectivamente.

Levadura		
Nombre	Genotipo	Referencia
BY4742	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	21
	<i>MATa; his3Δ 1 leu2Δ met15Δ ura3Δ PBS2-yEGFP::HIS3</i>	
CHG017	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; VMA1-mCh::clonNAT</i>	Este trabajo
CHG018	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NRD1-yEYFP::HIS3; VMA1-mCh::clonNAT</i>	Este trabajo
CHG019	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NRD1-yEYFP::HIS3</i>	Este trabajo
CHG021	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; VMA1-mCh::clonNAT; SEC63-yEYFP::KnMX</i>	Este trabajo
CHG022	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NRD1-yEYFP::HIS3; VMA1-mCh::clonNAT; LEU9-yECFP::KnMX</i>	Este trabajo
CHG027	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; VMA1-yECFP::clonNAT</i>	Este trabajo
CHG028	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; LEU9-mCh::clonNAT</i>	Este trabajo
CHG029	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; SEC63-mCh::clonNAT</i>	Este trabajo
CHG032	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NUP49-mCh::KnMX; VMA1-yECFP::clonNAT</i>	Este trabajo
CHG034	<i>MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NRD1-mCh::KnMX; MATa; his3Δ 1 leu2Δ met15Δ ura3Δ PBS2-yEGFP::HIS3</i>	Este trabajo
Bacteria		
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galk rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tabla 5.1 Cepas empleadas en este estudio.

Los plásmidos utilizados presentan la siguiente estructura general: 1. cassette de resistencia a antibiótico para bacteria, 2. el linker para fusionar una proteína fluorescente; 3. el promotor del marcador de selección para levadura; 4. gen de resistencia a un antibiótico o gen de complementación para una auxotrofia; 5. el terminador del marcador de selección para levadura; 6. el sitio de origen de la replicación para bacteria, esta estructura se describe en la figura 5.1.

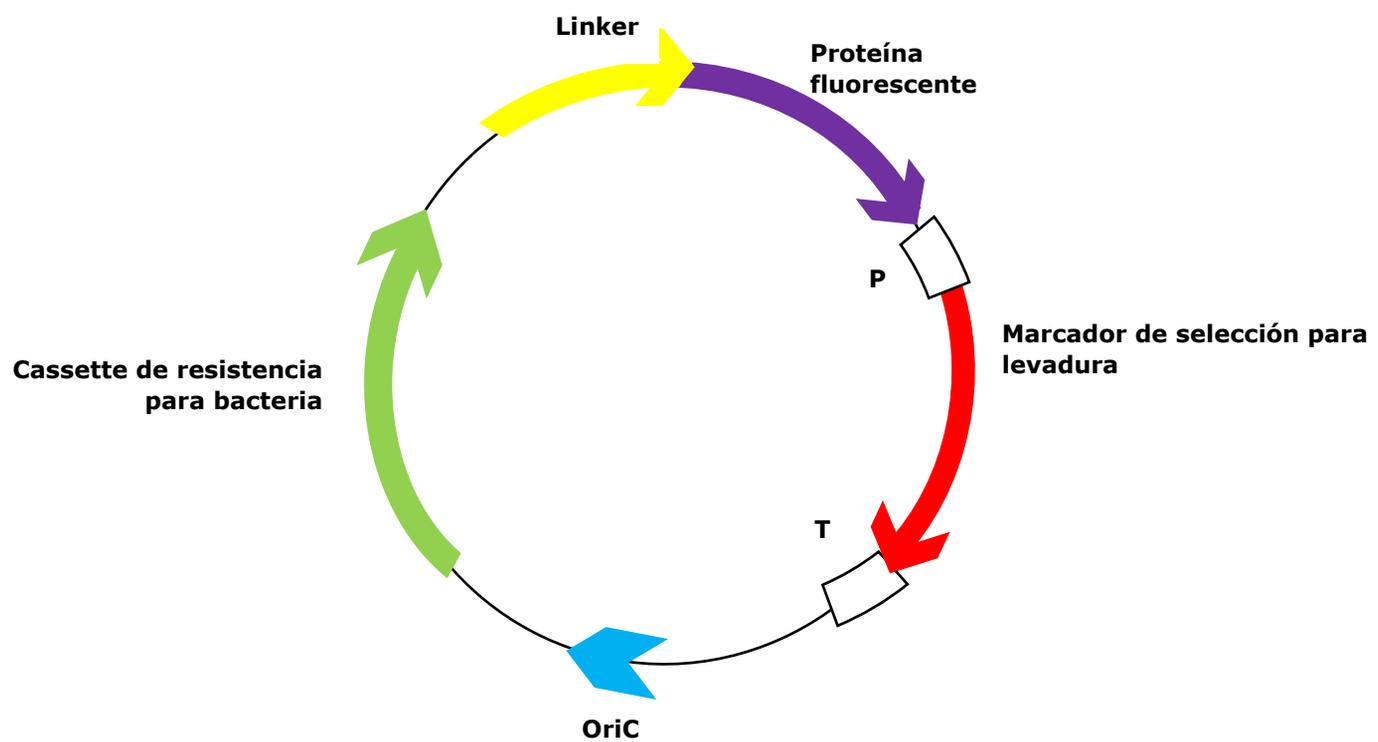


Figura 5.1 Esquema general de los plásmidos utilizados en este proyecto.

El diseño de los oligonucleótidos utilizados en este ensayo para amplificar secuencias de DNA mediante PCR fue a partir de los genes que codifican para proteínas específicas de cada estructura subcelular sentido 5' → 3' y fueron sintetizados por Sigma Aldrich (Tabla 5.3).

Plásmido	Descripción	Referencia
pAG25	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Contiene el gen <i>NAT1</i> que codifica para nourseotricina N-acetil-transferasa de <i>Streptomyces noursei</i> , ClonNat ^r para levaduras transformadas.	22
pAG32	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Contiene el gen <i>hph</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> que codifica para la higromicina B fosfotransferasa, hygrob ^r para levaduras transformadas.	22
pKT90	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yEVENUS y al marcador de selección <i>HIS5 (SpHIS5)</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> que complementa a <i>his3Δ</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
pKT103	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yEVENUS y al gen <i>kanMX</i> (G418 ^r) como marcador de selección para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
pKT127	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yEGFP y al gen <i>kanMX</i> (G418 ^r) como marcador de selección para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
pKT128	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yEGFP y contiene el marcador de selección <i>HIS5 (SpHIS5)</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> que complementa a <i>his3Δ</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
pKT140	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yEmCitrine y al gen <i>kanMX</i> (G418 ^r) como marcador de selección para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
pKT211	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yEmCitrine y al marcador de selección <i>HIS5 (SpHIS5)</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> que complementa a <i>his3Δ</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
pKT212	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente de pFA6a, contiene a la proteína fluorescente yECFP y al marcador de selección <i>URA3 (CaURA3)</i> de <i>Candida albicans</i> que complementa la mutación <i>ura3Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	15
pUG6	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Contiene al gen <i>kanMX</i> de Tn903 que confiere resistencia al antibiótico aminoglicósido G418 ^r para levaduras transformadas.	23
pBS35	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Contiene a la proteína fluorescente mCherry y además el gen <i>hph</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> que codifica para la higromicina B fosfotransferasa, hygrob ^r marcador de selección para levaduras transformadas.	24
pBS35+25	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Contiene a la proteína fluorescente mCherry y además al gen <i>NAT1</i> que codifica para nourseotricina N-acetil-transferasa de <i>Streptomyces noursei</i> , marcador de selección ClonNat ^r para levaduras.	Este trabajo
pGEMmCH14	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Vector pGEM T- easy (Promega) que contiene la inserción de la proteína fluorescente mCherry proveniente del plásmido pBS35+25, además del gen de resistencia a ClonNat ^r para levaduras transformadas.	Este trabajo
pCH13	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT90, contiene a la proteína fluorescente yEVENUS y contiene el marcador de selección <i>URA3</i> para levadura proveniente del plásmido pKT212.	Este trabajo
pCH14	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT90, contiene a la proteína fluorescente yEVENUS y contiene el marcador de selección hygrob ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG32).	Este trabajo
pCH15	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT90, contiene a la proteína fluorescente yEVENUS y contiene el marcador de selección ClonNAT ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG25).	Este trabajo

pCH23	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT128, contiene a la proteína fluorescente yEGFP y contiene el marcador de selección <i>URA3</i> para levadura proveniente del plásmido pKT212.	Este trabajo
pCH24	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT128, contiene a la proteína fluorescente yEGFP y contiene el marcador de selección hygrob ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG32).	Este trabajo
pCH25	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT128, contiene a la proteína fluorescente yEGFP y contiene el marcador de selección ClonNAT ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG25).	Este trabajo
pCH33	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT211, contiene a la proteína fluorescente yEmCitrine y contiene el marcador de selección <i>URA3</i> para levadura proveniente del plásmido pKT212.	Este trabajo
pCH34	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT211, contiene a la proteína fluorescente yEmCitrine y contiene el marcador de selección hygrob ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG32).	Este trabajo
pCH35	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT211, contiene a la proteína fluorescente yEmCitrine y contiene el marcador de selección ClonNAT ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG25).	Este trabajo
pCH41	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT212, contiene a la proteína fluorescente yECFP y contiene el marcador de selección G418 ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pUG6).	Este trabajo
pCH42	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT212, contiene a la proteína fluorescente yECFP y contiene el marcador de selección <i>HIS3</i> para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pKT90).	Este trabajo
pCH44	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT212, contiene a la proteína fluorescente yECFP y contiene el marcador de selección hygrob ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG32).	Este trabajo
pCH45	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pKT212, contiene a la proteína fluorescente yECFP y contiene el marcador de selección ClonNAT ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG25).	Este trabajo
pCH51	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pGEMmCh14, contiene a la proteína fluorescente mCherry y contiene el marcador de selección G418 ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pUG6).	Este trabajo
pCH52	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pGEMmCh14, contiene a la proteína fluorescente mCherry y contiene el marcador de selección <i>HIS3</i> para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pKT90).	Este trabajo
pCH53	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pGEMmCh14, contiene a la proteína fluorescente mCherry y contiene el marcador de selección <i>URA3</i> para levadura proveniente del plásmido pKT212.	Este trabajo
pCH54	Amp ^r en células de <i>E. coli</i> . Proveniente del plásmido pGEMmCh14, contiene a la proteína fluorescente mCherry y contiene el marcador de selección hygrob ^r para levaduras transformadas (proveniente del plásmido pAG32).	Este trabajo

Tabla 5.2 Composición de plásmidos utilizados en este proyecto.

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Descripción
VMA1F	TCGAAAAATTGTTGAGCACTATGCAAGAAAGATTTGCTGAATCTACCGATatcggtgacggtgctggttta	Oligo forward para fusionar VMA1 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
VMA1R	GAAGAAAAGACATCTAACAAATATACCAGAAGATAAATGCTACATATATCtggatggcggcggttagtatcg	Oligo reverse para fusionar VMA1 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
VMA1C	CGGCCTTGCTGATAGTG	Oligo C para confirmar fusión de VMA1 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
SEC63F	ATACTGATATCGATACGGATACAGAAGCTGAAGATGATGAATCACCAGAAatcggtgacggtgctggttta	Oligo forward para fusionar SEC63 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
SEC63R	AATATATACGTCTAAGAGCTAAAATGAAAACTATACTAATCACTTATATtggatggcggcggttagtatcg	Oligo reverse para fusionar SEC63 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
SEC63C	CATTAGGTCAGCCTGCACC	Oligo C para confirmar fusión de SEC63 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
SEC7F	CTATAAAACAATTTCTAAGCAGAGTTGGTGAATTATACCTTTCTACTGATatcggtgacggtgctggttta	Oligo forward para fusionar SEC7 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
SEC7R	GTGTTCTACAACCTAAGCATATTTAATCTGCTGGACCATTCAACAAAGCCtggatggcggcggttagtatcg	Oligo reverse para fusionar SEC7 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
SEC7C	ACGATGATGAGAAGAAGGC	Oligo C para confirmar fusión de SEC7 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
NRD1F	ATTCTTTGATGAATATGCTTAACCAACAGCAGCAGCAACAACAACAAGCatcggtgacggtgctggttta	Oligo forward para fusionar NRD1 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
NRD1R	GGTAGATTAGTTTTATGTAATGACTATGAGCAAATAAAGGGTGGAGTAAAGATCtggatggcggcggttagtatcg	Oligo reverse para fusionar NRD1 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
NRD1C	GATTCTGGCAGAAATGGGC	Oligo C para confirmar fusión de NRD1 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
PDR5F	TCTACTGGTTAGCAAGAGTGCCTAAAAGAACGGTAAACTCTCCAAGAAAatcggtgacggtgctggttta	Oligo forward para fusionar PDR5 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
PDR5R	AAAAAGTCCATCTTGGTAAGTTTCTTTTCTTAACCAAATTCAAAATTCTAtggatggcggcggttagtatcg	Oligo reverse para fusionar PDR5 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
PDR5C	GAATTCACACCACCATCCG	Oligo C para confirmar fusión de PDR5 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
LEU9F	TTGCTACTGTCAATAATATTATTCATTCCGGGGATGTTCTACTGGCAGAGatcggtgacggtgctggttta	Oligo forward para fusionar LEU9 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
LEU9R	TAAAAATACATATATATATAACATGAGTAATCATAAGCTACTCCTTTCTAtggatggcggcggttagtatcg	Oligo reverse para fusionar LEU9 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
LEU9C	GTCAACATCGAAGGCTACG	Oligo C para confirmar fusión de LEU9 con el gen que codifica para una proteína fluorescente
FluoR	ccttctggcatggcagact	Oligo para confirmar la fusión del gen que codifica para una proteína fluorescente (plásmidos pKT)
mChR	cgccgtcctgaagttcatc	Oligo para confirmar la fusión del gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry
linkermCherry	atcggtgacggtgctggtttaattaacatggtagcaagggcgaggag	Oligo forward para fusionar el linker de los plásmidos pKT a la proteína fluorescente mCherry
pVenusR	GTTTTGACACTGGATGGCGGCGTTAGTATactggatggcggcggttagtat	Oligo reverse para fusionar el terminador TEF-Term del gen NAT1 a la proteína mCherry

Tabla 5.3 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

5.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los cultivos de *E. coli* para la extracción de los plásmidos utilizados en este proyecto se realizaron en 5 mL de medio *Luria Bertani Broth* (LB broth, 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl pH 7.5) con Ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y se incubaron durante 16 horas a 37°C con agitación constante. Las placas utilizadas para cultivo de bacterias se realizaron con medio LB Broth agregando agar al 2% (Difco agar).

Las diferentes cepas de levadura se cultivaron en 5 mL de medio *Yeast Extract Peptone-Dextrose* (YPD medium: Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2% y glucosa 2%), se incubaron a 30°C durante toda una noche con agitación constante. Las placas para cultivo de levaduras se prepararon con medio YPD adicionado con 2% de agar. Cuando fue necesario se agregó antibiótico en las siguientes concentraciones: G418 100 µg/mL, Higromicina B 250 µg/mL y Neursotricina 100 µg/mL. Las levadura que de acuerdo a su marcador de selección fueran auxótrofas se cultivaron en medio mínimo (Minimum medium: Vitaminas 1000X 1% (biotina 0.0002%, pantotenato de calcio 0.04%, ácido fólico 0.0002%, niacina 0.04%, ácido p- aminobenzoico 0.02%, piridoxina- HCl 0.04%, riboflavina 0.02%, tiamina- HCl 0.04% e inositol 0.02%), trazas 1000X 1% (ácido bórico 0.05%, sulfato cúprico 0.004%, yoduro de potasio 0.01%, cloruro férrico 0.02%, sulfato manganeso 0.04%, molibdato de sodio 0.02% y sulfato de zinc 0.04%), sales 50X 1% (fosfato monopotásico 5%, sulfato de magnesio hepta hidratado 0.5%, NaCl 0.1%, CaCl₂ dihidratado 0.1% y agregar al final CHCl₃ 5mL), dextrosa 2% (NH₄)₂SO₄ 0.5%, Drop Out de aminoácidos -Lys, -Met 10X 1%; Lys 1mL, Met 1mL, His 1mL, Ura 1mL según fuese el caso, y se adicionaron estos aminoácidos según su auxotrofia.

5.3 Construcción de plásmido pBS35+25

El plásmido pBS35+25 contiene el marcador de selección clonNat para levaduras, en lugar del HygroB del plásmido pBS35 de Yeast Resource Center University of Washington; esto se logró digiriendo el plásmido pBS35 con enzimas de restricción *BglII* y *EcoRV* para extraer el gen *hph* que codifica para el antibiótico higromicina B fosfotransferasa, en su lugar se insertó mediante ligación el fragmento clonNAT que confiere resistencia a nourseotricina N-acetil-transferasa extraída del plásmido pAG25. Este proceso se realizó utilizando 5 U de cada enzima y se procedió de la misma manera que para la obtención de marcadores de selección y la construcción de plásmidos de las secciones 5.5 y 5.6 respectivamente

5.4 Construcción de plásmido pGEMmCh14

Para la obtención de un vector que contuviera a la proteína fluorescente mCherry y que además, tuviera el mismo linker que el de los plásmidos pKT's se construyó un nuevo plásmido utilizando el vector pGEM T-easy de Promega. La construcción del pGEMmCh14 consistió en la amplificación con DNA *Pfu* polimerasa, de la proteína fluorescente mCherry y su unión al linker utilizando 10 ng del plásmido pBS35+25 como templado; el oligo linkermCherry 10 mM que amplifica dirección 5´, 19 nt antes del linker y la secuencia del linker; y el oligo pVenusR 10 mM que amplifica sentido 3´ incluyendo el terminador del marcador clonNAT. El amplicon obtenido corresponde a 1973 pb y se ligó 1 µL de éste producto a 50 ng de pGEM®-T Easy Vector (Promega) con 10 U de T4 DNA Ligase, Rapid Ligation Buffer 2X y H₂O_d cbp 10 µL, se incubó toda una noche a 4°C. Se transformó a células competentes *E. coli* TOP 10 por heat shock (25) se plaqueó en cajas con medio LB con ampicilina y se incubó a 37°C durante toda una noche. A las clonas resultantes se les realizó digestiones de confirmación con las enzimas *BglII* y *EcoRI*.

5.5 Obtención de marcadores de selección y proteínas fluorescentes.

Se obtuvieron los genes que codifican para diferentes proteínas fluorescentes y marcadores de selección mediante la digestión de los plásmidos pKT90, pKT128, pKT211, pKT212, pUG6, pAG25 y pAG32, extraídos de cultivos de bacteria. La extracción de plásmido se realizó con el kit para extracción de plásmido ZR Plasmid Miniprep™-Classic de la marca *Zymo Research*, se transfirieron 5 mL de cultivo de bacteria correspondiente a cada plásmido a tubos de 1.5 mL y se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm para la obtención del precipitado de bacterias, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de P1 Buffer (rojo), se resuspendió completamente. Posteriormente se agregaron 200 µL de P2 Buffer (verde) y se mezcló por inversión de 2-4 veces y se dejó reposar 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 400 µL de P3 Buffer (amarillo, *Neutralization Buffer*) previamente enfriado a 4°C, se mezcló hasta observar precipitación y centrifugó cada tubo a 13,000 rpm durante 2 minutos para separar el precipitado de la muestra. Se transfirió el sobrenadante a columnas *Zymo-Spin™ IIN* contenidas en tubos colectores (incluidos en el kit) y centrifugó durante 30 segundos a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se adicionaron a la columna 200 µL de *Endo-Wash Buffer*, se centrifugó por 30 segundos, se desechó el sobrenadante y se centrifugó por 30 segundos adicionales para eliminar todos los restos de *Endo-Wash Buffer*. Se transfirió la columna a tubos limpios y etiquetados de 1.5 mL para eluir el plásmido purificado, se agregaron 50 µL de H₂O_d directamente a la columna cuidando humedecer por completo toda la superficie. Finalmente se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm.

La cuantificación de cada plásmido se realizó en Nanodrop (DNA quantification) dándonos valores en ng/ μ L.

Las enzimas utilizadas para cada digestión se seleccionaron de acuerdo a los mapas de restricción de los plásmidos (figura 5.2). Los plásmidos pKT90, pKT128, pKT211, pKT212, pUG6, pAG32 y pAG25 se digirieron con las enzimas de restricción **BglII** y **EcoRV**, dado que los sitios de corte de estas dos enzimas se encuentran en estos plásmidos para separar el marcador de selección y/o gen que codifica para proteína fluorescente según sea el caso. Para las construcciones con el plásmido pGEMmCh14, se digirió utilizando las enzimas **SacII** y **BglII** al igual que para los plásmidos que contienen los marcadores **HIS3**, **URA3** y KnMX (pKT90, pKT212 y pUG6 respectivamente), y con **ApaI** y **BglII** para la construcción del plásmido que contiene **hph** como marcador de selección (pAG32 se digirió con **BglII** y **EcoRV**). En la tabla 5.2 se describe la composición de los vectores (marcador de selección y/o proteína fluorescente), de acuerdo a los fragmentos que se necesitan para las construcciones.

Se digirió lo equivalente a 500 ng de plásmido puro con 5U de cada enzima (**BglII** 10 U/ μ L y **EcoRV** 10 U/ μ L de Thermo Scientific), 2 μ L de Buffer Orange 10X (buffer O de Thermo Scientific: Tris – HCl 50 mM pH 7.5 a 37°C, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y 0.1 mg/mL de BSA) y H₂O_d cbp un volumen final de 20 μ L, se incubó a 37°C durante 120 minutos. Para la digestión de pGEMCh14 se utilizó 5 U de la enzima **SacII** 10U/ μ L de Thermo Scientific y Buffer Blue 10X (buffer B de Thermo Scientific: Tris-HCl 10 mM pH 7.5 a 37°C), MgCl₂ 10 mM y 0.1 mg/ml BSA), o bien 5 U de **ApaI** 10 U/ μ L de New England Biolabs, 2 μ L de Buffer 4 NEB 10X (buffer 4NEB: Acetato de potasio 50 mM, Tris acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM y DTT 1mM, pH 7.9 a 25°C) y H₂O_d cbp un volumen final de 20 μ L, se incubó a 37°C durante 120 minutos.

Se corrió en electroforesis el volumen total de cada digestión por separado en gel de agarosa al 0.8% y se utilizó buffer SB 1X (Buffer SB 20X: 45 g de H₃BO₃ y 8 g de NaOH disueltos en 1 L de H₂O_d). La electroforesis se llevó a cabo durante 50 minutos a 150 volts. Cada fragmento de interés (digestión de plásmido) se cortó directamente del gel considerando el tamaño esperado en pb en cada caso descritos en la tabla 5.4. Se purificó con el kit QIAquick® Gel Extraction QIAGEN para purificación de gel, agregando 3 volúmenes correspondientes al peso total del fragmento de gel, de **Buffer QG** en un tubo de 1.5 mL (Ej. Si pesa 100 mg, añadimos 300 μ L). Posteriormente se incubó a 50°C durante 10 minutos, se añadió un volumen de 2-propanol correspondiente al peso total del fragmento de gel, se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se transfirió cada muestra a columnas con tubo colector incluidas en el kit por separado. Se centrifugó 1 minuto a 13,000 rpm y retiró el sobrenadante. Se agregaron

500 μL de *Buffer QG* y se centrifugó 1 minuto adicional. El líquido colectado en el tubo se deshecho y se agregaron 750 μL de *PE buffer* y se centrifugó por 1 minuto más. Las columnas se colocaron en tubos de 1.5 mL limpios y etiquetados para eluir las fracciones purificadas, se agregaron 50 μL de H_2O_d , directamente en la membrana hasta humedecer toda la superficie de la columna, se centrifugo durante 1 minuto a 13,000 rpm. La cuantificación de cada fragmento se realizó en Nanodrop (DNA quantification) dándonos valores en $\text{ng}/\mu\text{L}$. Las concentraciones en $\text{ng}/\mu\text{L}$ de cada plásmido puro se encuentran descritas en la tabla 5.4.

5.5.1 Extracción de fragmento *hph* para la construcción del plásmido pCH54

La digestión del plásmido pAG32 para la obtención del gen *hph* con las enzimas de restricción *ApaI* y *BglII* que liberan el gen *clonNAT* del plásmido pGEMmCh14 no corresponde con la liberación del gen *hph*, debido a que la enzima *ApaI* realiza un corte dentro de gen *hph*. La liberación del inserto *hph* se realizó digiriendo el plásmido pAG32 con las enzimas *BglII* y *EcoRV*, mientras que el vector que contiene a la proteína fluorescente se obtuvo mediante tres pasos: 1. La digestión de lo correspondiente a 1 μg de plásmido pGEMmCh14 con 5 U de enzima *ApaI* de New England Biolabs, posteriormente se purificó la digestión mediante el kit GeneJET PCR Purification de Thermo Scientific; 2. Se rellenó utilizando fragmento Klenow (Invitrogen) de los extremos 3' del vector digerido para la obtención de extremos como que pueda ser ligado al extremo digerido por *EcoRV* del inserto *hph*: Se añadieron a 15 μL de la digestión de pGEMmCh14, 2 U de fragmento Klenow 2 U/ μL de Thermo Scientific, dNTPs 0.05 mM, 2 μL de Buffer Klenow 10X (Tris-HCl 500mM pH 8.0 a 25°C, MgCl_2 50 mM, DTT 10 mM) y H_2O_d cpb una reacción de 20 μL totales, al final se incubó durante 15 minutos a 37°C. Consecutivamente se purificó directamente de gel de agarosa de bajo punto de fusión y 3. La digestión con *BglII* para la liberación del fragmento *clonNAT* para la obtención del vector con extremos iguales al inserto *hph*, por último se purificó de gel el fragmento correspondiente al vector y se ligó con el inserto.

Fragmento	<i>HIS3</i>	<i>URA3</i>	<i>KnMX</i>	<i>clonNat</i>	<i>hph</i>	<i>yEYFP</i>	<i>yEGFP</i>	<i>yECitrine</i>	<i>yECFP</i>	<i>mCherry</i>
Tamaño en pb	1300 pb	1462 pb	1501 pb	1222 pb	1678 pb	3434 pb	3434 pb	3434 pb	3434 pb	3751 pb
Concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$	4.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$	11.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$	4,6 $\text{ng}/\mu\text{L}$	5.8 $\text{ng}/\mu\text{L}$	5.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$	5.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$	6.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$	6.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$	4.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$	3.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$

Tabla 5.4 Fragmentos utilizados para las construcciones, peso en pb y concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$.

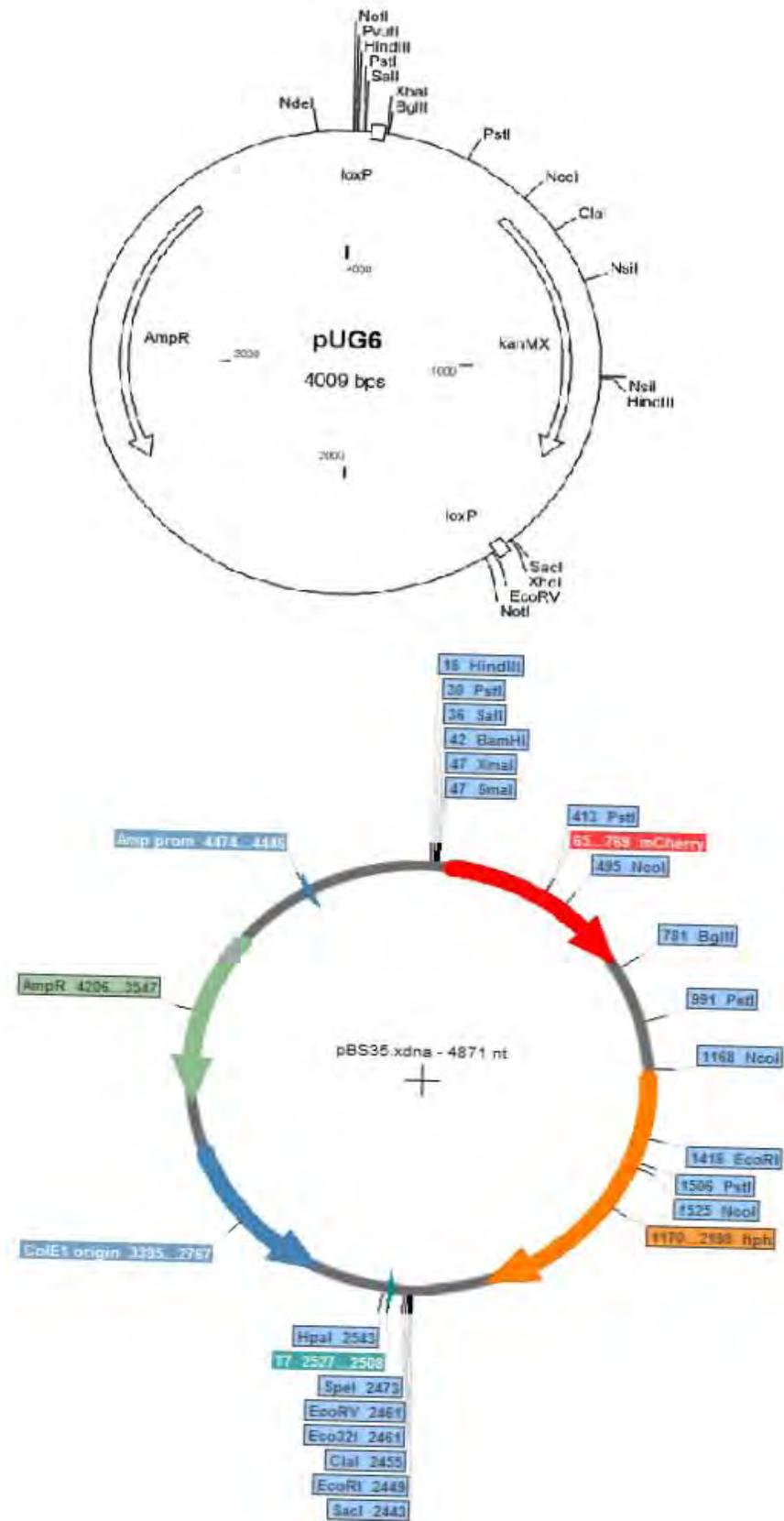


Figura 5.2 Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en este trabajo, pUG6 y pBS35.

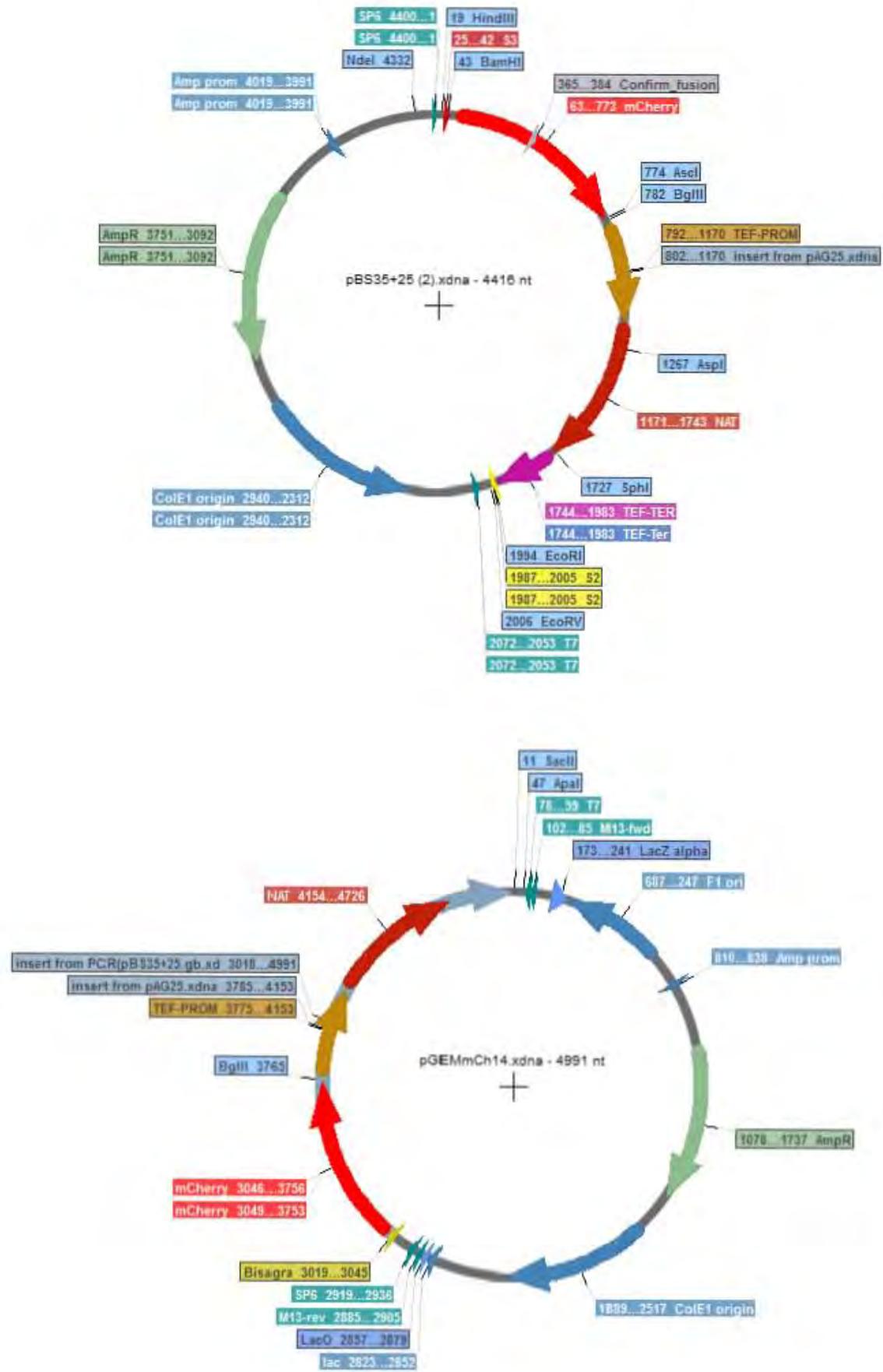


Figura 5.3 Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en este trabajo, pBS35+25 y pGEMmCh14.

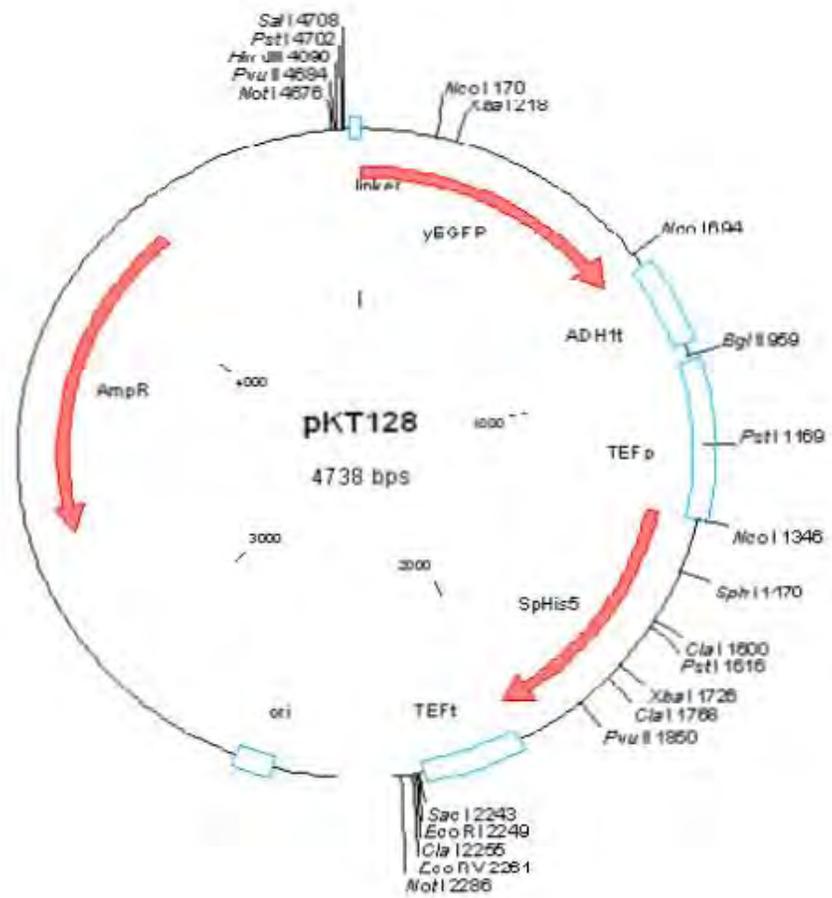
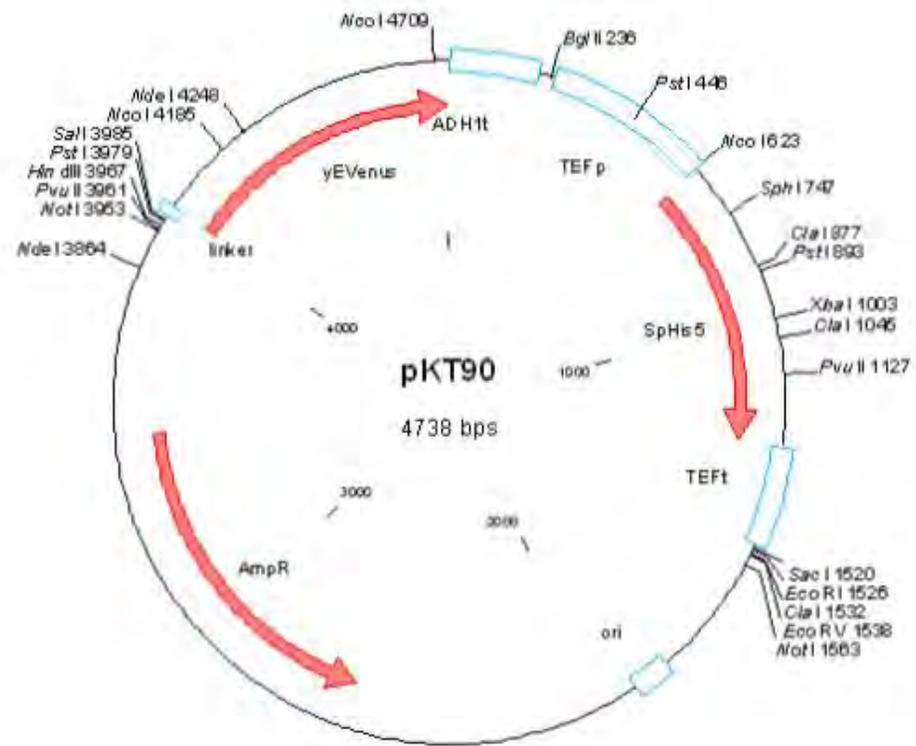


Figura 5.4 Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en este trabajo, pKT90 y pKT128.

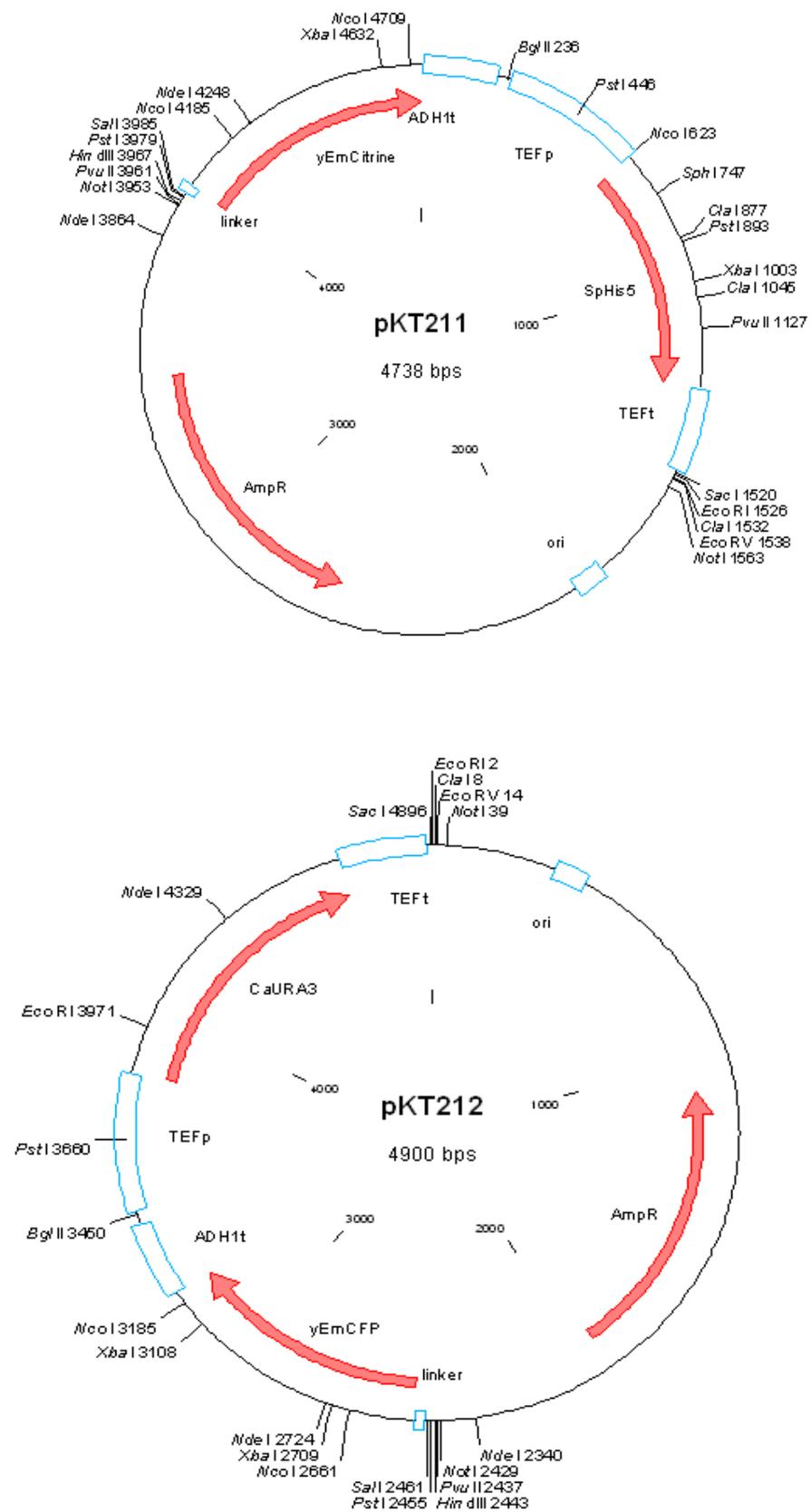


Figura 5.5 Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en este trabajo, pKT211 y pKT212.

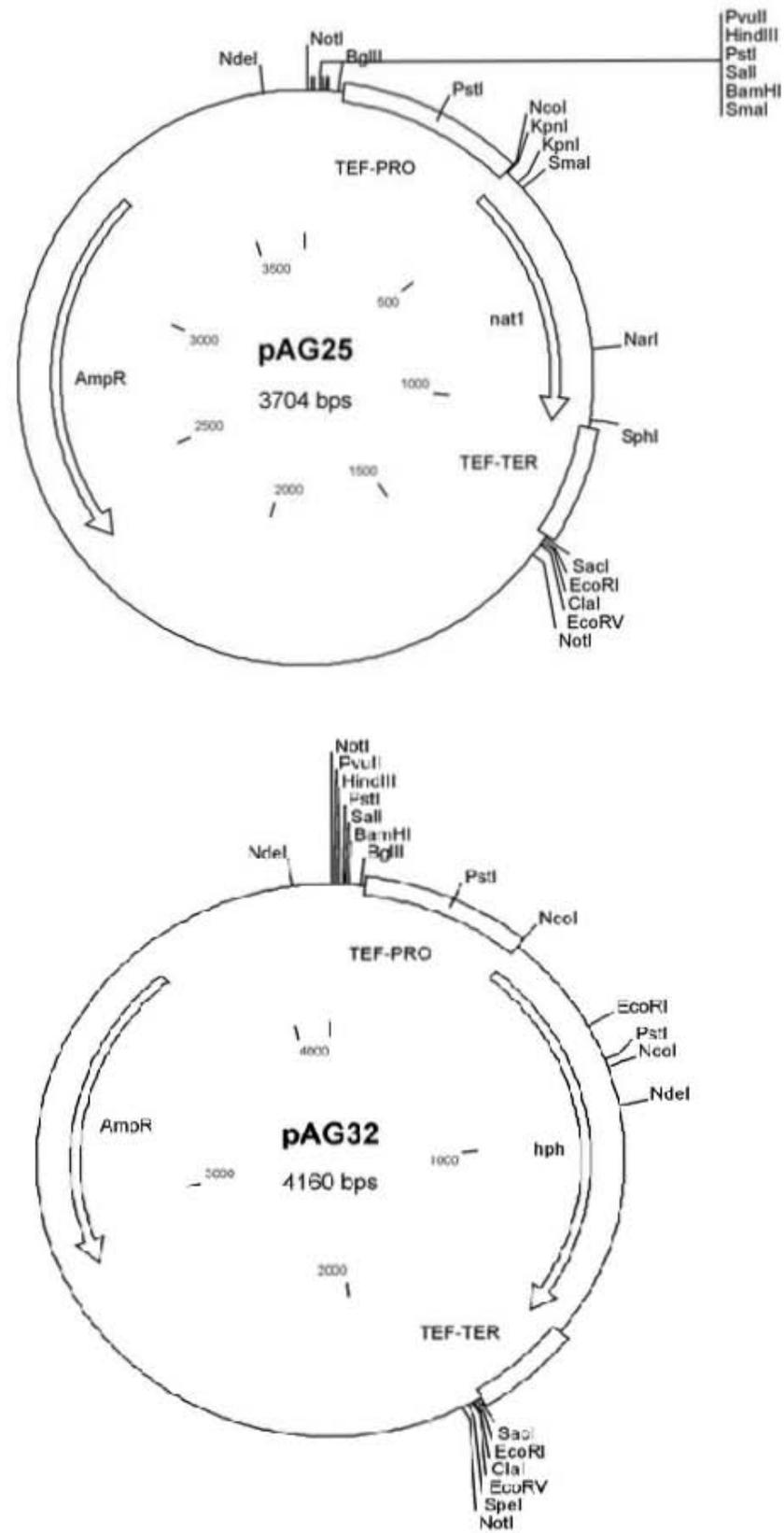


Figura 5.6 Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en este trabajo, pAG25 y pAG32.

5.6 Construcción de plásmidos (marcador de selección – proteína fluorescente).

Se ligó en relación 1:3 de cada proteína fluorescente (vector) con cada marcador (inserto) como se describe en la tabla 5.5 con la finalidad de obtener diferentes combinaciones de marcadores de selección con proteínas fluorescentes. Las ligaciones se realizaron utilizando 2 U de T4 DNA ligasa 1 U/ μL de Invitrogen, y se mezcló con 10 μL de inserto con 1.5 μL de vector (para tener una proporción de 3:1 de inserto: vector) y 10 U de T4 DNA ligasa de Promega, Buffer 1X de T4 DNA ligasa, además de H_2O_d cbp 20 μL de volumen final para cada reacción. Las ligaciones se incubaron a 4°C durante 16 horas.

Las reacciones resultantes se transformaron por choque térmico a células de *E. coli* TOP 10 preparadas por el protocolo Fresh competent *E. coli* Prepared Using Rubidium Chloride (25). Primeramente se inoculó una colonia de células de *E. coli* TOP 10 en 250 mL de medio LB que contenía 20 mM de MgSO_4 , se crecieron las células en un matraz de 1 L hasta conseguir una OD_{600} de entre 0.4 – 0.6 (aproximadamente en 2-3 horas), en este paso es importante que el cultivo se realice en un matraz de 1 L, debido a que así se mantiene una mejor oxigenación del cultivo durante el crecimiento, se centrifugó durante 5 minutos a 4,500 rpm a 4°C usando 2 tubos esteriles de 50 mL, se resuspenden los precipitados en 0.4 volúmenes de TBF1 previamente enfriado (TBF1: 30 mM potassium acetate, 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 100 mM RbCl , 15% glicerol, pH a 5.8 con ácido acético 1M preparado con ácido acético glacial, se filtra con membranas de 0.2 μm), en este paso la suspensión no se logra por completo y se debe cuidar pipetear muy bien. Después se combinaron los pellets en un solo tubo y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos así como las pipetas, se obtuvo el precipitado de células centrifugando a 4,500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se resuspendieron las células en 1/25 partes del cultivo inicial de TBF2 previamente enfriado (TBF2: MOPS 10 mM, CaCl_2 75 mM, RbCl 10 mM y glicerol al 15%, se ajustó el pH a 6.5 con KOH 1M y se filtró con membrana de 0.2 μm). Se incubaron las células en hielo durante 50 minutos y después se alicuotó en tubos de 1.5 mL previamente enfriados, los tubos se enfrían rápidamente con N_2 líquido y se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

La transformación se realizó bajo el protocolo Transformation of *E. coli* by thermal shock (25), mezclando en completa esterilidad una alícuota de 200 μL de células competentes de bacteria, con los 20 μL resultantes de cada reacción de ligación en un tubo de 1.5 mL. Las células se incubaron durante 15 minutos en hielo, después se provocó choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se regresó a hielo durante 5 minutos más. Las células se recuperaron mezclándolas con 500 μL de medio LB a una temperatura constante de 37°C durante 45 minutos. Las células se centrifugaron durante 1 minuto a 13,000 rpm se desechó el sobrenadante decantando en esterilidad y se resuspendieron las células con

el líquido sobrante después de la decantación. Las células transformadas se plaquearon utilizando perlas de vidrio limpias y estériles en cajas con medio LB agar con ampicilina 100 µg/ml e incubaron a 37°C durante toda una noche.

Para la purificación de plásmido, se realizaron parches de 8 colonias resultantes de la transformación y se purificaron recogiendo el parche de células con la ayuda de un palillo estéril. Las células se resuspendieron en 50 µL de H₂O_d estéril por separado, se adicionó a cada tubo 300 µL de TENS Buffer (TENS Buffer: 10 mM Tris – HCl pH 8.0, EDTA 1mM, NaOH 0.1 N, SDS 0.5% w/v) y se vortexeó hasta notar que la muestra se tornó pegajosa, agregamos 100 µL de NaCH₃COO pH 5.2, 3M y mezclamos completamente. Se centrifugó durante 13 minutos a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio y estéril, después se mezcló con 900 µL de EtOH al 100% para precipitar el plásmido y centrifugamos durante 5 minutos. Se retiró el EtOH mediante una bomba de vacío y se resuspendió cada muestra con 1 mL de EtOH al 70%. Cada muestra se centrifugó para precipitar el DNA, se decantaron los tubos para quitar el etanol y se dejaron durante toda una noche los tubos abiertos a temperatura ambiente para eliminar por evaporación completamente el etanol en cada muestra (también se puede secar cada muestra durante 30 minutos un baño maría a 42°C), al final se resuspendió cada muestra seca con 50 µL de H₂O_d estéril.

5.7 Comprobación de inserción de marcador de selección al vector correspondiente para cada plásmido construido.

Se digirió cada construcción con enzima(s) de restricción que realizan cortes únicos dentro del marcador de selección en las construcciones realizadas para considerar como positivas aquellas que lograran liberar fragmentos esperados acorde al tamaño calculado para cada plásmido. Las enzimas utilizadas para los cortes específicos se seleccionaron a partir del análisis de sitios únicos de corte utilizando el software *Serial Cloner 2.6.1*, se utilizó la enzima *EcoRI* para los marcadores *URA3* y *hph*, *HindIII* para KnMX, *XbaI* para *HIS3* y *SmaI* junto con *EcoRV* para el marcador clonNAT. En el caso de las comprobaciones para las construcciones que contienen a la proteína fluorescente mCherry las enzimas de restricción fueron distintas, esto debido a que el vector está constituido de manera distinta a los demás plásmidos y contiene sitios de corte que no nos ayudaron a evidenciar diferencias con el plásmido de referencia, en este caso se utilizaron las enzimas *HindIII* y *XhoI* para el marcador KnMX, *PstI* para *HIS3*, *EcoRI* para *URA3* y *EcoRI* para *hph*.

En cada caso, se digirieron 10 μ L de cada construcción purificada con anterioridad, con 5 U de cada enzima, 2.0 μ L de Buffer correspondiente y H₂O_d cpb para un volumen final de 20 μ L para cada reacción, todas las digestiones se incubaron a 37°C durante 180 minutos.

Número asignado para nomenclatura de plásmidos construidos		1	2	3	4	5
Marcador de selección		KnMX 4,6 ng/ μ L	<i>HIS3</i> 5,3 ng/ μ L	<i>URA3</i> 11,1 ng/ μ L	<i>hph</i> 5,5 ng/ μ L	clonNat 5,8 ng/ μ L
Proteína fluorescente						
1	yEYFP 5,9 ng/ μ L	pKT103	pKT90	pCH13	pCH14	pCH15
2	yEGFP 5,3 ng/ μ L	pKT127	pKT128	pCH23	pCH24	pCH25
3	yECitrine 6,7 ng/ μ L	pKT140	pKT211	pCH33	pCH34	pCH35
4	yECFP 4,1 ng/ μ L	pCH41	pCH42	pKT212	pCH44	pCH45
5	mCherry	pCH51	pCH52	pCH53	pCH54	pGEMmCh14

Tabla 5.5 Combinación de marcadores de selección con proteínas de fluorescencia. Nomenclatura de plásmidos construidos (rojo). Los plásmidos en color negro se refieren a plásmidos que ya existían en nuestro laboratorio.

Cada digestión se corrió en gel de agarosa al 0.8%, con Buffer SB 1X durante 50 minutos a 150 volts. Se consideró como positivas a aquellas clonas que al digerirlas liberaban fragmentos distintos al de los plásmidos iniciales de los cuales se obtuvo el inserto o marcador, los cortes con cada enzima en específico se realizaron dentro del inserto en cada plásmido construido con la finalidad de corroborar si la inserción dentro del vector se había logrado. Se compararon los tamaños de las bandas liberadas por cada digestión de plásmido construido contra la digestión con las mismas enzimas de restricción de cada plásmido de referencia de los cuales se obtuvieron los vectores utilizados para cada construcción.

Plásmido construido en este trabajo	Plásmido de referencia (vector)	Enzima de restricción	Fragmentos liberados en el plásmido construido en pb	Fragmentos liberados en el plásmido de referencia en pb
pCH13		<i>EcoRI</i>	3969, 931	
pCH14	pKT90	<i>EcoRI</i>	4083, 1033	
pCH15		<i>SmaI/EcoRV</i>	3872, 788	
pCH23		<i>EcoRI</i>	3969, 931	
pCH24	pKT128	<i>EcoRI</i>	4083, 1033	4738
pCH25		<i>SmaI/EcoRV</i>	3872, 788	
pCH33		<i>EcoRI</i>	3969, 931	
pCH34	pKT211	<i>EcoRI</i>	4083, 1033	
pCH35		<i>SmaI/EcoRV</i>	3872, 788	
pCH41		<i>HindIII</i>	3000, 1939	4900
pCH42	pKT212	<i>XbaI</i>	3230, 1109	4501, 399
pHC44		<i>EcoRI</i>	4083, 1033	4738
pCH45		<i>SmaI/EcoRV</i>	3872, 788	
pCH51		<i>HindIII/XhoI</i>	4770, 516	No hay corte
pCH52	pGEMmCH14	<i>PstI</i>	3651, 578, 447, 409	4004, 578, 409
pCH53		<i>EcoRI</i>	3032, 1284, 931	2997 y 1994
pCH54		<i>EcoRI</i>	2969, 1328, 1033	2997 y 1994

Tabla 5.6 Digestiones de confirmación a plásmidos construidos. Tamaños esperados en pb comparados con las digestiones de plásmidos de referencia.

5.8 Fusión de plásmidos con genes de proteínas específicas de estructuras celulares.

Las fusiones transcripcionales se realizaron mediante PCR y para ello se utilizaron los plásmidos construidos como templado (10mM), los oligonucleótidos forward y reverse utilizados se encuentran descritos en la tabla 5.3 en una concentración 10 mM. Se amplificó utilizando 0.5 U de *Pfu* DNA polimerasa (Thermo Scientific), *Pfu* Polimerase Buffer + MgSO₄ 1X, dNTPs 10mM, y H₂O_d cbp un volumen total de 25 µL. La reacción se llevó a cabo a 94°C para la desnaturalización inicial durante 1 minuto, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento de 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 5 minutos y una extensión final de 10 minutos a 72°C (La temperatura

de alineamiento varió dependiendo la proteína que se deseaba amplificar). Las reacciones resultantes se corrieron en geles de agarosa al 0.8% para corroborar los tamaños esperados.

5.9 Transformación en células BY4742, elaboración de cepas con marcadores de estructuras celulares.

La transformación de las fusiones transcripcionales resultantes en células BY4742 se realizó mezclando el producto de PCR con una alícuota de células competentes de levadura preparadas bajo el siguiente protocolo: se dejó un pre-cultivo de células BY4742 en 5 mL de YPD, ese pre-cultivo se inoculó en 100 mL de YPD y se creció hasta alcanzar una OD_{600} de 0.5-0.7, se tomaron 50 mL del cultivo en tubos de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron en dos ocasiones con 5 mL de agua estéril, después se lavó el pellet con 5 mL de SORB esteril (SORB: LiOAc 100 mM, TRIS pH 8.0 10 mM, EDTA 1 mM y sorbitol 1M). Para la transformación se mezcló una alícuota de 20 μ L de células BY4742 con de 100 μ L de plate mixture (LiOAc 100 mM, Tris HCl pH8 10 mM, EDTA/NaOH 1mM pH8 y PEG 3350 40%), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Adicionamos 15 μ L de DMSO e incubamos a 42°C durante 15 minutos, se centrifugó 30 segundos a 13,000 rpm y se retiró el sobrenadante, añadimos 200 μ L de YPD e incubamos a 30°C durante 4 horas, después se plaqueó en cajas con YPD con el marcador de selección que contiene el plásmido utilizado. Se incubó a 30°C durante 2-3 días. En el caso de la inserción de 3 productos de PCR para una cepa, a partir de la segunda inserción se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante con un producto de PCR en YPD líquido a 30°C toda hasta alcanzar una OD_{600} de 0.5, se obtuvo el precipitado de células centrifugando en tubos de 50 mL a 2500 rpm durante 10 minutos y lavando dos veces con 5 mL de H_2O_d y resuspendió en 1 mL de H_2O_d y se obtuvo precipitado, las células se lavaron con 1 mL de de TE/LiOAc (TE 10X pH7.5, LiOAc 10X pH7.5) (TE buffer 10X contiene Tris HCl 100mM y EDTA pH8 10mM) y se resuspendieron en 1/100 volúmenes de TE/LiOAc. Se mezclaron 50 μ L de células con 1 μ L de producto de PCR y con 5 μ L de DNA de esperma de Salmón, se añadieron 300 μ L de PEG/LiOAc/TE 40% (1 vol. De TE 10X, 1 vol. De LiOAc 10X y 8 volúmenes de PEG 40%), se mezcló e incubo a 30°C durante 30 minutos, se agregó 15 μ L de DMSO y se dio choque térmico a 42°C por 15 minutos, se centrifugó 30 segundos y el precipitado se resuspendió en 1 mL de YPD, incubamos a 30°C durante 4 horas. Las células se plaquearon en cajas de selección, se incubo a 30°C durante 2-3 días. Este proceso se repitió para la inserción del tercer producto de PCR.

La comprobación de la fusión de los plásmidos con los ORF de proteínas específicas de estructuras celulares después de la transformación a células BY4742, se realizó PCR de colonia a 3 colonias

resultantes. La reacción se llevó a cabo con 0.6 U de Taq polimerasa (Invitrogen), Taq Polimerase Buffer 1X, dNTPs 10mM, MgCl₂ 50 mM y los oligos de confirmación correspondientes a los productos obtenidos en una concentración de 10 mM, y H₂O_d cbp un volumen total de 20 µL. El programa que se utilizó en el termociclador consistió en una reacción a 94°C de desnaturalización inicial durante 10 minutos, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento de 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 10 minutos a 72°C (La temperatura de alineamiento varió dependiendo la fusión que se deseaba comprobar). Las reacciones resultantes se corrieron en geles de agarosa al 0.8% considerándose como positivas aquellas que produjeran un amplicon del tamaño esperado. Cuando fue necesario se purificó DNA genómico de cada cepa, esto debido a que en ocasiones no se lograba amplificar el producto de una cepa transformada directamente de una colonia. La purificación de DNA genómico se realizó a un cultivo de 10 mL de células a 30°C en constante agitación, al cual se le extrajo el precipitado centrifugando durante 3 minutos a 4000 rpm, el sobrenadante se removió y el precipitado se resuspendió en 500 µL de H₂O_d estéril para lavar. Las células se transfirieron a tubos de 1.5 mL y centrifugamos a 13 000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el agua residual contenida en el tubo. Posteriormente se agregaron 200 µL de solución QTP (Triton 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris- HCl pH 8, EDTA 1mM) y 200 µL de fenol – cloroformo en relación 1: 1. Se vortexeó durante 4 minutos y se añadieron 200 µL de TE buffer pH 8 (Tris- HCl 10 mM, EDTA 1 mM), centrifugamos durante 5 minutos a 13 000 rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos de 1.5 mL limpios, se agregó 1 mL de EtOH absoluto previamente frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó 2 minutos a 13 000 rpm se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 400 µL de buffer TE 1X y adicionalmente 3 µL de RNasa 10mg/mL, además se incubó 5 minutos a 37°C. Se agregaron 10 µL de acetato de amonio 4 M además de 1 mL de EtOH absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó 2 minutos, se descartó el sobrenadante con ayuda de vacío y se resuspendió en 50 µL de H₂O_d.

5.10 Obtención de cepas diploides

Las células diploides se obtuvieron mediante el apareamiento de células con diferente sexo: MAT_a y MAT_α, BY4741 y BY4742 respectivamente. En 5 mL de medio YPD se inoculó una porción de células (previamente estriadas en placas con medio de selección) correspondiente a las tomadas con un palillo y se resuspendieron en el medio. Se dejó crecer toda una noche a 30°C con agitación constante. Al día siguiente se tomó una porción del cultivo y se estriaron en placas con selección –Lys –Met marcadores de auxotrofia de las cepas silvestres BY4742 y BY4741 respectivamente. Aquellas clonas que fueron

capaces de crecer en el medio se consideraron positivas y se almacenaron en medio para su conservación y análisis.

5.11 Localización de estructuras subcelulares marcadas en células de *S. cerevisiae* BY4742

Se prepararon laminillas que contenían 7 μ L de cultivo de las cepas transformadas crecidas en medio YPD. Las laminillas se observaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 para localizar las estructuras subcelulares marcadas. El tiempo de exposición para excitar las señales de fluorescencia varía de acuerdo a cada proteína en específico, los filtros utilizados fueron seleccionados de acuerdo al color de interés: filtro 1 para proteínas dentro del intervalo de los azules; filtro 2 que abarca el intervalo de los amarillos-verdes; y el filtro 3 correspondiente al intervalo naranjas-rojos. Las condiciones para la localización de las diferentes proteínas se describen en la tabla 5.8. La microscopía de fluorescencia para la detección de las estructuras marcadas con proteínas fluorescentes consistió en la re-irradiación de la luz que absorben las proteínas mientras son excitadas. La técnica se fundamenta en la luz emitida por el fluoróforo la cual tiene una mayor longitud de onda y una menor intensidad que la luz de excitación, por lo tanto, si un material es excitado con luz de un determinado color (por ejemplo azul) la luz emitida será de otro color, correspondiente a una de mayor longitud de onda (por ejemplo verde). Estas moléculas no solo emiten fluorescencia sino que también reflejan la luz de la excitación, además pueden emitir una fluorescencia extra que no es de interés, y esto puede evitarse utilizando un filtro de excitación que permite excitar solo el fluoróforo de interés o usando un filtro barrera que solo deje pasar la longitud de onda (el color) de interés.

Proteína fluorescente	Filtro en microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51)	Tiempo de exposición milisegundos
yEYFP	2	1500
yEGFP	2	1500
yEmCitrine	3	800
yECFP	1	50
mCherry	3	800

Tabla 5.7 Uso de filtros y tiempo de exposición de acuerdo a cada proteína fluorescente en específico.

Se utilizó el microscopio confocal Leica el cual emplea un sistema láser que amplifica el haz de luz en forma de barrido, en una parte de las células el láser aplicado a una longitud de onda determinada provoca que sus moléculas excitadas emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada.

Para esto se obtuvo un precipitado de 10mL de cultivo y se fijaron con 100 μ L de solución FS-PBS (paraformaldehído al 4% y sucrosa 3.4% diluidas en solución PBS 1X), se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, y sucesivamente se realizaron lavados con 1 mL de buffer PBS 1X en tres ocasiones, al final se resuspendió el precipitado en 1 mL y se conservaron a -20 °C. De la preparación anterior, se tomaron 7 μ L y se colocaron en una laminilla, se dejó reposar durante unos minutos y se selló con barniz.

No.	Filtro	Intervalo en nm de excitación del filtro	Intervalo en nm de barrera del filtro
1	Azul	425-445 nm	460-510 nm
2	Amarillo	460-480 nm	495-540 nm
3	Rojo	490-500 nm	515-560 nm

Tabla 5.8 Intervalos de excitación y de barrera de cada filtro en específico

5.12 Cinética de crecimiento

Para la evaluación del crecimiento de las cepas elaboradas en este trabajo se realizaron ensayos de cinética de crecimiento. Las cepas se inocularon en placas de 96 pozos estériles con 150 μ L de medio YPD. Se inocularon células tomadas de una colonia en medio YPD y se dejaron crecer durante toda una noche a 30°C, de cada cepa se realizaron 5 réplicas provenientes de 5 colonias diferentes. De los cultivos anteriores se realizó una dilución 1:10 en 100 μ L de H₂O_d para medir la O.D.₆₀₀ y así poder ajustar la O.D.₆₀₀ a 0.1 en 150 μ L de YPD en todos los cultivos. Una vez ajustada la O.D. la placa se sometió a lecturas cada 15 minutos durante 24h en Microplate Reader Standard Operating Procedure Synergy-HT Bio-Tek que mantenía la placa a 30°C y agitación constante. Al finalizar las 24h se analizaron los datos de O.D. y se realizaron curvas de crecimiento graficando tiempo vs O.D.₆₀₀.

6. RESULTADOS

6.1 Construcción de plásmidos

La elaboración de cada plásmido consistió en la inserción de un marcador de selección a un vector que contiene una proteína fluorescente. Las construcciones se comprobaron realizando cortes específicos para cada marcador de selección, mismos que se seleccionaron de acuerdo al análisis de restricción de cada caso en particular. Cada digestión de plásmidos construidos se comparó con la digestión de un plásmido de referencia, siendo en cada caso, el plásmido de donde proviene el vector, es decir, el plásmido que contiene la proteína fluorescente, el origen de replicación y marcador de selección para bacteria, además del linker (secuencia entre proteína de interés y proteína fluorescente). Las enzimas utilizadas y los tamaños esperados para cada digestión en particular se encuentran descritos en la tabla 5.6.

6.1.1 Obtención de marcadores de selección para levadura

Los marcadores de selección para levadura *clonNAT*, *KnMX*, *hph*, *URA3* e *HIS3* extraídos de los plásmidos *pAG25*, *pUG6*, *pAG32*, *pKT212* y *pKT90* respectivamente, se obtuvieron mediante cortes con enzimas de restricción descritas en la parte 5.5. Los tamaños de los insertos correspondientes a los marcadores de selección para levadura que se utilizaron para las nuevas construcciones además contienen al promotor y terminador del gen que codifica para el marcador se encuentran descritos en la figura 6.1 y los tamaños de los vectores se muestran en la figura 6.2.

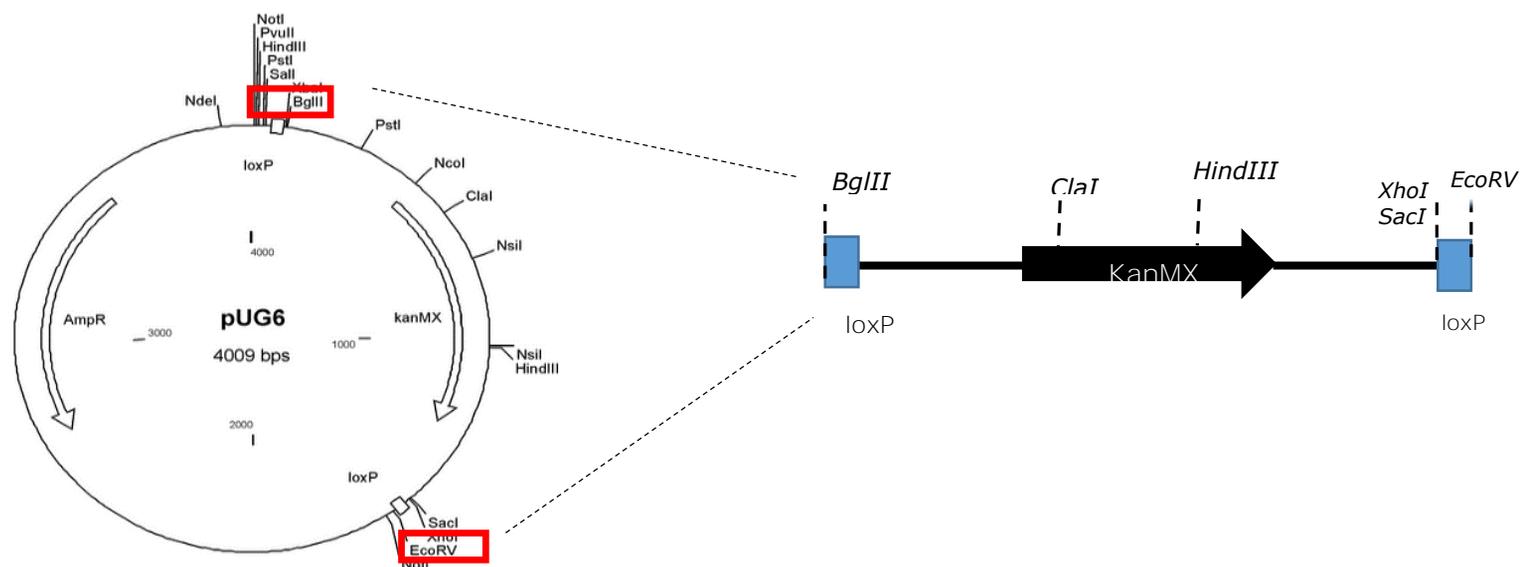


Figura 6.1 Digestión con enzimas *BglII* y *EcoRV* del plásmido pUG6 que libera el marcador *KnMX* (G418), de la misma manera que ocurre para la obtención de los demás marcadores de selección

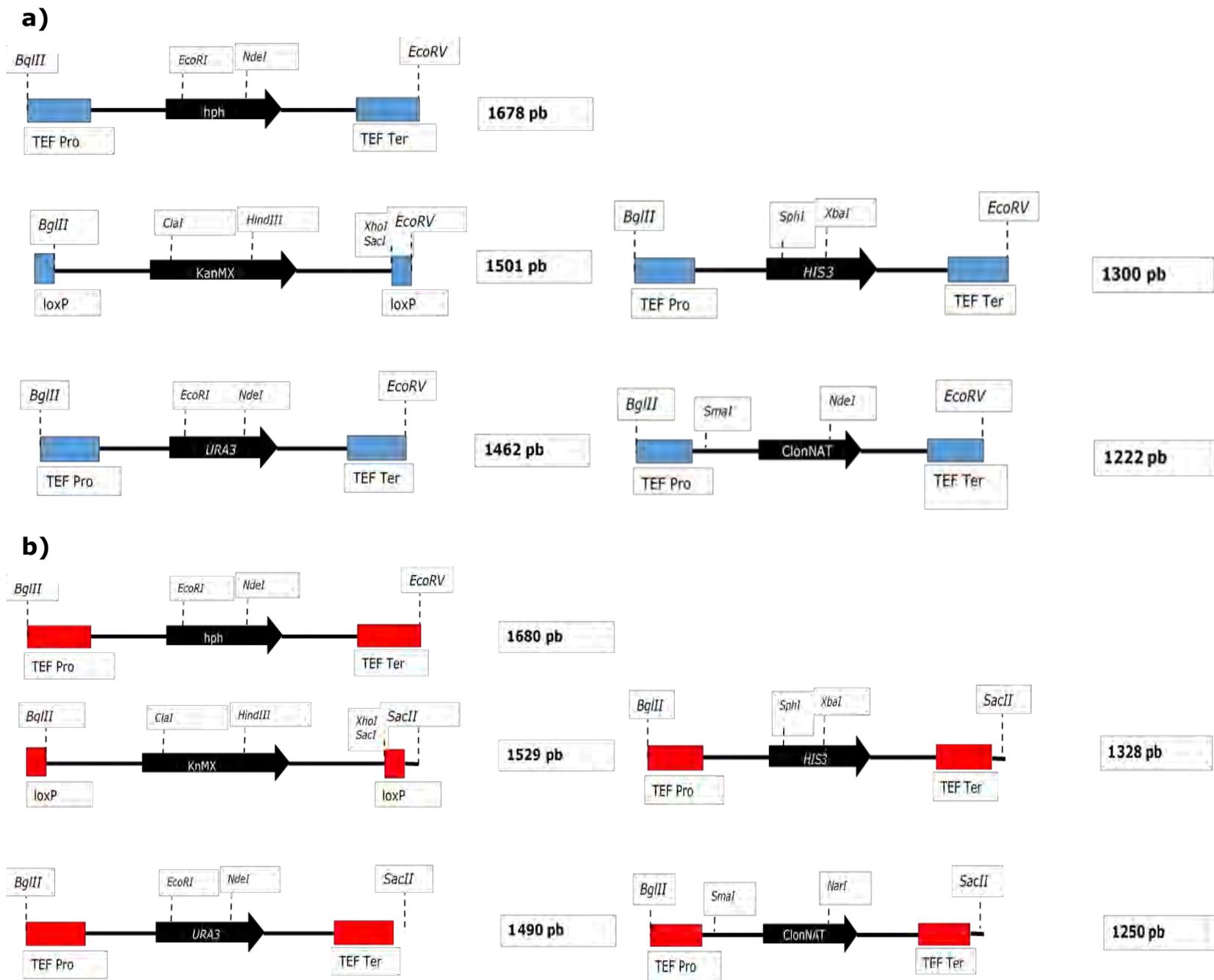


Figura 6.2 a) Fragmentos correspondientes a los marcadores de selección liberados; b) Fragmentos correspondientes a los marcadores de selección que se utilizaron para las construcciones con la proteína fluorescente mCherry.

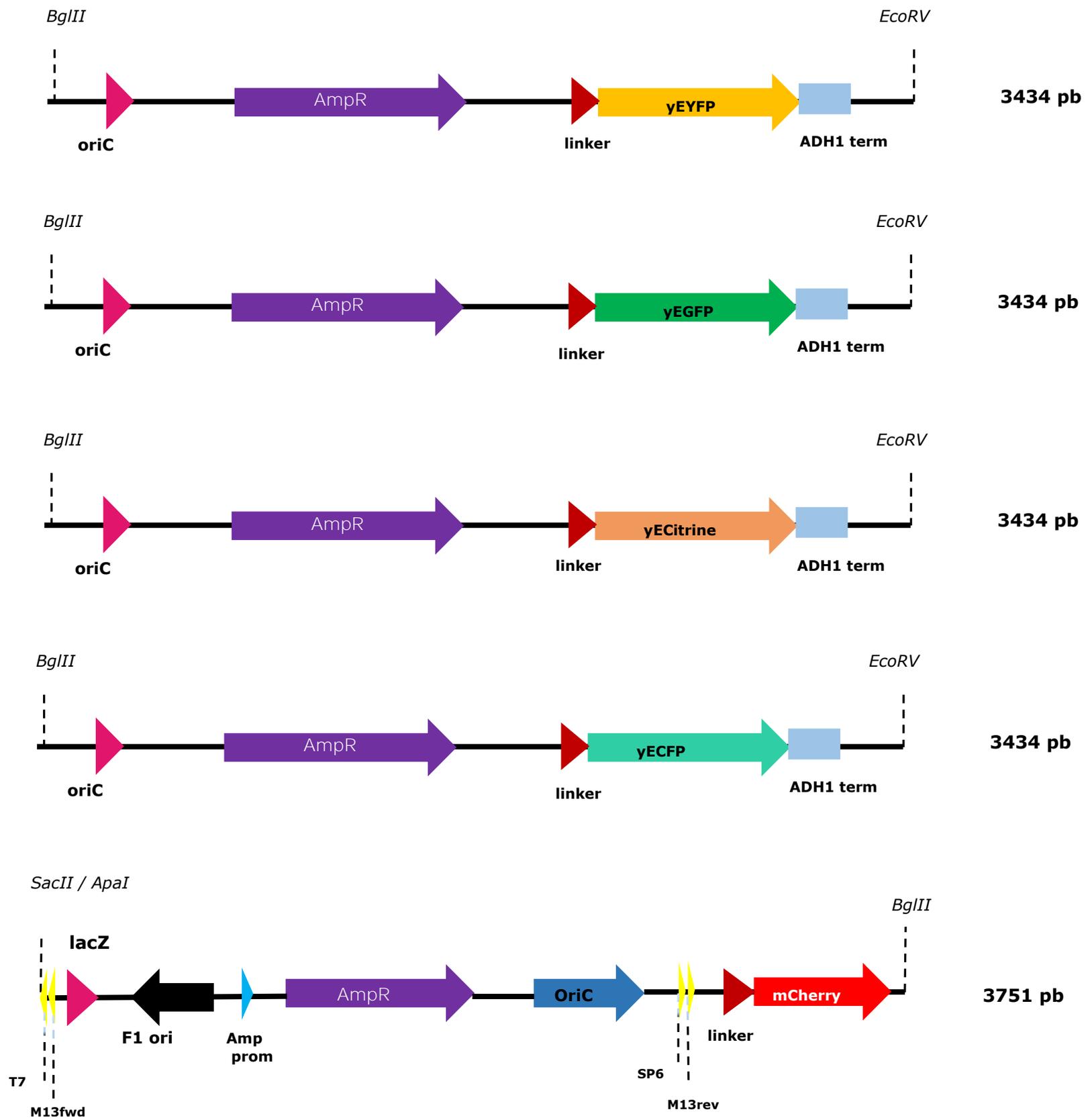


Figura 6.3 Fragmentos correspondientes a los vectores que contienen las proteínas fluorescentes yEYFP, yEGFP, yECitrine y yECFP (digestión con enzimas *BglII* y *EcoRV* del plásmidos pKT90, pKT128, pKT211 y pKT212), y por último el fragmento que corresponde al vector que contiene a mCherry (Digestion del plásmido pGEMmCh14 con *SacII* o *ApaI* y *BglII*).

6.1.2 Clonación de marcadores de selección a vectores

La inserción de un nuevo marcador de selección a vectores que incluyen la proteína fluorescente consistió en la ligación de marcadores a vectores, ambos presentando extremos romos y cohesivos proporcionados por la digestión con enzimas de restricción, concediéndoles la habilidad de ligarse uno con el otro limitando así la re-ligación entre ellos mismos.

La integración de nuevos marcadores de selección a los vectores se garantizó a partir del análisis de restricción a los nuevos plásmidos. Se seleccionaron enzimas de restricción que tenían un solo sitio de corte dentro de los marcadores de selección y en algunas ocasiones con enzimas que cortaran dentro de los vectores lo que varió según el número de fragmentos liberados. Las digestiones se compararon con el número de fragmentos liberados con el plásmidos de referencia (plásmido del cual se obtuvo el vector de clonación) para cada caso en particular, esperando así diferencias en número o tamaño de bandas liberadas.

Los vectores pKT90, pKT128, pKT212, pKT211 y pGEMmCh14 que contienen a las proteínas fluorescentes yEYFP, yEGFP, yECFP, yEmCitrine y mCherry respectivamente, contienen de manera general una secuencia **OriC** (origen de replicación para bacteria), un cassette de resistencia a ampicilina para bacteria, y un marcador de selección para levadura: **HIS3** para pKT90, pKT128, pKT211; **URA3** para pKT212; y clonNAT para pGEMmCh14. Estos vectores pueden replicarse en bacteria y por tener un marcador de selección de levadura se utilizaron para generar una colección de plásmidos que contienen una proteína fluorescente en conjunto con marcadores de selección para levadura a fin de obtener todas las combinaciones posibles.

Los distintos insertos KnMX, **hph**, clonNAT, **URA3** e **HIS3** se clonaron a los vectores que contienen a yEYFP, yEGFP, yECFP, yEmCitrine y mCherry en sus estructuras. Estos vectores además tienen resistencia a ampicilina, lo que permite la libre selección cuando las diferentes construcciones se transforman a células competentes de bacteria. Todos los vectores, presentan los sitios de restricción específicos para **BglII** y **EcoRV** lo que fue de utilidad para liberar el marcador de selección que presentan. Sólo en el caso del vector pGEMmCh14 se utilizaron las enzimas **SacII** y **BglII** para liberar el marcador clonNAT. Por otro lado en el caso del vector pAG32 se liberó el marcador **hph** con la digestión con **BglII** y **EcoRV**, por lo cual para poder ligar el vector pGEMmCh14 fue necesario rellenar los extremos 3' del vector. En la figura 6.5 se explica el proceso que se siguió para la obtención de esta construcción (plásmido pCH54).

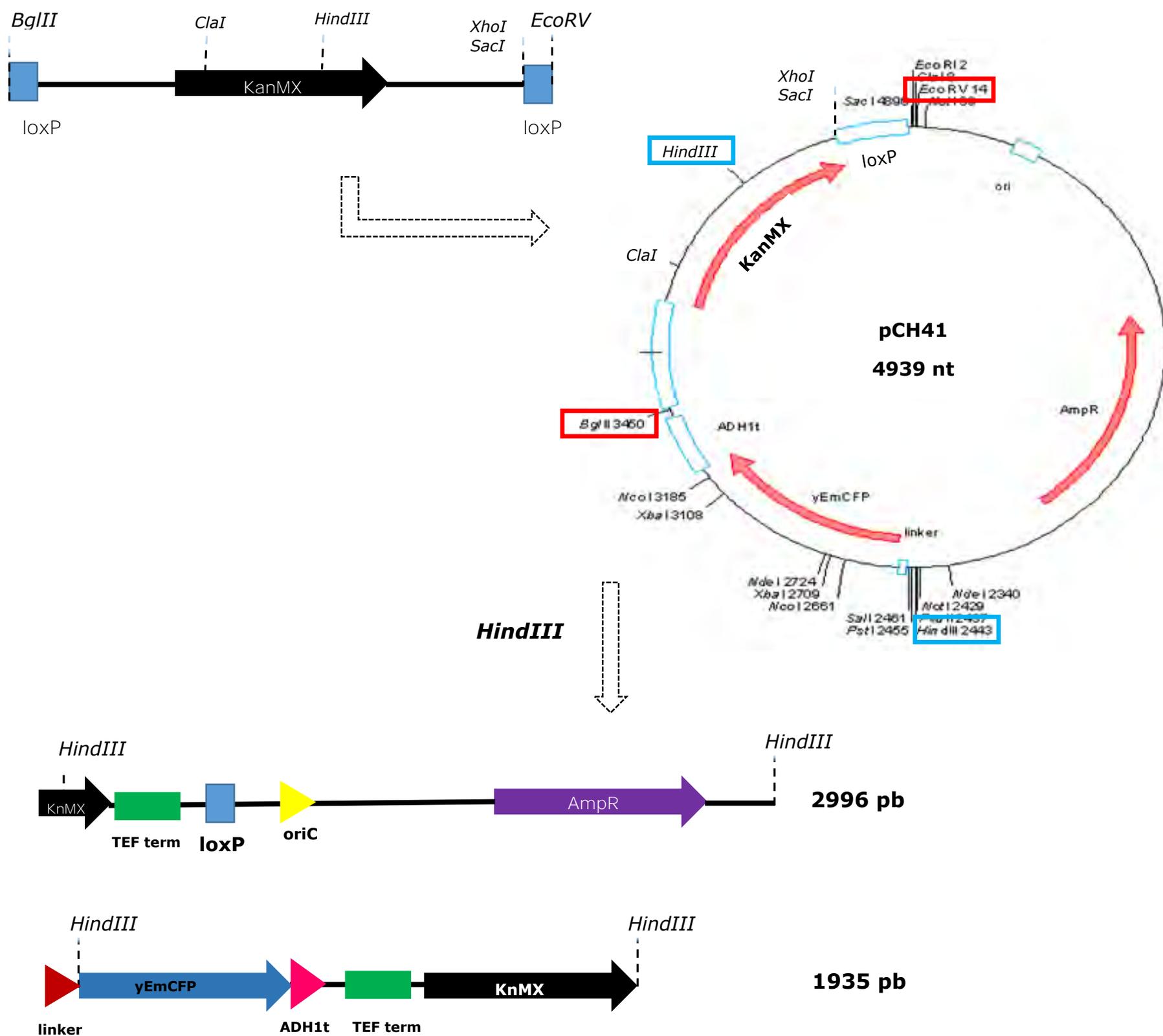


Figura 6.4 A) Ejemplo de la inserción de un nuevo marcador de selección a un vector. Clonación del marcador KanMX (G418) a vector que contiene a la proteína yEmCFP, construcción llamada pCH41 según nomenclatura detallada en la tabla 4.7, además se presenta el mapa de restricción de este nuevo plásmido. En la digestión de comprobación del plásmido pCH41 con la enzima *HindIII*.

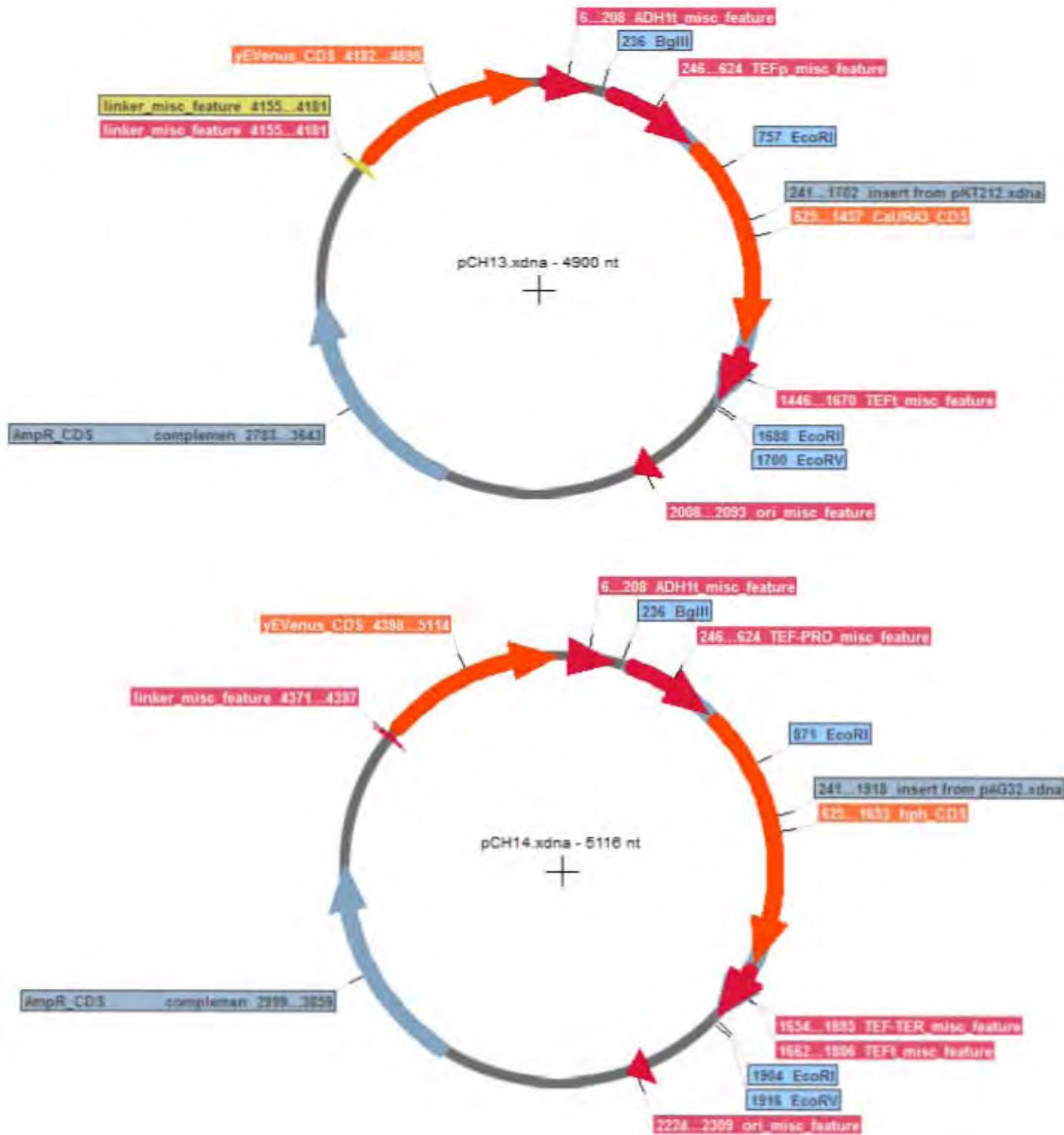


Figura 6.5 Esquemas de los plásmidos pCH13 y pCH14 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente yEYFP y los marcadores *URA3* y *hph* respectivamente.

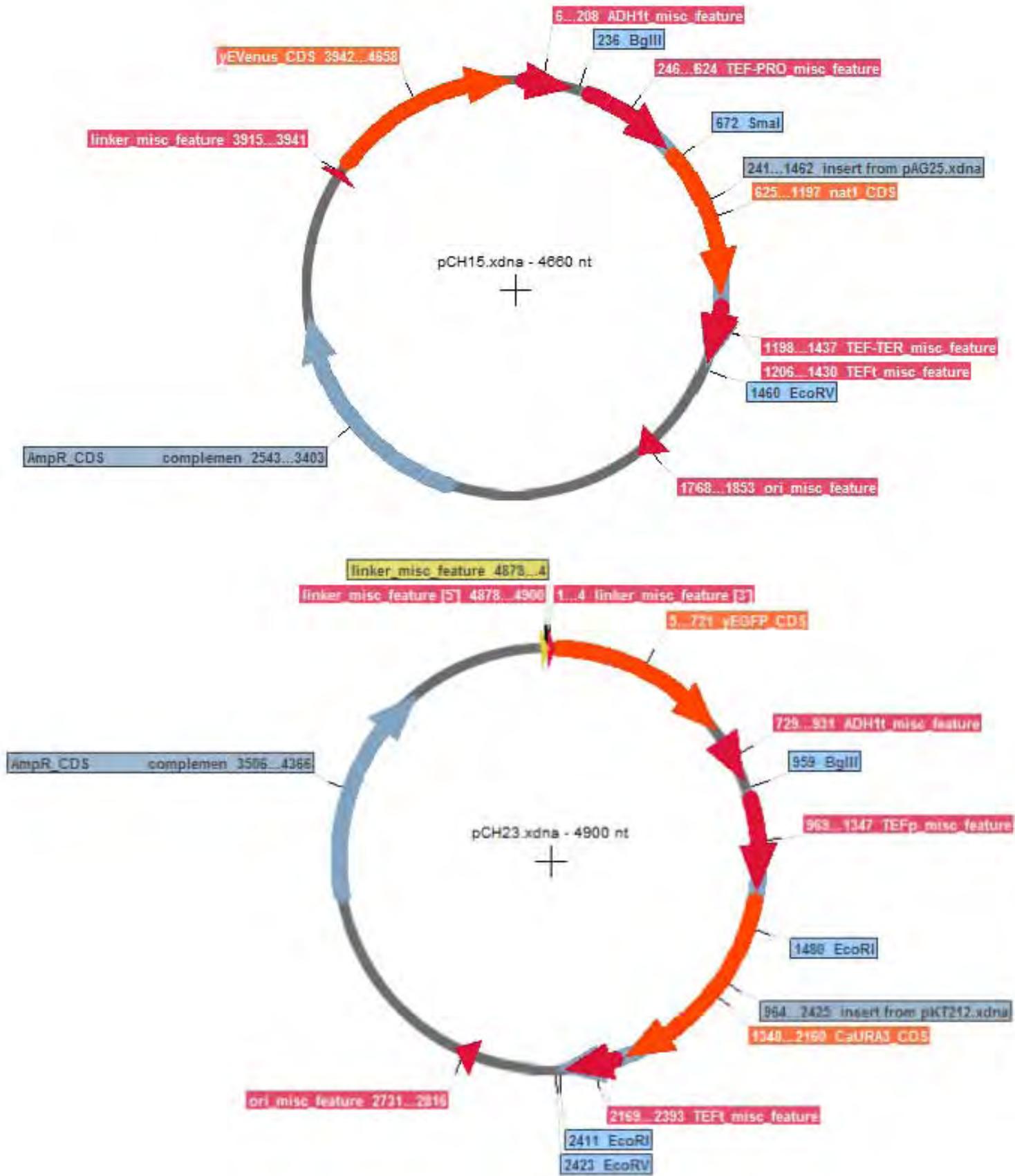


Figura 6.6 Esquemas de los plásmidos pCH15 y pCH23 construidos en este trabajo. pCH15 contienen la proteína fluorescente yEYFP y el marcador clonNAT, mientras que pCH23 yEGFP y *URA3*.

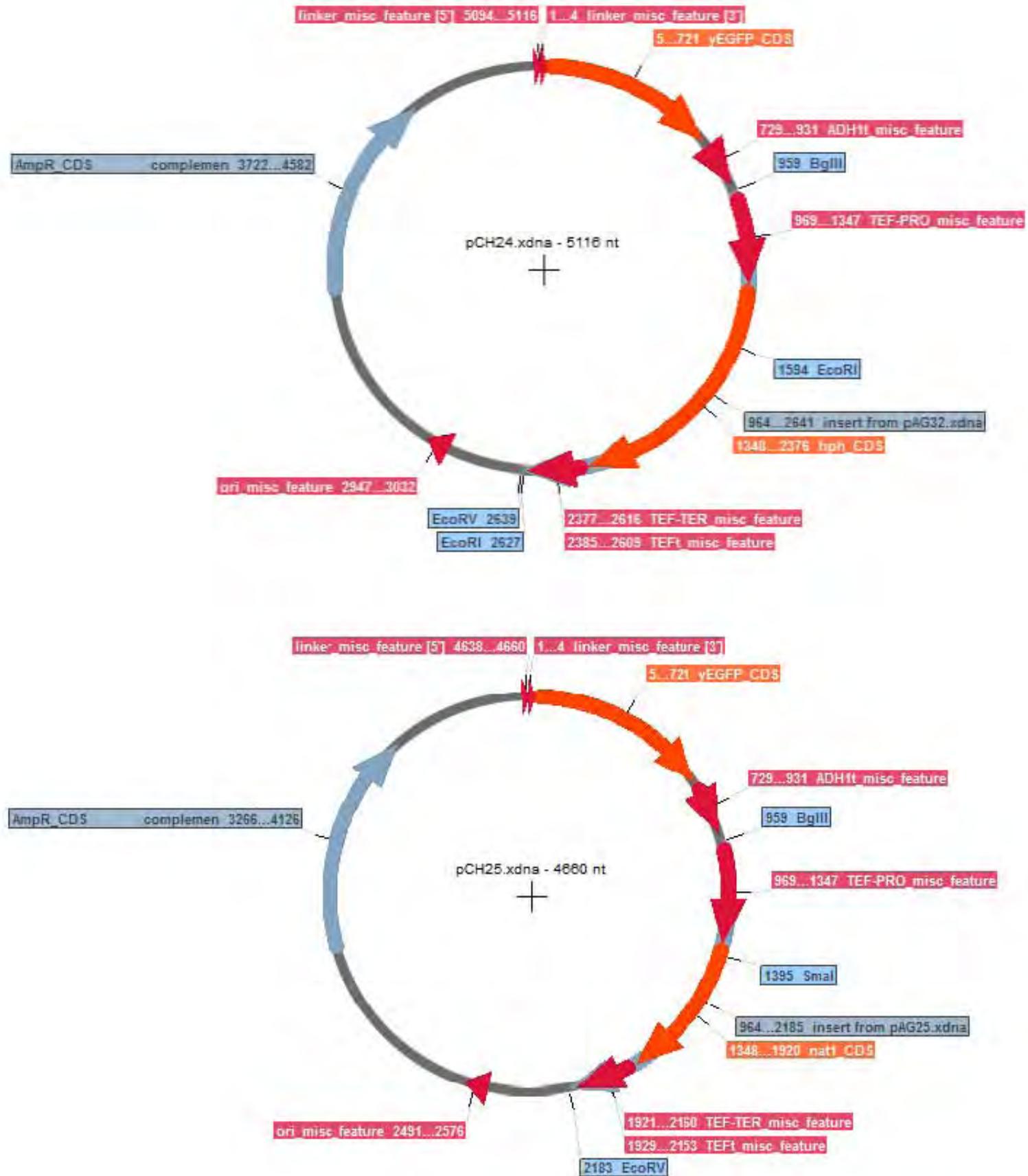


Figura 6.7 Esquemas de los plásmidos pCH24 y pCH25 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente yEGFP y los marcadores *hph* y clonNAT respectivamente.

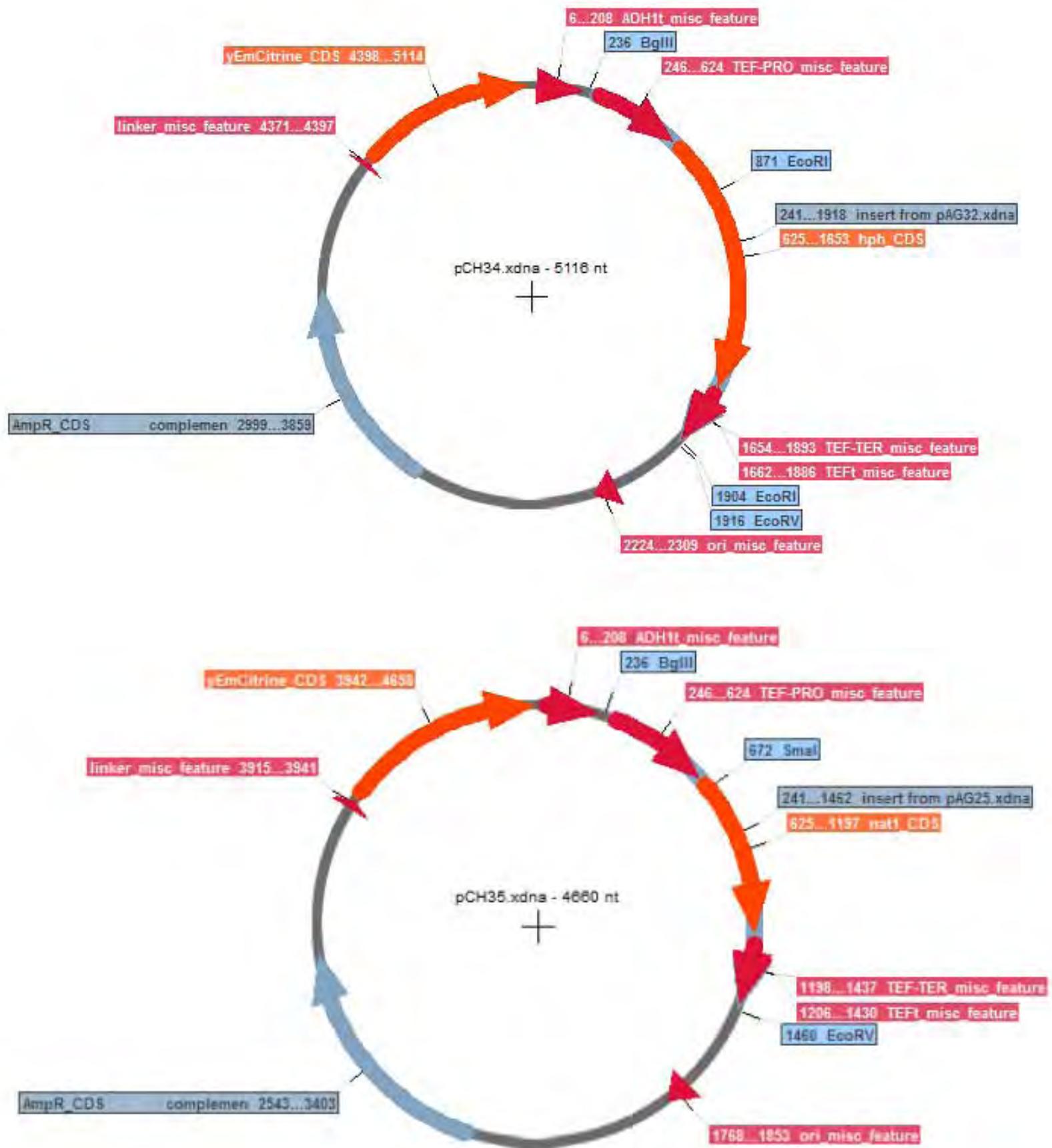


Figura 6.8 Esquemas de los plásmidos pCH34 y pCH35 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente yEmCitrine y los marcadores *hph* y clonNAT respectivamente.

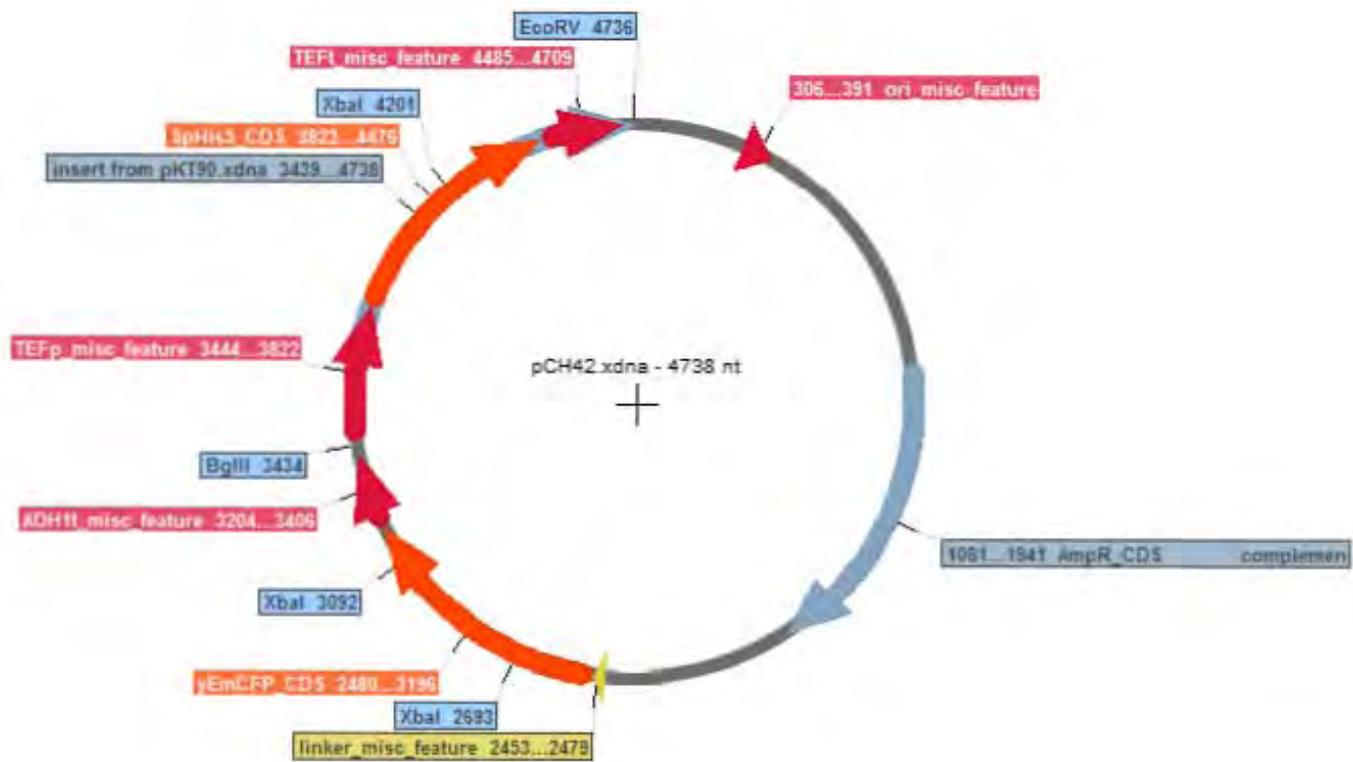
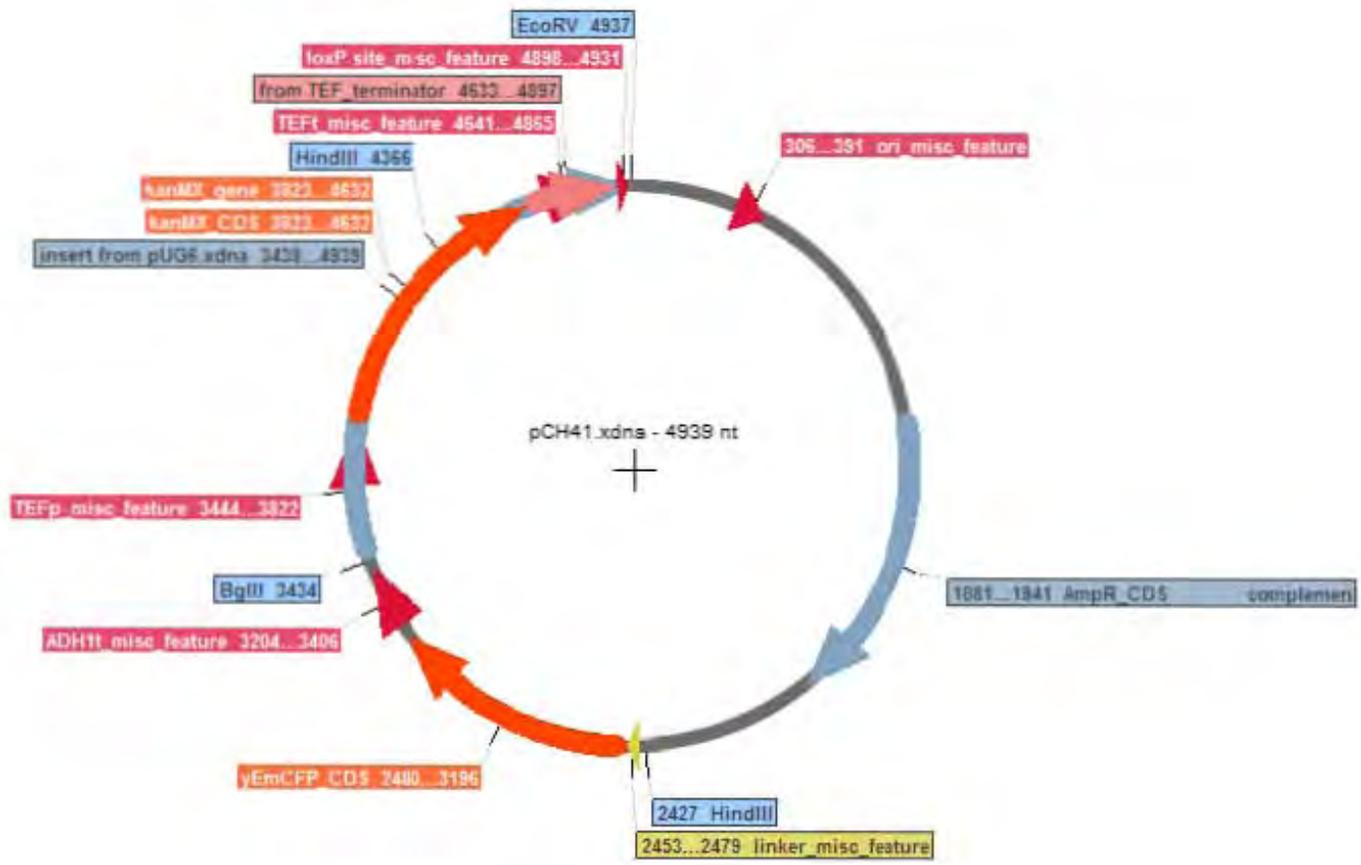


Figura 6.9 Esquemas de los plásmidos pCH41 y pCH42 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente yECFP y los marcadores KnMX e *HIS3* respectivamente.

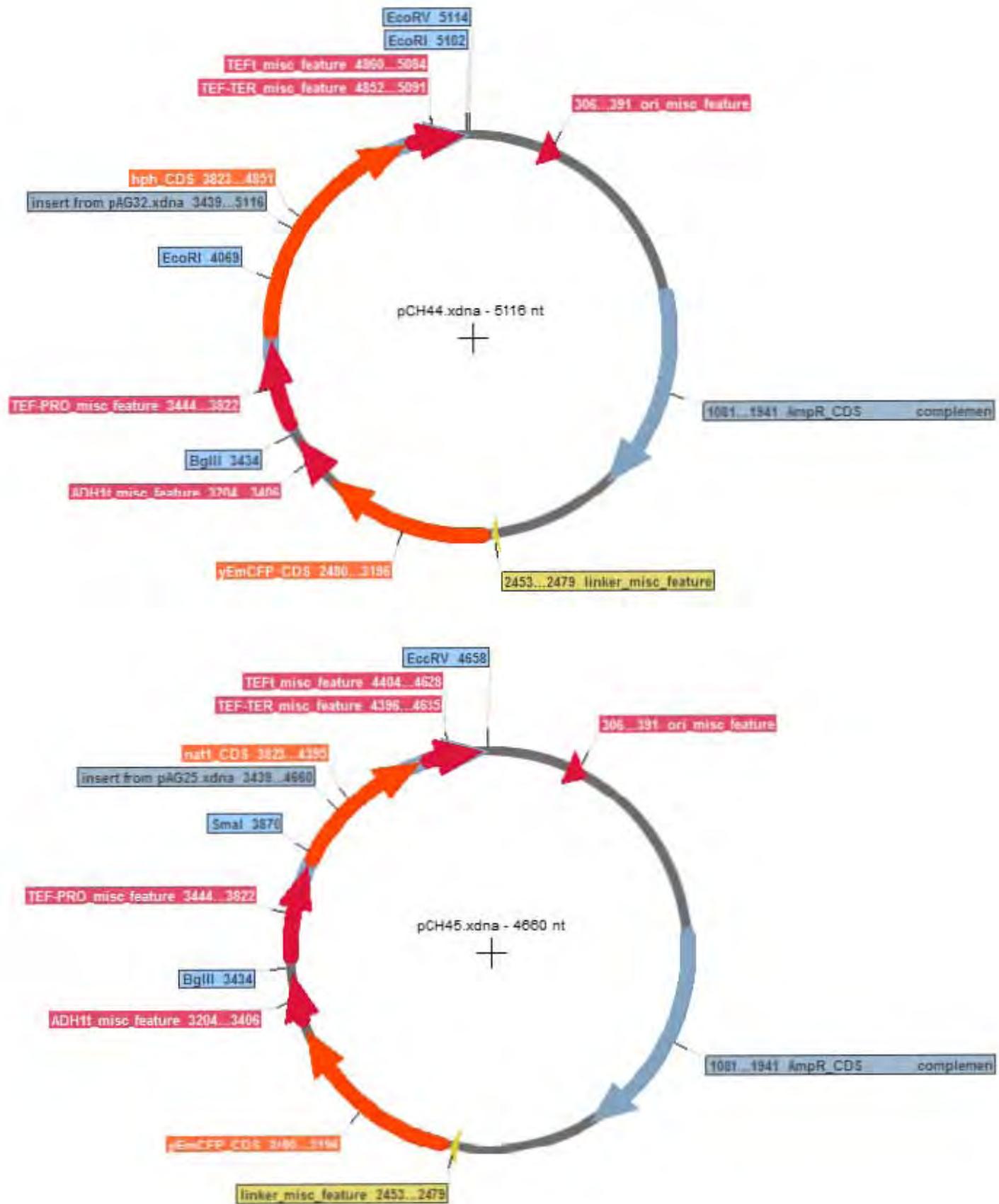


Figura 6.10 Esquemas de los plásmidos pCH44 y pCH45 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente yECFP y los marcadores *hph* y clonNAT respectivamente.

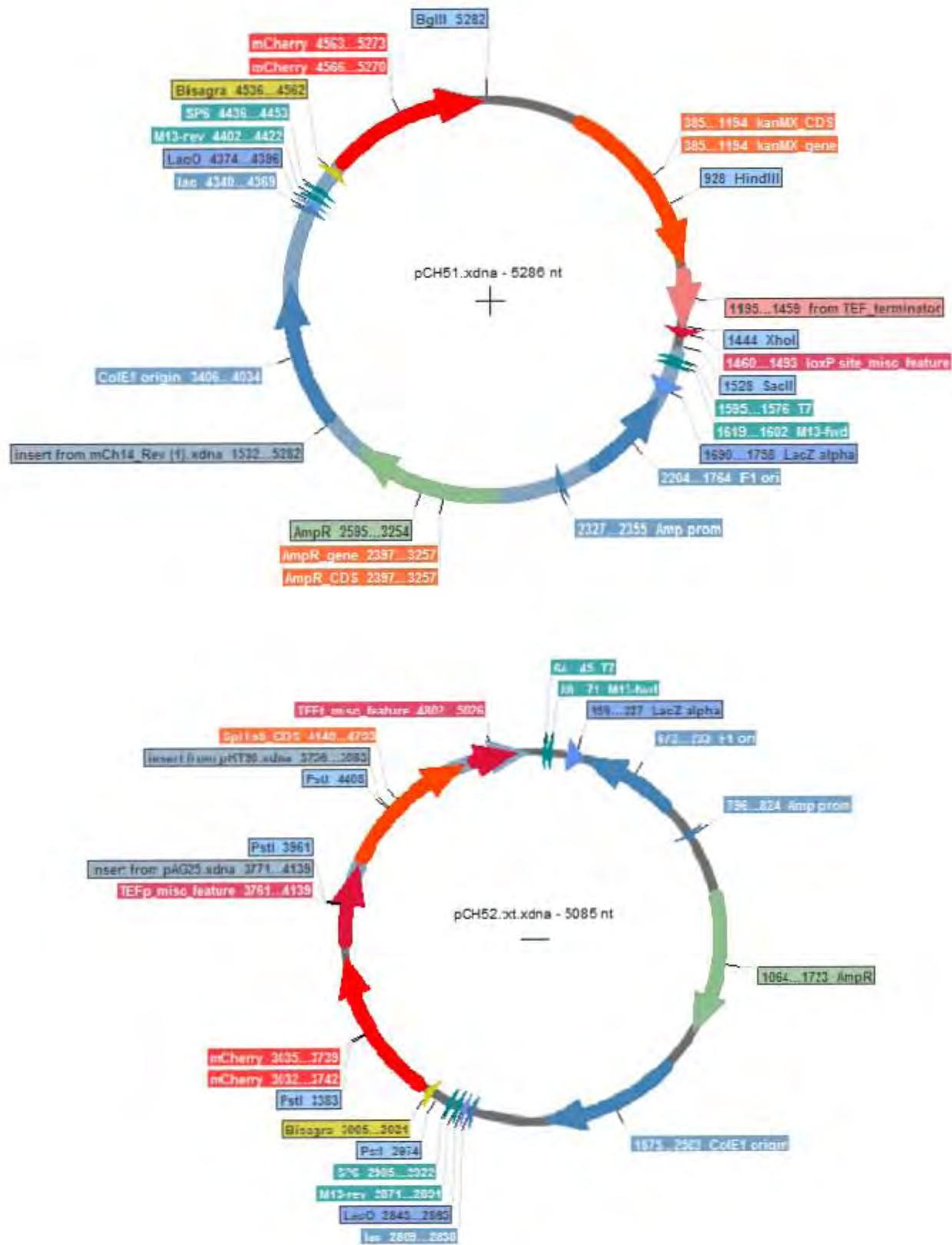


Figura 6.11 Esquemas de los plásmidos pCH51 y pCH52 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente mCherry y los marcadores KnMX e *HIS3* respectivamente.

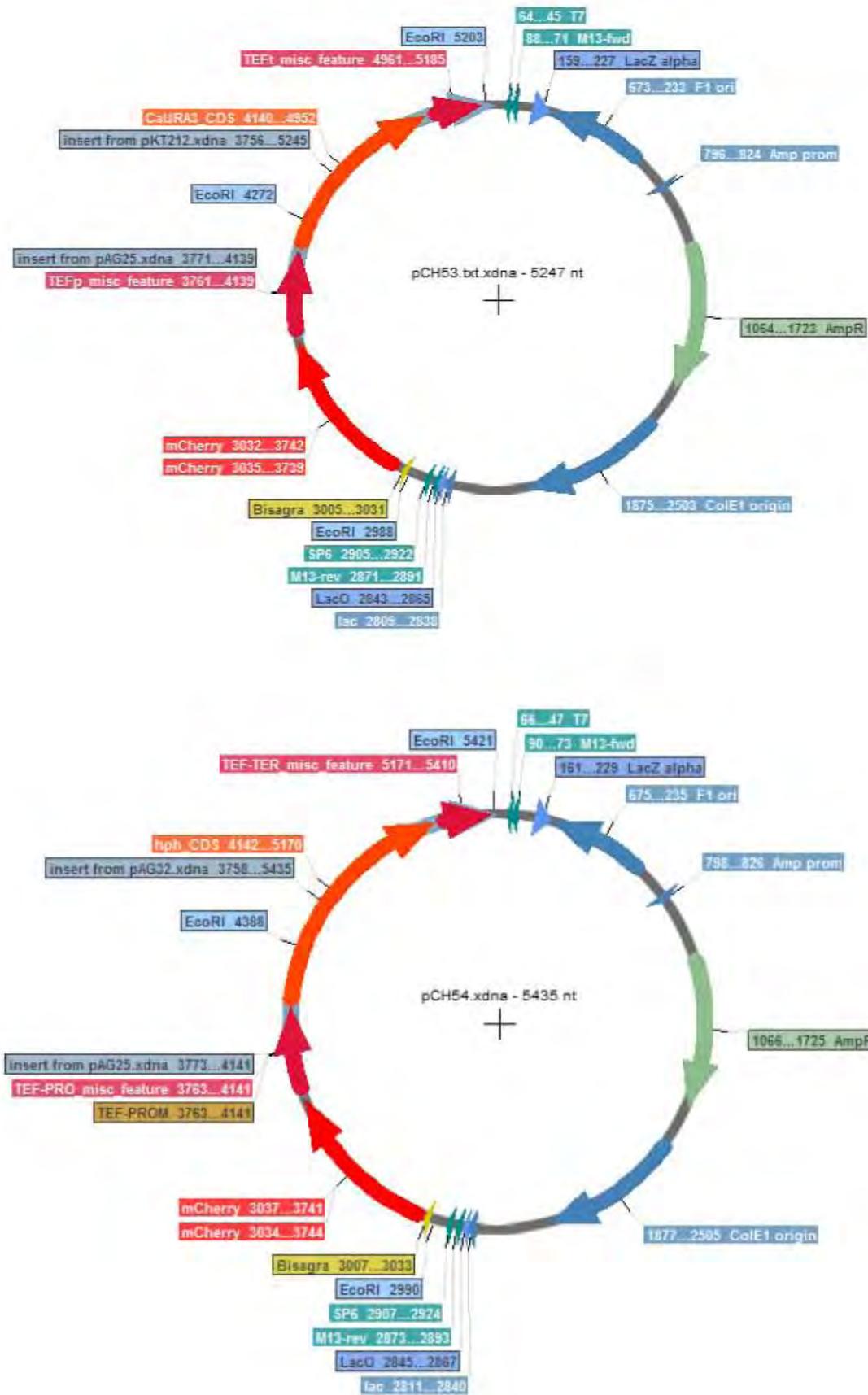


Figura 6.12 Esquemas de los plásmidos pCH53 y pCH54 construidos en este trabajo. Contienen la proteína fluorescente mCherry y los marcadores *URA3* y *hph* respectivamente.

Para la construcción pCH54 la inserción del gen *hph* al vector que contiene a la proteína mCherry se realizó con la ayuda de fragmento Klenow para rellenar extremos 3´ al digerirse por la enzima *ApaI*. El método consistió en la digestión del plásmido pGEMmCh14 con *ApaI*, se purificó y se realizó una reacción con el fragmento *Klenow* de la polimerasa para rellenar los extremos 3´ y dejar un extremo como compatible con el extremo dejado por la enzima *EcoRV* del inserto *hph* y posteriormente la restricción con la segunda enzima para la liberación del marcador clonNAT.

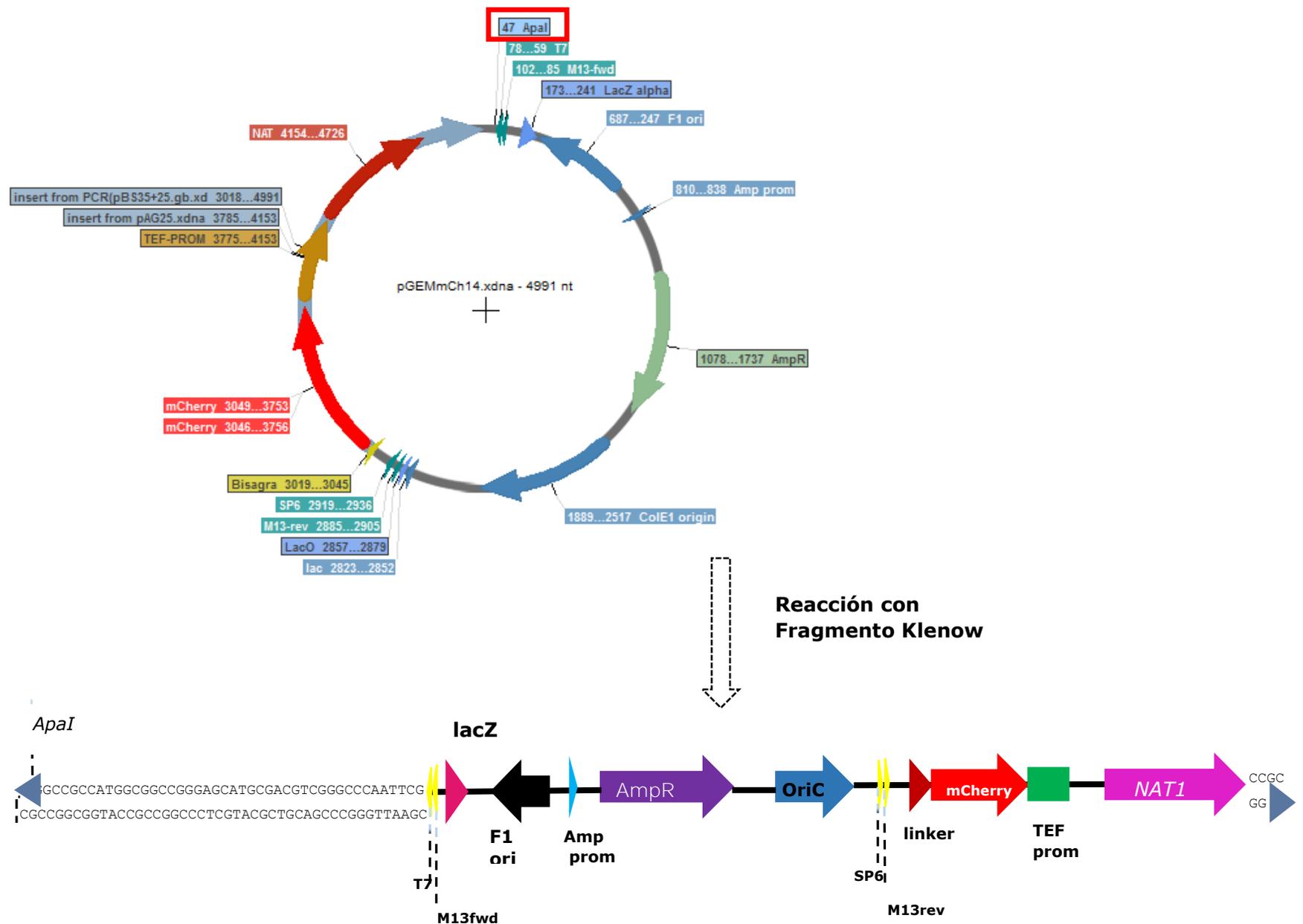


Figura 6.13 Esquema que ejemplifica la construcción del plásmido pCH54: el plásmido pGEMmCh14 digerido con *ApaI* y su posterior relleno en los extremos 3´ con el fragmento Klenow.

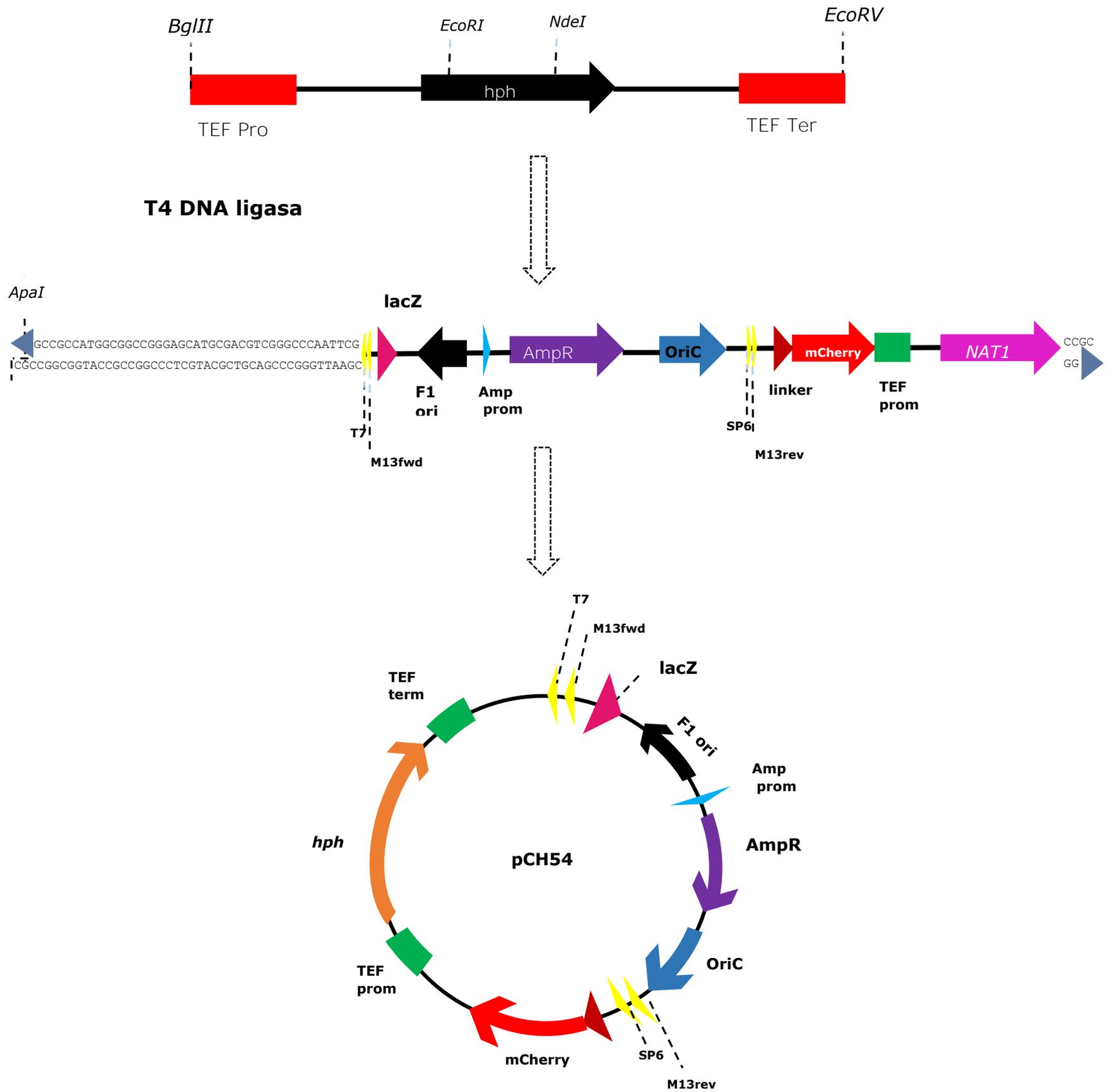


Figura 6.14 Esquema que ejemplifica la construcción del plásmido pCH54: ligación vector inserto.

6.1.3 Transformación de plásmidos contruidos a *E. coli* TOP 10

Se transformaron los plásmidos contruidos a células quimiocompetentes de bacteria *E. coli* TOP 10 por choque térmico y las clonas seleccionadas como positivas fueron aquellas capaces de crecer en presencia de ampicilina debido a que este marcador no está interrumpido en el vector aun con las digestiones realizadas para la obtención de los marcadores de selección y vectores. Con la finalidad de verificar que los insertos estuvieran clonados, se crecieron las bacterias de colonias seleccionadas y se purificó el plásmido de cada cepa mediante lisis alcalina. Los plásmidos purificados se confirmaron mediante una digestión del con enzimas que generaban un patrón de restricción diferente, además se comparó realizando los mismos cortes en los plásmidos que contienen los vectores originales. El número de colonias seleccionadas varió dependiendo la construcción y el número de colonias totales obtenidas en cada transformación. Las enzimas utilizadas para las digestiones de comprobación de cada plásmido nuevo y los tamaños esperados se encuentran descritos en la tabla 4.7.

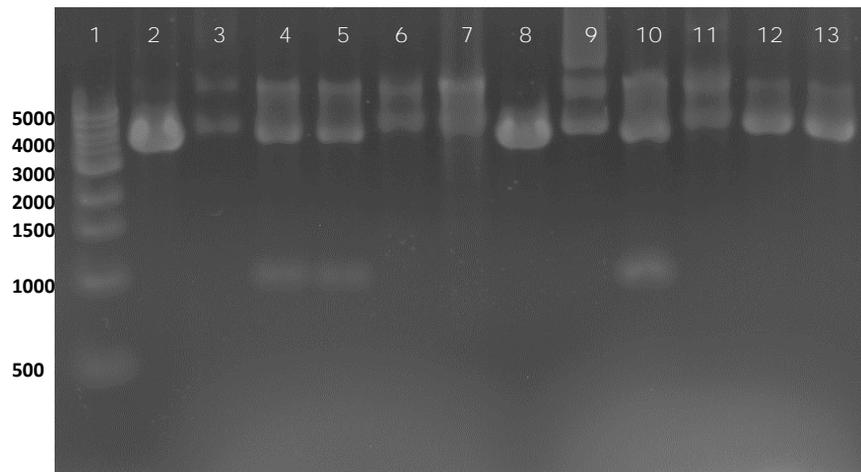


Figura 6.15 Gel de agarosa donde se muestran las digestiones de las construcciones pCH13 y pCH33 con la enzima *EcoRI*. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder (New England Biolab), carril 2, plásmido pKT90 digerido con *EcoRI* donde se observa un solo corte generando un tamaño de 4738 pb, carriles 3, 4, 5, 6 y 7 clonas 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente de la construcción pCH13. En el carril 8 se muestra el plásmido pKT211

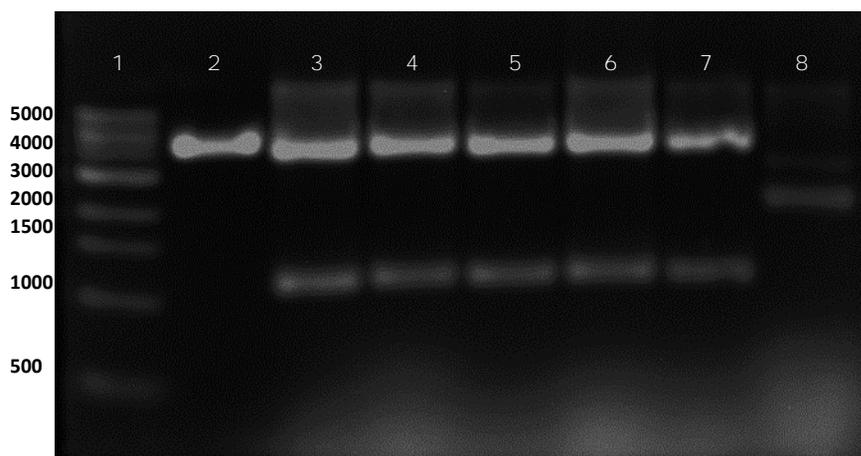


Figura 6.16 Gel de agarosa que muestra las digestiones de la construcción pCH14 con la enzima *EcoRI*. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder, carril 2, plásmido pKT90 digerido con *EcoRI* donde se observa un solo corte generando un tamaño de 4738 pb, carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 clonas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente de la construcción pCH14 donde las clonas 1, 2, 3, 4 y 5 muestran el tamaño esperado de 4083 y 1033 pb.

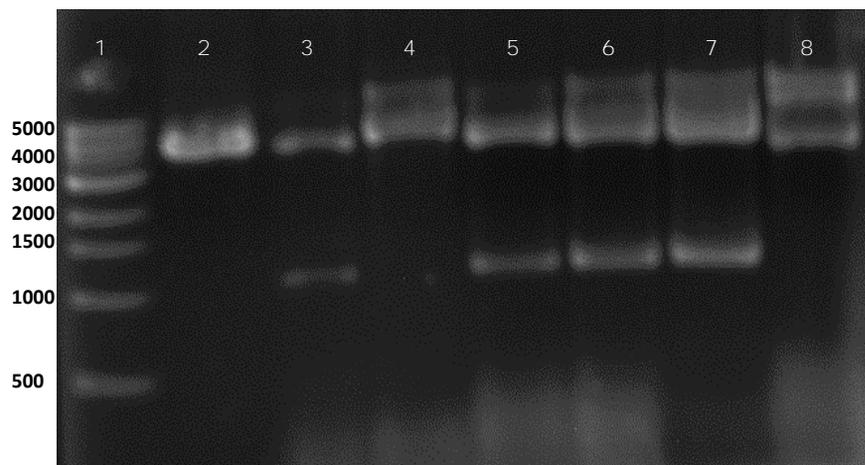


Figura 6.17 Gel de agarosa donde se muestran las digestiones de la construcción pCH24 con la enzima *EcoRI*. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder, carril 2, plásmido pKT128 digerido con *EcoRI* donde se observa un solo corte generando un tamaño de 4738 pb, carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 clonas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente de la construcción pCH24 donde las clonas 1, 3, 4 y 5 muestran el tamaño esperado de 4083 y 1033 pb.

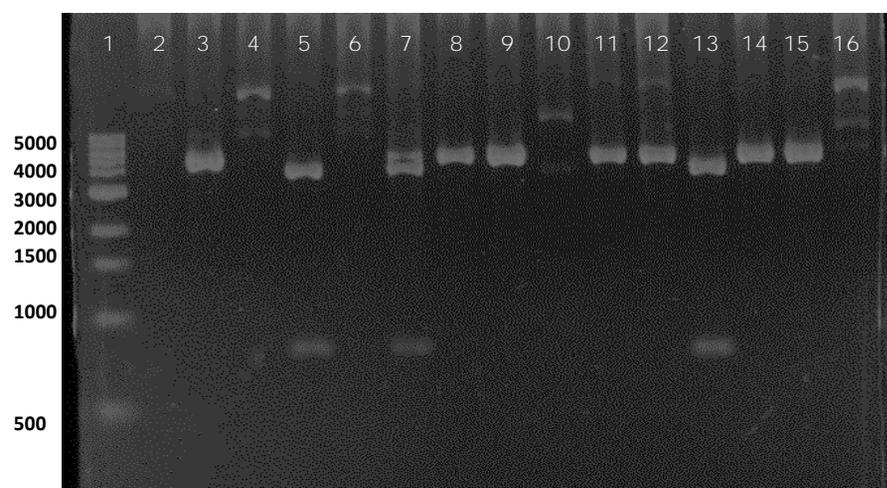


Figura 6.18 Gel de agarosa donde se muestran las digestiones de la construcción pCH35 con las enzimas *EcoRV* y *SmaI*. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder, carril 3 el plásmido pKT211 digerido con las mismas enzimas donde se observa un solo corte generando un tamaño de 4738 pb. En los carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 se encuentran las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 respectivamente de la construcción pCH35 donde las clonas 2, 4 y 10 muestran el tamaño esperado de 3872 y 788 pb.

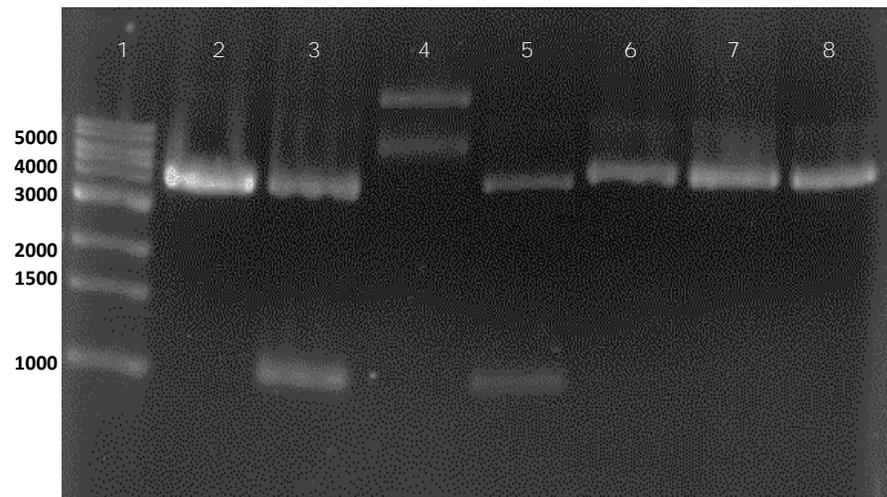


Figura 6.19 Gel de agarosa donde se muestran las digestiones de la construcción pCH34 con la enzima *EcoRI*. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder, carril 2 el plásmido pKT211 digerido con la misma enzima donde se observa un solo corte generando un tamaño de 4738 pb. En los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se encuentran las clonas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente de la construcción pCH34 donde las clonas 1 y 3 muestran el tamaño esperado de 4083 y 1033 pb.

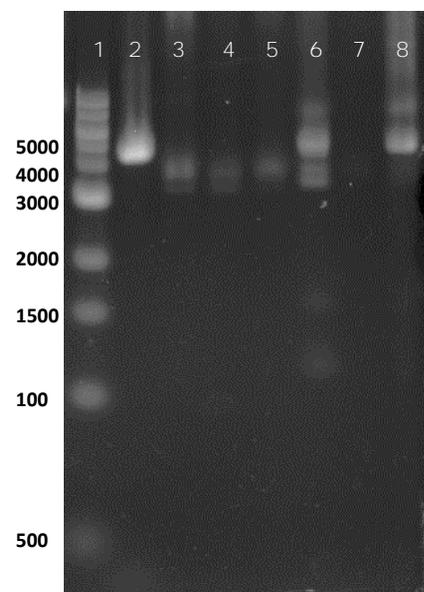


Figura 6.20 Gel de agarosa donde se muestra la digestión de la construcción pCH42 con la enzima *XbaI*. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder, carril 2, plásmido pKT212 digerido con *XbaI* donde se observan dos cortes generando dos fragmentos de 4501 y 399 pb. En carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente de la construcción pCH42 donde esperamos tres fragmentos de 3230, 1109 y 399., la clona 4 en el carril 6 es positiva.

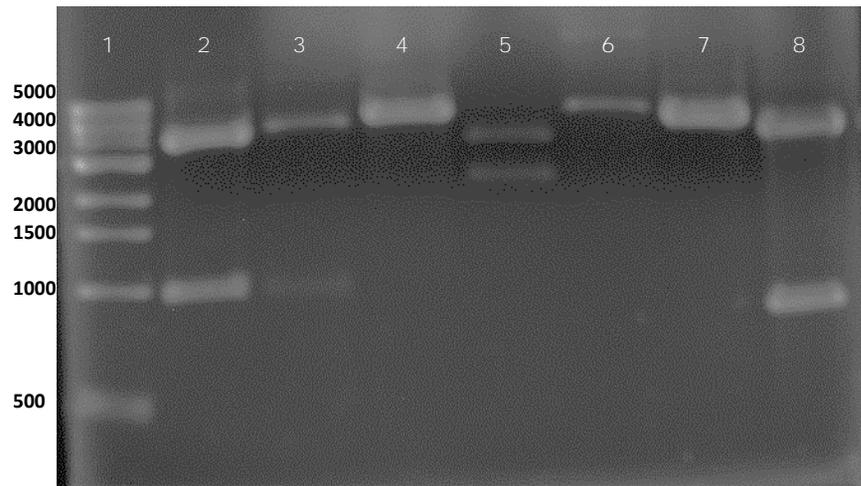


Figura 6.21 Gel de agarosa donde se muestra la digestión de las construcciones pCH44, pCH41 y pCH15. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder. En carril 2 el plásmido pKT212 digerido con *EcoRI* donde se observan dos cortes generando dos fragmentos de 3969 y 931 pb, en el carril 3 se muestra la digestión de la construcción pCH44 con la misma enzima, mostrando dos fragmentos de 4083 y 1033. En el carril 4 se muestra al plásmido pKT212 digerido con *HindIII* donde se observa una banda de 4900 pb; en los carriles 5 y 6 se observan las clonas 1 y 2 respectivamente de la construcción pCH41 digeridas con *HindIII* donde la clona 1 muestra los fragmentos esperados de 3000 y 1939 pb. En el carril 7 la digestión de pKT90 con *SmaI* y *EcoRV* observándose una banda de 4738 pb, mientras que en el carril 8 se encuentra la construcción pCH15 con las mismas enzimas liberándose fragmentos de 3872 y 788 pb.

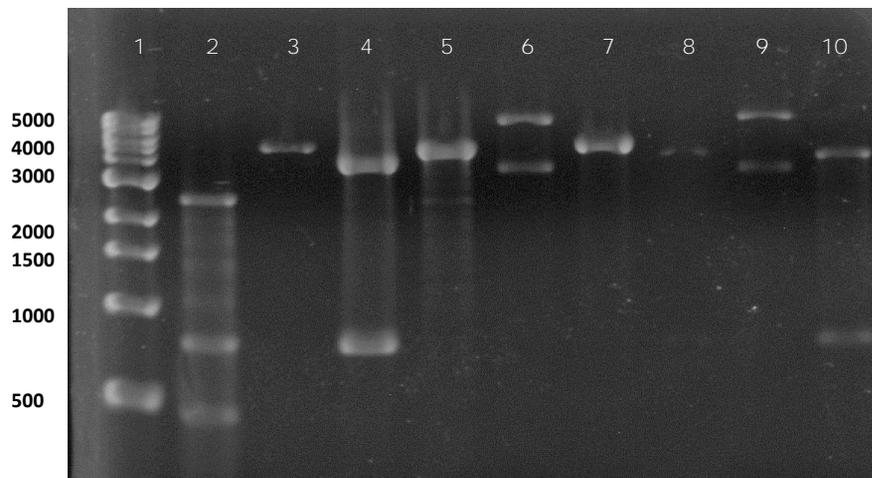


Figura 6.22 Gel de agarosa donde se muestra la digestión con las enzimas *EcoRV* y *HindIII* de las construcciones que contienen clonNAT como marcador de selección. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder. Carril 2: plásmido pAG25 digerido, fragmentos de 2458, 788 y 458 pb, carril 3: digestión de pKT128 mostrando un fragmento de 4738 pb, carril 4: Construcción pCH25 se observan dos bandas de 3872 y 788 pb, carril 5: pKT211 digerido, se muestra un fragmento de 4738 pb. Carril 6: pCH35 negativo, carril 7: digestión de plásmido pKT212 donde se observa un fragmento de 4738 pb, carriles 8, 9 y 10 digestión de clonas 1, 2 y 3 respectivamente, de la construcción pCH45, donde la clona 3 muestra las bandas esperadas de 3872 y 88 pb.

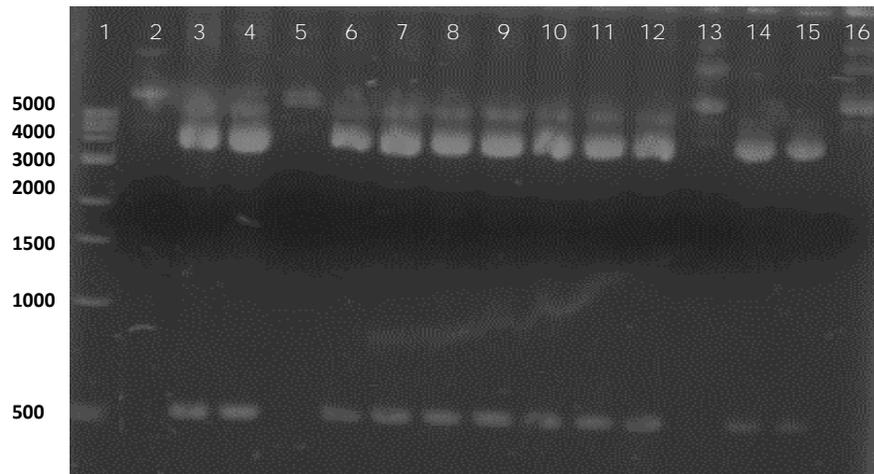


Figura 6.23 Gel de agarosa donde se muestra la digestión con las enzimas *XhoI* y *HindIII* de la construcción pCH51. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder. Carril 2: plásmido pGEMmCh14 digerido, del cual no se espera algún corte; en los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 se encuentran las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 respectivamente, de la construcción pCH51, digeridas con las mismas enzimas, para las cuales se esperan dos bandas de 4770 y 516 pb, considerándose positivas las clonas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

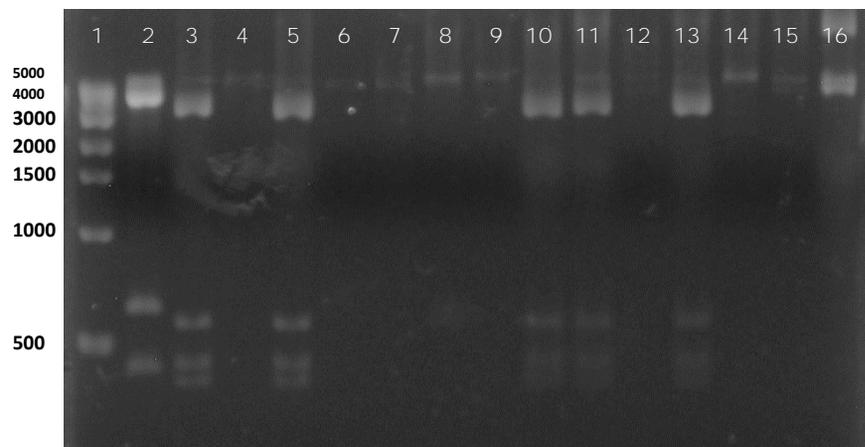


Figura 6.24 Gel de agarosa donde se muestra la digestión con la enzima *PstI* de la construcción pCH52. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder. Carril 2: plásmido pGEMmCh14 digerido, del cual se esperan fragmentos de 4004, 578 y 409 pb; en los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 se encuentran las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 respectivamente, de la construcción pCH52, digeridas con la misma enzima, para las cuales se esperan cuatro bandas de 3651, 578, 447 y 409 pb, considerándose positivas las clonas 1, 3, 8, 9 y 11.

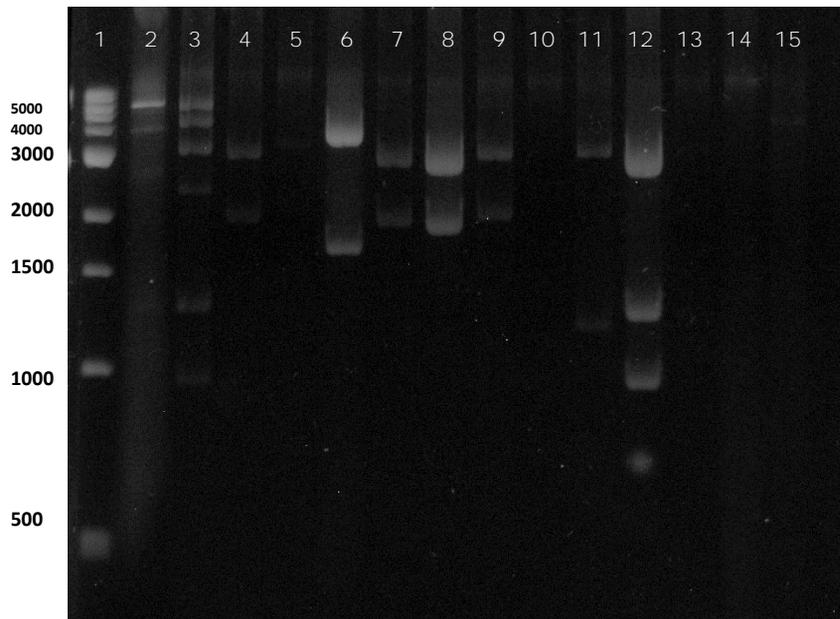


Figura 6.25 Gel de agarosa donde se muestra la digestión con la enzima *EcoRI* de la construcción pCH53. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder. Carril 2: plásmido pGEMmCh14 digerido, del se esperan fragmentos de 2997 y 1994 ; en los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 se encuentran las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6. 7. 8. 9. 10, 11, 12, 13 y 14 respectivamente de la construcción pCH53, digeridas con la misma enzima, para las cuales se esperan tres bandas de 3032, 1284y 931 pb, considerándose positiva la clona 10.

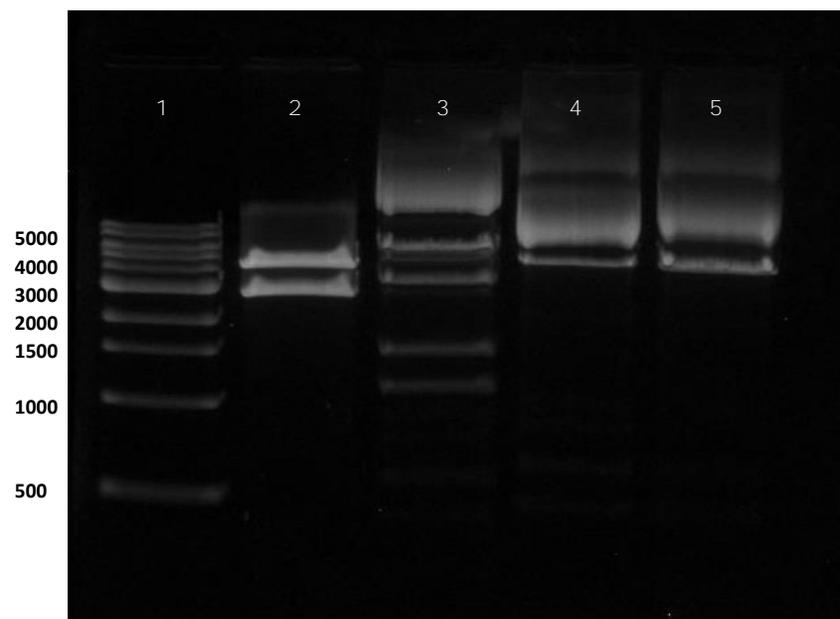


Figura 6.26 Gel de agarosa donde se muestra la digestión con la enzima *EcoRI* de la construcción pCH54. En el carril 1 marcador 1Kb DNA Ladder. Carril 2: plásmido pGEMmCh14 digerido, del cual se esperan fragmentos de 2997 y 1994; en los carriles 3, 4 y 5 se encuentran las clonas 1, 2 y 3 respectivamente de la construcción pCH54, digeridas con la misma enzima, para las cuales se esperan tres bandas de 2969, 1398 y 1033 pb, considerándose positiva la clona 1.

Las clonas positivas se cultivaron en 5 mL de medio líquido LB con ampicilina para la posterior extracción de plásmido utilizando el kit ZR Plasmid Miniprep™-Classic de ZymoResearch., Además cada clona positiva se le agregó glicerol a una concentración final del 40% para su crio conservación a -70°C. Los plásmidos puros se digirieron por segunda vez para corroborar los fragmentos esperados descritos en la tabla 5.6. Las digestiones se presentan acompañadas de la digestión del plásmido de referencia para cada caso.

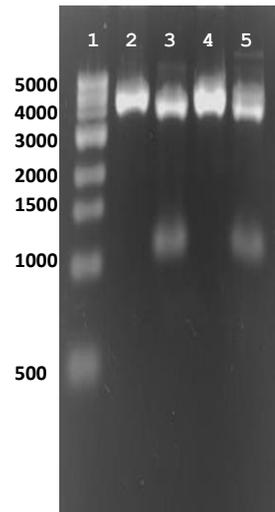


Figura 6.27 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT90, plásmido de referencia de la construcción pCH13 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*. En el carril 4 el plásmido pKT211, plásmido de referencia de la construcción pCH33 que se muestra en el carril 5, ambos plásmidos se digirieron con *EcoRI*.

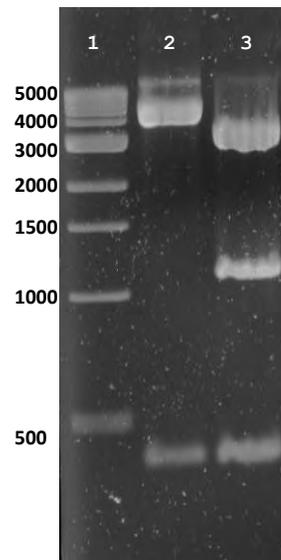


Figura 6.28 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT212, plásmido de referencia de la construcción pCH42 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *XbaI*.

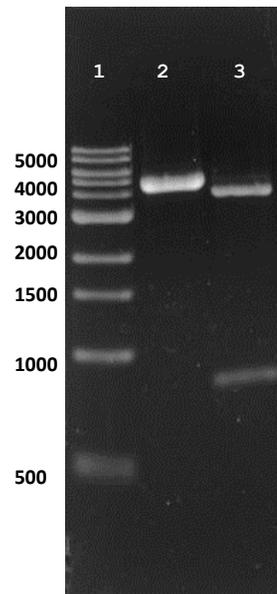


Figura 6.29 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT211, plásmido de referencia de la construcción pCH35 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *SmaI* y *EcoRV*.

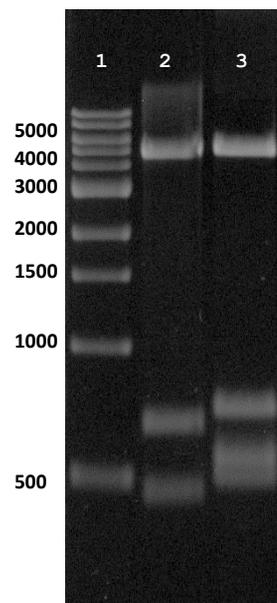


Figura 6.30 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pGEMmCh14, plásmido de referencia de la construcción pCH52 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *PstI*.

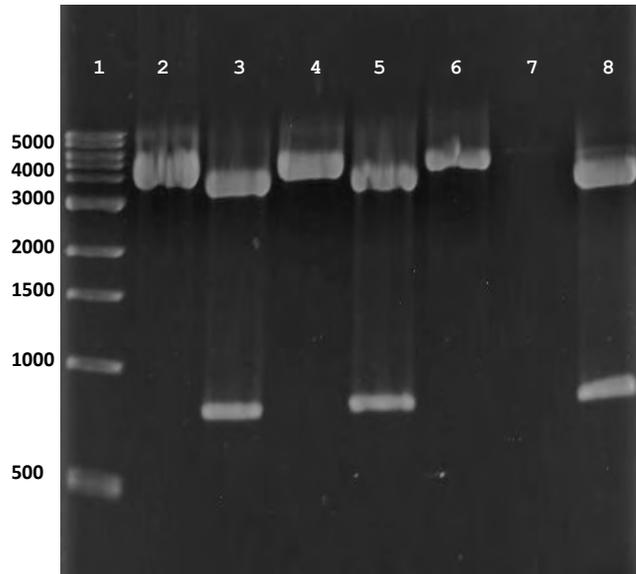


Figura 6.31 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT128, plásmido de referencia de la construcción pCH25 que se encuentra en el carril 3. En el carril 4 se muestra la digestión del plásmido pKT90, plásmido de referencia de la construcción pCH15 que se encuentra en el carril 5. En el carril 6 se encuentra el plásmido pKT212, plásmido de referencia de la construcción pCH45. Todos los plásmidos anteriores contienen el marcador clonNAT, por ello todos los plásmidos están digeridos con las enzimas *SmaI* y *EcoRV*.

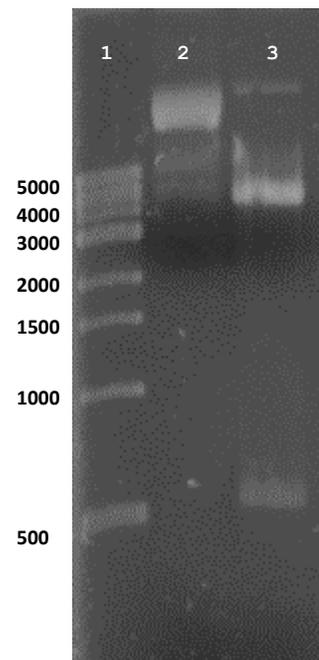


Figura 6.32 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pGEMmCh14, plásmido de referencia de la construcción pCH51 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRV*.

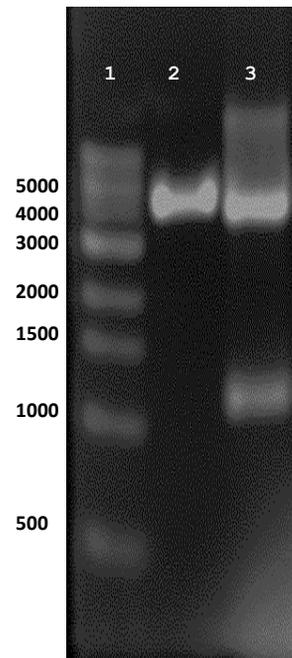


Figura 6.33 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT90, plásmido de referencia de la construcción pCH14 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*.

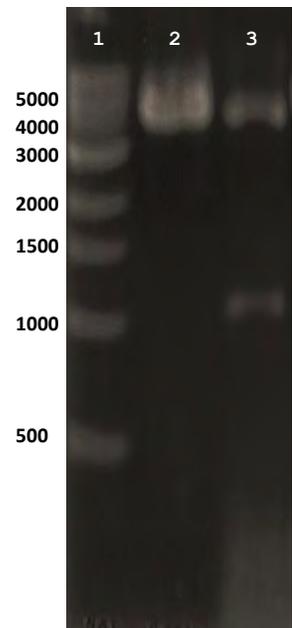


Figura 6.34 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT128, plásmido de referencia de la construcción pCH24 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*.

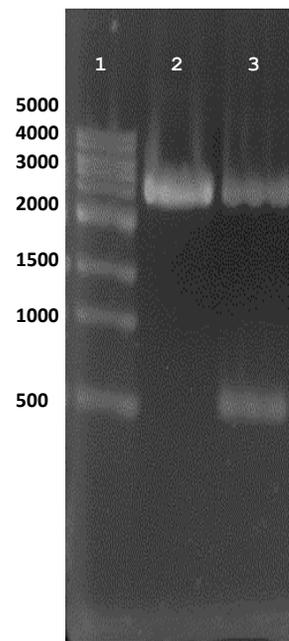


Figura 6.35 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT211, plásmido de referencia de la construcción pCH34 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*.

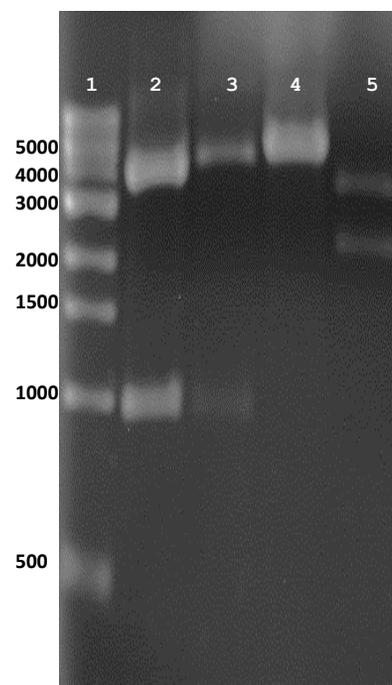


Figura 6.36 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pKT212, plásmido de referencia de la construcción pCH44 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*. En el carril 4 la digestión del pKT212 digerido con *HindIII* donde se observa una banda de 4900 pb; en el carril 5 se observa la construcción pCH41 digerida con la misma enzima.

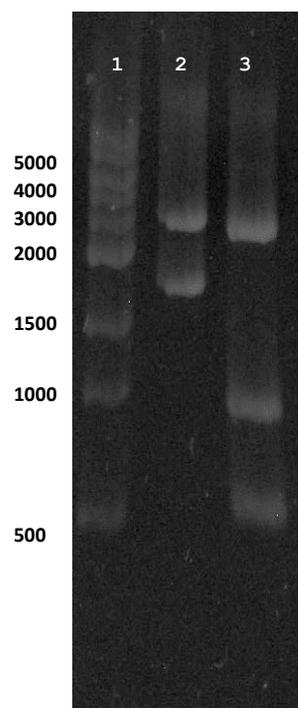


Figura 6.37 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pGEMmCh14, plásmido de referencia de la construcción pCH53 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*.

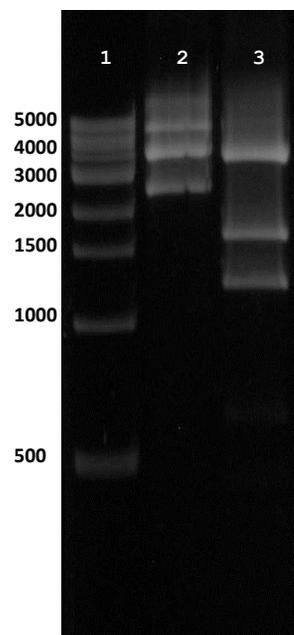


Figura 6.38 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. La digestión del plásmido pGEMmCh14, plásmido de referencia de la construcción pCH54 que se encuentra en el carril 3, ambos plásmidos están digeridos con *EcoRI*.

6.2 Fusión de plásmidos con genes de proteínas específicas de estructuras celulares

Los plásmidos construidos, teóricamente son funcionales como vectores de fusión transcripcional, y su efectividad se evaluó con su uso como templado en diferentes reacciones en cadena de la polimerasa, fusionándolos al marco de lectura abierto de proteínas específicas de diferentes estructuras subcelulares. Las fusiones transcripcionales se llevaron a cabo de acuerdo al gen de la estructura subcelular y al plásmido según la proteína fluorescente con que se marcó. Para ello se modificaron las condiciones de alineamiento de las secuencias que corresponden a los oligonucleótidos y las que corresponden a los plásmidos construidos. Se realizaron diferentes combinaciones de proteína fluorescente y gen de estructura subcelular. En la tabla 5.0 se describen las combinaciones que se realizaron para la obtención de cepas que contienen estructuras subcelulares marcadas.

Fusión	Plásmido utilizado	Tamaño en pb esperado del amplicon
NRD1 - yEYFP	pKT90	2357 pb
VMA1 - mCherry	pGEMmCh14	2041 pb
LEU9 - yECFP	pCH41	2513 pb
SEC63 - yEYFP	pKT103	2513 pb
VMA1 - yECFP	pCH45	2276 pb
LEU9 - mCherry	pGEMmCh14	2041 pb
SEC63 - mCherry	pGEMmCh14	2041 pb
NUP49 - mCherry	pCH51	2278 pb
NRD1 - mCherry	pCH51	2278 pb

Tabla 6.0 Fusiones de genes de proteínas específicas de estructuras subcelulares a plásmidos construidos.

La amplificación incluye el linker, la proteína fluorescente y el promotor del marcador de selección todo flanqueado por los oligonucleótidos fwd y rev correspondientes a cada estructura subcelular, logrando así el marcaje del gen.

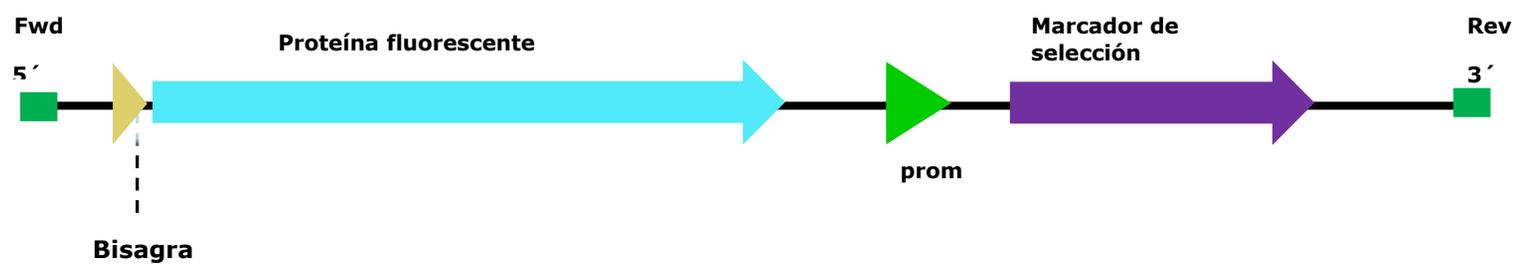


Figura 6.39 Esquema general de la amplificación de genes de proteínas de estructuras subcelulares utilizando los plásmidos optimizados.

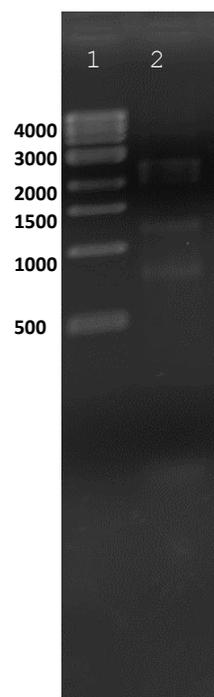


Figura 6.40 Gel de agarosa mostrando en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2. Producto de PCR de la fusión de *NRD1* con el plásmido pKT90.

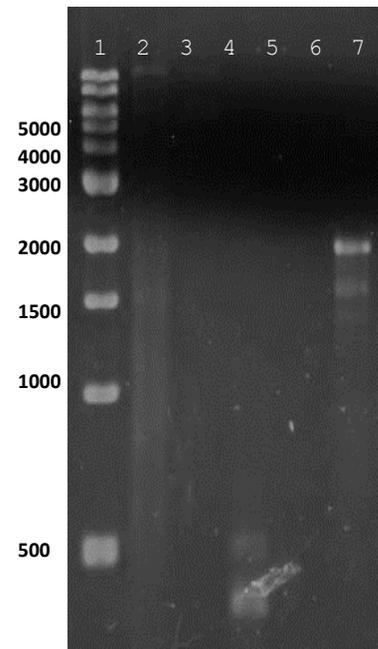


Figura 6.41 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, carril 2 y 3. La reacción negativa para la fusión *SEC63* con pKT103; carril 4 y 5. La reacción no resultó para *LEU9* con pCH44; carril 6. Producto de PCR de la fusión de *VMA1* con el plásmido pGEMmCh14, carril 7. La reacción no resultó para *VMA1* y pGEMmCh14.

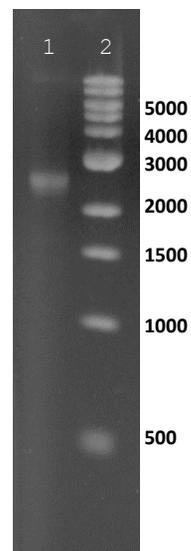


Figura 6.42 Gel de agarosa en donde se observa en el carril 1. Producto de PCR de la fusión de *LEU9* con el plásmido pCH41.; carril 2. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder.

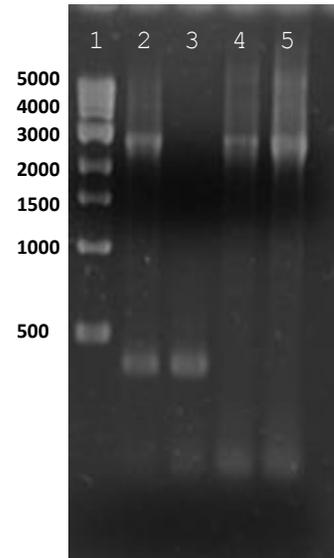


Figura 6.43 Gel de agarosa mostrando en el carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, en el carril 2 y 3 el PCR de fusión de *LEU9* con pCH44 donde solo en el carril 2 se encuentra una reacción positiva, en el carril 4 y 5 la reacción de fusión de *SEC63* con pKT103 siendo ambas muestras positivas.

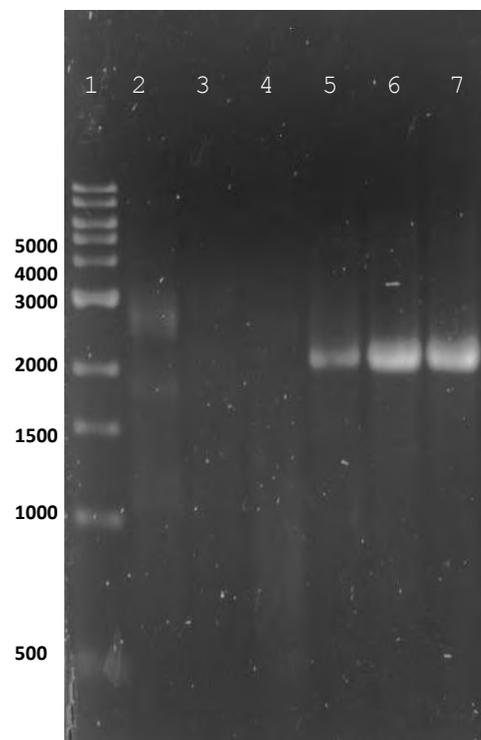


Figura 6.44 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder; carril 2. El PCR negativo para la fusión *VMA1* con pKT90; carril 3. La reacción de fusión negativa para *VMA1* con pCH41; carril 4. La reacción no resultó para la fusión *VMA1* con pCH45; carril 5. La reacción es positiva para la fusión *LEU9* con pGEMmCh14; carril 6 y 7. EL PCR positivo para la fusión *SEC63* con pGEMmCh14.

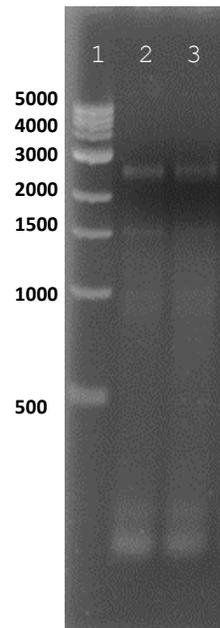


Figura 6.45 Gel de agarosa que muestra en el carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, en el carril 2 la reacción de PCR de *VMA1* con pCH41, carril 3 el PCR de fusión de *VMA1* con pCH45.

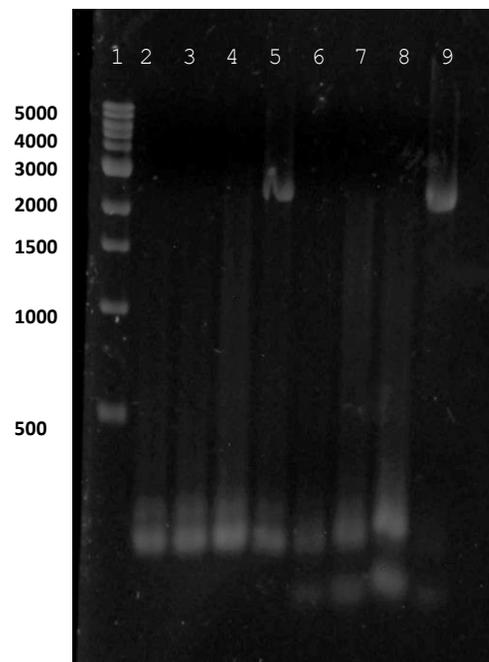


Figura 6.46 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder; carril 2. La reacción no resultó para la fusión *NUP49* con pCH41; carril 3. La reacción no resultó para la fusión *NUP49* con pCH42; carril 4. La reacción no resultó para la fusión *NUP49* con pCH44; carril 5. La reacción es positiva para la fusión *NUP49* con pCH51; carril 6. La reacción no resultó para la fusión *NRD1* con pCH41; carril 7. La reacción no resultó para la fusión *NRD1* con pCH42; carril 8. La reacción no resultó para la fusión *NRD1* con pCH44; carril 9. La reacción es positiva para la fusión *NRD1* con pCH51.

Asimismo se intentó la fusión de la proteína fluorescente yEGFP con el ORF correspondiente al gen *NUP49*, sin embargo dado que la reacción a una temperatura de alineamiento a 55°C y 50°C no funcionó. Se realizó un gradiente de temperatura donde para la reacción 1 se utilizó un temperatura de 48°C, para la reacción 2 49°C, para la 3 50°C, para la 4 52°C, para la 5 55°C, para la 6 57°C, para la 7 59°C y para la 8 60°C.

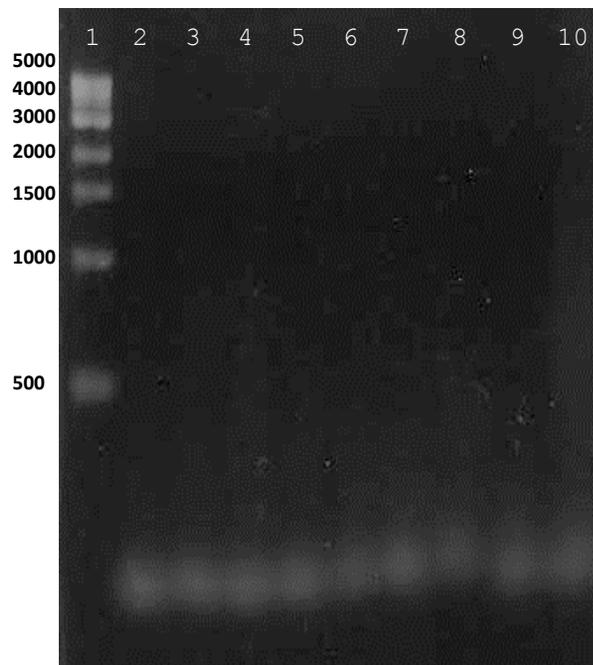


Figura 6.47 Gel de agarosa que muestra en carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder; carril 2-10: La reacción no resultó para la fusión *NUP49* con pCH41, se encuentran la reacción 1 en el carril 2 y así sucesivamente. En cada carril se encuentran diferentes reacciones entre las cuales se varió la temperatura de alineamiento en la reacción.

6.3 Transformación de productos de PCR a células BY4742 de *S. cerevisiae*

Los productos de PCR obtenidos anteriormente se transformaron a células competentes BY4742 y mediante recombinación homóloga, la amplificación de la proteína fluorescente junto con el marcador de selección flanqueado por los oligos forward y reverse de cada gen específico de estructura subcelular recombinó con el gen de interés (*NRD1*, *NUP49*, *SEC7*, *SEC63*, *VMA1*, *PDR5* y *LEU9*). La selección de las clonas positivas se realizó de acuerdo al marcador de selección para levadura contenido en el plásmido utilizado. Las clonas capaces de crecer en medio de selección se comprobaron por PCR de colonia para corroborar que tanto el gen de la estructura subcelular como la proteína fluorescente y marcador de selección se encuentran fusionadas y funcionales para su expresión.

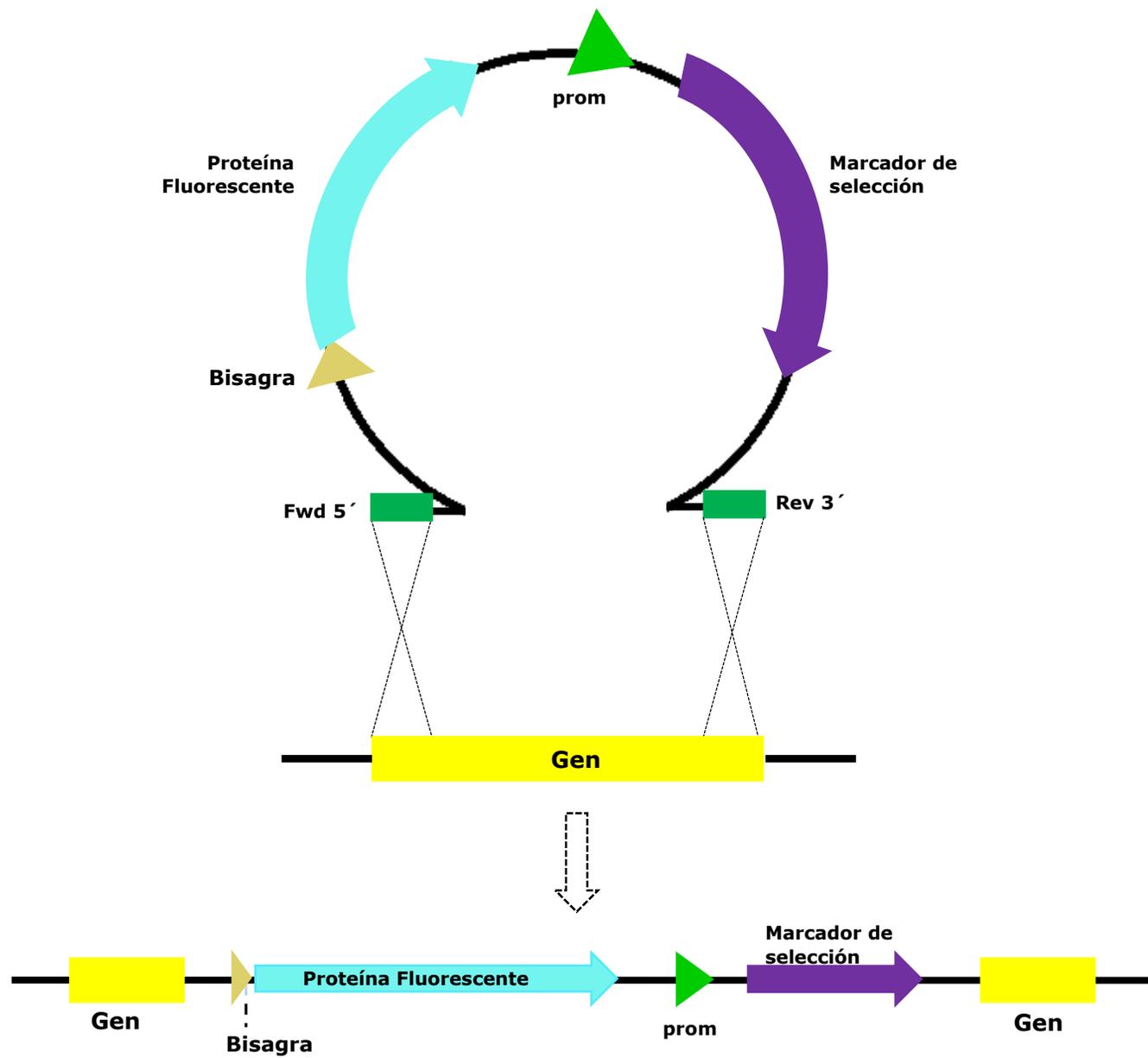


Figura 6.48. Recombinación homóloga entre el fragmento amplificado por PCR de fusión con el gen específico de estructura subcelular

El PCR de colonia consistió en un amplicón que incluye el linker dado por oligo forward (oligo C de cada gen) que amplifica parte del gen de la proteína de la estructura subcelular, y por el oligo reverse que amplifica parte de la proteína fluorescente (FluoR, mChR).

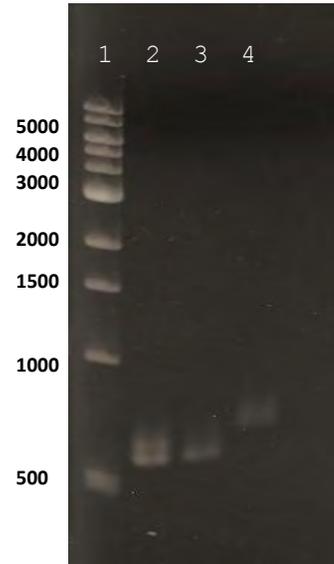


Figura 6.48 Gel de agarosa que muestra en el carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, en el carril 2, 3 y 4 la reacción de PCR de confirmación para la cepa *MAT α his3 Δ leu2 Δ lys2 Δ ura3 Δ ; NRD1-yEYFP::HIS3; VMA1-mCh::clonNAT; LEU9-yECFP::KnMX*; en el carril 2 para *NRD1-yEYFP::HIS3* (587 pb), en el carril 3 para *LEU9-yECFP::KnMX* (593 pb) y en el carril 4 para *VMA1-mCh::clonNAT* (634 pb).

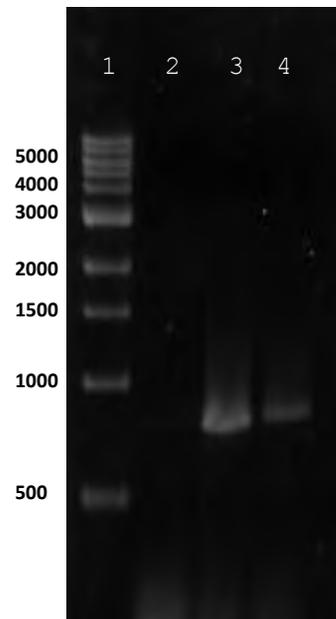


Figura 6.49 Gel de agarosa que muestra en el carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, en los carriles 3 y 4 la reacción de PCR de *MAT α his3 Δ leu2 Δ lys2 Δ ura3 Δ ; NUP49-mCh::KnMX; VMA1-yECFP::clonNAT*; en el carril 3 para *NUP49-mCh::KnMX* (607 pb) , y en el carril 4 para *VMA1-yECFP::clonNAT* (634 pb).

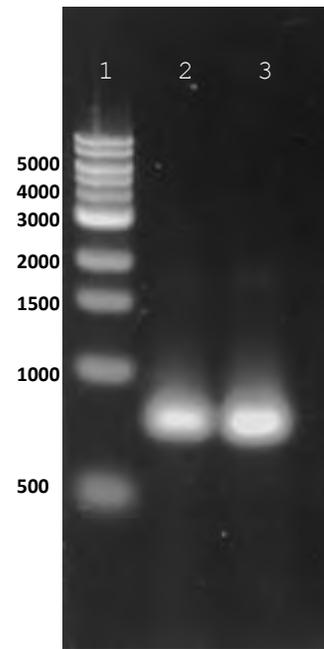


Figura 6.50 Gel de agarosa que muestra en el carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, en los carriles 2 y 3 la reacción de PCR de *MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; VMA1-mCh::clonNAT; SEC63-yEYFP::KnMX*; en el carril 2 para *VMA1-mCh::clonNAT* (638 pb) , y en el carril 3 para *SEC63-yEYFP::KnMX* (618 pb).

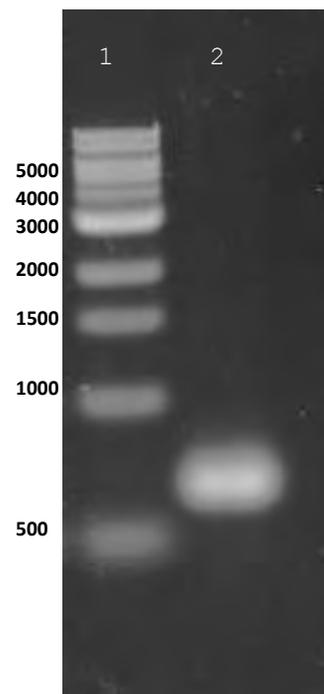


Figura 6.51 Gel de agarosa que muestra en el carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder, en el carril 2 la reacción de PCR de *MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NRD1-mCh::KnMX* (637pb).

Las cepas no confirmadas por PCR se confirmaron por su observación en el microscopio de epifluorescencia, debido a que las amplificaciones utilizando el DNA genómico no se obtuvieron por los diferentes requerimientos en la reacción de PCR.

6.4 Apareamiento de células haploides con distintas proteínas etiquetadas con proteínas fluorescentes

Una vez comprobada por PCR de colonia, la cepa haploide BY4742 (*MAT α*) que contiene a la proteína Nrd1 de núcleo etiquetada con la proteína mCherry, se apareo con una cepa perteneciente a la colección de proteínas etiquetadas con la proteína verde fluorescente BY4741 (*MAT a*) que tiene etiquetada a la proteína Pbs2, involucrada en estrés osmótico presente en el citoplasma. La cepa *MAT a* presenta el genotipo *his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; PBS2-yEGFP::*HIS3** y la cepa *MAT α* que tiene etiquetado al gen *NRD1* el genotipo *his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; NRD1-mCherry::*KnMX**. Del apareamiento resultaron células diploides que presentan una estructura subcelular y una proteína específica perteneciente a un proceso biológico marcadas con proteínas fluorescentes distintas. Las células diploides se seleccionaron en placas con medio mínimo -Met y -Lys marcadores de auxotrofia para las cepas BY4741 y BY4742 respectivamente, las células capaces de crecer en un medio sin estos dos aminoácidos corresponden a células diploides debido a la conjugación de los genotipos de cada cepa haploide.

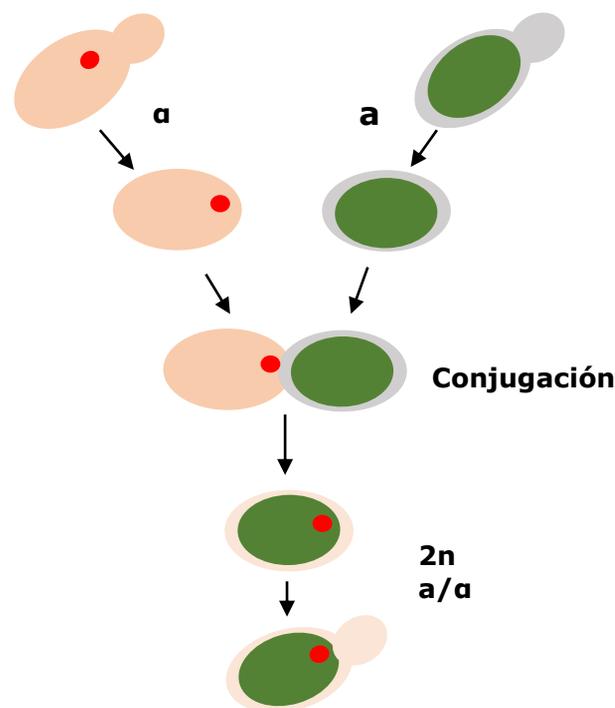


Figura 6.52 Esquema de apareamiento de *S. cerevisiae* para la obtención de células diploides

6.4 Localización de estructuras subcelulares marcadas en células wild type de *S. cerevisiae*

6.4.1 Uso de microscopía de epifluorescencia

Las estructuras subcelulares marcadas utilizando los plásmidos construidos se encuentran descritas en la tabla 6.0 y en la tabla 6.1 se enuncian las cepas obtenidas usando las fusiones anteriormente mencionadas su localización con el uso de microscopía de epifluorescencia observaron bajo las condiciones descritas en las tablas 5.8 y 5.9.

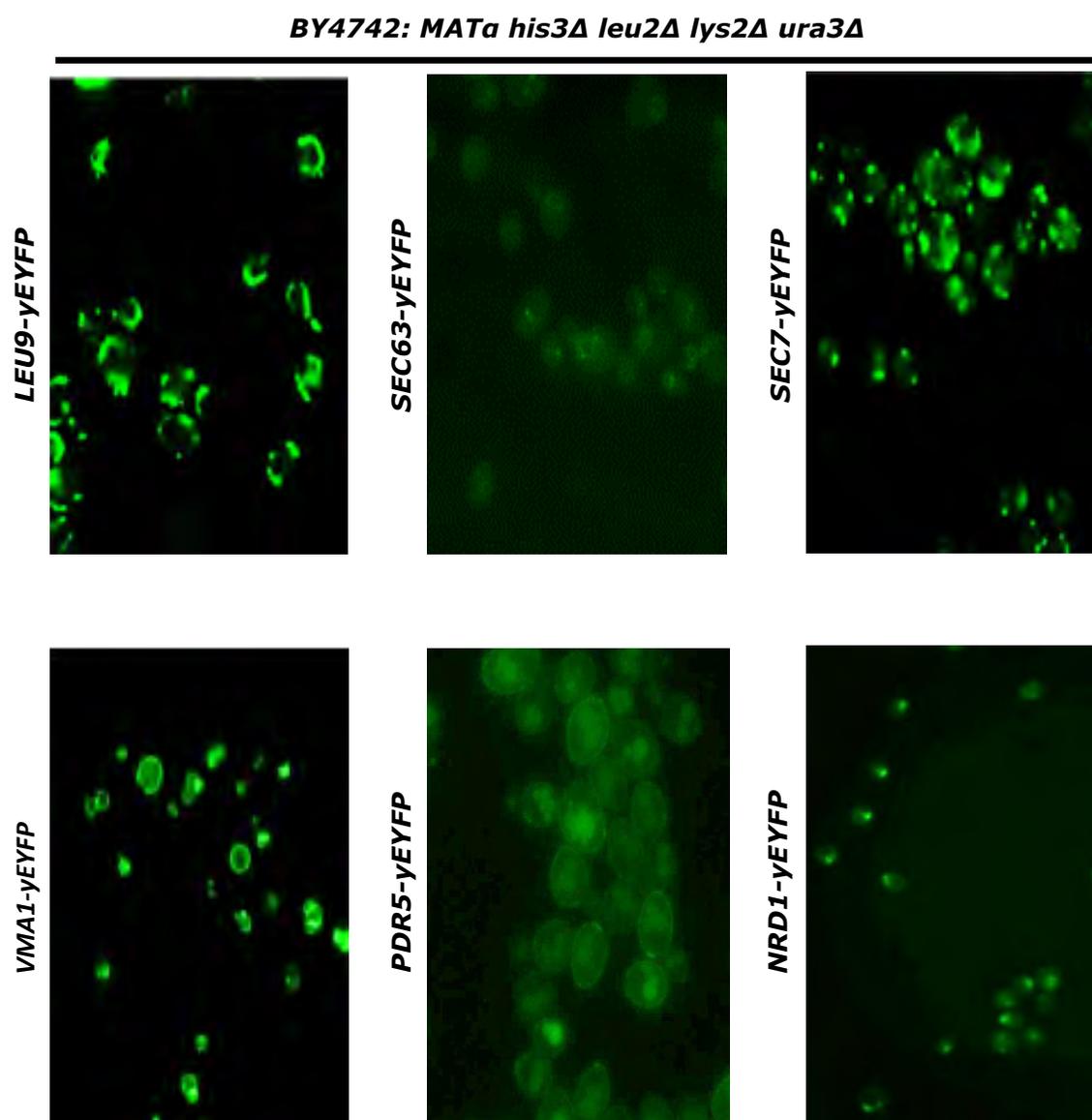
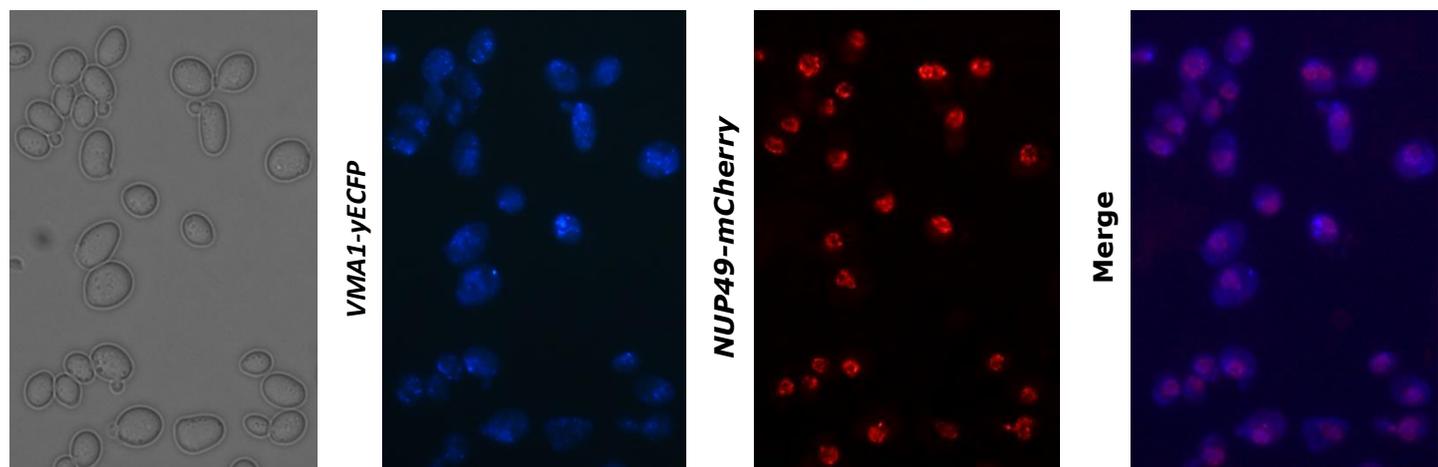


Figura 6.53 Estructuras subcelulares etiquetadas con la proteína amarillo fluorescente yEYFP, *LEU9* que corresponde a una proteína específica de mitocondria, *SEC63* de retículo endoplasmico, *SEC7* de trans Golgi, *VMA1* de vacuola, PDR5 de membrana plasmática y *NRD1* de núcleo.

A) *MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NUP49-mCh::KnMX; VMA1-yECFP::clonNAT*



B) *MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NRD1-yEYFP::HIS3; VMA1-mCh::clonNAT; LEU9-yECFP::KnMX*

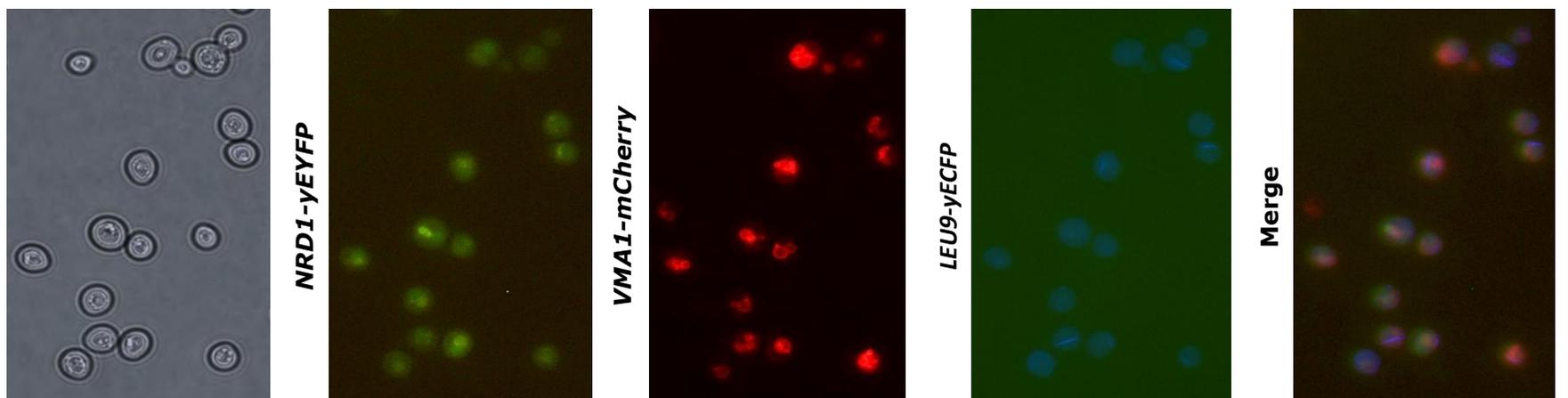


Figura 6.54 Fotografías de estructuras subcelulares etiquetadas y vistas mediante microscopía de fluorescencia. A) Cepa *WT* que presenta la vacuola y porinas nucleares etiquetadas con yECFP y mCherry respectivamente, y B) Cepa *WT* con el núcleo, la vacuola y mitocondrias etiquetadas con yEYFP, mCherry y yECFP respectivamente.

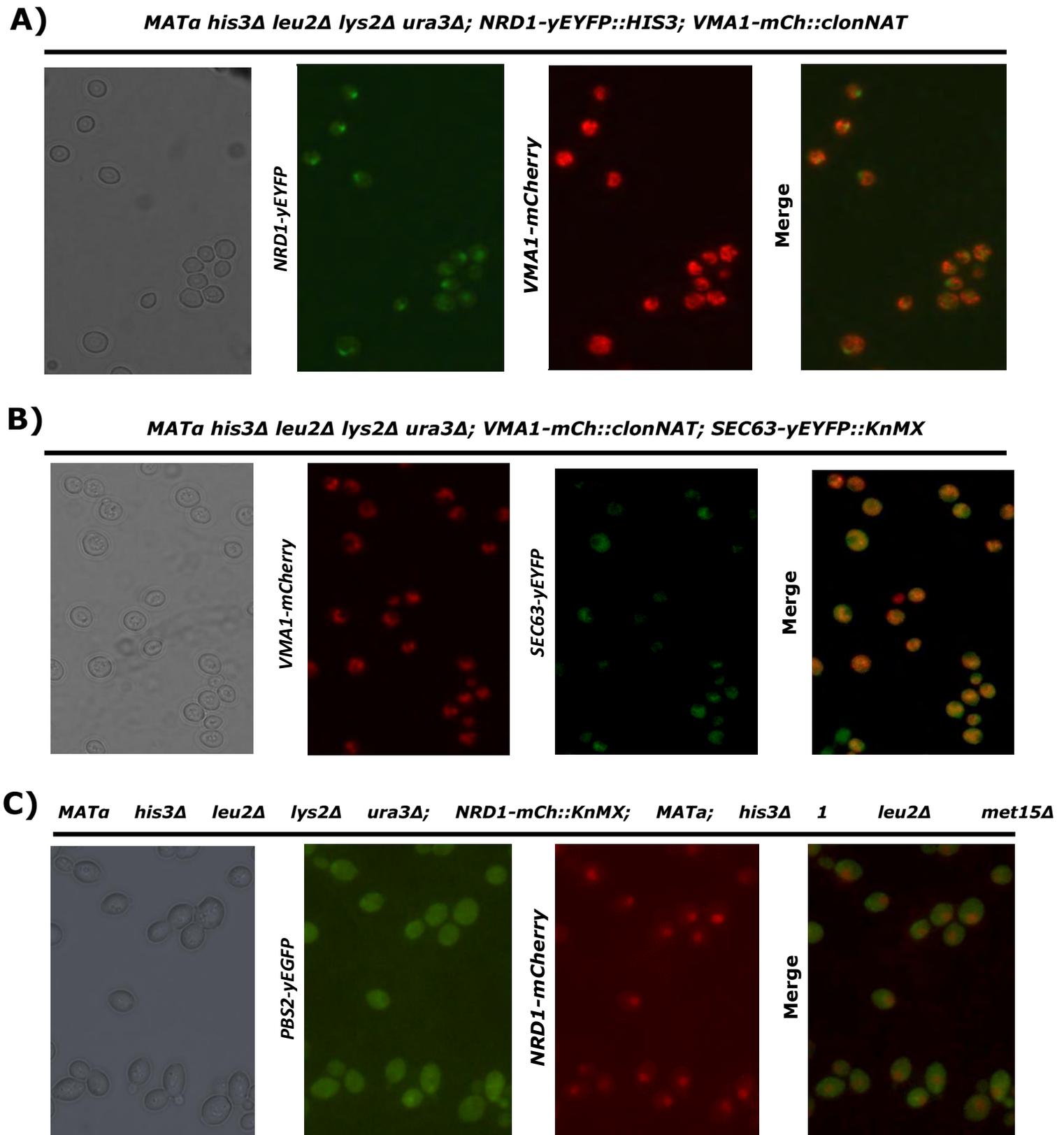


Figura 6.55 Fotografías de estructuras subcelulares etiquetadas y vistas mediante microscopía de fluorescencia. A) Cepa *WT* con el núcleo y la vacuola etiquetadas con yEYFP y mCherry respectivamente, B) Cepa *WT* que presenta la vacuola y el retículo endoplásmico etiquetados con mCherry y yEYFP respectivamente, y C) Cepa diploide que contiene al gen *PBS2* etiquetado con yEGFP y a *NRD1* con mCherry.

6.4.2 Uso de microscopía confocal

Algunas estructuras se observaron por microscopía confocal para corroborar que se contaran con estructuras etiquetadas ya fuese de manera individual o simultánea, sin embargo, en algunas ocasiones el brillo de las proteínas fluorescentes eran muy bajo debido a la visualización de un solo plano de la muestra con respecto a las imágenes vistas por el microscopio de epifluorescencia. No obstante, las características observadas en el microscopio confocal son más detalladas puesto que se muestra un barrido de planos de las células gracias a los cuales es posible la vista de estructuras subcelulares mejor definidas.

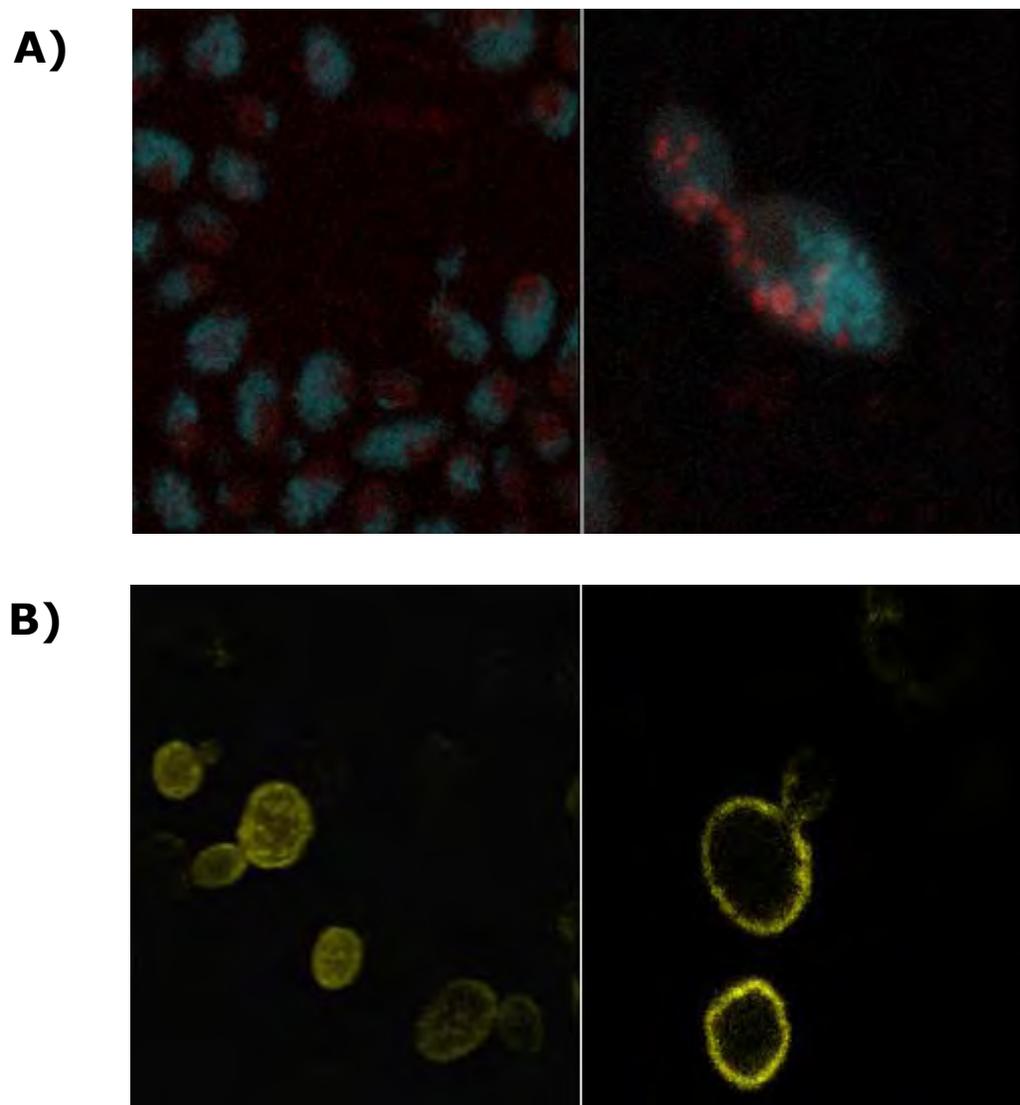


Figura 6.56 Células vistas con microscopía confocal. Para este método se fijaron células en fase exponencial, en A) la cepa *MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; NUP49-mCh::KnMX; VMA1-yEGFP::clonNAT* y en B) *MATa his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ; PDR5-yEYFP::HIS3*

6.5 Cinética de crecimiento de cepas elaboradas

Para evaluar que las cepas construidas durante este ensayo no tuvieran dificultades para crecer debido a que una proteína se encuentra marcada con una proteína fluorescente, o bien, debido a posibles efectos de las proteínas fluorescentes sobre las proteínas etiquetadas, se realizaron ensayos de cinética de crecimiento. Las cinéticas de crecimiento se evaluaron durante 24h midiendo la densidad óptica cada 15 minutos, los datos arrojados nos muestran el crecimiento de las células y las alteraciones que pueden ocurrir de acuerdo con las fusiones transcripcionales construidas. Los datos están graficados tiempo vs O.D. ₆₀₀.

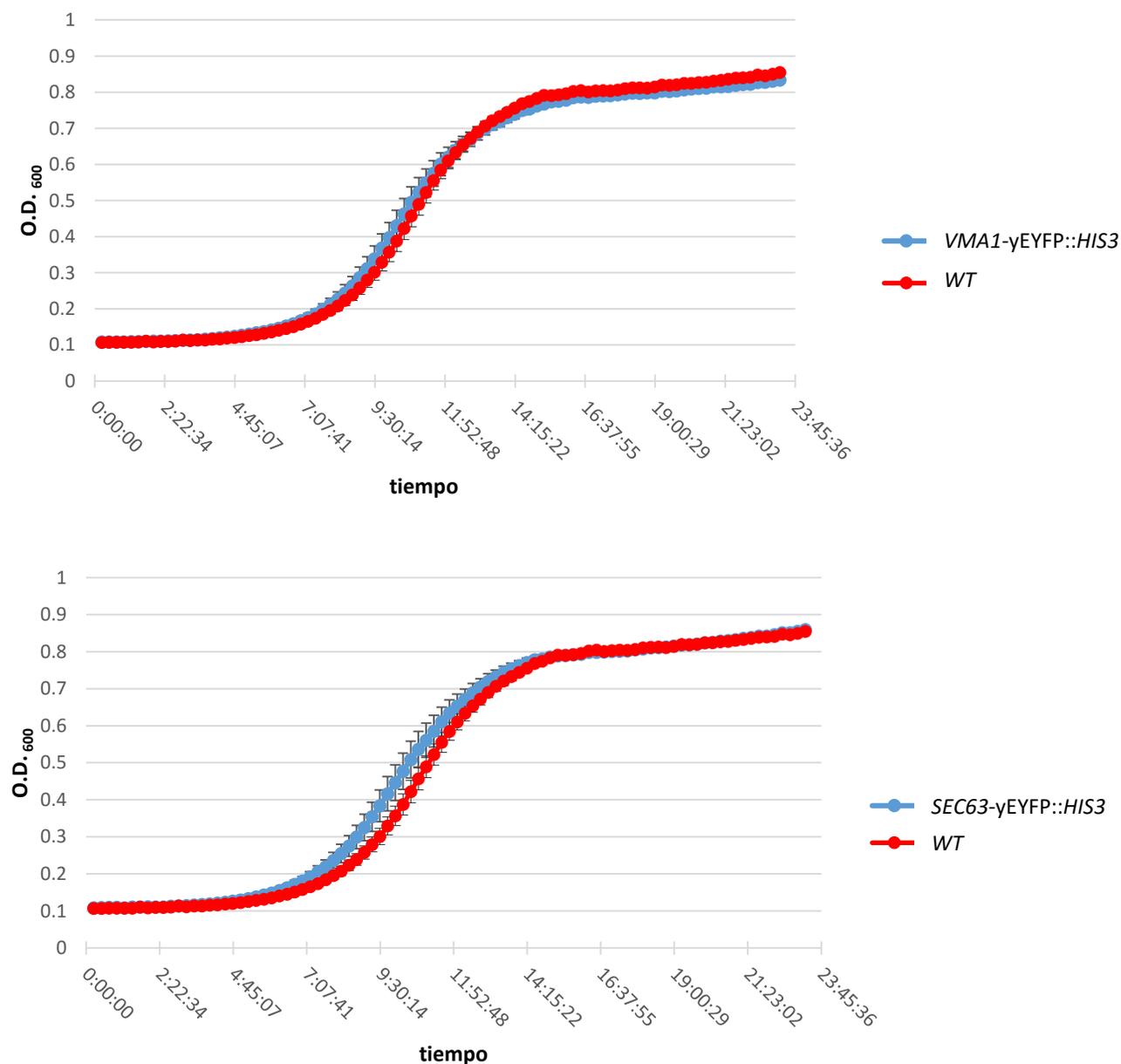


Figura 6.57 Cinética de crecimiento de cepas con proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con la proteínas amarillo fluorescente yEYFP. Se muestran las gráficas que corresponden a las cepas que contienen a *VMA1* y *SEC63* etiquetados

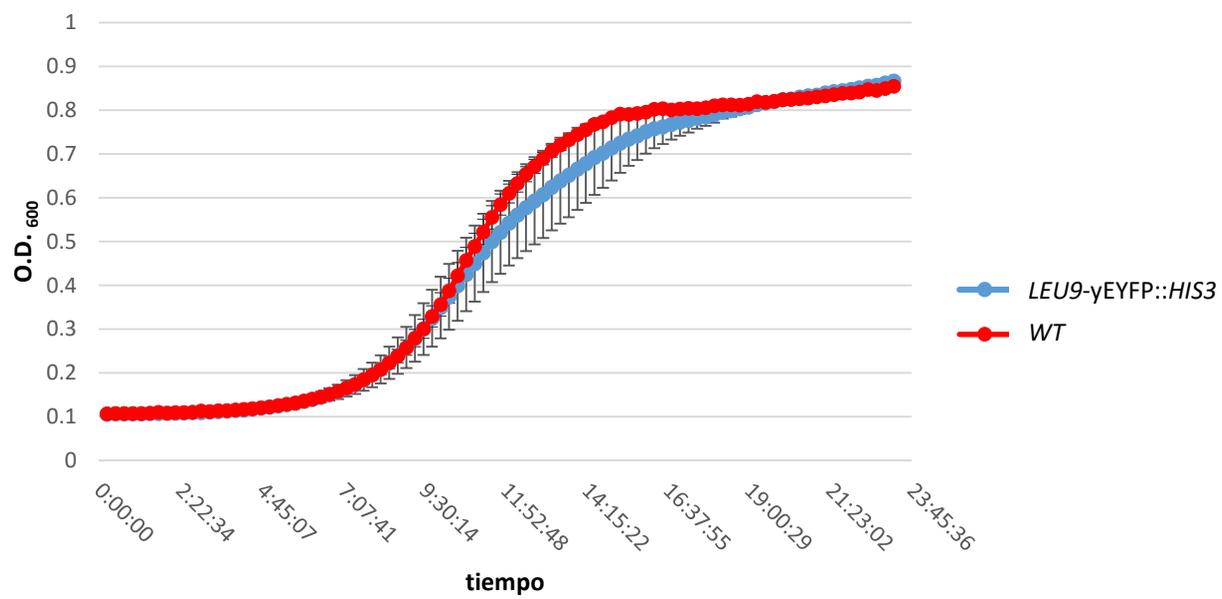
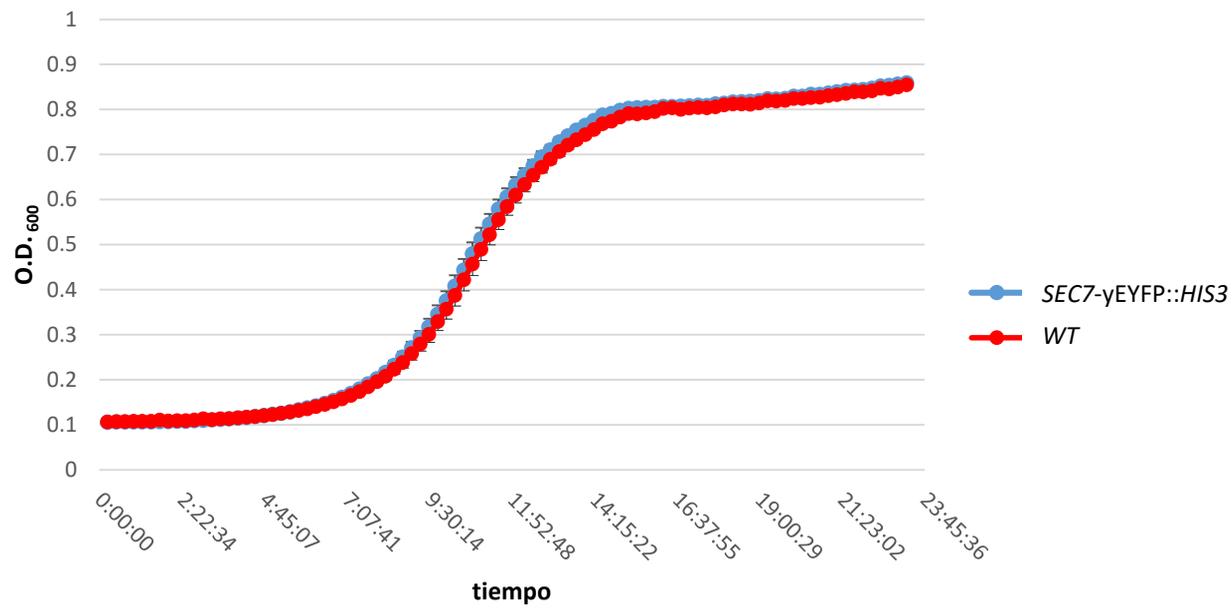


Figura 6.58 Cinética de crecimiento de cepas con proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con la proteínas amarillo fluorescente γ EYFP. Se muestran las gráficas que corresponden a las cepas que contienen a *SEC7* y *LEU9* etiquetados

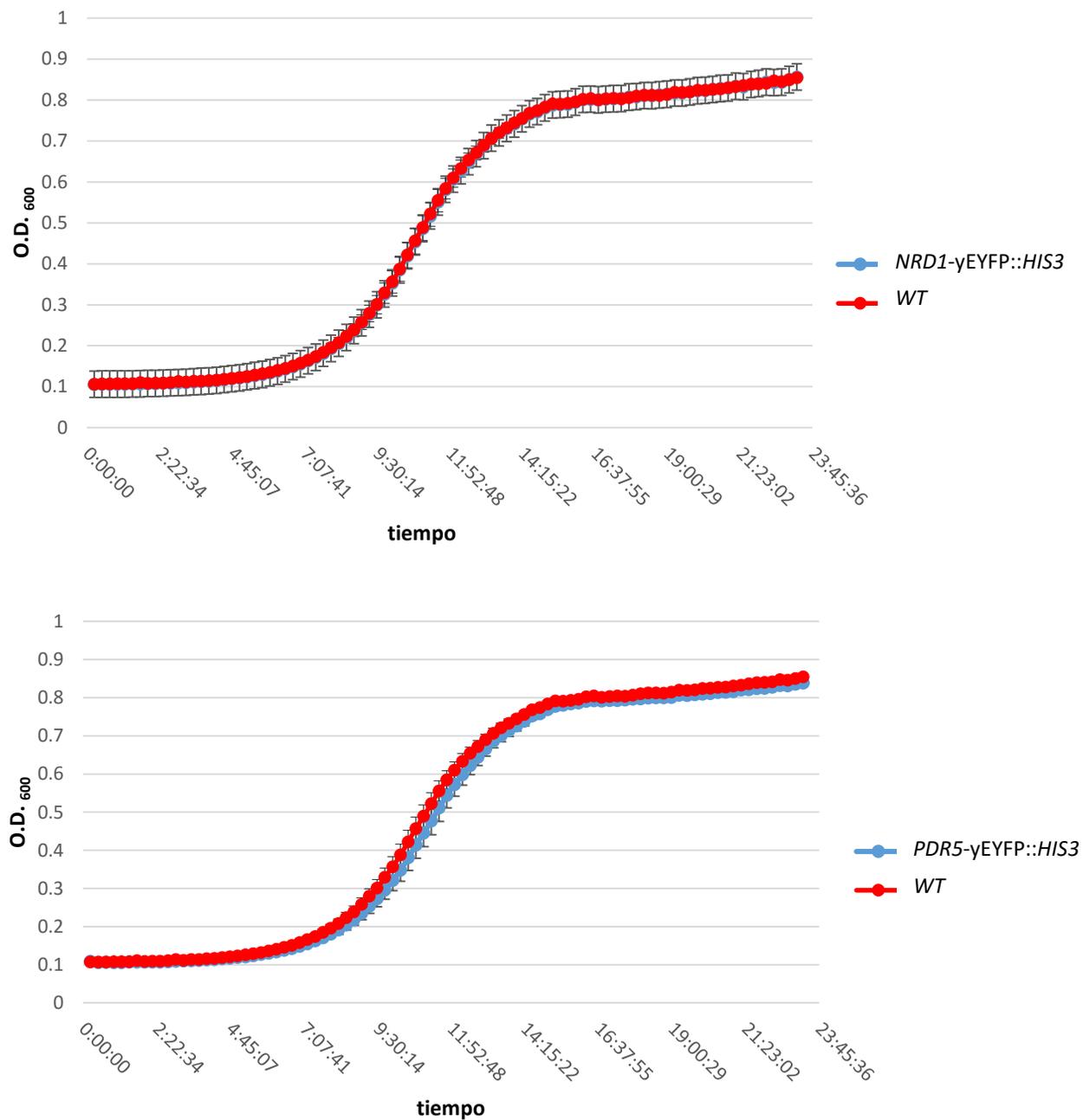


Figura 6.59 Cinética de crecimiento de cepas con proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con la proteína fluorescente yEYFP. Se muestran las gráficas que corresponden a las cepas que contienen a *NRD1* y *PDR5* etiquetados.

De acuerdo a los datos observados en las gráficas de la cinética de crecimiento las cepas que solo contienen una estructura subcelular marcada con la proteína fluorescente yEYFP no presentan alteraciones en su crecimiento, no se presenta mucha discrepancia entre los gráficos dados por una cepa *WT* y una cepa con estructura subcelular marcada. A continuación se presentan los gráficos de cepas que contienen dos o 3 estructuras subcelulares etiquetadas con proteínas fluorescentes o bien, que se encuentran etiquetadas con proteínas fluorescentes distintas a yEYFP.

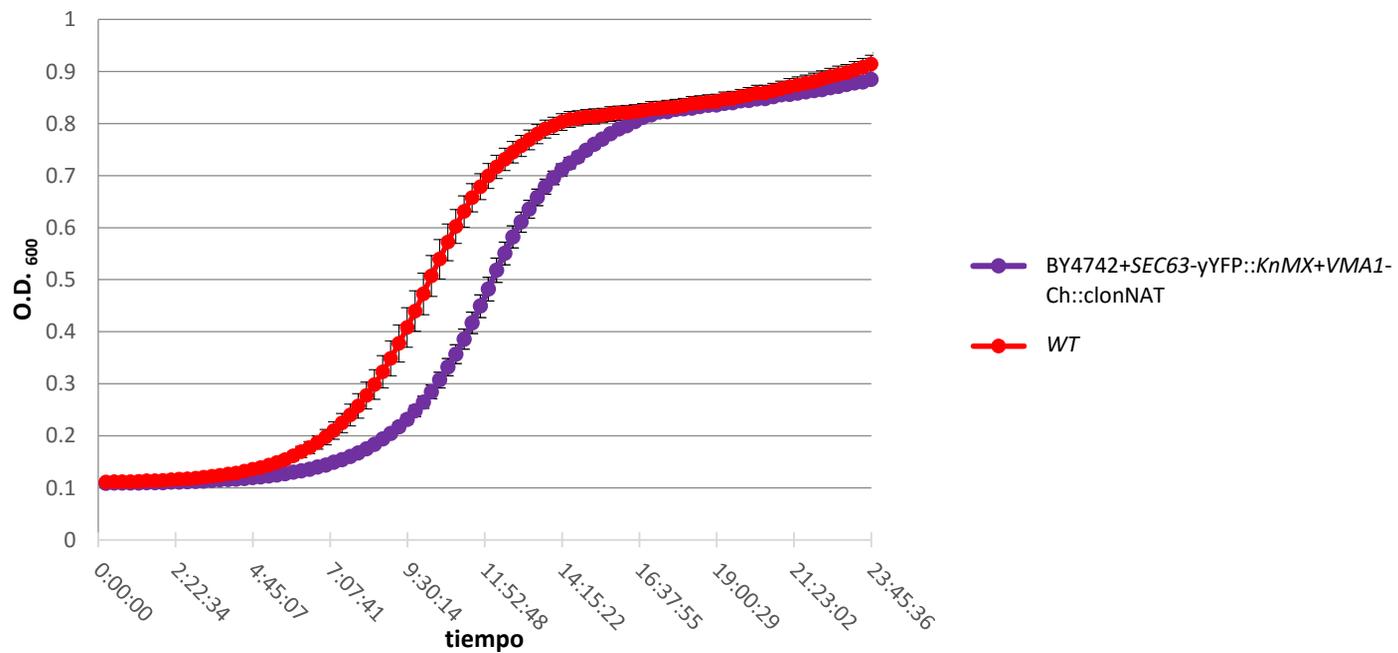
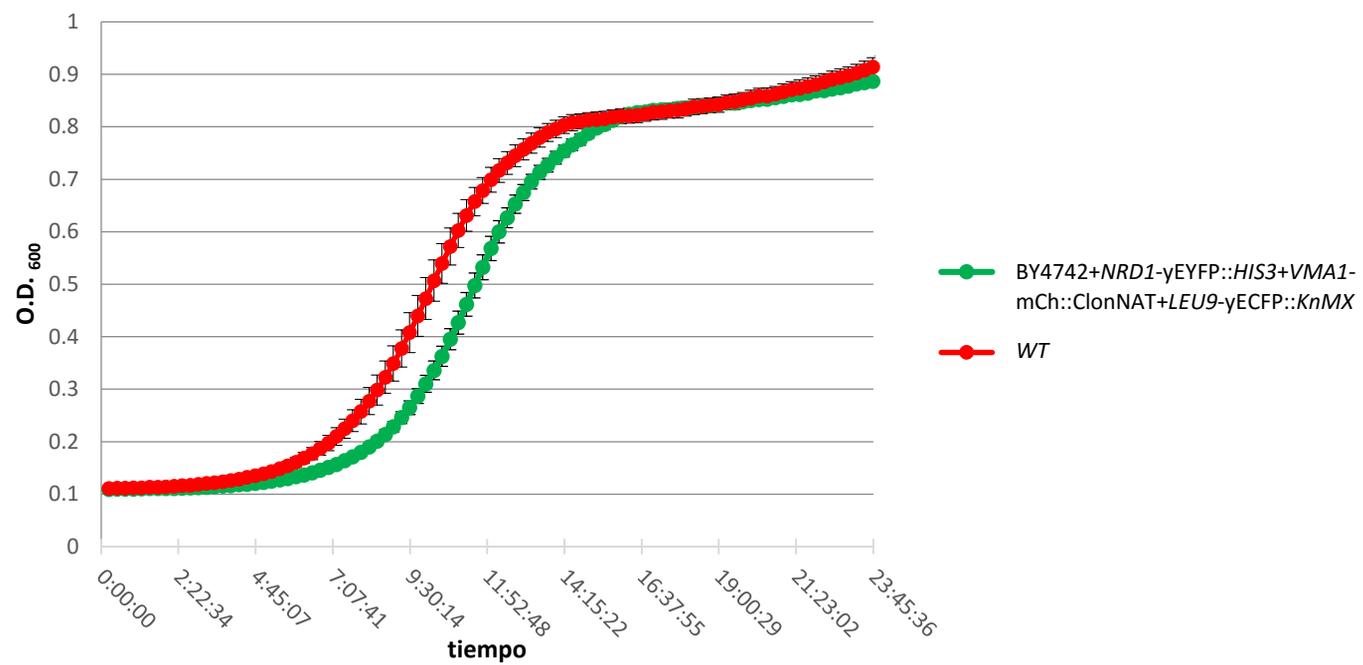


Figura 6.60 Cinética de crecimiento de cepas con 1, 2 o 3 proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con diferentes proteínas fluorescentes. Se muestran los gráficos para las cepas BY4742+ *NRD1-yEYFP::HIS3*; *VMA1-mCh::clonNAT*; *LEU9-yECFP::KnMX* y BY4742+ *SEC63-yEYFP::KnMX*; *VMA1-mCh::clonNAT*.

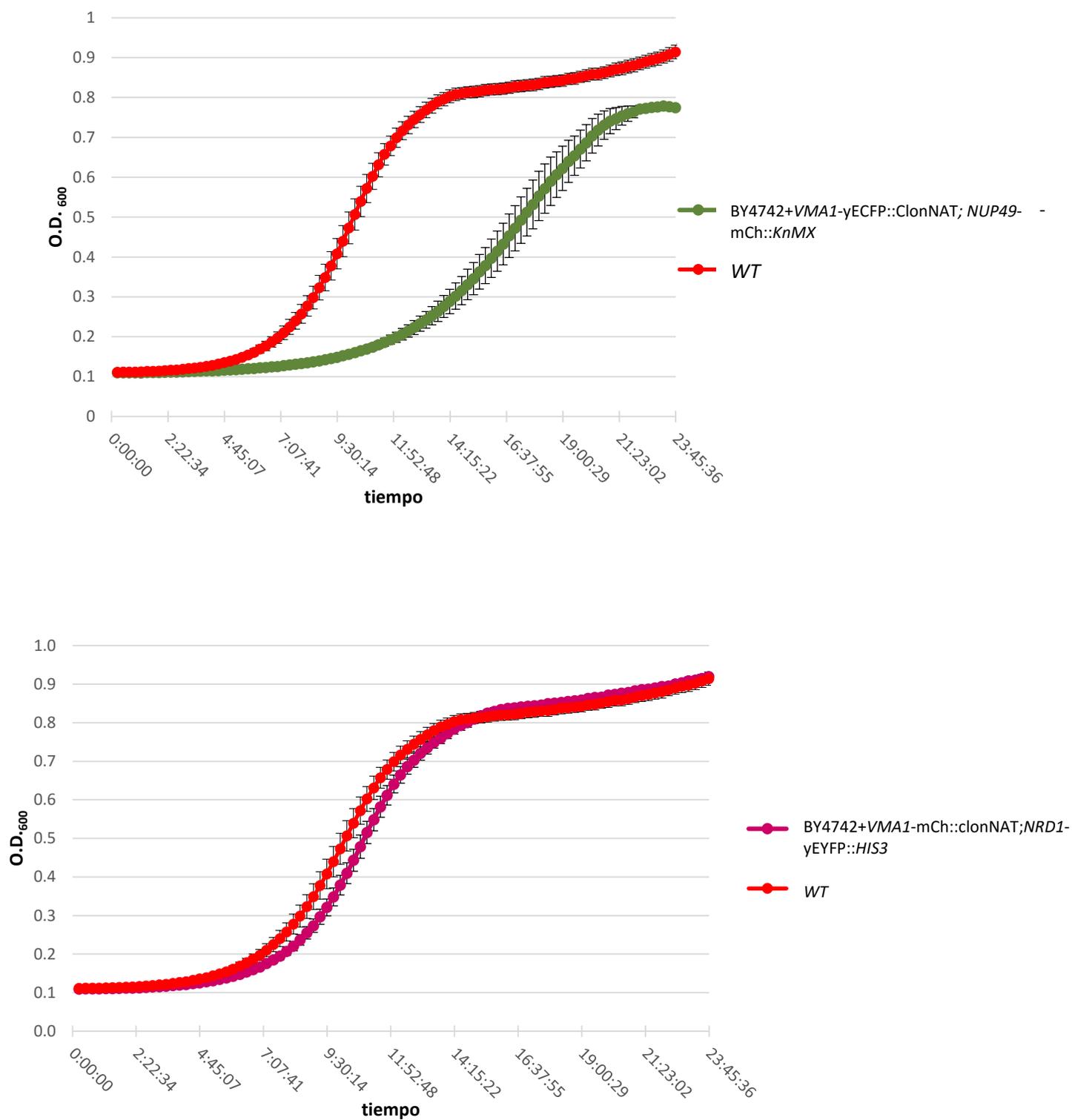


Figura 6.61 Cinética de crecimiento de cepas con 1, 2 o 3 proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con diferentes proteínas fluorescentes. Se muestran los gráficos para las cepas BY4742+*VMA1-yECFP::clonNAT*; *NUP49-mCh::KnMXm* y BY4742+*VMA1-mCh::clonNAT*; *NRD1-yEYFP::HIS3*.

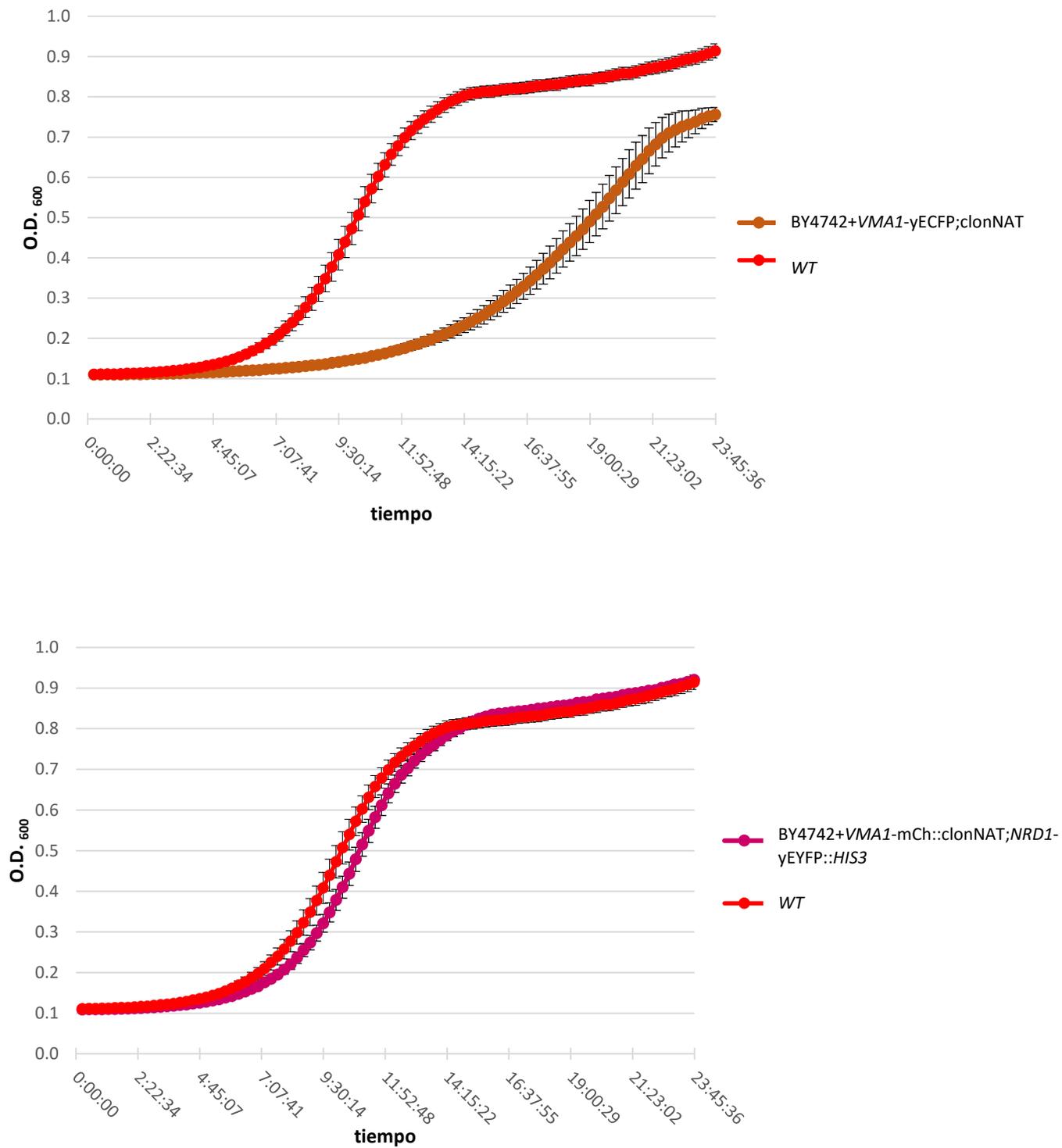


Figura 6.61 Cinética de crecimiento de cepas con 1, 2 o 3 proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con diferentes proteínas fluorescentes. Se muestran los gráficos para las cepas BY4742+*VMA1-yECFP::clonNAT*; *NUP49-mCh::KnMXm* y BY4742+*VMA1-mCh::clonNAT*; *NRD1-yEYFP::HIS3*.

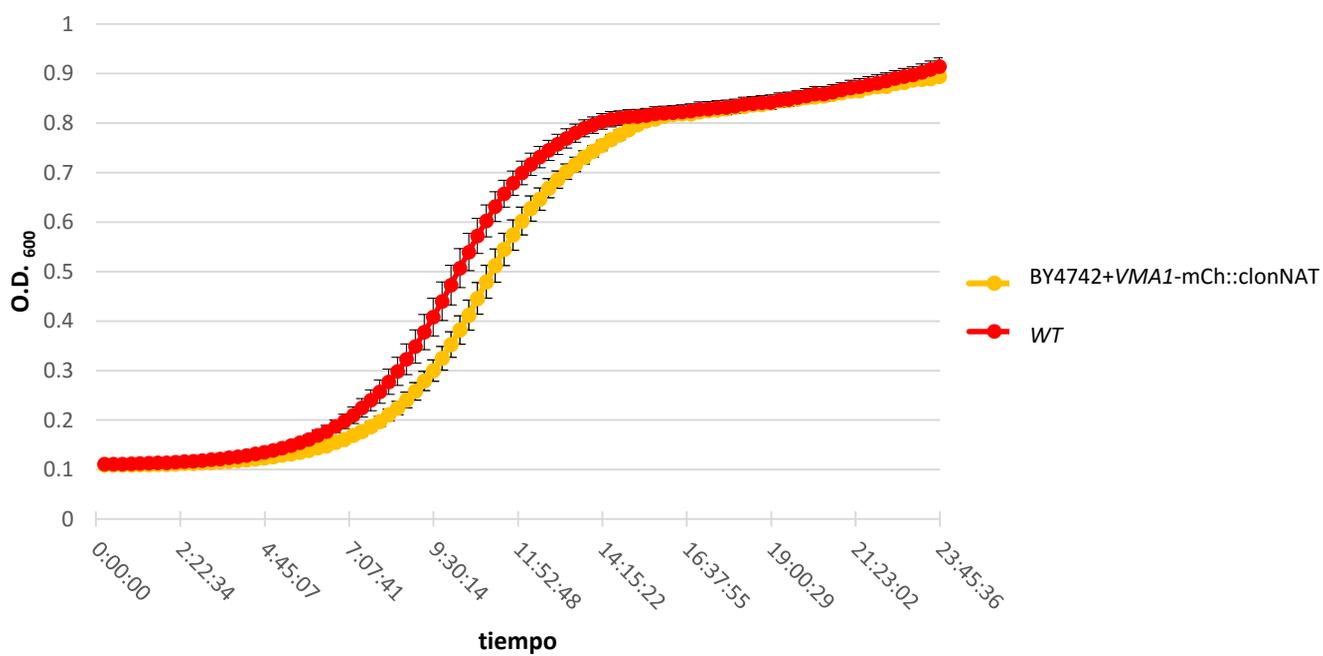
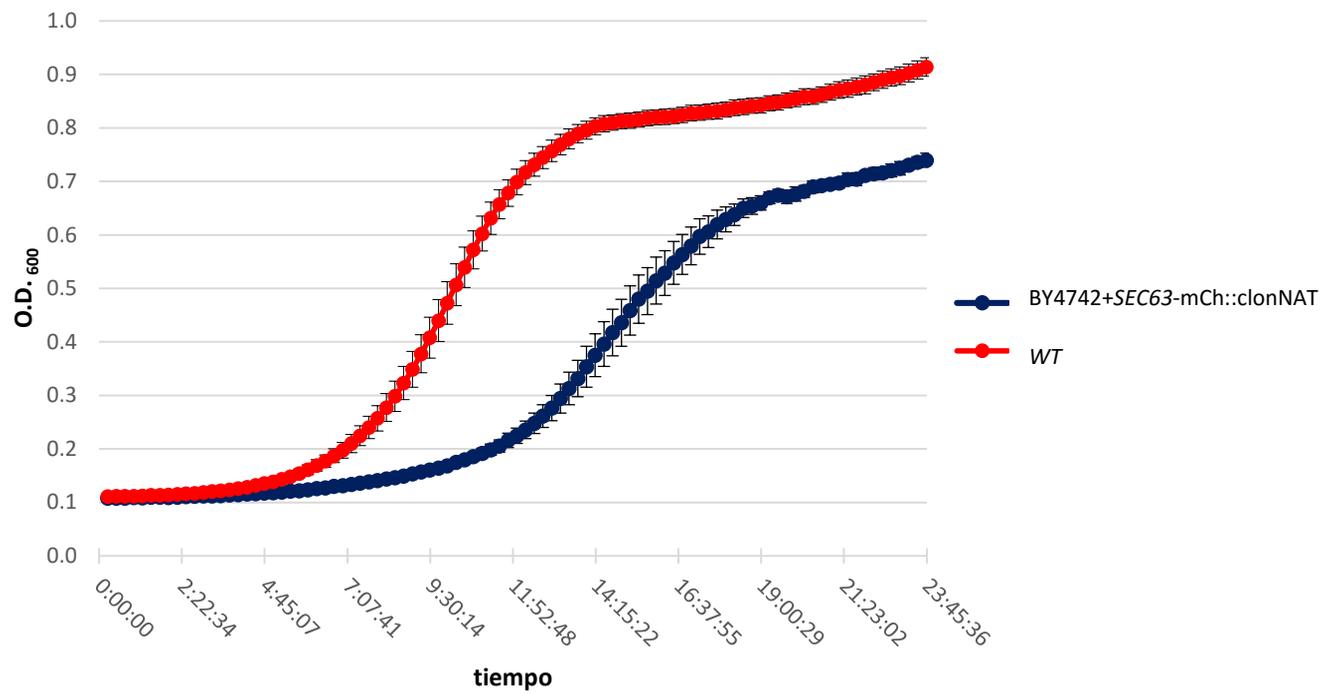


Figura 6.61 Cinética de crecimiento de cepas con 1, 2 o 3 proteínas de estructuras subcelulares etiquetadas con diferentes proteínas fluorescentes. Se muestran los gráficos para las cepas BY4742+*SEC63-mCh::clonNAT* y BY4742+ *VMA1-mCh::clonNAT*.

Haciendo un análisis de los gráficos dados por estas cepas, se puede apreciar que en algunos la velocidad de crecimiento es mayor con respecto a otras. En el caso particular de las cepas que contienen etiquetado el gen **VMA1** con la proteína fluorescente yECFP y a **SEC63** con mCherry esta diferencia en velocidad de crecimiento con respecto a la **WT** es muy marcada. En cuanto a las otras cepas a pesar de que se ve disminuida esta velocidad, no se desplaza tanto de la dada por una cepa **WT**.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La relación que existe entre la regulación de las funciones celulares y la localización de las proteínas es muy cercana, esto debido a que las proteínas no regulan exclusivamente una función, sino que dependiendo de su localización, pueden participar en diferentes vías regulando así, actividades muy distintas a las ya descritas. A lo largo de la historia del estudio de la célula la localización de proteínas es un problema cuando no se puede elucidar la función específica que ejerce de acuerdo a su ubicación subcelular.

El desarrollo de una nueva colección de plásmidos derivó de la ligación entre un plásmido que funcionó como vector de clonación y un marcador de selección para levadura. Los vectores de clonación utilizados en este trabajo, contienen principalmente, un cassette de resistencia a ampicilina y un sitio de origen de replicación para bacteria, además de dos genes, uno que codifica para un proteína fluorescente y otro para un marcador de selección para levadura, ya sea un gen de resistencia a un antibiótico o un gen de complementación para auxotrofia. Los nuevos plásmidos construidos son funcionales como vectores de fusión transcripcional. El gen que codifica para una proteína fluorescente es capaz de expresarse cuando se encuentra fusionado al marco de lectura abierto de una proteína correspondiente a una estructura subcelular.

Los distintos vectores elaborados son plásmidos que contienen a las proteínas fluorescentes yEGFP, yEYFP, yECFP, yECitrine y mCherry unidos aleatoriamente con los distintos marcadores de selección Nourseotricina (clonNAT), geneticina (*KnMX*) e higromicina B (*hph*), además de los marcadores de auxotrofia para *URA3* e *HIS3* (tabla 5.5). La fusión de proteínas fluorescentes con el ORF de genes que codifican para proteínas específicas de estructuras subcelulares se realizó en el extremo -COOH terminal mediante recombinación homóloga dirigida por oligonucleótidos, un par para cada ORF. **El diseño de los oligonucleótidos consiste para los oligos forward (5') en 47 nt correspondientes a los últimos nucleótidos del marco de lectura abierto de la proteína de la estructura subcelular que se desea fusionar y 21 nt que corresponden al linker contenido en los plásmidos, mientras que los oligos reverse (3') contiene los 50 nt siguientes al codón de termino y 21 nt contenidos en el terminador del marcador de selección.** Las amplificaciones realizadas para cada ORF se transformaron a células haploides BY4742. La eficiencia de transformación fluctuó entre una construcción y otra, ya que la estabilidad de expresión de los genes introducidos se controló por los promotores nativos del gen al cual fueron fusionados, lo que varió la capacidad para co-expresar los genes introducidos en los niveles deseados en todas y cada célula de la población de levaduras. Los diferentes amplicones de

integración, (sea 1, 2 o hasta 3) se insertaron en hasta tres eventos de transformación, dependiendo cada cepa, es decir, si contiene 1, 2 o 3 estructuras subcelulares marcadas. La eficiencia de transformación varió de acuerdo al número de productos de PCR insertados, entre más productos de PCR distintos se usan para transformar una cepa, menor es la eficiencia de transformación. Las clonas obtenidas para cada construcción se analizaron por medio de PCR utilizando DNA genómico con un oligo específico para la etiqueta de la proteína fluorescente y otro específico para cada ORF. Cuando hubo amplificación, el producto de PCR se había integrado en el locus apropiado y además todas ellas tenían fluorescencia. Los resultados anteriores, nos muestran que es factible realizar la integración de distintas etiquetas a estructuras con proteínas fluorescentes, aunque en algunos casos la tasa de éxito era baja con respecto a otras (de una colonia a decenas), lo que propone que algunas proteínas en estructuras subcelulares, pueden verse más afectadas que otras al estar fusionadas a proteínas fluorescentes.

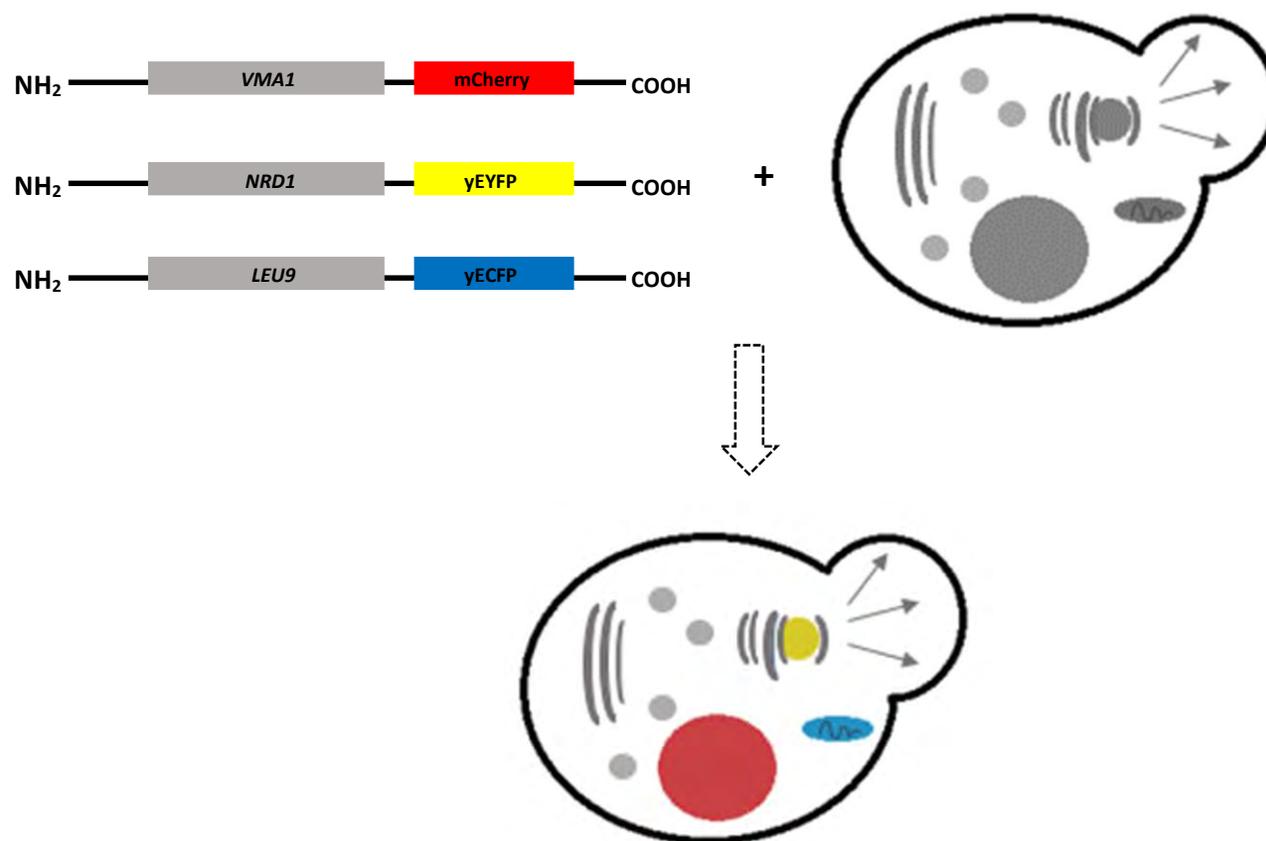


Figura 7.1 Esquema de transformación. Productos de PCR que contienen a mCherry, yEYFP y yECFP fusionados transcripcionalmente a las proteínas Vma1p, Nrd1p y Leu9p, respectivamente, se transformaron en *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante microscopía de fluorescencia se comprobó la expresión de las proteínas fluorescentes.

Los múltiples marcos abiertos de lectura que se utilizaron en este proyecto corresponden a los genes *NRD1*, *NUP49*, *VMA1*, *SEC7*, *SEC63*, *LEU9* y *PDR5*, que codifican para proteínas específicas en estructuras subcelulares. La decisión de su uso, radicó en los reportes donde se describe una localización específica mediada por una actividad específica en fases de crecimiento específico, lo cual fue de utilidad para apoyarse en ellos como elementos de localización fija en la levadura. *NRD1* codifica para una la proteína Nrd1p que forma parte del complejo NNS en el núcleo, es una subunidad que funciona como proteína de unión al RNA e interactúa con el exosoma para mediar la poliadenilación del extremo 3' de algunos mRNA como lo son los snRNAs y snoRNAs (28). *NUP49* codifica para una proteína componente del complejo del poro nuclear (CPN), una estructura proteica grande que media el transporte regulado de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma (29, 30). *VMA1* corresponde a la subunidad A del dominio de membrana periférica V1 de la V-ATPasa vacuolar (31). *SEC7* es el gen que codifica para el factor de intercambio de guanina para los factores de ribosilación de ADP involucrados en la proliferación del Golgi, el transporte intra-Golgi y RE-Golgi, se encuentra en el citoplasma y en vesículas recubiertas asociadas a Golgi (32). En eucariotas, las proteínas secretoras sintetizadas en el citosol primero se deben trasladar a través de la membrana al retículo endoplásmico (RE) para entrar en la vía secretora. Los precursores de estas proteínas se caracterizan por una secuencia de aminoácidos hidrófobos en su extremo N-terminal que los identifica para la orientación al RE. Esta secuencia señal es reconocida por factores de orientación en el citosol, en muchos casos a través de las acciones de la partícula de reconocimiento de señal (SRP), que dirige al precursor a la membrana del RE en la forma de un complejo de cadena ribosoma/naciente. *SEC63* codifica para un componente del complejo Sec62/63 implicado en la translocación post-traducciona de proteínas SRP-independente a través del retículo endoplásmico (33). *LEU9* codifica para la 2-isopropilmalato sintasa quien cataliza el primer paso en la ruta de biosíntesis de leucina en la mitocondria (34). Por ultimo *PDR5* un cassette (ABC) transportador de membrana de plasma ATP vinculante; transportador de múltiples fármacos regulados activamente, también participa en el transporte de esteroides, la resistencia de cationes y la desintoxicación celular durante el crecimiento exponencial (32). De acuerdo al análisis de localización por microscopía de fluorescencia, cada proteína conserva su estadía en la estructura subcelular para la cual han sido descritas. En el caso de *PDR5*, se observó que durante fase exponencial su localización es situada en la membrana plasmática como se ha reportado (figura 5.56), sin embargo, nosotros encontramos que en células en fase estacionaria la señal de fluorescencia se observa en vesículas y en algunos casos en vacuola (figura 6.53). Esto nos sugiere que el recambio de esta proteína es dinámico ya que en fase estacionaria probablemente se internaliza para su degradación.

Asimismo la fusión de las diferentes proteínas fluorescentes se realizó en el extremo carboxilo de las proteínas estructurales. El producto de PCR de estas fusiones corresponde a una secuencia que está flanqueada por los oligos forward y reverse correspondientes al ORF de la proteína de estructura subcelular, el linker, la proteína fluorescente, y el promotor del marcador de selección y el marcador de selección (figura 6.39). Las mayoría de las fusiones se obtuvieron (figuras 6.40-6.46), no obstante, no siempre las fusiones fueron positivas. La PCR de fusión del plásmido pCH41 que contiene a la proteína yECFP y el marcador *KnMX* con el ORF del gen *NUP49* no se logró (figura 6.47). La amplificación de los genes que codifican para la proteína fluorescente con los oligonucleótidos específicos para un ORF es un factor que se debe descartar, puesto que la secuencia de todos los oligos forward presentan una región correspondiente los últimos 47 nucleótidos del ORF y otra al linker contenido en los plásmidos, y todos los reverse contiene los 50 nt siguientes al codón de termino y 21 nt contenidos en el terminador del marcador de selección, de forma que la amplificación para todas y cada una de las distintas proteínas fluorescentes es la misma. Además se probaron distintas temperaturas de alineamiento para la fusión *NUP49*-yECFP: : *KnMX* mediante un gradiente sin tener éxito excluyendo así este otro factor.

Los datos mostrados en las gráficas de cinética de crecimiento (figuras 6.60-6.63) muestran diferencias en la velocidad de crecimiento de cada cepa elaborada, por ello, la idea de que las proteínas fluorescentes afectan la función de proteínas subcelulares llama mucho nuestra atención. Éste caso resulta particular para las cepas que contienen las fusiones yECFP-*VMA1::clonNAT* y mCherry-*SEC63::clonNAT*. Las fusiones de *SEC63* y *VMA1* con otras proteínas fluorescentes muestran una consistencia en el crecimiento con respecto a una cepa wild type y también con respecto a otras cepas que contienen más estructuras subcelulares etiquetadas, por esta razón se podría pensar que la función de una proteína de estructura subcelular etiquetada con ciertas proteínas fluorescentes podrían resultar afectadas. Otra característica que se observa en las curvas de crecimiento es que el número de proteínas etiquetadas no afecta el crecimiento como ocurre en la cepa que contiene las fusiones yEYFP-*NRD1::HIS3*, mCherry-*VMA1::clonNAT* y yECFP-*LEU9::KnMX* (Figura 6.60), sino que parece ser que la fusión con algunas proteínas fluorescentes si afecta el crecimiento. En algunos casos, se etiquetaron proteínas con funciones esenciales para la constitución de procesos biológicos importantes para la célula y es por esta razón que al realizar un análisis a cada ORF utilizado podría dar datos importantes para su uso adecuado, a pesar de que en la literatura se han reportado como proteínas estables, algunos

genes pueden resultar mayormente afectados que otros. Durante el desarrollo de este proyecto se observó que la expresión de *LEU9* etiquetado con la proteína yECFP parece no dañarse, pudiéndose explicar por la función paráloga desempeñada por *LEU4* gen parálogo de *LEU9* (31), quien puede amortiguar la pérdida de función de *LEU9* provocada por su fusión con yECFP. Un caso contrario ocurre con la fusión de yECFP con *VMA1* quien al no contar con algún parálogo para ejecutar su acción, se afecta su expresión y retrasa el crecimiento.

Al observar las discrepancias en el crecimiento entre cepas, se propone un estudio más a fondo de como las proteínas fluorescentes en conjunto con distintos marcadores de selección pueden afectar la expresión de proteínas estructurales y así retrasar el crecimiento celular. Una explicación podría ser el uso preferencial de codones para levadura. El uso de codones es una manera de asegurar la tolerancia de que genes foráneos pueden ser traducidos adecuadamente por el genoma receptor, lo que se debe a la compatibilidad del uso de codones de genes foráneos con la maquinaria de traducción del organismo hospedero. Cuando una proteína esta codificada por un alto porcentaje de codones poco frecuentes la velocidad de traducción se ve disminuida, y esto se ve reflejado en la cantidad de proteína final (35). Si una proteína fluorescente se encuentra fusionada al ORF de un gen que codifica para una proteína imprescindible para la célula, el alto contenido de codones poco frecuentes en la proteína fluorescente derivará en una escasa producción de proteína a la que se encuentra fusionada. Este punto es importante de analizar debido a que las propiedades químicas y biológicas de cada proteína se deben a su secuencia nucleotídica y el uso de codones preferenciales. No obstante, al realizar el análisis de uso de codones en la proteína yECFP se puede observar cómo los 239 codones en la secuencia corresponden a codones de uso preferente (36). El mismo análisis se realizó para la proteína mCherry, con la cual la eficiencia de transformación siempre fue baja, además de que la cepa que contiene a Sec63p etiquetada (figura 6.62), presenta un crecimiento más lento con respecto a la cepa wild type; en este caso se muestran resultados contrastantes: de 237 codones, 7 de ellos resultan ser codones poco frecuentes (figura 6.64), hecho que podría explicar por qué una cepa transformada con un producto de PCR que contiene a esta proteína fluorescente siempre formo colonias muy pequeñas, además de que la eficiencia de colonias transformadas era poca. Esta proteína, tiene la particularidad de provenir de una proteína roja fluorescente estandarizada para su uso en células de mamífero, la proteína mRFP1, de la cual se obtuvo mCherry mediante mutaciones (37). Si en los 7 codones no preferencialmente utilizados se realiza el cambio de un nucleótido por otro, podría lograrse el mismo aminoácido codificado por un

codón de mayor frecuencia estandarizado para su uso en levadura. Con los datos anteriores, se decidió realizar un tercer análisis del uso preferencial de codones para la proteína, yEYFP, debido a que las fusiones con esta proteína siempre presentaron buena eficiencia de transformación y de crecimiento para las cepas que la contienen (figuras 6.57-6.59). La frecuencia de codones para esta proteína es la misma que para yECFP al no presentar tripletes de baja frecuencia a lo largo de su secuencia. La interacción molecular de la proteína fluorescente con cada proteína estructural también podría estar afectando la expresión del gen de la proteína estructural derivando en pérdida de función. Por los resultados anteriores sería interesante realizar la caracterización de la proteína yECFP y encontrar posibles características que marquen diferencias significativas con las demás proteínas fluorescentes utilizadas en este trabajo lo que no le permite actuar de la misma manera permitiendo un crecimiento óptimo en algunas cepas que la contienen. El uso de esta proteína, se decidió debido a que en distintos reportes donde se ha utilizado la proteína cian fluorescente se muestran resultados positivos de fluorescencia (38-41), sin embargo no se reportan fenómenos como el nuestro, donde su fusión a una proteína causa deficiencia en el crecimiento de la levadura.

La observación de múltiples estructuras subcelulares etiquetadas se realizó con microscopía epifluorescente y confocal. Con el primero, la observación de cada cepa se realizó *in vivo*, por separado para cada estructura marcada, resultando con éxito para todas las estructuras marcadas. Para la microscopía confocal, al excitar los fluoróforos de manera simultánea, solo fue posible la observación por lapsos sin tener la posibilidad de fotografiar la mayoría de las fusiones, esto resultó así porque algunas proteínas fluorescentes requieren de mayor tiempo de excitación con respecto a otras, o bien, algunas se blanquean con mayor velocidad. La adquisición de imágenes por microscopio confocal emplea más tiempo que la captura por epifluorescencia, ya que el láser emplea un tiempo en el barrido. Además de que el brillo percibido de una proteína fluorescente está determinada por varios factores variables, incluyendo el brillo intrínseco de la proteína fluorescente, por su velocidad y eficiencia de maduración, coeficiente de extinción y la fotoestabilidad. Aunado a lo anterior, la microscopía de epifluorescencia nos permite ver la suma de todos los planos de la estructura subcelular marcada (figuras 6.53-6.55) permitiendo así un mayor brillo de cada fluoróforo, mientras que el confocal nos muestra distintos planos por separado, lo que hace posible una reconstrucción tridimensional de una estructura y así mejorar la distinción para cada estructura (figura 6.56). No obstante gracias a la tecnología del microscopio confocal, fue posible la visualización detallada de algunas estructuras (figura 6.56), como son el núcleo para el cual se marcó el gen **NUP49** con mCherry y la vacuola con el marcaje de **VMA1** con yECFP donde se puede apreciar perfectamente la co-localización de estas dos estructuras

subcelulares, incluso en una célula en gemación. La proteína Pdr5p, la cual por microscopía de epifluorescencia en células en fase estacionaria se observó su internalización a vesículas y vacuolas, pero mediante microscopía confocal, las células se fijaron en fase exponencial, donde se le ve formando parte de la membrana plasmática en agregados puntuales, lo cual sugiere que se encuentra concentrada en ciertos dominios y no en toda la estructura subcelular (figura 6.56). Los contrastes que existen entre estos dos tipos de microscopía nos explican los resultados de este trabajo: el microscopio de epifluorescencia de todos los colores emitidos por la lámpara elige el color de excitación adecuado para cada fluoróforo mediante filtros ópticos, esto ocurre por lapsos cortos que se pueden maniobrar por el espectador. Si bien el microscopio confocal mediante el láser puede excitar específicamente de manera secuencial cada fluoróforo contenido en una muestra para evitar el cruce de distintos canales de color, también provoca citotoxicidad por la generación de radicales libres. Asimismo, mediante el pinhole, se impide el paso de luz de otros campos ajenos al de interés, pero solo se percibe la luz proveniente de un plano, lo que genera que el láser siga iluminando por más tiempo apagando la fluorescencia de toda la muestra.

Por otro lado, esta nueva serie de plásmidos funge como una herramienta complementaria con la colección de proteínas etiquetadas con la proteína verde fluorescente (19). Se realizaron cruces de la cepa BY4741 que contiene a la proteína Pbs2 etiquetada con yEGFP: *HIS3* de esta colección con una de nuestras cepas obtenidas, BY4742 que contiene a la proteína Nrd1 etiquetada con mCherry: *KnMX*. El apareamiento de las cepas que contienen una etiqueta en una proteína de estructura subcelular de un sexo, con otras que contienen etiquetadas proteínas en específico del sexo contrario se logró exitosamente, lo que concluye que estas cepas también son funcionales para lograr la co-localización de proteínas contenidas en cepas de sexo distinto.

Durante la realización de este trabajo, se cuidaron distintas cuestiones para el marcaje de una proteína de interés con una proteína fluorescente. Cuando una proteína se marca mediante fusión a una proteína fluorescente, las interacciones entre la proteína y proteína fluorescente puede no dar los resultados deseables, ya que de este modo se puede perturbar la orientación o función de una proteína. En los resultados presentados, se concretó que los requisitos generales para la utilización con éxito de una proteína fluorescente para el uso de la microscopía de fluorescencia son: 1. La proteína fluorescente debe expresarse de manera eficiente y sin toxicidad en el sistema elegido, y debe ser lo suficientemente brillante para proporcionar una señal por encima de la autofluorescencia; 2. Debe ser fotoestable para poder así obtener imágenes durante la duración del experimento; 3. Si la proteína fluorescente se

expresa como fusión con otra proteína de interés, entonces la proteína fluorescente no debe oligomerizar; 4. Debe ser insensible a los efectos ambientales que podrían confundir para una interpretación cuantitativa de los resultados experimentales y finalmente, 5. en experimentos de etiquetado múltiple, se debe tener un mínimo de diferencia entre los canales de excitación y emisión de cada proteína fluorescente (42). De manera que si una proteína como yECFP acarreo problemas en el crecimiento celular al fusionarse con **VMA1**, y mCherry causa una baja eficiencia en la transformación, podrían no ser las proteínas adecuadas para este ensayo, debido a que su expresión puede ser no óptima en estas fusiones o bien, causar un efecto dañino para la célula. Parámetros como la fotoestabilidad y la elección de fluoróforos en distintos canales de excitación y emisión, fueron de suma importancia para el desarrollo de esta metodología, dado que de este modo la visualización de la co-localización de diferentes estructuras subcelulares marcadas en una cepa fue posible.

El objetivo central del estudio de las proteínas es entender la función y el papel que juega cada proteína en el desarrollo celular. Se han descrito métodos automatizados para la determinación de un número de propiedades de distintas proteínas, sin embargo, muy poca atención se ha prestado a la determinación de la localización subcelular de las proteínas. Los avances en el uso de la microscopía de fluorescencia la han convertido en un valioso método para la determinación de la localización de las proteínas. La información resultante del método desarrollado en este trabajo podría ayudar a entender, además de saber dónde se distribuye una proteína dentro de la célula, que función realiza y cómo cambia su ubicación en respuesta a fármacos, durante condiciones de estrés y durante el ciclo celular.

mCherry

TTT F 0.59 26.1(170666)	TCT S 0.26 23.5(153557)	TAT Y 0.56 18.8(122728)	TGT C 0.63 8.1(52903)
TTC F 0.41 18.4(120510)	TCC S 0.16 14.2(92923)	TAC Y 0.44 14.8(96596)	TGC C 0.37 4.8(31095)
TTA L 0.28 26.2(170884)	TCA S 0.21 18.7(122028)	TAA * 0.48 1.1(6913)	TGA * 0.30 0.7(4447)
TTG L 0.29 27.2(177573)	TCG S 0.10 8.6(55951)	TAG * 0.22 0.5(3312)	TGG W 1.00 10.4(67789)
CTT L 0.13 12.3(80076)	CCT P 0.31 13.5(88263)	CAT H 0.64 13.6(89007)	CGT R 0.14 6.4(41791)
CTC L 0.06 5.4(35545)	CCC P 0.15 6.8(44309)	CAC H 0.36 7.8(50785)	CGC R 0.06 2.6(16993)
CTA L 0.14 13.4(87619)	CCA P 0.42 18.3(119641)	CAA Q 0.69 27.3(178251)	CGA R 0.07 3.0(19562)
CTG L 0.11 10.5(68494)	CCG P 0.12 5.3(34597)	CAG Q 0.31 12.1(79121)	CGG R 0.04 1.7(11351)
ATT I 0.46 30.1(196893)	ACT T 0.35 20.3(132522)	AAT N 0.59 35.7(233124)	AGT S 0.16 14.2(92466)
ATC I 0.26 17.2(112176)	ACC T 0.22 12.7(83207)	AAC N 0.41 24.8(162199)	AGC S 0.11 9.8(63726)
ATA I 0.27 17.8(116254)	ACA T 0.30 17.8(116084)	AAA K 0.58 41.9(273618)	AGA R 0.48 21.3(139081)
ATG M 1.00 20.9(136805)	ACG T 0.14 8.0(52045)	AAG K 0.42 30.8(201361)	AGG R 0.21 9.2(60289)
GTT V 0.39 22.1(144243)	GCT A 0.38 21.2(138358)	GAT D 0.65 37.6(245641)	GGT G 0.47 23.9(156109)
GTC V 0.21 11.8(76947)	GCC A 0.22 12.6(82357)	GAC D 0.35 20.2(132048)	GGC G 0.19 9.8(63903)
GTA V 0.21 11.8(76927)	GCA A 0.29 16.2(105910)	GAA E 0.70 45.6(297944)	GGA G 0.22 10.9(71216)
GTG V 0.19 10.8(70337)	GCG A 0.11 6.2(40358)	GAG E 0.30 19.2(125717)	GGG G 0.12 6.0(39359)

```

atg gtg agc aag ggc gag gag gat aac atg gcc atc atc aag gag ttc atg cgc ttc aag gtg cac atg gag ggc tcc gtg aac ggc cac
M V S K G E E D N M A I I K E F M R F K V H M E G S V N G H

gag ttc gag atc gag ggc gag ggc gag ggc cgc ccc tac gag ggc acc cag acc gcc aag ctg aag gtg acc aag ggt ggc ccc ctg ccc
E F E I E G E G E G R P Y E G T Q T A K L K V T K G G P L P

ttc gcc tgg gac atc ctg tcc oct cag ttc atg tac ggc tcc aag gcc tac gtg aag cac ccc gcc gac atc ccc gac tac ttg aag ctg
F A W D I L S P Q F M Y G S K A Y V K H P A D I P D Y L K L

tcc ttc ccc gag ggc ttc aag tgg gag cgc gtg atg aac ttc gag gac ggc ggc gtg gtg acc gtg acc cag gac tcc tcc ctg cag gac
S F P E G F K W E R V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D

ggc gag ttc atc tac aag gtg aag ctg cgc ggc acc aac ttc ccc tcc gac ggc ccc gta atg cag aag aag acc atg ggc tgg gag gcc
G E F I Y K V K L R G T N F P S D G P V M Q K K T M G W E A

tcc tcc gag egg atg tac ccc gag gac ggc gcc ctg aag ggc gag atc aag cag agg ctg aag ctg aag gac ggc ggc cac tac gac gct
S S E R M Y P E D G A L K G E I K Q R L K L K D G G H Y D A

gag gtc aag acc acc tac aag gcc aag aag ccc gtg cag ctg ccc ggc gcc tac aac gtc aac atc aag ttg gac atc acc tcc cac aac
E V K T T Y K A K K P V Q L P G A Y N V N I K L D I T S H N

gag gac tac acc atc gtg gaa cag tac gaa cgc gcc gag ggc cgc cac tcc acc ggc ggc atg gac gag ctg tac aag tag
E D Y T I V E Q Y E R A E G R H S T G G M D E L Y K *

```

Figura 7.2 Análisis de uso preferencial de codones para la proteína fluorescente mCherry.

8. CONCLUSIONES

- Se generó una nueva colección de plásmidos que contienen una proteína fluorescente, y un marcador de selección para levadura y son funcionales como vectores de fusión transcripcional.
- La fusión de las proteínas fluorescentes en conjunto con un marcador de selección contenidos en un plásmido, al marco de lectura abierto de genes que codifican para proteínas específicas de estructuras subcelulares se logró mediante PCR.
- Fue posible la fusión transcripcional de proteínas fluorescentes en el extremo carboxilo de distintas proteínas específicas de estructuras subcelulares con la formación autocatalítica del fluoróforo.
- Este trabajo ofrece una metodología que consiste en el libre marcaje de múltiples estructuras subcelulares mediante su fusión con proteínas fluorescentes.
- Las cepas elaboradas en este trabajo, son una herramienta complementaria de la colección de proteínas marcadas con la proteína verde fluorescente, permitiendo la co-localización de distintas proteínas mediante apareamiento.
- La determinación de la localización de distintas proteínas específicas para estructuras subcelulares específicas fue posible gracias a que no presentan cambios en su localización a diferentes etapas de crecimiento.
- Pdr5p es un transportador encontrado en la membrana plasmática durante la fase exponencial de crecimiento, sin embargo, en fase estacionaria se le observó en vesículas y en algunos casos en vacuola.
- La observación de las estructuras subcelulares marcadas es posible para células *in vivo* mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.
- Ensayos de cinética de crecimiento, mostraron que las proteínas fluorescentes yECFP y mCherry disminuyen la velocidad de crecimiento de algunas cepas. Mientras que yEYFP es una proteína estable que no afecta el crecimiento de las cepas que la contienen.
- La eficiencia de crecimiento utilizando mCherry es baja, debido a que no es una proteína fluorescente estandarizada para su uso en levaduras.

- Se determinó que la proteína cian fluorescente (yECFP) no es la óptima para análisis *in vivo*. Es útil para el estudio de la localización de proteínas de interés, sin embargo afecta el crecimiento de algunas cepas.
- Este nuevo ensayo sirve de herramienta para la co-localización *in vivo* de proteínas mediante el marcaje de distintas estructuras subcelulares con proteínas fluorescentes.

9. PERSPECTIVAS

Aún falta estandarizar la fusión de las distintas proteínas fluorescentes con distintos marcos de lectura abierta, a modo de contar con parámetros estandarizados de acuerdo a cada ORF y proteína fluorescente, esto con la finalidad de poder lograr así el etiquetado de todas las proteínas subcelulares con todas las proteínas fluorescentes utilizadas en este trabajo. Así mismo, sería interesante cambiar el uso de codones del gen que codifica para la proteína mCherry para su uso en levadura, generando una secuencia que contenga sólo codones de alta frecuencia en levadura. De esta forma se podría pensar en una mayor eficiencia en la expresión de fusiones que contengan esta proteína.

La caracterización de yECFP, podría darnos datos útiles para el entendimiento de la disminución en la velocidad de crecimiento de una cepa que contiene genes fusionados a esta proteína fluorescente. Además, la consideración del uso de una nueva proteína fluorescente cyan que además de proporcionar buen brillo y fotoestabilidad, no cause daños en el crecimiento, podría ser útil para la generación de nuevos plásmidos y así la co-localización de proteínas de interés.

10. REFERENCIAS

1. Pawson T., Nash P. 2003. "Assembly of Cell Regulatory systems Through Protein Interaction Domains". *Science*: 445-452
2. Pawson T., Nash P. 2000. "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction". *Genes & Development*: 1027-1047
3. Shen H. et al. 2014. "Research Communication Structural Insights into RNA Recognition Properties of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*", *IUBMB Life*: 631-638
4. Tsang C. K. et al. 2014. "Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance". *Nature Communications*: 1-11
5. Griffioen G. et al. 2001. "Nucleocytoplasmic Distribution of Budding Yeast Protein Kinase A Regulatory Subunit Bcy1 Requires Zds1 and Is Regulated by Yak1-Dependent Phosphorylation of Its Targeting Domain". *Molecular And Cellular Biology*: 511-523
6. Mazumder A. et al. 2013. "Genome - wide single-cell-level screen for protein abundance and localization changes in response to DNA damage in *S. cerevisiae*". *Nucleic Acids Research*: 9310-9324
7. Tate J. J. et al. 2015. "Nitrogen Starvation and TorC1 inhibition Differentially Affect Nuclear Localization of the Gln3 and Gat1 Transcription Factors Through the Rare Glutamine tRNA_{CUG} in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*: , 455-474
8. Jeffery Constance J. 2014. "An introduction to protein moonlighting", *Biochemical Society Transactions*: 1679-1683
9. Jeffery Constance J. 2009. "Moonlighting Proteins - an update". *Molecular BioSystems*: 345-350
10. Jayadeva P., Oh D. y Hopper J. E. 1990. "Analysis of the GAL3 signal traduction pathway activating GAL4 Protein - dependent Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics*: 281-291

- 11.** Platt A. y Recee R. J. 1998. "Yeast galactose genetic switch is mediated by formation of GAL4p – GAL80p – GAL3p complex", *EMBO Journal*: 4086-4091
- 12.** Gancedo C. y Flores C. L. 2008. "Moonlightings Proteins in Yeast", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 197-210
- 13.** Segunpta J. et al. 2004. "Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM", *Nature structure and Molecular Biology*: 957-962
- 14.** Schneider R. 2004. "Yeast Genetics", *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*: 43-48
- 15.** Sheff M. A. and Kurt S. T. 2004. "Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*: 661-670
- 16.** Chee M. K. and Haase S. B. 2012. "New and Redesigned pRS Plasmid Shuttle vectors for Genetic Manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*", *3G Genes Genomes Genetics*: 515-526
- 17.** Slubowski C. J. et al. 2015. "Plasmids for C-terminal tagging in *Saccharomyces cerevisiae* that contain improved GFP proteins, *Envy and Ivy*", *Yeast*.
- 18.** Wiedenmann J., Oswald F., Nienhaus G. U. 2009. "Fluorescent Proteins for Live Cell Imaging: Opportunities, Limitations, and Challenges", *IUBMB Life*: 1029–1042
- 19.** Huh W. et al. 2003. "Global analysis of protein localization in budding yeast", *Nature*: 686-691
- 20.** Koh J. L. Y. et al. 2015. "CYCLOPS: A Comprehensive database constructed from automated analysis of protein abundance and subcellular localization patterns in *Saccharomyces cerevisiae*", *3G Gen Genomes Genetics*: 1223-1232.

- 21.** Brachmann et al. 1998. "Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications", *Yeast*: 115–132
- 22.** Goldstein A. et al. 1999. "Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast Functional Analysis Reports*: 1541–1553.
- 23.** Güldener U. et al. 1996. "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast", *Nucleic Acids Research*: 2519–2524.
- 24.** Yeast Source Center, University Of Washington. *mCherry (hgh) Plasmid pBS35* [online]. Available on: <http://depts.washington.edu/yeastrc/pages/pBS35.html>
- 25.** Sambrook J. et al. 1989. "Molecular cloning", 2^a edición, tomo II: 1.82, 5.62, 6.9, 1.75.
- 26.** Lagendijk E. L. et al. 2010. "Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization *in vitro* and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies". *FEMS Microbiol*: 81–90.
- 27.** McDonald C. et al. 2015. "Puromycin and Methotrexate Resistance Cassettes and Optimized cre-recombinase Expression Plasmids for use in Yeast".
- 28.** Porrua Odil and Libri Domenico. 2015." Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 1-13.
- 29.** Teixeira Maria Teresa, Dujon Bernard and Fabre Emmanuelle. 2002. "Genome-wide Nuclear Morphology Screen Identifies Novel Genes Involved in Nuclear Architecture and Gene-silencing in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Molecular Biology* 321: 551–561
- 30.** Shcheprova Z. et al. 2008."Segregation of yeast nuclear pores". *Nature* 454: 728–734.
- 31.** Hirata Ryogo et al. 19090. "Molecular Structure of a Gene, VMA1, Encoding the Catalytic Subunit of H⁺-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*". *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 265, No. 12: 6726-6733.

- 32.** Saccharomyces Genome Database, Stanford University. *Saccharomyces Genome Database* [online]. Available on: <http://www.yeastgenome.org/>
- 33.** Johnson N. et al. 2013. "The Signal Sequence Influences Post-Translational ER Translocation at Distinct Stages". *Plos One* vol. 8.
- 34.** López G. et al. 2015. "Diversification of Paralogous α -Isopropylmalate 1 Synthases by Modulation of Feedback Control and Hetero-oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic Cell*
- 35.** Medrano Soto L. A., "Uso de Codones, Traducibilidad, Niveles de Expresión y Transferencia Horizontal: ¿Hemos Sobreinterpretado Nuestros Organismos Modelo?". Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, 2005.
- 36.** Codon Usage Database, European Bioinformatics Institute. *Saccharomyces cerevisiae Codon Usage Table* [online]. Available on: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4932>
- 37.** Shaner N. C. et al. 2004. "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein", *Nature Biotechnology*: 1567-1572
- 38.** Hackett Elizabeth A. et al. 2006. "A family of destabilized cyan fluorescent proteins as transcriptional reporters in *S. cerevisiae*". *Yeast*, 23: 333–349
- 39.** Nguyen, Ngoc-Tu, Shin, Hwayoon, Kim, Yang-Hoon, Min, Jiho. 2015. "Toxicity Detection Using Lysosomal Enzymes, Glycoamylase and Thioredoxin Fused with Fluorescent Protein in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Biotechnology*.
- 40.** Dye Billy T. et al. 2005. "Detecting Protein–Protein Interaction in Live Yeast by Flow Cytometry". *Wiley InterScience*: 63A:77– 86
- 41.** Raicu V. et al. 2005. "Protein interaction quantified in vivo by spectrally resolved fluorescence resonance energy transfer". *Biochemistry Journal* 385: 265–277
- 42.** Shaner N. C., Steinbach P. A. & Tsien R. Y. 2005. "A guide to choosing fluorescent proteins", *Nature methods*: 905-909
- 43.** Niels B. Jensen et al. 2014. "EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Yeast Res* 14: 238–248.