



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Departamento de Biología Molecular de Plantas

Participación de Erv14p en la detoxificación de cobre y la tolerancia a ácidos débiles en la levadura

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

P R E S E N T A:
Biol. Carolina Yáñez Domínguez

TUTOR
Dr. Omar Homero Pantoja Ayala
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos.

Junio, 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio del Dr. Omar H. Pantoja Ayala del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo de la beca CONACYT y al donativo CONACYT 220085. Al Programa de Apoyo para los Estudios del Posgrado (PAEP).

Quiero agradecer al Dr. Omar Pantoja por la asesoría, disponibilidad y ánimos que me proporcionó durante la realización de este proyecto; así como estar pendiente de mi desarrollo académico.

También al Dr. Paul Rosas-Santiago por haberme enseñado a trabajar con las levaduras, por su contribución en la elaboración de este proyecto y su apoyo experimental.

Agradezco a mis sinodales Dr. José Luis Reyes, Dr. Leonardo Peraza, Dra. Elizabeth Cordoba, Dr. Ignacio López y el Dr. Roberto Coria por sus valiosos comentarios y el tiempo que se tomaron para la revisión de este escrito.

A mi comité tutorial, en especial a la Dra. Claudia Martínez por sus comentarios y el seguimiento a este trabajo durante los periodos de evaluación de la Maestría.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Rosario Vera, Adriana, Delia, Fernanda, Jorge, Erik y Guadalupe Muñoz.

A mis amigos: Diana, Javier, Migue, Wilver, Kary y Sinead por todos los buenos momentos que hemos pasado, por su apoyo en general.

A Daniel Lagunas Gómez por su apoyo, ánimos y confianza tanto en el ámbito académico como en lo personal.

A mi familia: Roberto, Carolina, Elena y Edson “bb” por todo su cariño, esfuerzo y apoyo incondicional que me han dado siempre.

RESUMEN

El tráfico de proteínas en la célula eucariota está altamente regulado a través de los diferentes compartimentos que la componen. Las proteínas que son secretadas y las proteínas de la membrana plasmática pasan por la ruta secretoria; el polipéptido recién sintetizado es inicialmente translocado hacia el retículo endoplásmico y una vez procesado es exportado hacia el aparato de Golgi por un sistema secretor vesicular denominado COPII. Las vesículas COPII se forman a partir de la activación de una pequeña GTPasa Sar1p, a través del intercambiador de nucleótidos de guanina o GEF Sec12p, esta acción conlleva al reclutamiento de las proteínas Sec24p-Sec23p y Sec13p-Sec31p. Se conoce que Sec24p interacciona con algunas proteínas cargo, sin embargo, existen otras proteínas residentes del retículo endoplásmico que funcionan como receptores cargo. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado nueve receptores cargo, entre ellos se encuentra Erv14p, que pertenece a una familia de proteínas conservadas en los eucariontes denominada cornichon. En un estudio masivo se identificó que la mutante en *erv14* ocasionó que el 32% de las proteínas de membrana plasmática cambiaran su localización, entre ellas varios transportadores.

El objetivo de este trabajo fue analizar otras proteínas cargo que dependieran de Erv14p para su correcta localización y las repercusiones fisiológicas que ocasiona un defecto en el tráfico intracelular de estas proteínas cargo, usando como modelo a la levadura *S. cerevisiae*. Para esto, se escogieron dos transportadores pertenecientes a las dos grandes familias de transportadores: Pdr12p (ABC) Y Qdr2p (MFS). Pdr12p juega un papel importante ante un estrés de ácidos débiles de cadena corta (C2-C6), principalmente a los sorbatos y benzoatos. En este trabajo se determinó que la localización de este transportador en la membrana plasmática depende de la presencia de Erv14p y que esto es importante en la tolerancia de la levadura al ácido butírico. Por otro lado, Qdr2p se identificó como un antiportador droga/H⁺, pero también se ha propuesto que es un antiportador Cu²⁺/H⁺ el cual tendría una función en la detoxificación de cobre en la levadura, sin

embargo, los resultados subsecuentes mostraron que Qdr2p no participa en este proceso, por lo cual, el papel fisiológico de este transportador queda por aclararse. De acuerdo con nuestros resultados, inesperadamente, la ausencia de Erv14p generó una resistencia al cobre en las levaduras mientras que su presencia en las levaduras causó una sensibilidad a las altas concentraciones de cobre, por lo cual sugiere la existencia de otros transportadores dependientes de Erv14p que estén involucrados en la captación de cobre a altas concentraciones, como lo es Fet4p. Pese a esto, se demostró que el transportador Qdr2p interacciona directamente con Erv14p y que esta interacción es necesaria para que Qdr2p salga del retículo endoplásmico y llegue a la membrana plasmática.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Vías de tráfico celular en la levadura.

Figura 2. Modelos de las vesículas que participan en el tráfico intracelular.

Figura 3. Componentes que participan en la formación del complejo COPII.

Figura 4. Algunos de los receptores de proteínas cargo en la levadura *S. cerevisiae*.

Tabla 1. Especificidad de los Receptores de las proteínas cargo involucrados en el transporte entre el RE y el AG (evidencias experimentales).

Figura 5. Topología de Erv14p.

Figura 6. Participación de Pdr12p en la tolerancia a ácidos débiles en *S. cerevisiae*.

Figura 7. Posible participación de Qdr2p en la homeostasis del cobre en *S. cerevisiae*.

Figura 8. Estrategia de clonación del gen *PDR12* por recombinación *in vivo* de dos fragmentos.

Figura 9. Proceso de mutagénesis dirigida en la levadura.

Figura 10. Representación del sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS).

Figura 11. Amplificación de la región codificante de *QDR2* obtenida a partir del cDNA de la levadura *S. cerevisiae*

Figura 12. Análisis de restricción del vector pDONR221-*QDR2*.

Figura 13. Fragmentos 5' y 3' del gen *PDR12*.

Figura 14. La clona 1B mostró el patrón de restricción esperado que indica una clonación correcta del gen *PDR12* en el vector pGRU-GFP.

Figura 15. Análisis de restricción del vector pMetYC-*QDR2_GW*.

Figura 16. Análisis de restricción del vector pGRU-*QDR2-GFP*.

Figura 17. Generación de los casetes de disrupción UP-5'*QDR2-loxP-Kanr-loxP-QDR2-3'-DOWN* y UP-5'*PDR12-loxP-Kanr-loxP-PDR12-3'-DOWN*.

Figura 18. Esquema del análisis de las mutantes simples BY4741*qdr2Δ* y BY4741*pdr12Δ*.

Figura 19. Identificación de las clonas 1, 4 y 6 como mutantes *qdr2Δ*.

Figura 20. Identificación de las clonas 2, 5 y 7 como mutantes *pdr12Δ*.

Figura 21. Esquema del análisis de la eliminación del casete de KanMX en la mutante BY4741*erv14Δ*.

Figura 22. Las clonas T, U y V de la cepa BY4741*erv14Δ* perdieron el casete de KanMX al no crecer en YPD+G418 y también perdieron el plásmido pSH47 al no crecer en YNB+HML.

Figura 23. Verificación por PCR de las dobles mutantes BY4741*erv14Δqdr2Δ* y BY4741*erv14Δpdr12Δ*.

Figura 24. La ausencia de Qdr2p y no de Erv14p disminuye la tolerancia al CuSO₄ en *S. cerevisiae*.

Figura 25. La presencia de Erv14p disminuye la sensibilidad al CuSO₄.

Figura 26. La complementación de Qdr2p en la mutante BY4741*qdr2Δ* no rescata la tolerancia al CuSO₄ en las levaduras.

Figura 27. Localización subcelular del transportador Qdr2p en la levadura *S. cerevisiae* BY4741*qdr2Δ*.

Figura 28 Qdrp2 participa en la detoxificación de cobre al rescatar casi por completo el crecimiento de las levaduras al cobre, mientras que Erv14 no participa en la detoxificación del cobre en la levadura.

Figura 29. Localización subcelular del transportador Qdr2p en la levadura *S. cerevisiae*.

Figura 30. Interacción entre Erv14p y Qdr2p en la levadura.

Figura 31. La ausencia de Erv14p y Pdr12p disminuye la tolerancia al ácido butírico en las levaduras.

Figura 32. La complementación de Erv14p rescata la tolerancia al ácido butírico en la levadura.

Figura 33. La complementación con Pdr12p en la mutante BY4741*pdr12Δ* rescata la tolerancia al ácido butírico.

Figura 34. Localización subcelular del transportador ABC Pdr12p en la levadura *S. cerevisiae*.

Figura 35. La complementación de Erv14p y Pdr12p en la mutante BY4741*erv14Δpdr12Δ* rescata la tolerancia al ácido butírico en las células de levadura.

Figura 36. Localización subcelular del transportador Pdr12p en la levadura *S. cerevisiae*.

INDICE DEL APÉNDICE

Tabla 1. Oligonucleótidos para la clonación del gen *QDR2*

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la clonación y secuenciación del gen *PDR12*.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para la mutagénesis dirigida de los genes *QDR2* y *PDR12*.

Tabla 4. Componentes que se utilizaron para la mezcla de reacción de PCR.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	11
1.2 La vía secretoria temprana	12
1.3 Formación de las vesículas COPII y la selección del cargo	14
1.4 Papel de los receptores de cargo en el complejo COPII	16
1.5 La familia del cornichon: receptores cargo conservados	17
1.6 Asociación de Erv14p con los transportadores de membrana	19
1.7 El papel del transportador Pdr12p en la tolerancia a los ácidos débiles en la levadura	20
1.8 El papel del transportador Qdr2p en la homeostasis del cobre en la levadura.	21
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	26
5.1 Objetivos particulares	26
6. METODOLOGÍA	27
6.1 Clonación de los genes <i>QDR2</i> y <i>PDR12</i> a partir de cDNA	27
6.1.1 Clonación de <i>QDR2</i>	27
6.1.2 Clonación de <i>PDR12</i>	28
6.1.3 Fusiones traduccionales de <i>QDR2</i> a la proteína verde fluorescente GFP	30
6.1.4 Extracción de RNA total por tiocianato de guanidina acida-fenol/ (Trizol [®])	31
6.1.5 Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5 α)	32
6.1.6 Transformación de células competentes por electroporación	33

6.1.7 Extracción de plásmido por lisis alcalina (miniprep)	34
6.1.8 Transformación de levadura por acetato de litio (AcLi)	35
6.1.9 Extracción de DNA plasmídico de levadura (Lazy Bones)	35
6.2 Generación de las mutantes <i>qdr2Δ</i> y <i>pdr12Δ</i> y de las dobles mutantes <i>qdr2Δerv14Δ</i> y <i>pdr12Δ-erv14Δ</i> de levadura	36
6.2.1 Cepas y medios	37
6.2.2 Generación de las mutantes simples <i>qdr2</i> y <i>pdr12</i> mediada por PCR del casete <i>loxP-Kan^r-loxP</i>	38
6.2.3 Detección y verificación de las mutantes simples y dobles por PCR	39
6.3 Ensayo de crecimiento de la levadura	40
6.4 Ensayo de complementación fenotípica en las mutantes sencillas y dobles de la levadura	41
6.5 Identificación de la interacción proteína-proteína Erv14p-Qdr2p mediante el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS)	42
6.5.1 Clonación del gen <i>QDR2</i> en vectores del sistema mbSUS compatibles con el sistema Gateway	43
6.5.2 Medios de crecimiento para levadura	44
6.5.3 Análisis de interacción	44
6.6 Localización de Qdr2p y Pdr12p en el fondo silvestre y en la mutante <i>erv14</i>	45
7. RESULTADOS	46
7.1 Clonación de los genes <i>QDR2</i> y <i>PDR12</i>	46
7.2 Clonación del gen <i>QDR2</i> en vectores del sistema mbSUS compatibles con el sistema Gateway	49
7.3 Fusiones traduccionales de <i>QDR2</i> a la GFP	50
7.4 Generación de las mutantes simples y dobles	51
7.5 Participación de Erv14p en la detoxificación del cobre	59
7.6 Participación de Erv14p en la tolerancia al ácido butírico	64

8. DISCUSIÓN	69
8.1 Erv14p y la homeostasis del cobre en la levadura	70
8.2 Erv14p participa en la tolerancia al ácido butírico controlando el tráfico del transportador Pdr12p	71
9. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	73
10. APÉNDICE	74
11. BIBLIOGRAFÍA	77

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio

La levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae*, es uno de los organismos eucariontes modelo mejor estudiado debido a varias ventajas, entre éstas, el compartir una organización intracelular compleja como otros eucariontes, y su estudio ha contribuido a entender procesos celulares como la señalización, el ciclo celular, el tráfico celular y el metabolismo de lípidos, entre otros¹. Otra ventaja de trabajar con levaduras es su fácil manipulación, ya que su tiempo de duplicación es de aproximadamente 1.5 h en medio rico, en comparación con otros organismos como los animales y las plantas. Sin duda, una de las grandes ventajas de la levadura es que se pueden cultivar y mantener tanto en su forma haploide como diploide. Esto ha servido para desarrollar técnicas de genética clásica basadas en el apareamiento de células haploides con genotipos opuestos (*MAT a* y *a*) que una vez diploides, tras efectuar meiosis, se pueden disectar para obtener nuevas cepas de la progenie (haploides) con rasgos genéticos de las cepas parentales². Con el auge de la biología molecular y tras la secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae*, se pueden introducir modificaciones genéticas por recombinación homóloga de fragmentos de DNA exógeno al genoma de la levadura, produciendo mutantes o fusionando genes para producir proteínas de interés con alguna etiqueta. Por último, la información genética también puede ser introducida en plásmidos. Estos últimos se definen por su origen de replicación, el origen de replicación episomal 2μ que resulta en un alto número de copias (aprox. 200 copias/célula), o pueden contener una secuencia centromérica de replicación autónoma o CEN/ARS que resulta en un bajo número de copias (1-3 copias/célula). Estos plásmidos también poseen promotores constitutivos o inducibles/reprimibles que ayudan a modificar la expresión génica; además se componen de marcadores de selección que complementan las auxotroffias celulares (mutaciones en genes que codifican para la síntesis de aminoácidos o enzimas metabólicas como *LEU2*, *HIS3*, *TRP1*, *LYS2*, *URA3* o *ADE2*)³. Todas

estas ventajas hacen posible que la levadura sea un atractivo sistema modelo para estudiar procesos biológicos conservados en las células eucariontes.

1.2 La vía secretoria temprana

En los organismos eucariontes existen varias rutas de tráfico vesicular por las que viajan las proteínas hasta llegar a su compartimento destino para llevar a cabo su función en la célula. En la levadura se han caracterizado diferentes vías de tráfico vesicular entre los organelos, como se muestra en la figura 1.

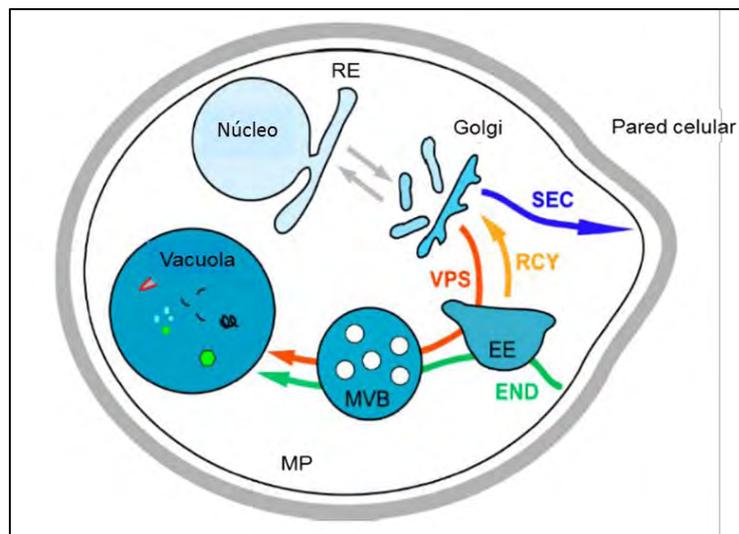


Figura 1. Vías de tráfico celular en la levadura. Las proteínas solubles o de membrana recién sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE), son transportadas hacia el Golgi. Estas proteínas pueden ser secretadas o pasar hacia la membrana plasmática (MP), a través de la vía secretoria (SEC), o pueden dirigirse hacia la vacuola a través de la vía VPS (“Vacuolar Protein Sorting”), que involucra la formación de endosomas (EE) y cuerpos multivesiculares (MVB)¹.

Las proteínas que son secretadas o que residen en alguna membrana, pasan por una vía denominada secretoria (SEC); esta ruta está conformada por un sistema de organelos que actúan en conjunto para asegurar el destino correcto de las proteínas. En las levaduras, aproximadamente un tercio de las proteínas pasa por esta ruta^{4,5}. La vía secretoria temprana fue identificada claramente gracias al trabajo de George Palade quien mostró un indicio sobre el transporte vesicular del retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi (AG) y la brotación vesicular del

AG al medio extracelular en células pancreáticas exocrinas del cuyo (*Cavia porcellus*)⁶. Posteriormente, en la década de los años 80's, en el laboratorio de Randy Sheckman, y empleando a la levadura, se identificaron los mecanismos moleculares por los cuales se produce este transporte. Este grupo aisló mutantes *sec* de levadura, incapaces de secretar la enzima invertasa al medio extracelular; muchos de estos genes *SEC* codifican para efectores de la maquinaria de la ruta secretoria. Randy Sheckman y James Rothman obtuvieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina este último realizó ensayos *in vitro* libres de células, recapitulando en mamíferos el transporte entre RE y AG. Thomas Südhof también obtuvo el premio noble con Sheckman y Rothman por el descubrimiento de la maquinaria molecular que regula la liberación de vesículas durante la sinapsis^{7,8}. Estos trabajos sentaron las bases sobre la existencia del tráfico celular de las proteínas a través de complejos vesiculares.

El inicio de la síntesis de las proteínas que pasan a través de esta ruta está acoplado a su translocación al RE. Durante la síntesis de la cadena polipeptídica en los ribosomas, la existencia de un segmento hidrofóbico o péptido señal en el extremo N-terminal, de estas proteínas las dirige hacia el RE, donde son transportadas por una serie de proteínas de manera co-traducciona l o post-traducciona l⁴. En el mecanismo co-traducciona l, la partícula de reconocimiento de la señal o SRP ("Signal Recognition Particle"), reconoce la señal durante la traducción del polipéptido seguido de un direccionamiento del complejo ribosoma-cadena peptídica-SRP hacia el receptor (SRPR, "Signal Recognition Particle Receptor"), para su inserción y translocación en la membrana del RE⁴. Muchas de las proteínas de membrana, incluidos los transportadores en la levadura, no poseen un péptido señal sino una secuencia hidrofóbica y se ha propuesto que son translocados de manera co-traducciona l⁹. En comparación, en el mecanismo post-traducciona l, el polipéptido recién sintetizado es dirigido directamente hacia el complejo Sec61p con la ayuda de chaperonas. Este complejo está conformado por las proteínas Sec62p/Sec63p/Sec71p/Sec72p y Sec61p como componente central del complejo, que estructuran un canal (denominado Translocón), por el cual el polipéptido es translocado⁴. Las proteínas que han sido procesadas correctamente

son exportadas hacia el AG, y desde este organelo pueden ser dirigidas hacia distintos destinos, a través de un sistema vesicular secretor. El paso de estas proteínas entre diferentes compartimentos membranales está mediado principalmente por complejos de proteínas que recubren las vesículas. Los más estudiados son, el complejo de clatrina y los complejos COPI y COPII. El complejo de clatrina media el tráfico del AG a la membrana plasmática y participa en la endocitosis; el complejo COPI media el tráfico retrógrado del AG al RE, mientras que el complejo COPII media el tráfico anterógrado del RE al AG¹⁰ (Fig. 2).

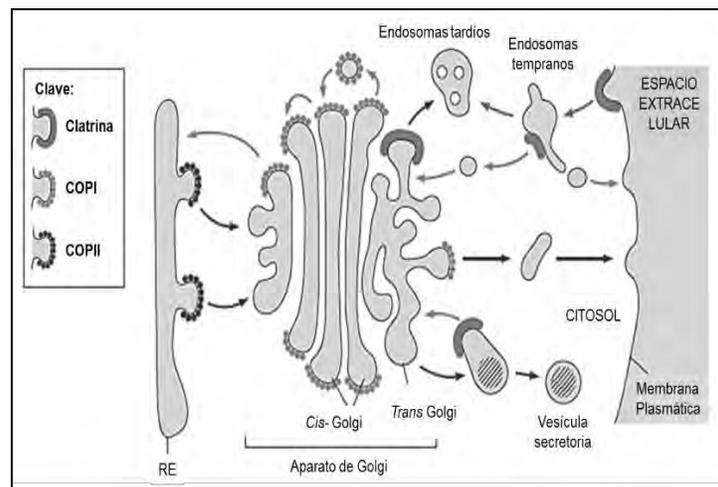


Figura 2. Modelo de las vesículas que participan en el tráfico celular. Localización espacial de los tres principales complejos que recubren a las vesículas involucradas en el tráfico celular. El complejo COPII media el tránsito de proteínas entre el RE y el AG, mientras que el complejo COPI interviene en el tráfico de proteínas del AG al RE. El complejo de clatrina está involucrado en la formación de vesículas que van desde el AG a la membrana plasmática y viceversa (procesos de exo- y endocitosis, respectivamente)¹⁰.

1.3 Formación de las vesículas COPII y la selección del cargo

La mayoría de las proteínas (carga) son transportadas inicialmente por el sistema secretor COPII, desde el RE hacia el AG, por medio de los sitios de salida del RE llamados ERES (“Endoplasmic Reticulum Exit Sites”), donde las proteínas son concentradas antes de su salida al AG por la actividad del sistema COPII. En algunos casos, este sistema requiere del reclutamiento de varios componentes que intervienen en el transporte del cargo. Para que se lleve a cabo la formación de la vesícula, primero es necesario deformar la membrana del RE, evento que

realiza la GTPasa Sar1p; sin embargo, este mecanismo requiere de otros elementos como el factor de intercambiador de nucleótidos Sec12p (GEF, “Guanine nucleotide Exchange Factor”), el cual estimula el intercambio del GDP a GTP en la GTPasa Sar1p y se recluta el complejo heterodimérico Sec23p-Sec24p, el cual puede reconocer o unir algunas proteínas cargo. Finalmente, el complejo Sec13p-Sec31p permite la separación definitiva de la vesícula del RE^{8,11,12}. En la figura 3 se muestra un esquema de la formación de las vesículas COPII.

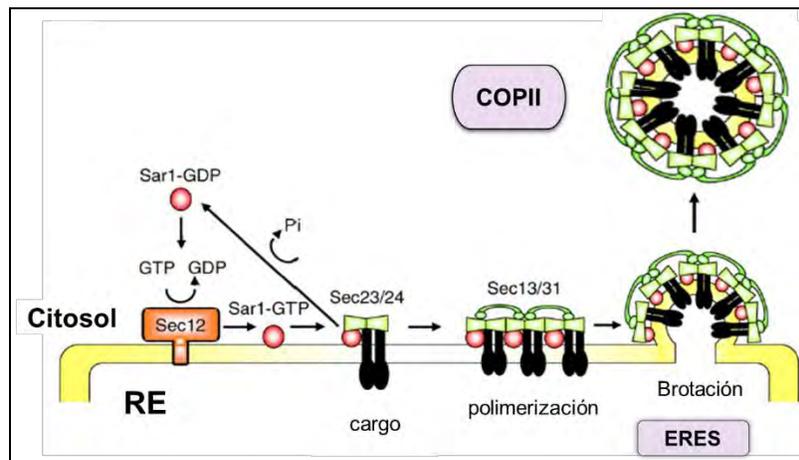


Figura 3. Componentes que participan en la formación del complejo COPII. Algunas o Las proteínas importantes en la formación del sistema COPII son el intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), Sec12p y la proteína citosólica inactiva Sar1-GDP, que es activada por Sec12p mediante el intercambio GDP-GTP, lo que ocasiona el anclaje de Sar1p a la membrana del RE. Este efecto dominó ocasiona el reclutamiento de los heterodímeros Sec23/24 y Sec13/31, así como del cargo, acumulándose en regiones específicas del RE denominadas ERES, donde eventualmente brota la vesícula COPII¹².

Algunos de los componentes del sistema COPII interactúan directamente con las proteínas cargo por medio de motivos particulares como los motivos diacídicos D/E-X-E¹³, di-hidrofóbicos I-L-X_X¹⁴, o aquellos caracterizados por la presencia de tirosinas Y-Y/X-X¹⁵. De manera general, Sec24p interacciona con muchos sitios de reconocimiento del cargo de manera independiente¹⁶. Tal es el caso del transportador Gap1p, en el cual Sec24p reconoce un motivo di-acídico en el C-terminal del transportador, lo que ocasiona que sea reclutado dentro del complejo COPII¹⁷.

1.4 Papel de los receptores de proteínas cargo en el complejo COPII

Aunado a la participación del complejo COPII, se han identificado proteínas residentes del RE, denominadas Receptores de Proteínas Cargo (RC), que se postula juegan un papel más específico en el reclutamiento de ciertas proteínas cargo que van a ser empaquetadas en las vesículas COPII (ver figura 4).

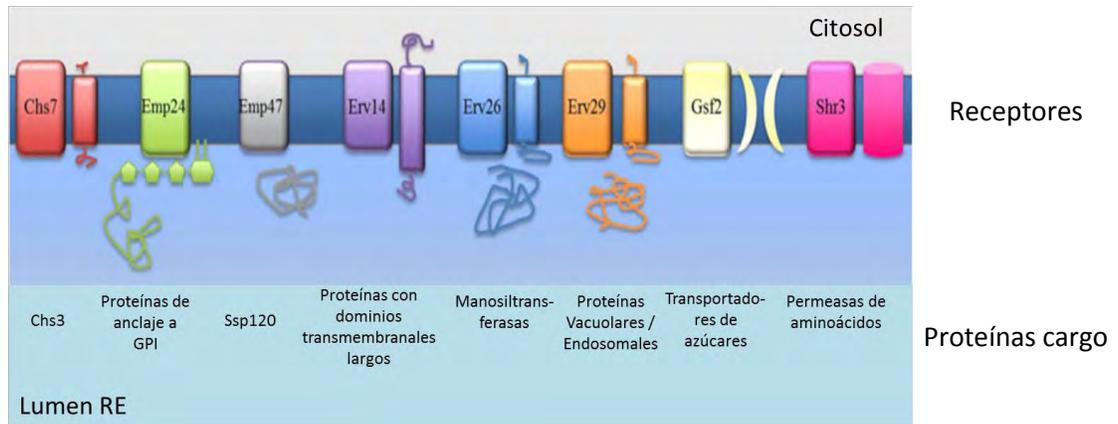


Figura 4. Algunos de los receptores de proteínas cargo en la levadura *S. cerevisiae*. Se muestra la selección y/o afinidad de algunos RC por proteínas cargo en el RE. Ej. El RC Erv26p recluta específicamente a las manosiltransferasas.

Algunos de los RC se han estudiado ampliamente, como las proteínas de la familia p24 y ERGIC-53. Emp24p es un miembro de la familia p24, que es necesario para el transporte de la proteína Gas1p desde el RE hacia el AG, la cual es una proteína que requiere de una modificación post-traducciona mediante su unión o anclaje al glicosilfosfatidilinositol (GPI). De manera interesante, el tráfico del factor glicosilado pro- α (gpaf), una proteína que no se une a GPI y que está presente en el sistema COPII, no se altera por la mutación de Emp24^{11,18,19}. Este hecho marca la existencia de diferentes señales o maquinarias de selección que usan el mismo sistema secretor. ERGIC-53p es necesario para el tráfico de la glicoproteína catepsina-Z entre el RE y el complejo de interacción del RE (ERGIC) hacia el AG. Además de estos dos ejemplos, se han encontrado otros RC que se muestran en la Tabla 1.

Sin embargo, se conoce poco de otros RC, como es el caso de Erv14p en levaduras o Cornichon en plantas y vertebrados, que aparentemente participan principalmente en el transporte de proteínas de membrana^{20,21}.

Tabla 1. Especificidad de los Receptores de Cargo involucrados en el tráfico vesicular entre el RE y el AG (evidencias experimentales).

Receptor Cargo	Proteína Cargo	Referencias
Erv14p	Ax12p, Sma2p TGF α (<i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>) Receptores AMPA (<i>H. sapiens</i>), Nha1p	(Powers and Barlowe 1998, 2002), (Nakanishi et al., 2007), (Boekel et al., 2006), (Perez Castro et al., 2007), (Schwenk et al., 2009), (Herzig et al., 2012), (Pagant et al., 2015), (Rosas-Santiago et al., 2015)
Erv15p	No hay cargos específicos	
Erv26/Svp26	Fosfatasa Alcalina Pro (Pho8p) Guanosina difosfatasa (Gda1p) Manosiltransferasas del AG (Kre3p, Mnn5p, Mnn2p, Kre2p y Krt1p)	(Bue et al., 2006), (Inadome, 2005), (Anand et al., 2009), (Noda y Yoda, 2010), (Noda et al., 2014)
Erv29p	CPY, Proteinasa A y gpaf	(Belden y Barlowe 2001); (Caldwell et al., 2001)
Erv41p-Erv46p	No hay cargos específicos	(Otte et al., 2001)
p24 (Emp24, Erv25p, Erp1p, Erp2p)	Proteínas de unión a GPI	(Schimmoller et al., 1995) (Muniz et al., 2000); (Castillon et al., 2009)
Emp46p	Glicoproteínas	(Sato y Nakano, 2002)
Emp47p	Glicoproteínas	(Sato y Nakano, 2002)
Shr3p	Permeasas de aminoácidos	(Kota et al., 2007), (Ljungdahl et al., 1992), (Kuehn et al., 1996)
Chs7p	Chs3p	(Trilla et al., 1999)
Gsf2p	Algunas permeasas (Gal2p, Hxt1p)	(Sherwood y Carlson, 1999)
Pho86p	Pho84p	(Lau et al., 2000)

1.5 La familia del cornichon: receptores cargo conservados en las células eucariontes

La familia del Cornichon está integrada por proteínas conservadas en los organismos eucariontes, ya que muestran una topología similar de proteínas transmembranales con su extremo N-terminal del lado citoplásmico y tres dominios transmembranales (Fig. 5)²². Hasta la fecha, se han identificado dos proteínas homólogas en *Drosophila melanogaster* denominadas Cni y Cnir; una en *Saccharomyces cerevisiae* llamada Erv14p y su parólogo Erv15p, sin embargo, la eliminación de Erv15 no causa algún fenotipo. También existen cuatro proteínas Cornichon en humanos (CNIH, CNIH2, CNIH3 y CNIH4). En plantas se ha identificado a OsCNIH1 del arroz, el cual es necesario para que un transportador selectivo a sodio llegue correctamente a su membrana de residencia²¹. Cni, Erv14p, OsCNIH1 y CNIH se han localizado en el RE, lo que se sugiere que juegan una función equivalente en estos organismos como el reclutamiento de proteínas cargo y su posterior transporte a través de la ruta secretoria.

.El cornichon fue inicialmente identificado en *D. melanogaster*; durante la ovogénesis, el Cni es requerido para el transporte del factor de crecimiento α (TGF) Gurken (Grk) hacia la membrana del ovocito. Se ha identificado que el Cni se une a un dominio extracelular del Grk por lo que se ha propuesto que el cornichon actúa como un receptor de cargo reclutando a Grk dentro de las vesículas COPII²³. Por otro lado, la pérdida de Erv14p, homólogo del cornichon en levadura, ocasiona la formación de un sitio defectuoso de gemación debido al transporte ineficiente de la proteína Ax12p, necesaria para este proceso²⁴. Se ha encontrado que el CNIH de humanos rescata la función de gemación defectuosa en levaduras mutantes *erv14 Δ* , casi con la misma eficiencia que la proteína propia²⁰. En plantas, OsCNIH1 es necesario para que el transportador de Na⁺, OsHKT1;3, se localice correctamente en la membrana del AG²¹.

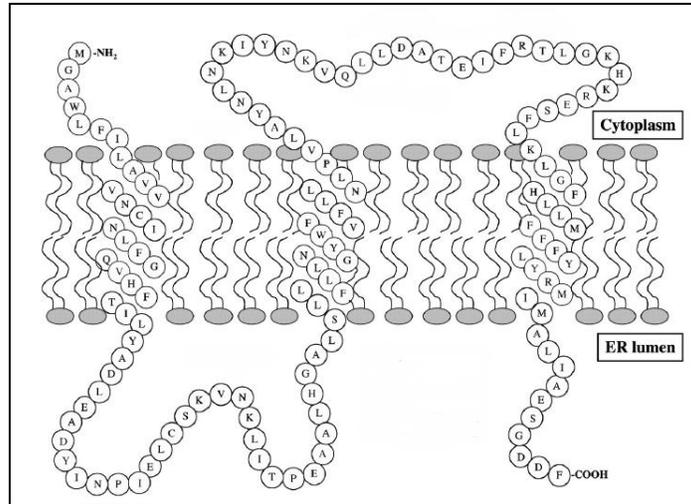


Figura 5. Topología de Erv14p. Estructura probable de la proteína Erv14p, en la cual su extremo N-terminal se encuentra del lado citoplásmico, posee tres dominios transmembranales y el extremo C-terminal se localiza en el lumen del RE²².

1.6 Asociación de Erv14 con los transportadores de membrana

Recientemente se ha descrito en la levadura que Erv14p participa en la localización de una variedad de proteínas transmembranales para llegar a diferentes membranas de la célula (AG, membrana plasmática y vacuola). Entre estas proteínas destacan: permeasas de amonio (Mep2), transportadores de azúcares (Hxtp), intercambiadores Na^+/H^+ (Nha1p), transportadores ABC (Pdr12p, Snq2p y Tpo4p), transportadores MFS (“Major Facilitator Superfamily”; Qdr2p), flipasas (Dnf1p, Cdc50p) y aquellas involucradas en el desarrollo de la levadura^{25,26}.

Entre las proteínas cargo dependientes de Erv14 existe una variedad de transportadores de la membrana plasmática que pertenecen a las dos grandes familias de transportadores: la superfamilia ABC (“ATP-binding cassette, por sus siglas en inglés”) y la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily, por sus siglas en inglés). Los transportadores ABC participan en el transporte de moléculas de diferentes tamaños, empleando la hidrólisis de ATP, mientras que los transportadores MFS sólo transportan moléculas o solutos pequeños en

respuesta a un gradiente quimiosmótico, funcionando como antiportadores, simportadores o uniportadores²⁷.

1.7 El papel del transportador Pdr12 en la tolerancia a los ácidos débiles en la levadura

El transportador Pdr12p pertenece a la subfamilia ABCG de los transportadores de multi-resistencia, contiene una estructura de un par de seis dominios transmembranales, es decir doce segmentos transmembranales, intercalados con dos dominios de unión a nucleótidos NBD (“Nucleotide Binding Domain”) y se localiza en la membrana plasmática²⁸. En la levadura, Pdr12p es requerido para la resistencia a ácidos débiles y para el bombeo de carboxilatos hacia el exterior de la célula, actividad que depende de ATP. Reportes previos han implicado a Pdr12p en la exportación de un amplio rango de compuestos de los que destacan los principales conservadores de los alimentos benzoato y sorbato, también los ácidos carboxílicos de cadena corta como ácido butírico y ácido fórmico, entre otros^{29–33}.

Los ácidos débiles como benzoatos, sorbatos y ácido butírico se han usado ampliamente como conservadores de alimentos para evitar el crecimiento de hongos y levaduras, como las de los géneros *Zygosaccharomyces* y *Saccharomyces*³⁴. Los ácidos débiles tienen la particularidad de que, al estar en un ambiente biológico de pH ácido, similar a su pK_a , se encuentran protonados y pueden difundir libremente a través de la membrana plasmática; una vez en el citosol pasan a su forma aniónica (desprotonación), debido al pH neutro de este compartimento, este fenómeno ocasiona que la ATPasa Pma1p bombee protones al exterior celular, manteniendo el pH y el potencial electroquímico de protones. Sin embargo, la actividad de Pma1p puede estar limitada y una forma de evitar este problema es mover a los ácidos débiles hacia el espacio extracelular. Pdr12p podría suplir esta función, evitando una acidificación del citosol que podría causar estrés en la levadura (Figura 6).

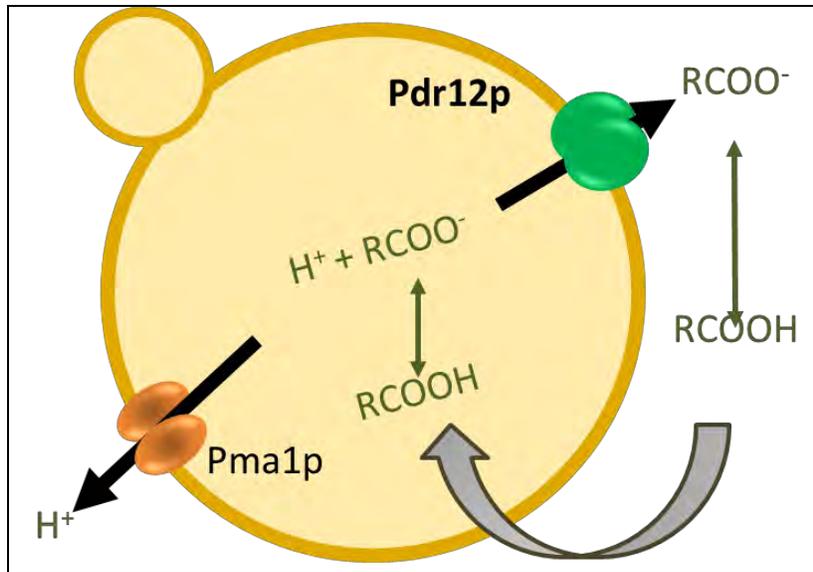


Figura 6. Participación de Pdr12 en la tolerancia a ácidos débiles en *S. cerevisiae*. Posible modelo de la función del transportador Pdr12p en la exportación de carboxilatos al exterior, ayudando a la ATPasa Pma1p a mantener el pH adecuado en el interior de la célula de la levadura. RCOOH (ácido débil sin disociar), RCOO⁻ (ácido débil disociado) y H⁺ (protón).

1.8 El papel del transportador Qdr2 en la homeostasis del cobre en la levadura

Otro de los transportadores que parece depender de su asociación con Erv14p para dirigirlo a la membrana plasmática, es el transportador MFS Qdr2p. Inicialmente se identificó que Qdr2p confería tolerancia a la quinidina, un fármaco anti-malárico, por lo cual se propuso ser un antiportador de droga/H⁺. También se ha reportado como un transportador de agentes anticancerígenos como el cisplatino y la bleomicina, y de barban (un herbicida)^{35,36}. Desde un punto de vista fisiológico, se ha propuesto que Qdr2p exporta cobre divalente del interior al exterior celular³⁷. El cobre es un micronutriente necesario para la levadura, es incorporado en el núcleo de enzimas antioxidantes como Sod1p y está presente en subunidades de la citocromo C oxidasa. También está involucrado en las reacciones redox de muchas reacciones biológicas, entre ellas la formación de radicales libres, por lo que la homeostasis del cobre debe ser altamente controlada ya que puede unirse al oxígeno, sulfuros y ligandos de imidazol, y desencadenar

reacciones no deseadas. Debido a esto, se sugiere que Qdr2p podría estar vinculada a la homeostasis del cobre divalente en la levadura³⁷.

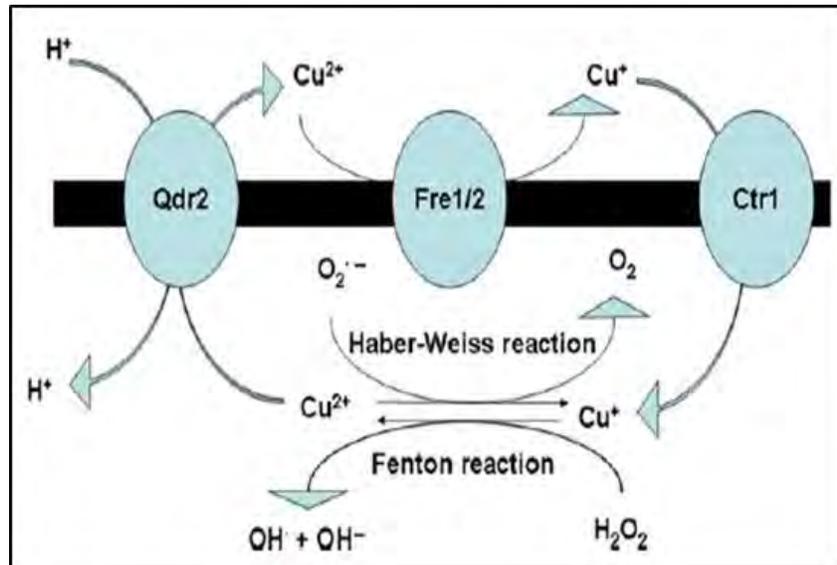


Figura 7. Posible participación de Qdr2p en la homeóstasis del cobre en *S. cerevisiae*. Modelo propuesto por Ríos et al. (2013), en el que el transportador Qdr2 exporta hacia el exterior de la levadura Cu^{2+} que se produce de la reacción de Fenton entre el Cu^+ y el H_2O_2 .

2. ANTECEDENTES

Con la finalidad de estudiar el papel que juegan los receptores cargo en la selección del cargo y en el tráfico intracelular, se han hecho varios trabajos. Uno de ellos es el de Herzig et al., 2012 en el cual se analizó la localización de una variedad de proteínas cargo en fondos mutantes de los nueve receptores cargo de la levadura, con el fin de identificar la selectividad que presenta cada uno de los receptores por el cargo²⁶. De acuerdo a la tecnología PAIRS (“Pairing Analysis of Cargo Receptors”), basada en la manipulación genética en la levadura y en la microscopía confocal automatizada, se identificó la localización de alrededor de 150 cargos en fondos mutantes de nueve receptores cargo (*erv14Δ*, *erv15Δ*, *erv26Δ*, *erv29Δ*, *emp24Δ*, *emp47Δ*, *gsf2Δ*, *chs7Δ*, y *Shr3-AmPΔ*). Un resultado interesante fue que la mutación de *ERV14* afectó la localización de muchos cargos, los cuales tienen la particularidad de poseer largos dominios transmembranales, sin embargo, el papel funcional de la interacción que pueda tener *Erv14* con este tipo de cargos (proteínas de membrana) no es muy claro y existen pocos ejemplos como los que se describen a continuación.

En las levaduras, la esporulación es un proceso del desarrollo en el que cuatro células haploides son envueltas por una doble membrana denominada pro-espora dentro de la célula madre; la formación de esta estructura requiere del transporte de las proteínas necesarias para llevar a cabo la maduración de la espora, con la participación activa de la ruta secretoria. En un estudio para detectar genes responsables de la formación de la pro-espora, Nakanishi et al., 2007 identificaron a *Erv14p* y *Sma2p*, ésta última es una proteína integral de membrana, localizada en la membrana de la pro-espora. La mutante *erv14Δ*, causó que *Sma2p* no llegara a la membrana de la pro-espora y que ésta y se retuviera en el RE, al no llegar *Sma2p* a su destino, la levadura mostró una deformación en la membrana de la pro-espora²⁵. Otro ejemplo es la correcta localización del antiportador Na^+/H^+ *Nha1p*, que depende de *Erv14p*, ya que al no estar presente este receptor de cargo, aquél (*Nha1p*), se retiene en el RE y las levaduras son sensibles al sodio.

Estos resultados se confirmaron al demostrar la interacción entre Erv14p y Nha1p³⁸.

Finalmente, se demostró que Erv14p se requiere para el tráfico correcto del transportador ABC Yor1p hacia la membrana plasmática³⁹. Anteriormente se había identificado un motivo di-acídico (DxD) en Yor1p como sitio de interacción con Sec24p, que propicia su reclutamiento en las vesículas COPII; también se identificó que existe un motivo IFRTL que se encuentra en el asa citosólica de Erv14p, el cual es indispensable en el reclutamiento de Yor1p al COPII y un motivo FLN en el segundo dominio transmembranal de unión con Yor1p y de otros cargos, incluyendo Qdr2p. Con base en esta información se ha propuesto que Erv14p y Yor1p interactúan a través del motivo FLN, y a la vez, Sec24p reconoce al motivo IFRTL de Erv14p para reclutar a Erv14p con su cargo dentro del complejo COPII⁴⁰.

El estudio detallado de otros posibles cargos de Erv14p, los cuales podrían ser principalmente transportadores localizados en la membrana plasmática, podría ayudar a entender de manera global el papel funcional de este receptor de cargo, no sólo en el tráfico celular sino en procesos fisiológicos de la levadura. De manera que al establecer la relación de Erv14p con sus cargos, se podría ahondar en el mecanismo de reclutamiento de los mismos a través del sistema COPII y/o de otras rutas independientes de COPII. Además se podría caracterizar la participación de otros componentes que en conjunto, sean responsables de la correcta localización de los transportadores Qdr2p y Pdr12p en la levadura.

3. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre los transportadores iónicos a nivel del tráfico celular^{9,41}. Básicamente, estos estudios se enfocan en tres vertientes: la primera es esclarecer el mecanismo de internalización de las proteínas, a través de la ruta de degradación endosoma/vacuola; la segunda es su almacenamiento y reciclamiento por diversas membranas intracelulares, en respuesta a señales específicas y por último; el estudio del movimiento de los transportadores a lo largo de la ruta secretoria, que

permiten su llegada a la membrana de residencia. Por otro lado, los transportadores de membrana son de vital importancia para la levadura y cualquier otro organismo ya que permiten el paso de iones o metabolitos necesarios para el organismo, así como el desecho de compuestos dañinos que comprometan su supervivencia y además, ayudan a mantener el potencial electroquímico en las membranas celulares para conservar la homeóstasis celular. Conocer la relación de Erv14p en asegurar la correcta localización de los transportadores Qdr2p y Pdr12p es necesario para identificar los mecanismos por los cuales los cargos son entregados a sus membranas de residencia.

4. HIPÓTESIS

La localización de Qdr2p y Pdr12p en la membrana plasmática depende de su interacción con el recetor cargo Erv14p, la correcta localización de estas proteínas es fundamental para poder llevar a cabo la detoxificación del cobre y del ácido butírico, respectivamente, en la levadura.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de Erv14p en la tolerancia a cobre y a ácidos débiles, a través de su interacción con los transportadores Qdr2p y Pdr12p, controlando la localización de éstos en la membrana plasmática.

5.1 Objetivos particulares:

- Clonar los genes *QDR2* y *PDR12* de *S. cerevisiae*.
- Generar las mutantes simples *qdr2Δ* y *pdr12Δ*, y las dobles mutantes *qdr2Δ/erv14Δ* y *pdr12Δ/erv14Δ* de *S. cerevisiae*.
- Determinar el posible fenotipo de sensibilidad a cobre o a ácidos débiles de la mutante *erv14Δ* y confirmar que las mutantes *qdr2Δ* y *pdr12Δ* son sensibles a los compuestos correspondientes.
- Demostrar que los fenotipos de tolerancia a cobre y a ácidos débiles depende tanto de la presencia de Qdr2p o Pdr12p como de Erv14p, complementando la función a las mutantes *qdr2Δ*, *pdr12Δ*, *erv14Δ*, y las dobles mutantes *qdr2Δ/erv14Δ* y *pdr12Δ/erv14Δ*.
- Determinar la localización de Qdr2p y de Pdr12p mediante fusiones traduccionales con la proteína verde fluorescente.
- Determinar si la localización de Qdr2p y Pdr12p cambia en ausencia de Erv14p.
- Demostrar que la localización subcelular de Qdr2p y Pdr12p en las dobles mutantes *qdr2pΔ-erv14pΔ* y *pdr12Δ-erv14Δ*, respectivamente, requiere la presencia de Erv14p.
- Caracterizar las interacciones Erv14p-Qdr2p y Erv14p-Pdr12p mediante el uso del sistema de la ubiquitina dividida en levaduras (mbSUS).

6. METODOLOGÍA

6.1 Clonación de *QDR2* y de *PDR12*

Con la finalidad de realizar las construcciones necesarias para este trabajo, se describen a continuación las técnicas que se emplearon, así como las estrategias que se usaron para la clonación de los genes *QDR2* y *PDR12* de la levadura *S. cerevisiae*.

6.1.1 Clonación de *QDR2*

Para la clonación de *QDR2* se empleó el sistema Gateway (Tecnología Gateway, Invitrogen, GE, Suiza), basado en el mecanismo de recombinación específica del fago lambda, que facilita su integración en el cromosoma de *E. coli* y el cambio entre el ciclo lítico y lisogénico. Una vez clonado el gen de interés en un vector de entrada, se tiene la facilidad de subclonarlo en múltiples vectores compatibles para realizar análisis funcionales o de expresión.

Para obtener el cDNA de *QDR2*, se realizó una reacción de PCR (por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction”), utilizando la Taq polimerasa de alta fidelidad PHusion (Invitrogen), utilizando los oligonucleótidos (incluidos en la Tabla 1 del apéndice), los componentes de reacción de PCR se especifican en el apéndice (Tabla 4). Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
2 x 35 ciclos	Inicial	98°C	30 s
	Desnaturalización	98°C	10 s
	Alineamiento	56°C	30 s
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	10 min
			4°C

El producto de PCR se clonó en el vector pDONR221 (Tecnología Gateway, Invitrogen, GE, Suiza) por medio de una reacción BP, por lo cual se incluyeron los sitios *attB1* y *attB2* en los extremos de los oligonucleótidos empleados para amplificar a *QDR2* (Tabla 1, en el apéndice). La reacción BP se incubó por 18 a 20

horas. Posteriormente se utilizó 1µl de la reacción BP para transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5α; una vez recuperadas las células se crecieron en medio LB sólido con Kanamicina (50µg/ml). Se picaron tres colonias y se extrajo el DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina. Se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción *PvuII* y *PstI* (Fermentas). Finalmente, los plásmidos se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos universales M13, para corroborar la clonación correcta del gen *QRD2*.

6.1.2 Clonación de *PDR12*

La clonación del gen *PDR12* se obtuvo mediante recombinación homóloga de dos fragmentos “*in vivo*”. El proceso de recombinación homóloga o generalizada, ocurre en todos los organismos y se basa en el reconocimiento entre pares de secuencias que presentan una homología suficientemente extensa (>90% por más de 100 pares de bases) y depende de un complejo enzimático característico, en el cual la proteína RecA (o su equivalente), es central para que ocurra este proceso. Desde el descubrimiento de que las levaduras pueden recombinar fragmentos lineales de DNA, se han desarrollado varios métodos para su manipulación, una de éstas corresponde a la clonación de genes. Hacia los extremos 5' y 3' del fragmento de PCR a clonar se agregan secuencias homólogas al vector de clonación o expresión. El vector se digiere con un enzima de restricción específica para linearizarlo y se co-transforma con el producto de PCR (gen de interés) en la levadura, llevando a cabo el proceso de recombinación (Fig. 8).

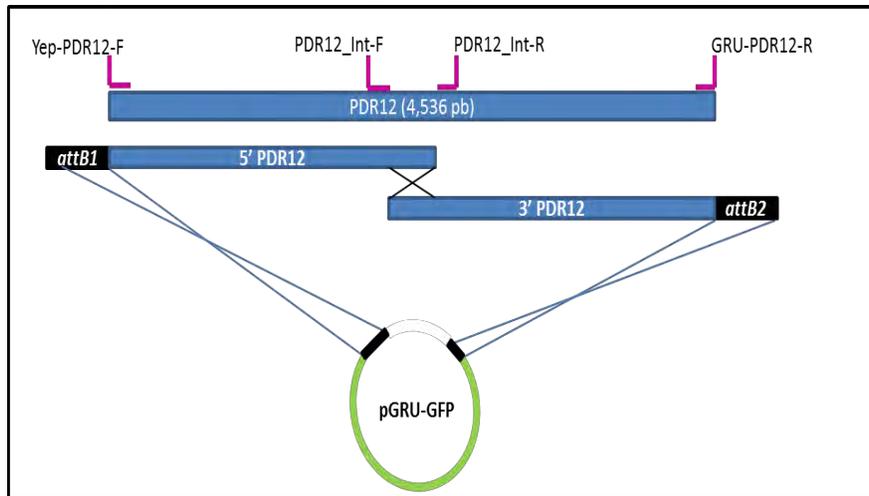


Figura 8. Estrategia de clonación del gen *PDR12* por recombinación *in vivo* de dos fragmentos. En la parte superior se muestra un esquema del gen *PDR12* (4536 pb), el posicionamiento de los oligonucleótidos se muestra en lila, en negro se muestran en los extremos 5' y 3' de los fragmentos del gen, las secuencias de homología con el vector pGRU-GFP. Así mismo, la sobreposición de la región terminal (3' o 5') de los fragmentos 5' y 3' del gen *PDR12*, genera otro sitio de homología entre sí que la levadura reconoce y lleva a cabo la recombinación *in vivo*. Los fragmentos de PCR y el vector linealizado se transforman al mismo tiempo.

A partir de cDNA de la cepa BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*), se amplificaron dos fragmentos de aprox. 2,500 pares de bases (pb), superpuestos parcialmente en la región central del gen *PDR12*, usando los oligonucleótidos YEP-Pdr12 Fw y Pdr12_Int F, para la parte 5' proximal del gen y los oligonucleótidos pGRU-Pdr12 Rv y Pdr12_Int R, para la parte 3' proximal del gen (Tabla 2 del apéndice). Los componentes de la reacción de PCR se muestran en la tabla 4 del apéndice, las condiciones de PCR fueron las siguientes:

	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
<i>2 x 35 ciclos</i>	Inicial	98°C	30 s
	Desnaturalización	98°C	10 s
	Alineamiento	57°C	30 s
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	10 min
		25°C	3 min
		4°C	Final

Los fragmentos se separaron en un gel al 1% de agarosa teñido con Bromuro de Etidio (EtBr), en Buffer TAE al 0.5%, durante 30 min a 100 V. Los fragmentos de PCR se purificaron con el paquete de purificación Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Se utilizó el plásmido pGRU-GFP para generar una fusión traduccional de *PDR12* con la GFP. El plásmido pGRU-GFP se digirió con la enzima de restricción *PvuII* (Fermentas) durante 2h a 37 °C. El plásmido digerido se purificó de la misma forma que los productos de PCR y se co-transformaron en la cepa de levadura BW31a (*leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal10 ena1-4::HIS3 nha1::LEU2*), mediante el método de transformación de acetato de Litio (AcLi). Las levaduras se crecieron en placa por 2 días y se escogieron de 10-15 colonias que se sembraron en cajas con medio YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco) con adenina (Ade), histidina (His), leucina (Leu) y triptófano (Trp). Para comprobar la correcta clonación de *PDR12* y a la vez la correcta fusión de la GFP a Pdr12 (pGRU-Pdr12-GFP) se seleccionaron ocho colonias y se incubaron durante 16 h en medio líquido YNB suplementado con Ade, His, Leu y Trp, a 30 °C en agitación. Posteriormente se colocaron 5 µl del cultivo en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio de epifluorescencia (Nikon). A las muestras que presentaron fluorescencia en la membrana plasmática se les realizó una extracción del plásmido para levadura ("Lazy bones"). Se utilizaron de 5 a 10 µl del plásmido para transformar células de *E. coli* DH5α electrocompetentes y se seleccionaron en medio LB con Ampicilina (100 µg/ml). Por último, se extrajo el plásmido por el método de lisis alcalina para realizar un análisis de restricción y se secuenció para corroborar la clonación correcta del gen *PDR12*. Una vez obtenida la construcción pGRU-*PDR12*-GFP, se realizaron los ensayos de complementación fenotípica y localización subcelular descritas más adelante.

6.1.3 Fusiones traduccionales de Qdr2 a la proteína verde fluorescente GFP

Para observar la localización subcelular de la proteína Qdr2, se generó una fusión traduccional en el extremo C-terminal de Qdr2 con la proteína verde fluorescente

(GFP), en el vector binario pGRU-GFP, usando la técnica de recombinación *in vivo* en la levadura. A partir del cDNA de la cepa BY4741, se amplificó el gen *QDR2* usando los oligonucleótidos YEP-Qdr2 Fw y pGRU-Qdr2 Rv de la tabla 1 (apéndice) los componentes de la reacción de PCR se especifican en la tabla 4 del apéndice. Las condiciones de PCR siguientes:

	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
<i>2 x 35 ciclos</i>	Inicial	98°C	30 s
	Desnaturalización	98°C	10 s
	Alineamiento	56°C	30 s
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	10 min
			4°C

Los fragmentos de DNA se separaron en un gel al 1% de agarosa teñido con EtBr (Buffer TAE 0.5%, 30 min, 100 V) y se purificaron con el kit de purificación Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Para la obtención de clona(s) positiva(s) que tuvieran la construcción pGRU-QDR2-GFP, se usó el mismo procedimiento que se encuentra en el apartado anterior. Para verificar la correcta sub-clonación del gen *QDR2* en el vector pGRU-GFP, se realizó un análisis de restricción con la enzima *Pst*I. Una vez que se confirmaron las clonas positivas, se transformaron en las cepas de levadura BY4741*qdr2Δ* y BY4741*erv14Δqdr2Δ* por el método de AcLi. En cuanto a *PDR12*, el plásmido donde se clonó permitió generar una fusión con la GFP, por lo tanto, el vector se empleó para transformar a las cepas de levadura BY4741*pdr12Δ* y BY4741*erv14Δpdr12Δ*. Estas transformantes se emplearon para el análisis de complementación funcional.

6.1.4 Extracción de RNA total por tiocianato de guanidina acido-fenol (Trizol[®])

Para extraer el RNA total de la levadura, se cultivó la cepa de *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) en 50 ml de medio YPD (Yeast Peptone Dextrose, Difco) y se incubó durante la noche a 30°C con agitación (250

r.p.m). Una vez crecido el cultivo, se centrifugó en un tubo cónico de 50 ml a 4,000 r.p.m por 6 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de agua ultrapura estéril, la cual se congeló con nitrógeno líquido dentro de un mortero y se trituró hasta obtener un polvo muy fino. Para la extracción del RNA se agregó Trizol (1 ml por cada 100 mg de muestra), fenol y una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), para remover proteínas. El RNA se precipitó con una mezcla de isopropanol/etanol al 70% (1:1 vol/vol). El RNA total se separó en un gel de agarosa al 1% (MOPS 1X, formaldehído) con buffer de MOPS 1X (MOPS 0.2 M (pH 7), acetato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM (pH 8)) a 100 V, durante 25 min, al final el gel de ARN se visualizó en un transiluminador para verificar la integridad del ARN extraído. Una vez obtenido el RNA total de la levadura, se realizó una reacción de RT-PCR para generar el cDNA total con la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoScientific), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El cDNA total se utilizó como templado para amplificar a *QDR2*, los componentes de la reacción fueron los mismos que se encuentran en la tabla 4 del apéndice. Las condiciones de PCR es incluyen a continuación:

	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
2 x 35 ciclos	Inicial	98°C	30 s
	Desnaturalización	98°C	10 s
	Alineamiento	56°C	30 s
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	10 min
			4°C

6.1.5 Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* (DH5α)

Para la preparación de células electrocompetentes, inicialmente se sembró un pre-inóculo a partir de una alícuota de células DH5α en un tubo cónico de 15 ml, en 5 ml de medio LB (triptona, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 10 g/l; pH ajustado a 7.0 con NaOH), y se incubó durante toda la noche a 37°C a 200 r.p.m. Al día siguiente, el pre-inóculo se vació en un matraz conteniendo 1 l de medio LB

bajo en sales (triptona, 10g/l; extracto de levadura, 5g/l; NaCl, 5g/l; pH 7.0 ajustado con NaOH), y se dejó crecer hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6 a 0.8. Una vez alcanzada la OD deseada, el cultivo se colocó en hielo y en un cuarto frío (4°C) por 30 min; a continuación, se centrifugó a 4,000 r.p.m a 4°C por 15 min (Rotor JA-10, Beckman Coulter). Se descartó el sobrenadante y se agregó ½ volumen del inicial de glicerol al 10% frío y estéril, resuspendiendo suavemente las células. Las células se volvieron a centrifugar a 4,000 r.p.m durante 15 min y se eliminó el sobrenadante para resuspender suavemente las células en ¼ de volumen inicial de glicerol al 10% frío y estéril. Posteriormente las células se volvieron a centrifugar a 4,000 r.p.m a 4°C, 15 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron de manera suave en 1/5 del volumen inicial de glicerol 10% frío y estéril, centrifugándose por última vez a 4,000 r.p.m, a 4°C, por 15 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10%, para hacer alícuotas de 50 µl en microtubos estériles de 1.5 ml previamente enfriados. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

6.1.6 Transformación de células competentes por electroporación

Para realizar la transformación por electroporación las células competentes, almacenadas a -80°C, se descongelaron en hielo y se agregó 1 µl de DNA plasmídico (150-800 ng) y se mezcló suavemente sin pipetear. A continuación, la mezcla se transfirió a una celda de electroporación previamente enfriada, de 0.1 cm (BioRad), y se aplicó un pulso eléctrico con un voltaje de 1.8 kV, con un electroporador (Gene Pulser Xcell, BioRad), por 4.5 ms. En seguida, las células se resuspendieron en 400 µl de medio LB líquido y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación a 250 r.p.m. Finalmente se sembraron 100 µl del cultivo transformado en cajas Petri con medio LB sólido, con los antibióticos requeridos de acuerdo al vector empleado, y se incubaron a 37°C por 12 h. Las células se emplearon para extraer el DNA plasmídico.

6.1.7 Extracción de plásmido por lisis alcalina (miniprep)

Para la extracción del DNA plasmídico, se seleccionaron algunas colonias de células transformadas y se inocularon en un tubo cónico de 15 ml, en 5 ml de medio LB líquido y se incubaron a 37°C por 18h, a 250 r.p.m. Se colocaron 1.5 ml de los cultivos crecidos en microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 r.p.m, a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante; con una pipeta se removió el resto del mismo, de manera que la pastilla de bacterias quedara lo más seca posible. A continuación, la pastilla de células se resuspendió en 200 µl de la Solución I esterilizada (Tris-HCl, 25mM, pH 8.0; EDTA, 50 mM; estéril), para agregar posteriormente 200 µl de la Solución II recién preparada (NaOH, 0.2 M; SDS, 1%) y se mezclaron de 5 a 6 veces suavemente por inversión. En seguida se agregaron 200 µl de la Solución III fría (acetato de potasio, 5M, pH 4.8; ácido acético, 11.5% v/v), y se incubó en hielo por 5 min, para después centrifugar a 4°C, 10 min a 13,000 r.p.m. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml nuevo y se agregaron 2.0 µl de RNAsa (20 mg/ml). Los tubos se incubaron a 37°C de 15-20 min. Después se agregaron 400 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y la solución se mezcló con ayuda de un vórtex y se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a 13,000 r.p.m. Con ayuda de una pipeta se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo y se agregaron 400 µl de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló con un vórtex, para posteriormente centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 5 min a 13,000 r.p.m. Se tomó la fase superior y se transfirió a un microtubo nuevo de 1.5 ml, se añadieron 900 µl de etanol absoluto frío y se mezcló con un vórtex; inmediatamente después, los tubos se colocaron en hielo y se incubaron por 10 min. Los tubos se centrifugaron a 4°C durante 15 min a 13,000 r.p.m. Una vez centrifugados, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Por último, los tubos se centrifugaron brevemente y el sobrenadante se removió con una pipeta. Una vez seca, la pastilla de DNA plasmídico se resuspendió en 20 µl de agua ultrapura estéril.

6.1.8 Transformación de levadura por Acetato de Litio (AcLi-TE)

Para realizar la recombinación *in vivo* y obtener las construcciones pGRU-PDR12-GFP y pGRU-QDR2-GFP se usó La cepa de levadura BW31a. Se puso un inoculo inicial en 5 ml de medio YPD-adenina (Yeast Peptone Dextrose, Difco), se incubó a 30°C y al día siguiente, se diluyó en un volumen final de 50 ml hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.1. Posteriormente, el cultivo se incubó a 30°C hasta obtener una OD₆₀₀ 0.5-0.6. Las células se separaron del medio por centrifugación; dos veces a temperatura ambiente a 3,600 r.p.m, durante 6 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en un volumen de 1.8 ml de AcLi-TE (AcLi, 100 mM Tris, 10 mM; EDTA, 1 mM, pH 7.5). Este volumen de LiAc-TE se mezcló con 0.7 ml de Polietilenglicol 4000 (PEG 4000) al 50% p/v, 80 µl de 1M AcLi-TE y 0.3 ml de ssDNA (single strand DNA) recién desnaturalizado (8-10 mg/ml). De esta mezcla se tomaron 99 µl y se le agregó 1.0 µl del DNA plasmídico (50-200 ng/µl). A continuación, las células se incubaron por 30 min a 28°C, seguido de un choque térmico a 42°C por 13 min; las células se lavaron con agua ultrapura estéril y se resuspendieron en 100 µl de agua ultrapura estéril. Se tomaron 30 µl de células y se plaquearon en medio sólido YNB +Ade +His +Leu +Trp, incubándolas por 2 d. Finalmente, se eligieron de 10 a 15 colonias y se sembraron en medio YNB +Ade +His +Leu +Trp por 1 d para extraer DNA plasmídico por el método descrito a continuación.

6.1.9 Extracción de DNA plasmídico de levadura (Lazy Bones)

De manera general, para la extracción del DNA plasmídico de células de la levadura, se crecieron algunas colonias en 3 ml de medio YNB líquido suplementado con Ade, His, Leu y Trp, a 30°C y en agitación a 200 r.p.m, durante 16 h. Se tomaron 1.5 ml del cultivo en microtubos y se centrifugaron en microtubos nuevos a máxima velocidad, por 5 min. Una vez descartado el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en una solución de liberación de plásmido (Triton X-100, 0.5 %; Na-EDTA, 1 mM; SDS, 1%; NaCl, 100 mM; Tris HCl, 10 mM, pH 8.0). En seguida, se agregó un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 0.3 ml de perlas de vidrio (250 µm diámetro), y se mezcló con ayuda de

un vórtex durante 7 min. A continuación, se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min y se transfirieron 120 µl de la fase superior a un nuevo tubo. Se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló con un vórtex y se colocó en hielo por 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 4°C durante 15 min, a 13,000 r.p.m. Finalmente, se removió el sobrenadante cuidadosamente y se lavó la pastilla en un volumen de etanol al 70%. Una vez seca la pastilla, el DNA plasmídico se resuspendió en 20 µl de agua ultrapura estéril y se almacenó hasta su posterior uso.

6.2 Generación de las mutantes *qdr2Δ* y *pdr12Δ* y de las dobles mutantes *qdr2Δ-erv14Δ* y *pdr12Δ-erv14Δ* en la levadura

La generación de las mutantes de levadura se obtuvo mediante recombinación homóloga, usando el casete de resistencia KanMX y el sistema Cre-*loxP* del bacteriófago P1, dando como resultado un casete de interrupción *loxP*-KanMX-*loxP* al cual se agregaron regiones flanqueantes del gen de interés en los extremos del casete, generando una región de homología que, una vez introducido en la levadura permite la recombinación y el gen de interés es reemplazado por el casete de KanMX. Cuando el gen Kan^r del Tn903 de *E. coli* se expresa en levaduras confiere una resistencia al antibiótico aminoglucósido G-418 o Geneticina, de manera que es posible seleccionar y detectar las levaduras que han perdido el gen de interés. Este sistema se puede utilizar también para reemplazar más de un gen, con la ayuda de un vector que posee el gen de la recombinasa Cre. La recombinasa reconoce los sitios *loxP* y escinde el casete *loxP*-Kan^r-*loxP* para que la levadura pierda la resistencia a G-418 y se pueda reemplazar por otro gen de interés⁴² (Fig. 9).

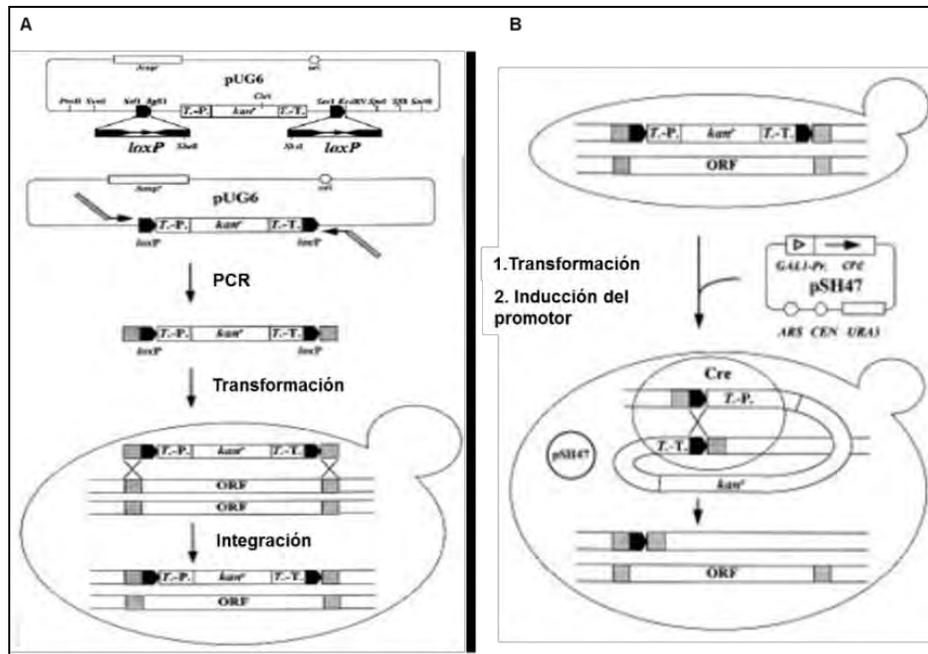


Figura 9. Proceso de mutagénesis dirigida en la levadura. A. En la parte superior se muestra el mapa del vector pUG6 donde el casete de Kan^r está bajo el control del promotor TEF2 (T.-P.), con su respectivo terminador TEF2 (T.-T.), y flanqueados están los sitios *loxP*. Para la interrupción de genes se usa un par de oligonucleótidos que contienen en su región 3' (flechas), secuencias homólogas flanqueantes a los extremos del casete de interrupción *loxP*-Kan^r-*loxP* y en su extremo 5' contienen una secuencias homólogas al ORF a interrumpir (rectángulos sombreados). El plásmido pUG6 se utiliza como templado para generar un producto de PCR que contenga el casete KanMX y las regiones de homología 5' y 3' para la interrupción del gen, durante el proceso de integración. **B.** La cepa diploide de levadura ORF/ORF::*loxP*-Kan^r-*loxP* se transforma con el vector pSH47 que contiene la Cre-recombinasa bajo el promotor inducible por galactosa. La Cre-recombinasa remueve el marcador de resistencia entre los sitios *loxP*, generando un genotipo ORF/ORF::*loxP*.⁴²

6.2.1 Cepas y medios de cultivo

La cepa BY4741 se utilizó para generar las mutantes simples de *QDR2* y *PDR12*, mientras que la cepa BY4741*erv14Δ* (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erv14Δ::KanMx*), se utilizó para generar las dobles mutantes. También se utilizó la cepa de *E.coli* DH5α para la transformación del vector pUG6. Para la selección de resistencia a G-418 después de la transformación de la levadura, se añadieron 900 μg/ml de G-148 a las placas de YPD. La selección de colonias transformantes

de *E. Coli*, resistentes a Kanamicina (Kan^r), se realizó en placas de YT (“Yeast Triptone”), suplementadas con 50 mg/L de Kan.

6.2.2 Generación de las mutantes simples *qdr2Δ* y *pdr12Δ* mediada por PCR del casete *loxP-Kan^r-loxP*

Para las respectivas mutantes de *QDR2* y *PDR12* se emplearon los oligonucleótidos de la tabla 3 (oligonucleótidos de interrupción de genes), usando como templado el vector pUG6 para obtener el casete de disrupción UP5’*QDR2-loxP-Kan^r-loxP-QDR2* 3’DOWN y el casete de disrupción UP5’*PDR12-loxP-Kan^r-loxP-PDR12* 3’DOWN. Las condiciones de PCR fueron:

	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
<i>2 x 30 ciclos</i>	Inicial	94°C	2 min
	Desnaturalización	94°C	1 min
	Alineamiento	55°C	1 min
	Extensión	72°C	2:30 min
	Extensión final	72°C	10 min
			4°C

Los productos de PCR se transformaron de manera independiente en la cepa BY4741 mediante el protocolo de transformación de AcLi, descrito con anterioridad. Después del choque osmótico, las células se dejaron en 1 ml de YPD durante 2-3 h a 30°C, se centrifugaron y luego se mezclaron suavemente en 200 µl de YPD y se sembraron en cajas de YPD suplementadas con 900 µg/ml de G-418. Las cajas se incubaron a 30°C hasta obtener un crecimiento visible de colonias. Posterior a esto, se seleccionaron algunas colonias y se re-sembraron en medio YPD sólido con 900 µg/ml de Geneticina para futuros análisis.

Para generar las dobles mutantes se utilizó la cepa BY4741*erv14Δ* (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erv14Δ::KanMX*). Esta cepa contiene el gen de KanMx en lugar del gen *ERV14*, por lo que primero se removió el casete de KanMx para poder utilizar los casetes de disrupción de *QDR2* y *PDR12* que contienen el gen de KanMx. Inicialmente, la cepa diploide de levadura ORF/ORF::*loxP-KanMX-loxP* se transformó con el vector pSH47 que contiene la Cre-recombinasa y confiere

auxotrofia a uracilo. Las clonas donde se insertó el vector se crecieron en medio con glucosa y luego en medio con galactosa (Gal) para inducir la expresión de la recombinasa. La Cre-recombinasa remueve de entre los sitios loxP al marcador de resistencia, dejando un genotipo ORF/ORF::loxP. Posteriormente, para corroborar que las clonas hubiesen perdido la resistencia a G418 se hicieron ensayos de sensibilidad a G418.

Por último, se eliminó el plásmido pSH47 de las levaduras mediante el crecimiento de algunas clonas en medios YPD por periodos de dos días de 3 a 5 veces. Las levaduras al no estar sometidas a un medio de selección son susceptibles de perder los plásmidos, en este caso el pSH47. De igual forma se corroboró que estas clonas ya no fueran capaces de crecer en medio sin uracilo. Posteriormente se procedió a mutar los genes *QDR2* y *PDR12* en *BY4741erv14Δ* para obtener las dobles mutantes.

6.2.3 Detección y verificación de las mutantes simples y dobles por PCR

A partir del análisis de DNA genómico proveniente de colonias re-sembradas en medio YPD con G-418, se seleccionaron las clonas de las mutantes simples de *qdr2* y *pdr12*, y de las mutantes dobles *qdr2-erv14* y *pdr12-erv14* de, a las colonias re-sembradas que crecieron en medio YPD (Yeast Peptone Dextrose) sólido con el antibiótico G-418 se les extrajo el ADN genómico.

La extracción de DNA genómico consistió en cultivar las levaduras en 10 ml de medio YPD a 30°C en agitación constante. Luego se centrifugó el cultivo a 3,000 r.p.m por 5 min, la pastilla de células se resuspendió en 0.5 ml de agua estéril y se centrifugó a 3,00 r.p.m por 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 0.2 ml de la solución TSN (2% Tritón X-100, 2%; SDS, 1%; NaCl, 100 mM; Tris, 10 mM, pH 8.0; EDTA, 1 mM), después se añadieron 0.2 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 0.3 ml de perlas de vidrio tratadas con ácido clorhídrico. Esta suspensión se mezcló en un vórtex por 30 s ocho veces (4 min en total). Se añadieron 0.2 ml de solución TE (Tris-EDTA, falta concentración pH 8.0), y se centrifugó a 4°C, a 12,500 r.p.m, durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo de 1.5 ml y se añadió 1 ml de

etanol al 100%, frío. Se centrifugó a 4°C, a 14,000 r.p.m, por 15min. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 0.4 ml de la solución TE con RNAsa (75 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 5 min. Para precipitar el DNA genómico se añadieron 10 µl de acetato de amonio, 4M y 1 ml de etanol frío al 100%, y se incubó por 5 min a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 4°C, por 15 min a 14,000 r.p.m. Finalmente, se realizó un lavado con etanol al 80% y el DNA genómico se resuspendió en 50 µl de agua ultrapura estéril.

Para mutar a los genes de interés, se diseñaron oligonucleótidos localizados ~200 pb antes del codón de inicio (ATG) y otros oligonucleótidos localizados ~200 pb después del codón de paro. Para verificar la integración del casete y la interrupción de QDR2, se utilizaron oligonucleótidos localizados en las regiones 5' y 3' del gen Kan^r. También se diseñaron oligonucleótidos internos localizados aproximadamente a la mitad de cada gen (Tabla suplementaria 3), estos fueron verificados con los oligonucleótidos U-QDR2 y Kan Fw, y D-QDR2 y Kan Rv, así como con los oligonucleótidos U-QDR2 y QDR2 Fw, y D-QDR2 y QDR2 Rv. Los oligonucleótidos U-PDR12 y Kan Fw, y D-PDR12 y Kan Rv, así como con los oligonucleótidos Pdr12_Int R, y D-PDR12 y Pdr12_Int F, se emplearon para verificar las mutantes en *PDR12*. Las condiciones de PCR fueron:

	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
<i>2 x 30 ciclos</i>	Inicial	94°C	2 min
	Desnaturalización	94°C	1 min
	Alineamiento	55°C	2:30 min
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	10 min
		4°C	Final

6.3 Ensayo de crecimiento de la levadura

Para determinar el fenotipo de sensibilidad a sulfato de cobre (CuSO₄) o a ácido butírico, las cepas BY4741 y BY4741*erv14Δ* fueron empleadas para realizar los ensayos de gota. Las cepas fueron estriadas en medio YNB sólido, suplementado con los aminoácidos necesarios y se incubaron a 30°C, durante 2 d. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales 1:10 a partir de una

concentración de células con una $OD_{600} = 3$. Por último, se realizó el ensayo de gota en medio mínimo YNB sólido sin y con diferentes concentraciones de $CuSO_4$ (0.5 a 1.5 mM), o con diferentes concentraciones de ácido butírico (8.5 a 10 mM). Las placas se incubaron durante 3-5 días, a 30°C. El crecimiento celular se registró mediante la adquisición de imágenes (Molecular Imager Gel, Doc XR, BioRad).

También se realizaron ensayos de gota de las cepas BY4741*qdr2* Δ (*MATa his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *qdr2::KanMX*), BY4741 Δ *erv14* Δ *qdr2* (*MATa his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *erv14* $\Delta::loxP$ *qdr2::KanMX*), BY4741 Δ *pdr12* (*MATa his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *pdr12::KanMX*), y BY4741 Δ *erv14* Δ *pdr12* (*MATa his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *erv14* $\Delta::loxP$ *pdr12::KanMX*) a diferentes concentraciones de dichos compuestos.

6.4 Ensayo de complementación fenotípica en las mutantes sencillas y dobles

Con la premisa de que *Erv14* pudiera estar involucrado en la sensibilidad a cobre y ácido butírico, se realizó un ensayo de complementación con la mutante *erv14* Δ transformada con el vector de expresión pDRF1-*ERV14*. La transformación se realizó por el método de AcLi-TE, para posteriormente realizar los ensayos de gota siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado.

También se realizó un ensayo de complementación con la mutante sencilla BY4741*pdr12* Δ , transformada con el vector de expresión pGRU-*PDR12* y la mutante sencilla BY4741*qdr2* Δ , con el vector de expresión pGRU-*QDR2*, con diferentes concentraciones de ácido butírico y $CuSO_4$, respectivamente.

Las dobles mutantes se co-transformaron con *ERV14* y *QDR2* o *PDR12*. Los plásmidos pDR-*ERV14* y pGRU-*PDR12* o pGRU-*QDR2*, se transformaron en la levadura por el método de AcLi-TE. Todas las transformantes se sembraron en medio de selección YNB sólido durante dos días. Finalmente se hicieron diluciones seriadas en medio YNB suplementado con metionina e histidina,

llevando a cabo los ensayos de gota a diferentes concentraciones de CuSO₄ o ácido butírico.

6.5 Identificación de la interacción proteína-proteína Erv14p-Qdr2p mediante el sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS)

Para determinar si Erv14 interactúa con el transportador de cobre Qdr2, se empleó el sistema de la ubiquitina dividida, mbSUS⁴³. Este sistema, similar al sistema de dos híbridos, permite conocer la interacción entre dos proteínas de membrana o una proteína citosólica y una de membrana. Se basa en el secuestro de un factor de transcripción en la membrana y su liberación por la acción de una proteasa, resultado de la reconstitución de las dos mitades de la ubiquitina. Cuando el dominio N-terminal de la ubiquitina (Nub) se co-expresa con su parte C-terminal (Cub) se reconstituye la funcionalidad de la ubiquitina. Otro componente importante es el factor de transcripción PLV (Protease A-LexA-VP16) que está fusionado al C-terminal del Cub. Cuando dos proteínas interactúan, las mitades Nub y Cub reconstituyen a la ubiquitina y entonces, una proteasa endógena específica libera al factor transcripcional el cual difunde del citosol al núcleo y activa la transcripción de los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*. En este sistema puede haber falsos negativos y falsos positivos, Cuando las fusiones al Cub se expresan adecuadamente se induce la actividad de los genes reporteros co-expresándolo con el NubWT que posee una fuerte afinidad por el Cub, es decir, siempre habrá una interacción; cuando las fusiones al Cub no se expresan adecuadamente se da un caso de no interacción entre nuestras proteínas de interés, por lo tanto las fusiones al Cub se co-expresan con el NubWT como control para detectar falsos negativos. Por otro lado, existe la mutante NubG (posee la mutación Ile13Gly) que tiene baja o nula afinidad hacia el Cub, evitando la reconstitución de la ubiquitina (excepto si las proteínas fusionadas al NubG y Cub están muy cercanas). Cuando las fusiones al Cub se co-expresan con el NubG no debería haber activación de los genes reporteros, sin embargo, si llegan a activarlos sería resultado de una interacción no verdadera o falso positivo.

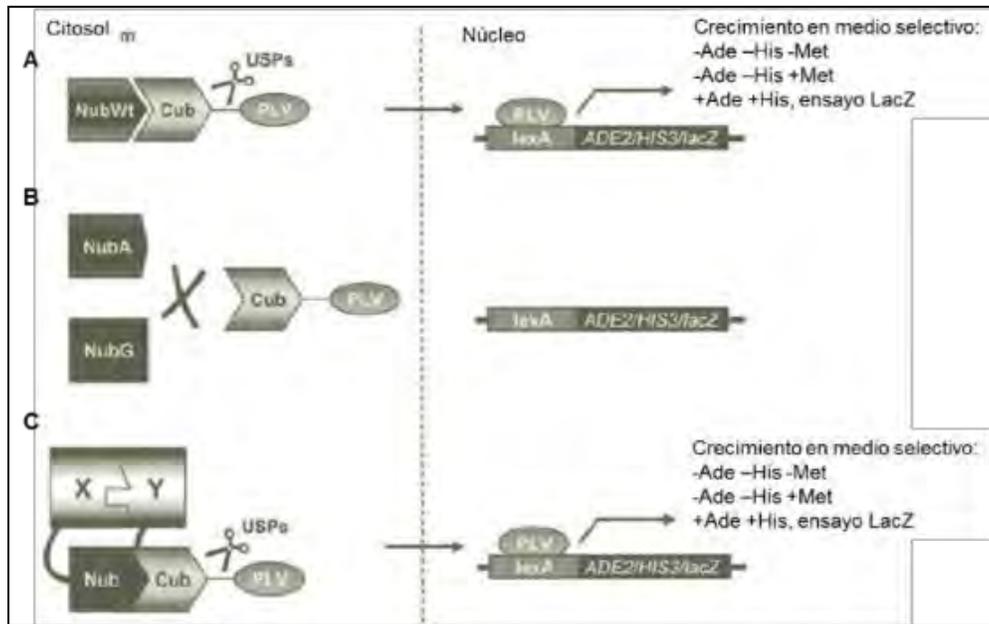


Figura 10. Representación del sistema de la ubiquitina dividida (mbSUS). **A**, el extremo mitad N-terminal de la ubiquitina interacciona con la mitad del C-terminal de ésta, ocasionando que una proteasa específica de ubiquitina escinda el factor de transcripción PLV (ProteinA-LexA-VP16), y éste se dirija hacia el núcleo para activar los genes reporteros *ADE2*, *HIS3* y *lacZ*. Las levaduras se cultivan en medios de selección para el análisis de interacción proteína-proteína. **B**, NubA o NubG son mitades del extremo N-terminal de la ubiquitina que poseen una mutación, que provoca que tenga muy baja afinidad por el Cub, lo que evita que la proteasa libere al PLV, y por lo tanto, no hay transcripción de los genes reporteros. **C**, Si dos proteínas (X y Y) fusionadas al Nub y Cub respectivamente, interactúan, ocurre la reconstitución de la ubiquitina y por lo tanto, el factor PLV es escindido, dirigiéndose hacia el núcleo para activar los genes reporteros (imagen modificada de Grefen et al., 2009).

6.5.1 Clonación del gen *QDR2* en vectores del sistema mbSUS compatibles con el sistema Gateway

Para clonar el gen *QDR2* en vectores del sistema mbSUS compatibles con el sistema Gateway, se transfirió *QDR2* al plásmido pMETYC-GW mediante una reacción LR; una vez obtenida la construcción, se emplearon 200 ng de DNA para transformar a la cepa de levadura THY-AP4 (*MATa ura3, leu2, lexA::lacZ::trp1, lexA::HIS3, lexA::ADE2*) por el método de AcLi-TE. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico de algunas colonias de levaduras que crecieron, el cual se empleó para transformar células de *E. coli* DH5 α por electroporación. De las

colonias que crecieron en el medio de selección con kanamicina (50µg/ml) se extrajo el DNA para realizar un análisis de restricción con la enzima *PvuII* (Fermentas). Los plásmidos que mostraron el patrón de restricción esperado se guardaron a -30°C, así como las clonas se almacenaron a -80°C.

El vector pGRU-GFP en el que fue clonado *PDR12* no cuenta con tecnología Gateway por lo tanto no fue posible utilizar el sistema mbSUS para comprobar la interacción proteína-proteína.

6.5.2 Medios de crecimiento de la levadura

Las células transformadas THY-AP4 (*MATa ura3, leu2, lexA::lacZ::trp1, lexA::HIS3, lexA::ADE2*) con el plásmido pMETYC-GW se crecieron en medio SC suplementadas con Trp (20 mg/l), His (20 mg/l), Ade (20 mg/l) y Ura (20 mg/l) para el medio Cub. Las células THY-AP5 (*MATα URA3, leu2, trp1, his3 loxP::ade2*) transformadas con el plásmido pXN-32GW, se crecieron en medios suplementadas con Leu (240mg/l), His (20 mg/l) y Ade (20 mg/l) (medio Nub). Las cepas Cub y Nub transformadas se crecieron en sus respectivos medios por 3 días a 30°C. Posteriormente ambas cepas se aparearon en medio YPD por 24h a 30°C y después las células diploides se plaquearon por replicado en medio DS. Las células diploides se crecieron en medio SC suplementado con Ade e His (medio DS).

6.5.3 Análisis de interacción proteína/proteína

Para la identificación de las interacciones proteína/proteína, así como de las falsas positivas y falsas negativas, se realizó el ensayo de interacción en medio IS-0 (en ausencia de aminoácidos) e IS-500 (suplementado con 0.5 mM de Met). Los vectores pMETYC-GW que corresponden a las fusiones al Cub, están bajo el control del promotor MET25 que es reprimible por Met, así, un incremento en la concentración de Met en los medios de selección ocasiona una disminución en los niveles de expresión, y por tanto, el ensayo se hace más estricto al momento de identificar la interacción proteína-proteína.

Para el ensayo lacZ, se disolvió 1% de agarosa en 50 ml de buffer Z (Na₂HPO₄, 85 g/L; NaH₂PO₄, 55;5 g/L KCl; MgSO₄, 246 g/L), se añadió 1 ml de SDS al 10% y 1 ml de X-Gal (40 mg/ml de N,N-dimetilformamida), posteriormente se colocó sobre las placas y se incubó a 37 °C por tres horas para revelar la coloración azul debida a la acción de la β-galactosidasa. Finalmente se tomaron fotos a las placas con una cámara digital.

6.6 Localización de Qdr2p y Pdr12p en el fondo silvestre y mutante *erv14Δ*

Para determinar la localización subcelular de Qdr2p y Pdr12p en presencia y ausencia de Erv14p, se transformó la cepa BY4741*qdr2Δ* con el vector pGRU-QDR2-GFP y la cepa BY4741*pdr12Δ* con el vector pGRU-PDR12-GFP. Por otra parte, para determinar posibles cambios en el patrón de la localización subcelular de Qdr2p y Pdr12p, se co-transformó la cepa BY4741*erv14Δqdr2Δ* con los vectores pGRU-QDR2-GFP y pDRF-ERV14 y la cepa BY4741*erv14Δpdr12Δ* con los vectores pGRU-PDR12-GFP y pDRF-ERV14. Las células se cultivaron en 5 ml de medio YNB con His, Met, Leu y/o Ura a 30°C, en agitación por 16 h. Una vez crecido el cultivo, las células se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 100 µl de H₂O ultrapura estéril. Se tomaron 3-5 µl de la suspensión y se montaron en un portaobjetos para ser observadas en el microscopio de epi-fluorescencia para comprobar que la proteína se estaba expresando correctamente; una vez que se confirmó esto, se procedió a observar las células en el Microscopio confocal invertido Olympus FV1000 Multi-fotónico (Olympus, EUA).

7. RESULTADOS.

7.1 Clonación de los genes *QDR2* y *PDR12*

Para obtener el DNA complementario (cDNA) y clonar el gen *QDR2*, se realizó una extracción de RNA total de la cepa BY4741 tal como en la figura 11A, en el que se observan las subunidades ribosomales 28S y 18S), posteriormente se utilizó como templado para obtener cDNA empleando la técnica de RT-PCR y finalmente se utilizaron oligonucleótidos específicos con los sitios parciales de attb1-*QDR2* Fw y attb2-*QDR2* Rv (segundo carril), finalmente se realizó un segundo PCR para reconstituir completamente los sitios *attB*, usando los oligos attB1-Fw y attB2-Rv, como se observa en la figura 11B (tercer carril). Los componentes para la mezcla de reacción están en la tabla 4 del apéndice.

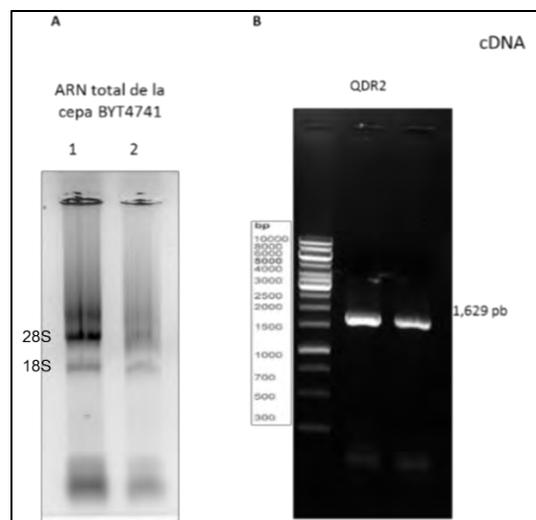


Figura 11. Amplificación de la región codificante de *QDR2* obtenida a partir del cDNA de la levadura *S. cerevisiae*. **RNA)** Gel desnaturizante de RNA (Agarosa al 1%, MOPS 1X, Formaldehído), en cada carril se cargó 1.0 µg del RNA total de la cepa BY4741.-**B.** Productos de RT-PCR correspondientes a los genes *QDR2* (~1,600 pb)

El producto de PCR que se obtuvo fue de aproximadamente 1,629 pb que corresponde al tamaño esperado de *QDR2*. Una vez obtenido el fragmento, se realizó una reacción BP con el vector pDONR221 y después se transformó en *E. coli* cepa DH5α. Se escogieron tres clones a las cuales se les extrajo el DNA

plasmídico y se procedió a realizar un análisis con enzimas de restricción para identificar alguna clona positiva, tal como se muestra en la figura 12. Primero se digirió con la enzima *PvuII*, de las tres clonas la clona Qdr2-C2 mostró el patrón de digestión esperado, con un fragmento entre 2,024 y 1,942 pb, aunque no se distinguió claramente (Figura 12A), así que se realizó una doble digestión con las enzimas *PvuII* y *PstI*. Después de esta digestión se observaron los fragmentos esperados de 1,942, 1,539 y 480 pb aproximadamente (Figura 12B). La clona Qdr2-C2 se secuenció para verificar que el fuera el fragmento clonado correspondiera al esperado.

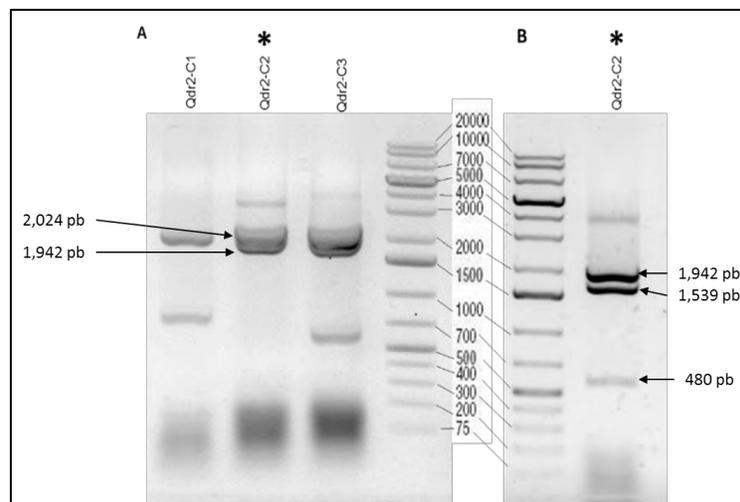


Figura 12. Análisis de restricción del vector pDONR221-QDR2. Las tres clonas seleccionadas con la construcción pDONR221-QDR2 se digirieron con la enzima de restricción *PvuII*, en **A**); la clona Qdr2-C2 mostró un patrón similar al esperado, sin embargo, la resolución de la digestión fue baja, por lo que se realizó una doble digestión con *PvuII* y *PstI*, en **B**).

La secuencia codificante del gen *PDR12* se clonó en el vector de expresión pGRU-GFP. Se amplificaron los productos de PCR tanto de la mitad 5' como de la mitad 3' del gen, cuyos tamaños fueron de 2,388 pb y 2,239 pb, respectivamente. Como se muestra en la figura 13, se pudieron obtener estos dos fragmentos, paralelamente, se linearizó el vector pGRU-GFP y tanto los fragmentos de *PDR12* como el vector linearizado se purificaron a partir del gel.

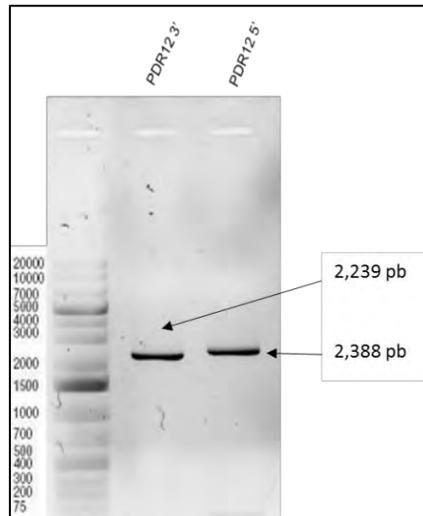


Figura 13. Fragmentos 5' y 3' del gen *PDR12*. Fragmentos del extremo 5' (2,388 pb) y 3' (2,239 pb) del gen *PDR12*, amplificados a partir de cDNA, proveniente de la cepa BY4741 silvestre; las bandas se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con Bromuro de Etidio.

Después se co-transformaron en la cepa de levadura BW31a y se seleccionaron utilizando el procedimiento descrito en la sección 6.1.2 Clonación de *PDR12* (materiales y métodos) en medio YNB +His, +Ade, +Leu y +Trp. Después de la transformación de levadura, se escogieron 15 colonias y se rayaron en cajas; una vez crecidas, las colonias 1 a 4 se observaron al microscopio de epifluorescencia. Aquellas colonias donde se observó fluorescencia en la membrana plasmática se emplearon para identificar clona(s) que tuvieran la clonación correcta de *PDR12* en el vector pGRU-GFP, por lo cual se extrajo DNA plasmídico y se realizó un análisis de restricción con las enzimas *PvuII-PstI*, como se muestra en la figura 14A. El tamaño de los fragmentos obtenidos en la clona 1B correspondió a los esperados de 8,186 pb y 2,003 pb, confirmando que se había obtenido la clona del gen *PDR12* (Figura 14A).

Con la finalidad de corroborar la presencia del gen *PDR12* en el vector pGRU-GFP, se efectuó la amplificación por PCR de la clona positiva 1B (Fig. 14B, asterisco). Esta clona se secuenció utilizando los oligonucleótidos que se encuentran en la tabla suplementaria 4. Los resultados de secuenciación indicaron que el gen *PDR12* no tuvo mutaciones.

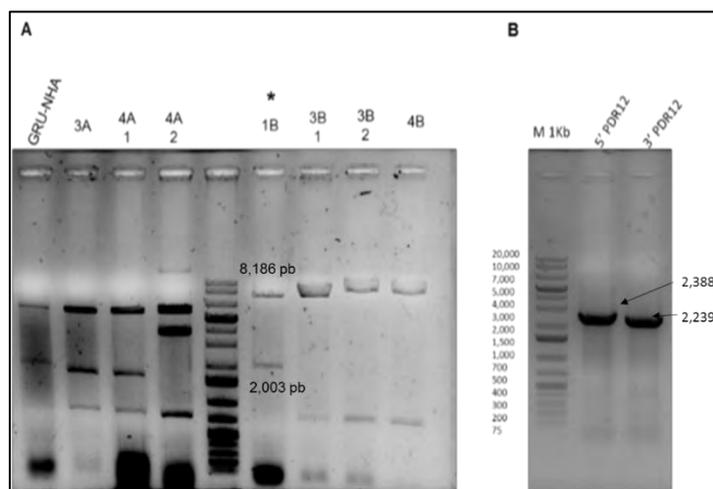


Figura 14. La clona 1B mostró el patrón de restricción esperado que indica una clonación correcta del gen *PDR12* en el vector pGRU-GFP. **A)** Doble digestión con las enzimas *PvuII* y *PstI* de las clonas 3A, 4A1, 4A2, 1B, 3B1, 3B2, 4B y como control el plásmido pGRU-NHA. La clona 1B (*) fue la que mostró el patrón de bandeado esperado y se secuenció. **B)** Productos de PCR correspondientes a los fragmentos 5' y 3' del gen *PDR12*, usando como templado a la clona 1B. DNA plasmídico extraído de *E. coli*.

7.2 Clonación del gen *QDR2* en vectores del sistema mbSUS compatibles con el sistema Gateway

Para realizar los experimentos de la ubiquitina dividida, se utilizó la clona C2 de la construcción pDONR221-*QDR2* para transferir *QDR2* al plásmido pMetYC_GW mediante una reacción LR. El plásmido de expresión generado se empleó para transformar células de *E. coli* DH5 α y se seleccionaron algunas clonas para la extracción del DNA plasmídico. A continuación, se realizó un análisis de esta construcción por restricción, con la enzima *PvuII* y se corrió en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 15. De las dos clonas sólo la uno mostró el patrón con el tamaño de las bandas esperadas de 5,790 y 4,312 pb.

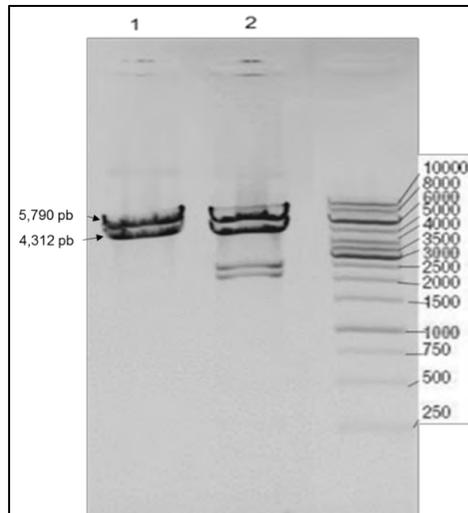


Figura 15. Análisis de restricción del vector pMetYC-QDR2_GW. Los plásmidos extraídos y digeridos con la enzima de restricción *PvuII* de las clonas 1 y 2, se separaron en un gel de agarosa al 1%. Se observa que la clona 1 mostró las bandas esperadas (aprox. 5,790 y 4,312 pb).

7.3 Fusiones traduccionales de Qdr2 a la GFP

Para fusionar Qdr2 a la GFP, se amplificó el gen por PCR usando los oligonucleótidos Yep-Qdr2-Fw y Gru-Qdr2-Rv; el producto de PCR se purificó al igual que el vector linearizado, y ambos se transformaron en la cepa de levadura BW31a. Posteriormente, se escogieron las colonias 1, 3, 5, 7 y 9 (números impares), se observaron al microscopio de epifluorescencia. Las células de todas las clonas transformantes mostraron fluorescencia en la membrana plasmática; a partir de éstas se extrajo DNA plasmídico y se realizó un análisis de restricción con la enzima *PstI*, observando los resultados que se muestran en la figura 16. El patrón de bandeado que se obtuvo correspondió a fragmentos de 750, 1,539 y 4,991 pb, aproximadamente, como se muestra en la figura 16. De las clonas seleccionadas, todas mostraron este mismo patrón, por lo cual se eligió la clona 5B. Esta clona se secuenció, y se confirmó que el gen *QDR2* no presentaba mutación alguna.

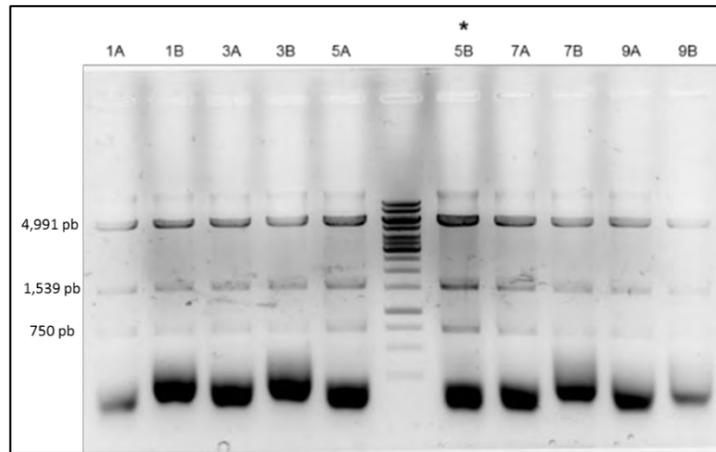


Figura 16. Análisis de restricción del vector pGRU-QDR2-GFP. Patrón de digestión con la enzima *Pst*I de la construcción pGRU-QDR2-GFP. Todas las clonas mostraron el patrón de bandeado esperado por lo cual sólo se escogió la clona 5B (*) para secuenciar. El DNA digerido se corrió en un gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt y se visualizó en un fotodocumentador.

7.4 Generación de las mutantes simples *pdr12Δ* y *qdr2Δ* y mutantes dobles *erv14Δpdr12Δ* y *erv14Δqdr2Δ*

Para la obtención de las mutantes simples y dobles, inicialmente se amplificaron los casetes de interrupción UP-5'QDR2-loxP-Kanr-loxP-QDR2 3'-DOWN y UP-5'PDR12-loxP-Kanr-loxP-PDR12 3'-DOWN, usando como templado el vector pUG6 y los oligonucleótidos de la tabla 3 (Apéndice). El tamaño de ambos casetes es de 1.5 Kb (Figura 17), que corresponde al casete de KanMX con las regiones 5' y 3' de los genes *QDR2* y *PDR12*, respectivamente.

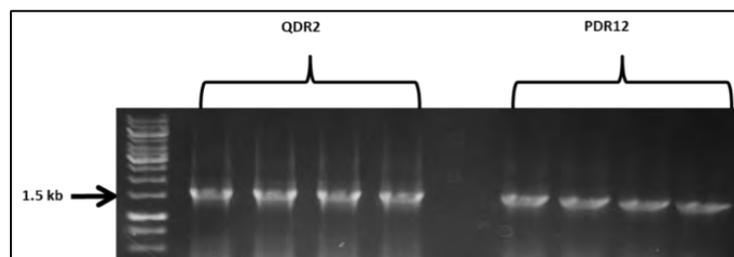


Figura 17. Generación de los Casetes de interrupción UP-5'QDR2-loxP-Kanr-loxP-QDR2-3'-DOWN y UP-5'PDR12-loxP-Kanr-loxP-PDR12-3'-DOWN. Los casetes se amplificaron por PCR, en ambos casos se obtuvo un producto de 1.5 Kb; las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con Bromuro de Etidio.

Ambos casetes de interrupción se emplearon para transformar a la cepa BY4741, la cual se creció en medio YPD suplementado con G-418. De las colonias que crecieron en este medio, se escogieron algunas y se extrajo el DNA genómico, para realizar un análisis por PCR para confirmar la interrupción de los genes *QDR2* o *PDR12* con el casete KanMX.

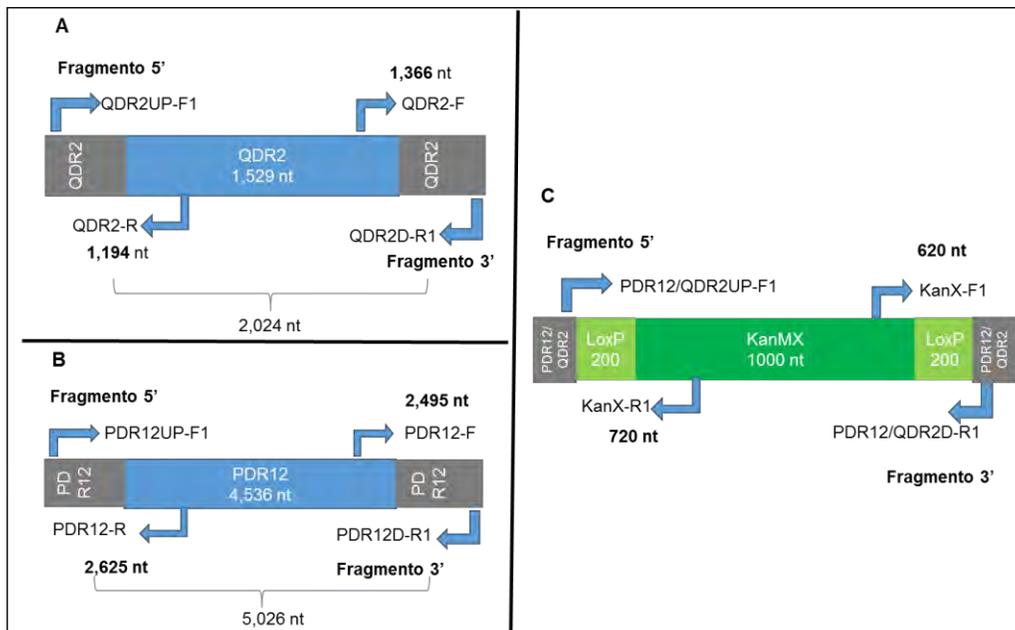


Figura 18. Esquema del análisis de las mutantes simples BY4741 $qdr2\Delta$ y BY4741 $pdr12\Delta$. **A)** Región río arriba y río debajo (incluyendo el gen) de *QDR2*. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos QDR2UP-F1 y QDR2-R, para amplificar el fragmento 5' de *QDR2* (1,194 pb) y la posición de los oligonucleótidos QDR2-F y QDR2D-R1 para amplificar el fragmento 3' de *QDR2* (1,366 pb). **B)** Región río arriba y río abajo (incluyendo el gen) de *PDR12*. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos PDR12UP-F1 y PDR12-R para amplificar el fragmento 5' de *PDR12* (2,625 pb) y los oligonucleótidos PDR12D-R1 y PDR12-F para amplificar el fragmento 3' (2,495 pb). **C)** Casete de KanMX con las regiones de homología de *QDR2* y *PDR12*, respectivamente. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos QDR2UP-F1 (ó en su caso PDR12UP-F1) y KanX-R1 para amplificar el fragmento 5' de 720 pb, y el fragmento 3' con los oligonucleótidos KanX-F1 y QDRD-R1 (o en su caso PDR12D-R1) con un tamaño de 620 pb.

Para confirmar la mutación del gen *QDR2* (Figura 19), se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos que amplificaron el gen completo de 1,629 pb (SQ2-F), 1,194 pb arriba del extremo 5' del gen (SQ2-5'), 1,366 pb abajo del extremo 3' del gen (SQ2-3'), la parte 5' del casete de disrupción (SQ2-K5') con un tamaño de 720 pb, la parte 3' del casete de disrupción (SQ2-K3') con un tamaño de 620 pb, como se muestra en la figura 18 A y C. También se realizaron reacciones de PCR sobre el DNA genómico de las cepas BY4741 y BY4741*erv14*Δ como controles. En la figura 19 se observa la amplificación de los fragmentos con los cuales fue posible identificar mutantes de *QDR2*. De las clonas 1, 4, 5, 6 y 7, sólo las clonas 1, 4 y 6 no se amplificó la región de *QDR2* (SQ2-F, SQ2-5' y SQ2-3'), pero sí el casete de Kan (SQ2-K5' y SQ2-K3'), por lo tanto se seleccionaron como mutantes en *QDR2*. La clona 5 quedó descartada como mutante de *QDR2* debido a que sólo se observó la amplificación de la parte 3' del casete de Kan. Otra de las clonas descartadas fue la 7 donde se observó amplificación tanto del gen silvestre como del casete de Kan (Fig. 19).

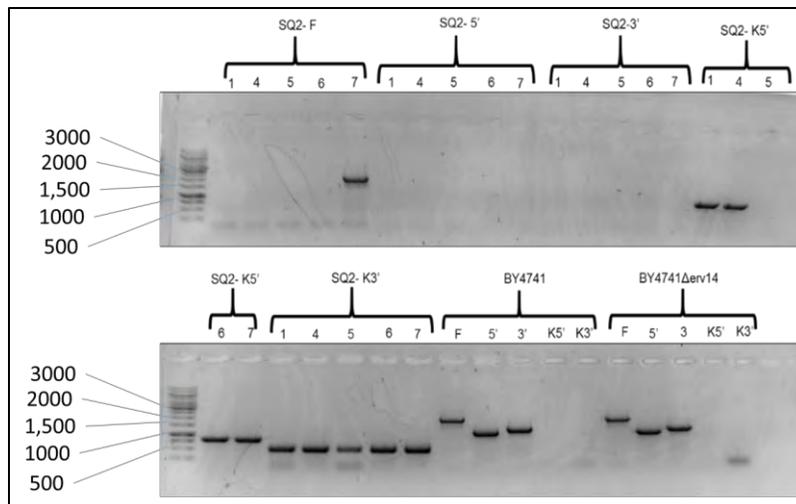


Figura 19. Identificación de las clonas 1, 4 y 6 como mutantes *qdr2*Δ. PCR de las clonas mutantes seleccionadas utilizando como templado DNA genómico. Las clonas 1,4 y 6 se escogieron como mutantes *qdr2*Δ ya que son las que no amplificaron el gen completo (SQ2-F) ni las regiones 5' (SQ2-5') y 3' (SQ2-3'), pero presentaron la inserción el casete de Kan en lugar de *QDR2* (SQ2-K5' y SQ2-K3'). Como control positivo se amplificó el gen y las regiones 5' y 3' de *QDR2*; como control negativo se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar las regiones 5' y 3' del casete de Kan, utilizando como templado el DNA genómico de la cepa silvestre BY4741 y BY4741*erv14*Δ.

Por otra parte, se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos que amplificaran el gen completo *PDR12* de 4,536 pb (SP12-F), 2,650 pb río arriba del extremo 5' del gen (SP12-5'); 2,495 pb río abajo del extremo 3' del gen (SP12-3'), la parte 5' del casete de disrupción (SP12-K5') con un tamaño de 720 pb, la parte 3' del casete de disrupción (SP12-K3') con un tamaño de 620 pb (Fig. 18 B y C). También se efectuaron reacciones de PCR empleando el DNA genómico de las cepas BY4741 y BY4741*erv14*Δ como controles. En la figura 20 se muestra que en las clonas 2, 5 y 7 no se observó la amplificación del gen completo, ni de las regiones río arriba del 5' y río abajo del 3' del gen, pero sí hubo amplificación del casete de Kan, por lo tanto, éstas se seleccionaron como mutantes en *PDR12*.

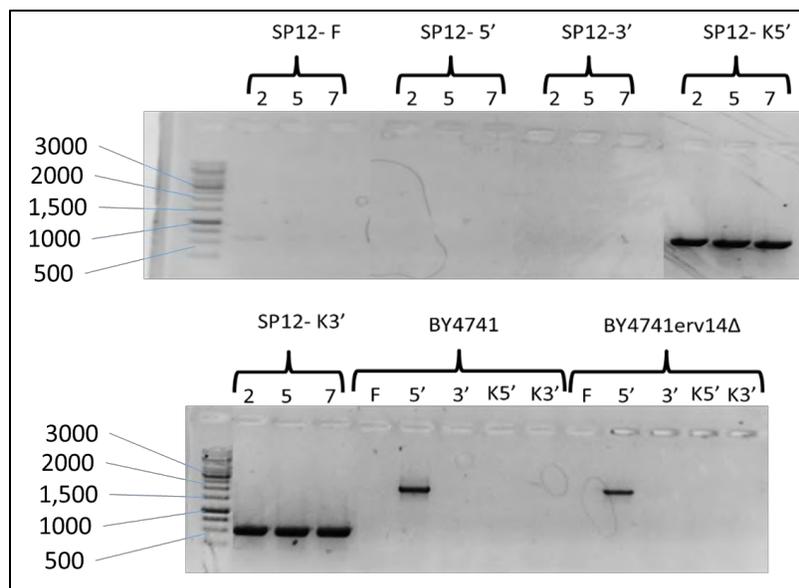


Figura 20. Identificación de las clonas 2, 5 y 7 como mutantes *pdr12*Δ. PCR de las clonas mutantes seleccionadas usando como templado DNA genómico. Las clonas 2, 5 y 7 se escogieron como mutantes *pdr12*Δ ya que no amplificaron el gen completo (SP12-F), ni las regiones 5' (SP12-5') y 3' (SP12-3'), pero fueron positivas para la inserción del casete Kan en lugar de *PDR2* (SP12-K5' y SP12-K3'). Como control positivo se amplificó la región 5' de *PRD12*; como control negativo se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar las regiones 5' y 3' del casete de Kan, utilizando como templado el DNA genómico de la cepa silvestre BY4741 y BY4741*erv14*Δ.

Para generar las dobles mutantes se escogió a la cepa BY4741*erv14*Δ, en la cual se había sustituido el gen *ERV14* por el casete de KanMX. Como esta cepa poseía resistencia a Geneticina, fue necesario remover el casete de KanMX con la

ayuda del vector pSH47 que contiene la recombinasa Cre. La figura 21 muestra un diagrama guía para el análisis y verificación de la remoción correcta del casete de KanMX en la mutante BY4741*erv14Δ*.

Las clonas se crecieron en YPD y luego se transfirieron a medios suplementados con Galactosa para inducir la expresión de la recombinasa Cre. Las clonas BY4741*erv14Δ*::loxP T, U y V que se escogieron, se cultivaron en medio YDP con el antibiótico G-418 (900 µg/ml), las cuales mostraron sensibilidad a G418, lo que nos indicó que habían perdido el casete de Kanamicina, en comparación con la cepa BY4741*erv14Δ*::KanMX (Fig. 22). Posteriormente, estas clonas de levadura se crecieron en medio YDP por 3 a 5 días para que perdieran el vector pSH47 y después se crecieron en medio YNB suplementado con His⁺,Met⁺,Leu⁺ y Ura para comprobar la pérdida del plásmido, indicado en el tercer panel como YNB+HML. Como se muestra en la figura 22, las cepas no crecieron en medio sin Ura, lo cual nos indicó que habían perdido el plásmido pSH47.

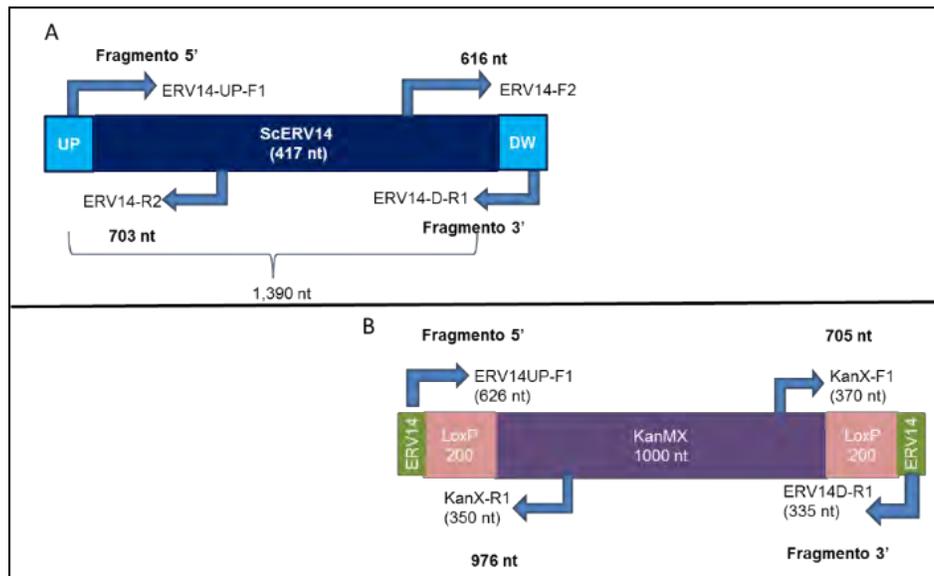


Figura 21. Esquema del análisis por PCR de la eliminación del casete de KanMX en la mutante BY4741*erv14Δ*. Esquemas de la región río arriba y río abajo de *ERV14* y el casete de KanMX con las regiones de homología de *ERV14*. **A)** Fragmento 5' con un tamaño de 703 pb, obtenido mediante la amplificación por PCR con los oligonucleótidos ERV14-UP-F1 y ERV14-R2 y el fragmento 3' con un tamaño de 616 pb, utilizando los oligonucleótidos ERV14-F2 y ERV14-D-R1 **B)** Fragmento 5' que abarca la región de homología de *ERV14* y parte del casete de KanMX hacia el extremo 5', con un tamaño de

976 pb, utilizando los oligonucleótidos ERV14-UP-F1 y KanX-R1; el fragmento 3' abarca la región de homología de *ERV14* y el casete de KanMX hacia el extremo 3' de 705 pb, utilizando los oligonucleótidos KanX-F1 y ERV14-D-R1.

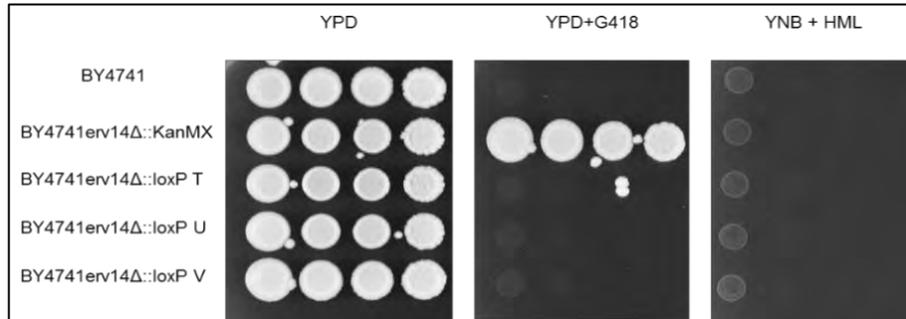


Figura 22. Las clonas T, U y V de la cepa BY4741erv14Δ perdieron el casete de KanMX al no crecer en YPD+G418 y también perdieron el plásmido pSH47 al no crecer en YNB+HML. Ensayo de gota de las cepas BY4741, BY4741erv14Δ::KanMX, y BY4741erv14ΔBY4741erv14Δ::loxP T, U ó V en medio YPD, sin y con G418, y en medio YNB +His, +Met,+ Leu (HML).

Los casetes de disrupción de *QDR2* y *PDR12* se transformaron en la clona BY4741erv14Δ::loxP, y una vez que se obtuvieron algunas clonas candidatas, se extrajo el DNA genómico y se analizaron por PCR para verificar que el casete de Kan estuviera presente, reemplazando los genes *QDR2* y *PDR12*

Se extrajo DNA genómico de las mutantes BY4741erv14Δ::loxP y se realizó un análisis por PCR para verificar la sustitución del gen *ERV14* por el casete Kan, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos que amplificaron el gen completo *ERV14* (E14-F) ó bien, la parte 5' del casete de disrupción (E14-K5'), con un tamaño de 720 pb y la parte 3' del casete de disrupción (E14-K3'), con un tamaño de 620 pb (Fig. 22 y Fig. 23 C y D). Se hizo un análisis de PCR para verificar el reemplazo de *QDR2* por el casete de Kan, para esto se utilizaron los oligonucleótidos que amplificaron el gen completo *QDR2* (DQD2-F) o la parte 5' del casete de disrupción (DQD2-K5'), con un tamaño de 720 pb y la parte 3' del casete de disrupción (DQD2-K3'), con un tamaño de 620 pb (Fig. 23 A y B). Las posibles clonas de las dobles mutantes *qdr2Δerv14Δ* fueron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, de las cuales, sólo en 3, 4, 5 y 8 se insertó correctamente el casete de Kan,

reemplazando a *QDR2*. Las clonas 1, 2, 6 y 7 fueron descartadas debido que no se presentó el reemplazamiento de *QDR2* por el casete de Kan (Fig. 23 A y B).

Para verificar el reemplazo de *PDR12* por el casete de resistencia a Kan en la doble mutante *erv14Δpdr12Δ*, se utilizaron los oligonucleótidos que amplificaran 2,650 pb por arriba del extremo 5' del gen *PDR12* (DPD12-5'Int); la parte 5' del casete de disrupción (DPD12-5'Kan), con un tamaño de 720 pb y la parte 3' del casete de disrupción (DPD12-3'K), con un tamaño de 620 pb (Fig. 23 A, B, C y D) de las cuales se obtuvieron dos clonas de la mutante BY4741*erv14Δpdr12Δ* (2 y 7), que se emplearon para los experimentos de complementación fenotípica y localización subcelular de los transportadores correspondientes.

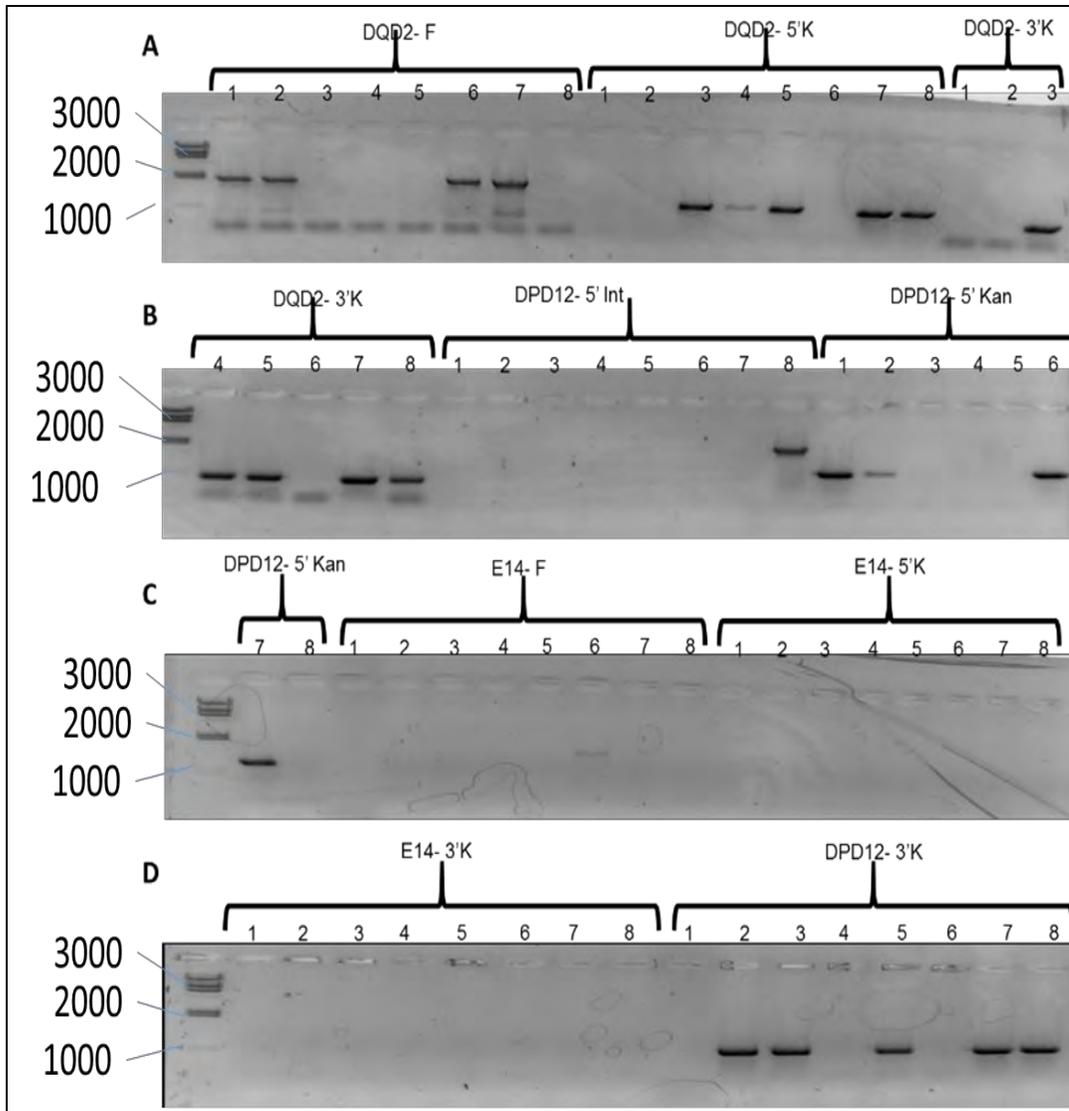


Figura 23. Verificación por PCR de las dobles mutantes BY4741*erv14Δqdr2Δ* y BY4741*erv14Δpdr12Δ*. Productos de PCR de las clonas mutantes seleccionadas, usando como templado DNA genómico, la ausencia y/o presencia de las bandas representa cuales son las clonas a las que se les reemplazo correctamente los genes *QDR2* o *PDR12* por el casete de Kanamicina. **A)** Amplificación del gen completo de *QDR2* (DQD2-F, clonas 1 a 8), del extremo 5' del casete de disrupción en *QDR2* (DQD2-5'K, clonas 1 a 8) y de la región 3' del casete de disrupción en *QDR2* (DQD2-3'K, clonas 1 a 3). **B)** Amplificación de la región 3' del casete de disrupción *QDR2* (DQD2-3'K, clonas 4 a 8); amplificación del fragmento por arriba del extremo 5' del gen *PDR12* (DPD12-5'Int, clonas 1 a 8); Parte 5' del casete de disrupción (DPD12-5'Kan, clonas 1 a 6). **C)** Amplificación del fragmento parte 5' del casete de disrupción (DPD12-5'Kan, clonas 7 y 8), amplificación del gen completo de *ERV14* (E14-F, clonas 1 a 8), también de la parte 5' del casete de disrupción (E14-5'K, clonas 1 a 8). **D)** Amplificación de la parte 3' del casete de disrupción (E14-3'K) y amplificación del extremo 3' del casete de disrupción (DPD12-3'K, clonas 1 a 8).

7.5 PARTICIPACIÓN DE Erv14 EN LA DETOXIFICACIÓN DEL COBRE

De acuerdo a lo previamente reportado, Qdr2p es un antiportador de droga/H⁺ que confiere a las levaduras resistencia a la quinidina³⁵, sin embargo, existen otros reportes que lo asocian a la detoxificación del cobre³⁷. Por otro lado, se ha reportado que la localización de Qdr2 cambia en ausencia de Erv14²⁶, por lo cual primero se propuso determinar si Erv14 y Qdr2 están involucrados en la detoxificación de cobre. Para esto se realizaron ensayos de gota con diluciones seriadas (1:10), de las cepas BY4741 y BY4741*erv14Δ*, BY4741*qdr2Δ* y BY4741*erv14Δqdr2Δ*, en medio mínimo YNB con concentraciones de 0.5 a 1.5 mM de sulfato de cobre (CuSO₄) (Fig. 24). En la figura 24 se muestra que en medio mínimo, las levaduras crecieron hasta en 1.5 mM de cobre; sorprendentemente, las cepas *erv14Δ* fueron ligeramente más resistentes al CuSO₄, mientras que la mutante *qdr2Δ* mostró ser sensible a 1.3 mM de cobre, lo cual sugiere que Qdr2 y no Erv14, podría estar involucrado en la detoxificación de cobre. En la cepa *erv14Δqdr2Δ*, las levaduras crecieron hasta en 1.5 mM de CuSO₄, similar al crecimiento de la mutante sencilla *erv14Δ*. Lo que podría indicarnos que la ausencia de Erv14 le confiere a las levaduras tolerancia al CuSO₄, este efecto parece predominar sobre el efecto que causa la ausencia de Qdr2.

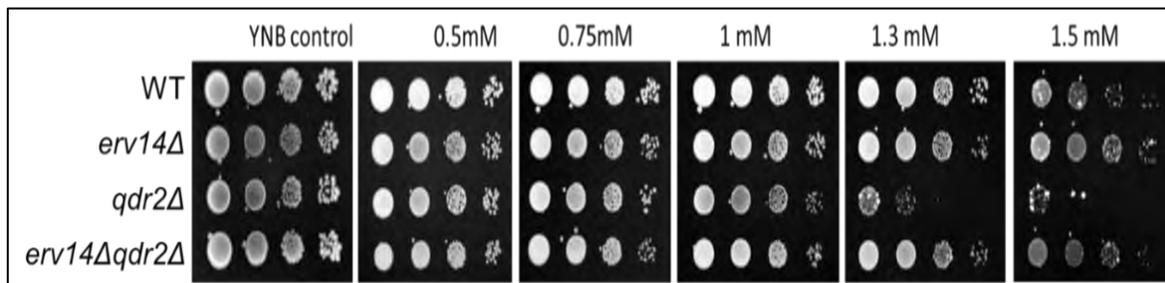


Figura 24. La ausencia de Qdr2 y no de Erv14 disminuye la tolerancia al CuSO₄ en *S. cerevisiae*. Ensayos de gota con diluciones seriadas 1:10 (izq. a der.) de las diferentes cepas silvestres y mutantes crecidas en medio mínimo YNB adicionado con diferentes concentraciones de CuSO₄. Las levaduras se incubaron en los diferentes medios por tres días y después se fotografiaron.

Para entender mejor el papel de *Erv14* en la tolerancia al cobre, se analizaron los efectos de la sobre-expresión y complementación de *Erv14* en las cepas silvestre y *erv14Δ*, respectivamente. En la figura 25 se puede observar que la sobreexpresión de *Erv14* en la cepa silvestre y la complementación de *Erv14* en la línea mutante *erv14Δ* hicieron más sensible a las levaduras al cobre.

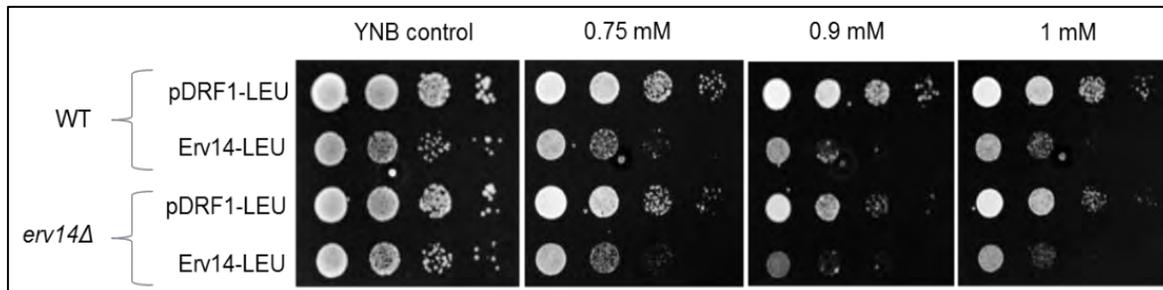


Figura 25. La presencia de *Erv14* disminuye la sensibilidad al CuSO_4 . Ensayos de gota con diluciones seriales 1:10 (izq a der) de las cepas BY4741 y BY4741*erv14Δ* crecidas en medio mínimo YNB y diferentes concentraciones de CuSO_4 . Complementación con el *Erv14p* (pDRF1-*ERV14*-LEU) y transformación con el vector vacío (pDRF1-LEU) como control. Las levaduras se crecieron por cuatro días y después se fotografiaron.

Para corroborar que *Qdr2p* participa directamente en la detoxificación al cobre, se realizó la complementación funcional de *Qdr2* en la cepa *qdr2Δ* y se evaluó la resistencia a diferentes concentraciones de cobre. Los resultados mostraron que *Qdr2* no logró rescatar la tolerancia de CuSO_4 al complementarle bajo su propio fondo mutante del transportador *Qdr2*, tal como se observa en la figura 26. Esta misma cepa se observó al microscopio confocal donde se apreció que *Qdr2* se localizó en la membrana plasmática (Fig. 27). Las levaduras complementadas con *QDR2* mostraron ser más sensibles con respecto a las levaduras que carecían de este transportador.

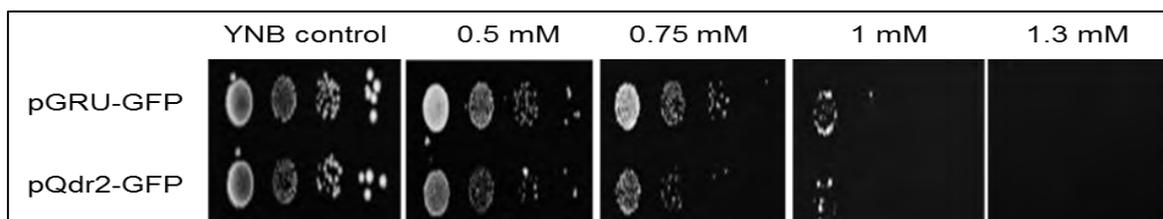


Figura 26. La complementación de *Qdr2* en la mutante BY4741*qdr2Δ* no rescata la tolerancia al CuSO_4 en las levaduras. Ensayos de gota con diluciones seriales 1:10 (izq a der) de las levaduras crecidas en medio mínimo YNB y con diferentes concentraciones de CuSO_4 . Mutante *qdr2* portadoras de un plásmido que expresa el alelo silvestre *QDR2*

(pQDR2-GFP) ó un plásmido control. Las levaduras se crecieron por cuatro días y después se fotografiaron.

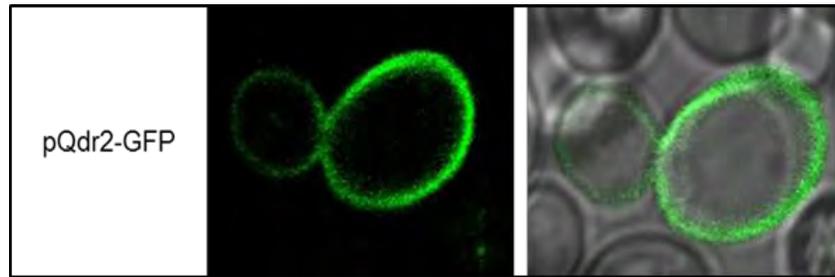


Figura 27. Localización subcelular del transportador Qdr2p en la levadura *S. cerevisiae* BY4741*qdr2Δ*. Las levaduras se transformaron con un vector que expresa la fusión traduccional de Qdr2 a GFP (pQDR2-GFP). En la imagen se observa la fluorescencia correspondiente a Qdr2p-GFP en la cepa BY4741*qdr2Δ*.

También se realizaron los ensayos de complementación funcional y el análisis de la localización subcelular de Qdr2p en la doble mutante BY4741*erv14Δqdr2Δ*, esto para comprobar si Qdr2 es una proteína cargo de con Erv14. Los ensayos de complementación funcional mostraron que en presencia de 1.5 mM de sulfato de cobre, las levaduras mutantes *erv14Δqdr2Δ* crecieron mejor (células co-transformadas con los plásmidos vacíos pGRU-GFP+pDRF1-LEU; Fig. 28), en comparación con las cepas complementadas con QDR2 (pQDR2-GFP) o ambos QDR2 y ERV14 (pQDR2-GFP + pDRF1ERV14 (Fig. 28). Las mutantes complementadas con los dos genes sorprendentemente fueron más sensibles al cobre, ya que su crecimiento se vio afectado por la presencia de 1 mM de CuSO₄ (Fig. 28, tercera fila), donde la doble mutante no complementada y transformada con sólo pQDR2-GFP aún presenta crecimiento.

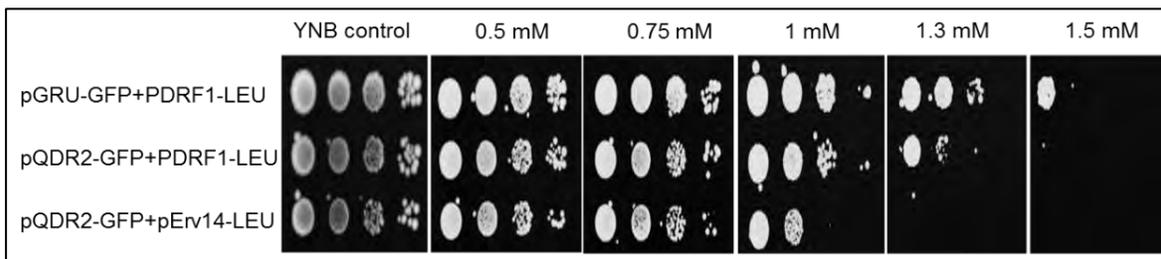


Figura 28. Qdr2 participa en la detoxificación de cobre al rescatar casi por completo el crecimiento de las levaduras al cobre, mientras que Erv14 participa en la captación del cobre en la levadura. Ensayos de gota con diluciones seriales 1:10 (izq. a

der) de las levaduras crecidas en medio mínimo YNB y con diferentes concentraciones de CuSO_4 . Las levaduras se fotografiaron después de cuatro días de crecimiento. Como control se co-transformó con los plásmidos vacíos pGRU-GFP +pDRF1-LEU. En la segunda fila se muestra el crecimiento de las levaduras complementadas sólo con *QDR2* en el fondo doble mutante y en la última fila se muestra el crecimiento de las levaduras complementadas con *ERV14* y *QDR2*.

Empleando las mismas células de la figura 28, se determinó la localización de *QDR2*-GFP con ayuda del microscopio confocal. La localización de Qdr2p en las levaduras les co-transformadas con *QDR2*-GFP y el plásmido vacío pDRF1-LEU, se observó en el córtex de la célula así como en la periferia del núcleo consistente con una localización del RE cortical y perinuclear, respectivamente; (Fig. 29). Cuando la complementación se realizó tanto con *ERV14* como con *QDR2*, la localización de éste último se observó una disminución de la fluorescencia en la periferia del núcleo y un aumento en la periferia de la célula consistente con una localización en la membrana plasmática (Fig. 29).

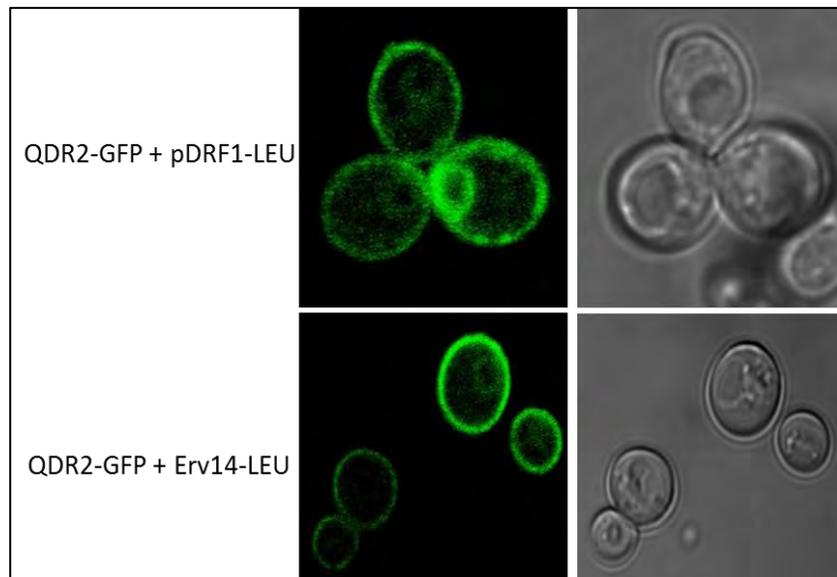


Figura 29. Localización subcelular del transportador Qdr2p en la levadura *S. cerevisiae*. En las imágenes superiores se observa la localización de Qdr2 en la cepa *BY4741erv14Δqdr2Δ*, complementando sólo con *QDR2*, mientras que en las imágenes inferiores se observa la localización Qdr2 en el mismo fondo mutante, co-transformado con *ERV14* y *QDR2*.

Finalmente, para analizar si la localización de Qdr2 depende de una interacción directa entre el cargo y el receptor Erv14, se realizó un ensayo de la ubiquitina dividida o mbSUS. Se usó a Qdr2 como cebo, fusionando a la mitad C-terminal de la ubiquitina (fusión Cub) y a Erv14 como presa, fusionada a la mitad N-terminal de la ubiquitina (fusión Nub); las levaduras se crecieron en medios de crecimiento Ura-, Trp-, Leu-, Ade-, His- para probar la interacción proteína-proteína. En la figura 31 se muestra que en el medio IS-0 se presentó crecimiento de la levadura, lo que indicó la interacción entre Qdr2 y Erv14, lo cual se confirmó en el medio IS-500, donde las levaduras mostraron una coloración rosada, indicando un estrés ya que la interacción es reprimida por la activación del promotor MET25, como consecuencia de la presencia de metionina en el medio. Por último, se confirmó la interacción del receptor cargo Erv14 con el cargo Qdr2, mediante la activación del gen *lacZ*, observándose una coloración azulada debido a la oxidación de X-gal por la acción de la β -galactosidasa (Fig. 30, LacZ).

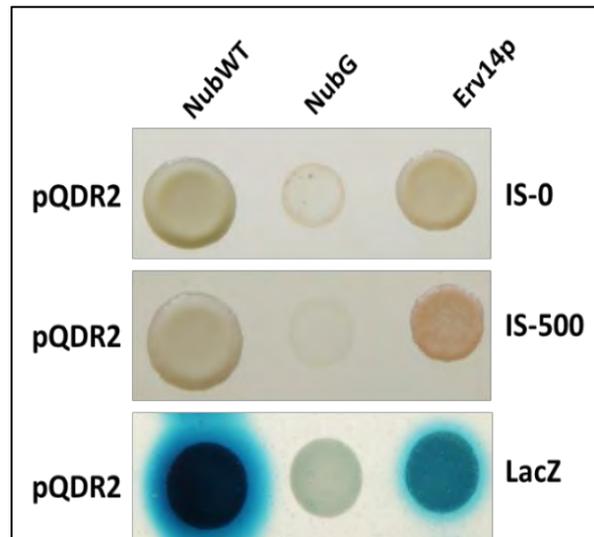


Figura 30. Interacción proteína-proteína entre Erv14p y Qdr2p en la levadura. Ensayo de la ubiquitina dividida o mbSUS. En la primera columna se muestra el control positivo (NubWT vs Qdr2) y en la segunda columna se muestra el control negativo del ensayo (NubG vs Qdr2), mientras que en la tercera columna se muestra la interacción entre el receptor cargo Erv14 y el cargo Qdr2, en cada uno de los diferentes medios de interacción. IS-0 (medio DS sin aminoácidos), medio IS-500 (medio DS con 500 μ M de Metionina). El ensayo de actividad de LacZ se realizó en medio DS, suplementado con Ade e His.

7.6 PARTICIPACIÓN DE *Erv14* EN LA TOLERANCIA AL ÁCIDO BUTÍRICO

Para saber si *Erv14* está relacionado con la tolerancia al ácido butírico indirectamente, debido a la relación con el transportador ABC *Pdr12*, y que éste a su vez le permita a la levadura crecer en presencia de este compuesto, primero se realizaron ensayos de gota con diluciones seriadas (1:10) de las cepas BY4741, BY4741*erv14* Δ , BY4741*pdr12* Δ y BY4741*erv14* Δ *pdr12* Δ , con concentraciones de 1.5 a 10 mM de ácido butírico en medio mínimo YNB. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 31, la cepa *erv14* Δ mostró una ligera sensibilidad al compuesto, en comparación con la cepa silvestre, llegando a crecer en presencia de hasta 10 mM de ácido butírico. De manera drástica, la cepa mutante *pdr12* Δ no creció en concentraciones más altas de 3 mM de ácido butírico, y en la doble mutante (*erv14* Δ *pdr12* Δ), resaltó más este efecto, ya que el crecimiento de estas células se vio disminuido incluso en 1.5 mM de ácido butírico (Fig. 31).

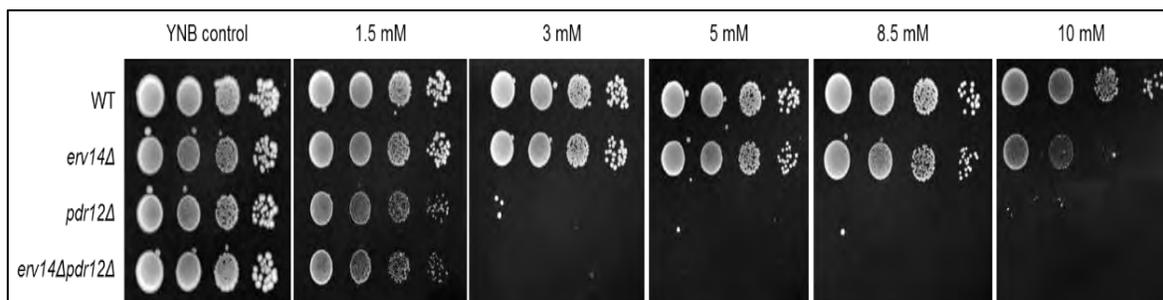


Figura 31. La ausencia de *Erv14* y *Pdr12* disminuye la tolerancia al ácido butírico en las levaduras. Ensayos de gota con diluciones seriadas 1:10 (izq. A der.) de las cepas BY4741 y BY4741*erv14* Δ crecidas en medio mínimo YNB con diferentes concentraciones de ácido butírico. Las levaduras se crecieron por tres días y después se fotografiaron.

Para determinar si el fenotipo de tolerancia al ácido butírico dependía en efecto de *Erv14*, se hicieron complementaciones funcionales de *erv14* Δ con la *Erv14*. En la figura 32 se puede observar que la cepa silvestre transformada con el plásmido vacío, continuó siendo tolerante hasta 10 mM de ácido butírico; por otro lado, la sobre-expresión de *ERV14* en el fondo silvestre aumentó su sensibilidad al compuesto. La introducción del plásmido vacío en la mutante BY4741*erv14* Δ ,

afectó el crecimiento de las levaduras en 10 mM de ácido butírico (Fig. 32). Por el contrario, al complementar con *ERV14*, se logró recuperar el crecimiento de las células mutantes BY4741*erv14Δ* en presencia de 10 mM de ácido butírico (Fig. 32), demostrando que, en efecto, Erv14 está implicado en la tolerancia de las levaduras al ácido butírico.

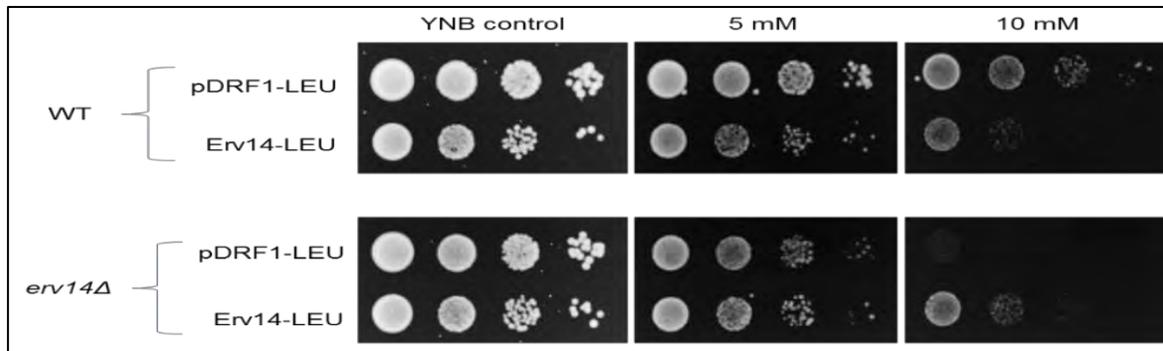


Figura 32. La complementación de Erv14 rescata la tolerancia al ácido butírico en la levadura. Ensayo de sensibilidad al ácido butírico en la cepa silvestre BY4741 y la cepa mutante BY4741*erv14Δ*. Ensayos de gota con diluciones seriales 1:10 (izq. a der.) de las cepas BY4741 y BY4741*erv14Δ* crecidas en medio mínimo YNB con diferentes concentraciones de ácido butírico. El crecimiento de las levaduras se documentó después de cuatro días.

Para corroborar que el fenotipo ocasionado por la ausencia de Pdr12p se debía directamente a la falta de este transportador, se realizaron ensayos de complementación fenotípica en la mutante *pdr12Δ* con el vector pGRU-*PDR12*-GFP, en presencia de diferentes concentraciones de ácido butírico. Los resultados mostraron la complementación de *pdr12Δ* con Pdr12p ya que se pudo observar el crecimiento de las células en presencia de 5 mM de ácido butírico, pero no así en las células transformadas con el vector vacío (Fig. 33). El empleo del vector pGRU-*PDR12*-GFP permitió determinar la localización subcelular del transportador, que, como se muestra en la figura 34, se localizó en la membrana plasmática, con lo que es consistente con que Pdr12 es importante para la tolerancia al ácido butírico, lo que le permite a la levadura crecer bajo esas condiciones.

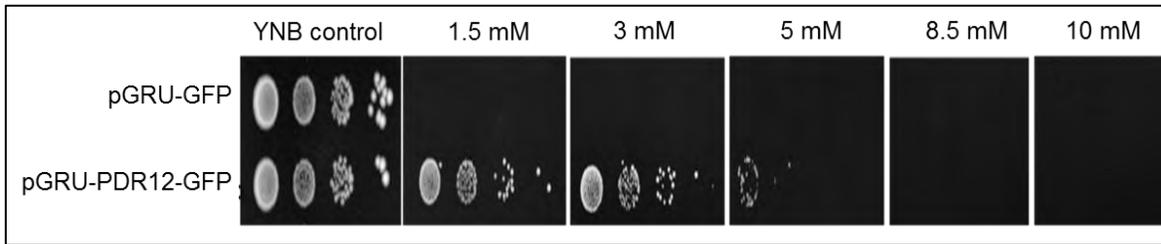


Figura 33. La complementación con Pdr12p en la mutante BY4741*pdr12Δ* rescata la tolerancia al ácido butírico. Ensayos de gota con diluciones seriales 1:10 (izq. a der.) de las levaduras crecidas en medio mínimo YNB en concentraciones de 1.5 a 10 mM de ácido butírico. Las levaduras se crecieron por cuatro días.

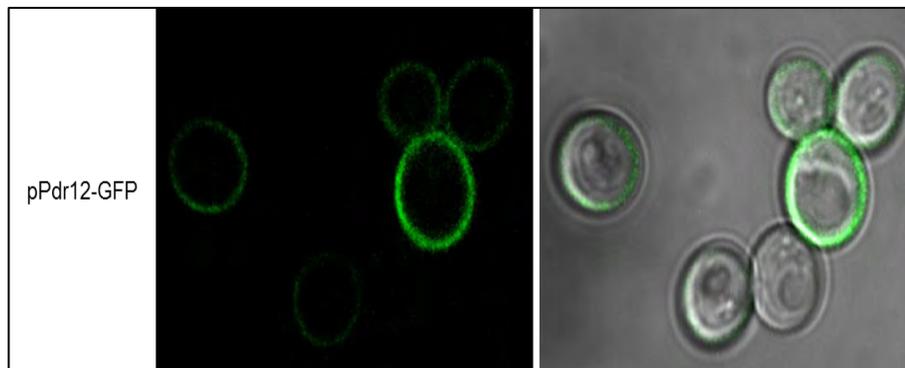


Figura 34. Localización subcelular del transportador ABC Pdr12p en la levadura *S. cerevisiae*. En la imagen se observa la localización de Pdr12-GFP en la cepa BY4741*pdr12Δ*.

Hasta este momento, los resultados obtenidos sugieren que, el transportador ABC Pdr12 y Erv14 participan en la tolerancia al ácido butírico. Para precisar si el fenotipo que se observó en ambos casos dependía uno del otro, se efectuaron los ensayos de complementación funcional y se estudió la localización subcelular de Pdr12p en ausencia de Erv14. En la figura 35 se observa que las levaduras carentes de Erv14 y Pdr12 co-transformadas con los plásmidos vacíos no crecieron en presencia de 1.5 mM de ácido butírico; en contraste, la cepa co-transformada con *PDR12* y el plásmido vacío pDRF1-LEU logró crecer en presencia de hasta 8.5 mM de éste ácido, mientras que las levaduras co-transformadas con *PDR12* y *ERV14* crecieron en 10 mM de ácido butírico, similar al crecimiento de la cepa silvestre (Fig. 35).

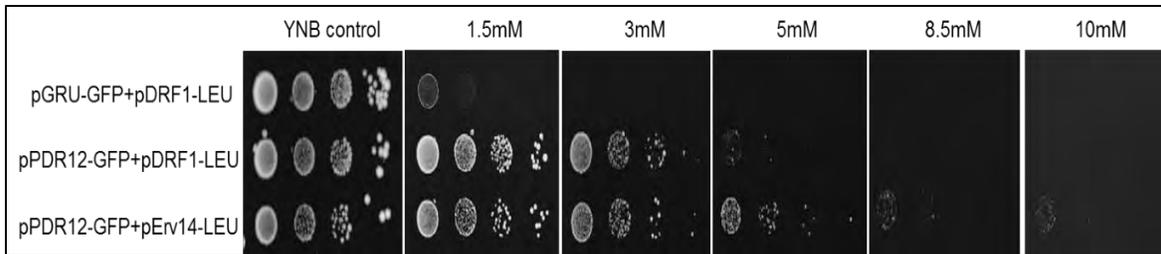


Figura 35. La complementación de *Erv14* y *Pdr12* en la mutante *BY4741erv14Δpdr12Δ* rescata la tolerancia al ácido butírico en las células de levadura. . Ensayos de gota con diluciones seriales 1:10 (izq. a der.) de las levaduras crecidas en medio mínimo YNB con diferentes concentraciones de ácido butírico. Las levaduras se crecieron por cuatro días y después se fotografiaron. Como control se transformó con los plásmidos vacíos pGRU-GFP +pDRF1-LEU. En la segunda fila se muestra el crecimiento de las levaduras con la complementación con *PDR12* en el fondo de la doble mutante y en la última fila se muestra el crecimiento de las levaduras complementando con *ERV14* y *PDR12*.

Los resultados anteriores sugerían que *Pdr12* debería de estar localizado en la membrana plasmática para bombear al ácido butírico fuera de las células para permitir su crecimiento. Para comprobar esto, las células *BY4741erv14Δpdr12Δ* se transformaron inicialmente con el vector p*PDR12*-GFP y el vector vacío pDRF1-LEU, observando la fluorescencia asociada a *PDR12*-GFP en el retículo endoplásmico (Fig. 36). Cuando las células *BY4741erv14Δpdr12Δ* se co-transformaron con los vectores p*PDR12*-GFP y pDRF1-*ERV14*-LEU, la fluorescencia de *PDR12*-GFP se observó mayoritariamente en la periferia de las células, sugiriendo una reducción de *Pdr12p* en el RE y una correcta localización en la membrana plasmática (Fig. 36). La complementación con *Erv14* y *Pdr12* en la cepa doble mutante rescata la tolerancia al ácido butírico en la levadura, aunado a esto la complementación con *Erv14p* restaura la localización de *Pdr12p* en la membrana plasmática, estas dos observaciones se correlacionan con la resistencia de las células respectivas al ácido butírico (ver Fig. 35).

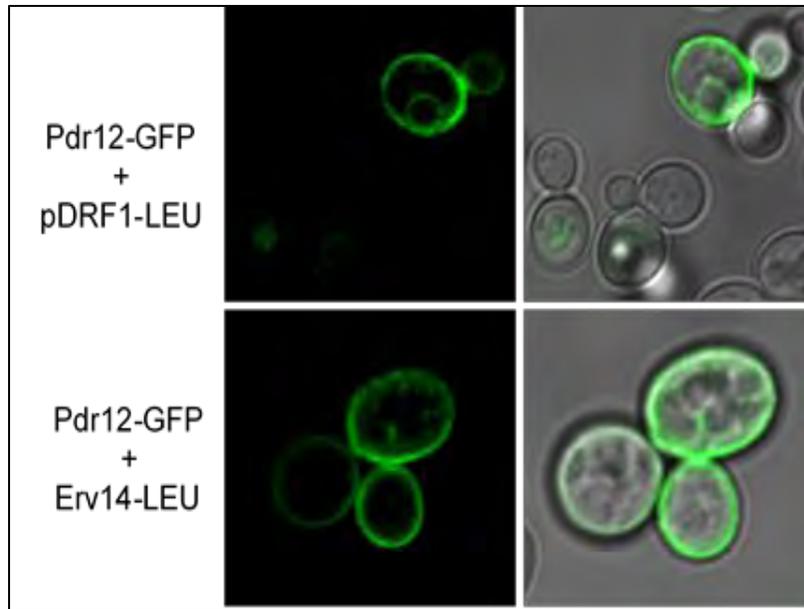


Figura 36. Localización subcelular del transportador Pdr12p en la levadura *S. cerevisiae*. En las imágenes superiores se observa la localización de Pdr12 en la cepa *BY4741erv14Δpdr12Δ*, complementada sólo con PDR12-GFP, mientras que en las imágenes inferiores se observa la localización del transportador en el mismo fondo mutante, complementando con pPDR12-GFP y pDRF1-ERV14-LEU.

8 DISCUSIÓN

El RE es el punto de salida de muchas proteínas de membrana. La salida de estas proteínas hacia su membrana de residencia se lleva a cabo a través del complejo vesicular COPII. En general se conoce que las proteínas cargo pueden ser empaquetadas en las vesículas COPII a través de motivos específicos como di-acídicos, hidrofóbicos, de argininas que son reconocidos por Sec24p¹². Sin embargo, existen proteínas residentes del RE que son importantes para el reclutamiento de proteínas cargo en las vesículas COPII, este tipo de proteínas se denominan RC, siendo uno de ellos Erv14p²⁴. Existen pocos estudios sobre la función de Erv14p en el reconocimiento de sus cargos. Powers y Barlowe identificaron a Erv14p como un componente adicional de la maquinaria COPII, aislando vesículas del RE purificadas^{22,24}. En su trabajo, ellos demostraron que Erv14p es el receptor cargo de Axl2p, que es una proteína de membrana importante para iniciar el proceso de brotamiento axial de la levadura. Otro de los cargos que dependen de Erv14p, involucrados en el desarrollo de la levadura, es Sma2p, la cual participa en la formación de la pro-espora; si esta proteína no llega a la membrana plasmática, la levadura muestra defectos en la formación de la pro-espora²⁵. Por otra parte, Nha1p es un antiportador de Na⁺/H⁺ que confiere tolerancia a la salinidad en las levaduras. Este transportador es una proteína cargo de Erv14p y su correcta localización en la membrana plasmática depende de éste; en ausencia de Erv14 las levaduras muestran mayor sensibilidad al sodio, debido a la retención de Nha1p en el RE, así que de manera indirecta Erv14 es importante en la tolerancia a la salinidad³⁸.

Por otro lado, estudios masivos como los reportados por Herzig²⁶, han ampliado el estudio de posibles cargos asociados a Erv14. Sin embargo, son necesarios más análisis funcionales para confirmar la importancia del tráfico celular de estas proteínas cargos dependientes de Erv14, lo cual constituye el objetivo general del presente trabajo.

8.1 Erv14 y la homeostasis del cobre en la levadura.

De acuerdo a reportes previos en la literatura, se propone que Qdr2 es un transportador de cobre y que Erv14 parece ser su receptor cargo^{37,26}, por lo que en este trabajo se supuso que Erv14 tendría una participación en la detoxificación del cobre al controlar el tráfico de su cargo, Qdr2, hacia la membrana plasmática. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la mutante *qdr2Δ* mostró un menor crecimiento en presencia de cobre (Fig. 24), lo cual indicaría su posible papel como un intercambiador $\text{Cu}^{2+}/\text{H}^{+}$, sorpresivamente al complementar la mutante *BYT4741qdr2Δ* con *QDR2*, las levaduras continuaron siendo sensibles al sulfato de cobre (Fig. 26), a pesar de localizarse correctamente en la membrana plasmática (Fig. 27), el fallo en la complementación con Qdr2 bajo su propio fondo mutante también podría deberse a la etiqueta en el extremo C-terminal de Qdr2 con la GFP que afecte la actividad del transportador pero no así su localización. Cuando se complementa en la cepa doble mutante Qdr2 logra rescatar parcialmente la tolerancia al cobre (Fig. 28), lo cual indicaría que Qdr2 tiene una función en la detoxificación de cobre. Sin embargo es necesario realizar estudios adicionales sobre su caracterización para esclarecer la función fisiológica de este transportador. Por otra parte, los resultados obtenidos con la mutante *erv14Δ*, indicaron que las levaduras no se vieron afectadas por la presencia de cobre en el medio (Fig. 25), mientras que la presencia de Erv14 en las levaduras les ocasionó ser más sensibles al cobre con respecto a la cepa silvestre (Fig. 26), lo cual podría deberse a la localización de otros transportadores dependientes de Erv14 capaces de transportar al cobre hacia el interior de la célula, afectando el crecimiento en las cepas de levadura. Uno de estos mecanismos podría ser la permeasa Fet4, descrita como un transportador de baja afinidad de hierro que se encuentra en la membrana plasmática, sin embargo en concentraciones altas de cobre, este transportador es selectivo a cobre y no a hierro⁴⁴. También se ha reportado que en condiciones altas de cobre, este transportador se encuentra más activo que otros⁴⁴. Por lo cual sería importante investigar si Fet4 es una proteína cargo de Erv14. De acuerdo a reportes previos en la literatura, se propone que Qdr2 es un transportador de cobre y que Erv14 parece ser su receptor cargo^{26,37}

A pesar de estas observaciones, se demostró por localización subcelular (Fig. 29) y a través de una interacción proteína/proteína (Fig. 30) Qdr2 depende de Erv14 lo cual se puede concluir que Erv14 es receptor cargo de Qdr2, sin embargo Erv14 estaría participando principalmente en la captación del cobre al interior celular a través de la interacción con otras proteínas cargo como el transportador Fet4 y no tanto en la detoxificación de cobre en la levadura.30),

8.2 Erv14 participa en la tolerancia al ácido butírico controlando el tráfico del transportador Pdr12

Los resultados obtenidos sobre el transportador ABC Pdr12 mostraron que la dinámica que ocurre entre Erv14 y Pdr12 comprobó la hipótesis propuesta de este estudio. En primer lugar, se observó una sensibilidad al ácido butírico en la mutante *erv14Δ*, que fue mayor en la doble mutante *erv14Δpdr12Δ* (Fig.31) y que, al complementar esta última con ambos genes, la levadura pudo crecer en altas concentraciones de ácido butírico (Fig. 35), asociado con la correcta localización de Pdr12 en la membrana plasmática, dependiente de Erv14 (Fig. 36). En vista de estas observaciones, es posible proponer que la sensibilidad de la cepa *erv14Δ* al ácido butírico, en comparación con la cepa silvestre (Fig. 32), se debe a que Pdr12 no se localice en la membrana plasmática, demostrando la participación indirecta de Erv14 en la tolerancia a ácidos débiles. El hecho que la mutante *erv14Δ* mostró ser más resistente que la mutante en *pdr12Δ* (Fig. 31), sugiere que esto podría deberse a que Pdr12 llegue a la membrana plasmática a través de algún otro RC. Por último, Pipper y colaboradores²⁹ demostraron que el transcrito de *PDR12* se induce en presencia de ácidos débiles pero no así su localización en la membrana plasmática, por lo tanto, nosotros corroboramos que la correcta localización de Pdr12 depende de su tráfico celular, en el que interviene Erv14 (Fig. 36). Desafortunadamente no fue posible comprobar la interacción proteína-proteína entre Erv14 y Pdr12 por el método del mbSUS, por cuestiones técnicas de clonación del gen que codifica para este transportador, sin embargo, es pertinente buscar otras técnicas para identificar la interacción proteína-proteína tales como la

inmunoprecipitación, la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFc) o el FRET (Transferencia de energía de resonancia), que nos permitan confirmar la interacción directa de Erv14 con Pdr12.

9. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Después de haber desarrollado este proyecto, se han abierto varias posibilidades para entender mejor la importancia de la interacción entre el receptor de proteínas cargo, ERv14, y las proteínas cargo con las que interacciona que hasta ahora se han caracterizado por ser de membrana. De acuerdo a esto, se proponen las siguientes perspectivas:

- Identificar los posibles transportadores de cobre como cargos de Erv14 en levadura, a través de realizar co-inmunoprecipitaciones en condiciones de altas concentraciones de cobre.
- Caracterizar con mayor detalle la función del antiportador de droga/H⁺ Qdr2 en la levadura, por medio de un tamizado con diferentes compuestos y/o condiciones y confirmar el transporte del compuesto seleccionado, a través de registros electrofisiológicos en ovocitos de rana *X. laevis*.
- Caracterizar nuevos componentes del tráfico vesicular que participen en la correcta localización de Qdr2 y Pdr12 hacia la membrana plasmática, a través de co-inmunoprecipitaciones en la levadura *S. cerevisiae*.
- Identificar proteínas homólogas de Pdr12 y/o Qdr2 en otros organismos y caracterizar su función y analizar su relación con las proteínas Cornichon, homólogas a Erv14.

10. Apéndice

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos para la clonación del gen *QDR2*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
QDR2-attB1-F	GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAGGAGCAACATC
QDR2-attB2-R	GTACAAGAAAGCTGGGTCATTTACTCCCAGTTCTTG
attB1	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la clonación y secuenciación del gen *PDR12*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Yep PDR12-F	GTACATTATAAAAAAAAAAATCCTGAACTTAGCTAGATATTATGTCTTCGACTGACGAACATATTG
GRU PDR12-R	TAAAGCTCCGGAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTTTTCTTCGTGATTTTATTTTCG
Pdr12_Int F	GGGTGTGAACATTGTGTGGAC
Pdr12_Int R	CAGCAAGTCACCTCCTCCCTC
PDR12-F2	GCCAGGTGCAGGTTGCTCC
PDR12-F3	ACATCCGTCACGGTCGAT
PDR12-F4	CTGGTGTGGATGCCCATGC
PDR12-F5	GCCTTGATGGGTGAATCCG
PDR12-F6	GGTGCCGGTGCCACTGCT

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida de los genes *QDR2* y *PDR12*.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Gen
Interrupción de genes		
ScCQDR2-KanMX-F	AACTCTGCTCTCAAACCTTGAGTACTGCAACGATGGCAGGAGCA	<i>QDR2</i>
ScCQDR2-KanMX-R	TTCCTTTGATTCAAGAAGCTTTACTTCTTAATTTACTCCCAG	<i>QDR2</i>
ScCPDR12-KanMX-F	GTTATTGTTCTTATTAATAAAAAAATGTCTTCGACTGACGAAC	<i>PDR12</i>
ScCPDR12-KanMX-R	CACGAAATACAAATATATTTGCTTGCTTGTTTATTTCTTCGTG	<i>PDR12</i>
Verificación		
U-QDR2-Fw	GTG TCT TGG CTC AGA TGA TG	<i>QDR2</i>
D-QDR2-Rv	GTG AAT CGT GCT GCT AAC TC	<i>QDR2</i>
QDR2 Fw	GCTTGTGCTCAAACGTATGC	<i>QDR2</i>
QDR2 Rv	GATAACGCCGTAAGGTGCGTAG	<i>QDR2</i>
U-PDR12-Fw	ACA ACC ATG GTA CAA GGT AGT	<i>PDR12</i>
D-PDR12-Rv	AAG CCA TTA CTC ACG AGT GG	<i>PDR12</i>
Pdr12_Int_F	GGG TGT GAA CAT TGT GTG GAC	<i>PDR12</i>
Pdr12_Int_R	CAG CAA GTC ACC TCC TCC CTC	<i>PDR12</i>
ScERV14-UP-F1	CCCATTCTCACATTTATC	<i>ERV14</i>
ScERV14-D-R1	TTTCACAGTCATGCTCACCC	<i>ERV14</i>
ScERV14-F2	GCATGGTGCTTTGTCATTAC	<i>ERV14</i>
ScERV14-R2	GATACAGTTGACAACAACAGC	<i>ERV14</i>
		Kan ^r
		Kan ^r

Tabla 4. Componentes que se utilizaron para la mezcla de reacción de PCR

Componente	Cantidad (50 μ l de reacción)	Concentración final
5X Phusion HF Buffer	10 μ l	1X
10 mM dNTPs	1 μ l	200 mM c/u
10 μ M Oligonucleótido	1 μ l	0.5 μ M
10 μ M Oligonucleótido Reverso	1 μ l	0.5 Mm
Templado de DNA	1 μ l	10 ng - 250 ng
5X Betaína	10 μ l	1X
Phusion DNA polimerasa	0.5 μ l	0.05 U/ μ l
H ₂ O	Hasta 50 μ l	-

11. BIBLIOGRAFIA.

1. Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D. & Friant, S. Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 1509–1525 (2015).
2. Greig, D. & Leu, J.-Y. Natural history of budding yeast. *Curr. Biol.* **19**, R886–R890 (2009).
3. Schneiter, R. Genetics , Molecular and Cell Biology of Yeast. *Yeast Genet.* 1–86 (2004).
4. Barlowe, C. K. & Miller, E. a. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**, 383–410 (2013).
5. Morita, M. T. & Shimada, T. The plant endomembrane system--a complex network supporting plant development and physiology. *Plant Cell Physiol.* **55**, 667–71 (2014).
6. Caro, L. G. & Palade, G. E. Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. an Autoradiographic Study. *J. Cell Biol.* **20**, 473–95 (1964).
7. Bonifacino, J. S. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends Cell Biol.* **24**, 3–5 (2014).
8. Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. **116**, 153–166 (2004).
9. Haguenaer-Tsapis, R. & André, B. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation. *Top. Curr. Genet.* **9**, 273–323 (2005).
10. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. & Morgan, D. in *Molecular Biology of the Cell* 695–699 (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2015). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
11. Campbell J. L. and Sheckman R. Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum-derived COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**,

- 837–842 (1997).
12. Sato, K. & Nakano, A. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett.* **581**, 2076–82 (2007).
 13. Votsmeier, C. & Gallwitz, D. An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J.* **20**, 6742–6750 (2001).
 14. Otte, S. & Barlowe, C. The Erv41p-Erv46p complex : multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO J.* **21**, 6095–6104 (2002).
 15. Sato, K. & Nakano, A. Emp47p and Its Close Homolog Emp46p Have a Tyrosine-containing Endoplasmic Reticulum Exit Signal and Function in Glycoprotein Secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2518–2532 (2002).
 16. Miller, E. A. *et al.* Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. *Cell* **114**, 497–509 (2003).
 17. Malkus, P., Jiang, F. & Schekman, R. Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **159**, 915–21 (2002).
 18. Schimmoller, F. *et al.* The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* **14**, 1329–1339 (1995).
 19. Muñoz, M., Nuoffer, C., Hauri, H. & Riezman, H. The Emp24 Complex Recruits a Specific Cargo Molecule into Endoplasmic Reticulum – derived Vesicles. *J. Cell Biol.* **148**, 925–930 (2000).
 20. Castro, C. P., Piscopo, D., Nakagawa, T. & Derynck, R. Cornichon regulates transport and secretion of TGF α -related proteins in metazoan cells. *J. Cell Sci.* **120**, 2454–66 (2007).
 21. Rosas-Santiago, P. *et al.* Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *J. Exp. Bot.*

- 66**, 2733–2748 (2015).
22. Powers, J. & Barlowe, C. Erv14p Directs a Transmembrane Secretory Protein into COPII-coated Transport Vesicles. *Mol. Biol. Cell* **13**, 880–891 (2002).
 23. Bökel, C., Dass, S., Wilsch-Bräuninger, M. & Roth, S. Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF α -like growth factor Gurken. *Development* **133**, 459–70 (2006).
 24. Powers, J. & Barlowe, C. Transport of Axl2p Depends on Erv14p, an ER-Vesicle Protein Related to the. **142**, 1209–1222 (1998).
 25. Nakanishi, H., Suda, Y. & Neiman, A. M. Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **120**, 908–16 (2007).
 26. Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S. & Schuldiner, M. A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biol.* **10**, e1001329 (2012).
 27. Pao, S. S., Paulsen, I. A. N. T. & Saier, M. H. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1–34 (1998).
 28. Jungwirth, H. & Kuchler, K. Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* **580**, 1131–8 (2006).
 29. Piper, P. *et al.* The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* **17**, 4257–4265 (1998).
 30. Holyoak, C. D., Bracey, D., Piper, P. W., Coote, P. J. & Kuchler, K. The *Saccharomyces cerevisiae* Weak-Acid-Inducible ABC Transporter Pdr12 Transports Fluorescein and Preservative Anions from the Cytosol by an Energy-Dependent Mechanism. *J. Bacteriol.* **181**, 4644–4652 (1999).
 31. Hazan, R., Levine, A. & Abeliovich, H. Benzoic Acid , a Weak Organic Acid Food Preservative , Exerts Specific Effects on Intracellular Membrane Trafficking Pathways in *Saccharomyces cerevisiae* Benzoic Acid , a Weak Organic Acid Food Preservative , Exerts Specific Effects on Intracellular

Membr. (2004). doi:10.1128/AEM.70.8.4449

32. Ullah, A., Chandrasekaran, G., Brul, S. & Smits, G. J. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Front. Microbiol.* **4**, 142 (2013).
33. Nygård, Y. *et al.* The diverse role of Pdr12 in resistance to weak organic acids. *Yeast* **31**, 219–232 (2014).
34. Piper, P. W. *Resistance of yeasts to weak organic Acid food preservatives. Advances in applied microbiology* **77**, (Elsevier Inc., 2011).
35. Vargas, R. C. *et al.* Saccharomyces cerevisiae multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells. *Eukaryot. Cell* **6**, 134–42 (2007).
36. Tenreiro, S., Vargas, R. C., Teixeira, M. C., Magnani, C. & Sá-Correia, I. The yeast multidrug transporter Qdr3 (Ybr043c): localization and role as a determinant of resistance to quinidine, barban, cisplatin, and bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 952–9 (2005).
37. Ríos, G. *et al.* Role of the yeast multidrug transporter Qdr2 in cation homeostasis and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Res.* **13**, 97–106 (2013).
38. Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrová, H. & Pantoja, O. Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 67–74 (2016).
39. Louie, R. J. *et al.* A yeast phenomic model for the gene interaction network modulating CFTR- Δ F508 protein biogenesis. *Genome Med.* **4**, 103 (2012).
40. Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F. & Miller, E. a. Sec24 Is a Coincidence Detector that Simultaneously Binds Two Signals to Drive ER Export. *Curr. Biol.* **25**, 403–412 (2015).
41. Gilstring, C. F. & Ljungdahl, P. O. A Method for Determining the in Vivo Topology of Yeast Polytopic Membrane Proteins Demonstrates That

Gap1p Fully Integrates into the Membrane Independently of Shr3p. *J. Biol. Chem.* **275**, 31488–31495 (2000).

42. Guldener, U. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1–6 (1996).
43. Grefen, C. O. P. y H. K. in *Plant Signal Transduction* **479**, 217–233 (2009).
44. Hassett, R., Dix, D. R., Eide, D. J. & Kosman, D. J. The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **351 Pt 2**, 477–84 (2000).