



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

. . .

**Expresión de la NaTrxh y de las mutantes NaTrxh Δ N α y
NaTrxh Δ N α β fusionadas a GFP en *Saccharomyces
cerevisiae***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ANDRE ZARAGOZA GÓMEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAVIER ANDRÉS JUÁREZ DÍAZ**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Zaragoza Gómez Andre

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311123209

2. Datos del tutor

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno

4. Datos del sinodal 2

Dr. Luis Felipe Jiménez García

5. Datos del sinodal 3

Dra. Adriana Muñoz Hernández

6. Datos del sinodal 4

Dra. Karina Jiménez Durán

7. Datos del trabajo escrito

Expresión de la NaTrxh y de las mutantes NaTrxh Δ N α y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ fusionadas a GFP en

Saccharomyces cerevisiae

55 pp.

2018

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Desarrollo de Plantas/Invernadero del Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, UNAM, como parte del Taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*, bajo la dirección del **Dr. Javier Andrés Juárez Díaz** con el financiamiento de los proyectos PAPIIT (IA-204815) y CONACyT (240927). Se recibió la beca por *Apoyo para la formación de Recursos Humanos* del mismo proyecto CONACyT (octubre, 2016 – septiembre 2017).

Agradecimientos

A mi asesor de tesis, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, por tu amistad y por todos tus consejos además de leer el borrador de mi tesis aunque estuviera muy mal escrito. Pasamos muy buenos ratos en estos 2 años y medio. Es cierto que también pasamos malos ratos pero se que los regaños que recibí fueron por mi bien. No tengo palabras para expresarte lo agradecido que estoy contigo, de verdad gracias por darme la oportunidad de trabajar en tu laboratorio

A los sinodales, por todas sus observaciones sobre este trabajo.

A todo el Laboratorio de Desarrollo de Plantas, especial a Judith Márquez, a Mague Collazo, a Sonia Vázquez y al equipo que ahí trabaja.

Al Dr. Felipe Cruz García del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, así como a los miembros de su laboratorio por su apoyo, críticas y comentarios en los seminarios que compartimos. De manera especial, a la M. en C. Yuridia Cruz González Zamora por su apoyo y asistencia técnica.

A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos por su valioso apoyo y asistencia técnica en el Invernadero de la Facultad de Ciencias.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León (Taller de Biología de Plantas I y II), por la asistencia técnica recibida a lo largo del desarrollo de este trabajo, así como su disposición a ayudarnos siempre.

A la Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezno (Taller de Biología Molecular de la Célula), por su asistencia técnica en la transformación de levadura, así como su trato tan cordial hacia nosotros.

A la Dra. Karina Jiménez Durán del Laboratorio de Microscopía confocal, USAII, Facultad de Química, UNAM, por su asistencia técnica, asesoría y apoyo en el trabajo que hicimos juntos para obtener las imágenes de las levaduras.

Al laboratorio de la Dra. Rosario Muñoz Clares (Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM) y a su equipo, especialmente al M. en C. Carlos Mujica por su asistencia técnica y al Q.F.B. Erick Jael Palomo Paz también por sus consejos y guía profesional.

A la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, por su valiosa asistencia técnica.

A Imelda Gómez Islas por tu cariño y tu orientación además de los recursos que me brindaste para concluir mi carrera

A Raúl Zaragoza Medina por tu cariño y los valores que inculcaste en mi además de reparar mi computadora cada vez que la echaba a perder

A Jesús Gómez mi abuelo por su apoyo orientación y los valores que me enseñó día a día

A Guadalupe Islas mi abuela por todo lo que me ofreció desde prepararme algo de comer cuando llegaba en la noche hasta enseñarme a ver el lado gracioso de las cosas, gracias por todo

A Alberto Zaragoza por ayudarme a hacer mi tarea bajando el volumen de lo que estabas viendo y por todos los buenos ratos que hemos tenido

A Pamela alcántara por prestarme tu coche recientemente y por tu apoyo incondicional

A mis tíos Pepe, Pablo y Luis gracias por todo su apoyo y los buenos ratos que hemos pasado

A Fernanda Duarte Quiroga gracias por toda la ayuda en la carrera eres parte fundamental de esta etapa de mi vida y sin ti nada de esto hubiera sido posible

A Frida Abarca por tu amistad incondicional, lo mejor que me pasó en la universidad fue conocerte eres una de las mejores personas que conozco y hemos compartido muchas cosas, espero seguir contando contigo siempre

A Damaris Valencia por los 8 años de amistad que tenemos y las fiestas que hemos pasado juntos

A Ana may y Andrea Leyda López por las cosas locas que pasamos en la preparatoria, fue muy divertido

A mis compañeros de laboratorio, Diana Arzate, Daniel Muro, Yair Rodríguez, Juan Bartolo, Javier Chang, Vera Isabel Martínez, Aldo Caraglio, Víctor Alí, Erick Palomo y por último, pero no menos importante, a Isabel Sánchez. A todos ustedes gracias por los buenos momentos compartidos desde jugar *Age of empires* en nuestros ratos libres hasta las fiestas que hemos pasado juntos, fue muy divertido compartir el laboratorio con ustedes.

A PAPIIT-UNAM (IA-204815) y a CONACyT (240927) por el financiamiento al laboratorio para la realización del proyecto y a CONACyT también por la beca recibida como *Apoyo para la formación de Recursos Humanos* del mismo proyecto (octubre, 2016 – septiembre 2017).

Resumen

Las proteínas de secreción en eucariontes, de manera clásica, contienen un péptido señal ubicado en su extremo amino con un perfil hidrofóbico. Estas características permiten que en cuanto se están traduciendo estas proteínas, son identificadas por la partícula de reconocimiento de señal, dando como resultado la translocación de la proteína nascente al retículo endoplásmico, donde termina la traducción hacia el lumen del mismo. Una vez en el retículo endoplásmico, estas proteínas son dirigidas al aparato de Golgi, a partir del cual, por medio de vesículas de secreción, alcanzan la superficie celular, dando como resultado lo que se conoce como la vía clásica de secreción o vía retículo endoplásmico/Golgi. Sin embargo, se han identificado proteínas que aún sin péptido señal, alcanzan el espacio extracelular, sugiriendo la existencia de vías alternas a la convencional.

La NaTrxh, una tiorredoxina tipo *h* de *Nicotiana glauca*, se localiza en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar a pesar de que no posee un péptido señal. Lo que sí contiene, es una extensión hacia su extremo amino, el cual por análisis *in silico* se divide en dos motivos: el N α y el N β . Por medio de ensayos de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla, se demostró que es el motivo N β el responsable de la secreción de la NaTrxh, esto a pesar de estar entre los residuos Ala-17 y Pro-27 y mostrar un perfil hidrofílico. De manera contrastante, aunque con una $p=0.59$, el algoritmo *Hidden Markov* predice un sitio de corte entre los residuos Ala-16 y Ala-17. A pesar de que en células vegetales el motivo N α no contiene la información para la secreción de la NaTrxh, en este trabajo se evaluó la posibilidad de que otro sistema eucarionte, como lo es *Saccharomyces cerevisiae*, lo reconozca como tal y secrete a la proteína recombinante. Sin embargo, se encontró que no solo *S. cerevisiae* no reconoce a dicho motivo como señal de secreción, sino que en general, no reconoce a la NaTrxh como proteína de secreción, permitiendo sugerir que su secreción sea exclusiva de células vegetales, por lo que muy probablemente existan vías alternas de secreción exclusivas de cada grupo biológico.

Índice general

| | |
|---|----|
| Resumen | i |
| Índice general | ii |
| Introducción | 1 |
| Tiorredoxinas | 1 |
| Características generales de las Trx | 2 |
| Tiorredoxinas de plantas | 3 |
| Tiorredoxinas tipo <i>h</i> | 4 |
| Proteínas de secreción | 4 |
| Vía de secreción no clásica | 7 |
| Antecedentes | 9 |
| Hipótesis | 12 |
| Objetivos | 12 |
| Objetivo general | 12 |
| Objetivos particulares | 12 |
| Materiales y métodos | 13 |
| Material biológico | 13 |
| Amplificación de las fusiones moleculares de la NaTrxh-GFP, NaTrxhΔNα-GFP, NaTrxhΔNαβ-GFP para su colonación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO | 13 |
| Clonación de los genes de fusión en el vector de entrada pENTR/D-TOPO | 17 |
| Transferencia de las fusiones moleculares al vector destino pYES-DEST52 | 19 |
| Transformación de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 21 |
| Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes de fusión | 21 |
| Extracción de proteína total a partir de <i>S. cerevisiae</i> | 22 |
| Cuantificación de proteína | 23 |
| Análisis de las proteínas por SDS-PAGE y ensayo réplica tipo western-blot | 23 |
| Inmunodetección | 24 |
| Observación de las células transformantes de <i>S. cerevisiae</i> por microscopía confocal | 25 |
| Resultados | 26 |
| Corroboración de las construcciones en el vector pEarleyGateway103 | 26 |
| Análisis de las secuencias de las fusiones NaTrxh-GFP, NaTrxhΔNα-GFP y NaTrxhΔNαβ-GFP clonadas en pENTR/D-TOPO | 29 |
| Clonación de los genes de fusión NaTrxh-GFP, NaTrxhΔNα-GFP y NaTrxhΔNαβ-GFP en el vector destino pYES/DEST52 | 32 |
| Análisis de las proteínas recombinantes expresadas en <i>S. cerevisiae</i> | 34 |
| Detección de la fluorescencia de GFP en células de <i>S. cerevisiae</i> | 36 |

| | |
|---|----|
| Discusión | 37 |
| La proteína de fusión NaTrxh-GFP no se secreta en <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| Posibles vías por las que la NaTrxh podría secretarse | 39 |
| La secreción de la NaTrxh parece ser un evento exclusivo de células vegetales | 40 |
| Conclusiones | 43 |
| Perspectivas | 43 |
| Bibliografía | 44 |
| Apéndice 1 | 48 |
| Apéndice 2 | 52 |

Introducción

Tiorredoxinas

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas pertenecientes a la superfamilia de las oxidorreductasas con actividad reductora sobre los puentes disulfuro de sus proteínas blanco. La primer Trx que se identificó fue una de *Escherichia coli* (*E.Coli*) (Black *et al.*, 1960), pero no fue sino hasta cuatro años después, cuando se determinó su actividad reductora, que se les denominó tiorredoxinas (Laurent *et al.*, 1964). Su nombre alude al carácter redox vinculado a la presencia de grupos tiol. Bajo este epígrafe se inició un campo de trabajo que desde inicios del siglo XXI se encuentra en auge (Gutiérrez, 2005).

Debido a la capacidad que tienen las Trx de reducir puentes disulfuro de una gran variedad de proteínas es que participan, como donadoras de electrones, en una gran diversidad de procesos fisiológicos, tales como la regulación enzimática, la respuesta al estrés oxidativo, la regulación de la transcripción y de la traducción (Balmer y Buchanan, 2002), así como en transducción de señales (Haffani *et al.*, 2004).

Para el caso de las Trx vegetales, las funciones descritas también son muy variadas, ya que dependen de la proteína blanco. Como proteínas reguladoras en la transducción de señales se ha demostrado que una Trx, la TRX1 de *Brassica sp.*, interacciona con un receptor específico, el receptor con actividad de cinasa del *locus S* (SRK), regulando así la respuesta del rechazo del polen en el sistema de autoincompatibilidad (AI) de la familia Brassicaceae (Cabrillac *et al.*, 2001; Haffani *et al.*, 2004), Otra función muy específica en plantas en la que una

tiorredoxina está involucrada es en la AI en *Nicotiana glauca*. La NaTrxh es una tiorredoxina que interacciona y reduce *in vitro* a la determinante femenina de este sistema, la S-RNasa (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Esta reducción parece ser fundamental para la respuesta de autoincompatibilidad, ya que la actividad de ribonucleasa aumenta significativamente, mientras que cuando la reducción se lleva a cabo con ditioneol, su actividad se abate (Torres, 2016). Esto, a su vez, indica que además de que la S-RNasa es una proteína blanco de la NaTrxh, la reducción es específica en cuanto a los cuatro posibles puentes disulfuro que posee la enzima (Torres, 2016), aumentando así la importancia del estudio de las tiorredoxinas en sistemas tan complejos bioquímicamente.

Características generales de las Trx

Las Trx son proteínas globulares de aproximadamente 12 kDa, (Jacquot *et al.*, 1997). Las Trx se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, desde procariontes hasta eucariontes, siendo en la mayoría de los casos de codificación nuclear (Gutiérrez, 2005). Hasta la fecha, de las muchas Trx que se han identificado, sus estructuras primarias varían en longitud de los 105 a los 110 residuos de aminoácidos y muestran una identidad del 27 al 69 % (Eklund *et al.*, 1991). Todas las Trx comparten un plegamiento común con una sucesión de elementos estructurales secundarios que incluyen a más del 75% de los residuos de la proteína (Holmgren, 1985). Los miembros de esta familia se caracterizan por tener en su sitio activo la secuencia típica WCGPCK (Laloi *et al.*, 2001). Cuando las Trx se reducen [Trx-(SH)₂], son capaces de romper los puentes disulfuro de un

gran número de proteínas blanco, lo que les permite participar en varias reacciones reductoras como donadoras de electrones (Balmer y Buchanan, 2002). Cuando la Trx ha llevado a cabo su función reductora, queda inevitablemente en estado oxidado (Trx-S₂), necesitando un agente externo que sea capaz de regenerar su estado Trx-(SH)₂. La gran mayoría de las Trx se reducen por los electrones provenientes del NADPH a través de la tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (NTR), conformando así un sistema de reducción presente en el citoplasma denominado NADPH/NTR/Trx (Johnson *et al.*, 1987). Existen otras Trx, principalmente las de cloroplasto (las de tipo *m* y *f*), que se reducen por medio de la ferredoxina, lo cual ocurre en algunos organismos fotosintéticos (Barajas *et al.*, 2007).

Tioredoxinas de plantas

Las Trx en plantas forman un grupo muy complejo, ya que tan solo en las plantas terrestres se conocen hasta la fecha alrededor de 50 genes que codifican este tipo de proteínas (Meyer *et al.*, 2008; 2009; Meyer *et al.*, 2012). Basándose en su estructura primaria, las Trx vegetales se clasifican en 8 tipos diferentes. Los tipos *m*, *x*, *y*, *f* y *z* se localizan en el cloroplasto, las del tipo *o* en la mitocondria, las del *s* se asocian comúnmente al retículo endoplásmico (RE) y las Trx tipo *h* que, aunque originalmente se describieron como proteínas citoplásmicas, algunas se han encontrado en la mitocondria y en el apoplasto (Laloi *et al.*, 2001; Gelhaye *et al.*, 2002; Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

El primer sistema de Trx que se descubrió en plantas fue el sistema cloroplastídico y las Trxs pertenecientes a este sistema se separaron en dos grupos: *m* y *f*

(Gutiérrez, 2005). En *A. thaliana* existen dos genes de Trx f (Meyer *et al.*, 2002) y su denominación se debe a su alta capacidad para reducir y activar a la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cloroplastídica (Gutiérrez, 2005). El nombre de la Trx m deriva de su blanco principal, la malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺.

Tiorredoxinas tipo h

Las Trx tipo *h* (Trx *h*) se dividen en tres subgrupos. En general, las Trx *h* son un poco más largas que las Trx de *E. coli* y, de acuerdo con los análisis de las secuencias, se propone que están mucho más relacionadas con la Trx humana que con la de *E. coli* (Schürmann y Jacquot, 2000). Con respecto a las del subgrupo 2, estas se caracterizan por poseer extensiones hacia el extremo amino y/o carboxilo.

Las Trx *h* carecen de un péptido de tránsito y/o señal, por lo que se asumían como proteínas citosólicas (Meyer *et al.*, 1999). Sin embargo, en *oryza sativa* y en otras plantas se ha encontrado que las Trx *h* también están presentes en el floema, al cual lo alcanzan por medio de su movilidad a través de los plasmodesmos (Ishiwatari *et al.*, 1995), en mitocondrias (Gelhaye *et al.*, 2004) o inclusive en el espacio extracelular (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Proteínas de secreción

Si se considera a la célula eucarionte como un sistema de membranas y compartimentos membranosos, donde se realizan distintas funciones en virtud de sus composiciones proteicas particulares, surge la pregunta sobre cómo se destinan las proteínas después de su síntesis en los ribosomas a sus respectivos

sitios de función. Más de 30 años de investigación revelan que la información genómica específica no sólo la actividad de las distintas proteínas sino también el sitio donde se debe llevar a cabo dicha función (González, 2007).

Una vez que la proteína se traduce en los ribosomas, esta puede permanecer en la parte soluble del citoplasma (citosol), dirigirse a la mitocondria, al cloroplasto, al núcleo o enviarse a la membrana plasmática o a otros organelos, tales como lisosomas, vacuolas y peroxisomas, entre otros (Ureña y Arribas, 2000).

En 1970 se descubrió el primer péptido señal en la historia, el cual se ubica en la región amino terminal de la proteína (Blobel y Dobberstein, 1975). Actualmente, se cuenta con varios péptidos señal identificados, los cuales tienen un tamaño promedio de 15 a 60 residuos de aminoácidos. El péptido señal dirige a la proteína que se está traduciendo al RE, donde generalmente se elimina. (Thanassi *et al.*, 2005).

El RE es una estructura membranosa presente en las células eucariontes que se encuentra rodeando al núcleo, de hecho, es una extensión de la membrana externa de la envoltura nuclear. Al llevarse a cabo la traducción de una proteína con péptido señal, este es reconocido por la partícula de reconocimiento del péptido señal (SRP). SRP dirige a la proteína naciente junto con el ribosoma al RE, donde se encuentra el receptor de SRP (SRPR), se produce una interacción entre el péptido señal de la proteína naciente y los receptores específicos del RE, provocando que la traducción de la proteína se lleve a cabo hacia el lumen del mismo. Este proceso es dependiente de ATP (Blobel y Dobberstein, 1975; Sudhof, 1995).

A las proteínas que se traducen en el RER se les elimina el péptido señal en cuanto inicia su síntesis hacia el lumen del mismo y, en muchas ocasiones, además, son también blanco de modificaciones co-traduccionales y post-traduccionales, tales como la adición de residuos de carbohidratos (glicosilación) (Alberts *et al.*, 2013). Los carbohidratos añadidos en el RE (glicosilación central) se modifican en cada uno de los compartimentos del aparato de Golgi (AG) en un proceso denominado glicosilación terminal. Se asume que el RER es una estación de control de calidad que impide que las proteínas plegadas incorrectamente (*i. e.* no funcionales), progresen a través de la vía secretora, el cual incluye al AG. Finalmente, las proteínas de secreción se dirigen por vesículas secretoras a la membrana plasmática (Ureña y Arribas, 2000).

El transporte de las proteínas desde el RE al AG y, finalmente, al espacio extracelular, es conocida como la vía clásica de secreción RE/Golgi (Nombela *et al.*, 2006) y tiene lugar mediante la formación de unas vesículas de transporte que se producen en el RE y se fusionan con la membrana del AG en un proceso en el que participan proteínas evolutivamente conservadas en todos los eucariontes (Ureña y Arribas, 2000).

La regulación del tráfico de proteínas en la célula ocurre principalmente en la membrana de las vesículas, donde existen complejos proteicos que se adosan a membranas específicas y proveen la fuerza mecano-química que provoca la curvatura necesaria de la membrana para generar una vesícula de transporte. Los complejos generadores de vesículas que se conocen hasta el momento son la clatrina (en la red *trans* del AG y en la membrana plasmática), el complejo COP-I (en Golgi) y el complejo COP-II (en el RE) (González, 2007).

El complejo COP-I por lo general está presente en las vesículas que se mueven entre las cisternas del AG y las que se dirigen al RE, como también las vesículas que por secreción constitutiva van a fusionarse con la membrana plasmática. Por su parte, la cubierta COP-II es una envoltura muy selectiva que se forma en las vesículas que emergen del elemento transicional del RER cargados de vesículas y se fusionan en el agregado túbulo vesicular y posteriormente, a la red *cis*-Golgi (Zanetti *et al.*, 2012).

Vía de secreción no clásica

La mayoría de las proteínas de secreción generadas en una célula entran al RE que, entre otras funciones, se encarga de conducir los diversos productos resultantes de la actividad sintetizadora de la célula.

Después, la secuencia que corresponde al péptido señal se elimina (*i. e.* sin péptido señal) se conduce al AG, donde las proteínas se clasifican y se empaquetan en compartimentos especiales de transporte. Estos compartimentos se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido, constituyendo así lo que se conoce como la vía clásica o convencional de secreción de proteínas en la célula o simplemente como la vía RE/Golgi (Jiménez y Merchant, 2003).

Hay muchas proteínas que alcanzan el medio extracelular a pesar de carecer de un péptido señal y otras que a pesar de contenerlo, no se secretan por la vía convencional, es decir, salen del RE en vesículas que no están recubiertas por COPII y al parecer evitan el AG, ya que las células las secretan a pesar de haber sido tratadas con brefeldina A (BFA) (Ritzenthaler, *et al.*, 2002; Nombela, *et al.*, 2006), el cual actúa como inhibidor potente del reclutamiento a la membrana del

pequeño factor de ADP-ribosilación 1 de GTPasa (ARF1), que es el primer paso en la formación de vesículas revestidas con COPI a partir de la membrana de Golgi (Helms y Rothman, 1992). Las vesículas revestidas con COPI median el transporte retrógrado de enzimas residentes en el AG y de vuelta al RE (Rabouille y Klumperman, 2005), pero posiblemente también están implicadas en el transporte anterógrado de las proteínas de carga en el aparato de Golgi (Pelham y Rothman, 2000).

Antecedentes

El sistema de autoincompatibilidad (AI) en *N. alata* está regulado por un *locus* multialélico denominado S. En este *locus* se encuentran codificados los dos genes que determinan la especificidad alélica para el rechazo del polen propio (McClure y Franklin-Tong, 2006). Estos genes son las determinantes S, que en el caso de la determinante femenina es una enzima con actividad de ribonucleasa, la S-RNasa (McClure *et al.*, 1989), y en el de la masculina es una proteína con caja F, denominada SLF (Lai *et al.*, 2002). Buscando genes no ligados al *locus* S involucrados en el proceso de AI en *N. alata*, se identificó un gen que se expresa más en estilos de *N. alata* (especie autoincompatible) que de *N. plumbaginifolia* (autocompatible), sugiriendo su posible involucramiento en el sistema del rechazo del polen alelo S específico (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011). Este gen codifica una proteína de 16.8 kDa cuya estructura primaria deducida a partir del cDNA contiene el sitio activo típico de las Trx. Su caracterización bioquímica indica que efectivamente se trata de una Trx y el análisis de su estructura primaria la agrupa dentro de las Trx tipo *h* del subgrupo 2 y se le nombró NaTrxh (Na: *Nicotiana alata*; Trx: tiorredoxina; h: es del tipo *h*) (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Al caracterizar a la NaTrxh, se encontró que es una proteína de secreción, siendo así la primera Trx vegetal cuya localización es extracelular, demostrando además, que la estructura primaria de la NaTrxh contiene la información suficiente para dirigir su secreción (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Una característica de las Trx *h* que están dentro del subgrupo 2 es que poseen una extensión hacia el extremo amino y/o carboxilo. El extremo amino de la

NaTrxh abarca hasta la posición Pro-27. El algoritmo *Hidden Markov* (Bendtsen *et al.*, 2004) predice un sitio de corte entre los sitios Ala-16 y Ala-17, sugiriendo un posible péptido señal en lo que se denomina el motivo N α (Met-1 a Ala-16) con una probabilidad de 0.59 (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Sin embargo, al expresar a la mutante sin este motivo, la NaTrxh Δ N α , la proteína se sigue localizando en el apoplasto, indicando que el motivo N α no es el responsable de su localización extracelular. De manera interesante, la mutante sin el extremo amino completo (NaTrxh Δ N $\alpha\beta$), es decir sin los residuos de la Met-1 a Pro-27 se localiza en el citoplasma (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), indicando que los residuos de aminoácidos comprendidos entre Ala-17 y Pro-27, llamado motivo N β , es el responsable de su localización en el apoplasto, lo cual se demostró fusionando estos 11 residuos a la proteína GFP y, por medio de ensayos de expresión transitoria en células de epidermis de *Allium cepa*, se encontró que la fluorescencia se localiza fuera de la célula (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Aparentemente, el motivo N β es exclusivo de sistemas vegetales, ya que solo se encontraron 2 Trx con secuencias similares al motivo N β . Ambas proteínas, Trxh1 y Trxh2 de *Glycine max*, de manera interesante, se encuentran asociadas a la membrana plasmática (Shi y Bhattacharyya, 1996).

Debido a las características fisicoquímicas del motivo N β , tales como su posición inusual en la estructura primaria de la NaTrxh y su alto perfil hidrofílico, se sugiere que la NaTrxh sigue una vía de secreción no clásica. De hecho, otro algoritmo, *Secretome* (Bendtsen *et al.*, 2004) predice que la NaTrxh se secreta por una vía no convencional ($p=0.87$), ya que la compara con la Trx1 de humano que se sabe usa esta vía para alcanzar el torrente sanguíneo (Wollman *et al.*, 1988; Juárez-

Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, se sabe que la secreción de la NaTrxh utiliza los elementos de la vía convencional (RE, AG y vesículas de secreción) (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), de tal manera que es posible sugerir que su reconocimiento como “tipo péptido señal” sea por un factor diferente a SRP.

Debido a que las evidencias sugieren que el motivo N β es exclusivo de organismos vegetales y a las contradicciones en los algoritmos que predicen el posible péptido señal y la ruta que este seguirá, es importante estudiar el motivo N α para demostrar si funciona como péptido señal en otro organismo eucarionte, ya que si este motivo es interpretado como señal de secreción en otro organismo, permitirá sugerir que los mecanismos de secreción entre las plantas y otros eucariontes, como los hongos, no están conservados.

Saccharomyces cerevisiae es un eucarionte que presenta proteínas que se secretan a la superficie celular para integrarse en la estructura de la pared celular o exportarse al medio externo. La secreción de muchas de estas proteínas es a través de la vía clásica, impulsada por un péptido señal canónico ubicado en el N-terminal. Sin embargo, se han identificado diversas proteínas de superficie y localización extracelular que carecen de algún péptido señal; inclusive en *S. cerevisiae* también se han encontrado proteínas típicamente citoplásmicas en el espacio extracelular, tales como la fosfogliceratocinasa 1 (PGK1) y la enolasa (ENO). Algunas proteínas incluso pueden acceder a la superficie de la célula y permanecer unidas débilmente a la pared. De estos tipos de proteínas, al menos 17 se han encontrado en la superficie celular de *S. cerevisiae* a pesar de carecer de un péptido señal convencional (Nombela *et al.*, 2006).

Hipótesis

El motivo N α no es fundamental para la secreción de la NaTrxh en células vegetales, por lo que seguramente tampoco lo será en *S. cerevisiae* a pesar de que se predice como posible péptido señal.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si el motivo N α de la NaTrxh participa en su secreción en *S. cerevisiae*.

Objetivos particulares

- Expresar a la NaTrxh recombinante y a las mutantes NaTrxh Δ N α y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ en células de *S. cerevisiae* fusionadas a GFP.
- Determinar la localización celular de la GFP fusionada a la NaTrxh y a las distintas mutantes en las células de *S. cerevisiae*.

Materiales y métodos

Material biológico

Todas las construcciones moleculares primero se subclonaron en células de *Eshcerichia coli* TOP10, la cual es ideal para la clonación y la propagación de diversos plásmidos. Con respecto a las células de *Saccharomyces cerevisiae*, se usó la cepa diploide InvSc1 (Invitrogen), la cual es de rápido crecimiento e ideal para la sobreexpresión de genes heterólogos. Además, entre otras características, es una mutante auxótrofa a uracilo, lo cual permite seleccionar a las células transformantes con el plásmido de expresión pYES-DEST52 porque éste contiene el gen *URA3*, capaz de complementar su auxotrofia a uracilo.

Amplificación de las fusiones moleculares de la NaTrxh-GFP, NaTrxh Δ N α -GFP y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -GFP para su clonación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

En el laboratorio se cuenta con las secuencias de las diferentes versiones de la NaTrxh clonadas en el vector binario pEarleyGateway103 (pEG103) (Earley *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), las cuales fueron donadas por el Dr. Felipe Cruz García (Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM). En este vector, la secuencia que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) está localizada de tal manera que se fusiona hacia el extremo 3' del gen de interés. Estas construcciones se usaron como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada uno de los genes de fusión a GFP (*i. e.* *NaTrxh-GFP*, *NaTrxh Δ N α -GFP* y *NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -GFP*).

Primero se corroboraron por PCR cada una de las construcciones en pEG103, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos en sentido NaT-F1 para la NaTrxh, NaT-F2 para la NaTrxh Δ N α y NaT-F3 para la NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ y los antisentido (NaT-R y GFP-R), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1. La posición en donde

se alinea cada uno de los oligonucleótidos se muestra en la Figura 1. En este análisis se usó la enzima *TEMPase Hot Start DNA Polymerase* (Ampliqon), la cual genera productos de amplificación con una alta especificidad, además de detectar un número bajo de copias del molde y tiene un residuo químico que se une a la enzima en el sitio activo, lo que hace que permanezca inactiva a temperatura ambiente, hasta alcanzar la temperatura ideal para comenzar la reacción y evitar errores en la polimerización. Los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 4 y las condiciones de amplificación en la Tabla 5.

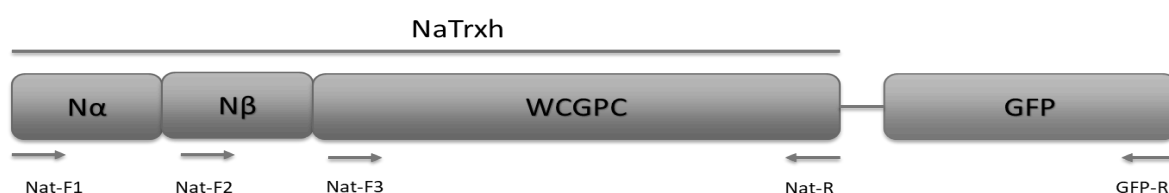


Figura 1. Esquema de la estructura primaria de la NaTrxh con sus diferentes motivos, fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) mostrando los sitios donde se alinean los diferentes oligonucleótidos en sentido (NaT-F1, NaT-F2 y NaT-F3) y los antisentido (NaT-R y GFP-R) empleados para la amplificación por PCR de las fusiones *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα-GFP* y *NaTrxhΔNαβ-GFP*. Nα: motivo que comprende de la Met-1 a la Ala-16; Nβ: motivo que abarca de la Ala-17 a la Pro-27; WCGPC: sitio activo de la tiorredoxina.

Tabla 1. Oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación y análisis por PCR de las fusiones *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα-GFP* y *NaTrxhΔNαβ-GFP*. Los oligonucleótidos en sentido (con la letra F en su nombre) contienen la secuencia CACC en el extremo 5', el cual se utiliza para la clonación directa del producto de amplificación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO; además, a los NaT-F2 y NaT-F3 se les adicionó el codón de inicio inmediato a la secuencia CACC. El oligonucleótido en antisentido NaT-R no contiene la secuencia correspondiente al codón de término de la NaTrxh; mientras que el GFP-R sí lo contiene para el término de la traducción de la proteína de fusión.

| Nombre | Tamaño (nt) | Secuencia (5' – 3') |
|--------|-------------|--------------------------------------|
| NaT-F1 | 31 | CACCATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCG |
| NaT-F2 | 31 | CACCATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCG |
| NaT-F3 | 35 | CACCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTG |
| NaT-R | 36 | TTGGACATGAAATTTAGTTCGATAATTACTAGCAGC |
| GFP-R | 30 | TCACACGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTAGC |

Para la clonación de los genes de fusión a GFP (*NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα* y *NaTrxhΔNαβ*) en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen) (pENTR) es necesario que éstos contengan extremos romos, por lo que para obtenerlos de

esta manera se utilizó la enzima *Phusion Hot Start Flex* (New England BioLabs), la cual es una DNA polimerasa de alta fidelidad (con una tasa de error de hasta 50 veces menor con respecto a la *Taq* DNA polimerasa), termina la polimerización en extremos romos y, además, presenta un ligando específico unido reversiblemente que inhibe la actividad de DNA polimerasa a temperatura ambiente, lo cual evita amplificaciones inespecíficas. En la Tabla 2 se muestran los componentes de la reacción y la concentración de cada uno de estos para el ensayo de PCR; en la Tabla 3 se muestran las condiciones de PCR que se utilizaron para amplificar las fusiones *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα-GFP* y *NaTrxhΔαβ-GFP* usando como molde las construcciones pEG103:NaTrxh, pEG103:NaTrxhΔNα y pEG103:NaTrxhΔNαβ, respectivamente.

Otro aspecto importante para la clonación correctamente orientada de los productos de amplificación en el vector pENTR es que deben tener en su extremo 5' la secuencia CACC, razón por la cual todos los oligonucleótidos en sentido la contienen (Tabla 1).

Tabla 2. Componentes y concentración de los reactivos para los ensayos de PCR utilizando la *Phusion Hot Start Flex* (New England BioLabs)

| Componente | Concentración final |
|---|---------------------|
| Mezcla de amortiguador con la enzima 5X | 1X |
| dNTPs 10 mM | 200 μM |
| Oligonucleótido A | 0.5 μM |
| Oligonucleótido B | 0.5 μM |
| DNA molde | 0.5 μl |

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizando a la *Phusion Hot Start Flex* (New England BioLabs)

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Número de ciclos |
|---------------------------|------------------|--------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 98 | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98 | 10 s | |
| Alineamiento | 60 | 10 s | 35 |
| Extensión | 72 | 15 s | |
| Extensión final | 72 | 5 min | 1 |

Los análisis de las fusiones ya clonadas se realizó por PCR usando la enzima DNA polimerasa *TEMPase Hot Start* (Ampliqon) como se muestra en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Componentes y concentración de PCR utilizado en la DNA polimerasa *TEMPase Hot Start* (Ampliqon)

| Componente | Concentración |
|-------------------------|--------------------|
| TEMPase 2X Master Mix | 1X |
| 25 mM MgCl ₂ | 1.5 mM (0.5 - 5mM) |
| oligonucleótido A | 0.5 μM |
| oligonucleótido B | 0.5 μM |
| DNA molde | 0.5 μl |

Tabla 5. Condiciones de PCR utilizado en la DNA *TEMPase Hot Start* (Ampliqon)

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Número de ciclos |
|---------------------------|------------------|---------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 15 min | 1 |
| Desnaturalización | 98 | 30 s | |
| Alineamiento | 60 | 30 s | 35 |
| Extensión | 72 | 1.5 min | |
| Extensión final | 72 | 5 min | 1 |

Clonación de los genes de fusión en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

Los productos de amplificación por PCR usando la enzima *Phusion Hot Start Flex*, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a partir del cual, una vez corroborado que los productos tenían el tamaño esperado, en promedio 1215 pb, se purificó cada uno por separado usando el kit *Min Elute Gel Extraction Kit* (Qiagen), cuyo protocolo se describe en el Apéndice 1.

Cada uno de los insertos purificados a partir de gel se clonaron en el vector pENTR (Figura 2) incubando la siguiente reacción a 22°C por al menos 12 h.

1. 0.5 µl de solución salina (NaCl 1.2M)
2. 1 µl de producto de PCR purificado de gel
3. 0.5 µl del vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen)
4. 1 µl de agua estéril

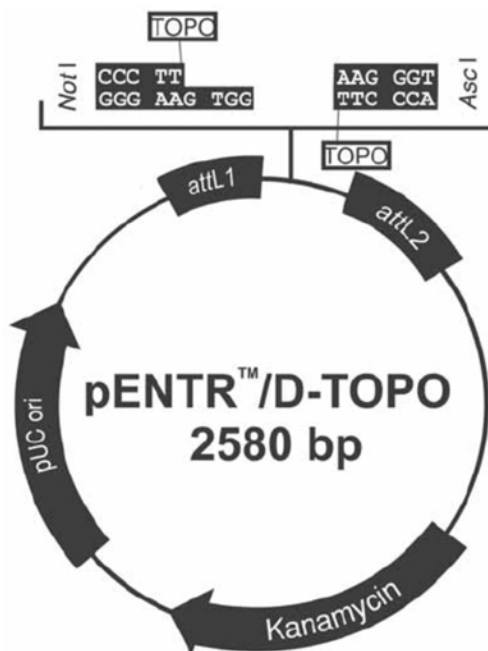


Figura 2. Esquema del vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Este plásmido contiene gen que confiere resistencia a kanamicina, el origen de replicación bacteriano (pUC ori) y los sitios de recombinación *attL1* y *attL2* necesarios para la posterior transferencia del inserto al vector destino, que en el caso de este trabajo, se usó el pYES-DEST52.

Una vez finalizada la incubación, la mezcla de reacción se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *E.coli* TOP10 (preparadas como se detalla en el Apéndice 1), por choque térmico siguiendo el protocolo que se describe en el Apéndice 1.

Las colonias que crecieron en el medio selectivo se aislaron y cultivaron en medio LB líquido con una concentración de 100 µg/ml de kanamicina. A partir de cada cultivo se tomaron alícuotas de 0.5 µl y se analizaron por PCR siguiendo las condiciones de las Tablas 4 y 5 con la finalidad de probar que contuvieran el gen de interés, es decir la fusión *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα-GFP* o *NaTrxhΔNαβ-GFP*. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Al obtener los resultados esperados con respecto al tamaño de cada una de las fusiones moleculares usando los distintos pares de oligonucleótidos (Tabla 1 y Figura 1), se purificó el DNA plasmídico de cada una de éstas a partir de un cultivo de 5 ml de *E. coli* TOP10 transformante.

Para la purificación del DNA plasmídico a partir de células de *E.coli* se usó un kit de purificación de plásmido (Qiagen), tal y como se describe en el Apéndice 1.

Finalmente, se obtuvieron las secuencias de las fusiones moleculares en cada una de las construcciones (pENTR:NaTrxh-GFP, pENTR:NaTrxhΔNα-GFP y pENTR:NaTrxhΔNαβ-GFP), para lo cual se hizo uso del servicio de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. De esta manera fue posible comprobar por un alineamiento con la secuencia de la NaTrxh (NCBI; número de acceso DQ021448.1) que no presentaran alguna mutación que pudiera influir en los experimentos de manera directa, interfiriendo con los resultados, así como también que la fusión a GFP estuviera en el marco de lectura correcto.

Transferencia de las fusiones moleculares al vector destino pYES-DEST52

Una vez que se obtuvo el resultado esperado a partir del análisis de las secuencias de cada una de las construcciones moleculares en el vector de entrada, se transfirieron los genes de fusión *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNaα-GFP* y *NaTrxhΔNaβ-GFP* al vector de expresión para levadura pYES-DEST52 (Figura 3) por medio de una reacción de recombinación tipo *LR*.

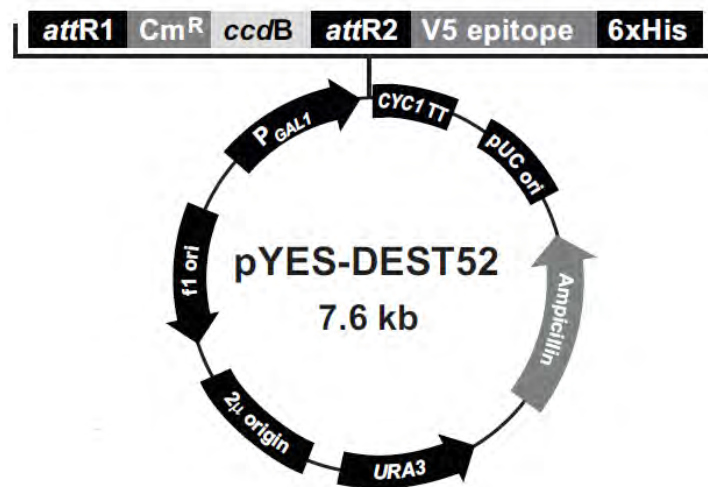


Figura 3. Esquema del vector pYES-DEST52 (Invitrogen). Este plásmido “destino” contiene el gen que *URA3*, complementando así la auxotrofia a uracilo de las levaduras *INVSc1*. Además, contiene el gen que confiere la resistencia a ampicilina y los sitios *attR1* y *attR2*, necesarios para la recombinación con el vector de entrada y así la inserción de la secuencia de interés.

Para clonar las diferentes construcciones en el vector de expresión de levadura pYES-DEST52 se empleó la tecnología Gateway. El sistema de clonación Gateway, comercializado por Invitrogen desde finales de la década de los 90, es un método que permite transferir eficientemente fragmentos de DNA entre plásmidos utilizando un conjunto patentado de secuencias de recombinación, los sitios "Gateway *att*", y dos mezclas patentadas de enzimas, llamadas "LR

Clonase" o "BP Clonase". el procedimiento para llevar a cabo la reacción es el siguiente.

Agregar los siguientes componentes a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml a temperatura ambiente y mezclar.

- Vector de entrada (100-300 ng) 2 μ l
- Vector de destino (150 ng/ μ l) 1 μ l
- Amortiguador de reacción 5X 2 μ l
- Amortiguador TE (Apéndice 2), pH 8.0 3 μ l

Retirar la mezcla de *LR Clonase* de una temperatura de -80°C y dejar descongelando en hielo por 2 min, después mezclar brevemente de forma vigorosa y continuar con el siguiente protocolo.

1. Agregar 4 μ l, de mezcla de enzimas *LR Clonase* e incubar 3 horas a 25°C
2. Adicionar 1 μ l de proteinasa K, mezclar brevemente de forma vigorosa e incubar 10 minutos a 37°C
3. Continuar con la transformación de células *E.coli* TOP10 mediante choque térmico agregando 2 μ l del producto final del paso 4 y siguiendo el protocolo descrito anteriormente, solo que en este caso la selección de las células transformantes se hizo por medio de su capacidad de crecer en un medio selectivo con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$

Las colonias obtenidas en el medio selectivo, fueron aisladas y cultivadas en medio LB líquido con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. De cada cultivo se tomaron 0.5 μ l y se analizó por PCR (Tabla 5) para verificar que además de ser transformantes (*i. e.* resistentes a ampicilina), contuvieran el gen de interés,

es decir, los genes de fusión *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα-GFP* o *NaTrxhΔNαβ-GFP*. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Transformación de células de *Saccharomyces cerevisiae*

Una vez confirmadas por PCR las fusiones moleculares en el vector destino pYES-DEST52, los plásmidos purificados se utilizaron para la transformación de *S. cerevisiae* INVSc1 (Apéndice 1).

De las colonias capaces de crecer en medio selectivo SC-U (*i. e.* sin uracilo; Apéndice 2), se seleccionaron 5 colonias de cada construcción, las cuales se inocularon en medio SC-U con 20% de glicerol y almacenadas a -80°C.

Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes de fusión

El plásmido pYES-DEST52 contiene al promotor *GAL1* (Figura 3), el cual se induce con galactosa en ausencia de glucosa. Por lo tanto, para la sobreexpresión, se crecieron las células transformantes en un medio mínimo sin uracilo (SC-U) con galactosa al 2% (w/v) y rafinosa al 1% (w/v) como fuentes de carbono. Para sobreexpresar las diferentes proteínas recombinantes, *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhNΔα-GFP* y *NaTrxhNΔαβ-GFP*, se siguió la metodología que a continuación se describe.

1. Inocular 15 ml de medio selectivo SC-U con glucosa como fuente de carbono e incubar toda la noche a 30°C con agitación

2. Determinar la DO_{600} del cultivo y calcular la cantidad necesaria para inocular 50 ml de medio de inducción, de tal manera que quede a una DO_{600} de 0.4
3. Remover la cantidad de cultivo que se determinó en el paso 2 y centrifugar a 4500 rpm por 5 min a 4°C y decantar
4. Resuspender las células en 1-2 ml de medio de inducción y repetir el paso 3 y 4 una vez más
5. Inocular 50 ml de medio de inducción
6. Recolectar una alícuota de células a las 0, 6 y 12 h. Para el tiempo 0 se tomaron 15 ml de muestra, para los tiempos 6 y 12 h se tomaron alícuotas de 10 ml de cada uno; a todas las alícuotas se les determinó la DO_{600}
7. Centrifugar las células a 4500 rpm por 5 min a 4° C
8. Decantar el sobrenadante. Resuspender las células en 500 μ l de agua estéril
9. Transferir las células a un tubo estéril de 1.5 mL. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 s
10. Decantar y almacenar el botón a -80°C hasta su uso

Extracción de proteína total a partir de *S. cerevisiae*

La lisis celular se puede realizar a partir de células frescas o células congeladas, en cualquier caso el protocolo fue el siguiente.

1. Resuspender el botón celular en 500 μ l de amortiguador de ruptura.
Centrifugar a 4500 rpm x 5 min 4°C

2. Remover el sobrenadante y resuspender las células en un volumen de amortiguador de ruptura para obtener una DO_{600} de 50-100
3. Agregar un volumen igual de perlas de vidrio
4. Mezclar vigorosamente la mezcla durante 30 s, seguidos de 30 s en hielo. Repetir este paso 4 veces
5. Centrifugar la muestra a 15,000 rpm por 10 min
6. Remover el sobrenadante y transferirlo a un tubo limpio de 1.5 ml

Nota: el lisado de las células puede almacenarse a -20°C por un máximo de 2 semanas para evitar degradación de las proteínas

Cuantificación de proteína

La determinación de la cantidad de proteína en los extractos crudos se hizo mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), usando diferentes diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La relación reactivo de Bradford (BioRad):solución de proteína fue de 5:1 y se determinó la A_{595} .

Análisis de las proteínas por SDS-PAGE y ensayo réplica tipo western-blot

Las proteínas de los extractos crudos se separaron mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5%. En esta técnica, las proteínas primero se solubilizan con el amortiguador de muestra, el cual contiene como agente desnaturizante al dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2.5% y como agente reductor al ditionitrotol (DTT) a 0.1M. Para lograr una desnaturización completa de las proteínas, la solución se incubó por 5 min a

95°C. Finalmente, se deja a temperatura ambiente para aplicar la muestra pretratada al gel, de tal manera que ni la estructura tridimensional de las proteínas ni su punto isoeléctrico influyen en su migración electroforética, separándose así únicamente en función de su masa molecular.

De cada muestra o fracción se cargaron 25 µg de proteína total para su análisis por electroforesis. Cada gel se hizo por duplicado, de tal manera que al finalizar la electroforesis, uno sirvió para teñir a las proteínas con azul brillante de Coomassie y el otro para la transferencia tipo western-blot.

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por los anticuerpos, primero se transfieren desde el gel de poliacrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) por electrotransferencia (Apéndice 1).

Inmunodetección

La inmunodetección de las proteínas de fusión NaTrxh-GFP, NaTrxhNΔα-GFP y NaTrxhNΔαβ-GFP se hizo después de la transferencia tipo western-blot siguiendo la metodología que a continuación se describe.

1. Enjuagar la membrana con agua por 30 s
2. Bloquear la membrana con solución de bloqueo (Apéndice 2) por 2 h
3. Agregar el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo e incubar con agitación suave a temperatura ambiente por 12 h. En el caso del anti-GFP se usó un título de 1:10,000; mientras que con el anticuerpo anti-NaTrxh fue de 1:2,500.

4. Desechar la solución con el anticuerpo y realizar dos lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS; Apéndice 2) frío (el primero por 5 min y el segundo por 10 min; cuando se indique, este segundo lavado se hizo con PBS + NaCl 15 mM).
5. Sumergir la membrana con el anticuerpo secundario (anti-conejo con fosfatasa alcalina conjugada) diluido en solución de bloqueo a un título de 1:10,000 por 2 h
6. Realizar 3 lavados de 10 min cada uno con PBS frío
7. Lavar por 10 min con una solución de Tris·HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M y MgCl₂ 0.05 M, pH 9.5.
8. Agregar el sustrato de la fosfatasa nitroazul de tetrazolio + 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (nBT + BCIP) para revelar.

Observación de las células transformantes de *S. cerevisiae* por microscopía confocal

Para la observación de células transformantes de *S.cerevisiae*:

1. se preparó un preinoculo en 15 ml en medio SC-U (glucosa) incubando toda la noche a 30°C a 250 rpm
2. Determinar la DO₆₀₀ del cultivo y calcular la cantidad necesaria para inocular 10 ml de medio de inducción, de tal manera que quede a una DO₆₀₀ de 0.4
3. Inducir por 12 horas a 30°C a 250 rpm

- Centrifugar los 10 ml de cultivo pasadas las 12 horas, retirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de ml de medio de inducción

Se colocó 10 μ l de cada muestra en un portaobjetos y se observó en el microscopio confocal a una longitud de onda de excitación 488 nm

Resultados

Corroboración de las construcciones en el vector pEarleyGateway103

Se determinó que las construcciones pEG103:NaTrxh, pEG103:NaTrxh Δ N α y pEG103:NaTrxh Δ $\alpha\beta$, donadas por el laboratorio del Dr. Cruz García (Facultad de Química, UNAM), efectivamente fueran las correctas. Para esto, se realizó una amplificación por PCR usando cada una como molde y tres pares de oligonucleótidos por separado, usando los diferentes oligonucleótidos en sentido con el antisentido NaT-R (Tabla 4).

| | Control | | | NaTrxh-GFP | | | NaTrxh Δ N α -GFP | | | NaTrxh Δ $\alpha\beta$ -GFP | | |
|--------------|---------|---|---|------------|---|---|---------------------------------|---|---|------------------------------------|---|---|
| NaTF1 + NaTR | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| NaTF2 + NaTR | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - |
| NaTF3 + NaTR | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + |

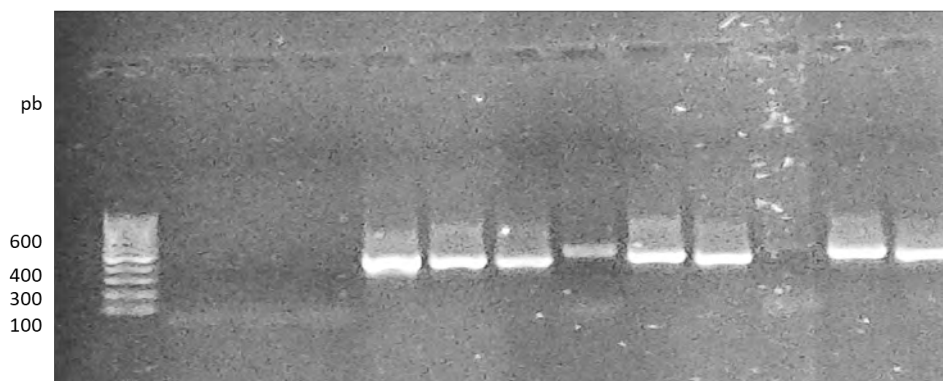


Figura 4. Análisis por PCR de las construcciones donadas por el laboratorio del Dr Felipe Cruz pEG103: NaTrxh, pEG103:NaTrxh Δ N α y pEG103:NaTrxh Δ $\alpha\beta$. Para este análisis se utilizaron los oligonucleótidos en sentido NAT-F1, NAT- F2 o NAT-F3 con el antisentido NAT-R. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y el DNA se tiñó con SYBR-green.

El resultado del análisis por PCR de las construcciones en el plásmido pEG103 demostraron que a partir de las construcciones pEG103:NaTrxh y pEG103:NaTrxh Δ N α se obtienen productos de amplificación del tamaño esperado y, además, los productos se obtienen con los juegos de oligonucleótidos que corresponde (Figura 4), es decir, a partir de pEG103:NaTrxh se obtuvo un producto de amplificación con los tres pares de oligonucleótidos, ya que tanto el NaT-F1 como el F2 y el F3 se alinean sobre la secuencia de *NaTrxh*, mientras que de pEG-103:NaTrxh Δ N α no se obtuvo producto con el par de oligonucleótidos NaT-F1 + NaT-R (aunque se detectó una amplificación seguramente por contaminación) debido a que esta mutante carece del dominio N α , por lo que el NaT-F1 no se alinea (Figura 1).

Con respecto a la construcción pEG103:NaTrxh Δ $\alpha\beta$, solo se esperaba obtener un producto de amplificación con el par de oligonucleótidos NaT-F3 + NaT-R; sin embargo, se observó una banda clara con el par NaT-F2 + NaT-R (Figura 4). Por lo tanto, esta construcción no se utilizó para los experimentos subsecuentes.

Para obtener la secuencia que corresponde a la mutante NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, se utilizó como molde a la construcción pEG103:NaTrxh, el par de oligonucleótidos NaT-F3 + GFP-R y la DNA polimerasa *Phusion Hot Start Flex*. Siguiendo el protocolo de las Tablas 2 y 3. Para las otras dos fusiones (*NaTrxh-GFP* y *NaTrxh Δ N α -GFP*) se usó la construcción en pEG103 correspondiente con el oligonucleótido en sentido NaT-F1 para la silvestre y NaT-F2 para la mutante *NaTrxh Δ N α* , mientras que el antisentido GFP-R se usó para ambas.

Los productos de la amplificación de las tres fusiones a *GFP* se clonaron en el vector pENTR/D-TOPO (pENTR) en *E. coli* TOP10. Se seleccionaron 5 colonias

resistentes a kanamicina (50 µg/ml), las cuales se crecieron en medio líquido selectivo (kanamicina 100 µg/ml) para analizarlas por PCR con los oligonucleótidos NaT-F3 y GFP-R. Los productos de amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 5) obteniendo como resultado 5 clonas positivas para pENTR:NaTrxh-GFP, 5 para pENTR:NaTrxhΔNα-GFP y 3 para pENTR:NaTrxhΔNαβ-GFP.

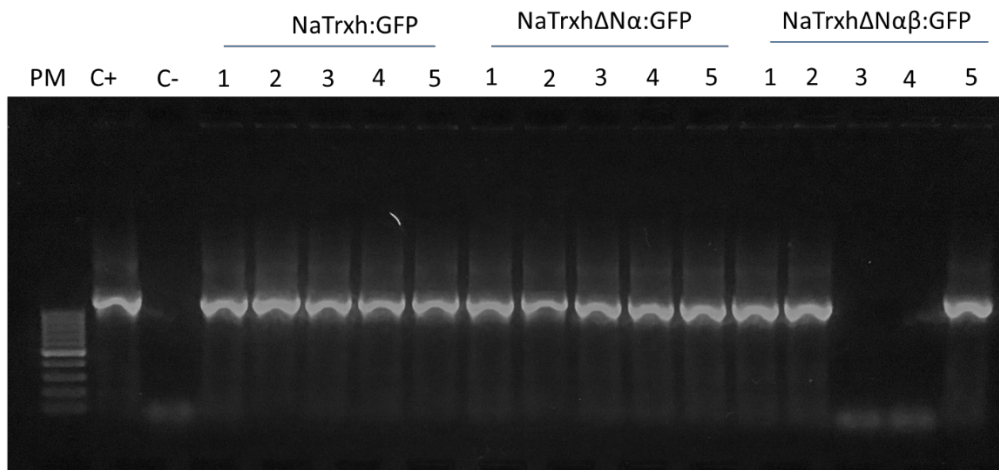


Figura 5. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de las colonias de transformantes de *E.coli* que resultaron positivas en medio selectivo con kanamicina de las diferentes cosntrucciones moleculares (pENTR:NaTrxh-GFP, pENTR:NaTrxhΔNα-GFP y pENTR:NaTrxhΔNαβ-GFP). Para este ensayo se utilizó el par de oligonucleótidos NaTF3 y GFPR.

El resultado de la Figura 5 confirmó que la clonación en el vector pENTR se llevó a cabo con la fusión a *GFP*. Sin embargo, el oligonucleótido NaT-F3 se alinea con las tres diferentes versiones de la NaTrxh (Figura 1), por tanto, para corroborar que se tenía la versión adecuada de cada una de las secuencias de la NaTrxh, se hizo una prueba por PCR usando tres distintas combinaciones de oligonucleótidos: (1) NaT-F1 + GFP-R; (2) NaT-F2 + GFP-R; y (3) NaT-F3 + GFP-R. En la Figura 6 se muestra el resultado de este análisis, para el cual solo se usó una colonia de

cada una de las construcciones. De acuerdo al sitio donde se alinean los oligonucleótidos en sentido (Figura 1), el resultado mostró que efectivamente cada una de las fusiones corresponde a la versión esperada, teniendo así las construcciones pENTR:NaTrxh-GFP, pENTR:NaTrxhΔNα-GFP y pENTR:NaTrxhΔNαβ-GFP.

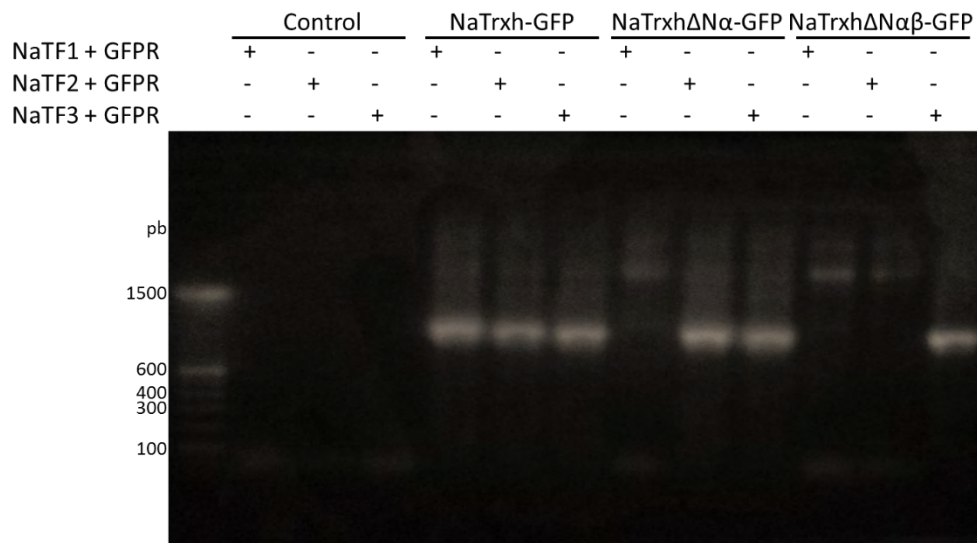


Figura 6. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación por PCR de las construcciones moleculares pENTR:NaTrxh, pENTR:NaTrxhΔNα y pENTR:NaTrxhΔNαβ usando en reacciones diferentes los oligonucleótidos NaT-F1, NaT-F2 y NaT-F3 con el antisentido GFPR.

Análisis de las secuencias de las fusiones *NaTrxh-GFP*, *NaTrxhΔNα-GFP* y *NaTrxhΔNαβ-GFP* clonadas en pENTR/D-TOPO

Las secuencias de cada uno de los genes de fusión se obtuvieron haciendo uso del servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se hizo un alineamiento múltiple (ClustalW) de cada una de las secuencias obtenidas con la reportada de la NaTrxh (número de acceso

DQ021448.1) y la que codifica GFP en el vector pEG103, encontrando que las fusiones *NaTrxh-GFP* y *NaTrxhΔNα-GFP* no presentaron ninguna mutación y están en marco de lectura con la secuencia *GFP* (Figura 7A), por lo que la estructura primaria de las proteínas de fusión corresponde a lo esperado (Figura 7B). Con respecto a la fusión *NaTrxhΔNαβ-GFP* se encontraron 2 mutaciones puntuales (Figura 7A), pero ninguna se ubicó en los motivos estructurales que se analizan en este trabajo ($N\alpha$ y $N\beta$) ni tampoco alteran el marco de lectura para la fusión a GFP (Figura 7B), por lo que se decidió continuar con esta construcción para los experimentos subsecuentes.

A

| | 1 | Na | Nβ |
|------------------------|------|---|--|
| NaTrxh DQ021448.1 | ---- | ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGCGCGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAAATCAGGATCGTCTCAGAACCGTCGCGG | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | CACCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGCGCGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAAATCAGGATCGTCTCAGAACCGTCGCGG | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | CACCAT----- | GGCAGAGGCAGAAATCAGGATCGTCTCAGAACCGTCGCGG |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | CACCAT----- | -----GTCGCGG |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | TGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | TGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | TGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | TGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | TACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCGCGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGTATACCAGCTTGACTTCGTCAAAATCGACGT | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | TACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCGCGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGTATACCAGCTTGACTTCGTCAAAATCGACGT | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | TACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCGCGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGTATACCAGCTTGACTTCGTCAAAATCGACGT | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | TACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCGCGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGTATACCAGCTTGACTTCGTCAAAATCGACGT | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | CGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGTGCTGTAAGCAAGGAAAGGAGTAGAGAGAGT | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | CGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGTGCTGTAAGCAAGGAAAGGAGTAGAGAGAGT | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | CGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGTGCTGTAAGCAAGGAAAGGAGTAGAGAGAGT | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | CGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGTGCTGTAAGCAAGGAAAGGAGTAGAGAGAGT | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | GGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGTCTCTAAATTTGCTGCTAGTAATATCGAACTAAAT | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | GGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGTCTCTAAATTTGCTGCTAGTAATATCGAACTAAAT | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | GGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGTCTCTAAATTTGCTGCTAGTAATATCGAACTAAAT | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | GGTTGGGGCTAAGAAAGATGAACTCGAGAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGTCTCTAAATTTGCTGCTAGTAATATCGAACTAAAT | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | TCATGTCCAA----- | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | TCATGTCCAA----- | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | TCATGTCCAA----- | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | TCATGTCCAA----- | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | CCCAATCTTGTGTAATAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACT | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | CCCAATCTTGTGTAATAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACT | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | CCCAATCTTGTGTAATAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACT | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | CCCAATCTTGTGTAATAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACT | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | TACCCCTAAATTTATTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCGGTGGCCAACTTGTCTACTACTTTCTCTTATGTTGTTCAATGCTTTTC | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | TACCCCTAAATTTATTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCGGTGGCCAACTTGTCTACTACTTTCTCTTATGTTGTTCAATGCTTTTC | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | TACCCCTAAATTTATTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCGGTGGCCAACTTGTCTACTACTTTCTCTTATGTTGTTCAATGCTTTTC | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | TACCCCTAAATTTATTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCGGTGGCCAACTTGTCTACTACTTTCTCTTATGTTGTTCAATGCTTTTC | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | AAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCAGCACTTCTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTCGAGGAGAGGACCATCTTCTCAAGGA | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | AAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCAGCACTTCTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTCGAGGAGAGGACCATCTTCTCAAGGA | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | AAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCAGCACTTCTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTCGAGGAGAGGACCATCTTCTCAAGGA | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | AAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCAGCACTTCTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTCGAGGAGAGGACCATCTTCTCAAGGA | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | CGACGGGAACACAAGACAGCTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAAGGGAATCGATTCAAGGA | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | CGACGGGAACACAAGACAGCTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAAGGGAATCGATTCAAGGA | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | CGACGGGAACACAAGACAGCTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAAGGGAATCGATTCAAGGA | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | CGACGGGAACACAAGACAGCTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAAGGGAATCGATTCAAGGA | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | GGACGGAAACATCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACATACTCCACAACTATACATCATGGCCGACAAAGCAAAGAACCGCATCAA | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | GGACGGAAACATCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACATACTCCACAACTATACATCATGGCCGACAAAGCAAAGAACCGCATCAA | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | GGACGGAAACATCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACATACTCCACAACTATACATCATGGCCGACAAAGCAAAGAACCGCATCAA | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | GGACGGAAACATCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACATACTCCACAACTATACATCATGGCCGACAAAGCAAAGAACCGCATCAA | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | AGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGAGCGGCGCGTGAACCTCGGTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCC | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | AGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGAGCGGCGCGTGAACCTCGGTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCC | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | AGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGAGCGGCGCGTGAACCTCGGTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCC | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | AGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGAGCGGCGCGTGAACCTCGGTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCC | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | TGTCCTTTTACCAGACAACCAATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGA | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | TGTCCTTTTACCAGACAACCAATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGA | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | TGTCCTTTTACCAGACAACCAATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGA | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | TGTCCTTTTACCAGACAACCAATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGA | |
| GFP (pEG103) | | ----- | ----- |
| NaTrxh DQ021448.1 | | GTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAAAGCTAGCCACCACCACCACCACCGTGTGA | |
| NaTrxh-GFP (pENTR) | | GTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAAAGCTAGCCACCACCACCACCACCACCGTGTGA | |
| NaTrxhΔNa-GFP (pENTR) | | GTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAAAGCTAGCCACCACCACCACCACCACCGTGTGA | |
| NaTrxhΔNaβ-GFP (pENTR) | | GTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAAAGCTAGCCACCACCACCACCACCACCGTGTGA | |
| GFP (pEG103) | | ----- | -----TAA |

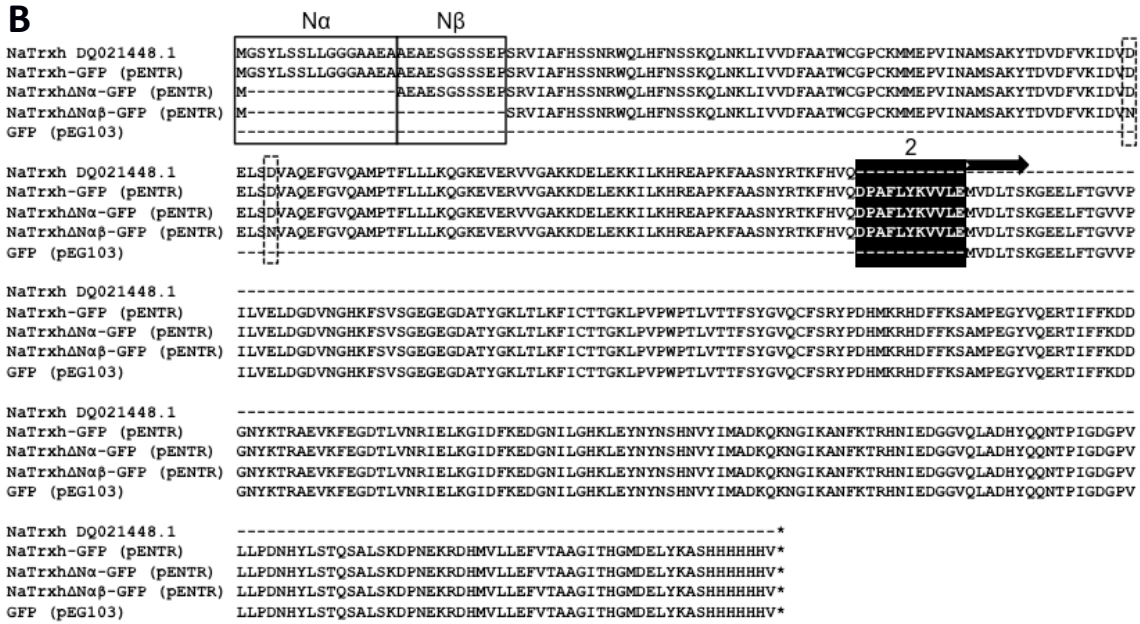


Figura 7. Alineamiento múltiple de la secuencia reportada de la NaTrxh (NaTrxh; DQ021448.1) y de la GFP del vector pEG103 con las secuencias clonadas en las construcciones pENTR:NaTrxh-GFP [NaTrxh-GFP (pENTR)], pENTR:NaTrxh Δ N α -GFP [NaTrxh Δ N α -GFP (pENTR)] y pENTR:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -GFP [NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -GFP (pENTR)] a nivel de nucleótidos (A) y a nivel de proteína (B). En la caja 1 está la secuencia añadida correspondiente al sitio de inserción a pENTR (CACC); la caja N α corresponde al motivo N α de la Natrxh; la caja N β corresponde al motivo N β de la Natrxh; caja 2: secuencia de unión (*linker*) entre NaTrxh (y mutantes) y GFP; Flecha negra; inicio de secuencia de GFP. Las cajas punteadas indican las mutaciones que se encontraron en la secuencia de la NaTrxh Δ N $\alpha\beta$.

Clonación de los genes de fusión NaTrxh-GFP, NaTrxh Δ N α -GFP y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -GFP en el vector destino pYES/DEST52

Una vez analizadas las secuencias de los genes de fusión en las construcciones pENTR:NaTrxh-GFP, pENTR:NaTrxh Δ N α -GFP y pENTR:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -GFP, tanto a nivel de DNA como a nivel de aminoácidos, se procedió con la clonación de las fusiones correspondientes en el vector pYES/DEST52 (pYES).

La transferencia del vector de entrada pENTR al vector destino pYES se realizó por recombinación tipo *LR*, es decir, los sitios *attL* del vector de entrada (Figura 2) recombinan con los sitios *attR* (Figura 3) del destino. El vector destino tiene un gen

suicida (*ccdb*; Figura 3) flanqueado por los sitios *attR*, el cual evita que una célula transformante crezca si no ocurrió la recombinación (*i.e.* la transformación se haya llevado a cabo con un plásmido “vacío”). Finalmente, el hecho de que ambos vectores confieren resistencia en *E. coli* a diferentes antibióticos (kanamicina el de entrada; ampicilina el destino), hace fácil también seleccionar a las células transformantes con el plásmido pYES.

El resultado de la recombinación se subclonó primero en células de *E. coli* TOP10. Se seleccionaron 5 colonias de cada versión de NaTrxh y se probaron por PCR si contenían o no el inserto de interés. En la Figura 8 se muestra un análisis por electroforesis de los productos de amplificación, en donde claramente se observa que se obtuvieron las versiones de la NaTrxh fusionadas a GFP tal y como se esperaba.

| | C | NaTrxh-GFP | | | C | NaTrxhΔNα-GFP | | | C | NaTrxhΔNαβ-GFP | | |
|--------------|---|------------|---|---|---|---------------|---|---|---|----------------|---|---|
| NaTF1 + GFPR | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| NaTF2 + GFPR | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| NaTF3 + GFPR | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + |

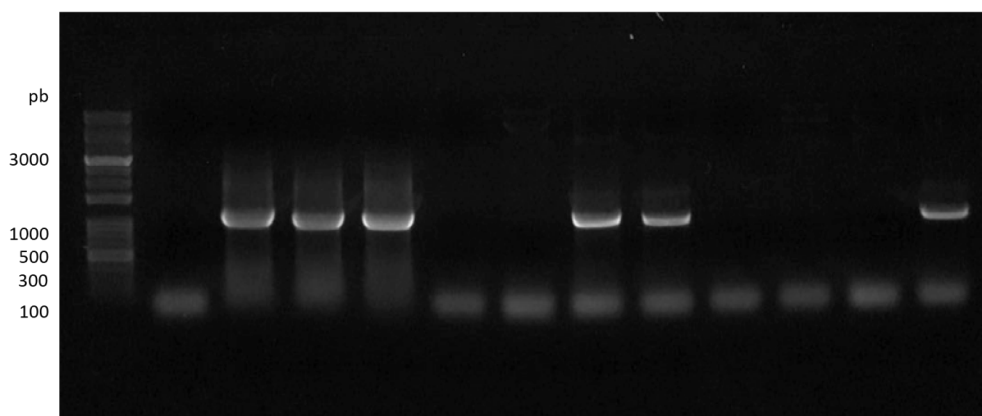


Figura 8. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de las construcciones pYES:NaTrxh-GFP, pYES:NaTrxhΔNα-GFP y pYES:NaTrxhΔNαβ-GFP, donde se observa el patrón de amplificación esperado a partir de cada una de las construcciones, corroborando la clonación de cada una de estas en el vector destino. C: control negativo, en donde en lugar de DNA molde, se agregó agua a la reacción.

Al comprobar la clonación de las diferentes fusiones moleculares en el vector de expresión de levadura, pYES/DEST-52, se transformaron células de *S. cerevisiae* INVSc1, seleccionando a las células transformantes por su capacidad de crecer en un medio mínimo sin uracilo (SC-U).

Análisis de las proteínas recombinantes expresadas en *S. cerevisiae*

La inmunodetección de las diferentes proteínas se realizó con un anticuerpo policlonal anti-NaTrxh, con el cual se inmunodetectaron diversas bandas, siendo la de mayor interés la que está a una altura aproximada a los 44 KDa, es decir, la masa aproximada de las diferentes proteínas recombinantes. A pesar de que se obtuvo reacción cruzada con el anticuerpo, la banda mencionada no se observó en el control negativo (extracto de proteína a partir de levaduras no transformantes) ni en el tiempo inicial de inducción (*i.e.* 0 h) de cada uno de los diferentes experimentos (Figura 9).

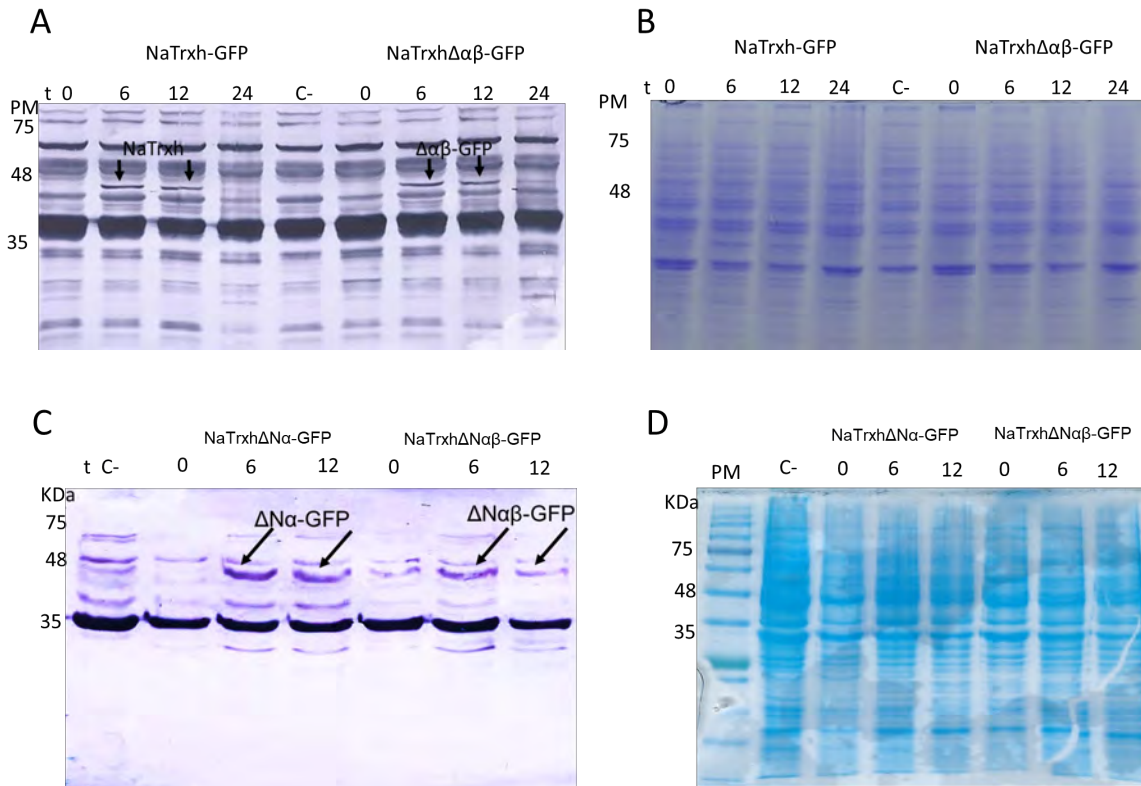


Figura 9. Inmunodetección de las proteínas recombinantes NaTrxh-GFP, NaTrxhΔNα-GFP y NaTrxhΔNαβ-GFP a partir de extractos de proteína total de levadura a diferentes tiempos de inducción de la expresión. **A y C.** Ensayo por western-blot, revelado con el anticuerpo anti-NaTrxh; las flechas señalan la banda que corresponde a cada una de las proteínas de fusión recombinantes, de 44 kDa aproximadamente, a las 6 y 12 h de inducción. Esta banda no se detectó en el control negativo (C-), que es la cepa INVSc1 sin transformar ni en el tiempo inicial de inducción (0). **(B) y (D)** Proteínas teñidas con azul de Coomassie.

En la Figura 9, además de la reacción cruzada del anticuerpo anti-NaTrxh, fue evidente una baja inmunodetección de la banda que presumiblemente corresponde a cada una de las versiones de la proteína fusionada a GFP. Por lo tanto, se decidió hacer diferentes extracciones de proteína total de *S. cerevisiae* utilizando tres diferentes amortiguadores de extracción: (1) amortiguador de ruptura (50 mM fosfato de sodio, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 % glicerol y 1 mM PMSF); (2) amortiguador de ruptura + 300 mM NaCl; y (3) amortiguador de ruptura + 300 mM NaCl + 1% Tritón (4) Litio 2M + 400 mM NaOH, En la Figura 10

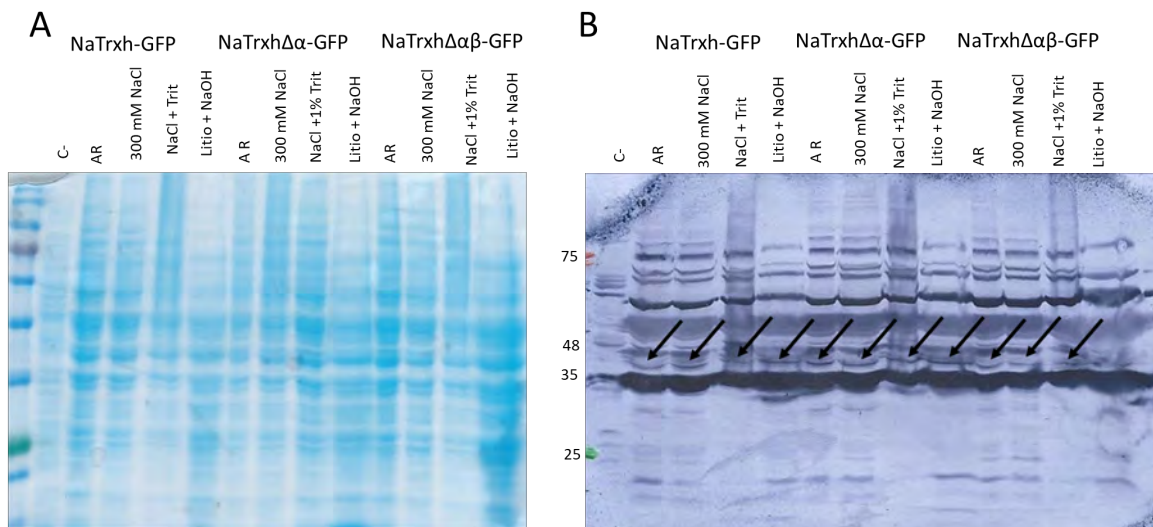


Figura 10. Extracción de las proteínas recombinantes NaTrxh-GFP y las diferentes mutantes NaTrxhΔNα-GFP y NaTrxhΔNαβ-GFP con diferentes amortiguadores de extracción (AR: amortiguador de ruptura; 300 mM NaCl amortiguador de ruptura + 300 mM NaCl; NaCl + Trit: amortiguador de ruptura + 300 mM NaCl + 1% de Tritón X-100; Lito + NaOH: cloruro de litio 2M + 400 Mm de NaOH). Los extractos de proteína total se realizaron a partir de células inducidas por 6 h. **(A)** Proteínas teñidas con azul brillante de Coomassie. **(B)** Inmunodetección con el anticuerpo policlonal anti-NaTrxh de las diferentes proteínas recombinantes en donde las flechas indican la banda correspondiente a cada una de las diferentes proteínas recombinantes con una masa molecular aproximada de 44 KDa.

Detección de la fluorescencia de GFP en células de *S. cerevisiae*

Para corroborar que las proteínas inmunodetectadas (Figura 10) efectivamente corresponden a las proteínas de fusión NaTrxh-GFP, NaTrxhΔNα-GFP y NaTrxhΔNαβ-GFP, se observaron las células de *S. cerevisiae* transformantes por microscopía confocal para detectar la fluorescencia de GFP de cada una de las proteínas de fusión. El resultado que se obtuvo indica que *S. cerevisiae* sí expresa a las tres proteínas de fusión, a pesar de que solo muy bajo número de células lo hagan (Figura 11), esto a pesar de que siempre se crecieron en medio selectivo, es decir, en un medio mínimo sin uracilo.

De manera importante, en la Figura 11 también se observa que en las células que se detectó fluorescencia, está siempre se encuentra en el citoplasma sin importar la versión de la NaTrxh, sugiriendo que la NaTrxh no se secreta en este tipo celular, por lo que las mutantes (sin el extremo amino, NaTrxhΔNαβ, ni sin el motivo Nα, NaTrxhΔNα).

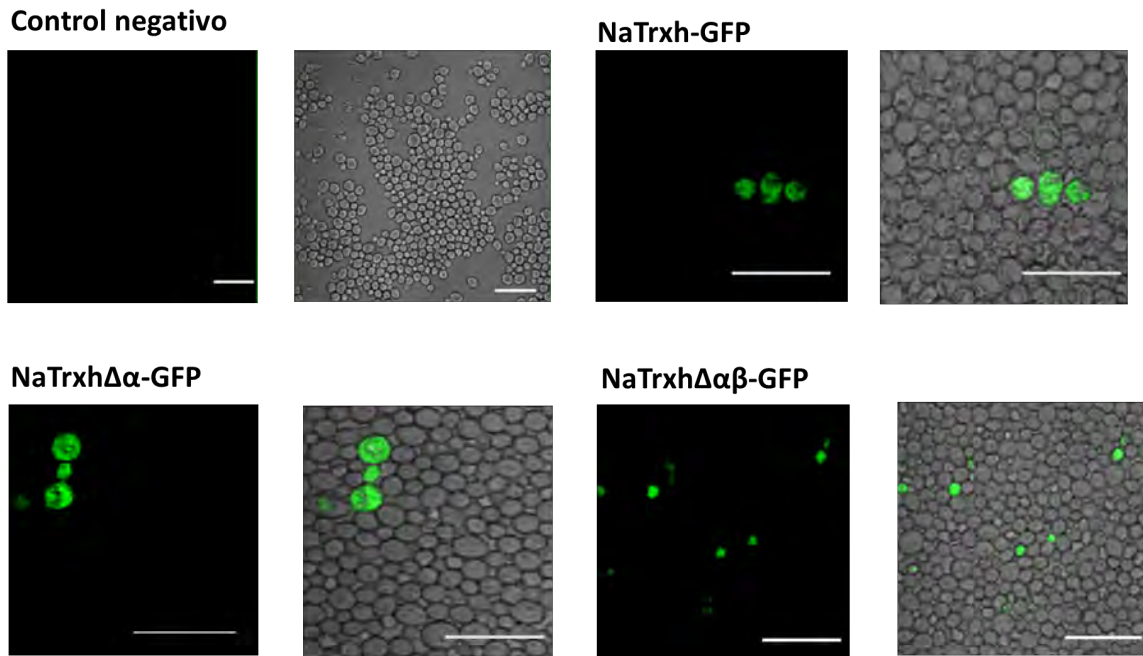


Figura 11. Análisis por microscopía confocal mostrando la fluorescencia de la GFP en las diferentes proteínas de fusión recombinantes, NaTrxh-GFP, NaTrxh $\Delta\alpha$ -GFP y NaTrxh $\Delta\alpha\beta$ -GFP a un tiempo de inducción de 12 h en medio con galactosa. El control negativo corresponde a células de *S.cerevisiae* transformantes pero crecidas con glucosa. La barra de escala equivale a 20 μm .

Discusión

La proteína de fusión NaTrxh-GFP no se secreta en *S. cerevisiae*

La NaTrxh, como las otras Trx h del subgrupo 2, contiene una extensión hacia el extremo amino, el cual, siguiendo la predicción de un sitio de corte entre los residuos Ala-16 y Ala-17, se dividió en dos motivos: el N α y el N β (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Esto sugiere que el motivo N α (Met-1 a Ala-16) podría funcionar como péptido señal. Sin embargo, por medio de ensayos de expresión transitoria de la mutante NaTrxh Δ N α fusionada a GFP en células de epidermis de cebolla, se demuestra que este motivo no contiene la información para dirigir su secreción (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Con la finalidad de evaluar la posibilidad de si esto solo ocurre en plantas, se decidió determinar si la NaTrxh se secreta en otro sistema eucarionte, así como la posibilidad de que el motivo N α pudiese funcionar como péptido señal en otras células eucariontes, como las de *S. cerevisiae*, en la cual, además, se han reportado diferentes vías de secreción a la RE/Golgi (Nombela *et al.*, 2006).

Al expresar a la proteína de fusión recombinante NaTrxh-GFP en *S. cerevisiae* se encontró que permaneció como proteína intracelular. Lo mismo ocurrió con las mutantes NaTrxh Δ N α y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ fusionadas a GFP. Estos resultados sugieren que la localización intracelular de las mutantes no se debe a la delección del motivo N α (NaTrxh Δ N α) o de la extensión total del extremo amino (Met-1 a Pro-27; mutante NaTrxh Δ N $\alpha\beta$), sino a que *S. cerevisiae* no reconoce a la NaTrxh como proteína de secreción, permitiendo proponer que la localización extracelular

de una proteína con una señal como la de la NaTrxh, seguramente el motivo N β (Ala-17 a Pro-27), solo ocurre en células vegetales

Posibles vías por las que la NaTrxh podría secretarse

Una vez que una proteína se traduce en los ribosomas, puede permanecer en la parte soluble del citoplasma, dirigirse a las mitocondrias o al núcleo o ser enviada a la membrana plasmática o a otros organelos internos, como los lisosomas.

Las proteínas de secreción en cuanto se están traduciendo son dirigidas por una señal ubicada en su amino terminal, denominado péptido señal (Blobel y Dobberstein, 1975). Esta señal dirige a las proteínas nacientes junto con el ribosoma que las está traduciendo hacia el RE, donde termina su síntesis. Posteriormente, las proteínas se dirigen al aparato de Golgi (AG), donde también pueden tener modificaciones adicionales, tales como glicosilación, y finalmente, son dirigidas ya sea a los lisosomas o a vesículas secretoras, mismas que se fusionan a la membrana plasmática. A esta ruta se le conoce como la vía RE/AG o vía clásica de secreción. El péptido señal que dirige las proteínas a la vía RE/AG varía de 5 a 30 residuos aminoácidos que en conjunto muestran un perfil hidrofóbico (Von Heijne, 1985). Cuando esta secuencia sale del ribosoma, un complejo llamado SRP es la que la reconoce y transporta al complejo ribosoma-proteína naciente hacia el RE. Ahí el ribosoma facilita la entrada de la cadena polipeptídica hacia el lumen del RE conforme se traduce.

Existen muchas proteínas carentes de un péptido señal convencional que también alcanzan la superficie celular y aún no hay manera de explicar cómo ocurre esto desde el mecanismo del péptido señal convencional. Debido a que los datos no

son consistentes con la ruta de exportación clásica, solo se puede interpretar en términos de otros mecanismos, que existe una gran variedad de péptidos señal no convencionales, permitiendo la postulación de más de una ruta alterna a la clásica de secreción (Nombela *et al.*, 2006).

Un posible mecanismo para la secreción de la NaTrxh es la secreción por casetes de unión a ATP, mismo que podría funcionar como motor para la exportación de proteínas ya que. Otro posible mecanismo para la ruta de secreción de la NaTrxh es que se formen burbujas de membrana que solo reconozcan a la proteína en particular; sin embargo, estos escenarios no parecen ser lo que ocurre en la célula debido a que ambos han sido encontrados en *S. cerevisiae* y, como se reporta en este trabajo, esta levadura no secreta a la NaTrxh. Adicionalmente, se encuentra la evidencia que demuestra que la NaTrxh utiliza los elementos de la vía convencional (*i. e.* RE, AG y vesículas de secreción) en células vegetales (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), los cuales no son seguidos por ninguno de estos 2 escenarios. Por lo tanto, el escenario que parece más factible en este caso es que un factor diferente a SRP reconozca al motivo N β como señal de secreción, ya que debido a la posición inusual del motivo N β en la estructura primaria de la NaTrxh y a su alto perfil hidrofílico resulta improbable que SRP sea quien reconozca a este motivo como señal de tránsito.

La secreción de la NaTrxh parece ser un evento exclusivo de células vegetales

La NaTrxh fue la primer tiorredoxina de plantas cuya localización se define como extracelular (Juarez- Díaz *et al.* 2006), aunque en otros eucariontes, como *Homo*

sapiens, se sabe que la Trx1 se secreta al torrente sanguíneo (Wollman *et al.*, 1988).

Las Trx h originalmente se describieron como proteínas citoplásmicas (Meyer *et al.* 1999); posteriormente, se encontró que una Trx h, la PtTrxh2 de *Poplar*, se dirige a la mitocondria (Gelhaye *et al.* 2004). De manera interesante, la localización subcelular de la PtTrxh2 se debe a la extensión en su extremo amino, sugiriendo una función importante de estas extensiones con respecto al tráfico celular de las proteínas que las contienen, típicas de las Trx h del subgrupo 2 y que además, no están conservadas en cuanto a su secuencia (Eklund *et al.*, 1991). Esto se refuerza con el hecho de que la Trx de arroz solo se mueve por los plasmodesmos cuando contiene dicha extensión en su extremo amino (Ishiwatari *et al.*, 1998). La NaTrxh, en su extremo amino, efectivamente contiene la información para su localización extracelular (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), misma que se encuentra precisamente en su extensión del amino terminal (Ávila-Castañeda, *et al.* 2014). Dicha extensión se divide en 2 motivos: N α (Met-1 a Ala-16) y N β (Ala-17 a Pro-27), siendo el motivo N β el responsable de la localización extracelular de la proteína en plantas. En este trabajo se demuestra que la extensión total del extremo amino de la NaTrxh no es reconocido por *S. cerevisiae*, permitiendo sugerir que el motivo N β solo es reconocido como señal de tránsito por células vegetales. Como evidencia adicional para sustentar esta hipótesis es que se encontraron 2 Trx de soja con motivos similares al motivo N β , la Trxh1 y la Trxh2, que de manera interesante se localizan asociadas a la membrana plasmática (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Es posible que las secuencias similares al motivo N β sean reconocidas por un factor distinto a SRP debido a las características fisicoquímicas del motivo N β , el cual no se encuentra en el extremo amino, como comúnmente se localizan los péptido señal ortodoxos, y que posee un perfil de baja hidrofobicidad, razón por la se sugiere que SRP no es el complejo encargado de reconocer a esta señal, ya que se sabe que SRP reconoce secuencias de aminoácidos hidrofóbicas (Grudnik *et al.*, 2009) haciendo muy poco probable que SRP reconozca al motivo N β , además de que los resultados sugieren que el complejo que reconoce al motivo N β es exclusivo de plantas.

Conclusiones

Se logró expresar a las diferentes proteínas recombinantes en *S.cerevisiae*.

La proteína de fusión NaTrxh-GFP, así como las mutantes NaTΔNα y NaTΔαβ fusionadas a GFP, no son reconocidas como proteínas de secreción por *S. cerevisiae*. Esto a pesar de que los niveles de expresión de cada una de las proteínas de fusión fue baja.

Se sugiere que la información del motivo Nβ es reconocida por un factor diferente a SRP debido a las características propias del motivo y además de que posiblemente sea exclusivo de plantas.

El hecho de que *S. cerevisiae* no reconozca al motivo Nα ni al extremo amino total (Nα+Nβ) como señal de secreción, significa que la levadura no reconoce a la NaTrxh como proteína de secreción en general, sugiriendo que su secreción sea exclusiva de células vegetales, por lo que muy probablemente existan vías alternas de secreción exclusivas de cada grupo biológico.

Perspectivas

Determinar la secuencia mínima funcional del motivo Nβ para ser reconocido como señal de tránsito/secreción.

Generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresen tanto a la NaTrxh-GFP como a la fusión del motivo Nβ a GFP para identificar al factor que reconoce a este motivo como señal de tránsito/secreción.

Hacer un análisis bioinformático más detallado que permita definir al motivo Nβ como exclusivo de sistemas vegetales.

Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai S. (2011) Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2013 Essential Cell Biology. Garland Publishing, New York & London
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walker, P. 2010 *Biología molecular de la célula*. (5ª edición). Barcelona: Ediciones Omega
- Ávila-Castañeda, A., Juárez-Díaz, J., Rodríguez-Sotres, R., Bravo-Alberto, C., Ibarra-Sánchez, C., Zavala-Castillo, A., Cruz-Zamora, Y., Martínez-Castilla, L., Márquez-Guzmán, J. y Cruz-García, F. 2014 A novel motif in the NaTrxhN-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro. *BMC Plant Biol.* **14**:147
- Balmer, Y. y B. B. Buchanan. 2002. Yet another plant thioredoxin. *Trends Plant Sci.* **7**: 191-193.
- Barajas López, J., Serrato, A., Olmedilla, A., Chueca, A. and Sahrawy, M. 2007 Localization in roots and flowers of pea chloroplast thioredoxin f and m proteins reveals new roles in non-photosynthetic organs. *Plant Physiol.* **145**: 1-15
- Black, S., Harte, E.M., Hudson, B., and Wartofsky, L. (1960). Specific enzymatic reduction and glutaredoxin systems are efficient electron-donors to human plasma glutathiones-peroxidase. *Journal of biological chemistry* **269**: 29382-29384.
- Blobel, G. 2000 Protein targeting (Nobel lecture). *Chem. Biochem.;* **1**:86-102
- Blobel, G. & Dobberstein, B. 1975 Transfer of proteins accross membranes. *J. Cell. Biol.* **67**: 835-51
- Bendtsen, J., Nielsen, H., Heijne, G. and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol* **340**: 783-795
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G., and Brunak, S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 349–356
- Bradford, M. 1976 Anal. A rapid and sensitive method for the quantittation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Biochem.* **72**, 248–254
- Cabrillac D., Cock J., Dumas C., Gaude T. 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thiorredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**: 220- 223
- Casabona C. 1995. *Genética Humana: fundamentos para el estudio de los efectos sociales de las investigaciones sobre el genoma humano*. España: Universidad de Deusto
- Chang, R. 2002. *Química*. 7ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México
- Clarck, D. Martinko, J. Madigan, M. Dunlap, P. 2009. *Brock Biología de los microorganismos* (12ª edición), Pearson Educación.

- Coat Protein Complex US National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH). Consultado el 10 de septiembre de 2016
- Earley, K., Haag, J., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*, **45**:616–629.
- Eklund, H., F. K. Gleason y A. Holmgren. 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**: 13-28
- Gelhaye, E., N. Rouhier, P. Laurent, P. E. Sautière, F. Martin y J. P. Jacquot. 2002. Isolation and characterization of an extended thioredoxin *h* from poplar. *Physiol. Plantarum* **114**: 165-171
- Gelhaye, E., N. Rouhier y J. P. Jacquot. 2004a. The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 265-271
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N. Ohlsson, P.I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y., Jacquot J. 2004. A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 14545-14550
- González, A. 2007. Tráfico de proteínas, biogénesis y reciclaje de la superficie celular: Mecanismos y enfermedad. Boletín escuela de medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile. Volumen 32
- Grudnik, P., Bange, G., & Sinning, I. 2009. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biological Chemistry*, **390** 775-82
- Von Heijne, G. 1985. Signal sequences. *Journal of Molecular Biology*, **184**(1), 99–105.
- Gutiérrez, J.A. 2005. Caracterización génica, proteínica y funcional de tiorredoxinas de guisantes. Editorial de la Universidad de Granada, Granada, España
- Haffani Y Z., Gaude T., Cock J.M., Goring D.R. 2004. Antisense suppression of thioredoxin *h* mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol Biol*, **55**:619–630.
- Helms, J. B. & Rothman, J. E. 1992. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**:352–354
- Holmgren, A. 1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* **3**: 239-243
- Ishiwatari, Y., T. Fujiwara, K. C. McFarland, K. Nemoto, H. Hayashi, M. Chino y W. J. Lucas 1998. Rice phloem thioredoxin *h* has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205**: 12-22
- Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S. I., Hirano, H., Mori, S., Fijirawa, T., Hayashi, H. and Chino, M. 1995. Thioredoxin- *H* is one of the major proteins in rice phloem. *Planta*. **195**: 456-463.
- J. L. Burman 2009. Characterization of molecules regulating Clathrin- and COPI-trafficking. *McGill University y Library and Archives Canada*

- Jacquot, J. P., J. M. Lancelin e Y. Meyer. 1997. Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.* **136**: 543-570
- Jiménez, F. Merchant, H., (2003). *Biología celular y molecular*. Pearson educación, México
- Jonhson, T.C., Cao, R.Q., Kung, J.E. y Buchanan, B.B. 1987. Thiorredoxin and NADP-thioredoxin reductase from cultured carrot cells. *Planta* **171**: 321-331
- Juárez- Díaz, J., McClure, Bruce., Vázquez Santana, S., Guevara García, A., León Mejía, P., Márquez Guzmán, J., and Cruz García, F. . 2006. A Novel Thioredoxin *h* Is Secreted in *Nicotiana glauca* and Reduces S-RNase *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* **281**: 3418-3424
- Lai, Z., Ma, W., Han, B. Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y. 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (s) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol.* **50** (1): 29-42
- Laloi, C., N. Rayapuram, Y. Chartier, J. M. Grienenberger, G. Bonnard e Y.Meyer. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14144-14149
- Laurent, E. and Reichard, P. (1964) Enzymatic Synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *E. coli*. *J.Biol.Chem.* **239**:3436-3444.
- Mahmood, T. Yang, P. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* **4** (9): 429-434
- Maraculla. J., Goñi F. 1994. *Bioquímica Humana: curso básico*. Barcelona, España. Editorial Reverté S.A
- María Calderón Domínguez. 2009. Premio Nobel de Química 2008. Encuentros en la biología. **2**: 124
- McClure, B., Haring, V., Ebert, P., Anderson, M., Simpson, P., Sakiyama, F. and Clarke, E. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955 -957
- McClure, B. and Franklin-Tong, V. 2006. Gametophytic Self-Incompatibility: Understanding the Cellular Mechanisms Involved in “Self” Pollen Tube Inhibition. *Planta*, **224**, 233-245
- McClure B., Cruz-García F., Romero C. 2011. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann Bot*, **108**:647–658.
- Mellman, I., and Warren, G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 2000; **100**:99-112
- Meyer Y., Buchanan B., Vignols F., Reichheld J. 2009 Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet*, **43**:335–367
- Meyer, Y., L. Verdoucq y F. Vignols. 1999. Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* **4**: 388-394
- Meyer, Y., F. Vignols y J.P. Reichheld. 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**:394-402

- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C 2012. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid Redox Signal* **17**:1124–1160
- Müller-Esterl, Werner 2008. *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Editorial Reverté. p. 263-270
- Nombela C., Gil C. y Chaffin W. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* **14**: 15-21
- Pelham H. R. & Rothman J. E. 2000. The debate about transport in the Golgi two sides of the same coin? *Cell* **102**, 713–719
- Rabouille C. & Klumperman J. 2005. The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nature Rev.Mol. Cell Biol.* **6**, 812–817
- Ritzenthaler C., Nebenführ A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin A., Robinson D. 2002.Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell*, **14**:237–261
- Schürmann, P. y J. P. Jacquot. 2000. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 371-400.
- Shi J. and Bhattacharyya M. K. 1996. A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. *Plant Mol Biol*, **32**:653–562
- Sudhof, T.C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**: 645-53
- Teasdale R.D. & Jackson M.R. 1996. Signal mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **12**: 27-54
- Thanassi D., Stathopoulos C., Karkal A., Li, H. 2005. Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of Gram-negative bacteria (Review). *Molecular Membrane Biology* **22** (1): 63-72.
- Tsien R.Y. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annual Reviews Biochemistry*. 67: 509 - 544.
- Torres Rodriguez M. D. 2016 NaTrxh regula positivamente la actividad catalítica de la S-RNasa. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. UNAM. 82 pp
- Ureña J. y Arribas J. 2000. El Transporte Intracelular de Proteínas: El caso del TGF-alfa. *Ciencia al día* 3: 1
- Von Heijne, G. 1985. Signal sequences. *Journal of Molecular Biology*, **184** 99–105.
- Wollman E., d'Auriol L., Rimsky L., Shaw A, Jacquot J., Wingfield P., Graber P., Dessarps F., Robin P., Galibert F., Bertoglio J., Fradelizi D. 1988 Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J Biol Chem*, **263**:15506–15512.
- Zanetti G., Pahuja K., Studer S., Shim S., Schekman R. 2012. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature cell biology*. **14**: 20-28.

Apéndice 1 (protocolos)

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa (Qiagen)

1. Cortar el gel de agarosa alrededor de la banda que corresponde al producto de amplificación con un bisturí limpio y pesarlo en un microtubo de 1.5 ml.
2. Agregar 3 volúmenes de amortiguador QG (tiocianato de guanidina 5.5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 6.6) por cada volumen de gel, considerando que 100 mg de gel corresponden a 100 µl de amortiguador.
3. Incubar a 50°C por 10 min mezclando vigorosamente cada 2 a 3 min para facilitar la disolución del gel.
4. Agregar 1 volumen de isopropanol (100 mg de gel equivalen a 100 µl) a la muestra y mezclar por inversión.
5. Colocar una columna en un tubo de colecta de 2 ml y aplicar la muestra a la misma.
6. Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm. Descartar el fluido recuperado y colocar la columna en el mismo tubo de colecta. Para muestras mayores a 800µl, solo se rellena la columna y se centrifuga de nuevo.
7. Eliminar los posibles residuos de agarosa agregando 500 µl de amortiguador QG a la columna y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm, descartar el fluido y colocar la columna en el mismo tubo de colecta.
8. Lavar el DNA unido a la columna con 750 µl de amortiguador PE (NaCl 20 mM, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 80% de etanol) a la columna y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm, descartar el fluido y colocar la columna en el mismo tubo de colecta.
9. Eliminar el exceso de etanol y amortiguador centrifugando la columna por 1 min adicional.
10. Colocar la columna en un microtubo limpio y estéril de 1.5 ml y eluir el DNA agregando 10 µl de agua desionizada estéril en el centro de la columna. Incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar 2 min a 13,000 rpm.

Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

1. Crecer células de *E. coli* en 10 mL de medio líquido LB (LB) por 12 h a 37°C.
2. Inocular 5 mL del precultivo en 50 mL de LB fresco, incubar a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C, decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 5 mL de CaCl₂ 100mM estéril e incubar por 15 min a 4 °C. Repetir el paso 3 y 4 dos veces más.
5. Resuspender el botón celular en 5 mL de una solución estéril que contenga CaCl₂ 50 mM y glicerol al 20 %.
6. Hacer alícuotas de 45 µL y conservar a -80 °C hasta su uso.

Transformación de *E. coli* por choque térmico

1. Adicionar a una alícuota de 50 µl de células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 los 3 µl de la reacción de recombinación y mezclar muy suavemente con la punta de la pipeta.
2. Incubar en hielo por 30 min.
3. Aplicar el choque térmico incubando a 42°C durante 40 s.
4. Pasar inmediatamente a hielo e incubar por 5 min.
5. Agregar 500 µl de medio LB (Luria-Bertani) con glucosa 20 mM e incubar con agitación constante por 1 h a 37°C.
6. Centrifugar a máxima velocidad por 30 s, decantar y resuspender el botón con el medio sobrante; sembrar en medio selectivo (LB-agar con kanamicina a 50 µg/ml) e incubar a 37°C de 12 – 16h.

Purificación de DNA plasmídico a partir de células de *E. coli* (Qiagen)

1. Crecer las células en 1 – 5 ml de medio selectivo líquido por 12 – 16 h a 37°C
2. Colectar las células por centrifugación a temperatura ambiente (15,000 rpm por 1 min)
3. Resuspender el botón celular en 250 µl del amortiguador P1 (Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 10mM y 100 µg/ml RNase A)
4. Agregar 250 µl de la solución de lisis (NaOH 200 mM y SDS 1% (m/v)) y mezclar por inversión de 4 – 6 veces o hasta que la mezcla se vuelva viscosa
5. Agregar 350 µl de la solución de neutralización (Acetato de potasio 3M, pH 5.5) y mezclar por inversión de 4 – 6 veces
6. Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm

7. Transferir el sobrenadante a una columna
8. Centrifugar 1 min a 13,000 rpm y desechar el líquido residual
9. Agregar 750 µl de amortiguador PE (NaCl 80 mM, 8 mM Tris - HCl pH 7.5) a la columna para lavar el DNA y centrifugar 1 min a 13,000 rpm
10. Descartar el líquido residual y centrifugar 1 min adicional con la finalidad de eliminar el etanol que forma parte del amortiguador de lavado (PE).
11. Colocar la columna en un tubo limpio y estéril de 1.5 ml y eluir el DNA agregando 50 µl de agua desionizada estéril en el centro de la columna. Incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar 2 min a 13,000 rpm.

Transformación de *S. cerevisiae* por choque térmico

1. Inocular 5 ml de medio YPD con la cepa INVSc1 de *S.cerevisiae* e incubar 12 h a 30°C y 250 rpm
2. Inocular 30 ml de YPD nuevo con aproximadamente 1 ml del cultivo anterior, determinar la densidad óptica a 600 nanometros de longitud de onda (DO_{600}) inicial e incubar a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5 – 0.6, lo que corresponde a aproximadamente 1×10^7 células/ml
3. Centrifugar 5 min 2500 rpm, eliminar el sobrenadante, agregar un volumen igual de agua destilada estéril (del medio inicial) y resuspender
4. Volver a centrifugar por 5 min a 2500 rpm. Eliminar el sobrenadante, resuspender el botón en 1 ml de agua y pasar las células a un microtubo de 1.5 ml estéril
5. Centrifugar por 5 s a máxima velocidad
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 1 ml de TE/acetato de litio (preparado a partir de una solución madre 10X; Apéndice 1)
7. Centrifugar igual que en paso 5, eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 300 µl TE/acetato de litio
8. Por evento de transformación, en un microtubo de 1.5 ml, colocar 50 µl de células y agregar 50 µl de DNA de esperma de salmón sonicado y hervido.
9. Agregar 4 µl de DNA plasmídico purificado (pYES:NaTrxh-GFP, pYES:NaTrxhNΔα-GFP o pYES:NaTrxhNΔαβ-GFP)
10. Agregar 300 µl de una solución de polietilen glicol (PEG) al 40% litio/TE (1 volumen de amortiguador TE 10X (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH8.0), 1 volumen de acetato de litio 1M y 8 volúmenes de PEG-4000 al 50%)
11. Mezclar vigorosamente e incubar por 30 min a 30°C
12. Agregar 40 µl de dimetil sulfóxido, mezclar vigorosamente
13. Aplicar un choque térmico a 42°C por 15 min, incubar en hielo 5 min
14. Centrifugar 5 s, eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 µl de agua

15. Sembrar en placas con medio selectivo, es decir, medio mínimo sin uracilo (SC-U), con 2% de glucosa como fuente de carbono e incubar a 30°C de 24 a 48 h

Transferencia de proteínas a membrana PVDV (western-blot)

1. Al finalizar la electroforesis, lavar el gel sumergiéndolo en agua desionizada con agitación suave por 30 s y eliminar el agua.
2. Equilibrar el gel sumergiéndolo en amortiguador de transferencia por 10 – 15 min con agitación suave
3. Mientras se equilibra el gel, la membrana de PVDF se activa sumergiéndola en metanol al 50% por 20 s e inmediatamente se lava con agua desionizada (sumergir por 2 min con agitación).
4. Equilibrar la membrana por 2 – 3 min en amortiguador de transferencia con agitación suave
5. Colocar los siguientes componentes equilibrados/empapados en amortiguador de transferencia en el orden indicado sobre el ánodo: (1) papel filtro; (2) membrana PVDF; (3) gel de poliacrilamida; y (4) papel filtro. Finalmente, colocar el cátodo sobre los componentes de la transferencia y aplicar 10 V por 20 min en el caso de un gel y 20 V por 25 min en el caso de dos transferencias simultáneas.

Apéndice 2

(Soluciones de trabajo)

Acrilamida:bis-acrilamida (29:1) – 100 mL

- Acrilamida 29 g
- Bis-acrilamida 1.0 g
- Aforar a 100 mL y esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm de diámetro de poro

Amortiguador apilador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL

- Tris 6.06 g
- Ajustar el pH a 6.8
- SDS al 20% 2 ml
- Aforar a 100 mL

Amortiguador de glicina para SDS-PAGE 10X (1L)

- Tris 30 g
- Glicina 144 g
- SDS 10 g

Amortiguador de muestra 6X (SDS-PAGE)

- Tris·HCl 0.28M, pH 6.8
- Glicerol al 30% (v/v)
- SDS al 1% (m/v)
- DTT 0.5 M
- Azul de bromofenol al 0.0013% (m/v)
- Hacer alícuotas y almacenar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Amortiguador de ruptura celular (*S. cerevisiae*)

- Fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4
- EDTA 1 mM
- Glicerol 5 %
- PMSF 1 mM

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 10X (1 L)

- NaCl 80.0628 g
- KCl 2.013 g
- Na₂HPO₄·7H₂O 11.527 g
- NaH₂PO₄·H₂O 1.9318 g
- Ajustar a pH 7.3 y esterilizar

Amortiguador separador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL

- Tris 18.17g
- Ajustar a pH 8.8
- SDS al 20% 2 ml
- Aforar a 100 mL

Amortiguador TAE (tris – ácido acético – EDTA) 50X (1 L)

- Tris: 242g
- Ácido acético glacial hasta llegar al pH deseado
- 100 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0

Amortiguador TE (Tris-EDTA) 10X

- 5 mM Tris·HCl, pH 7.5
- 0.5 mM EDTA

Amortiguador de transferencia (Western- blot) 1L

- Amortiguador de glicina 10X 100ml
- Metanol 200 ml
- Aforar a 1L

Medio de inducción (sin uracilo) para *S. cerevisiae* – 1L

- Disolver en 600 mL
 - Medio sintético de levadura sin uracilo (Sigma Y1501) 1.92 g
 - Fuente de nitrógeno sin aminoácidos (Sigma Y0626) 6.7 g
- Aforar a 800 mL y esterilizar por autoclave
- En ambiente estéril, agregar 100 mL de rafinosa al 10% y 100 mL de galactosa al 20%, ambas soluciones esterilizadas por filtración (membrana de 0.25 µm de diámetro de poro)

Medio LB (Luria-Bertani) – 1L

- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Esterilizar por autoclave

Medio selectivo SC-U (sin uracilo) para *S. cerevisiae* – 1L

- Disolver en 900 mL
 - Medio sintético de levadura sin uracilo (Sigma Y1501) 1.92 g
 - Fuente de nitrógeno sin aminoácidos (Sigma Y0626) 6.7 g
- Aforar a 960 mL y esterilizar por autoclave
- Para preparar medio sólido, se agrega 20 g/L de agar
- En ambiente estéril, agregar 40 mL de glucosa al 50% esterilizada por filtración (membrana de 0.25 µm de diámetro de poro)

Medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) – 1L

- Disolver en 900 mL
 - Peptona bacteriológica 20 g
 - Extracto de levadura 10 g
- Aforar a 960 mL y esterilizar por autoclave
- Para preparar medio sólido, se agrega 20 g/L de agar
- En ambiente estéril, agregar 40 mL de glucosa al 50% esterilizada por filtración (membrana de 0.25 µm de diámetro de poro)

Solución de bloqueo (inmunodetección)

- Leche en polvo descremada 5%
- Tween-20 0.1%
- Disolver en PBS

Solución LiAc 10X – 0.1 L

- En 90 mL de agua desionizada
 - Acetato de litio 10.2 g
- Ajustar el pH a 7.5 con ácido acético glacial diluido

Solución 1x LiAc/ 40% PEG-3350/ 1X TE

- 1 volumen de la solución LiAc 10X
- 1 volumen de amortiguador TE 10X
- 8 volúmenes de PEG-3350 al 50%

Solución LiAc 1X/TE 0.5X – 100 mL

- 10 mL de la solución LiAc 10X
- 5 mL de amortiguador TE 10X
- Aforar a 100 mL

Solución PEG-3350 al 50% – 100 mL

- PEG- 3350: 50 g
- Aforar a 100 mL con H₂O desionizada
- Esterilizar por autoclave
- Almacenar a temperatura ambiente