



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Regulación de la formación de gránulos almacenadores de proteosoma en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*”.

Tesis

Que opta por el grado de:
Maestro en Ciencias

Presenta:

Bruno Axel González Núñez

Tutor principal

Dr. José Francisco Torres Quiroz
Instituto de Fisiología Celular

Comité tutor

Dr. Marcelino Arciniega Castro
Instituto de Fisiología Celular

Dr. José Fernando Lledías
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México, Febrero, 2022



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.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la dirección del doctor José Francisco Torres Quiroz en el laboratorio 102-Oriente del departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco la asesoría técnica de la doctora Paola Moreno Álvarez y el apoyo por parte de los miembros del laboratorio 102-Oriente: María José Blanco, Elías Nieto Zaragoza, Angélica Montes Trujillo, Rosario Martínez Velázquez, Dinorah Moreno, Francisco Amezola Chávez, así como también al doctor Leonardo Peraza Reyes y a los miembros de su laboratorio: el doctor Fernando Suaste Olmos, Raúl Navarro Espíndola y Melisa Álvarez Sánchez, por las facilidades y apoyo otorgados.

Agradezco al doctor Roberto Coria Ortega y a los miembros de su laboratorio: la doctora Laura Kawasaki Watanabe, Abiram Olivares Reséndiz, Diana García Chávez y Juliana Rojo, por las facilidades y apoyo otorgados con el microscopio de epifluorescencia, la asistencia y el préstamo de equipos, material y reactivos, así como al doctor Antonio Peña Díaz por el préstamo de equipos.

Reconozco el apoyo técnico del doctor Abraham Rosas Arellano para el uso de microscopía confocal.

Este proyecto contó con asesoría técnica del personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, la doctora Laura Ongay Larios, la bióloga María Guadalupe Codiz Huerta y la maestra en ciencias Minerva Mora Cabrera.

Este trabajo se realizó gracias a DGAPA-UNAM a través del proyecto UNAM-PAPIIT IN209219, IN208922. Se agradece a CONACyT y PAEP por el apoyo económico otorgado.

Agradecimientos personales.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio por hacerme sentir como en casa y enseñarme a disfrutar de un mundo desconocido para mí, así como me alegro por no solamente terminar esta etapa con un título en mis manos, sino también con amistades sinceras.

Me encuentro profundamente agradecido con mi tutor Francisco Torres Quiroz porque no solamente me dio la posibilidad de aprender y de crecer, sino que me ayudó en uno de los momentos más difíciles de mi vida y de quien de no haber recibido tan inmenso apoyo, no hubiera podido continuar con mis estudios.

Agradezco a toda mi familia por siempre impulsar e inculcar mi superación personal y profesional, principalmente estoy agradecido con mi hermano Yaen, por siempre estar mi lado apoyando hasta la más tonta decisión que tome, siempre orgulloso al presumir mis logros, con mi tía Angélica, de quien siempre recibimos un amor incondicional, por ver en mí un hijo y darme todo para que esté mejor, con mis suegros Daniel Badillo y Cecilia Reyes, de los que recibí un inmenso apoyo desde mi licenciatura como médico y durante mi maestría y quienes se han vuelto parte de mi familia en mi corazón, a mi pareja Yanei, quien me ha apoyado durante muchos años, con quien he compartido gran parte de mi vida y que junto a la persona que más he amado ha sido mi más grande apoyo y de igual manera ha sido un importante apoyo durante mis estudios.

Por último, quiero agradecer a la persona que siempre ha sido la protagonista de todos mis logros, quien nunca titubeó en apoyar y defender cada gran o absurda decisión de mi vida, aquella persona que siempre confió en mí y que cada día se aseguró de dar todo por nosotros, aquella guerrera que sacó a una familia adelante y que siempre estuvo presente en todo pequeño logro o gran fracaso, aquella que jamás falló un solo día en reiterar palabras de amor, aquella que impulsó y vio formarse el sueño de estudiar este posgrado, que estuvo en todo el proceso, orgullosa de mis logros y que al día de hoy no dejó de extrañar y pensar a cada momento.

Esta tesis al igual que cada parte de mi vida por siempre pertenecen a ella, gracias por todo mi más grande tesoro. Hasta siempre mamá.

Índice

1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1 Proteosoma: estructura y función	9
2.1.1 Complejo 19S estructura y función	10
2.1.2 Ensamblado del complejo 19S	11
2.1.3 Complejo 20S estructura y función	11
2.1.4 Ensamblado del complejo 20S	12
2.1.5 Ensamblado del proteosoma 26S	13
2.2 Regulación del proteosoma	13
2.2.1 Síntesis	13
2.2.2 Modificaciones postraduccionales	14
2.2.3 Degradación de proteosoma	14
2.3 Ubicación celular del proteosoma y dinámica proteosomal	15
2.4 Factores involucrados en la dinámica proteosomal	18
2.4.1 pH intracelular	18
2.4.2 Efecto de la acetilación de subunidades proteosomales	19
2.4.3 Blm10	19
2.5 Importación nuclear del proteosoma	21
2.6 Transporte proteosomal en citoplasma	22
2.7 Regiones de baja complejidad	22
2.8 Proteínas Zds1 y Zds2	23
2.9 <i>Saccharomyes cerevisiae</i>	24
3. Antecedentes del laboratorio	25
4. Preguntas de investigación	27
5. Hipótesis	27

6. Objetivo generales	27
7. Objetivos específicos	27
8. Materiales y métodos	28
8.1 Construcción de cepas transformantes para valorar el papel de los extremos carboxilo terminal de subunidades del 20S	28
8.1.1 PCR para fusión de γ -GFP y m-Cherry a subunidades proteosomales	28
8.1.2 PCR para delección de extremo carboxilo terminal de subunidades Pup2 (α 5) y Pre10 (α 7)	30
8.1.3 transformación de células para generar cepas con fusión de γ -GFP y m-Cherry a subunidades proteosomales y delección de extremo carboxilo terminal de subunidades Pup2 (α 5) y Pre10 (α 7)	33
8.2 Construcción de cepas transformantes para valorar el papel de los genes <i>ZDS1</i> , <i>ZDS2</i> y <i>BLM10</i> en la dinámica proteosomal	36
8.2.1 PCR para delección de los genes <i>ZDS1</i> , <i>ZDS2</i> y <i>BLM10</i>	36
8.2.2 transformación de células para generar cepas con fusión de γ -GFP y m-Cherry a subunidades proteosomales y delección de extremo carboxilo terminal de subunidades Pup2 (α 5) y Pre10 (α 7)	38
8.3 Confirmación de cepas transformantes mediante PCR de confirmación	40
8.3.1 PCR de confirmación de cepas transformantes	41
8.3.2 Electroforesis de productos de PCR de confirmación y secuenciación	45
8.4 Secuenciación de producto de PCR de confirmación de cepas	48
8.5 Crioconservación de las cepas transformantes	49
8.6 Fotografías con microscopio de epifluorescencia de cepas	50
8.6.1 Preparación de muestras a observar en microscopio de epifluorescencia	50
8.6.2 Fijación de muestras con FS-PBS	51
8.6.3 Tinción de ácidos nucleicos	51
8.7 Análisis de fotografías obtenidas en microscopio de epifluorescencia	52
8.8 Estudio de viabilidad de cepas silvestre- α , Pup2 Δ C, Pre6 Δ C, Pre9 Δ C, Pre10 Δ C, en la cepa BY4742	53

8.9 Ensayo de crecimiento por diluciones seriadas de las cepas: silvestre- α , Pup2 Δ C, Pre6 Δ C, Pre9 Δ C y Pre10 Δ C, en medios que inducen diferentes tipos de estrés, en la cepa BY4742 ----- 54

8.10 Curvas de crecimiento de las cepas: silvestre- α , $\Delta zds1$, $\Delta zds2$, $\Delta blm10$ y Pre10 Δ C, en la cepa BY4742 ----- 56

9. Resultados ----- 58

9.1 Función de los extremos carboxilo terminal en la localización celular del proteosoma durante la dinámica proteosomal ----- 58

9.1.1 La delección del extremo carboxilo terminal de las subunidades Pup2 y Pre10 afecta la localización del proteosoma en fase estacionaria ----- 58

9.2 Identificación de repercusiones biológicas en la delección de los extremos carboxilo terminal, de subunidades Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10----- 78

9.2.1 La cepa Pre10 Δ C muestra una mayor viabilidad con respecto a la cepa silvestre. ----- 78

9.2.2 La cepa Pre9 Δ C muestra mayor resistencia a estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno. ----- 80

9.3 Función de los genes ZDS1, ZDS2 y BLM10 en la dinámica proteosomal ----- 85

9.3.1 La delección del gen *ZDS1* afecta la localización del complejo 20S, pero no la localización del complejo 19S, en el fondo BY4742 ----- 86

9.3.2 La delección del gen *ZDS2* no afecta la localización de los complejos 19S y 20S, en la cepa BY4742 ----- 90

9.3.3 La delección del gen *BLM10* no afecta la localización de los complejos 19S y 20S, en el fondo BY4742 ----- 93

9.3.4 La localización del complejo 20S, en la delección de los genes *ZDS2* y *BLM10*, es distinta en las cepas BY4741 y BY4742 ----- 96

9.4 Pre10 Δ C muestra un crecimiento más lento en comparación a la cepa silvestre, posterior a la inducción de estrés por ausencia de fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno ----- 98

10. Discusión ----- 103

10.1 Los extremos carboxilo terminal de las subunidades proteosomales Pup2 y Pre10 son necesarios para que ocurra una adecuada dinámica proteosomal ---- 103

10.2 Los genes ZDS1, ZDS2 y BLM10 son necesarios para que ocurra una adecuada dinámica proteosomal, de manera distinta en las cepas BY4741 y BY4742 -----	109
11. Conclusiones -----	112
12. Perspectivas -----	113
12.1 Papel de los extremos carboxilo terminal de subunidades del 20S en la dinámica proteosomal -----	113
12.2 Papel de los genes ZDS1, ZDS2 y BLM10 en la dinámica proteosomal-----	113
13. Anexos -----	115
13.1 Preparación de medios y buffer -----	115
13.2 Plásmidos -----	116
13.3 Secuencias de desoxioligonucleótidos -----	118
13.4 Cepas para valorar el papel de los extremos carboxilo terminal de subunidades del 20S -----	121
13.5 Cepas para valorar el papel de los genes ZDS1, ZDS2 y BLM10 en la dinámica proteosomal -----	122
13.6 Localización de los complejos 19S y 20S en delección del extremo carboxilo terminal de Pup2 -----	123
13.7 Localización de Pre10 con y sin extremo carboxilo terminal en fondo genético BY4741 -----	124
13.8 Localización de Pre10 con y sin extremo carboxilo terminal en estrés oxidativo -----	125
13.9 Re-localización nuclear de Pre10 a las 2 horas de re-suspensión en medio con fuentes de carbono en la delección del gen ZDS1 -----	126
13.10 Comparación gráfica de la dinámica proteosomal de las distintas cepas usadas --	127
14. Bibliografía -----	130

1. RESUMEN

El proteosoma es un complejo proteico dependiente de ATP, que se encuentra en células eucariotas y se encarga de degradar proteínas mal plegadas o dañadas, las cuales se encuentran marcadas con una cadena de poliubiquitina.

El proteosoma 26S (llamado así por su coeficiente de sedimentación) se compone de dos complejos denominados: partícula central 20S y partícula reguladora 19S, que a su vez se componen de diversas subunidades. Estos complejos se localizan en el núcleo, cuando existen fuentes de carbono en el medio y la célula se encuentra dividiéndose activamente. Por el contrario, cuando hay ausencia de fuentes de carbono en el medio y la célula se encuentra en un estado quiescente, el proteosoma 26S se desensambla en los complejos 19S y 20S. Estos complejos son exportados juntos hacia el citoplasma, donde forman agregados proteicos insolubles, no asociados a membrana, llamados gránulos almacenadores de proteosoma (PSGs por sus siglas en inglés).

El cambio de localización celular del proteosoma 26S y de los complejos proteosomales 19S y 20S es reversible, según la disponibilidad de fuentes de carbono en el medio. Los complejos regresan al núcleo cuando hay presencia de fuentes de carbono. A este proceso se le ha llamado dinámica proteosomal.

Actualmente no se conocen todos los mecanismos, ni las proteínas involucradas en la dinámica proteosomal.

En este proyecto, demostramos que los extremos carboxilo terminal de las subunidades $\alpha 5$ (Pup2) y $\alpha 7$ (Pre10) son indispensables para la correcta localización del proteosoma, durante la dinámica proteosomal, que ocurre por disponibilidad de fuentes de carbono en el medio, siendo indispensables para que los complejos proteosomales puedan salir del núcleo y agregarse en PSGs durante la fase estacionaria.

De igual manera, demostramos que los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*, son indispensables para la correcta agregación del complejo 20S en PSGs, durante la fase estacionaria, sin afectar la agregación del complejo 19S en PSGs. Este fenómeno ocurre de manera distinta en las cepas BY4741 y BY4742.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Proteosoma: estructura y función

El proteosoma es un complejo proteico multicatalítico dependiente de ATP, que actúa como proteasa y forma parte del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés), siendo la vía principal de degradación de proteínas citosólicas y nucleares en células eucariotas (Ravid *et al.*, 2008; Finley, 2009; Livneh *et al.*, 2016).

El proteosoma 26S está conformado por dos complejos, caracterizados por sus coeficientes de sedimentación, que son denominados: partícula central “20S” y partícula reguladora “19S”. Estos complejos se componen de varias subunidades, son ensamblados de manera independiente y cumplen funciones distintas, al conformar el proteosoma 26S, que es el que tiene la actividad de degradar proteínas ubiquinadas (Hochstrasser, 1996; Baumeister *et al.*, 1998).

El marcaje de ubiquitina es un proceso dependiente de energía mediado por tres enzimas (E1, E2 y E3) (Hershko & Ciechanover, 1998) (figura 1). La ubiquitinación ocurre entre el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina, en el residuo G76 y un residuo de lisina de la proteína blanco a degradar. A la ubiquitina se le pueden agregar más ubiquitinas para formar una cadena de poliubiquitina, por enlaces peptídicos entre los residuos K48 y G76 de ubiquitinas adyacentes.

La unión de poliubiquitina en proteínas blanco, generado por enlaces en el residuo 48 de lisina, es el principal marcaje para degradación de proteínas por el proteosoma (Finley *et al.*, 1987; Chau *et al.*, 1989), requiriendo un mínimo de cuatro ubiquitinas unidas a la proteína blanco para que sea reconocida y degradada por el proteosoma (Thrower *et al.*, 2000).

Las proteínas ubiquitinadas, blancos a degradación, son reconocidas por el complejo 19S, los cuales remueven este marcaje de ubiquitina, las desdoblan y degradan en pequeños péptidos (Yao, 2002; Peth *et al.*, 2010; Rosenzweig *et al.*, 2012). Posteriormente son translocadas al 20S que tiene la actividad catalítica, en un proceso dependiente de ATP que ocurre en el 19S, donde estas proteínas pasan a través de un poro central hacia la cámara catalítica del complejo 20S (Rabl *et al.*, 2008).

Las proteínas translocadas hacia el complejo 20S son degradadas por las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$, que en su forma activa tienen un residuo de treonina catalítico N-terminal, que les confiere tres distintos tipos de actividad: $\beta 1$ similar a caspasa, $\beta 2$ similar a tripsina y $\beta 3$ similar a quimotripsina. Interacciones alostéricas entre los tres sitios activos dan como resultado un mecanismo denominado mordida-masticar (bite-chew en inglés) por el cual los sustratos, que se encuentran en el sitio activo del complejo 20S, son degradados (Heinemeyer *et al.*, 1997; Dick *et al.*, 1998; Kisselev *et al.*, 1999)

En levadura las proteínas que son degradadas principalmente son proteínas de vida corta, en su mayoría asociadas a progresión de ciclo celular, mientras que las proteínas de vida larga no son degradadas por proteosoma.

En la figura 1 se muestra un panorama general del funcionamiento del UPS.

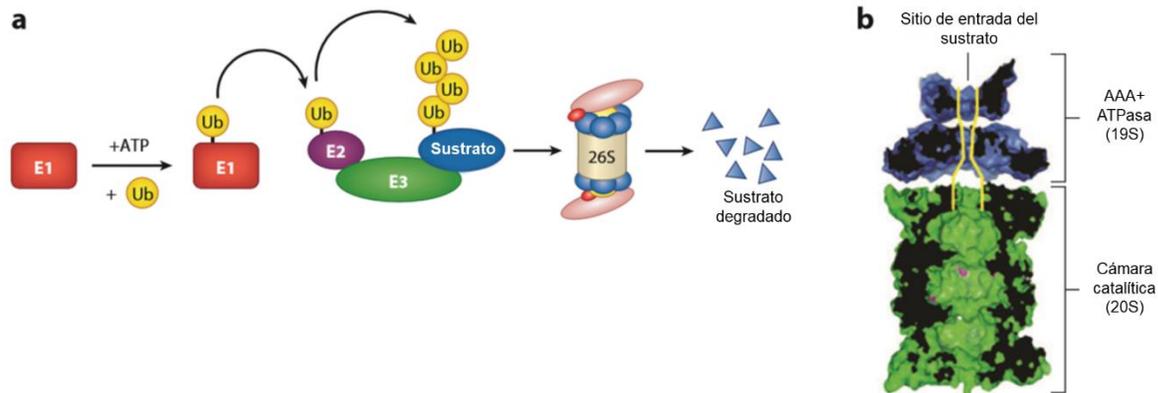


Figura 1. Panorama general de la vía de degradación de proteínas mediadas por ubiquitina, a través del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, por las siglas en inglés de “Ubiquitine-Proteasome System”).

En a) se muestra el proceso de ubiquitinación, mediado por las enzimas E1, E2 y E3 en un proceso dependiente de ATP, las cuales son reconocidas y degradadas por el proteosoma 26S. b) Se muestra el proteosoma 26S compuesto de sus dos complejos 19S RP (Regulatory particle por sus siglas en inglés) en azul y 20S CP (Core particle por sus siglas en inglés) en verde, la vía de entrada de sustrato desde el 19S hacia el centro catalítico del 20S se encuentra marcado en color amarillo. Los sitios catalíticos de la unidad CP se representan como puntos morados. Imagen tomada de Tomko & Hochstrasser, 2013.

2.1.1 Complejo 19S estructura y función

El complejo 19S proteosomal forma parte de una antigua superfamilia de proteasas dependiente de ATP, caracterizadas por un anillo ATPasa AAA+ (Sauer & Baker, 2011), que actúa regulando la función proteolítica proteosomal, participando en los procesos de: identificación, unión, desubiquitinación, desdoblamiento y translocación de los sustratos al sitio catalítico.

El 19S se encuentra cubriendo al complejo 20S en su porción superior e inferior y se conforma de un total 19 subunidades, las cuales se encuentran formando dos subcomplejos: la base y la tapa (Rosenzweig *et al.*, 2008).

La base del complejo 19S consiste en seis subunidades reguladoras de la familia de las AAA+ ATPasas, denominadas Rtp1-Rtp6 y cuatro subunidades reguladoras no ATPasas, denominadas Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13 (Glickman *et al.*, 1998; Livneh *et al.*, 2016). Las subunidades Rtp1-Rtp6 son AAA ATPasas parálogas que forman un anillo heterohexamérico, el cual se encuentra en contacto directo con la superficie del anillo α del complejo 20S y ejerce la fuerza de desdoblamiento dependiente de ATP necesaria para la translocación de los sustratos, hacia el interior de la cámara del complejo 20S (Tomko *et al.*, 2010).

Se han asociado algunas funciones específicas a ciertas subunidades de la base del complejo 19S siendo:

- Rpn10 y Rpn13 funcionan como receptores de poliubiquitina, uniéndose directamente con la ubiquitina que se encuentra en la proteína marcada, blanco a degradar (Fu *et al.*, 1998; Husnjak *et al.*, 2008).
- Rpn1 tiene contactos con la superficie externa del anillo de ATPasa y tiene la función de servir como plataforma de carga para los sustratos que van a entrar (Shi *et al.*, 2016)

La tapa del complejo 19S está compuesta de nueve subunidades: Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 y Rpn15, que forman una estructura con forma de herradura, la cual tiene la función de desubiquitinar los sustratos entrantes y de mantener unidos a los complejos 19S y 20S (Tomko & Hochstrasser, 2013). La subunidad Rpn11 es la que se encarga de desubiquitinar los sustratos a degradar, junto con otras enzimas desubiquitinantes (Verma *et al.*, 2002).

2.1.2 Ensamblado del complejo 19S

El proceso de ensamblado del complejo 19S comienza con el ensamblado de la base, que es mediado por las chaperonas Hsm3, Nas2, Nas6 y Rpn14, las cuales ordenan a las subunidades en un anillo e inhiben su actividad catalítica (ATPasa), ensamblándolas en un orden desconocido (Funakoshi *et al.*, 2009).

El proceso de ensamblado de la tapa inicia con la formación de dos módulos, compuestos de las subunidades Rpn5-6, Rpn8-9, Rpn11 (Sharon *et al.*, 2006; Estrin *et al.*, 2013) y otro módulo que consiste de las subunidades Rpn3, Rpn7 y Sem1 (Sharon *et al.*, 2006; Fukunaga *et al.*, 2010; Tomko & Hochstrasser, 2014) estos son unidos por Rpn3 y Rpn5 para que finalmente Rpn12 complete el ensamblado de la tapa, uniéndola con la base (Tomko *et al.*, 2015).

En levaduras también se encuentra Adc17, una chaperona inducida por estrés que facilita el armado de 19S en diferentes condiciones de estrés (Hanssum *et al.*, 2014) y Hsp90 que puede estar involucrado en la integridad de la tapa (Imai *et al.*, 2003).

2.1.3 Complejo 20S estructura y función

El complejo 20S está compuesto por cuatro anillos apilados axialmente, que forman una estructura en forma de barril, cada uno de los anillos se conforma por siete subunidades α externas y siete subunidades β internas, que se encuentran altamente conservadas entre levaduras y mamíferos y están codificadas por 14 genes distintos (Tomko & Hochstrasser, 2013; Livneh *et al.*, 2016; Marshall & Vierstra, 2019).

Las subunidades α son las encargadas de regular la entrada de sustratos al sitio catalítico, bloquear la entrada de sustratos no ubiquinados y organizar la salida de los productos, formando una tapa con sus extremos amino terminal (Smith *et al.*, 2007), en un proceso mediado por el extremo amino terminal de la subunidad α 3, el cual es

modulado por la unión de reguladores de proteosoma como lo son: complejo 19S, PA28, PA200, ECM29 y PI3 (Smith *et al.*, 2007).

Las subunidades β se localizan internamente, están delimitadas por los dos anillos α superior e inferiormente y son sintetizadas como pro-péptidos, de las cuales $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ son las que presentan la actividad catalítica del complejo 20S (Arendt *et al.*, 1997).

2.1.4 Ensamblado del complejo 20S

El ensamblado del complejo 20S empieza con la formación de un anillo α , que es regulado y dirigido por dos complejos heterodiméricos chaperonas denominados Pba1/Pba2 y Pba3/Pba4 (Stadtmueller *et al.*, 2012). El proceso inicia con la interacción de las proteínas $\alpha 5$ y $\alpha 7$ con el complejo Pba1/Pba2, para luego incorporar las demás subunidades.

El complejo Pba3/Pba4 interviene previniendo la incorporación de subunidades α incorrectas, la dimerización espontánea de las subunidades α y la formación de un anillo completo; se encuentra unido a la porción interna del anillo hasta que se completa la formación del anillo α heptamérico (Hirano *et al.*, 2005; Kusmierczyk *et al.*, 2008; Stadtmueller *et al.*, 2012).

Una vez ensamblado el anillo α heptamérico, sirve como base para iniciar el ensamble de las subunidades β , que inicia con la incorporación de la subunidad $\beta 2$ al anillo α , seguido de $\beta 3$, que separa al complejo chaperona Pba3/Pba4 del anillo α ; luego se agregan las demás subunidades hasta integrarse, por último, la subunidad $\beta 6$ (Murata *et al.*, 2009). Este proceso es mediado y regulado por la chaperona Ump1, una proteína citosólica y nuclear que evita la dimerización de precursores con grupos de subunidades β incompletas y previene la actividad prematura de las subunidades catalíticas (Ramos *et al.*, 1998)

Al finalizar el ensamblado del anillo β se obtiene como resultado un complejo proteico compuesto de un anillo α y un anillo β con subunidades inmaduras, el cual recibe el nombre de mitad de proteosoma (half-proteosome en inglés). Ump1 genera un punto de control para evitar la unión prematura de estos half-proteosome, permitiendo su dimerización cuando están correctamente ensamblados (Li *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2009).

Al final del proceso de ensamblado las chaperonas Pba1/ba2 y Ump1 son degradadas por el 20S, gracias a su actividad proteolítica de proteínas no ubiquinadas independiente del complejo 19S (Ramos *et al.*, 1998). Cuando el complejo 20S madura, ocurren cambios conformacionales en las colas amino terminales de los anillos α externos, cerrando el poro central del anillo y manteniendo al 20S en estado latente (Groll *et al.*, 2000)

2.1.5 Ensamblado del proteosoma 26S

En células eucariotas el ensamblado del proteosoma 26S es un proceso complejo que involucra la participación intrínseca de los complejos 19S y 20S, y la participación de las proteínas chaperonas involucradas en su ensamblaje; pudiendo ocurrir en las configuraciones RP-CP 26S o RP-CP-RP 30S (Tomko & Hochstrasser, 2013; Livneh *et al.*, 2016; Marshall & Vierstra, 2019).

Algunos autores proponen que el ensamblaje de los complejos 19S y 20S ocurre por acoplamiento de extremos carboxilo terminal de varias subunidades Rpt (del anillo del complejo 19S), en espacios formados entre subunidades α de complejos 20S adyacentes y que, la unión de ATP al anillo del 19S es suficiente para estabilizar la interacción entre el anillo ATPasa del 19S y el anillo alfa del 20S (Smith *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

Actualmente se sabe que la chaperona Hsp90 está involucrada en la unión de los complejos 19S y 20S, sin conocer el mecanismo involucrado (Imai *et al.*, 2003) y que la proteína Ecm29 funge como un punto de control del ensamblaje del 26S (Lehmann *et al.*, 2010), además de que Ecm29 desensambla al proteosoma 26S en los complejos 19S y 20S, bajo condiciones de estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2010)

2.2 Regulación del proteosoma

La regulación el proteosoma ocurre a distintos niveles, incluyendo: síntesis, velocidad de ensamblado/desarmado, modificaciones postraduccionales, regulación de su actividad proteolítica, cambios conformacionales, localización subcelular, reclutamiento a distintos organelos y degradación (Livneh *et al.*, 2016).

2.2.1 Síntesis

Con respecto a la síntesis, las subunidades que componen a los complejos inmaduros tardan 30 minutos en ser sintetizados en cepas silvestres de levadura, que se encuentran en división activa (Marguerat *et al.*, 2012) y es el segundo complejo proteico más abundante, con una vida media de dos semanas (Marguerat *et al.*, 2012)

El principal factor de transcripción de los genes proteosomales es Rpn4 (subunidad no integral del proteosoma) (Xie & Varshavsky, 2001; Ju *et al.*, 2010), sus niveles correlacionan con la actividad del proteosoma (Xie & Varshavsky, 2001) y es transcrito en situaciones de estrés (oxidativo, resistencia a drogas, choque térmico) uniéndose río arriba de los genes proteosomales, para inducir su expresión.

Algunos estudios han demostrado que la inhibición del proteosoma con la subsecuente deglucosilación, ubiquitinización y degradación parcial, genera la translocación del factor de transcripción Nrf1 al núcleo, con la formación de *novo* de subunidades proteosomales (Tomko & Hochstrasser, 2013; Livneh *et al.*, 2016; Marshall & Vierstra, 2019).

2.2.2 Modificaciones postraduccionales

En levadura se han reportado más de 345 modificaciones postraduccionales en el proteosoma 26S, sin embargo, se desconoce la mayoría de los mecanismos involucrados por los cuales esas modificaciones ejercen su efecto en el proteosoma, así como también el efecto de estas modificaciones (Tomko & Hochstrasser, 2013; Livneh *et al.*, 2016; Marshall & Vierstra, 2019).

Algunas de los efectos que ejercen ciertas modificaciones postraduccionales en el proteosoma de levadura son:

- Acetilación de N-terminal de las subunidades por N-acetiltransferasas, regulan la localización de proteosoma durante el envejecimiento (Van Deventer *et al.*, 2015).
- Ubiquitinización del proteosoma como marcaje para su degradación en lisosomas, regulación de su actividad proteolítica y de la especificidad de unión a sustrato.
- Fosforilación por proteína cinasa A (PKA) que aumenta el armado del 26S y su actividad proteolítica.

2.2.3 Degradación de proteosoma

Bajo diversos mecanismos el UPS puede degradar sus propias subunidades disfuncionales, pero cuando su capacidad es sobrepasada, estas son transportadas hacia Depósitos de Proteínas Insolubles (IPOD, por las siglas en inglés de *Insoluble Protein Deposit*).

Estos IPOD se encuentran adyacentes a la estructura pre-autofagosomal y funcionan como depósitos de proteínas mal plegadas, donde se localizan las proteínas, cuando se sobrepasan los mecanismos involucrados para degradarlas.

Este proceso ocurre con subunidades proteosomales mal plegadas, comprometidas estructuralmente o no ensambladas en sus respectivos complejos; es mediado por Hsp42 (Peters *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018) donde, las subunidades proteosomales que se encuentran en los IPOD son ubiquitinadas para posteriormente ser degradadas por autofagia selectiva, en un proceso denominado proteofagia, que es mediado por Cue5 y Atg8 (Marshall *et al.*, 2015; Cohen-Kaplan *et al.*, 2016).

Además de la degradación de subunidades proteosomales por el UPS y por proteofagia, puede ocurrir degradación del proteosoma por autofagia inespecífica, cuando el proteosoma se encuentra inactivo y hay ausencia de aminoácidos esenciales en el medio (Marshall *et al.*, 2015; Cohen-Kaplan *et al.*, 2016).

2.3 Ubicación celular del proteosoma y dinámica proteosomal

Estudios realizados mediante fusiones de proteínas reporteras fluorescentes han aportado información acerca de la localización celular de las subunidades del proteosoma en levadura (Enenkel *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 2002; Isono *et al.*, 2007), demostrando que su localización es nuclear o citoplasmática, según la fase de crecimiento en el que se encuentren, dependiendo de la disponibilidad de fuentes de carbono en el medio (Laporte *et al.*, 2008).

En células que se encuentran en fase exponencial (dividiéndose activamente), en un medio rico en fuentes de carbono fermentables y no fermentables, el 80% del proteosoma se encuentra en el núcleo (Russell *et al.*, 1999; Laporte *et al.*, 2008), pero UPS se reorganiza cuando existe un agotamiento gradual de glucosa, con una disminución secundaria de ATP durante la fase estacionaria (Gray *et al.*, 2004), cambiando de localización.

Durante el proceso de entrada hacia G_0 por depleción de nutrientes, el proteosoma 26S es desarmado en los complejos 19S y 20S (Bajorek *et al.*, 2003) que salen del núcleo hacia el citoplasma, donde forman unas estructuras llamados gránulos almacenadores de proteosoma (*Proteasome storage granules PSGs* por sus siglas en inglés).

Estos gránulos almacenadores de proteosoma son agregados proteicos móviles citoplasmáticos (en menor medida perinucleares inmóviles), no solubles y no asociados a membranas, en los que solamente se encuentran los complejos 19S, 20S inactivos y armados (Bajorek, 2003) y la proteína reguladora del 20S Blm10 (figura 2) (Laporte *et al.*, 2008).

Este proceso de cambio de localización o re-localización de las subunidades desde el núcleo hacia los gránulos almacenadores de proteosoma ocurre rápidamente, iniciando a las 4 horas de depleción de fuentes de carbono y es reversible, pudiendo volver al núcleo cuando hay fuentes de carbono fermentables o no fermentables en el medio (Laporte *et al.*, 2008).

La re-localización de subunidades proteosomales hacia el núcleo, no ocurre por síntesis y ensamblado de nuevas subunidades, sino que se trata de los complejos previamente formados agregados en los PSGs, los que vuelven a localizarse en el núcleo (figura 3), tomando 15 minutos aproximadamente desde que hay fuentes de carbono disponibles, para que la mayoría de los proteosomas se encuentren nuevamente en el núcleo (Laporte *et al.*, 2008).

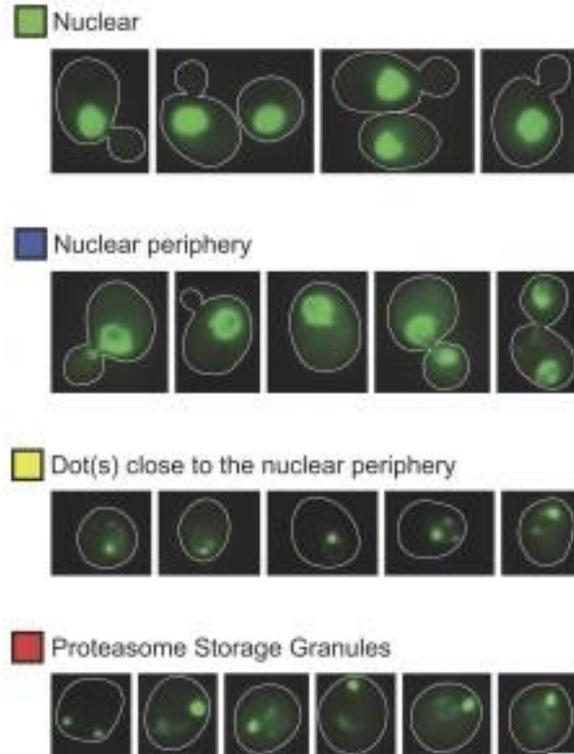


Figura 2. Dinámica de localización proteosomal en *S. cerevisiae*.

La localización del proteosoma es distinta durante el ciclo celular, dependiendo de la disponibilidad de fuentes de carbono fermentables y no fermentables que se encuentren en el medio, siendo predominantemente nuclear cuando hay fuentes de carbono disponibles (la célula se encuentra dividiéndose activamente) y citoplasmática, en PSGs, cuando no hay fuentes de carbono en el medio (la célula se encuentre en fase estacionaria).

En la imagen se muestra el cambio de localización proteosomal (Subunidad Pre6 del 20S CP fusionada a GFP) con respecto a la disponibilidad de fuentes de carbono, observando como ocurre la dinámica proteosomal, pasando de localización nuclear a gránulos almacenadores de proteosoma, siendo este un proceso gradual.

Imagen tomada y modificada de Laporte *et al.*, 2008.

A este proceso de agregación y desagregación del proteosoma, con cambio de localización celular, que depende de la disponibilidad de fuentes de carbono fermentables y no fermentables en el medio, se le ha denominado dinámica proteosomal y se cree que, la agregación de subunidades en PSGs, sirve para evitar que las subunidades proteosomales sean degradadas, cuando las condiciones del medio no son favorables, para posteriormente ser incorporadas al núcleo al haber fuentes de carbono, permitiendo evitar reponer grandes cantidades de proteosoma y evitando un retraso en la re-entrada al ciclo celular (Marshall & Vierstra, 2018).

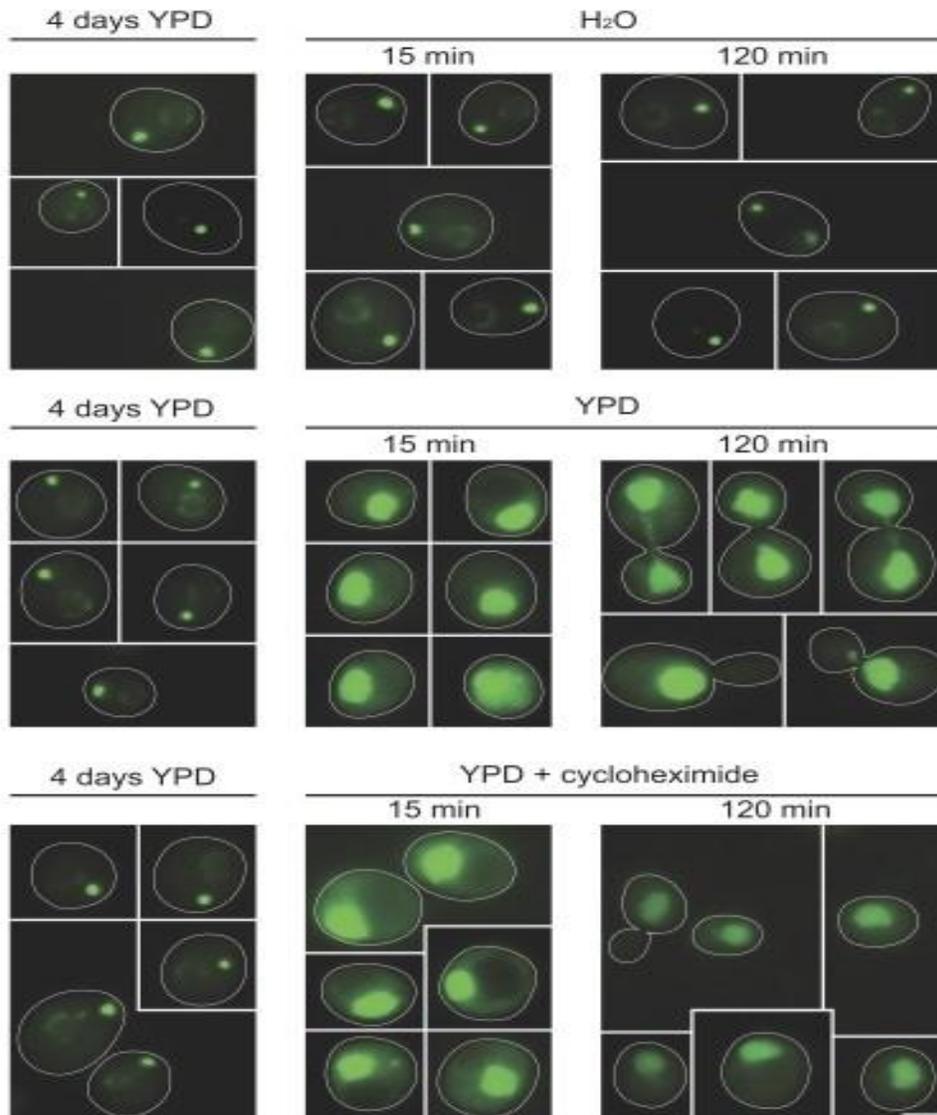


Figura 3. Re-localización del proteosoma hacia el núcleo en cuando se suspenden células en medio con fuentes de carbono.

En la imagen se muestra la re-localización del proteosoma al núcleo de células en fase estacionaria al re-suspender en medio con fuentes de carbono.

Arriba se muestran células en fase estacionaria re-suspendidas en agua durante 15 o 120 minutos, donde la localización del proteosoma sigue siendo granular (PSGs); en medio se muestran células en fase estacionaria que fueron re-suspendidas durante 15 o 120 minutos en medio YPD fresco, donde se ve que la localización del proteosoma es en su mayoría nuclear desde los 15 minutos posteriores a re-suspender en medio con fuentes de carbono; abajo se muestran células en fase estacionaria re-suspendidas en medio YPD con cicloheximida (para inhibir la síntesis de proteínas), donde también hay localización del proteosoma es en su mayoría nuclear desde los 15 minutos, lo que sugiere que la re-localización de la señal hacia el núcleo no depende de síntesis de nuevas subunidades.

Imagen tomada y modificada de Laporte *et al.*, 2008.

2.4 Factores involucrados en la dinámica proteosomal.

2.4.1 pH intracelular

Como se ha comentado previamente, los PSGs se forman en condiciones de ausencia de fuentes de carbono (Laporte *et al.* 2008), que se acompaña de una caída rápida en el pH citosólico (pHi) (Martínez & Kane, 2008; Dechant *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Peters y colaboradores (2013) se identificó que algunos genes que regulan el pH intracelular (pHi), incluyendo varias subunidades del complejo V-ATPasa, una bomba de protones vacuolar que regula el pH vacuolar y citosólico (pHi), bombeado protones hacia el interior del organelo (Dechant *et al.*, 2010), están involucrados en la localización proteosomal.

En particular, estos autores demostraron que en la ausencia del gen *VMA2*, que codifica para una subunidad de la ATPasa vacuolar, la formación de PSGs ocurre antes con respecto a su control y que al restablecer la fuente de carbono la re-localización del proteosoma se retrasa (Dechant *et al.*, 2010).

2.4.2 Efecto de la acetilación de subunidades proteosomales.

Van Deventer y colaboradores (2015) valoraron la relación de localización de proteosoma con respecto a la edad replicativa celular, definida como el número de células hijas producidas por una célula madre (Mortimer *et al.*, 1959; Kaeberlein, 2010) y las N-acetiltransferasas NatA, NatB y NatC, acetiltransferasas N-terminal encargadas de acetilar los extremos amino terminal de diversas proteínas, siendo NatA, NatB y NatC los principales complejos proteicos que llevan a cabo esta función en levadura (Starheim *et al.*, 2012).

Encontraron que, la formación de gránulos está inversamente relacionada a la edad replicativa celular y que hay un enriquecimiento nuclear proteosomal, que correlaciona positivamente con la edad replicativa (Marshall & Vierstra, 2019) y que en la ausencia de subunidades que conforman a ciertas acetiltransferasas N-terminal, se encuentra un enriquecimiento nuclear de proteosoma, cuando las células se encuentran en fase estacionaria, con distintos grados de formación de gránulos almacenadores de proteosoma.

Puntualmente, la delección de las subunidades Nat3 de NatB y Mak3 de NatC tienen un fenotipo con mayor localización nuclear proteosomal, con un comportamiento variable, donde en ausencia de Mak3 (NatC) no se ve muy afectada la formación de gránulos almacenadores de proteosoma, mientras que la ausencia de Nat3 (NatB) se disminuye considerablemente la formación de gránulos almacenadores de proteosoma, además de que, en la ausencia de Nat3, el enriquecimiento nuclear de proteosoma correlaciona positivamente con la edad replicativa celular (Van Deventer *et al.*, 2015).

2.4.3 Blm10

Blm10 es una proteína que cubre el anillo α del CP como un domo, uniéndose preferencialmente al complejo 20S pre-activado, en el cual los anillos α se encuentran desordenados (Lehmann *et al.*, 2008), formando diversas estructuras (Blm10-CP, Blm10-CP-Blm10 o Blm10-CP-RP) (Schmidt *et al.*, 2005) y funge como regulador la función catalítica intrínseca del complejo 20S, según la estructura que forme al unirse con el 20S (Sadre-Bazzaz *et al.*, 2010).

Cuando se Blm10 se une al 20S, formando el complejo Blm10-CP-Blm10, el complejo 20S proteosomal se comporta como una enzima latente, con anillos α cerrados y cuando se une formando el complejo Blm10-CP, el 20S tiene una actividad aumentada de corte o escisión hacia péptidos cromogénicos (Schmidt *et al.*, 2005).

La presencia de Blm10 es importante para importar al 20S al núcleo (Weberrus *et al.*, 2013), para que el 20S se agregue en gránulos almacenadores de proteosoma en fase estacionaria y que el complejo 20S re-localice al núcleo en la re-suspensión en fuentes de carbono de células estacionarias (figura 4), además se ha encontrado que Blm10 confiere resistencia contra daño de DNA y estrés proteotóxico, y contribuye a un mejor fitness celular, durante el envejecimiento (Doherty *et al.*, 2012).

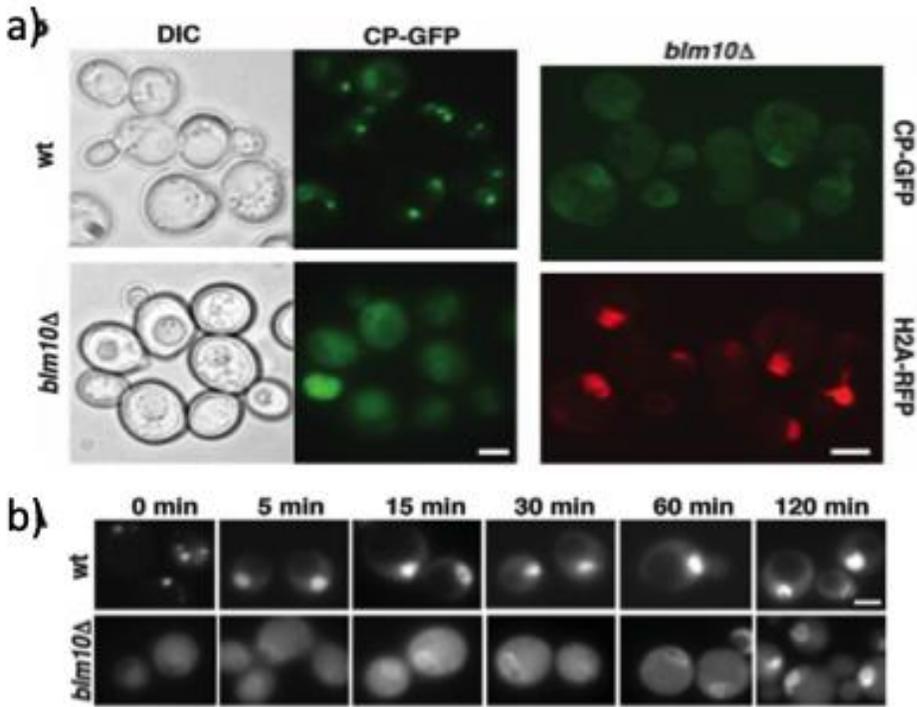


Figura 4. Blm10 es indispensable para la agregación del 20S en gránulos almacenadores de proteosoma y para la re-localización nuclear del 20S en la re-suspensión en fuentes de carbono de células estacionarias.

En la ausencia del gen *BLM10* se ve afectada la localización del complejo 20S.

En a) se muestra a la izquierda una comparación de localización proteosomal (subunidad del 20S CP Pre2 fusionado a GFP) de células en fase estacionaria, entre las cepas con el gen *BLM10* (cepa silvestre) y sin el gen *BLM10* (*blm10Δ*), donde se observa que en la cepa *blm10Δ* hay pérdida de agregación de Pre2 en PSGs.

A la derecha se observa la comparación de la señal del 20S CP proteosomal con la histona H2A (proteína nuclear) fusionada a una proteína reportera, para co-localizar señal con núcleo, donde se observa que la señal del 20S proteosomal es dispersa en el citoplasma con cierto grado de localización nuclear.

En b) se muestra la importancia de *BLM10* para la re-localización nuclear del proteosoma al re-suspender células estacionarias en medio con fuentes de carbono, donde se observa un retraso en la re-localización del 20S con respecto a su control.

Imagen tomada y modificada de Weberruss *et al.*, 2013.

2.5 Importación nuclear del proteosoma.

El importe nuclear de distintos compuestos celulares ocurre a través del complejo del poro nuclear, el cual está compuesto por nucleoporinas, las cuales en su mayoría tienen repetidos ricos en Fenilalanina-Glicina (Görlich & Kutay, 1999; Rout *et al.*, 2000; Christie *et al.*, 2016; Schmidt & Görlich, 2016; Schwartz, 2016), que permiten la formación de una malla de dominios de proteína intrínsecamente desordenados, con propiedades similares a hidrogel (Frey *et al.*, 2006).

Las proteínas con masa de hasta 40kDa pasan por el poro nuclear por difusión, pero proteínas más grandes y complejos RNA-proteína, requieren receptores de transporte nuclear específicos, que median su interacción con los repetidos de FG y usan el gradiente de Ran-GTP a través de la envoltura nuclear (Moore & Blobel, 1993).

Actualmente se propone que los complejos 19S y 20S se importan separados al núcleo, para luego ser ensamblados en el proteosoma 26S, aunque existe evidencia de que el proteosoma 26S puede ensamblarse en el citoplasma y ser importado hacia el núcleo, sin saber el mecanismo por el cual sucede esto (Pack *et al.*, 2014).

El importe nuclear de los complejos 19S y 20S ocurre por una vía canónica que incluye a importina- $\alpha\beta$, una carioferina, que se une a los complejos proteosomales en el citoplasma, reconociendo sus secuencias de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés), aprovechando el gradiente de Ran-GTP (Tanaka *et al.*, 1990).

En un modelo propuesto por Tanaka *et al.* 1990, se contempla que la importación del complejo 20S es mediado por subunidades α que contienen señales de localización nuclear y que pueden existir dos configuraciones: competentes e incompetentes a la importación, según la accesibilidad de sus NLS; donde $\alpha\beta$ -importina tiene preferencia por NLS de complejos inmaduros (Groll *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2002; Chen y Madura, 2014), en los cuales se encuentra la proteína chaperona Ump1 (Groll *et al.*, 2000; Hoefler *et al.*, 2006).

Se sabe que el complejo 19S es importado al núcleo mediante NLS en las subunidades de la base Rpt2 y Rpn2 (Wendler *et al.*, 2004; Isono *et al.*, 2007), donde Rpn2 se une a $\alpha\beta$ -importina para mediar la importación (Savulescu *et al.*, 2011). También se sabe que Blm10 se asocia a Rpn2 y puede mediar la importación del 20S CP maduro, cuando las células que se encuentran en fase estacionaria vuelven a entrar al ciclo celular activamente y se dividen (Weberruss *et al.*, 2013).

Otra proteína involucrada en la localización nuclear del proteosoma es Sts1, esta proteína contiene NLS y se asocia transitoriamente con la tapa del 19S RP (Chen *et al.*, 2011; Pack *et al.*, 2014). También se sabe que Sts1, una proteína de la envoltura nuclear, está involucrada en la localización nuclear del proteosoma, uniéndose preferencialmente al proteosoma 26S (Chen *et al.*, 2011; Budenholzer *et al.*, 2020)

El transporte de los proteosomas desde el citoplasma hacia el núcleo es mediado por Arc3, una proteína involucrada en la polimerización de actina, ocurriendo en *Schizosaccharomyces Pombe* (Cabrera *et al.*, 2010).

2.6 Transporte proteosomal en citoplasma.

Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual se transporta el proteosoma hacia los gránulos almacenadores en el citoplasma, pero se sabe que hay una asociación transitoria de la chaperona Hsp42 con las subunidades del proteosoma, cuando estas se encuentran fuera del núcleo (Ben-Aroya *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2015).

Hsp42 es una chaperona involucrada en marcar y transportar proteínas hacia IPODs (Specht *et al.*, 2011), esta proteína co-localiza con el proteosoma durante la dinámica proteosomal, al inicio de la deprivación de fuentes de carbono, en la periferia nuclear, para separarse posteriormente; igualmente se asocia transitoriamente durante el proceso de re-localización de las subunidades proteosomales hacia al núcleo, cuando las células vuelven a un medio con fuentes de carbono (Ben-Aroya *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2015).

Además de co-localizar con Hsp42, los PSGs co-localizan con otras proteínas de IPODs, para luego diferenciarse en PSGs, lo que sugiere una asociación transitoria de los IPODs con los PSGs que se forman al inicio del estrés por deprivación de fuentes de carbono (denominados PSGs tempranos), actuando como un punto de control, debido a que, la agregación de las subunidades proteosomales en los PSGs requiere que estas se encuentren estructuralmente íntegras, pudiendo terminar en los IPODs en caso contrario (Peters *et al.*, 2016).

2.7 Regiones de baja complejidad

Las regiones de baja complejidad (“LCR” por sus siglas en inglés) son residuos de aminoácidos en secuencia que pueden estar compuestas de un solo aminoácido repetido o de motivos cortos con poca diversidad en su contenido de aminoácidos. Son abundantes en diversas proteínas, siendo más prevalentes en complejos proteicos (Coletta, 2010), encontrándose en células procariontas (Moxon *et al.*, 1994) y eucariotas (Golding, 1999; Marcotte *et al.*, 1999).

Se cree que surgen de eventos de deslizamiento durante la replicación mitótica y por recombinación en la división meiótica (Ellegren, 2004), aumentando la variación en poblaciones de especies, facilitando su adaptación y funcionalidad (Verstrepen *et al.*, 2005; Kashi & King, 2006), aunque también se encuentran implicados en ciertas patologías (Gatchel & Zoghbi, 2005).

Los LCR se encuentran agrupados, espaciados irregularmente o con una presencia periódica (DePristo *et al.*, 2006), ubicándose tanto en regiones centrales de la secuencia

lineal de la proteína o en los extremos amino y carboxilo terminal. La mayoría de estos LCR no forman estructuras proteicas bien definidas y son móviles, lo que se cree favorece la unión con diferentes blancos (Dyson & Wright, 2005).

Un análisis de ontología genética sugiere que las funciones biológicas que llevan a cabo los LCR dependen en parte de su ubicación en la secuencia lineal de la proteína, siendo los LCR terminales, los más involucrados en respuestas de estrés celular, traducción y procesos de transporte de proteínas; y los LCR, centrales, involucrados en procesos de transcripción y su regulación, con una alta prevalencia en proteínas con función cinasa (Coletta, 2010).

Se ha encontrado que los LCR de algunas proteínas con una dinámica de agregación citoplasmática reversible en gránulos insolubles (similares a los PSGs) son indispensables para que ocurra este fenómeno de agregación y desagregación, siendo puntualmente ciertas modificaciones postraduccionales dentro de estas regiones de baja complejidad las que actúan como señal para la agregación y desagregación proteica reversibles (Grignaschi *et al.*, 2018; Höhfeld, 2017).

2.8 Proteínas Zds1 y Zds2

ZDS1 y *ZDS2* son dos genes parálogos ubicados en el cromosoma XIII, las cuales tienen un alto porcentaje de similitud entre sus secuencias (llegando a ser aproximadamente 90% de similitud) y con algunos dominios, ubicados en sus extremos carboxilo terminal, que cumplen las mismas funciones (Calabria *et al.*, 2012).

Se sabe que están involucrados en la progresión del ciclo celular, llevando a cabo las siguientes funciones: regulación del crecimiento polarizado (Yasutis *et al.*, 2010), mantenimiento de Cdc55 en el citoplasma (Yasutis *et al.*, 2010), regulación de señalización de la GTPasa Rho1 junto con Cdc55 (Jonasson *et al.*, 2016), salida de mitosis por regulación de la localización de Cdc14 y exportación nuclear de mRNA por unión a Dbp5 y Gfd1 (Estruch *et al.*, 2005).

Dentro de los fenotipos observados en mutantes con delección de ambos genes se encuentran: defectos en el crecimiento y morfología anormal en la presencia de calcio (Mizunuma *et al.*, 1998), sensibilidad a estrés osmótico (Yakura *et al.*, 2006) y defectos morfológicos en la gemación con retraso de progresión del ciclo celular (Yu *et al.*, 1996).

Se sabe que la fracción completa de Zds1 se localiza en el citoplasma, aunque ciertos dominios pueden localizar en el núcleo (Yakura *et al.*, 2006).

Recientemente se identificó mediante capturas por afinidad y análisis por espectrometría de masas (*affinity capture-MS*) que existe una interacción física de la proteína Zds2 con la subunidad Pre10 proteosomal y con Blm10 (Gavin *et al.*, 2002).

2.9 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un organismo unicelular eucarionte de 5µm de diámetro, conocido por la capacidad que tiene de fermentar azúcares en etanol y dióxido de carbono, puede encontrarse como un organismo unicelular formando colonias heterogéneas, las cuales pueden tener una función cooperativa con respecto a los nutrientes y condiciones adversas que pueda existir en su medio (Campbell *et al.*, 2016).

Presenta un conjunto haploide de 16 cromosomas, con una secuencia total de DNA cromosómico de 12,052kb, la cual contiene 5,773 o 5,726 genes codificantes de proteínas, cada cromosoma contiene 200-2,200kb y los genes representan el 72% de la secuencia total de DNA (Kellis *et al.*, 2004). Además de DNA cromosomal presenta otros tipos de elementos genéticos, con diversas funciones y patrones de herencia, los cuales son: DNA Mitocondrial, plásmidos, virus dsRNA, RNA de cadena simple codificantes de RNA polimerasa dependiente de RNA y Elementos Ty (Sherman, 2002).

Tiene dos tipos de división: Mitótica y meiótica, la división mitótica se presenta en células haploides y en células diploides, la división meiótica se presenta en células diploides cuando hay pocos nutrientes generando cuatro células haploides (Duina *et al.*, 2014); pudiendo volverse haploides dependiendo de la cantidad de fuentes de carbono disponibles en el medio, pasando de diploides a haploides cuando hay pocos nutrientes (Sherman, 2002).

Las células haploides tienen dos tipos de apareamiento (*Mating-type*) denominados a y α (MAT-a y MAT- α), estos *Mating-type* se encuentran en el locus MAT, localizado en el brazo derecho del cromosoma III, que contiene uno de los dos alelos no homólogos de cada *Mating-type*, definiendo así los sexos *Mating-Type* MAT-a y MAT-α, según el alelo que se encuentre presente.

Con respecto a su crecimiento las células haploides se duplican en un promedio de 90 minutos en medio YPD o 140 minutos en medio sintético durante la fase exponencial, alcanzando una densidad promedio en YPD de 2×10^8 células/ml (Duina *et al.*, 2014).

S. cerevisiae se usa como sistema modelo en estudios biológicos debido a ciertas propiedades que presenta como son: crecimiento rápido, células dispersas, facilidad de replicar y aislar mutantes, un sistema genético bien definido, un sistema de transformación de DNA versátil y eficiente preservación a 4°C o a -80°C por periodos prolongados, entre otros (Duina *et al.*, 2014).

Debido a todas las características nombradas *S. cerevisiae* se ha utilizado como modelo para el estudio del proteosoma, razón por la cual se decidió usar como modelo para el estudio del papel de los extremos carboxilo terminal y los genes *ZDS1* y *ZDS2* en la dinámica proteosomal.

3. ANTECEDENTES DEL LABORATORIO.

Por los antecedentes previamente descritos de la dinámica proteosomal, decidimos trabajar con las subunidades proteosomales del complejo 20S que tienen extremos carboxilo terminal largos, móviles que no cristalizan, dentro de estos se encuentran las subunidades alfa: Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10 del complejo proteosomal 20S.

La subunidad Pre10 es la que tiene el extremo carboxilo terminal más largo y además muestra un LCR, lo que nos hizo contemplar la posibilidad de que probablemente este extremo juega algún papel en la dinámica, por lo que se decidió hacer las deleciones de estos extremos carboxilo terminal, dejando el último residuo de aminoácido que cristaliza y 3 residuos extra para no alterar su correcto plegamiento (figura 5)

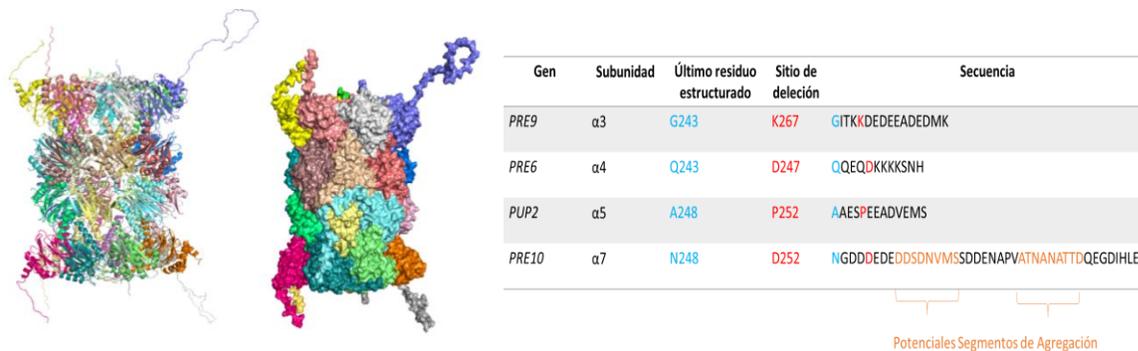


Figura 5. Extremos carboxilo terminal de subunidades del complejo 20S usadas en este proyecto

En la primera imagen se muestra la estructura por cristalografía del complejo 20S proteosomal, donde se observan los extremos carboxilo terminal de las subunidades Pup2, Pre9, Pre6 y Pre10 como ramificaciones sobresalientes. A la derecha se muestran las subunidades del 20S cuyos extremos carboxilo terminal no cristalizan, donde se muestra la secuencia de residuos de aminoácidos de interés en este proyecto; en azul se indica el último residuo encontrado en la estructura de la proteína y en rojo se indica el residuo donde se realizaron los cortes de los extremos carboxilo terminal, dejando 3 residuos para no alterar la estructura de las subunidades. En naranja se muestran secuencias que son potenciales segmentos de agregación en la subunidad α7.

Se valoró la localización de estas subunidades sin extremo carboxilo terminal, en las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de re-suspensión de células estacionarias en medio con fuente de carbono, para determinar su localización, observando una disminución en la formación de PSGs, en las cepas Pre10 sin extremo carboxilo y Pup2 sin extremo carboxilo terminal, durante la fase estacionaria, predominando una localización nuclear, sin encontrar diferencias con respecto a sus cepas control con extremos carboxilo terminal completo, por lo que se decidió trabajar con estas subunidades (cepas y experimentos realizados por Maria José Blanco, alumna de licenciatura de Investigación biomédica básica de la UNAM).

Con respecto a los genes *ZDS1* y *ZDS2*:

Como se ha comentado previamente, los genes *ZDS1* y *ZDS2* están involucrados, entre otras funciones, en la regulación del ciclo celular; además, se sabe que existe una interacción física de Zds2 con la subunidad Pre10 del complejo 20S y con Blm10.

Por lo tanto, se decidió trabajar con estos genes para observar si se encuentran implicadas en la regulación de la dinámica proteosomal.

Debido a que *ZDS1* y *ZDS2* son genes parálogos, sin un fenotipo característico que los haga diferentes, se decidió trabajar con ambos genes.

4. Preguntas de investigación.

- ¿Qué papel tienen los extremos carboxilo terminal de las subunidades alfa Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10 del complejo 20S del proteosoma, en la dinámica proteosomal?
- ¿Qué papel tienen las proteínas Zds1 y Zds2 en la dinámica proteosomal?
- ¿Qué funciones biológicas están afectadas en las células que presentan una dinámica proteosomal alterada?

5. Hipótesis.

La formación de gránulos almacenadores de proteosoma es mediada por el reclutamiento de proteínas mediante el extremo carboxilo terminal de algunas subunidades proteosomales.

Los extremos carboxilo terminal de las subunidades proteosomales son indispensables para que ocurra una adecuada dinámica proteosomal.

Las proteínas Zds1 y Zds2 están involucradas en la dinámica proteosomal, por medio de interacción con la subunidad Pre10.

6. Objetivo general.

Elucidar los mecanismos involucrados en los procesos de localización proteosomal durante la dinámica proteosomal.

7. Objetivos específicos.

- Determinar la función del extremo carboxilo terminal de las subunidades Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10 en la dinámica proteosomal.
- Explorar si Zds1 y Zds2 están involucradas en la dinámica proteosomal.
- Identificar qué funciones biológicas están afectadas en las células que no pueden formar gránulos del proteosoma.

8. Materiales y métodos.

8.1 Construcción de cepas transformantes para valorar el papel de los extremos carboxilo terminal de subunidades del 20S

Las mutantes se hicieron mediante un abordaje de doble recombinación homóloga, para esto, se usaron productos de PCR obtenidos con desoxioligonucleótidos que contienen secuencias homólogas al gen blanco y a porciones específicas de los vectores usados (plásmidos)

8.1.1 PCR para fusión de γ -GFP y m-Cherry a subunidades proteosomales

Las PCR para las fusiones genómicas de γ -GFP y m-Cherry a las diversas subunidades proteosomales, se hicieron usando Phusion DNA polimerasa (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del proveedor.

Para las fusiones se usaron desoxioligonucleótidos específicos para cada subunidad y como templado los plásmidos GFPgamma-SpHis5 y mCH14.

En las fusiones a γ -GFP se utilizó el plásmido GFPgamma-SpHis5 y para las fusiones a m-Chery el plásmido mCh14.

Se usó el siguiente protocolo:

Reactivo	Volumen (20 μ L final)
H ₂ O	13.4 μ L
Buffer 5x	4 μ L
dNTPs (10 μ M)	0.4 μ L
Desoxioligonucleótido Forward (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido Reverse (10 μ M)	0.5 μ L
DNA templado (GFPgamma-SpHis5) (50ng/ml)	1 μ L
Phusion DNA polimerasa (0.625U)	0.2 μ L

Las combinaciones de desoxioligonucleótidos utilizados para fusión de γ -GFP y m-Cherry a cada subunidad se muestran a continuación en la tabla 1

Tabla 1. Desoxioligonucleótidos usados para generar cepas con fusión a proteínas reporteras.

Pup1::γ-GFP (β2)	Pup1F Pup1R
Pup2::γ-GFP(α5)	Pup2CompF Pup2R
Pup2ΔC::γ-GFP(α5)	Pup2IncompF Pup2R
Pre6::γ-GFP(α4)	Pre6CompF Pre6R
Pre6ΔC::γ-GFP(α4)	Pre6IncompF Pre6R
Pre9::γ-GFP (α3)	Pre9CompF Pre9R
Pre9ΔC::γ-GFP (α3)	Pre9IncompF Pre9R
Pre10::γ-GFP (α7)	Pre10CompF Pre10R
Pre10ΔC::γ-GFP (α7)	Pre10IncompF Pre10R
Rpn1::γ-GFP	Rpn1F Rpn1R
Rpn5::γ-GFP	Rpn5F Rpn5R
Pup1::m-Cherry (β2)	Pup1F Pup1R
Pre9::m-Cherry (β2)	Pre9CompF Pre9R
Rpn1::m-Cherry (β2)	Rpn1F Rpn1R
Rpn5::m-Cherry (β2)	Rpn5F Rpn5R

Desoxioligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para generar las distintas transformantes de subunidades fusionadas a γ -GFP con y sin extremos carboxilo terminal completos y fusión a mCherry con extremo carboxilo terminal completo.

A la izquierda se muestra las cepas y a la derecha la combinación de desoxioligonucleótidos usados.

Se hicieron PCR independientes con los desoxioligonucleótidos y los plásmidos correspondientes, colocando todos los componentes en el orden indicado en la tabla. Al final se colocó la enzima y se pusieron las mezclas en termociclador, con las siguientes condiciones.

Evento	Temperatura	Duración
1.- Desnaturalización inicial	98 °C	1 minuto
2.- Desnaturalización	98 °C	10 segundos
3.- Alineamiento de primers	55 °C / 72°C	30 segundos
4.- Extensión	72 °C	1 minuto
5.- Extensión final	72 °C	5 minutos
6.- Hold	10 °C	Indefinido

La temperatura de alineación usada para fusionar γ -GFP es de 55°C y para fusionar m-Cherry es de 72°C.

Se realizaron 35 ciclos en total, del evento 2 al evento 4 (Desnaturalización-Extensión). Todas las reacciones de PCR se hicieron usando el termociclador "C1000 Touch Thermal Cycler" de Bio-Rad.

En la figura 6, se muestran las electroforesis de los productos de PCR usados para realizar transformaciones.

8.1.2 PCR para delección de extremo carboxilo terminal de subunidades Pup2 (α 5) y Pre10 (α 7).

Las PCR para obtener las delecciones genómicas del extremo carboxilo terminal de las subunidades proteosomales Pup2 (α 5) y Pre10 (α 7), se hicieron usando Pfu DNA polimerasa (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del proveedor.

Para las delecciones del extremo carboxilo terminal se usaron desoxioligonucleótidos específicos por cada subunidad y como templado los plásmidos pAG25 y pUG6, usando el siguiente protocolo.

Reactivo	Volumen (25 μ L final)
H ₂ O	19.8 μ L
Buffer 10x con MgSO ₄	2.5 μ L
dNTPs (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido Forward (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido Reverse (10 μ M)	0.5 μ L
DNA templado (pAG25/pUG6) (50ng/ml)	1 μ L
Pfu DNA polimerasa (0.625U)	0.25 μ L

Las combinaciones de desoxioligonucleótidos utilizados para delecciones de extremo carboxilo terminal se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2 Desoxioligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para generar las distintas transformantes de subunidades del 20S sin extremo carboxilo terminal.

Pup2ΔC (α5)	Pup2Cter Pup2R
Pre6ΔC (α4)	Pre6Cter Pre6R
Pre9ΔC (α3)	Pre9Cter Pre9R
Pre10ΔC (α7)	Pre10Cter Pre10R

A la izquierda se muestran las cepas y a la derecha la combinación de desoxioligonucleótidos usados.

Se hicieron PCR independientes con los desoxiligonucleótidos y los plásmidos correspondientes, colocando todos los componentes en el orden indicado en la tabla. Al final se colocó la enzima y se pusieron las mezclas en termociclador, con las siguientes condiciones.

Evento	Temperatura	Duración
1.- Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
2.- Desnaturalización	95 °C	30 segundos
3.- Alineamiento de primers	55 °C	30 segundos
4.- Extensión	72 °C	4 minutos
5.- Extensión final	72 °C	5 minutos
6.- Hold	10 °C	Indefinido

Se realizaron 35 ciclos en total, del evento 2 al evento 4 (Desnaturalización-Extensión). Todas las reacciones de PCR se hicieron usando el termociclador "C1000 Touch Thermal Cycler" de Bio-Rad.

En la figura 6, se muestran las electroforesis de los productos de PCR usados para realizar transformaciones.

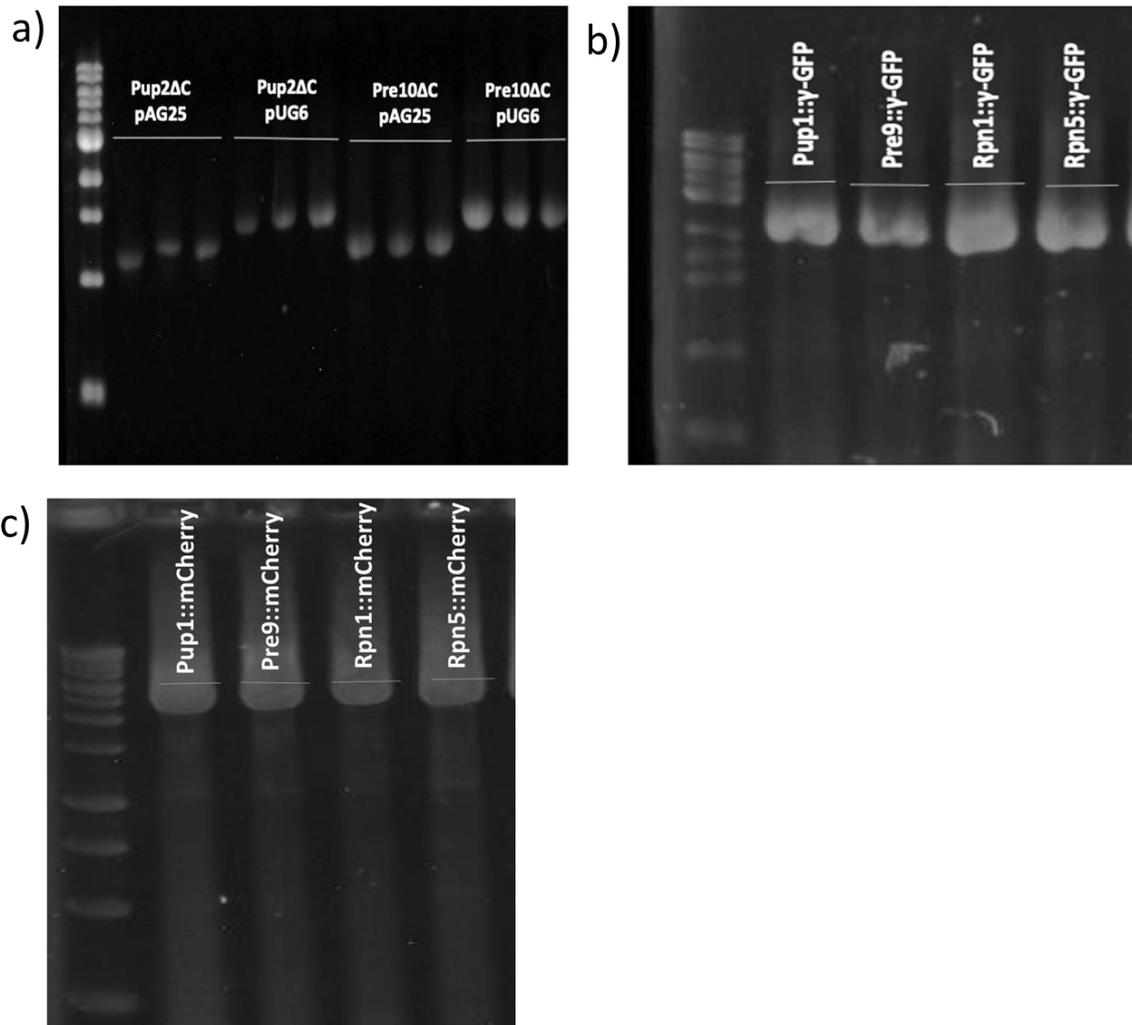


Figura 6. Productos de PCR usados para crear las cepas con fusión a proteínas reporteras y deleción de extremos carboxilo terminal.

En a) se muestran los productos de PCR, amplificados a partir de los plásmidos pAG25 y pUG6, que se usaron para generar la deleción de extremos carboxilo terminal de Pre10 y Pup2, sin fusión a γ -GFP. En b) se muestran los productos de PCR, amplificados a partir del plásmido GFPgamma-SpHis5, usados para la fusión de γ -GFP a subunidades proteosomales. En c) se muestran los productos de PCR amplificados, a partir del plásmido mCH14, usados para fusionar mCherry a subunidades proteosomales. En la sección 8.1.3 se indican los pesos esperados.

8.1.3 transformación de células para generar cepas con fusión de γ -GFP y m-Cherry a subunidades proteosomales y delección de extremo carboxilo terminal de subunidades Pup2 (α 5) y Pre10 (α 7)

Para la fusión de γ -GFP, a las subunidades de los complejos proteosomales 19S y 20S, se usó el producto de PCR obtenido de la amplificación del plásmido γ -GFP-SpHis5 y los desoxioligonucleótidos específicos de cada gen. Estas cepas, tienen como marcador de selección la auxotrofia del aminoácido Histidina, que presenta la cepa BY4742.

Para la fusión de mCherry, a las subunidades de los complejos proteosomales 19S y 20S, se usó el producto de PCR obtenido de la amplificación del plásmido mCh14 y los desoxioligonucleótidos específicos de cada gen. Estas cepas, tienen como marcador de selección la resistencia al antibiótico neourseotricina (CloNat).

Las transformantes genómicas con fusión a γ -GFP y mCherry, fusionan una secuencia de residuos de aminoácidos que funciona como un puente, seguido por el marco de lectura que codifica para la proteína reportera fluorescente, en el extremo 3' del gen que codifica cada subunidad proteosomal, conservando el promotor del gen blanco, e insertando el terminador del gen de selección, proveniente del vector (figura 7).

Las cepas construidas con delección de extremo carboxilo terminal, generan la delección del extremo carboxilo terminal e insertan un gen de selección, que brinda resistencia a antibiótico (proveniente del plásmido), siendo, en el vector pAG25 el gen *NAT1* (que confiere resistencia al antibiótico Nourseotricina "clonNAT") y en el vector pUG6, el gen *KanMX* (que confiere resistencia al antibiótico G418).

Las electroforesis de los productos de PCR usados para transformar, se hicieron en gel de agarosa 0.8%, colocando 5 μ L de producto más 1 μ L de buffer de carga 6X.

Se corrieron en buffer de corrida SB 1x, a 160V durante 40 minutos y posteriormente se tiñeron durante 10 minutos con bromuro de etidio 1X, para verificar los siguientes pesos esperados:

- Fusión de γ -GFP a subunidades, con plásmido GFPgamma-SpHis5: 2356 nucleótidos.
- Fusión de m-Cherry a subunidades, con plásmido mCh14: 2040 nucleótidos.
- Delección de extremo carboxilo terminal de subunidad α 7 (Pre10): plásmido pAG25 1354 nucleótidos y plásmido pUG6 1617 nucleótidos.
- Delección de extremo carboxilo terminal de subunidad α 5 (Pup2): plásmido pAG25 1351 nucleótidos y plásmido pUG6 1614 nucleótidos.

Las transformantes se hicieron a partir de células competentes preparadas bajo el siguiente protocolo:

- 1.- Preparar cultivo en 10 ml de YPD durante toda la noche.
- 2.- Al día siguiente medir densidad óptica de cultivo y hacer ajuste para colocar 0.2 unidades de densidad óptica en un volumen final de 50 ml de YPD.
- 3.- Colocar cultivo y YPD nuevo en matraz estéril de 250ml y se deja a 30°C constantes en movimiento.

- 4.- Medir densidad óptica para preparar células, la cual debe ser entre 0.5 y < 0.7 unidades de densidad óptica.
- 5.- Cuando el cultivo este entre 0.5 y < 0.7 unidades de densidad óptica se coloca el cultivo en tubo de centrifuga de 50 ml estéril y se centrifuga a 1500rpm por 5 minutos.
- 6.- Se decanta YPD y se hace lavado con 5ml de H₂O estéril, se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos.
- 7.- Se decanta y se re-suspende en 5ml de SORB, se centrifuga 5 minutos a 1500rpm, se decanta y se vuelve a centrifugar 1 minutos a 1500rpm y se retira restante con pipeta.
- 8.- Se agregan 360 μ L de SORB y 40 μ L de DNA de esperma de salmón (previamente hervido), se re-suspende y se hacen alícuotas de 20 μ L.
- 9.- Se guardan alícuotas a - 80°C

Se procedió a transformar las células competentes con productos de PCR, mediante choque térmico, bajo el siguiente protocolo:

- 1.- Colocar en tubo de centrifuga de 1.5ml estéril 20 μ L de células competentes y 10 μ L de producto de PCR y se re-suspende.
- 2.- Agregar 100 μ L de Plate Mixture, re-suspender y dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente agregar 10 μ L de DMSO
- 3.- Choque térmico a 42°C durante 15 minutos, sin movimiento (para el choque térmico se usó el agitador térmico Thermo Shaker Incubator BSTH-103 de BioLab).
- 4.- Lavar con 500 μ L de H₂O destilada estéril y centrifugar a 14,000rpm durante 1 minuto.
- 5.- Se decanta sobrenadante y se retira sobrante con pipeta. Agregar 500 μ L de YPD y colocar en incubadora a 30°C durante 4 horas.
- 6.- Centrifugar 1 minuto a 14,000rpm decantar y re-suspender en YPD restante.
- 7.- Colocar células en medio sólido y plaquear con perlas de vidrio estériles hasta secar. Posteriormente dejar en incubadora a 30°C para que crezcan colonias.

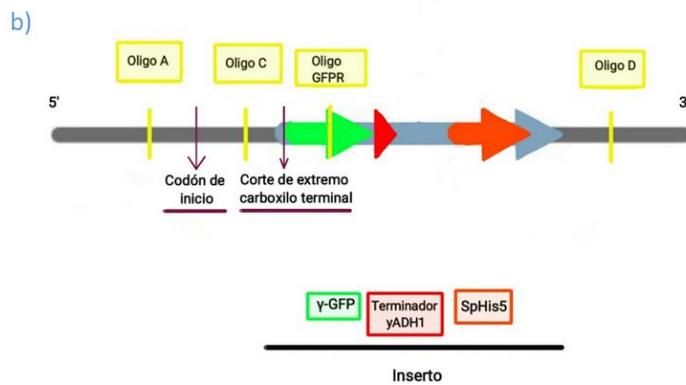
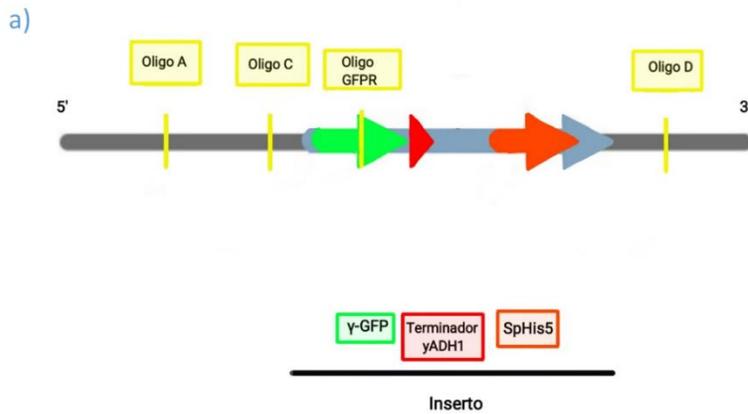


Figura 7. Esquema que muestra el resultado de doble evento de recombinación homóloga, en las transformantes con fusión a γ -GFP con extremos carboxilo terminal completos e incompletos.

Todas las cepas con fusión a γ -GFP se construyeron a partir de un amplificado, obtenido mediante PCR, usando el plásmido γ -GFP-SpHis5 como DNA molde y los desoxiionucleótidos específicos a cada subunidad; estos contienen secuencias que flanquean al gen blanco (subunidad proteosomal) y secuencias que flanquean el segmento a amplificar del vector (plásmido).

El PCR amplificado se introduce en células competentes y se inserta gracias a un evento de doble recombinación homóloga.

Las cepas construidas conservan el promotor del gen codificante de cada subunidad, pero usan el terminador del marcador de auxotrofia de histidina (proveniente del plásmido).

Arriba, en a), se muestra el esquema de las cepas construidas, de subunidades con extremos carboxilo terminal completos fusionados a γ -GFP, donde se encuentra en gris el gen que codifica cada subunidad ± 1 Kilobase, en azul el inserto, que se compone de γ -GFP en verde, terminador en rojo y en naranja el gen SpHis5; en amarillo se muestran los sitios de unión de los desoxioligonucleótidos usados para confirmar las cepas.

Abajo en b), se observa el esquema de las cepas construidas, de subunidades con delección de extremos carboxilo terminal y fusión a γ -GFP, en estas cepas el desoxioligonucleótido con el que se amplifica el plásmido contiene el codón de paro, seguido de la secuencia del gen codificante de γ -GFP, dentro del mismo marco de lectura. Además de resaltar los mismos elementos que en el esquema a), se muestra con morado el codón de inicio y el sitio donde ocurre el corte del extremo carboxilo terminal, para que pueda usarse como referencia con respecto al desoxioligonucleótido GFP, que se usó posteriormente para confirmar y secuenciar dicho corte.

8.2 Construcción de cepas transformantes para valorar el papel de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* en la dinámica proteosomal.

Las mutantes se hicieron mediante un abordaje de doble recombinación homóloga, para esto, se usaron productos de PCR obtenidos con desoxioligonucleótidos que contienen secuencias homólogas al gen blanco (*ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*) y a porciones específicas de los vectores (plásmidos pAG26 y pUG6) usados para hacer las delecciones.

8.2.1 PCR para delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*

Las PCR para delecciones genómica de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* se hicieron con Pfu DNA polimerasa (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del proveedor, usando desoxioligonucleótidos específicos por cada subunidad y como templado los plásmidos pAG25 y pUG6, usando el siguiente protocolo.

Reactivo	Volumen (25 μ L final)
H ₂ O	19.8 μ L
Buffer 10x con MgSO ₄	2.5 μ L
dNTPs (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido Forward (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido Reverse (10 μ M)	0.5 μ L
DNA templado (pAG25/pUG6) (50ng/ml)	1 μ L
Pfu DNA polimerasa (0.625U)	0.25 μ L

Las combinaciones de desoxioligonucleótidos utilizados para delecciones de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* se muestran enseguida en la tabla 3.

Tabla 3 Desoxioligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para generar las distintas transformantes con delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

<i>ZDS1</i>	Zds1F Zds1R
<i>ZDS2</i>	Zds2F Zds2R
<i>BLM10</i>	Blm10F Blm10R

A la izquierda se muestran las cepas y a la derecha la combinación de desoxioligonucleótidos usados.

Se hicieron PCR independientes con los desoxioligonucleótidos y los plásmidos correspondientes, colocando todos los componentes en el orden indicado en la tabla. Al final se colocó la enzima y se pusieron las mezclas en termociclador, con las siguientes condiciones.

Evento	Temperatura	Duración
1.- Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
2.- Desnaturalización	95 °C	30 segundos
3.- Alineamiento de primers	50 °C	30 segundos
4.- Extensión	72 °C	4 minutos
5.- Extensión final	72 °C	5 minutos
6.- Hold	10 °C	Indefinido

Se realizaron 35 ciclos en total, del evento 2 al evento 4 (Desnaturalización-Extensión). Todas las reacciones de PCR se hicieron usando el termociclador "C1000 Touch Thermal Cycler" de Bio-Rad.

En la figura 8 se muestran las electroforesis de los productos de PCR usados para realizar transformaciones

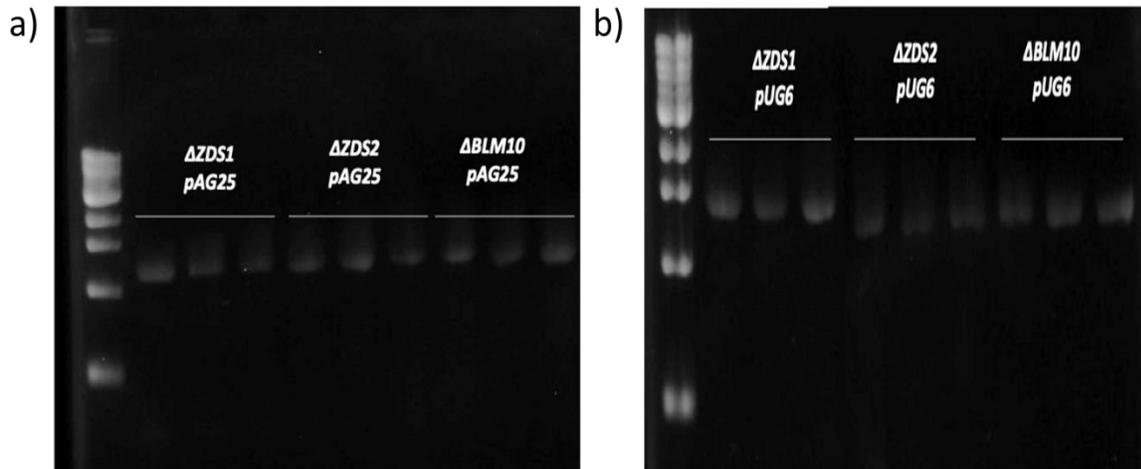


Figura 8. Productos de PCR usados para crear las cepas con delección de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

En a) se muestran los productos de PCR, amplificados a partir del plásmido pAG25, para delección de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*. En b) se muestran los productos de PCR a amplificados usando el plásmido pUG6 para delección de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

En la sección 8.2.2 se indican los pesos esperados.

8.2.2 transformación de células para generar cepas con fusión de γ -GFP y m-Cherry a subunidades proteosomales y delección de extremo carboxilo terminal de subunidades Pup2 ($\alpha 5$) y Pre10 ($\alpha 7$)

Las transformantes genómicas obtenidas contienen la delección del gen correspondiente e inserción de un gen de selección, con el promotor y terminador del gen insertado; este gen de selección brinda resistencia a antibiótico (proveniente del plásmido), siendo, en el vector pAG25 el gen *NAT1* (que confiere resistencia al antibiótico Nourseotricina "clonNAT") y en el vector pUG6, el gen *KanMX* (que confiere resistencia al antibiótico G418) (figura 9).

Las electroforesis de los productos de PCR usados para transformar, se hicieron en gel de agarosa 0.8%, colocando 5 μ L de producto más 1 μ L de buffer de carga 6X.

Se corrieron en buffer de corrida SB 1x, a 160V durante 40 minutos y posteriormente se tiñeron durante 10 minutos con bromuro de etidio 1X, para verificar los siguientes pesos esperados:

- Cepas $\Delta zds1$: plásmido pAG25 1407 nucleótidos y plásmido pUG6 1712 nucleótidos.
- Cepas $\Delta zds2$: plásmido pAG25 1407 nucleótidos y plásmido pUG6 1712 nucleótidos.
- Cepas $\Delta blm10$: plásmido pAG25 1407 nucleótidos y plásmido pUG6 1712 nucleótidos.

Las transformantes se hicieron mediante evento de doble recombinación en células competentes usando los productos de PCR obtenidos para transformar; la preparación

de células competentes y la transformación por choque térmico se siguió con el mismo protocolo indicado en el apartado 8.1.3.

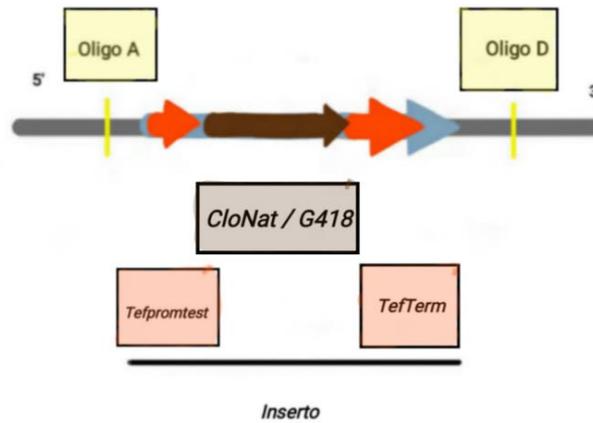


Figura 9. Esquema de resultado de doble evento de recombinación homóloga, en transformantes genómicas, para obtener delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* con producto de PCR amplificados a partir de los plásmidos pAG25 y pUG6.

Se muestra una representación gráfica de cómo se construyeron las cepas con delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

Las transformantes se generan a partir de un amplificado obtenido con desoxioligonucleótidos, que contienen secuencias que flanquean el gen blanco (genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*) y secuencias que flanquean el segmento a amplificar del vector (plásmido pAG25 o pUG6).

El PCR obtenido se introduce en células competentes y se inserta por evento de doble recombinación homóloga.

En las cepas resultantes se pierde el gen correspondiente y se inserta un gen que confiere resistencia a antibiótico, con el promotor y terminador del gen insertado.

En la imagen se muestra el esquema de las cepas construidas, donde se encuentra en gris el gen correspondiente ± 1 Kilobase, en azul el inserto, que se compone de promotor/terminador en naranja y gen insertado que da resistencia a antibiótico en café; en amarillo se muestran los sitios de unión de los desoxioligonucleótidos usados para confirmar las cepas. Igualmente se usaron desoxioligonucleótidos dentro del promotor (*Tefpromtest*) y terminador (*TefTerm*) para confirmar.

8.3 Confirmación de cepas transformantes mediante PCR de confirmación.

La confirmación de cepas se hizo a partir de las colonias transformantes obtenidas, mediante PCR, usando como templado una muestra de colonia directamente, o producto de extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico, a partir de cultivos, se realizó conforme al siguiente protocolo:

- 1.- Preparar cultivo durante toda la noche en 5 ml de YPD en rotor con movimiento constante y temperatura constante de 30°C.
- 2.- Colocar los 5 ml de cultivo en tubo de centrifuga y centrifugar 2000rpm por 5 minutos.
- 3.- Decantar y quitar sobrenadante con pipeta y re-suspender en 500 µL de agua destilada estéril.
- 4.- Pasar muestra en agua a tubo de centrifuga de 1.5ml, membretando cada muestra y centrifugar a 14000rpm por 1 minuto.
- 5.- Vortexear tubo para disolver pellet.
- 6.- Agregar 200 µL de buffer QTP.
- 7.- Agregar 50 µL de microperlas estériles y colocar 100 µL de Fenol más 100 µL de Cloroformo, en campana de extracción.
- 8.- Sellar herméticamente los tubos con Parafilm y vortexear por 4 minutos.
- 9.- Agregar 200 µL de buffer TE 1X y centrifugar a 14000rpm por 1 minuto.
- 10.- Recuperar la fase líquida, en nuevo tubo de centrifuga de 1.5ml, con pipeta, sin tocar la fase sólida.
- 11.- Agregar 1 ml de etanol absoluto a -20°C, mezclar por inversión y centrifugar a 14000rpm por 1 minuto.
- 12.- Decantar sobrenadante, centrifugar rápido (spin) y quitar sobrenadante con pipeta.
- 13.- Re-suspender pellet en 400 µL de buffer TE 1X, sin tocar pellet directamente con punta.
- 14.- Agregar 3 µL de RNAsa a concentración de 10mg/ml e incubar 5 minutos a 37°C.
- 15.- Agregar 20 µL de acetato de amonio a concentración 4M y 1 ml de etanol absoluto a -20°C, mezclar por inversión.
- 16.- Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto y decantar, volver a centrifugar rápido (spin) y quitar sobrenadante con pipeta.
- 17.- Dejar secar pellet contubo abierto colocándolo horizontalmente, posteriormente re-suspender pellet en 100 µL de agua destilada estéril y almacenar a -20°C.

Para hacer las PCR de confirmación, se diseñaron los siguientes desoxioligonucleótidos:

- Desoxioligonucleótido A: Se une a secuencia genómica, externa al gen blanco, ubicada rio arriba del gen blanco.
- Desoxioligonucleótido D: Se une a secuencia genómica, externa al gen blanco, ubicada rio abajo del gen blanco.
- Desoxioligonucleótido C: Se une a secuencia no modificada del gen blanco, ubicada río arriba del sitio de interés modificado.

- Desoxioligonucleótido GFP-R: Se une a secuencia del gen que codifica la proteína γ -GFP, en cepas con fusión a γ -GFP.
- Desoxioligonucleótido TefpromTest: Se une a secuencia del promotor del gen de resistencia insertado de los plásmidos pAG25 y pUG6 en cepas con delección de extremo carboxilo terminal y delección de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*
- Desoxioligonucleótido Tefterm: Se une a secuencia del terminador del gen de resistencia insertado de los plásmidos pAG25 y pUG6 en cepas con delección de delección de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

8.3.1 PCR de confirmación de cepas transformantes

Las PCR que se hicieron para confirmar las diferentes transformantes, se realizaron usando la enzima DreamTaq DNA polimerasa de Thermo Fisher, siguiendo las instrucciones de proveedor, usando los siguientes protocolos según el origen del DNA templado (colonia o DNA genómico extraído).

- PCR de confirmación con templado de colonia.

Reactivo	Volumen (24 μ L final)
H ₂ O	19.8 μ L
Buffer 10X	2.5 μ L
dNTPs (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido C correspondiente (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido GFP-R (10 μ M)	0.5 μ L
Colonia	

Se preparó la mezcla con reactivos y se tomó una pequeña muestra de colonia con una punta estéril de 10 μ L, que se colocó en el tubo con la mezcla, luego se colocó en termociclador 5 minutos a 95°C, para desnaturalizar el DNA. Posterior a la desnaturalización se agregó 0.2 μ L DreamTaq DNA polimerasa y se colocó en termociclador siguiendo siguiente programa.

Evento	Temperatura	Duración
1.- Desnaturalización	95 °C	30 segundos
2.- Alineamiento de primers	Según cepa.	30 segundos
3.- Extensión	72 °C	4 minutos
4.- Extensión final	72 °C	5 minutos
5.- Hold	10 °C	Indefinido

Se realizaron 35 ciclos en total del evento 1 al evento 3.

- PCR de confirmación a partir de DNA genómico como templado.

Reactivo	Volumen (25 μ L final)
H ₂ O	19.8 μ L
Buffer 10X	2.5 μ L
dNTPs (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido C correspondiente (10 μ M)	0.5 μ L
Desoxioligonucleótido GFP-R (10 μ M)	0.5 μ L
DNA genómico.	1 μ L
DreamTaq DNA polimerasa	0.25 μ L

Se preparó la mezcla de reactivos y se colocó en termociclador, usando el siguiente programa:

Evento	Temperatura	Duración
1.- Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
2.- Desnaturalización	95 °C	30 segundos
3.- Alineamiento de primers	Según cepa.	30 segundos
4.- Extensión	72 °C	4 minutos
5.- Extensión final	72 °C	5 minutos
6.- Hold	10 °C	Indefinido

- a) Confirmación de fusiones genómicas de γ -GFP y m-Cherry a las subunidades proteosomales.

Para confirmar las fusiones genómicas de γ -GFP a cada subunidad correspondiente se usaron los desoxioligonucleótidos: GFP-R (para γ -GFP) ó Tefpromtest (para m-Cherry), y los oligonucleóticos C correspondientes a cada subunidad, siguiendo los protocolos para preparar mezcla de reactivos según la cepa a confirmar y el origen del DNA templado (directo de colonia o producto de extracción de DNA genómico).

Se usó el programa de termociclador según al origen del DNA templado, con una temperatura de alineamiento de primers (annealing) de 50°C para las fusiones a γ -GFP y de 55°C para las fusiones a m-Cherry.

Las combinaciones de desoxioligonucleótidos para hacer las confirmaciones de cepas transformantes se muestran enseguida en la tabla 4.

Tabla 4 Desoxioligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para confirmar las distintas transformantes con subunidades fusionadas a γ -GFP y mCherry.

Pup1::γ-GFP (β2)	Pup1C GFP-R
Pup2::γ-GFP(α5)	Pup2C GFP-R
Pup2ΔC::γ-GFP(α5)	Pup2C GFP-R
Pre6::γ-GFP(α4)	Pre6C GFP-R
Pre6ΔC::γ-GFP(α4)	Pre6C GFP-R
Pre9::γ-GFP (α3)	Pre9C GFP-R
Pre9ΔC::γ-GFP (α3)	Pre9C GFP-R
Pre10::γ-GFP (α7)	Pre10C GFP-R
Pre10ΔC::γ-GFP (α7)	Pre10C GFP-R
Rpn1::γ-GFP	Rpn1C GFP-R
Rpn5::γ-GFP	Rpn5C GFP-R
Pup1::m-Cherry (β2)	Pup1C TefPromTest
Pre9::m-Cherry (β2)	Pre9C TefPromTest
Rpn1::m-Cherry (β2)	Rpn1C TefPromTest
Rpn5::m-Cherry (β2)	Rpn5C TefPromTest

A la izquierda se muestran las cepas y a la derecha la combinación de desoxioligonucleótidos usados.

b) Confirmación de deleción de extremo carboxilo terminal de las subunidades proteosomales del complejo 20S

Para confirmar las deleciones de los extremos carboxilo terminal de las subunidades se usaron los desoxioligonucleótidos Tefpromtest y los oligonucleóticos C correspondientes a cada subunidad, siguiendo los protocolos para preparar mezcla de reactivos según el origen del DNA templado.

Se usó el programa de termociclador correspondiente según origen del DNA templado, con una temperatura de alineamiento de primers (annealing) de 56°C.

Las combinaciones de desoxioligonucleótidos para hacer las confirmaciones de cepas transformantes se muestran en seguida en la tabla 5

Tabla 5 Desoxioligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para confirmar las distintas transformantes con delección de extremo carboxilo terminal.

Pup2ΔC(α5)	Pup2C Tefpromtest
Pre6ΔC(α4)	Pre6C Tefpromtest
Pre9ΔC(α3)	Pre9C Tefpromtest
Pre10ΔC(α7)	Pre10C TefPromTest

A la izquierda se muestran las cepas y a la derecha la combinación de desoxioligonucleótidos usados.

c) Confirmación de delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

Para confirmar las delecciones de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* se usaron los desoxioligonucleótidos A correspondiente/Tefpromtest y los oligonucleóticos D correspondiente/TEfterm, siguiendo los protocolos para preparar mezcla de reactivos según el origen del DNA templado.

Se usó el programa de termociclador correspondiente según el origen del templado, con una temperatura de alineamiento de primers (annealing) de 56°C.

Las combinaciones de desoxioligonucleótidos para hacer las confirmaciones de cepas transformantes se muestran en seguida en la tabla 6

Tabla 6 Desoxioligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para confirmar las distintas transformantes con delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

Δzds1	Zds2A TEfPromTest + Zds2D TefTerm	o	Zds2A Zds2D
Δzds2	Zds2A TEfPromTest + Zds2D TefTerm	o	Zds2A Zds2D
Δblm10	Blm10A TEfPromTest + Blm10D TefTerm	o	Blm10A Blm10D

Para confirmar se amplificaron los extremos recombinantes con los oligos A + TEfprontest y D + Tefter, o amplificando todo el inserto con los desoxioligonucleótidos A + D

A la izquierda se muestran las cepas y a la derecha la combinación de desoxioligonucleótidos usados.

8.3.2 Electroforesis de productos de PCR de confirmación y secuenciación

Se hicieron electroforesis de DNA de productos de PCR para confirmar cepas, en gel de agarosa al 0.8%, %, colocando 5 μ L de producto más 1 μ L de buffer de carga 6X. Se corrieron en buffer de corrida SB 1x, a 160V durante 40 minutos y posteriormente se tiñeron durante 10 minutos con bromuro de etidio 1X, para verificar los siguientes pesos esperados:

a) Confirmación de fusiones a proteínas reporteras

Pup1:: γ -GFP (β 2): Pup1C/GFP-R peso esperado 562 pares de base.
Pup2:: γ -GFP(α 5): Pup2C/GFP-R peso esperado 715 pares de base.
Pup2 Δ C:: γ -GFP(α 5): Pup2C/GFP-R peso esperado 688 pares de base.
Pre6:: γ -GFP(α 4): Pre6C/GFP-R peso esperado 654 pares de base.
Pre6 Δ C:: γ -GFP(α 4): Pre6C/GFP-R peso esperado 630 pares de base.
Pre9:: γ -GFP (α 3): Pre9C/GFP-R peso esperado 702 pares de base.
Pre9 Δ C:: γ -GFP (α 3): Pre9C/GFP-R peso esperado 666 pares de base.
Pre10:: γ -GFP (α 7): Pre10C/GFP-R peso esperado 749 pares de base.
Pre10 Δ C:: γ -GFP (α 7): Pre10C/GFP-R peso esperado 638 pares de base.
Rpn1:: γ -GFP: Rpn1C/GFP-R peso esperado 1052 pares de base.
Rpn5:: γ -GFP: Rpn5C/GFP-R peso esperado 1052 pares de base.
Pup1::m-Cherry (β 2): Pup1C/TefpromTest peso esperado 1173 pares de base.
Pre9::m-Cherry (β 2): Pre9C/TefpromTest peso esperado 1313 pares de base.
Rpn1::m-Cherry (β 2): Rpn1C/TefpromTest peso esperado 1663 pares de base.
Rpn5::m-Cherry (β 2): Rpn5C/TefpromTest peso esperado 1663 pares de base.

b) Confirmación de deleción de extremos carboxilo terminal.

Pup2 Δ C(α 5): Pup2C/Tefpromtest peso esperado 613 pares de base.
Pre6 Δ C(α 4): Pre6C/Tefpromtest peso esperado 555 pares de base.
Pre9 Δ C(α 3): Pre9C/Tefpromtest peso esperado 591 pares de base
Pre10 Δ C(α 7): Pre10C/Tefpromtest peso esperado con plásmido pAG25 563 nucleótidos, con plásmido pUG6 589 pares de base.

c) Confirmación de deleción de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*

$\Delta zds1$: Zds1A/Tefpromtest peso esperado 650 pares de base.
Zds1D/Tefterm peso esperado 492 pares de base.
 $\Delta zds2$: Zds2A/Tefpromtest peso esperado 653 pares de base.
Zds2D/ Tefterm peso esperado 512 pares de base.
 $\Delta blm10$: Blm10A/Tefpromtest peso esperado 711 pares de base.
BLM10D/ Tefterm peso esperado 511 pares de base.

En las figuras 10 y 11 se muestran las electroforesis de los productos de PCR de confirmación de las cepas construidas, en geles de agarosa.

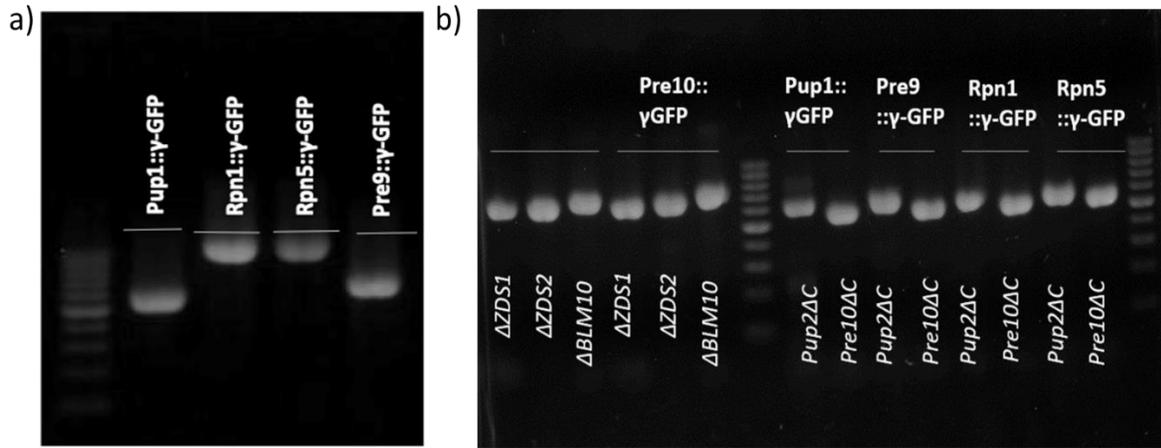


Figura 10. Productos de PCR de confirmación de cepas con fusión de γ -GFP a subunidades proteosomales en distintas cepas, deleciones de extremos carboxilo terminal y deleción de genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

En a) se muestran PCR de confirmación de fusión de γ -GFP a subunidades proteosomales, usando desoxioligonucleótidos C y GFPR. En b) se muestran a la izquierda PCR de confirmación de fusión de Pre10 a γ -GFP con deleción de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*; a la derecha PCR de confirmación de deleción de extremos carboxilo terminal de Pre10 y Pup2 con subunidades fusionadas a γ -GFP.

En la sección 8.3.2 se muestran los pesos esperados.

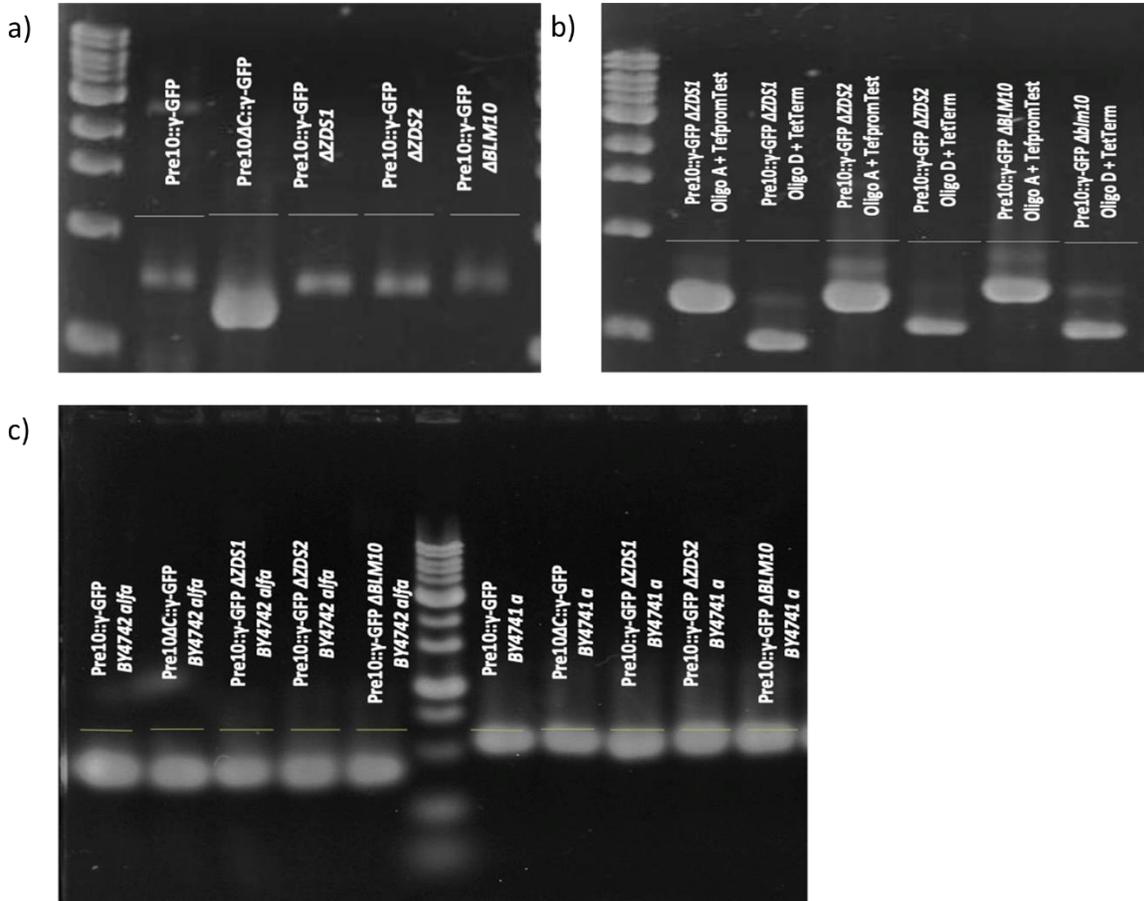


Figura 11. Productos de PCR de confirmación de cepas con fusión a γ -GFP en cepas con delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* y confirmación de fondo genético BY4741, BY4742 en distintas cepas .

En a) se muestran PCR de confirmación de fusión de γ -GFP a Pre10 en las diversas cepas.

b) Se muestran PCR de confirmación de delección de los genes *ZDS1* y *ZDS2* usando Desoxioligonucleótidos A y TefpromTest; y usando desoxioligonucleótido D y TefTerm, para verificar que hubo evento de doble recombinación.

c) Se muestra PCR de confirmación de fondos genéticos BY4742 y BY4741, usando los desoxioligonucleótidos para amplificar el gen Mat-a de BY4742 y Mat-a de BY4741.

En la sección 8.3.2 se muestran los pesos esperados.

8.4 Secuenciación de producto de PCR de confirmación de cepas

Se secuenció el DNA de los PCR de confirmación, que se encontraron dentro del peso esperado, para asegurarse que las secuencias estaban conservadas, que los cortes en los extremos carboxilo terminal eran los esperados y que la delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* ocurrieron adecuadamente.

Para secuenciar, se hicieron purificaciones por columna de los productos de PCR o purificación por columna a partir de banda de peso esperado, en gel de agarosa de bajo punto de fusión, siguiendo los siguientes procedimientos:

a) Purificación de DNA

La purificación de DNA se hizo utilizando kit GeneJet Purificatin Kit de Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del proveedor, llevando a cabo el siguiente protocolo.

- 1.- Colocar en tubo de centrifuga de 1.5 ml un volumen 1:1 de Binding buffer/producto de PCR y mezclar (se debe verificar coloración de la mezcla, si se observa de color naranja/violeta el pH no es óptimo, por lo que se debe agregar 10 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 hasta que cambie a color amarillo).
- 2.- Si el fragmento de DNA es menor a 500 pares de base colocar una relación 1:2 de isopropanol al100%.
- 3.- Transferir muestra a columna de purificación y centrifugar a 14000rpm por 1 minuto.
- 4.- Agregar 700 μ L de Wash buffer, previamente diluido con etanol absoluto como indicado por proveedor.
- 5.- Centrifugar a 14000rpm por 1 minuto y decantar sobrenadante, posteriormente centrifugar un minuto adicional.
- 6.- Transferir columna a tubo de centrifuga de 1.5 ml y agregar 30 μ L de agua destilada estéril, centrifugar a 14000 rpm por un minuto y almacenar a -20°C

b) Purificación de DNA en gel de agarosa.

La extracción de DNA en gel de agarosa se hizo utilizando el kit GeneJET Gel Extraction Kit de Thermo Scientific, siguiendo las especificaciones de proveedor, llevando a cabo el siguiente protocolo:

- 1.- Se realizó electroforesis de DNA a extraer, en gel de agarosa de bajo punto de fusión a 0.8%, corriendo a un voltaje no mayor a 120V en buffer SB 1X.
- 2.- Se corta banda que se encuentra dentro de peso esperado y se coloca en tubo de centrifuga de 1.5ml previamente pesado.
- 3.- Pesar banda cortada en tubo de centrifuga y colocar Binding buffer en relación 1:1 p/v.
- 4.- Incubar mezcla a 60°C por 10 minutos, hasta que se disuelva y mezclar por inversión. Se debe verificar si se observa de color naranja/violeta el pH no es óptimo, por lo que se debe agregar 10 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 hasta que cambie a color amarillo.

- 5.- Si el fragmento es menor a 500 pares de bases, colocar un volumen 1:1 de isopropanol al 100% y mezclar.
- 6.- Transferir mezcla a columna, centrifugar a 14000 rpm por un minuto y decantar sobrenadante.
- 7.- Agregar 100 μ L de Binding buffer, centrifugar a 14000 rpm por un minuto y decantar sobrenadante.
- 8.- Agregar 700 μ L de Wash buffer, previamente diluido con etanol absoluto como indicado por proveedor.
- 9.- Centrifugar a 14000rpm por 1 minuto y decantar sobrenadante, posteriormente centrifugar un minuto adicional.
- 10.- Transferir columna a tubo de centrífuga de 1.5 ml y agregar 50 μ L de agua destilada estéril, centrifugar a 14000 rpm por un minuto y almacenar a -20°C

El DNA purificado se secuenció utilizando el método de Sanger, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La secuenciación se realizó utilizando los oligonucleótidos antisentido correspondientes a cada PCR de confirmación (GFP-R, TefpromTest) y se valoró:

- En cepas con fusiones de γ -GFP a cada subunidad: se corroboró que la secuencia de γ -GFP y la secuencia puente estuvieran dentro del marco de lectura, así como que no hubiera mutaciones puntuales introducidas ni en la secuencia de γ -GFP, el puente, ni el extremo carboxilo terminal de cada subunidad.
- En cepas con delección del extremo carboxilo terminal de subunidades del 20S: se corroboró que se hiciera la delección de extremo carboxilo terminal, en el último residuo de aminoácido correspondiente a cada subunidad y que no hubiera mutaciones puntuales introducidas en los extremos carboxilos terminales.
- En las cepas con delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*: se corroboró que se estuviera la delección e inserción esperada.

8.5 Crioconservación de las cepas transformantes.

Se realizaron gliceroles de cepas transformantes confirmadas y secuenciadas para poder almacenar a -80°C , colocando cultivos en medio con marcador de selección correspondiente a cada cepa y glicerol 80%.

8.6 Fotografías con microscopio de epifluorescencia.

Se observaron en microscopio de epifluorescencia las diversas contruidas, con fusión a proteínas reporteras, para poder valorar el papel de los extremos carboxilo terminal de Pup2 / Pre10, y el papel de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* en la dinámica proteosomal.

Las cepas se valoraron a partir de una muestra de colonia por cada cepa colocada en cultivo YPD líquido, tomando muestras en diferentes tiempos.

Abajo se enlistan las condiciones observadas y la preparación de las cepas para poder ver en microscopio de epifluorescencia.

8.6.1 Preparación de muestras a observar en microscopio de epifluorescencia

Se observaron muestras de las cepas, a partir de un cultivo YPD líquido, tomando muestras en distintos tiempos, para poder valora la dinámica proteosomal que ocurre en diferentes condiciones de crecimiento:

- Fase exponencial (día 1)

Estas muestras contienen células en fase exponencial, en un medio que es rico en fuentes de carbono.

Para preparar las muestras se colocaron pre-cultivos en medio YPD líquido, a partir de colonias individuales (sembradas en medio selectivo sólido) de cada cepa, bajo condiciones de esterilidad. Estos se dejaron en movimiento y temperatura constante de 30°C, durante una noche y al día siguiente, se midió la densidad óptica para colocar 0.5 unidades de densidad óptica (DO) en un volumen final de 10 ml de YPD nuevo.

Las muestras usadas para ver en microscopio de epifluorescencia en fase exponencial se tomaron a partir de los cultivos nuevos, a las 4 horas; se tiñeron las células con tinción de ácidos nucleicos (Hoechst) y se fijaron con formaldehído (FS-PBS).

- Fase estacionaria (día 6)

Después de tomar muestra en el primer día (fase exponencial), se dejaron crecer los cultivos (en movimiento y temperatura constante de 30°C) y se volvieron a tomar muestras en el sexto día.

Estas muestras contienen células en fase estacionaria, en un medio que es carente de fuentes de carbono.

- Re-suspensión de células estacionarias (día 6) en medio con fuentes de carbono (YPD)

Además de tomar las muestras de células en fase estacionaria en el sexto día, se colocaron muestras de estos mismos cultivos en medio YPD líquido nuevo y se dejaron durante 20 minutos, para posteriormente preparar las muestras.

Se tomaron fotos con células vivas y células fijadas con formaldehído (FS-PBS), sin encontrar diferencias en la señal emitida por las proteínas reporteras, por lo que se decidió trabajar con células fijadas con formaldehído (FS-PBS).

8.6.2 Fijación de muestras con FS-PBS

Las muestras que se tomaron para observar las células en las diferentes condiciones de crecimiento se fijaron con FS-PBS, conforme al siguiente protocolo:

- 1.- Tomar muestra a fijar: para la fase exponencial (día 1) se tomaron 500 μ L de cultivo (previamente ajustado a 0.5 DO en 10 ml de YPD nuevo), a las 4 horas de haber sido colocado; para la fase estacionaria (día 6), se midió densidad óptica y se ajustó para tomar una muestra con 0.68 DO en 1 ml de volumen final: para la re-suspensión de células estacionarias en fuentes de carbono se tomaron 0.68 DO del cultivo en el sexto día, se centrifugaron y se colocaron en 1 ml de medio con fuentes de carbono (YPD líquido nuevo).
- 2.- Centrifugar a 14000rpm por un minuto y decantar sobrenadante.
- 3.- Realizar dos lavados con 1 ml de buffer PBS 1X. Después de segundo lavado quitar sobrenadante con punta.
- 4.- Agregar 100 μ L de FS-PBS, mezclar y dejar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Realizar dos lavados con 1 ml de buffer PBS 1X.
- 6.- Agregar 1 ml de buffer PBS 1X y almacenar a 4°C

Las células fijadas se almacenaron a 4°C y se observaron en un tiempo no mayor a una semana, desde su fijación.

8.6.3 Tinción de ácidos nucleicos

Se hicieron tinciones con Hoechst para hacer co-localización de la señal de γ -GFP con el núcleo, conforme al siguiente protocolo:

- 1.- Tomar 500 μ L de células vivas en fase exponencial, 0.68 DO de células vivas en fase estacionaria o 400 μ L de células fijadas.
- 2.- Agregar 600 μ L de mismo cultivo en células vivas o buffer PBS 1X, según sea el caso.
- 4.- Para teñir células en fase exponencial y células re-suspendidas en medio YPD con fuente de carbono, en fase estacionaria, se agregan 4.28 μ L de Hoechst a concentración de 10mg/ml.
Para teñir células en fase estacionaria se agregan 2.14 μ L de Hoechst a concentración de 10mg/ml.
- 5.- Para teñir células en fase exponencial y células re-suspendidas en medio YPD con fuente de carbono, en fase estacionaria, se dejaron las muestras reposando 10 minutos.
Para las fotografías en fase estacionaria se dejaron reposando overnight a 4°C, protegiendo muestras de la luz.

- 6.- Centrifugar a 14000rpm por un minuto y decantar sobrenadante.
- 7.- Realizar lavado con 1 ml del mismo medio de cultivo en células vivas o con 1 ml buffer PBS 1X según sea el caso.
- 8.- Centrifugar a 14000 rpm por un minuto, retirar sobrenadante con punta y colocar 10 μ L de medio o buffer PBS 1X, según sea el caso.

8.7 Análisis de fotografías obtenidas en microscopio de epifluorescencia.

Se observaron las muestras de células vivas y fijadas en microscopio de epifluorescencia, usando filtros para Hoechst y γ -GFP.

Las muestras se prepararon tomando 7 μ l, que se colocaron sobre un portaobjetos y se dejaron reposar por aproximadamente 2 minutos para que se asentaran las células. Posteriormente se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se observó bajo el microscopio de epifluorescencia.

Para tomar las imágenes se usaron los siguientes tiempos de exposición:

100-200 milisegundos para campo claro, 2-10 milisegundos para tinción de ácidos nucleicos y 100-300 milisegundos para γ -GFP.

Se hizo una valoración visual comparativa de las señales obtenidas de Hoechst y γ -GFP en células vivas y fijadas, sin observar diferencias significativas, por lo que se trabajó con células fijadas con FS-PBS (figura 12).

El análisis de las fotografías (en microscopio de epifluorescencia) se hizo a partir de células fijadas, con 3 réplicas independientes obtenidas de diferentes colonias, contando un total de 200 células por cada réplica. Las células se cuantificaron si cumplían las siguientes condiciones:

- En campo claro la célula se observaba con membrana íntegra.
- Las células con membrana íntegra en campo claro presentaban tinción de núcleo con Hoechst.
- Las células que se observan bien en campo claro y con adecuada tinción nuclear muestran señal de γ -GFP.
- La señal emitida de Hoechst no se observa con el filtro de γ -GFP y viceversa.
- La señal de γ -GFP que se analiza se tomó en el mismo plano de enfoque con el que se tomó imagen de Hoescht.
- La célula no se mueve y se puede analizar la señal de los 3 campos.

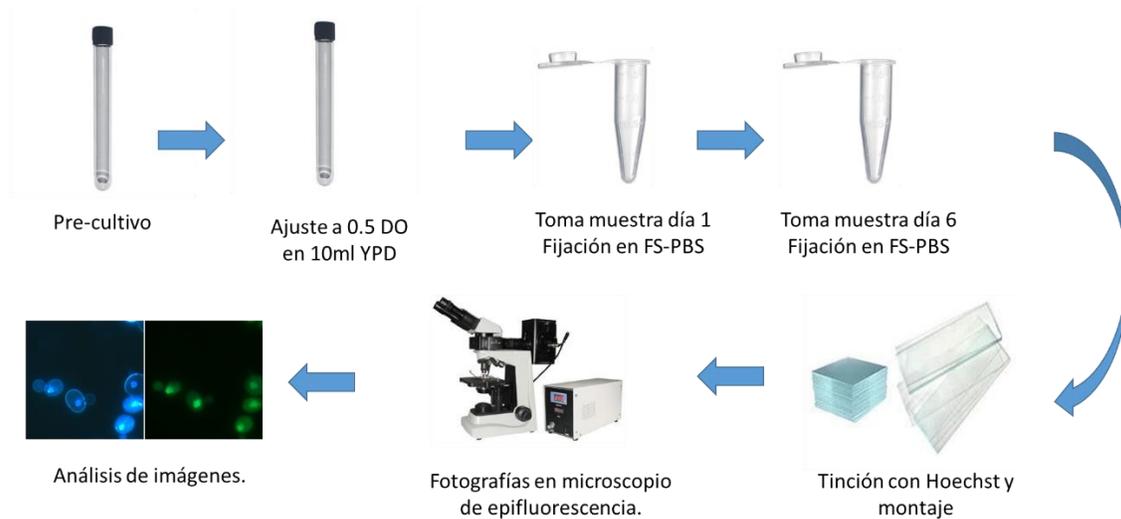


Figura 12. Preparación de muestras para observar la dinámica proteosómica de las cepas con fusión a proteínas reporteras.

Para evaluar la dinámica proteosómica en las diferentes cepas, se colocaron pre-cultivos, durante toda la noche, de colonias independientes a una temperatura de 30°C, al día siguiente se midió densidad óptica y se ajustó para tener 0.5 DO en 10 ml de volumen final en YPD nuevo. A partir de este nuevo cultivo se tomaron las muestras (primer día, sexto día y re-suspensión de células estacionarias, del sexto día, en medio con fuentes de carbono) que se fijaron con FS-PBS y tiñeron con Hoechst. Las células fijadas y teñidas se observaron en el microscopio de epifluorescencia, para ver la localización de la señal de las distintas subunidades fusionadas a proteínas reporteras.

8.8 Estudio de viabilidad de las cepas: silvestre- α , Pup2 Δ C, Pre6 Δ C, Pre9 Δ C y Pre10 Δ C en la cepa BY4742.

El estudio de viabilidad se hizo con la finalidad de observar si la delección de los extremos carboxilo terminal de las subunidades del complejo 20S afecta la viabilidad de las células.

Para realizar el estudio de viabilidad, se colocaron cultivos en 10 ml YPD líquido que se dejaron en movimiento y temperatura constante de 30°C. Se tomaron muestras de estos cultivos cada cuatro días, durante 60 días y se hicieron goteos por diluciones seriadas de suspensiones celulares, en medio sólido YPD, los cuales se dejaron dos días en incubadora a 30°C..

Para hacer los goteos de las suspensiones celulares se tomó 1 DO de cada muestra y se hicieron diluciones seriadas 1:10 (1DO, 1×10^{-1} DO, 1×10^{-2} DO, 1×10^{-3} DO y 1×10^{-4} DO).

Las densidades ópticas se midieron usando el espectofotómetro "WPA CO8000 Cell Density Meter" de Biochrom, colocando diluciones en agua, con un volumen final de 1 ml, tomando como rango aceptable una densidad óptica medida de 0.1 – 0.8 DO. La densidad óptica real se calculó multiplicando la densidad óptica medida por el factor de dilución.

8.9 Ensayo de crecimiento por diluciones seriadas de las cepas: silvestre- α , Pup2 Δ C, Pre6 Δ C, Pre9 Δ C y Pre10 Δ C en medios que inducen diferentes tipos de estrés, en la cepa BY4742.

Con la finalidad de valorar si hay una respuesta alterada bajo ciertas circunstancias de estrés, se realizaron ensayos de crecimiento por diluciones seriadas de las cepas sin extremo carboxilo terminal de subunidades del 20S, induciendo los siguientes tipos de estrés: oxidativo, osmótico, de retículo endoplásmico y térmico.

Los ensayos de crecimiento se hicieron en dos condiciones de estrés que llamamos crónico y agudo, según el tiempo que se indujo estrés.

El estrés crónico se indujo con goteos de suspensiones celulares por diluciones seriadas en medio sólido YPD con distintas sustancias, según el tipo de estrés.

El estrés agudo se indujo colocando las sustancias que inducen estrés directamente en una muestra de cultivo, donde se dejó durante 3 horas, para posteriormente hacer los goteos de suspensiones celulares por diluciones seriadas, en medio YPD sólido.

Estos ensayos de crecimientos por diluciones seriadas en diferentes tipos de estrés se realizaron de la siguiente manera:

- Goteos por diluciones seriadas para inducir estrés crónico.

Se colocaron pre-cultivos de colonias individuales en YPD líquido, durante toda la noche, se midió densidad óptica y se hicieron goteos de suspensiones celulares en medios sólidos de YPD preparados con los siguientes compuestos:

-Estrés oxidativo: H₂O₂ (4mM, 5mM, 6mM, 7mM) y Terbutilhidroperóxido (0.25mM, 0.5mM, 0.75mM).

-Estrés de retículo endoplásmico: Tunicamicina (0.5 μ g/ml, 0.75 μ g/ml, 1 μ g/ml, 1.25 μ g/ml y 1.5 μ g/ml).

-Estrés osmótico: Sorbitol (1M) y NaCl (0.5M, 0.7M, 0.9M, 1.1M).

Los goteos de las suspensiones celulares se realizaron a partir de 1 DO con diluciones seriadas 1:10 (1DO, 1 x 10⁻¹ DO, 1 x 10⁻² DO, 1 x 10⁻³ DO y 1 x 10⁻⁴ DO).

- Goteos por diluciones seriadas induciendo estrés agudo.

Las condiciones valoradas de estrés agudo fueron: estrés oxidativo y estrés por choque térmico, bajo las siguientes condiciones:

-Estrés oxidativo: Se colocaron pre-cultivos de colonias individuales en YPD líquido, durante toda la noche, se midió densidad óptica y se colocó 1 DO en el volumen necesario para tener una concentración final de: H_2O_2 7mM, Terbutilhidroperóxido 0.75mM y Paraquat 1mM.

Se dejaron durante 3 horas y posteriormente se hicieron goteos en YPD sólido.

-Estrés por choque térmico: Se colocaron pre-cultivos de colonias individuales en YPD líquido, durante toda la noche, luego se tomó 1 ml por cada cultivo y se indujo estrés por choque térmico a 37°C, 42°C y 50°C.

Se dejaron durante 3 horas y posteriormente se hicieron goteos en YPD sólido.

Todos los ensayos se hicieron con diluciones seriadas 1:10, colocando 1DO, 1×10^{-1} DO, 1×10^{-2} DO, 1×10^{-3} DO y 1×10^{-4} DO; las cajas de medio sólido con los goteos se dejaron a 30°C por dos días y se tomaron fotografías.

En la figura 13 se muestra un esquema del ensayo de crecimiento por diluciones seriadas con inducción de estrés que se usó

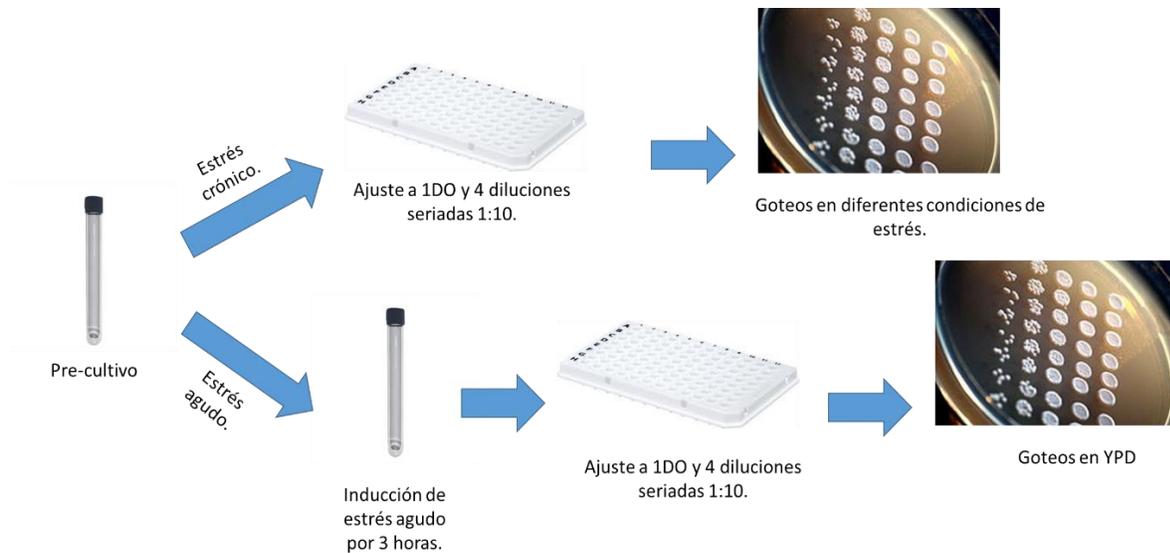


Figura 13. Ensayos de crecimiento por diluciones seriadas de cepas sin extremo carboxilo terminal de subunidades del complejo 20S, con diferentes condiciones de estrés.

Se colocaron pre-cultivos en YPD toda la noche y se tomaron dos consideraciones según el tipo de estrés a inducir.

Estrés crónico: se midió densidad óptica y se ajustó para tener diluciones seriadas a partir de 1 DO, colocando gotas de cada suspensión celular sobre el medio de cultivo sólido con los diferentes compuestos usados para inducir estrés. Posteriormente se dejaron incubando durante 24 horas a 30°C.

Estrés agudo: se tomaron muestras a partir de pre-cultivos y se colocaron las diferentes sustancias usadas para inducir estrés directamente en los cultivos, estos se dejaron induciendo durante 3 horas, luego se midió densidad óptica para tener diluciones seriadas 1:10 a partir de 1DO y colocar las gotas de suspensiones celulares en medios sólidos YPD. Las suspensiones en medios sólidos se dejaron incubando durante 48 horas a 30°C.

Para el estrés térmico se tomaron la muestra de los pre-cultivos y se colocaron a las diferentes temperaturas mencionadas durante 3 horas, posteriormente se hicieron diluciones seriadas 1:10 a partir de 1DO en medio sólido YPD y se dejaron 48 horas a 30 °C.

8.10 Curvas de crecimiento de las cepas: silvestre- α , $\Delta zds1$, $\Delta zds2$, $\Delta blm10$ y Pre10 ΔC , en la cepa BY4742.

Las curvas de crecimiento se hicieron con la finalidad de observar si en las cepas $\Delta zds1$, $\Delta zds2$, $\Delta blm10$ y Pre10 ΔC se encuentra alterado el tiempo de duplicación de las células cuando después de estar bajo diferentes tipos de estrés por privación de nutrientes, vuelven a encontrarse con condiciones favorables.

Para realizar las curvas de crecimiento se colocaron pre-cultivos individuales, durante toda la noche, en 5ml de medio sintético completo, tomando en total 5 colonias por cada cepa a partir de medio sólido.

Al día siguiente se midió la densidad óptica de cada pre-cultivo y se ajustaron densidades ópticas para tener 1 DO en 200 μ l de volumen final, que se colocaron en placas de 96 pozos.

Las células se centrifugaron, se les quitó el sobrenadante y se re-suspendieron en los siguientes medios: sintético completo (+C+N), sintético sin fuente de carbono (-C), sintético sin fuente de nitrógeno (-N) y sintético sin fuente de carbono / sin fuente de

nitrógeno (-C-N); con la finalidad de inducir estrés, en un volumen final de 200 μ l, dejándolos durante 24 horas.

Luego de cumplir 24 horas en los distintos medios, se centrifugaron las placas, se retiró medio y se re-suspendieron en medio sintético completo, ajustando densidad óptica para colocar 0.1 DO en un volumen final de 200 μ l que se colocaron en placas *honeycomb* y se dejaron en crecínómetro, donde se dejaron crecer a 30°C, tomando mediciones de densidad óptica cada 15 minutos durante 24 horas (figura 14).

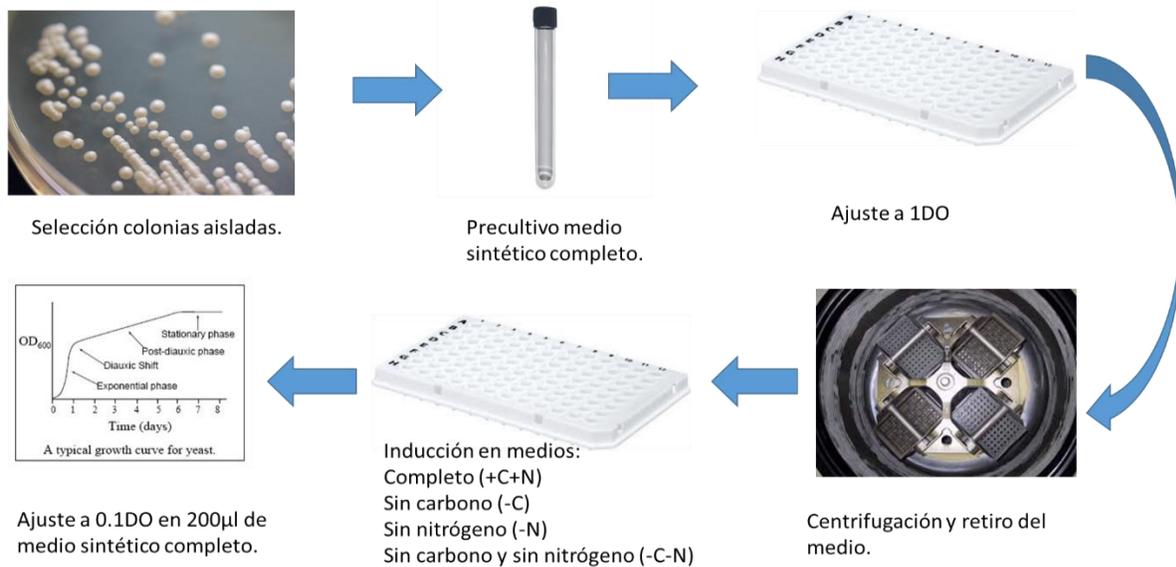


Figura 14. Curvas de crecimiento.

Se colocaron pre-cultivos en medio sintético completo, tomando colonias independientes de cada cepa, después se midió la densidad óptica de los cultivos y se colocó el volumen necesario para tener 1 DO en cada pozo de la placa, para posteriormente centrifugar y retirar el sobrenadante del medio de cultivo.

Se suspendieron las células, sin sobrenadante, en los distintos medios inductores de estrés y se dejaron durante 24 horas en incubadora a 30°C. Después de 24 horas se midieron densidades ópticas y se ajustaron para colocar 0.1 DO en medio sintético completo y se colocaron en crecínómetro, midiendo densidad óptica cada 15 minutos durante 24 horas, a temperatura constante de 30°C.

9. Resultados.

9.1 Función de los extremos carboxilo terminal en la localización celular del proteosoma durante la dinámica proteosomal.

9.1.1 La delección del extremo carboxilo terminal de las subunidades Pup2 y Pre10 afecta la localización del proteosoma en fase estacionaria

Con los antecedentes previos que observamos en el laboratorio, en donde la delección de los extremos carboxilo terminal de las subunidades Pup2 y Pre10 afectan la localización proteosomal, decidimos valorar el efecto que tiene la delección de los extremos carboxilo terminal de diversas subunidades del complejo 20S proteosomal, en la dinámica proteosomal.

Para valorar esto, se usaron las cepas con extremo carboxilo terminal completo e incompleto fusionadas a γ -GFP, las cuales se dejaron crecer en un cultivo del cual se tomaron muestras en las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y re-suspensión de células estacionarias en medio nuevo con fuentes de carbono; para luego ser fijadas, teñidas con tinción de ácidos nucleicos y ser observadas en microscopio de epifluorescencia.

Primero se valoraron las cepas con extremos carboxilo terminal completos, de las cuales se observó que, la localización de la señal de las subunidades proteosomales del complejo 20S, es nuclear en fase exponencial, granular en fase estacionaria y nuclear a los 20 minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono (YPD), presentando una cantidad variable de PSGs en fase estacionaria (figuras 15 y 16).

Las cepas Pre9:: γ -GFP y Pre10:: γ -GFP tienen una mayor formación de PSGs en fase estacionaria (95% y 92% respectivamente; figuras 15,19 y 21), sin embargo, la cepa Pup1:: γ -GFP fue la que menor formación de PSGs presentó en fase estacionaria (57%) con una señal importante nuclear (22%) (figuras 15 y 25).

Estas cepas presentaron señal predominantemente nuclear en fase exponencial y a los 20 minutos de re-suspensión en fuentes de carbono (figura 15), hallazgos similares a los reportados previamente por Laporte *et al.*, 2008.

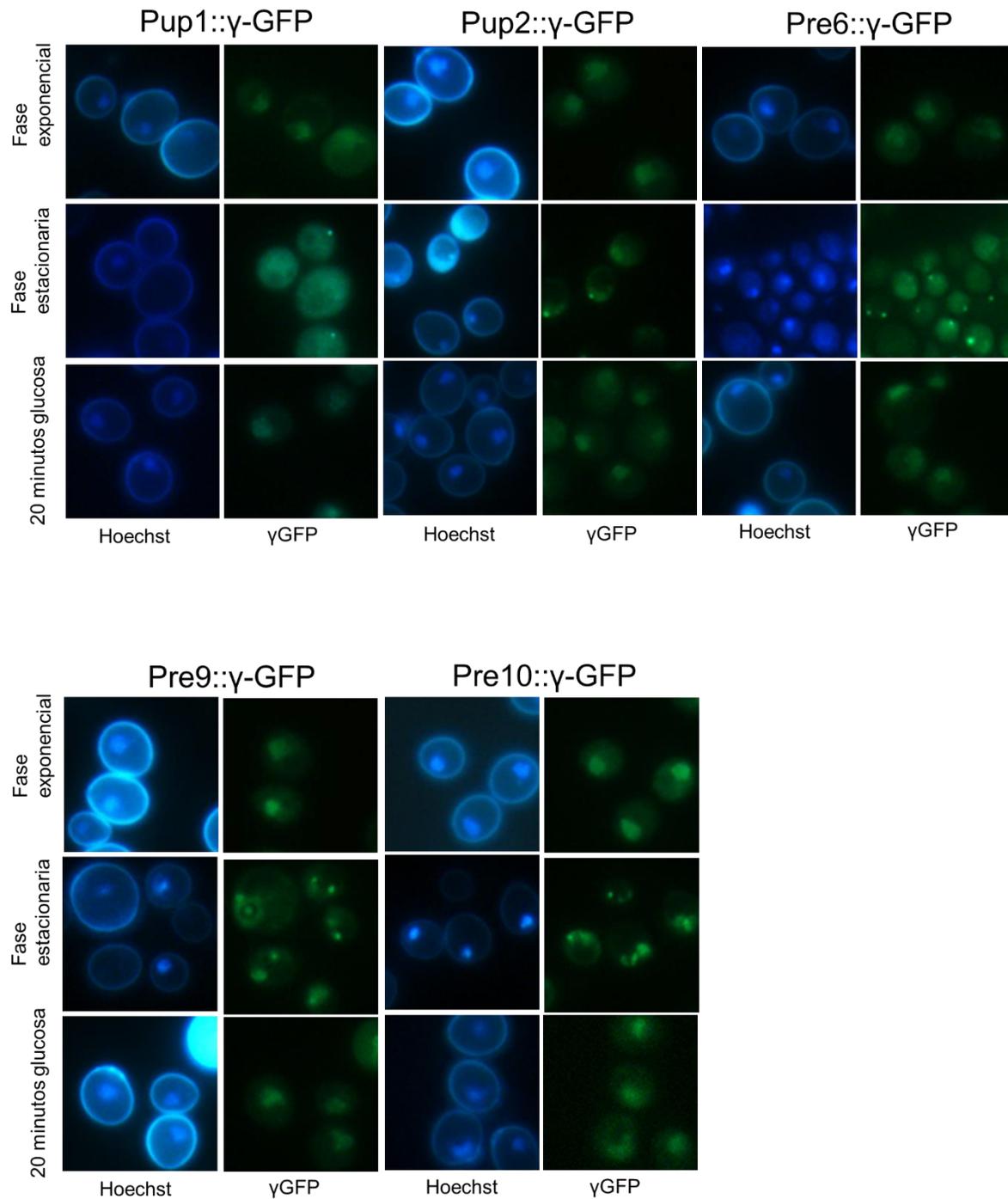


Figura 15. Dinámica proteosomal de subunidades del complejo 20S proteosomal con extremos carboxilo terminal completos.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de cepas Pup1::γ-GFP ($\beta 2$), Pup2::γ-GFP ($\alpha 5$), Pre6::γ-GFP ($\alpha 4$), Pre9::γ-GFP ($\alpha 3$) y Pre10::γ-GFP ($\alpha 7$)) con extremo carboxilo terminal completo.

Se observa el cambio de localización de las subunidades de los complejos 20S marcados, durante la dinámica proteosomal, que ocurre en un cultivo durante las fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de re-suspender en medio con fuentes de carbono.

En todas las cepas se observa una localización predominantemente nuclear en fase exponencial, granular en fase estacionaria y nuclear a los 20 minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono, sin embargo, las cepas Pup1:: γ -GFP (β 2) y Rpn1:: γ -GFP muestran una menor formación de PSGs, en comparación con las demás subunidades del complejo 20S.

De igual manera se observó que la localización de las subunidades proteosomales Rpn1 y Rpn5 del complejo 19S es variable.

En la cepa Rpn1:: γ -GFP (base), durante la fase estacionaria, hay una menor formación de PSGs (25%) y la señal se localiza principalmente tanto en núcleo como en PSGs (36%), seguido de una localización nuclear (33%) una cantidad importante de señal nuclear, siendo esta cepa, la única que presentaba menor localización de señal exclusivamente en PSGs y mayor localización en núcleo (figuras 16 y 23)

La cepa Rpn5:: γ -GFP mostró señal predominantemente en PSGs (94%) en fase estacionaria (figuras 16 y 27)

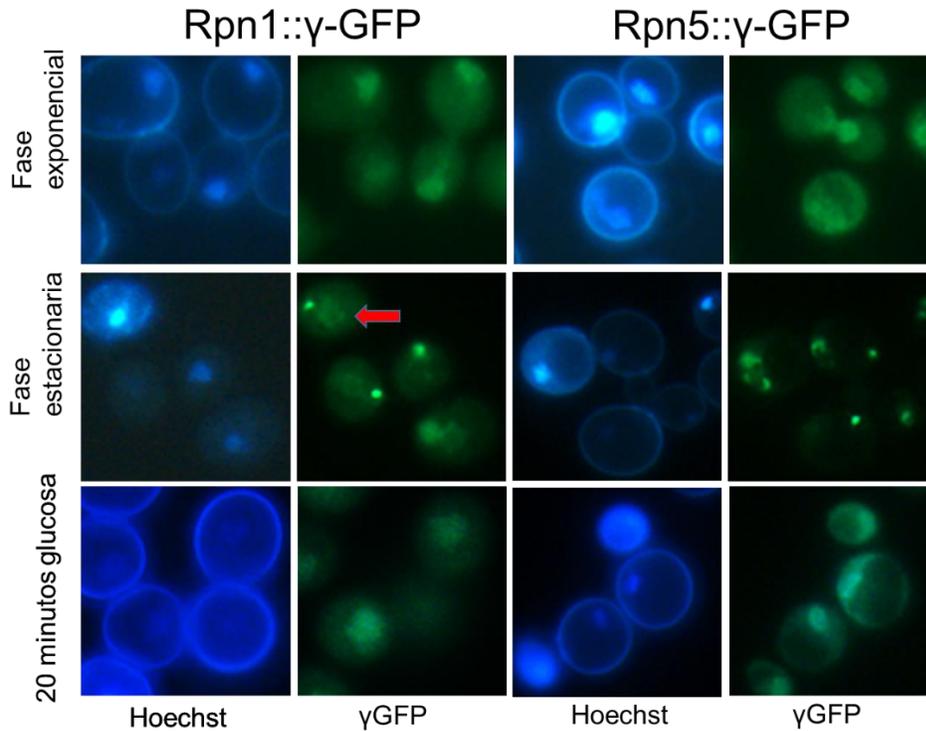


Figura 16. Dinámica proteosomal de subunidades del complejo 19S proteosomal.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de cepas Rpn1::γ-GFP (base) y Rpn5::γ-GFP (base).

En la imagen se observa el cambio de localización de las subunidades de los complejos 19S marcados, durante la dinámica proteosomal, que ocurre en un cultivo durante las fases: exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de re-suspender en medio con fuentes de carbono.

En la cepa Rpn1::γ-GFP (base) se observa que en fase estacionaria, la señal se está principalmente en el núcleo, con una menor formación de PSGs en comparación con la cepa Rpn5::γ-GFP (tapa), que muestra localización predominante en PSGs durante la fase estacionaria (con flecha roja se muestra la localización nuclear que presenta Rpn1).

Ambas cepas presentan localización predominantemente nuclear en fase exponencial y a los 20 minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono.

Una vez que observamos los fenotipos de localización proteosomal de los complejos 19S y 20S, se procedió comprobar el fenotipo que tienen las cepas sin extremo carboxilo terminal del complejo 20S ((Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10) fusionados a γ-GFP, durante la dinámica proteosomal.

Para valorar esto, se tomaron muestras de las cepas sin extremos carboxilo terminal, marcadas con γ-GFP, bajo las mismas condiciones que las cepas con extremos carboxilo terminal completo y se visualizaron células fijadas y teñidas en fase exponencial, estacionaria y re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono.

Se encontró que la señal de las cepas Pre6ΔC::γ-GFP(α4) y Pre9ΔC::γ-GFP (α3) es similar a lo que se observa en sus respectivos controles con extremos carboxilo terminal completos (figura 15), por el contrario, las cepas Pup2ΔC::γ-GFP(α5) y Pre10ΔC::γ-GFP

($\alpha 7$) muestran una señal predominantemente nuclear, con poca formación de gránulos almacenadores de proteosoma, en fase estacionaria (figura 17).

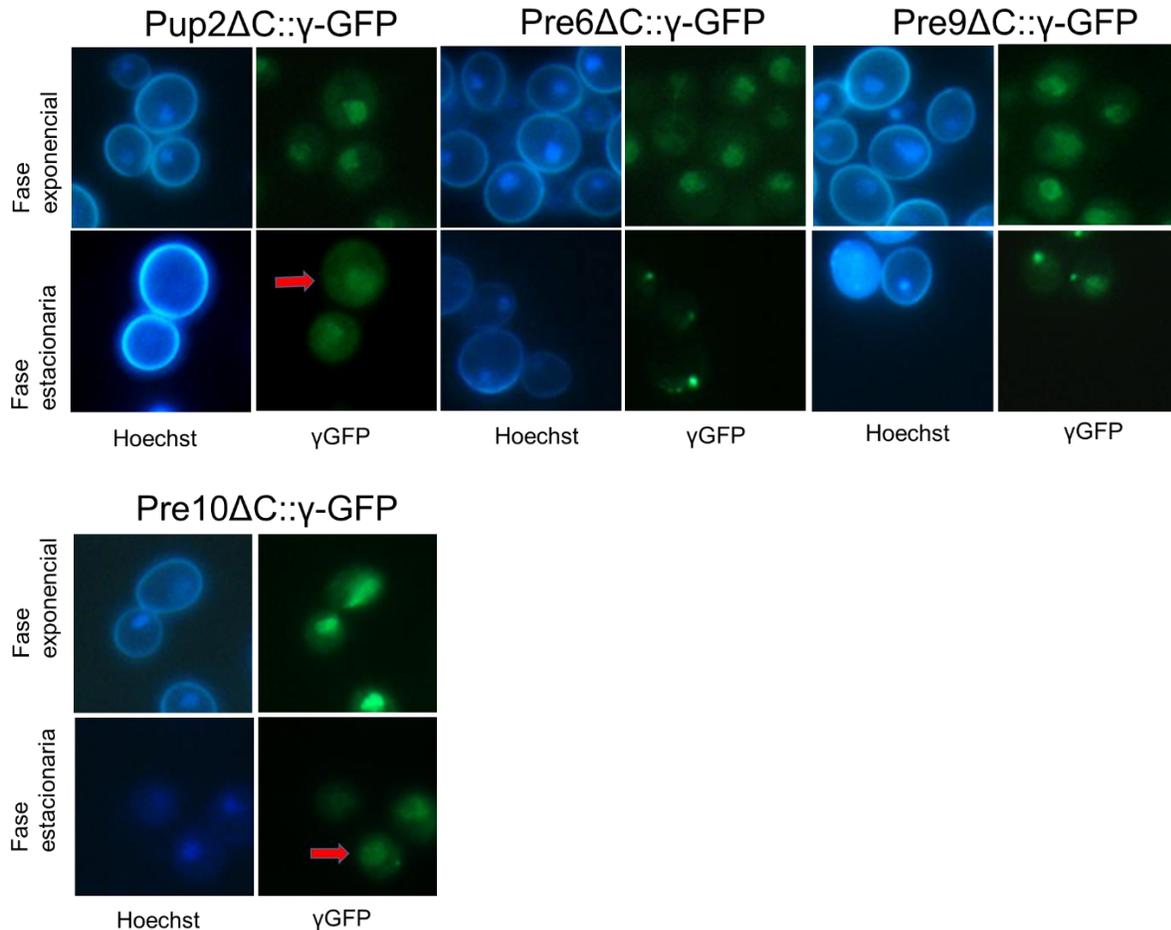


Figura 17. La delección del extremo carboxilo terminal de las subunidades Pup2 y Pre10 afecta su localización en fase estacionaria.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de cepas Pup2 Δ C:: γ -GFP($\alpha 5$), Pre6 Δ C:: γ -GFP($\alpha 4$), Pre9 Δ C:: γ -GFP ($\alpha 3$) y Pre10 Δ C:: γ -GFP ($\alpha 7$).

En la imagen se observa que, en fase estacionaria las cepas Pre6 Δ C:: γ -GFP($\alpha 4$) y Pre9 Δ C:: γ -GFP ($\alpha 3$) muestran un fenotipo similar a sus respectivos controles (cepas con extremo carboxilo terminal completo figura 15), con una señal principalmente PSGs en fase estacionaria, sin embargo, las cepas Pup2 Δ C:: γ -GFP($\alpha 5$) y Pre10 Δ C:: γ -GFP ($\alpha 7$) muestran un fenotipo distinto a sus respectivos controles (cepas con extremo carboxilo terminal completo (figura 15), con señal principalmente nuclear y menor formación de PSGs en fase estacionaria (se muestra la localización nuclear con flechas rojas).

Todas las cepas presentan localización de la señal predominantemente nuclear en fase exponencial y a los 20 minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono.

Al ver el efecto que produce la delección de los extremos carboxilo terminal de Pup2 y Pre10 decidimos valorar el fenotipo de localización de subunidades de ambos complejos, en ausencia de los extremos carboxilo de estas subunidades, enfocándonos en el estudio de la subunidad Pre10, considerando el antecedente de que su extremo carboxilo terminal presenta una región de baja complejidad con residuos de aminoácidos fosforilables (figura 5).

Primero se cuantificó el grado de afectación de formación de gránulos almacenadores de proteosoma, en ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10, mediante un análisis cuantitativo de la señal en las cepas Pre10 con extremo carboxilo terminal completo e incompleto, fusionadas γ -GFP, en las fases exponencial, estacionaria y en re-suspensión de células estacionarias en fuentes de carbono.

Se encontró que en fase estacionaria, la cepa Pre10 Δ C:: γ -GFP presenta un 67 % de células con señal exclusivamente nuclear, un 16 % con señal mixta (nuclear y en PSGs) y solo un 10 % muestra señal exclusivamente en gránulos almacenadores de proteosoma. Esto contrasta significativamente con el 92 % de localización granular que se observa en fase estacionaria cuando el extremo carboxilo terminal de Pre10 está completo (figuras 18 y 19).

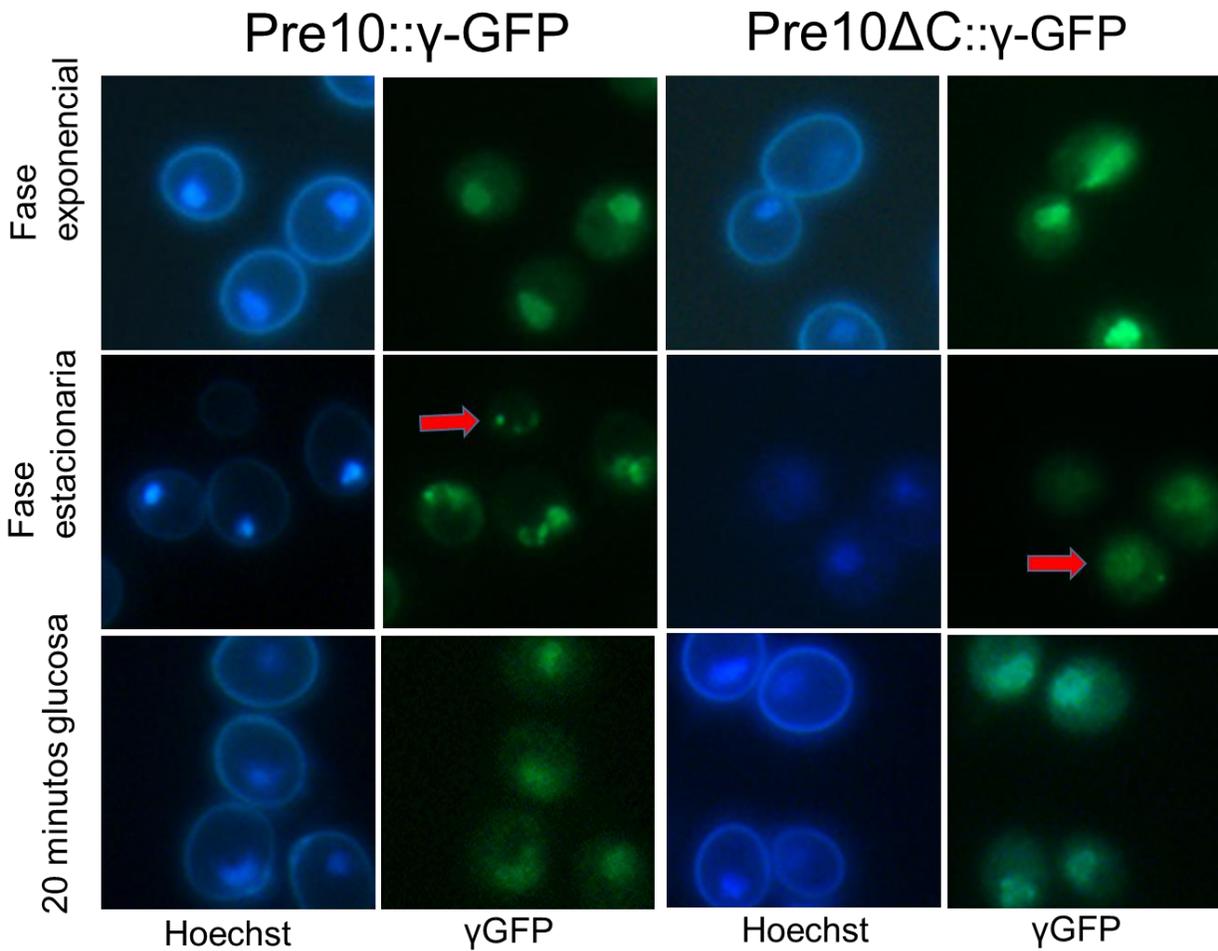


Figura 18. La delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 afecta su localización, siendo predominantemente nuclear en fase estacionaria.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas en las que la subunidad Pre10 ($\alpha 7$) y Pre10 Δ C:: γ -GFP.

Se muestran células representativas, donde, a diferencia de la cepa control (Pre10:: γ -GFP ($\alpha 7$)), la cepa sin extremo carboxilo terminal (Pre10 Δ C:: γ -GFP ($\alpha 7$)) muestra un fenotipo con localización de la señal predominantemente nuclear durante la fase estacionaria (con flechas rojas se indica la diferencia de señal de ambas cepas).

Ambas muestran señal predominantemente nuclear en fase exponencial y re-suspensión en medio con fuentes de carbono.

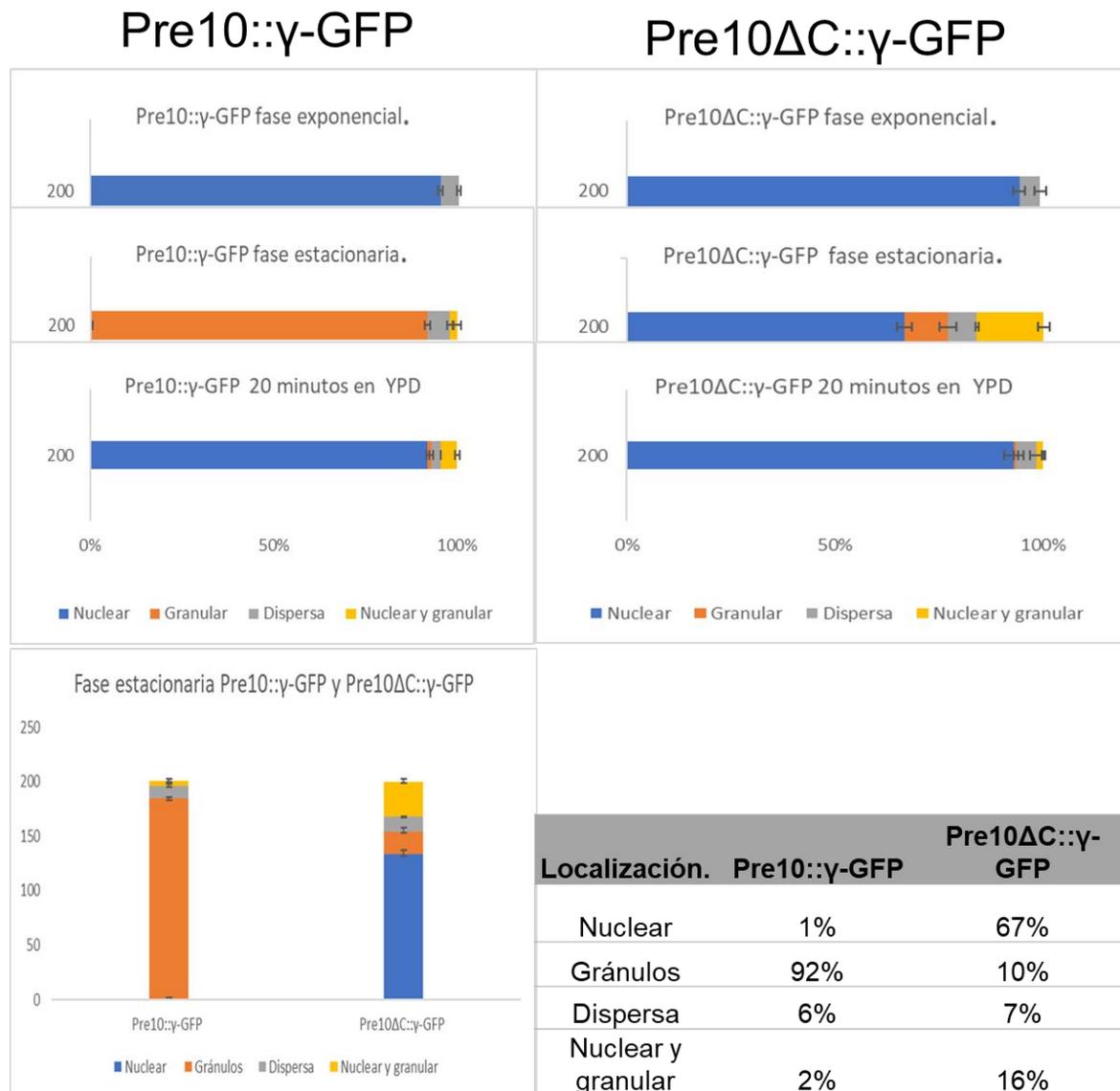


Figura 19. Grado de afectación de localización de la señal de la subunidad Pre10 en la delección de su extremo carboxilo termina.

Cuantificación de la localización de la subunidad Pre10 con y sin extremo carboxilo terminal.

Arriba se muestra la diferencia en porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, con desviaciones estándar.

Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica, de la diferencia de porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, de ambas cepas.

La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

Al encontrar que la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 afecta su localización en fase estacionaria, se decidió observar si también se ve afectada la localización de otras subunidades proteosomales de ambos complejos (19S y 20S).

Para valorar esto, se analizaron las cepas con subunidades del 19S y del 20S fusionadas a γ -GFP, donde existe delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 (Pre10 Δ C), bajo las mismas condiciones, en fase exponencial, fase estacionaria y a los 20 minutos de re-suspensión de células estacionarias en medio nuevo (figuras 20-27).

Se encontró que la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 altera la localización de las subunidades proteosomales tanto del complejo 20S (Pup1 (β 2), Pre9 (α 3)) como del complejo 19S (Rpn1(base) y Rpn5 (tapa)), de forma variable, con un porcentaje de localización distinto a sus respectivos controles (cepas con subunidad fusionada a γ -GFP, con extremo carboxilo terminal completo de Pre10).

Este cambio en la localización se observó en la fase estacionaria, sin encontrar diferencias importantes en la fase exponencial y a los 20 minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono (YPD)

En las cepas Pre9:: γ -GFP Pre10 Δ C (figuras 20 y 21) y Rpn1:: γ -GFP Pre10 Δ C (figuras 22 y 23) predominó más la localización nuclear en fase estacionaria, con respecto a sus controles, de igual manera en ambas la localización de la señal en fases exponencial y a los 20 minutos de re-suspensión de células estacionarias en fuentes con carbono fue principalmente nuclear.

Al comparar la localización de Pre9 en las cepas Pre9:: γ -GFP y Pre9:: γ -GFP Pre10 Δ C encontramos que la señal de esta subunidad, en fase estacionaria, cambia de ser exclusivamente en PSGs (95%) en la cepa control, a localizarse en el núcleo (66%) con menor formación de PSGs (21%) en la cepa con delección de extremo carboxilo terminal de Pre10 (figura 21).

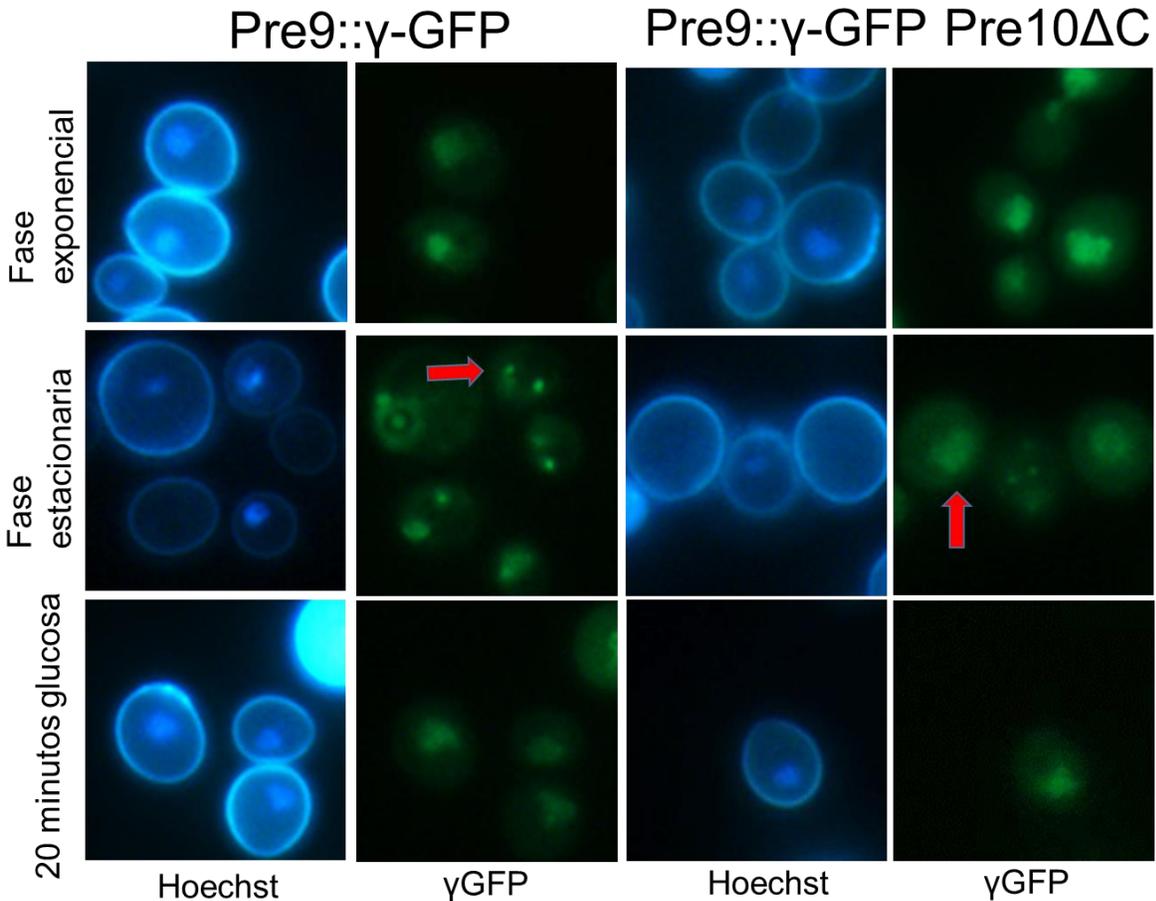


Figura 20. La localización de Pre9 es predominantemente nuclear con poca formación de PSGs, en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 , durante la fase estacionaria. Esta frase no se entiende

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pre9:: γ -GFP y Pre9:: γ -GFP Pre10 Δ C.

Se observa que durante la fase estacionaria la señal de la cepa sin extremo carboxilo terminal de Pre10 es predominantemente nuclear, a diferencia de su control (con flechas rojas se indica la diferencia de localización de la señal de ambas cepas en fase estacionaria), este fenotipo es similar a la localización del proteosoma de la cepa Pre10 Δ C:: γ -GFP, en fase estacionaria.

En fase exponencial y re-suspensión en medio con fuentes de carbono la señal se encuentra predominantemente nuclear en ambas cepas.

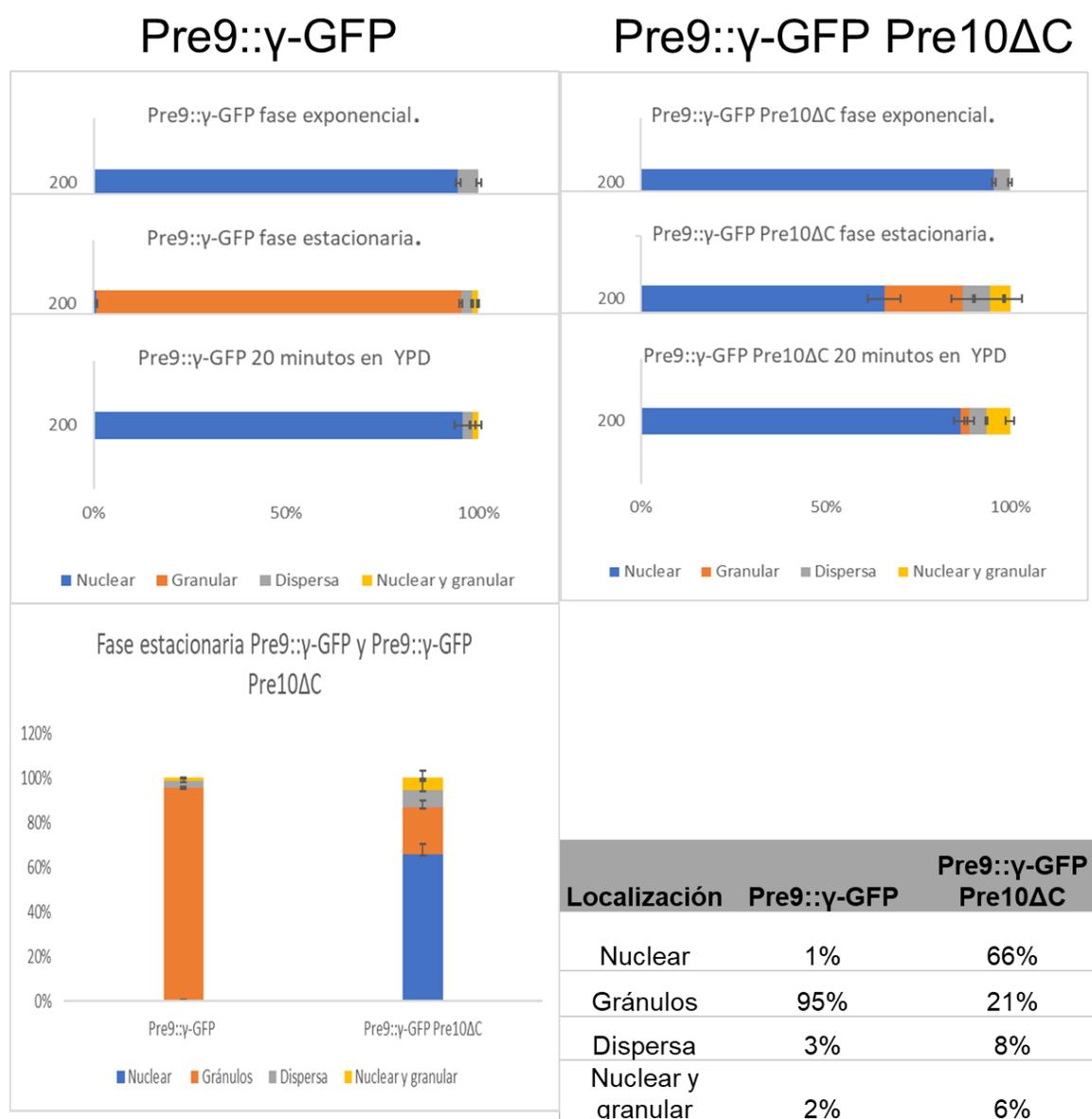


Figura 21. Grado de afectación de localización de la señal de la subunidad Pre9 en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10.

Cuantificación de la localización de la subunidad Pre9 ($\alpha 3$) en las cepas Pre9::γ-GFP y Pre9::γ-GFP Pre10ΔC. Arriba se muestra la diferencia en porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, en ambas cepas, con desviaciones estándar. Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica, de la diferencia de porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, de ambas cepas. La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

En las cepas Rpn1:: γ -GFP y Rpn1:: γ -GFP Pre10 Δ C encontramos que la señal de Rpn1, en fase estacionaria, se vuelve predominantemente nuclear en la cepa sin el extremo carboxilo terminal de Pre10 con un 80% de señal exclusivamente nuclear y 11% nuclear con formación de PSGs, siendo solamente 3% la señal encontrada exclusivamente en PSGs (figura 23).

Esto contrasta con la cepa control, que, aunque ya tenía un grado importante de señal nuclear (33% exclusivamente nuclear), seguía presentando señal en PSGs tanto exclusiva en gránulos (25%), como nuclear y granular (36% nuclear con formación de PSGs); para pasar a ser casi en su totalidad nuclear en la cepa sin extremo carboxilo terminal de Pre10 (figura 23).

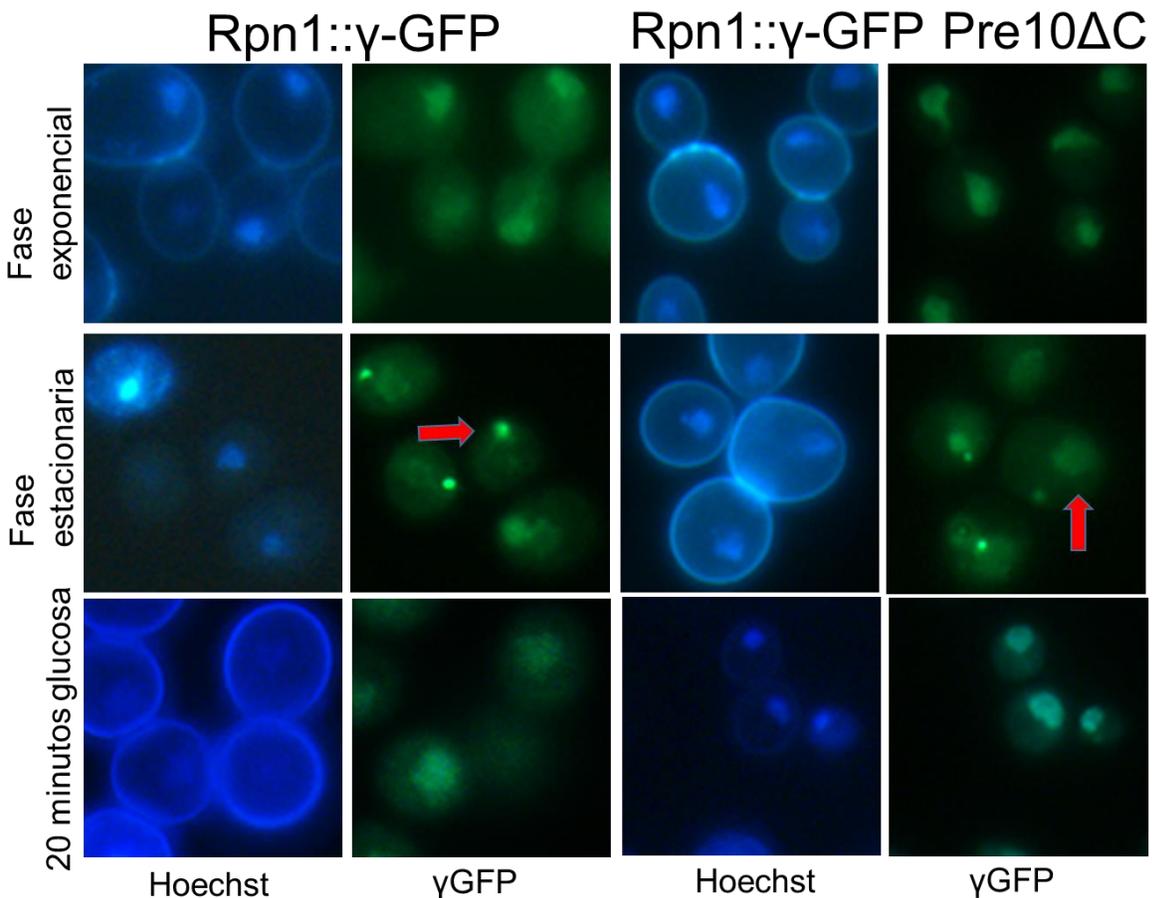


Figura 22. La localización de Rpn1 es predominantemente nuclear con casi nula formación de PSGs, en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10, durante la fase estacionaria.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Rpn1:: γ -GFP y Rpn1:: γ -GFP Pre10 Δ C. Se observa que durante la fase estacionaria la señal de Rpn1 sin el extremo carboxilo terminal de Pre10 es predominantemente nuclear, sin embargo, la cepa control también presenta un alto porcentaje de localización nuclear en fase estacionaria, con formación de PSGs (con flechas rojas se indica la diferencia de señal de ambas cepas). En fase exponencial y re-suspensión en medio con fuentes de carbono la señal se encuentra predominantemente nuclear en ambas cepas.

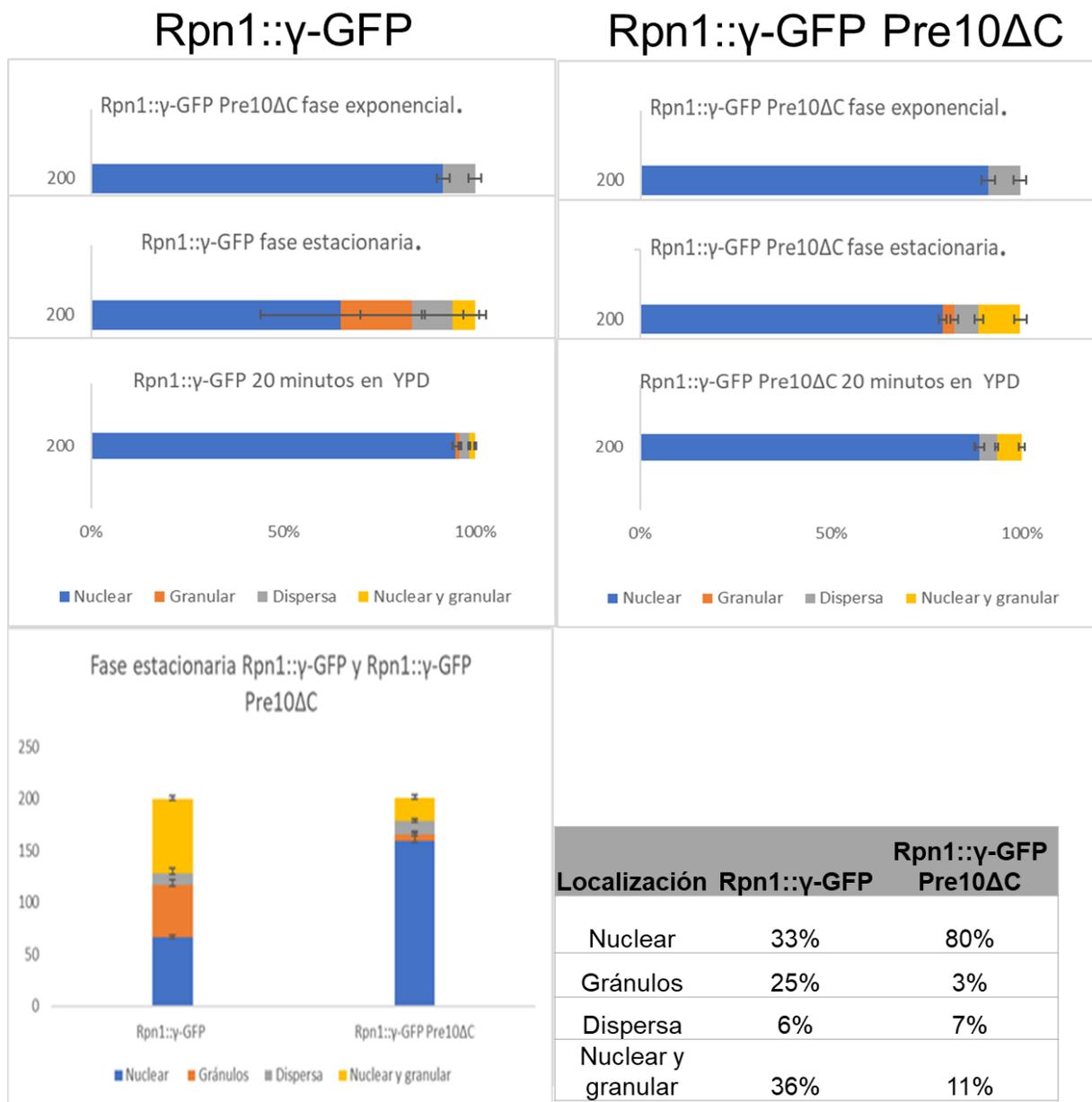


Figura 23. Grado de afectación de localización de la señal de la subunidad Rpn1 en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10.

Cuantificación de la localización de la subunidad Rpn1 en las cepas Rpn1::γ-GFP y Rpn1::γ-GFP Pre10ΔC.

Arriba se muestra la diferencia en porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias de ambas cepas, con desviaciones estándar.

Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica, de la diferencia de porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, donde se muestra que la señal de Rpn1 en la cepa control tiene un porcentaje nuclear importante (33% nuclear y 36% nuclear y granular), sin embargo, en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 se observa un aumento de señal nuclear de Rpn1 siendo casi completamente nuclear (80%). La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

En las cepas Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C (figuras 24 y 25) y Rpn5:: γ -GFP Pre10 Δ C (figuras 26 y 27) se encontró más variación de localización de señal en fase estacionaria, siendo Rpn5:: γ -GFP Pre10 Δ C la cepa que presentó una mayor formación de gránulos almacenadores de proteosoma de todas las cepas con las que se trabajó de ambos complejos.

La señal de la subunidad Pup1 en las cepas Pup1:: γ -GFP y Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C fue diversa tanto en la cepa control como en la cepa sin extremo carboxilo terminal de Pre10, sin embargo presentó un cambio de localización de señal en fase estacionaria, pasando de ser: 22% nuclear, 57% granular, 13 dispersa y 7% nuclear y granular en la cepa control a ser 50% nuclear, 16% granular, 7% dispersa y 27% nuclear y granular (figura 25). De estas cepas la cepa Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C mostró un porcentaje importante de señal en PSGs, ya sea exclusivamente granular o granular y nuclear, sin embargo, hubo un aumento de localización nuclear (exclusiva nuclear y con formación de PSGs), con respecto a su control (figuras 24 y 25).

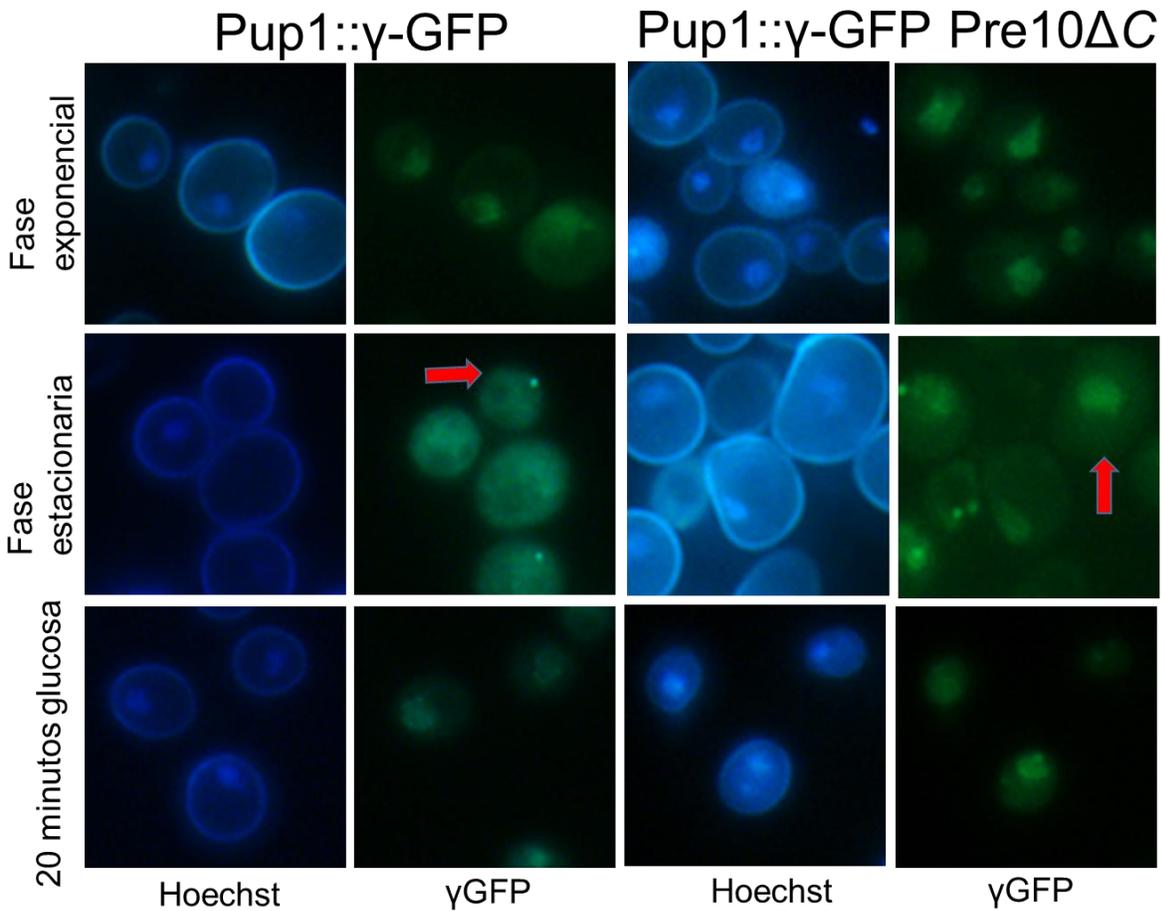


Figura 24. Durante la fase estacionaria la localización de Pup1 es predominantemente nuclear o nuclear con PSGs en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pup1:: γ -GFP y Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C. Se observa que durante la fase estacionaria la señal de Pup1 es predominantemente nuclear y nuclear con formación de PSGs, a diferencia de su control (con flechas rojas se indica la diferencia de señal de ambas cepas, en fase estacionaria). En ambas cepas en fase exponencial y re-suspensión en medio con fuentes de carbono la señal es predominantemente nuclear.

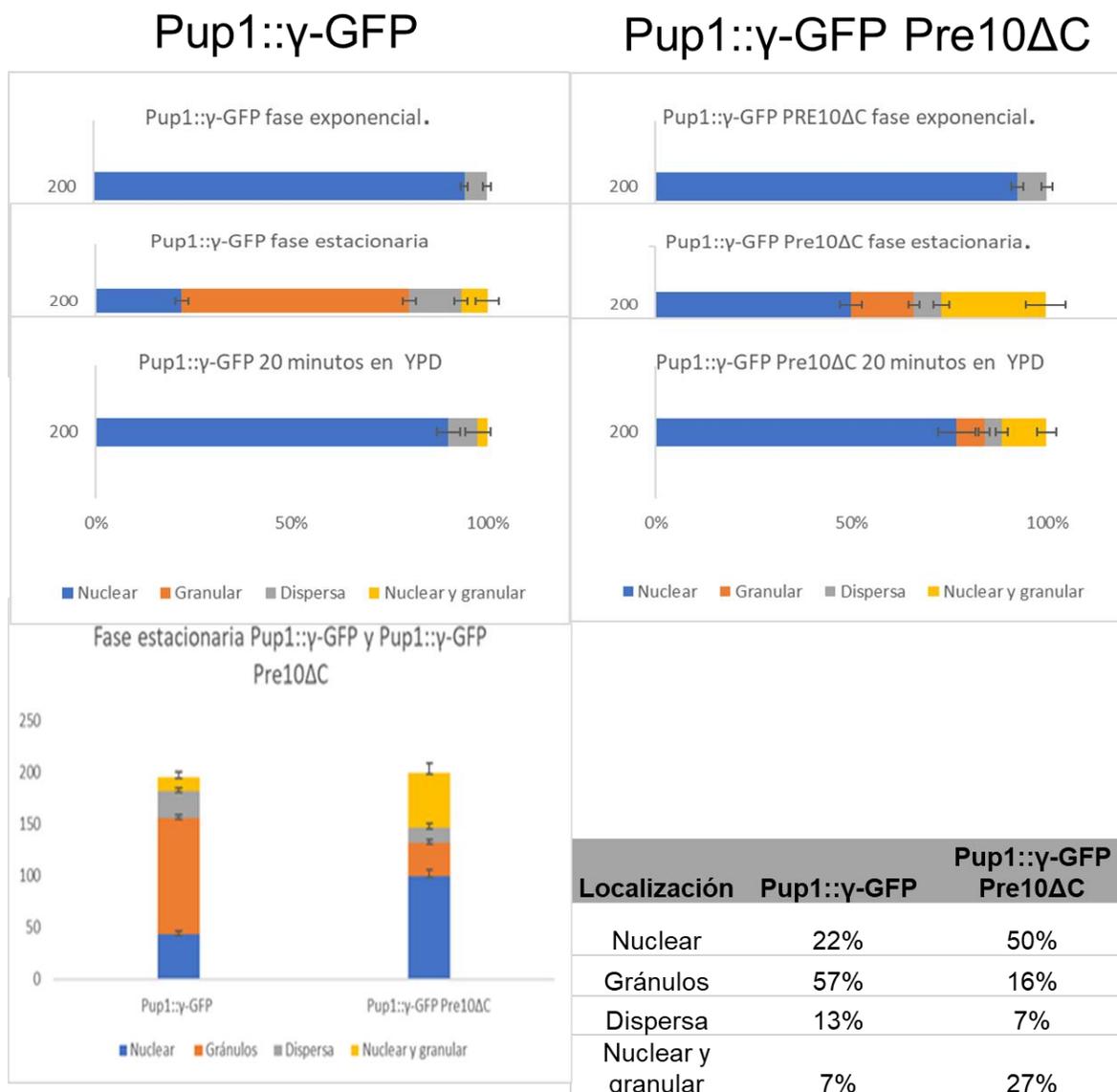


Figura 25. Grado de afectación de localización de la señal de la subunidad Pup1 en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10.

Cuantificación de la localización de la subunidad Pup1 (β_2) en las cepas Pup1:: γ -GFP y Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C. Arriba se muestra la diferencia en porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, con desviaciones estándar. Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica, de la diferencia de porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, donde se muestra que la señal de la cepa Pup1 sin extremo carboxilo terminal es predominantemente nuclear y nuclear con formación de PSGs. La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

Con respecto a la cepa Rpn5:: γ -GFP Pre10 Δ C se encontró que la señal de Rpn5, durante la fase estacionaria, fue la que tuvo mayor presencia en PSGs (figuras 26 y 27), en comparación a las demás cepas (Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C, Pre9:: γ -GFP Pre10 Δ C, Pre10 Δ C:: γ -GFP y Rpn1:: γ -GFP Pre10 Δ C) (figuras 18-25), pasando de ser mayormente exclusiva en PSGs (94% en cepa control), a ser principalmente nuclear y granular (41%), seguido de exclusiva en PSGs (32%), nuclear (19%) y por último dispersa (8%) (figura 27).

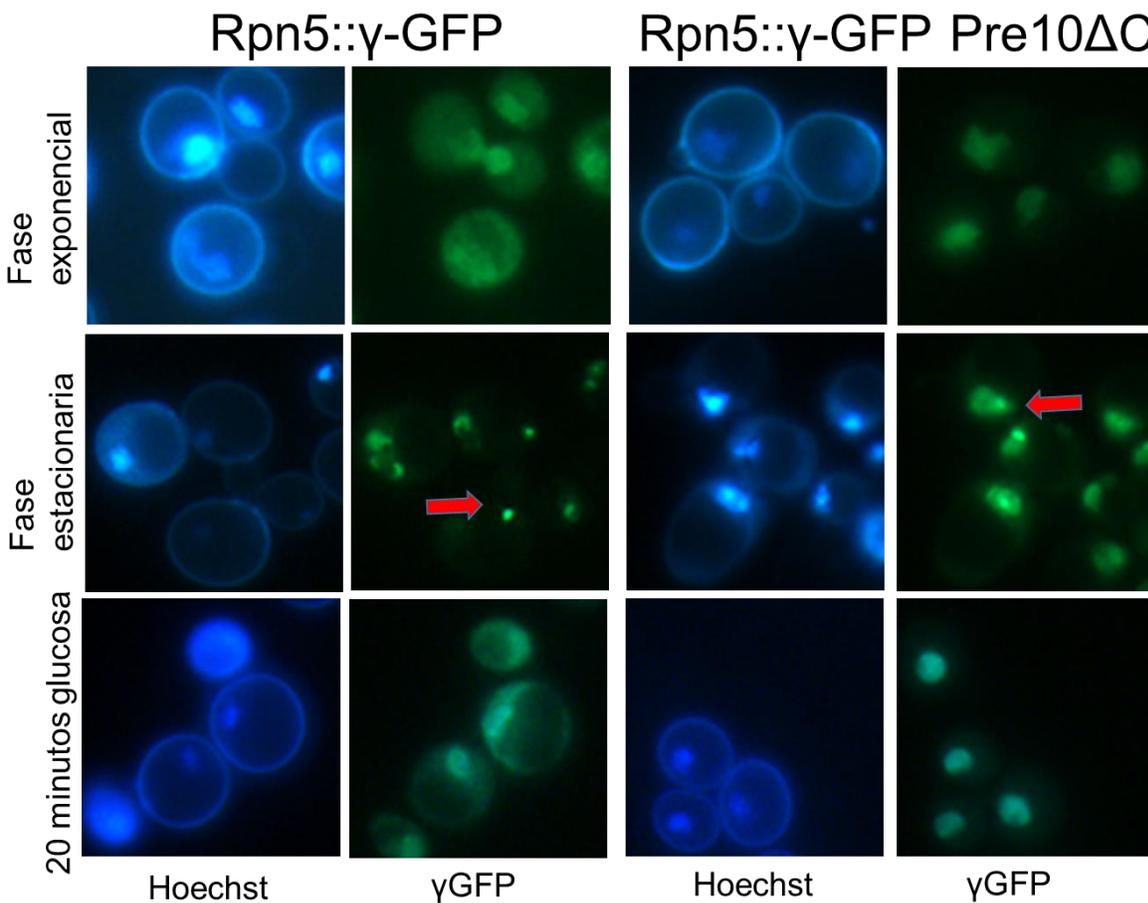


Figura 26. Durante la fase estacionaria, la localización de Rpn5 es predominantemente nuclear con formación de PSGs en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Rpn5:: γ -GFP y Rpn5:: γ -GFP Pre10 Δ C.

Se observa que la señal de Rpn5 durante la fase estacionaria se distribuye casi equitativamente en gránulos almacenadores (principalmente perinucleares) y núcleo, señal que es diferente a la observada en la cepa control, siendo la subunidad que presenta mayor formación de PSGs con señal nuclear o sin señal nuclear. La cepa Rpn5:: γ -GFP Pre10 Δ C muestra mayor formación de gránulos almacenadores de proteosoma en comparación con la cepa Pre10 Δ C:: γ -GFP (con flechas rojas se indica la diferencia de señal de ambas cepas, en fase estacionaria).

En fase exponencial y re-suspensión en medio con fuentes de carbono la señal se encuentra predominantemente nuclear en ambas cepas.

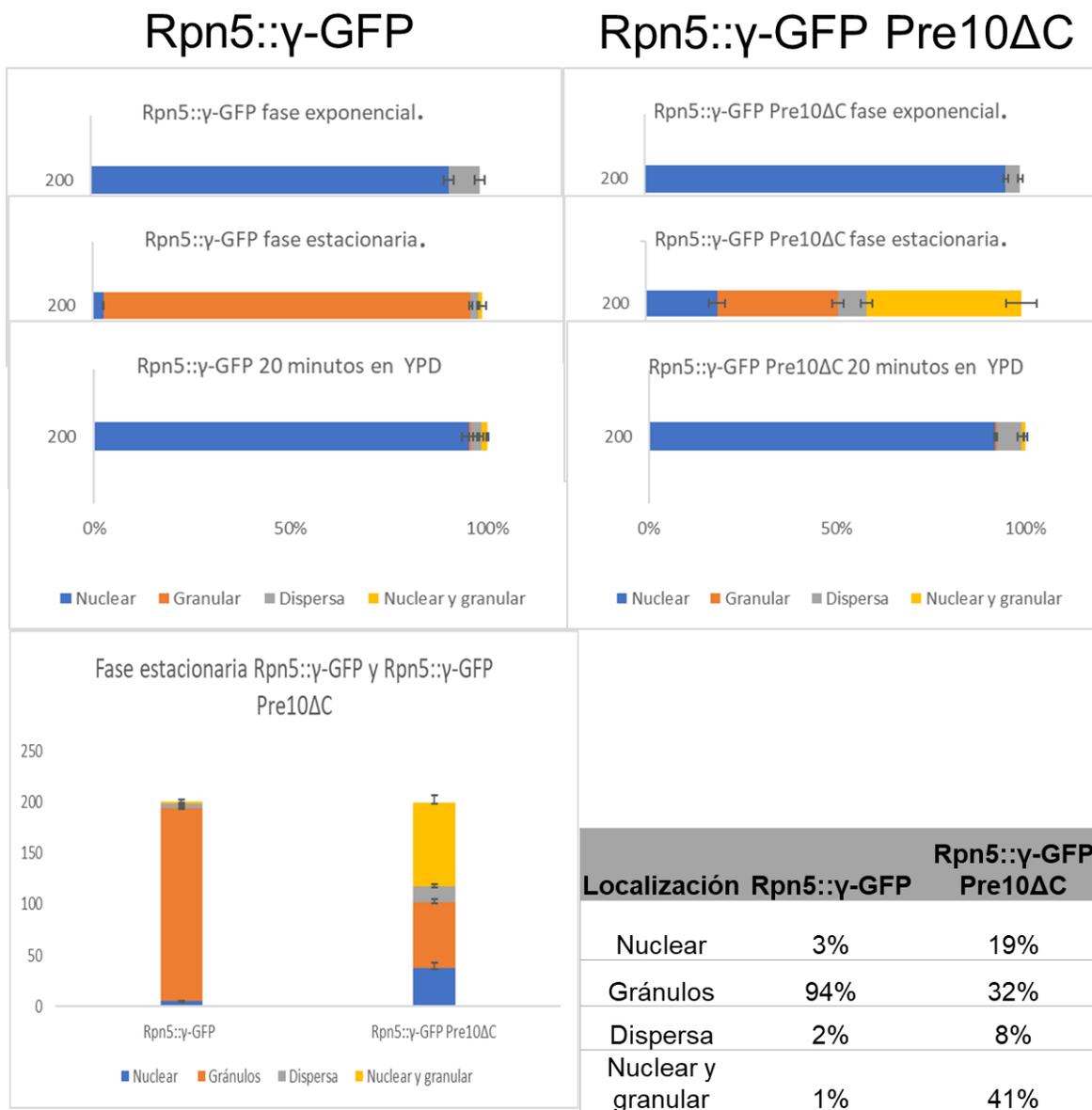


Figura 27. Grado de afectación de localización de la señal de la subunidad Rpn5 en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10.

Cuantificación de la localización de la subunidad Rpn5 en las cepas Rpn5::γ-GFP y Rpn5::γ-GFP Pre10ΔC.

Arriba se muestra la diferencia en porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, con desviaciones estándar.

Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica, de la diferencia de porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, donde se muestra que la señal de la cepa Rpn5 sin extremo carboxilo terminal es predominantemente nuclear con PSGs (41%), seguido de granular (32%) y nuclear (19%). De todas las cepas esta es la que permite una mayor formación de gránulos almacenadores de proteosoma y la que presenta mayor porcentaje de localización en ambos compartimentos. La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

Como se observa en las figuras previas, el tipo de localización nuclear durante la fase estacionaria de las subunidades proteosomales con delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 es variable, sin embargo, todas presentaron un enriquecimiento de localización nuclear, en comparación con sus respectivos controles (con el extremo carboxilo terminal de Pre10 completo).

Los fenotipos observados muestran un comportamiento similar a la cepa Pre10 Δ C:: γ -GFP (α 7) donde, aunque no presentan el mismo porcentaje de localización en fase estacionaria, la señal de cada subunidad tiende a encontrarse en el núcleo, asociado a un grado variable de formación de PSGs, el cual es menor en comparación a sus controles. Refrasear este párrafo.

La diferencia en los porcentajes de localización de las subunidades de los complejos 19S y 20S con respecto a la cepa Pre10 Δ C:: γ -GFP, nos hizo contemplar la posibilidad de que Pre10 no se ensambla en su complejo o que el complejo 20S no se ensambla con el complejo 19S, para formar al proteosoma 26S, debido a esto, se decidió valorar la localización de las subunidades del 19S y 20S con respecto a Pre10 Δ C:: γ -GFP, para ver si estos co-localizan durante la dinámica proteosomal.

Para poder observar la co-localización de los complejos 19S y 20S con la subunidad Pre10 Δ C fusionada a γ -GFP, se generaron las cepas Pre9::mCherry Pre10 Δ C:: γ -GFP y Rpn5::mCherry Pre10 Δ C:: γ -GFP, que se observaron en microscopio confocal, bajo las mismas condiciones, en fase exponencial, estacionaria y re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono.

Se observó que existe una co-localización importante entre la señal de las subunidades Pre9 (20S) y Rpn5 (19S) con Pre10 Δ C:: γ -GFP, tanto en núcleo, como en PSGs, lo que apoya la idea de que Pre10 Δ C se ensambla en el complejo 20S y que el complejo 20S se ensambla con el 19S y de igual manera se encuentra junto al 19S en los PSGs (figura 28).

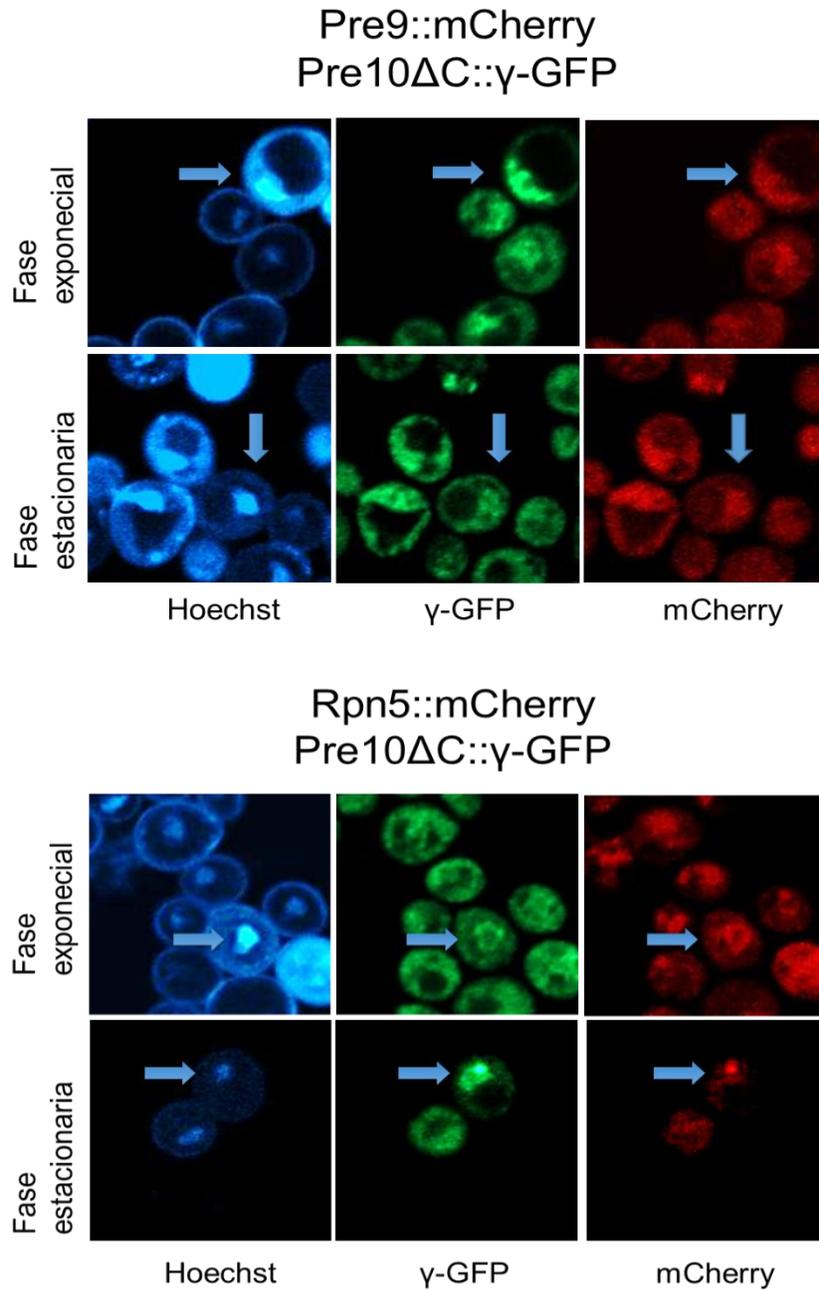


Figura 28. La señal de la subunidad Pre10 Δ C co-localiza con las subunidades Rpn5 y Pre9 de los complejos 19S y 20S, durante la dinámica proteosomal.

Fotografías tomadas en microscopio confocal, de cepas con Pre9 y Rpn5 (complejos 20S y 19S respectivamente) fusionadas a mCherry y Pre10 sin extremo carboxilo terminal fusionado a γ -GFP.

Se observa que la señal de los complejos 19S y 20S (mCherry) tiene una co-localización importante tanto en núcleo como en gránulos (co-localización de la señal indicado con flechas azules). Aunque no explica la diferencia de porcentajes, implica que Pre10 sin extremo carboxilo terminal se encuentra co-localizando con ambos complejos, durante la dinámica proteosomal.

Como se mencionó anteriormente, la eliminación del extremo carboxilo terminal de Pup2 produce una disminución significativa de formación de PSGs con un enriquecimiento nuclear de la señal de Pup2, durante la fase estacionaria (figura 17), este fenotipo se observa de igual manera en varias subunidades de ambos complejos (19S y 20S), afectando su localización durante la dinámica proteosomal en una manera similar al efecto que produce la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 (anexo 13.6, figura 51).

De igual manera este fenotipo de localización en fase estacionaria, que ocurre en ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10 no depende de la cepa usada BY4741 o BY4742, ya que en ambas cepas se muestra un fenotipo similar de localización durante la dinámica proteosomal (anexo 13.7, figura 52).

9.2 Identificación de repercusiones biológicas en la delección de los extremos carboxilo terminal de las subunidades Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10.

9.2.1 La cepa Pre10 Δ C muestra una mayor viabilidad con respecto a la cepa silvestre.

En un intento por buscar que repercusiones biológicas de la delección de los extremos carboxilo terminal de las subunidades Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10, se buscó valorar si está comprometida la viabilidad de las células sin extremos carboxilo terminal (Pup2 Δ C, Pre6 Δ C, Pre9 Δ C y Pre10 Δ C).

Para esto, se realizó un ensayo de viabilidad cualitativo, en el cual se tomaron muestras a lo largo de varios días, a partir de un cultivo en YPD que se dejó crecer hasta 52 días, realizando goteos de suspensiones celulares con diluciones seriadas, en medios sólidos, de muestras tomadas en distintos días.

Se encontró que, en los goteos de suspensiones celulares por diluciones seriadas a partir del cultivo líquido, las cepas Pup2 Δ C, Pre6 Δ C y Pre9 Δ C pierden viabilidad a partir del día 25 en comparación con la cepa silvestre, por el contrario, la cepa Pre10 Δ C continúa siendo viable al menos hasta el día 52, creciendo aún más que la cepa silvestre (figura 29).

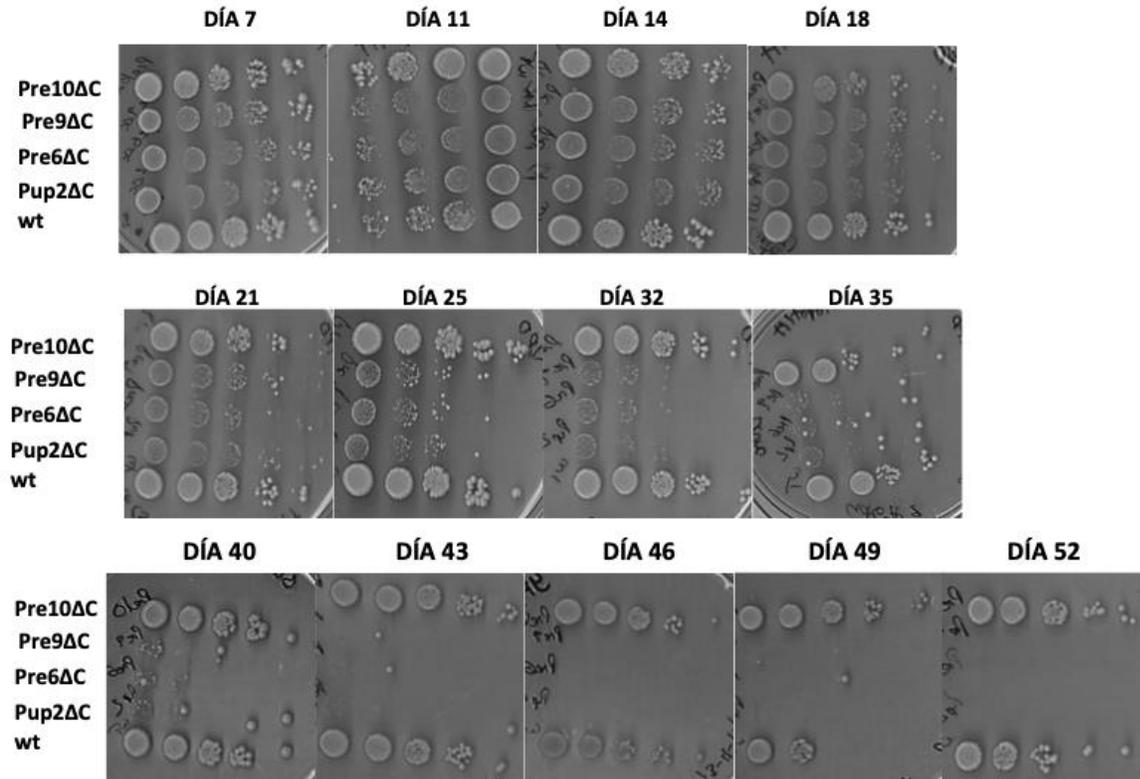


Figura 29. Las cepas Pup2ΔC, Pre6ΔC y Pre9ΔC tienen una menor viabilidad, mientras que Pre10ΔC muestra una mayor viabilidad, con respecto a la cepa silvestre..

Se muestran las fotos obtenidas de los goteos de suspensiones celulares por diluciones seriadas que se hicieron a partir de las muestras obtenidas en los distintos días indicados arriba de cada imagen, los cuales tomaron en condiciones de esterilidad y se dejaron crecer en incubadora a 30°C durante 2 días. Se observa que las cepas Pup2ΔC, Pre6ΔC y Pre9ΔC tienen una viabilidad disminuida con respecto a la cepa silvestre (Wild type), dejando de crecer a partir del día 25, también se observa que la cepa Pre10ΔC sigue siendo viable, creciendo más que la cepa silvestre al día 49.

9.2.2 La cepa Pre9 Δ C muestra mayor resistencia a estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno.

Para poder evaluar si la ausencia, de los extremos carboxilo terminal de las proteínas Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10, compromete la respuesta de las células ante situaciones de estrés; se analizó la supervivencia de las cepas sin extremo carboxilo terminal (Pup2 Δ C, Pre6 Δ C, Pre9 Δ C y Pre10 Δ C) en medios de cultivo con distintos compuestos químicos, que inducen dos tipos de estrés que definimos como: crónico (figuras 30-32) y agudo (figuras 33-34).

a) Estrés crónico

Para valorar estrés crónico se hicieron goteos por diluciones seriadas de suspensiones celulares (a partir de cultivos en fase exponencial) en medios sólidos YPD, preparados con distintos estresores que se usaron para inducir estrés de retículo endoplásmico, estrés oxidativo y estrés osmótico.

Al evaluar el impacto del estrés de retículo endoplásmico (tunicamicina, figura 30) y del estrés osmótico (cloruro de sodio y sorbitol, figura 31), se observó que no hay ninguna diferencia entre las cepas analizadas y la cepa silvestre.

En presencia de terbutil hidroperóxido, un inductor de estrés oxidativo, las cepas sin extremo carboxilo terminal no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, en presencia de H₂O₂ se observó que la cepa Pre9 Δ C es más resistente que la cepa silvestre (figura 32).

**Estrés de retículo inducido
con Tunicamicina.**

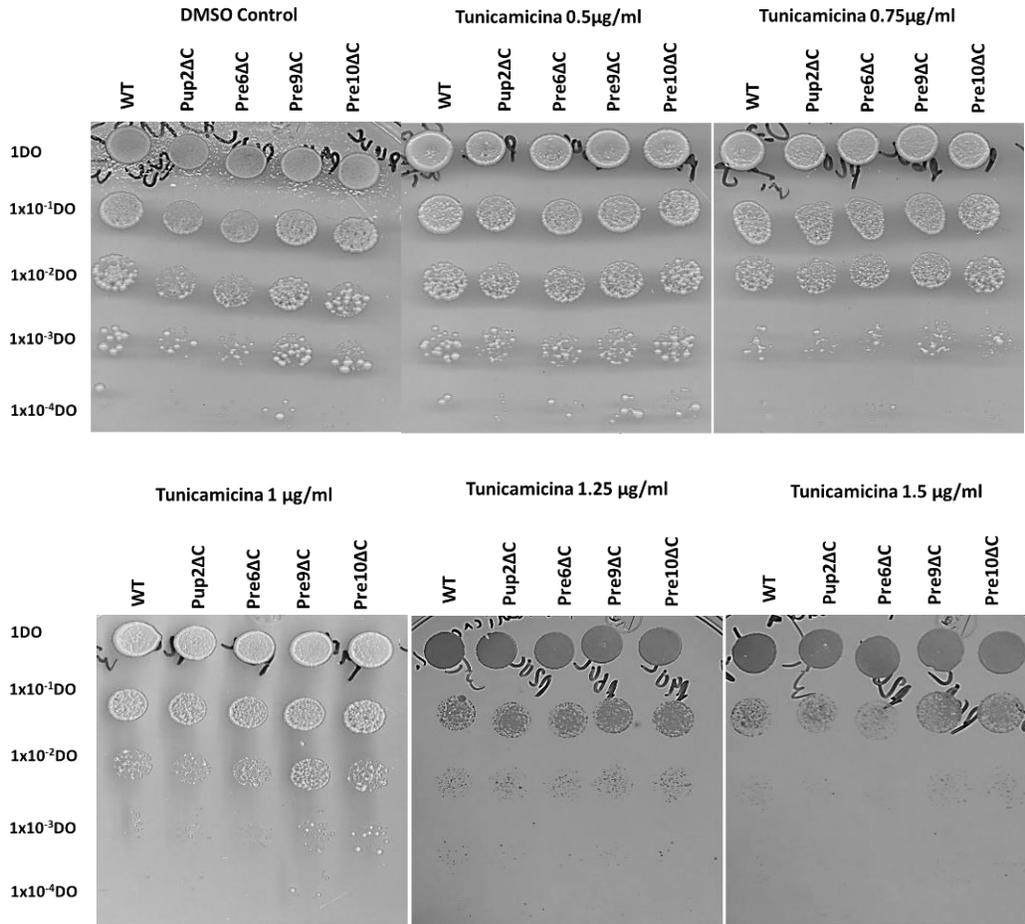


Figura 30. No existen diferencias cualitativas significativas de viabilidad, de las cepas sin extremo carboxilo terminal, con respecto a la cepa silvestre, en estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.

Goteos de suspensiones celulares en diluciones seriadas 1:10 a partir de 1 DO, de pre-cultivos en medio YPD.

Los goteos de suspensiones celulares se hicieron en medio YPD sólido con DMSO (como control negativo) y medios YPD sólidos con distintas concentraciones de tunicamicina (0.5 μg/ml, 0.75 μg/ml, 1 μg/ml, 1.25 μg/ml y 1.5 μg/ml) y se dejaron en incubadora a 30°C durante 2 días. Se observa que todas las cepas analizadas se comportan de manera similar a la cepa silvestre (*Wild Type*).

Imágenes representativas de 3 réplicas independientes.

Estrés osmótico.

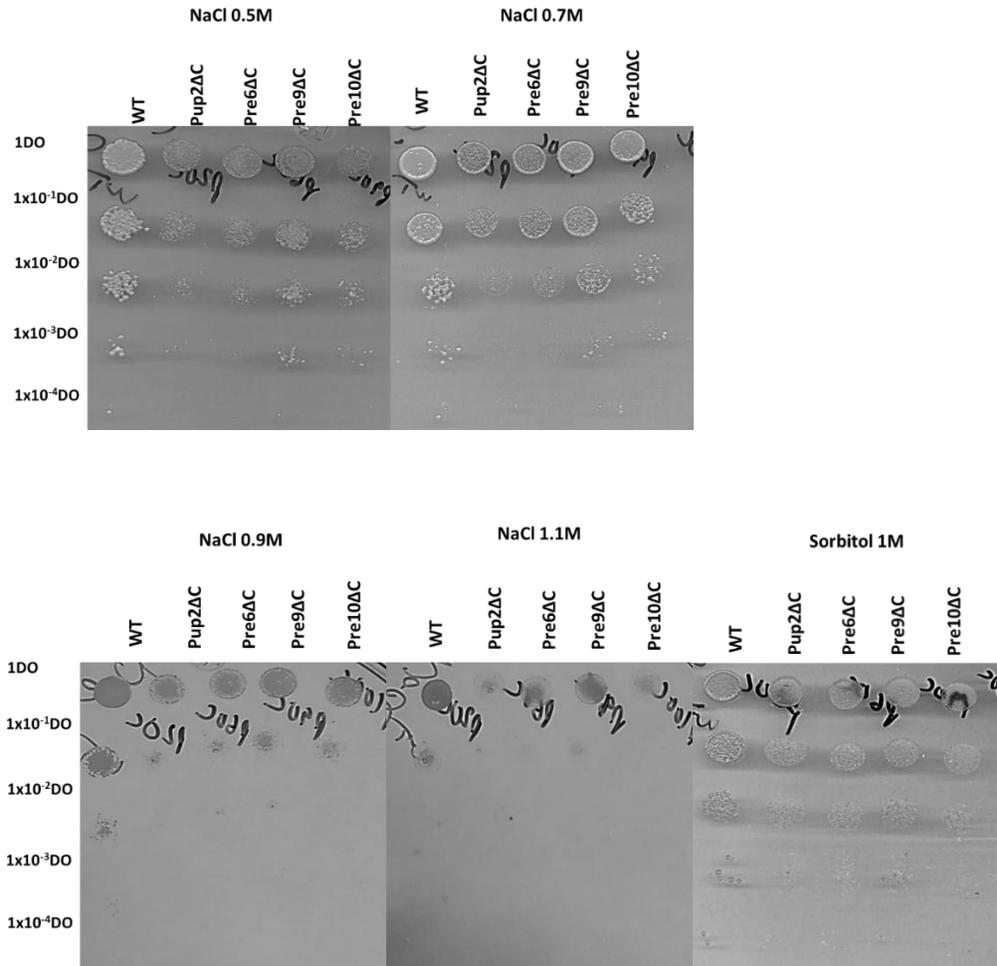


Figura 31. No existen diferencias cualitativas significativas de viabilidad de las cepas sin extremo carboxilo terminal, con respecto a la cepa silvestre, en estrés osmótico inducido por NaCl y Sorbitol.

Goteos de suspensiones celulares en diluciones seriadas 1:10 a partir de 1 DO, de pre-cultivos en medio YPD.

Los goteos de suspensiones celulares se hicieron en medio YPD sólido con NaCl a distintas concentraciones (0.5M, 0.7M, 0.9M y 1.1M) y YPD sólido con Sorbitol (1M), estas suspensiones se dejaron en incubadora a 30°C durante 2 días. Se observa que todas las cepas analizadas se comportan de manera similar a la cepa silvestre (*Wild Type*).

Imágenes representativas de 3 réplicas independientes.

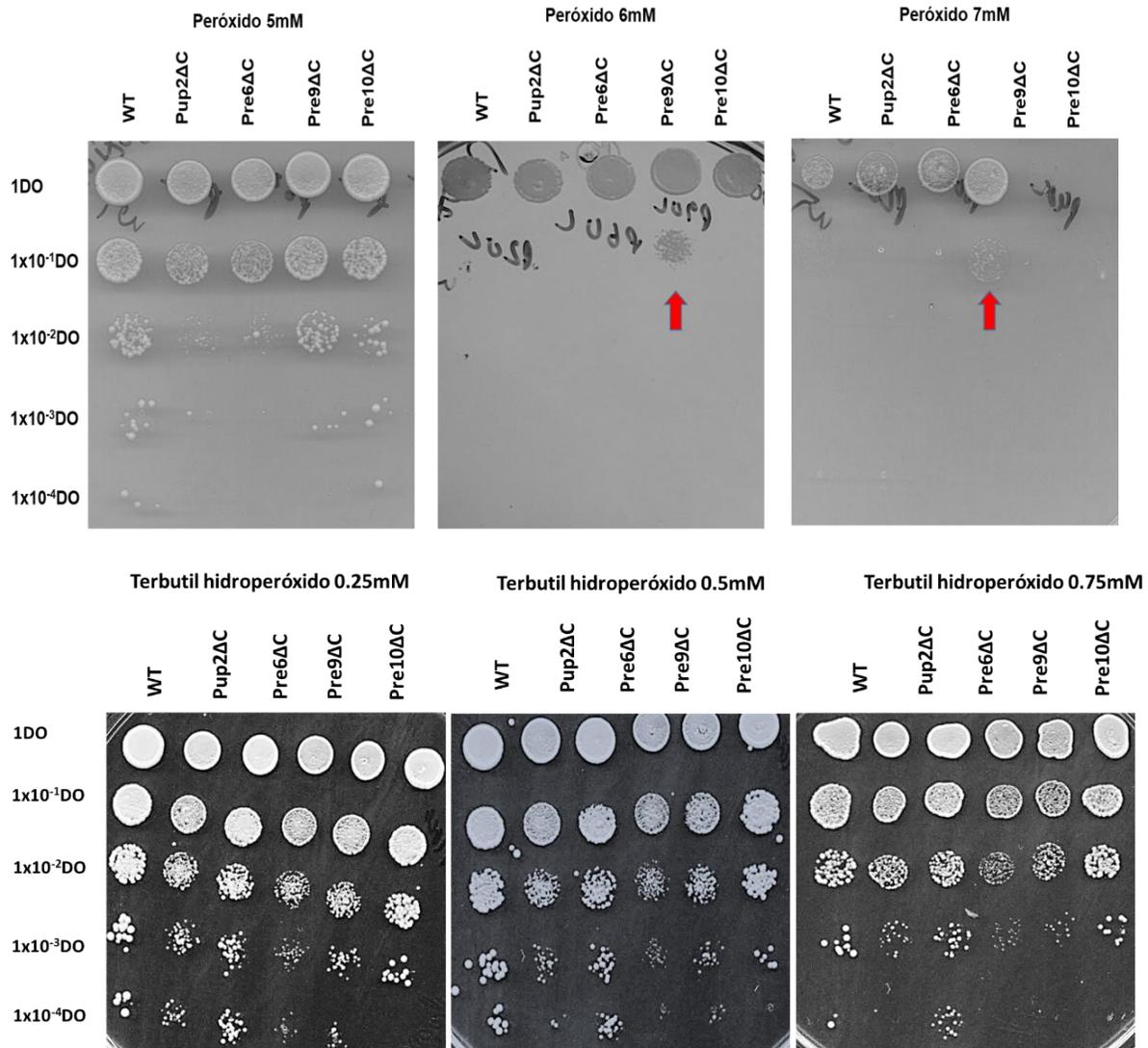


Figura 32. La cepa Pre9ΔC muestra mayor resistencia a estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno. Goteos de suspensiones celulares en diluciones seriadas 1:10 a partir de 1 DO, de pre-cultivos en medio YPD. Los goteos de suspensiones celulares se hicieron en medio YPD sólido con H₂O₂ a distintas concentraciones (5mM, 6mM y 7mM) y Terbutil hidroperóxido a distintas concentraciones (0.25mM, 0.5mM y 0.75mM), estas suspensiones se dejaron en incubadora a 30°C durante 2 días. Se observa que en los crecimientos evaluados en presencia de H₂O₂ la cepa Pre9ΔC es más resistente que la cepa silvestre siendo evidente a partir de la concentración 6mM. El resto de las cepas se comportan como la silvestre. Al inducir el estrés oxidativo con terbutil hidroperóxido a 0.25mM, 0.5mM y 0.75mM no se observan diferencias entre ninguna de las cepas analizadas. Imágenes representativas de 3 réplicas independientes.

b) Estrés agudo.

A continuación, se evaluó el efecto de un estrés agudo sobre las cepas que carecen del extremo carboxilo de las proteínas Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10.

En primer lugar, se evaluó el efecto del estrés oxidante (figura 33), observándose que no hay diferencias entre las distintas cepas con respecto a la silvestre al usar H₂O₂, paraquat o terbutil-hidroperóxido, tampoco se encontraron diferencias con respecto a la cepa silvestre en inducción de estrés agudo por choque térmico a 37°C, 42°C y 50°C (figura 34).

De igual manera se analizó si la presencia de un estrés oxidante agudo (3 horas con H₂O₂) modificaba la localización de la subunidad Pre10 con y sin su extremo carboxilo terminal completo, tanto en fase exponencial como estacionaria, sin encontrar diferencias en la localización nuclear de Pre10 y Pre10ΔC (anexo 13.8, figura 53).

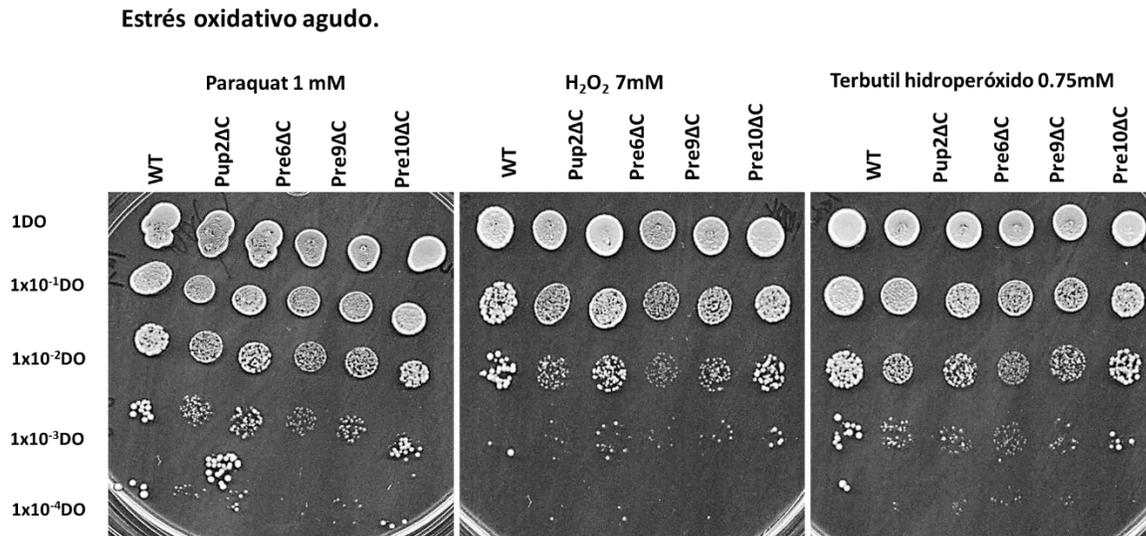


Figura 33. No existen diferencias cualitativas significativas de viabilidad, de las cepas sin extremo carboxilo terminal, con respecto a la cepa silvestre, en estrés oxidativo agudo.

Se tomaron muestras a partir de cultivos con 1 DO de células, en fase exponencial, que se pusieron a crecer durante tres horas en presencia de paraquat 1mM, H₂O₂ 7mM y terbutil hidroperóxido 0.75 mM.

Posterior a las 3 horas se hicieron los goteos de suspensiones celulares en diluciones seriadas 1:10, en medio sólido YPD, y se dejaron en incubadora a 30°C por dos días. No se observan diferencias significativas entre las cepas Pup2ΔC, Pre6ΔC, Pre9ΔC, Pre10::γ-GFP y Pre10ΔC con respecto a la cepa silvestre en ninguna de las condiciones de estrés oxidativo agudo evaluadas.

Imágenes representativas de 3 réplicas independientes.

Choque térmico

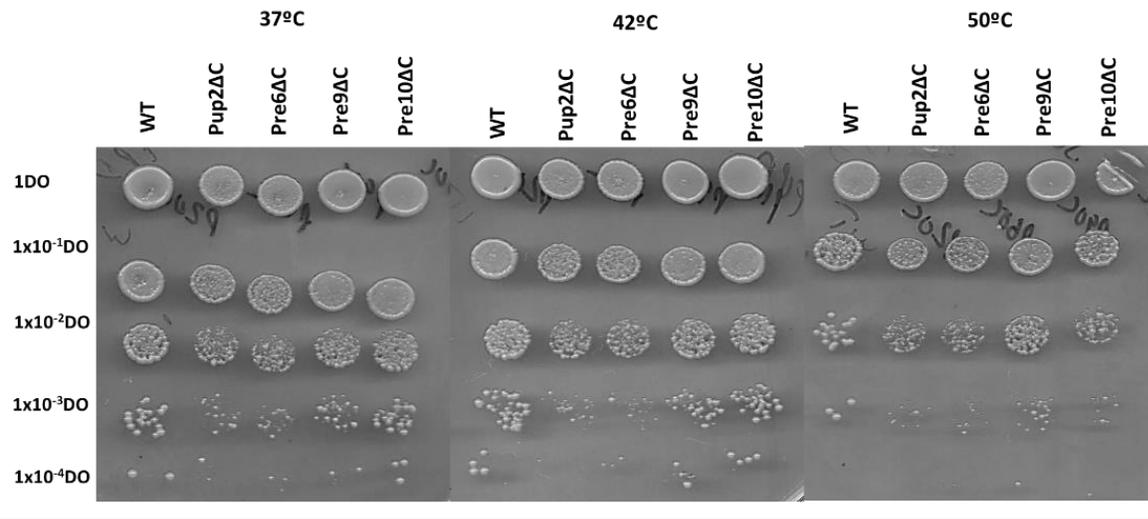


Figura 34. No existen diferencias cualitativas significativas de viabilidad, de las cepas sin extremo carboxilo terminal, con respecto a la cepa silvestre, en estrés por choque térmico.

Se tomaron muestras a partir de cultivos con 1 DO de células en fase exponencial, de las cepas indicadas, las cuales se pusieron a crecer durante tres horas a 37°C, 42 C y 50 °C, después de las 3 horas se hicieron los goteos de suspensiones celulares en diluciones seriadas 1:10, en medio sólido YPD y se dejaron en incubadora a 30°C por dos días. En estas condiciones no se observó ninguna diferencia entre las cepas Pup2ΔC, Pre6ΔC, Pre9ΔC y Pre10ΔC con respecto a la cepa silvestre.

Imágenes representativas de 3 réplicas independientes.

9.3 Función de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* en la localización del proteosoma durante la dinámica proteosomal.

Como se comentó previamente, no existe mucha información acerca de los mecanismos involucrados en el cambio de localización del proteosoma, que ocurre durante la dinámica proteosomal por falta de fuentes de carbono en el medio. Se sabe que la proteína Blm10 está involucrada tanto en la regulación (Schmidt *et al.*, 2005; Fehlker *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 2008), e importación nuclear del complejo 20S (Weberruss *et al.*, 2013), como en su correcta localización en PSGs durante la fase estacionaria (Weberruss *et al.*, 2013).

Recientemente se identificó que existe una interacción física de Zds2 con Pre10 y Blm10 (Gavin *et al.*, 2002). Se sabe que Zds2 tiene un parálogo que es Zds1, que se localiza tanto en citoplasma como en el núcleo (Yakura, 2005) y se sabe que ambas cumplen funciones similares (involucrados en ciclo celular y exporte de RNA mensajero del núcleo), sin existir un fenotipo asociado a cada gen. Debido a que no se han encontrado otras proteínas involucradas en la correcta localización del proteosoma en la dinámica

proteosomal y basados en el antecedente mencionado, decidimos evaluar si los genes *ZDS1* y *ZDS2* tienen algún papel en la dinámica proteosomal.

Para valorar esto se construyeron cepas en las que se fusionó γ -GFP a subunidades del 29S y 20S, en donde se eliminaron los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*; estas se dejaron crecer en cultivos de la misma manera que los otros experimentos, tomando muestras en las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y re-suspensión en medio nuevo con fuentes de carbono de células estacionarias.

9.3.1 La delección del gen *ZDS1* afecta la localización del complejo 20S, pero no la localización del complejo 19S, en el fondo BY4742

Se observó que la señal de Pre10, en la cepa Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$, se encuentra alterada durante la fase estacionaria, encontrando una señal principalmente dispersa en el citoplasma (67%), con menor señal en PSGs (17% granular y 2% nuclear y granular) y exclusivamente nuclear (14%), contrastando con la señal predominantemente granular (92%) de la cepa control (figuras 35 y 36).

También se observó un retraso en la re-localización nuclear cuando las células estacionarias se re-suspenden en medio con fuentes de carbono, observando menos del 50% de la señal en el núcleo a los 20 minutos, a diferencia de la cepa control, donde la señal se encuentra casi en su totalidad nuclear (figuras 35 y 36). Esta re-localización se observó completamente nuclear a las 2 horas de re-suspender en medio con fuentes de carbono, sin descartar si la señal observada puede deberse a síntesis de nuevas subunidades (anexo 13.9).

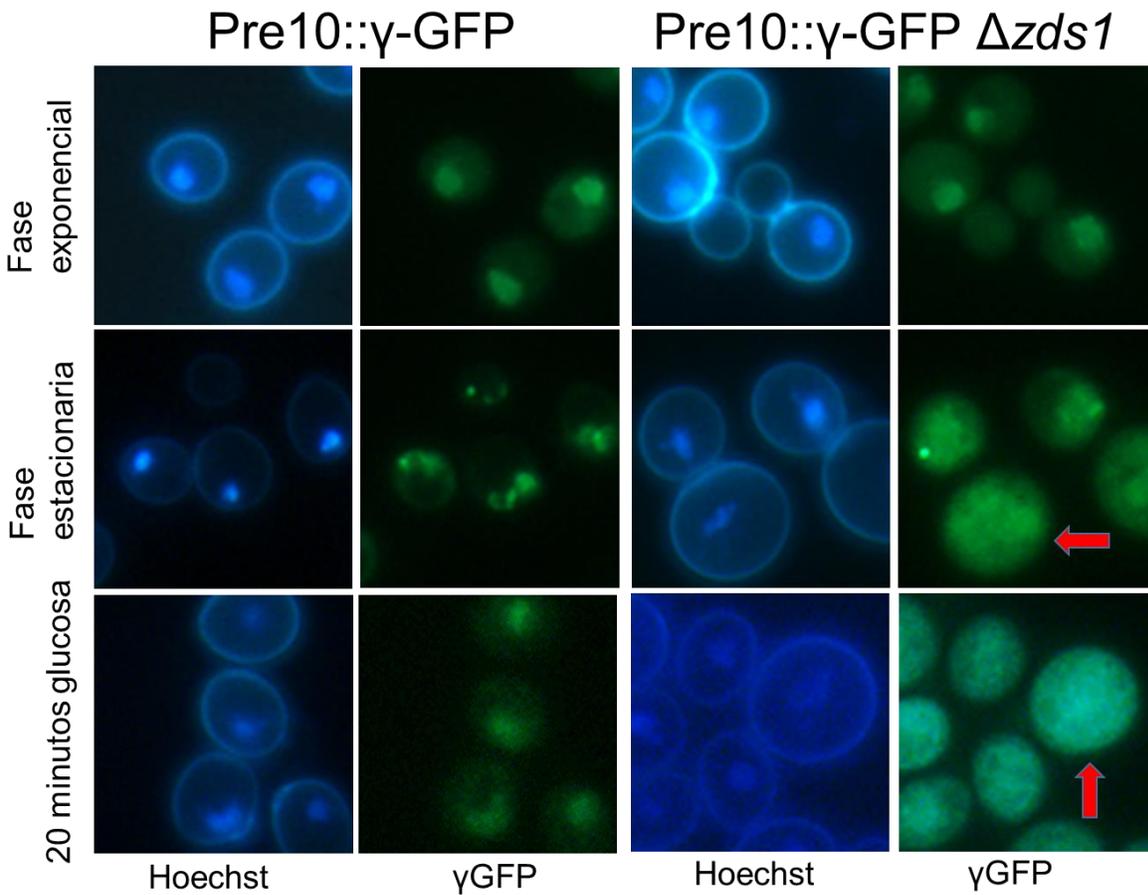


Figura 35. La delección de *ZDS1* afecta la localización de Pre10 en fase estacionaria y a los 20 minutos de re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pre10:: γ -GFP y Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$, en cepa BY4742.

Se observa que en ausencia de *ZDS1* la señal de Pre10, durante la fase estacionaria, se localiza de forma difusa en el citoplasma, con muy poca localización nuclear y granular, además, hay un retardo en la re-localización de la señal proteosomal hacia el núcleo, sin encontrar re-localización de la señal de Pre10 en el núcleo, a los 20 minutos de re-suspender en medio con fuentes de carbono (con flechas rojas se muestra la localización dispersa en el citoplasma de Pre10 en la cepa $\Delta zds1$, tanto en fase estacionaria como a los 20 de minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono).

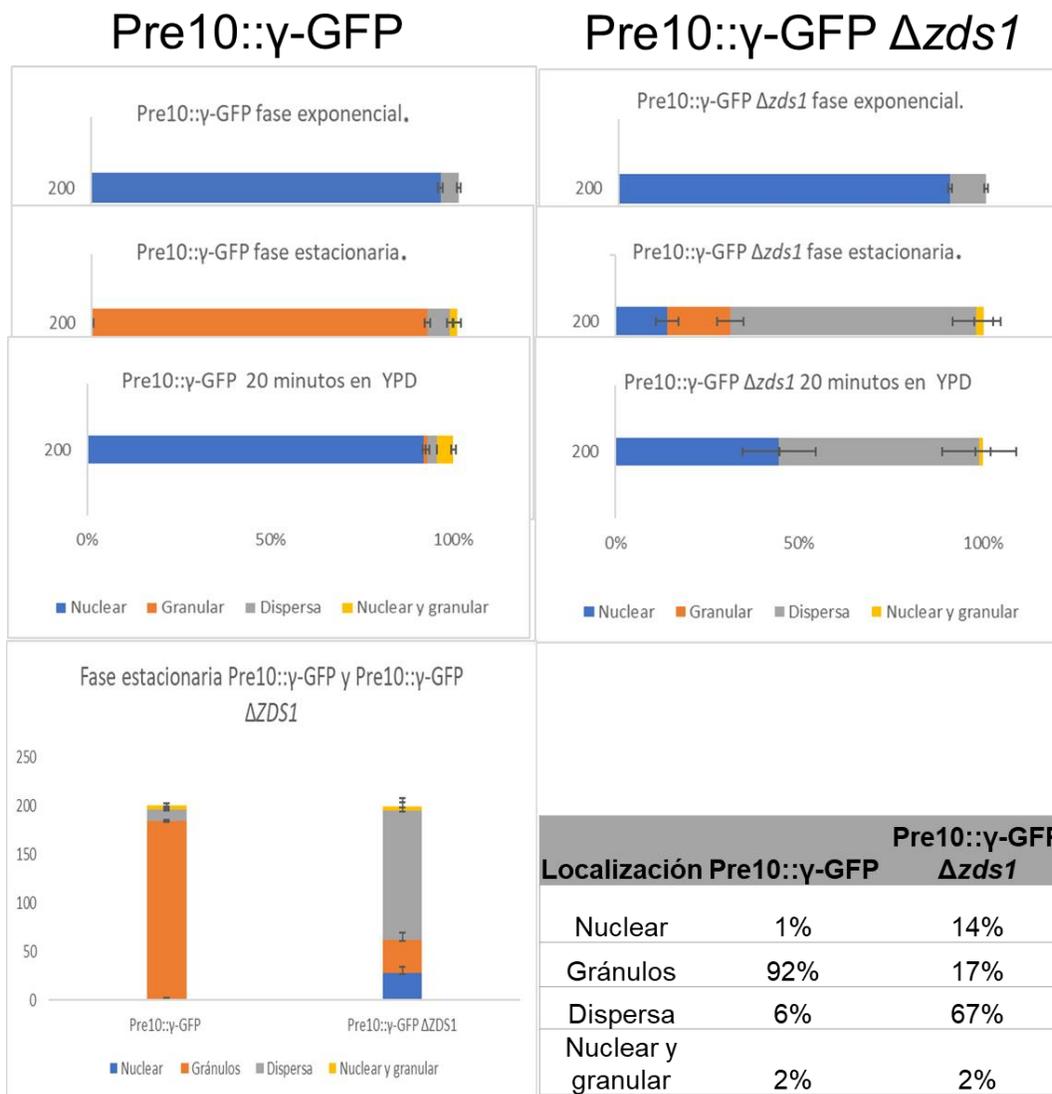


Figura 36. Grado de afectación de localización de la señal de la subunidad Pre10 en la delección del gen ZDS1. Cuantificación de la localización de la subunidad Pre10 en las cepas Pre10::γ-GFP y Pre10::γ-GFP Δzds1, en cepa BY4742.

Arriba se muestra la diferencia en porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, con desviaciones estándar.

Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica, de la diferencia de porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, donde se muestra que la señal de la cepa Pre10::γ-GFP Δzds1, en fase estacionaria, es principalmente dispersa en el citoplasma (67%) con menor localización nuclear (14%) y en PSGs (17%). También se observa que la señal de Pre10 a los 20 minutos de re-suspensión en medio con fuentes de carbono sigue siendo principalmente dispersa en citoplasma.

La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

Al ver el efecto de la delección del gen *ZDS1* en la localización de Pre10, decidimos valorar, si también se ve afectada la localización de otras subunidades de ambos complejos

Se encontró que la delección del gen *ZDS1* afecta la localización del complejo 20S durante la fase estacionaria, ya que, en la cepa Pre9:: γ -GFP $\Delta zds1$ la señal de Pre9 es principalmente difusa en el citoplasma (figura 37), a diferencia de su control (figuras 15 y 20), donde se observa principalmente en PSGs.

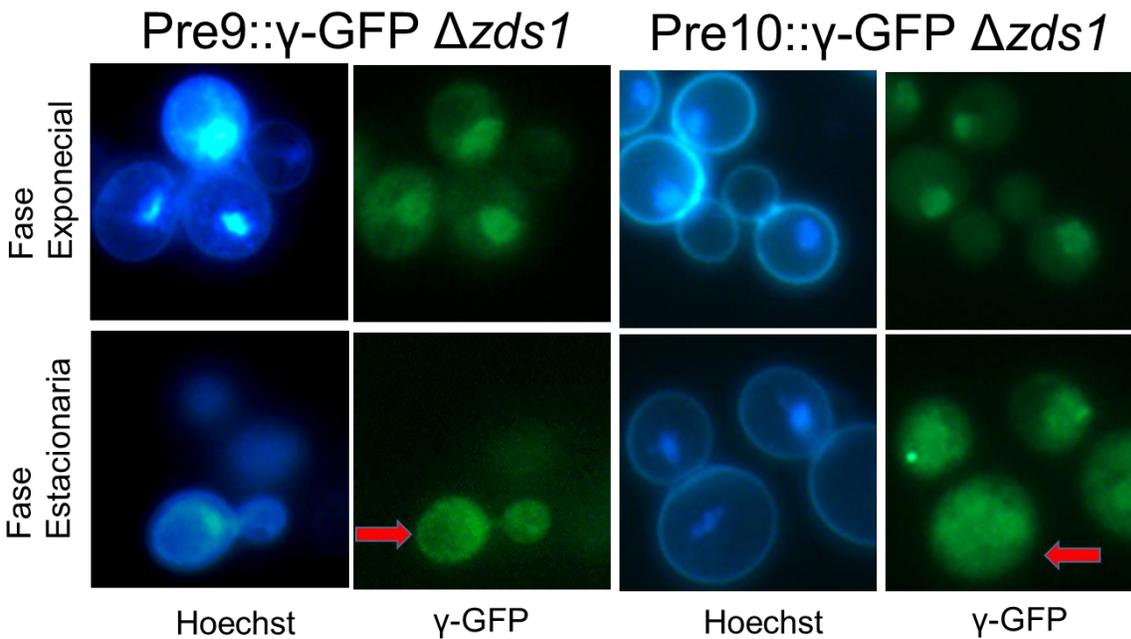


Figura 37. La delección del gen *ZDS1* afecta la localización del complejo 20S en fase estacionaria.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pre9:: γ -GFP $\Delta zds1$ y Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$, en cepa BY4742. Se observa que en ausencia de *ZDS1* la señal de Pre9 y Pre10 (subunidades del complejo 20S) se ven afectadas de manera similar durante la fase estacionaria, encontrando que la localización de ambas subunidades es difusa en el citoplasma (con flechas rojas se muestra la señal dispersa en el citoplasma de Pre9 y Pre10 en la cepa $\Delta zds1$).

A continuación, se analizó el efecto de la ausencia de *ZDS1* sobre la localización de la subunidad Rpn5, del complejo 19S (figura 38), encontrando que la localización de Rpn5 no ve alterada con respecto a su control, al eliminar al gen *ZDS1*, lo que indica que la delección del gen *ZDS1* afecta solamente la localización del complejo 20S.

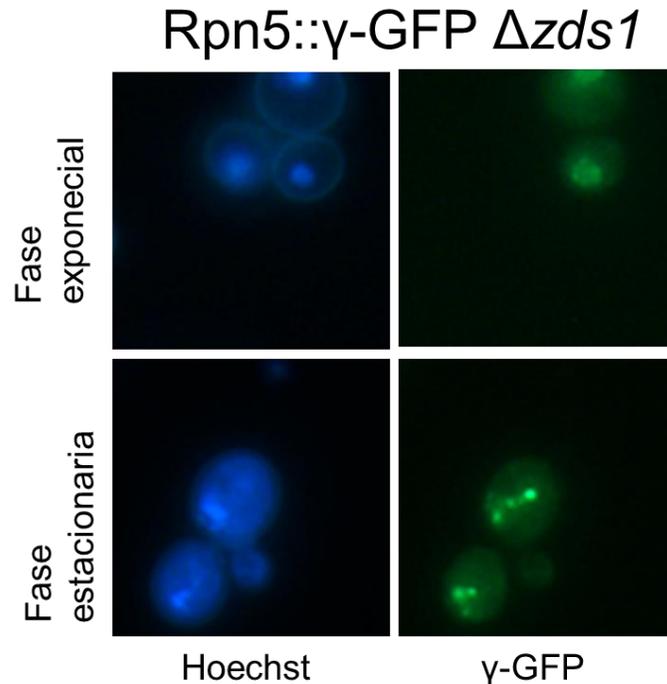


Figura 38. La delección de *ZDS1* no afecta la localización del complejo 19S.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de la cepa Rpn5:: γ -GFP $\Delta zds1$, en cepa BY4742.

Se observa que en ausencia del gen *ZDS1* la señal de Rpn5, durante la fase estacionaria, se localiza en gránulos almacenadores de proteosoma mientras que en la fase exponencial presenta una localización nuclear, mostrando un comportamiento similar al observado en cepa control donde no hay delección de *ZDS1*.

Estos hallazgos sugieren que el gen *ZDS1* es importante para la correcta agregación del complejo 20S en PSGs durante la fase estacionaria y la re-localización hacia el núcleo en re-suspensión en medio con fuentes de carbono, pero no está implicado en la correcta agregación y re-localización del complejo 19S.

9.3.2 La delección del gen *ZDS2* no afecta la localización de los complejos 19S y 20S, en la cepa BY4742.

A continuación, evaluamos el efecto de la ausencia del gen *ZDS2* en la dinámica de las subunidades de los complejos 19S y 20S; para valorar esto se construyeron las cepas respectivas y se tomaron muestras bajo las mismas condiciones, en las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y re-suspensión en medio nuevo con fuentes de carbono de células estacionarias.

Se encontró que al eliminar el gen *ZDS2* (cepa BY4742), la subunidad Pre10 del complejo 20S se comporta de manera similar a su cepa control, formando PSGs en fase estacionaria, que re-localizan al núcleo al re-suspender las células estacionarias en medio con fuentes de carbono (figuras 39 y 40).

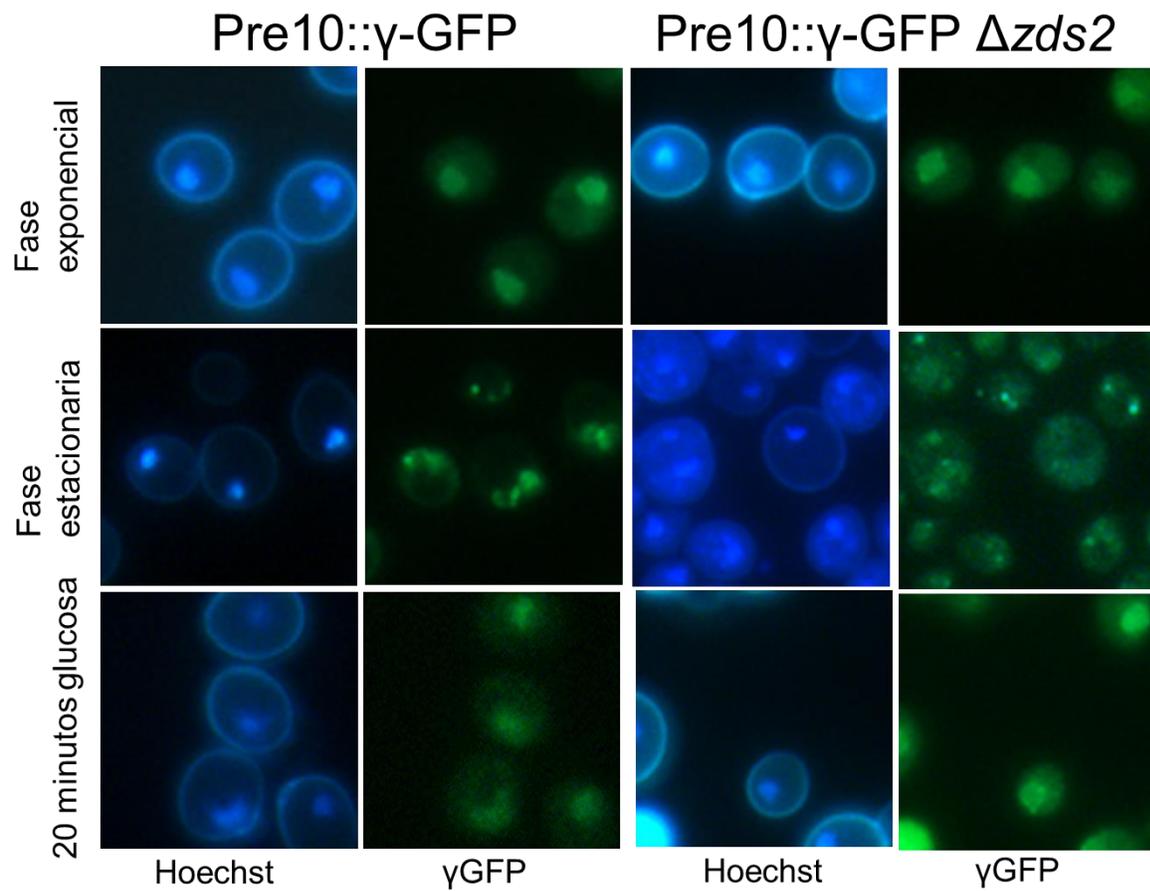


Figura 39. La delección del gen *ZDS2* no afecta la localización de Pre10.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pre10:: γ -GFP y Pre10:: γ -GFP $\Delta zds2$, en cepa BY4742.

Se observa que en ausencia de *ZDS2*, la señal de Pre10 muestra un fenotipo similar a su control, en las fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono.

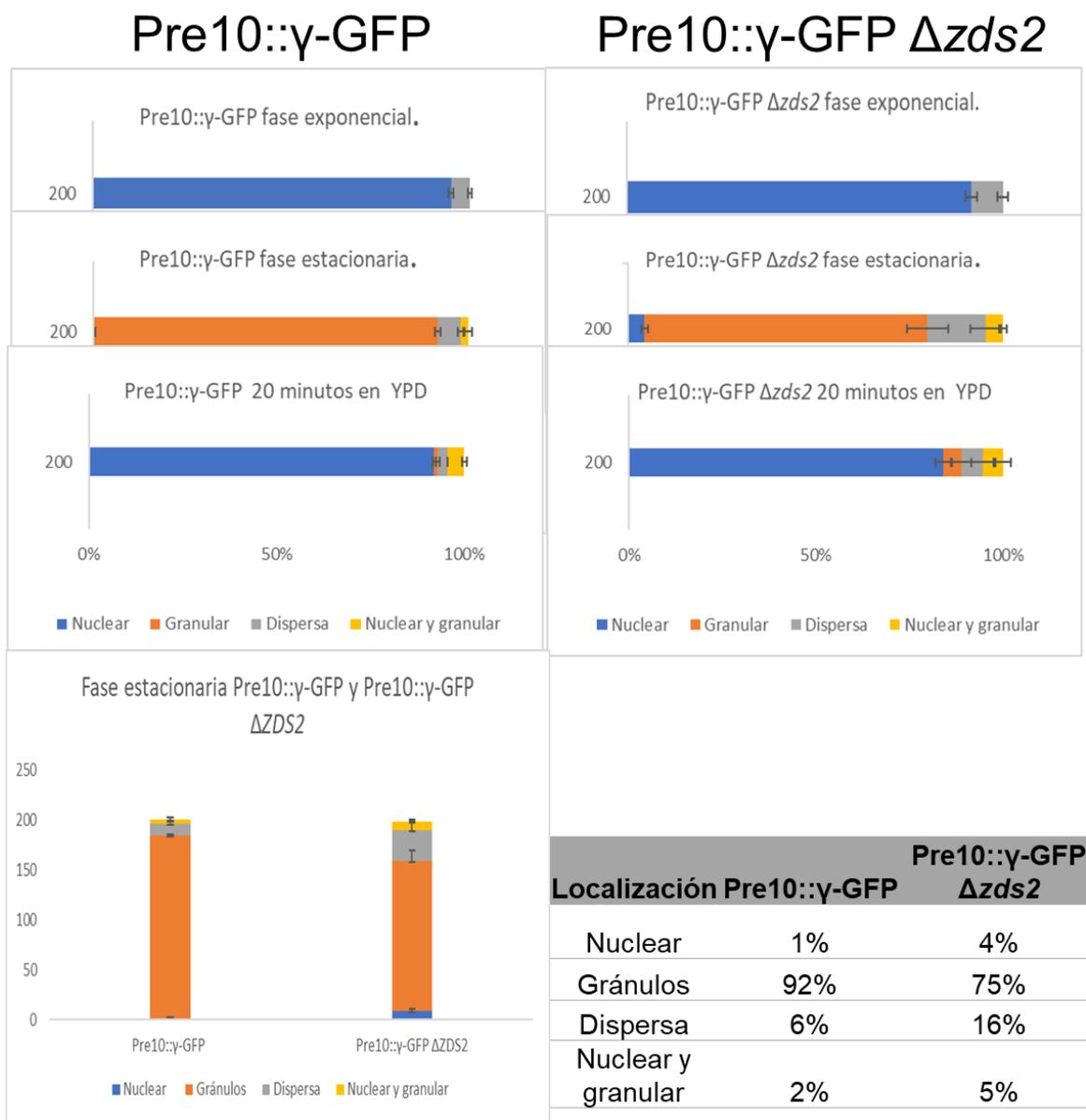


Figura 40. Porcentajes de localización de la señal de la subunidad Pre10 en la delección del gen ZDS2.

Cuantificación de la localización de la subunidad Pre10 en las cepas Pre10::γ-GFP y Pre10::γ-GFP $\Delta zds2$, en cepa BY4742.

Arriba se muestra los porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, con desviaciones estándar.

Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica de los porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, donde se muestra que la señal de la cepa Pre10::γ-GFP $\Delta zds2$ es similar a la cepa control. En fase exponencial y re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono la localización es similar a la cepa control.

La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

También se valoró la localización del complejo 19S (Rpn5) en la delección del gen *ZDS2*, encontrando que tampoco se ve afectada la dinámica proteosomal (figura 41), de igual manera que lo encontrado en la delección del gen *ZDS1* (figura 38).

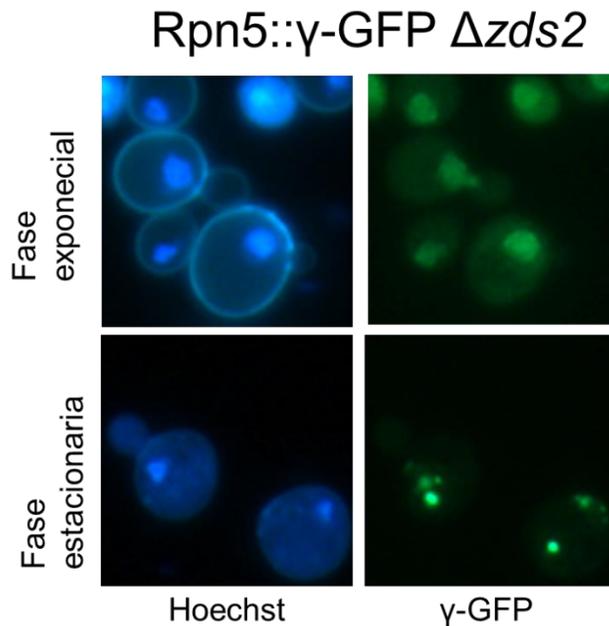


Figura 41. La delección del gen *ZDS2* no afecta la localización del complejo 19S.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de la cepa Rpn5:: γ -GFP $\Delta zds2$, en cepa BY4742.

Se observa que en ausencia del gen *ZDS2*, la señal de Rpn5 se localiza de manera similar a la cepa control, durante las fases exponencial y estacionaria.

9.3.3 La delección del gen *BLM10* no afecta la localización de los complejos 19S y 20S, en el fondo BY4742.

Al realizar la toma de muestras, en fases exponencial, estacionaria y re-suspensión, bajo las mismas condiciones, se encontró que la localización de en la delación del gen *BLM10* no se encuentra alterada, mostrando una dinámica de localización similar a la cepa control (figuras 42 y 43).

Este hallazgo es contrario a lo reportado previamente por Weberruss *et al.*, 2013, que demostró que la delección de este gen altera la localización de las subunidades del 20S, siendo principalmente dispersas en el citoplasma, con cierto grado de enriquecimiento nuclear, en fase estacionaria.

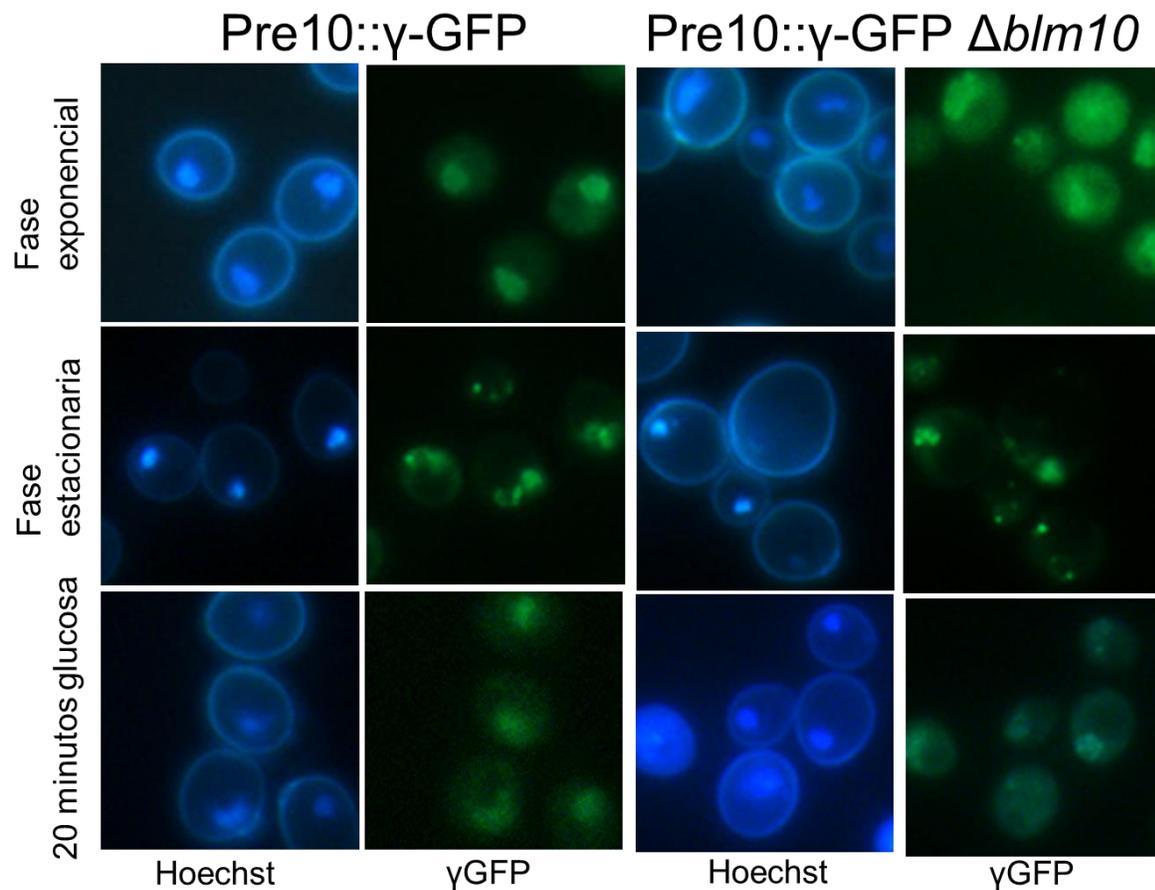


Figura 42. La delección del gen *BLM10* (en cepa BY4742) no afecta la localización del complejo 20S.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de la cepa Pre10:: γ -GFP $\Delta blm10$, en cepa BY4742.

Se observa que en ausencia del gen *BLM10*, la señal de Pre10, se localiza de manera similar a la cepa control, durante las fases exponencial, estacionaria y en la re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono.

Este fenotipo de localización similar a la cepa silvestre (*Wild type*) es contrario a lo reportado previamente, en donde, la ausencia de Blm10 tiene un fenotipo en donde la localización del complejo 20S, durante la fase estacionaria, es dispersa en el citoplasma con cierto grado de localización nuclear.



Figura 43. Porcentajes de localización de la señal de la subunidad Pre10 en la delección del gen *BLM10*.

Cuantificación de la localización de la subunidad Pre10 en las cepas Pre10::γ-GFP y Pre10::γ-GFP $\Delta blm10$, en cepa BY4742. Arriba se muestra los porcentajes de localización en fases exponencial, estacionaria y a los 20 minutos de reposición de glucosa (YPD) de células estacionarias, con desviaciones estándar.

Abajo se muestra, a la izquierda la comparación gráfica de los porcentajes de localización de la señal en fase estacionaria; a la derecha se muestran los porcentajes de localización en fase estacionaria, donde se muestra que la señal de la cepa Pre10::γ-GFP $\Delta blm10$ es similar a la cepa control.

En fase exponencial y re-suspensión de células estacionarias en medio con fuentes de carbono la localización es similar a la cepa control. La cuantificación se hizo a partir de 3 réplicas de colonias independientes, cuantificando un total de 200 células por cada réplica.

Esto es cierto también con respecto al complejo 19S, ya que la delección del gen *BLM10* no afecta la localización de este complejo (figura 44).

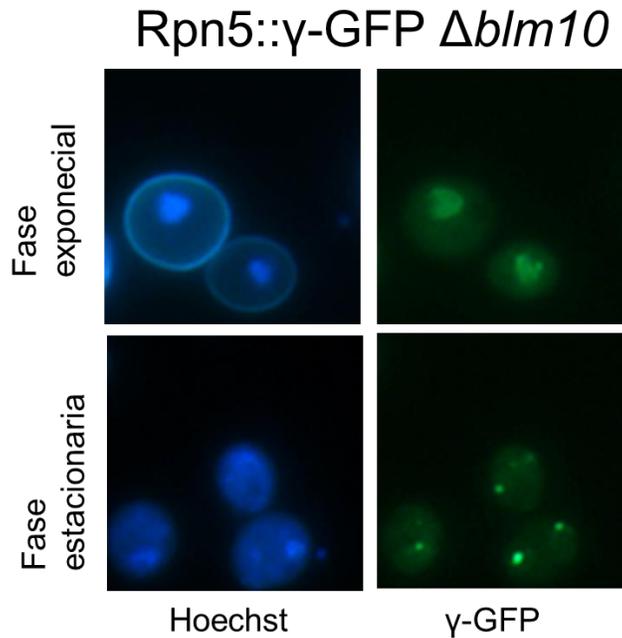


Figura 44. La delección del gen *BLM10* no afecta la localización del complejo 19S.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de la cepa Rpn5:: γ -GFP $\Delta blm10$, en cepa BY4742.

Se observa que en ausencia del gen *ZDS2* la señal de Rpn5 se localiza de manera similar a la cepa control, durante las fases exponencial y estacionaria.

9.3.4 La localización del complejo 20S, en la delección de los genes *ZDS2* y *BLM10*, es distinta en las cepas BY4741 y BY4742.

Debido a que los resultados obtenidos de localización de Pre10, en ausencia del gen *BLM10*, son contradictorios con respecto a lo reportado previamente por otros autores (Weberruss *et al.*, 2013), se decidió verificar si la localización proteosomal en la delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* depende de la cepa BY4741 o BY4742; ya que en este proyecto se usó la cepa BY4742, a diferencia de los trabajos previos de otros autores, que usaron la cepa BY4741.

La diferencia que existe entre las cepas BY4741 y BY4742 radica en los marcadores de auxotrofia y el sexo, siendo el genotipo de la cepa BY4741 MAT-a his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0; y de la cepa BY4742 MAT- α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0.

Para valorar la diferencia de localización en ambas cepas, se generaron las cepas correspondientes con Pre10 fusionada a γ -GFP y delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*, en las cepas BY4741 y BY4742, de las cuales se analizó la localización de las subunidades en fase estacionaria, fase exponencial y después de restablecer la fuente de carbono, bajo las mismas condiciones de los experimentos previos.

Se encontró que la distribución de Pre10 en la cepa $\Delta zds1$ del fondo genético BY4741 es similar al encontrado en la cepa BY4742, con una localización predominantemente dispersa en el citoplasma en fase estacionaria (figura 45), sin embargo, el comportamiento de Pre10 en las cepas carentes de los genes *ZDS2* y *BLM10* en la cepa BY4741 es distinto a la cepa BY4742.

La delección del gen *ZDS2* en la cepa BY4741, produce un fenotipo donde, en la fase estacionaria, no se forman PSGs y en cambio, la señal de Pre10 se observa difusa en todo el citoplasma celular, de manera similar a lo que se observa al eliminar al gen *ZDS1* tanto en la cepa BY4741 como en la cepa BY4742 (figura 45), contrario a la cepa BY4742 donde es similar a la cepa control (figuras 39 y 40).

La localización de la subunidad Pre10 en la cepa $\Delta blm10$ BY4741, muestra un fenotipo como el reportado previamente por Weberruss *et al.*, 2013, donde la señal en fase estacionaria es predominantemente dispersa en el citoplasma con un grado de enriquecimiento nuclear (figura 45).

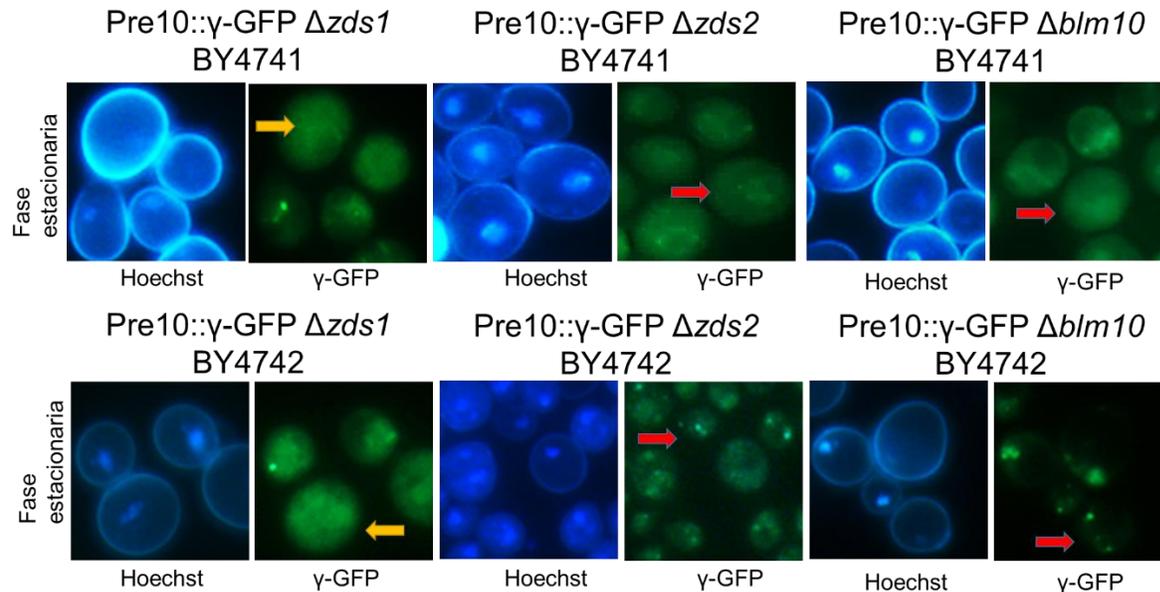


Figura 45. La localización del complejo 20S es distinta, en la delección de los genes *ZDS2* y *BLM10*, en las cepas BY4741 y BY4742.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pre10::γ-GFP *Δzds1*, Pre10::γ-GFP *Δzds2* y Pre10::γ-GFP *Δblm10*, en las cepas BY4741 (imágenes superiores) y BY4742 (imágenes inferiores).

Se observa que la señal de Pre10 se comporta diferente según el fondo genético (se muestra con flechas las diferencias de localización de Pre10, en fase estacionaria, en los fondos genéticos BY4741 y BY4742).

La delección del gen *ZDS1* muestra un fenotipo similar en ambos fondos genéticos (figuras 35 y 36), en donde la señal de Pre10 es principalmente dispersa en el citoplasma, sin embargo, la delección de los genes *ZDS2* y *BLM10* produce fenotipos distintos entre los fondos genéticos.

En la cepa BY4742 la señal de Pre10 con delección de *ZDS2*, se localiza de manera similar a la cepa silvestre (figuras 39 y 40), durante la fase estacionaria; por el contrario, en la cepa BY4741, la señal se localiza de similar a la cepa con delección del gen *ZDS1*.

La delección del gen *BLM10*, en la cepa BY4741, muestra una localización dispersa en el citoplasma, con leve señal nuclear, durante la fase estacionaria. Esta localización es similar a lo reportado previamente por otros autores, sin embargo, en la cepa BY4742 el fenotipo es similar a la cepa silvestre (figuras 42 y 43).

9.4 Pre10ΔC muestra un crecimiento más lento en comparación a la cepa silvestre, posterior a la inducción de estrés por ausencia de fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno.

Se cree que la formación de PSGs sirve para proteger al proteosoma de la degradación de proteínas que ocurre por autofagia inespecífica, cuando las condiciones del medio no son favorables, apoyándose en el hecho de que la formación de PSGs inicia a las 4 horas posteriores de encontrarse en estrés por privación de fuentes de carbono, mientras que la autofagia inespecífica comienza a las 8 horas.

Marshall & Vierstra, 2018 demostraron que las células que pueden formar gránulos almacenadores de proteosoma "PSGs" crecen más rápido (tienen un tiempo de duplicación menor) cuando vuelven a estar en un medio favorable, después de

encontrarse en condiciones que inducen formación de PSGs (estrés por falta de fuentes de carbono) y autofagia inespecífica (estrés por falta de fuentes de nitrógeno).

Estos autores proponen que los PSGs son necesarios para proteger al proteosoma de degradación inespecífica y sirven para tener un reservorio de proteosomas disponibles, para que las células puedan reintegrarse eficazmente al ciclo celular, cuando las condiciones del medio son favorables.

Tomando en cuenta estos antecedentes, se hicieron curvas de crecimiento de las cepas: silvestre (*Wild type*), *Pre10ΔC*, *Δzds1*, *Δzds2* y *Δblm10*, con la finalidad de valorar si la marcada disminución de PSGs (en estrés por privación de fuentes de carbono) tiene repercusiones en el crecimiento de las células al volver a haber condiciones favorables en el medio, después distintos tipos de estrés.

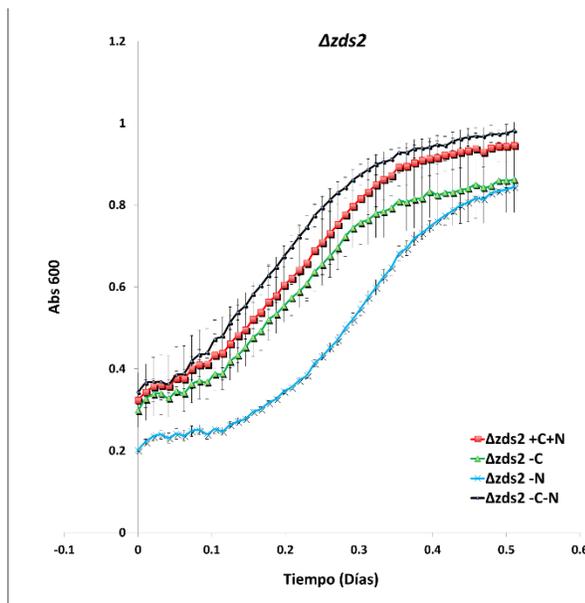
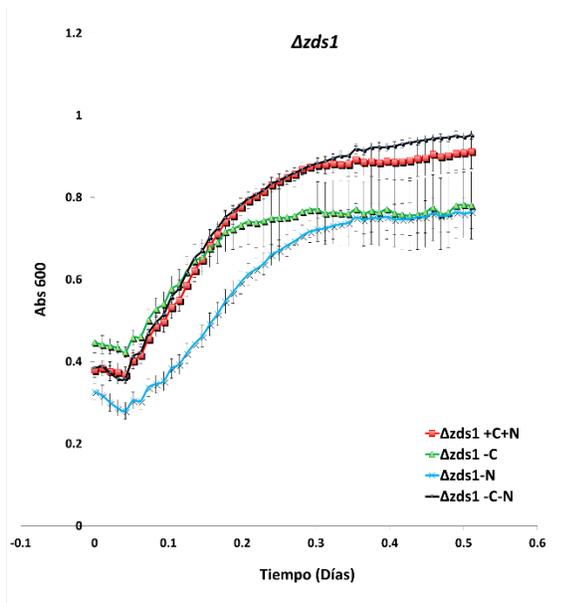
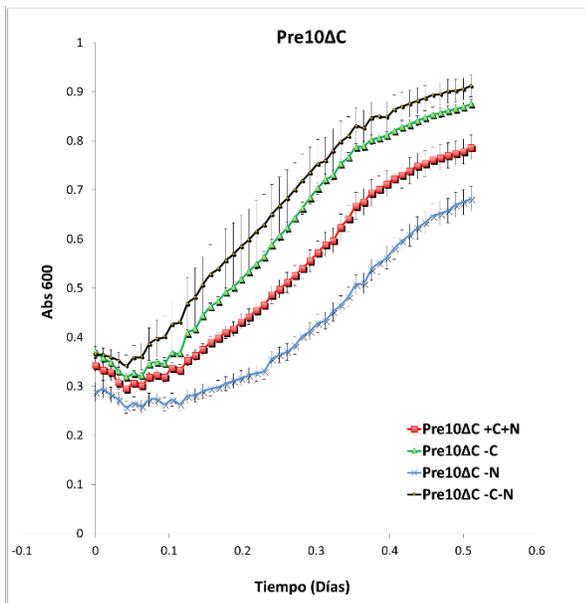
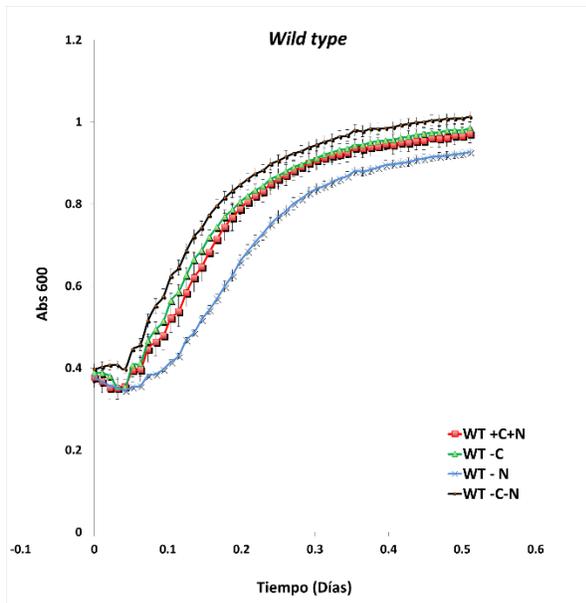
Las curvas de crecimiento se realizaron induciendo estrés en los medios: sintético sin fuente de carbono (-C), sintético sin fuente de nitrógeno (-N) y sintético sin fuente de carbono y sin fuente de nitrógeno (-C-N); usando como control medio sintético completo (+C+N).

Se usaron estos medios para inducir estrés por privación de fuentes de carbono (que induce la formación de PSGs) y estrés por privación de fuentes de nitrógeno (que induce autofagia inespecífica), en los cuales se dejaron inducir células en fase exponencial durante 24 horas, para posteriormente cambiar a medio sintético completo y dejar crecer durante 24 horas en crecínómetro.

Se encontró que todas las cepas alcanzaron el máximo de densidad óptica a las 24 horas en todas las condiciones (+C+N, -C, -N y -C-N) y que el crecimiento posterior a la inducción de estrés por privación de fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno es diferente

En inducción en medio mínimo sin fuente de nitrógeno (-N) todas las cepas mostraron un retraso en el crecimiento comparadas con el medio completo (+C), como lo reportado previamente (Marshall & Vierstra, 2018).

En inducción por ausencia de fuentes de carbono con o sin fuentes de nitrógeno (medio mínimo sin fuente de carbono (-C) y mínimo sin fuente de carbono y sin fuente de nitrógeno (-C-N)) el crecimiento fue más rápido, en comparación a la inducción de estrés por ausencia de fuentes de nitrógeno (medio sin fuente de nitrógeno (-N)) (figura 46).



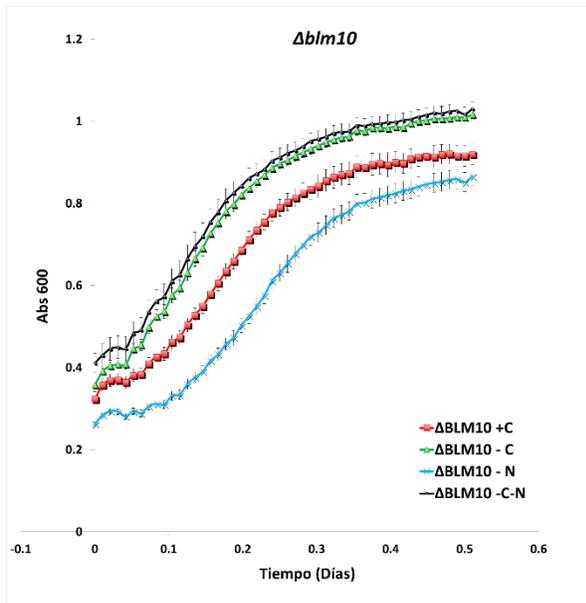


Figura 46. Las cepas: silvestre (Wild type), Pre10 Δ C, $\Delta zds1$, $\Delta zds2$ y $\Delta blm10$, muestran un retraso de crecimiento posterior a estrés por privación de fuentes de nitrógeno.

Curvas de crecimiento de cepas: silvestre (Wild type), Pre10 Δ C, $\Delta zds1$, $\Delta zds2$ y $\Delta blm10$.

Las curvas de crecimiento se hicieron posterior a inducir estrés por: ausencia de fuentes de carbono (-C), ausencia de fuentes de nitrógeno (-N) y ambos (-C-N), además de un control sin estrés por ausencia de carbono ni nitrógeno (medio completo +C+N).

Para inducir los distintos tipos de estrés, se tomaron células a partir de pre-cultivos en fase exponencial, que se colocaron en los distintos medios para inducir estrés y se dejaron durante 24 horas a 30°C. Después de dejar induciendo se realizaron lavados y se midió densidad óptica para tener 0.1DO en 200 μ l de volumen final de medio sintético completo y se dejaron en crecinómetro 24 horas a 30°C, midiendo DO cada 15 minutos.

En todas las cepas se observa un retraso en el crecimiento cuando hay estrés por privación de fuentes de nitrógeno y un mejor crecimiento después de inducir estrés por ausencia de fuentes de carbono, en comparación a las cepas que no se les indujo ningún tipo de estrés (cepas que siempre estuvieron en medio mínimo completo).

Resultados representativos de réplicas independientes de 10 colonias por cepa, se muestran réplicas de 5 colonias.

También se observa que todas las cepas crecen más lento en comparación con la Wild type en condiciones sin fuentes de nitrógeno (- N) y sin fuente de nitrógeno y carbono (-C-N), siendo Pre10 Δ C la que más retraso en el crecimiento presenta (Figura 46); esta última cepa crece más lento en comparación a todas las demás cepas, en cada una de las condiciones evaluadas (figura 47).

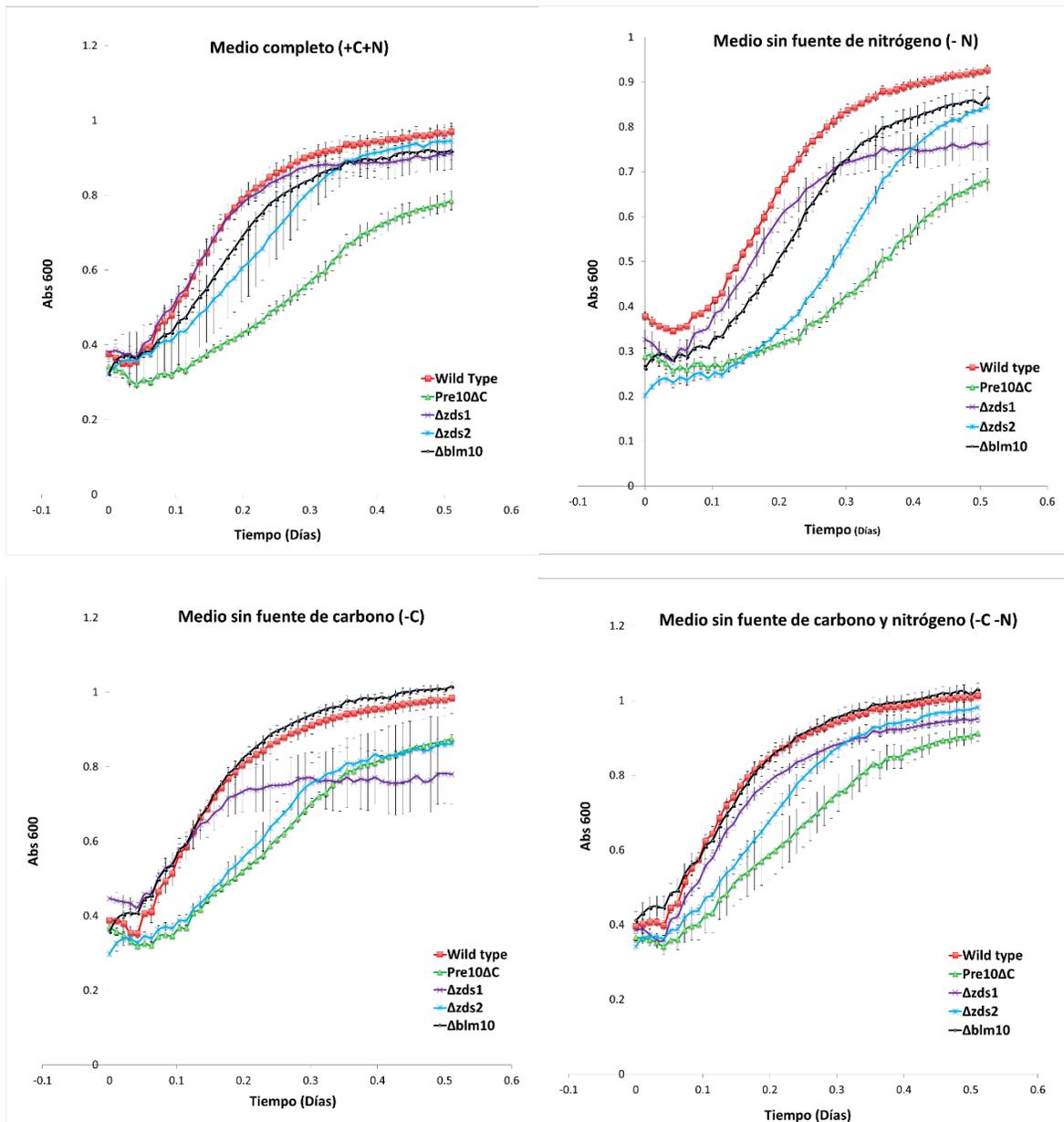


Figura 47. La cepa Pre10ΔC muestra un crecimiento más lento en comparación a la cepa silvestre, posterior a la inducción de estrés por ausencia de fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno.

Curvas de crecimiento de las cepas: *Wild type-α* (rojo), *Pre10ΔC* (verde), *Δzds1* (morado), *Δzds2* (azul) y *Δblm10* (negro).

Representación gráfica de curvas de crecimiento, en las distintas condiciones de estrés, en la cual se observa que la cepa Pre10ΔC tiene un crecimiento más lento en todas las condiciones, en comparación con todas las cepas.

10. Discusión.

10.1 Los extremos carboxilo terminal de las subunidades proteosomales Pup2 y Pre10 son necesarios para que ocurra una adecuada dinámica proteosomal.

Con los resultados obtenidos podemos inferir que la ausencia de los extremos carboxilo terminal de las subunidades proteosomales Pre9 y Pre6 no repercuten en la dinámica proteosomal, ya que muestran un fenotipo similar a la cepa silvestre con extremo carboxilo terminal completo.

Por el contrario, los extremos carboxilo de las subunidades Pup2 y Pre10 tienen un papel evidente en la dinámica proteosomal, debido a que en su ausencia se encuentra comprometida la formación de gránulos almacenadores de proteosoma "PSGs" de los complejos 19S y 20S, durante la fase estacionaria, en donde, la localización de estas subunidades de los complejos 19S y 20S es principalmente en el núcleo y la cantidad de gránulos de almacenamiento de proteosoma es menor para cada subunidad, con respecto a sus respectivos controles.

Esto implica que los extremos carboxilo terminal de Pup2 y Pre10 tienen un papel importante en la localización de ambos complejos proteosomales, durante la dinámica proteosomal.

La disminución de formación de gránulos almacenadores de proteosoma, durante la fase estacionaria en la ausencia de los extremos carboxilo de Pre10 y Pup2, podría implicar que se ve afectada la salida de estas subunidades del núcleo hacia el citosol y por consecuencia, su posterior agregación en gránulos almacenadores, con un grado variable de formación de gránulos almacenadores entre subunidades.

La diferencia de localización de subunidades del 19S y 20S observada en ausencia del extremo carboxilo de Pre10 podría explicarse por diversos motivos: la dificultad de ensamblado de las subunidades en sus respectivos complejos, degradación de Pre10 o diferencias en concentración de subunidades que se encuentren o no ensambladas

En las figuras 55-57 del anexo 13.10 se muestran la comparación gráfica en las 3 condiciones de crecimiento, de todas las cepas usadas en este proyecto.

Las imágenes de las cepas Pre10 Δ C-GFP y Pre9-mCherry o Rpn5-mCherry muestran que las señales en su mayoría co-localizan tanto en la fase exponencial como estacionaria, lo que podría implicar que en ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10, al menos cierto porcentaje de subunidades ya ensambladas en el 26S permanece en el núcleo y algunas subunidades que se encuentran solo en el 19S y 20S sin estar ensamblado en el 26S se están agregando en PGSs.

Esta co-localización de Pre10 Δ C con las subunidades Pre9 y Rpn5 sugiere que independientemente de la configuración del proteosoma (26S o separado en 19S más 20S) estas subunidades se ensamblan en sus respectivos complejos y el destino de los complejos 19S y 20S en cierta medida es el mismo.

Con lo anterior podemos inferir que la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10 no afecta la estabilidad de los complejos, lo cual se apoya también en el hecho de que, aunque tiene un efecto en la velocidad de crecimiento de las células, estas no detienen su crecimiento y presentan una viabilidad similar a la cepa silvestre.

Con los resultados obtenidos podemos inferir que la localización predominantemente nuclear de subunidades de ambos complejos, que se observa en la ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10, puede deberse a: i) un impedimento total de la salida del núcleo al citoplasma; o ii) un impedimento parcial de la salida del núcleo, con presencia de salida del proteosoma en menor medida.

De cualquier manera, esto implica la ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10 dificulta la salida del proteosoma, ya sea total o parcial, del núcleo y favorece la formación de gránulos almacenadores de proteosoma (ya sea que se conformen de 26S o 19S más 20S).

Otra alternativa es que la ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10 impide la salida del proteosoma del núcleo y los gránulos almacenadores de proteosoma que se encuentran en el citosol están constituidos de complejos 19S y 20S que no se importaron al núcleo y que no se ensamblaron en el 26S.

Se sabe que en la fase estacionaria el proteosoma 26S se desensambla en los complejos 19S y 20S y estos migran hacia los gránulos almacenadores de proteosoma, encontrándose en estos gránulos solamente los complejos 19S y 20S separados, junto con la proteína reguladora del 20S Blm10.

Además, se sabe que el factor desencadenante de la formación de gránulos almacenadores de proteosoma es la privación de fuentes de carbono, siendo la disminución de pH intracelular secundaria a la depleción de ATP lo que induce este evento, cambiando la localización del proteosoma hacia gránulos a las 4 horas de iniciado el estrés.

Actualmente no se tiene identificado qué proteínas intervienen en la regulación de la formación de gránulos almacenadores de proteosoma durante la privación de fuente de carbono, qué proteínas se encargan de separar al proteosoma 26S, exportar los complejos 19S y 20S y facilitar su agregación en gránulos almacenadores de proteosoma.

Recientemente se descubrió una relación de la proteína Ecm29 con respecto a la regulación del proteosoma. Se sabe que Ecm29 se une a los complejos 19S, a través de Rpt5 (Lee *et al.*, 2011) y al 20S gracias a una interacción con Pre10 (Wani *et al.*, 2016).

La unión de Ecm29 inhibe la función proteolítica dependiente de ubiquitina del 26S mediante dos mecanismos: cerrando los canales de entrada de sustratos encontrados en las porciones superiores e inferiores del 20S y por inhibición de la actividad ATPasa del 19S (De La Mota-Peynado *et al.*, 2013). Funge además como punto de control para el adecuado ensamblado y funcionamiento del 26S, ayudando a la maduración completa del 20S de proteosomas 26S ya armados no funcionales (Lehmann *et al.*, 2010).

Bajo condiciones de estrés oxidativo Ecm29 desarma el 26S en 19S y 20S, haciendo a las células más resistentes a estrés oxidativo, por el papel del 20S en la degradación de proteínas oxidadas no dependiente de ubiquitina que es más efectiva en comparación con la capacidad de degradar proteínas oxidadas del proteosoma 26S (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017).

Se sabe que las modificaciones postraduccionales que ocurren en el extremo carboxilo de la subunidad proteosomal Pre10 del complejo 20S son necesarias para que Ecm29 pueda unirse adecuadamente al proteosoma 26S y lo separe, siendo puntualmente la fosforilación de los residuos de aminoácidos S258, S263 y S264, ubicados dentro de la región de baja complejidad de su extremo carboxilo terminal.

Estas modificaciones postraduccionales son indispensables para que Ecm29 se pueda unir al proteosoma (Wani *et al.*, 2016).

Una probabilidad que podría explicar el fenotipo nuclear observado en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10, es que Ecm29 desensamble el proteosoma 26S en los complejos 19S y 20S durante la fase estacionaria, por lo tanto, estaría encargada de esta separación y de la salida de los complejos separados al citoplasma.

Dicho de otra manera, Ecm29 sería responsable de la dinámica proteosomal en condiciones de depleción de fuentes de carbono, esto podría ocurrir debido a que, durante la fase estacionaria, se acumulan especies reactivas de oxígeno provenientes de la cadena de transporte de electrones, que se encuentra activa durante la respiración celular.

Aunque en menor medida se puede importar y exportar el proteosoma 26S, de ser Ecm29 la encargada de separar el proteosoma 26S durante la dinámica proteosomal, explicaría el hecho de que la señal del proteosoma es predominantemente nuclear y aún hay formación de gránulos almacenadores, esto podría considerarse en la dinámica de un cultivo con células que lleguen a fase estacionaria, pero no sabemos si lo mismo podría ocurrir durante la formación de gránulos en respuesta a un estrés agudo, por retiro súbito de fuentes de carbono.

Con respecto a nuestros resultados, aún falta elucidar si en las cepas sin el extremo carboxilo terminal de Pre10 el 26S no se puede desensamblar en los dos complejos y si los gránulos almacenadores formados se componen de estos complejos separados o si en estos se encuentra el proteosoma 26S.

También falta esclarecer si la señal observada de proteínas de los complejos 19S y 20S que se encuentran en el núcleo en fase estacionaria, provienen de proteosomas en conformación 26S y si estos son completamente funcionales para llevar a cabo su función de degradación de proteínas dependiente de ubiquitina.

Aparentemente el efecto observado en la ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10, no es dependiente de la cepa BY4741 o BY4742.

Aunque se puede deducir el mecanismo probable por el cual se encuentra una localización predominantemente nuclear del proteosoma en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10, no hay una explicación tan evidente con el fenotipo similar observado en la delección del extremo carboxilo terminal de Pup2.

Probablemente Pup2 juegue un papel similar al de Pre10 interaccionando directamente con proteínas que regulan el ensamblaje/desensamblaje del proteosoma en sus complejos y por lo tanto en su salida del núcleo; pero otra posibilidad sería que su extremo carboxilo terminal es indispensable desde el punto de vista estructural, provocando un cambio estructural en el proteosoma 26S, que genera un efecto similar a la ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10.

En la figura 48 se muestra un modelo propuesto para la dinámica proteosomal derivado de nuestros resultados en condiciones silvestres, en la figura 49 lo que proponemos estaría ocurriendo en ausencia del extremo carboxilo terminal de Pre10.

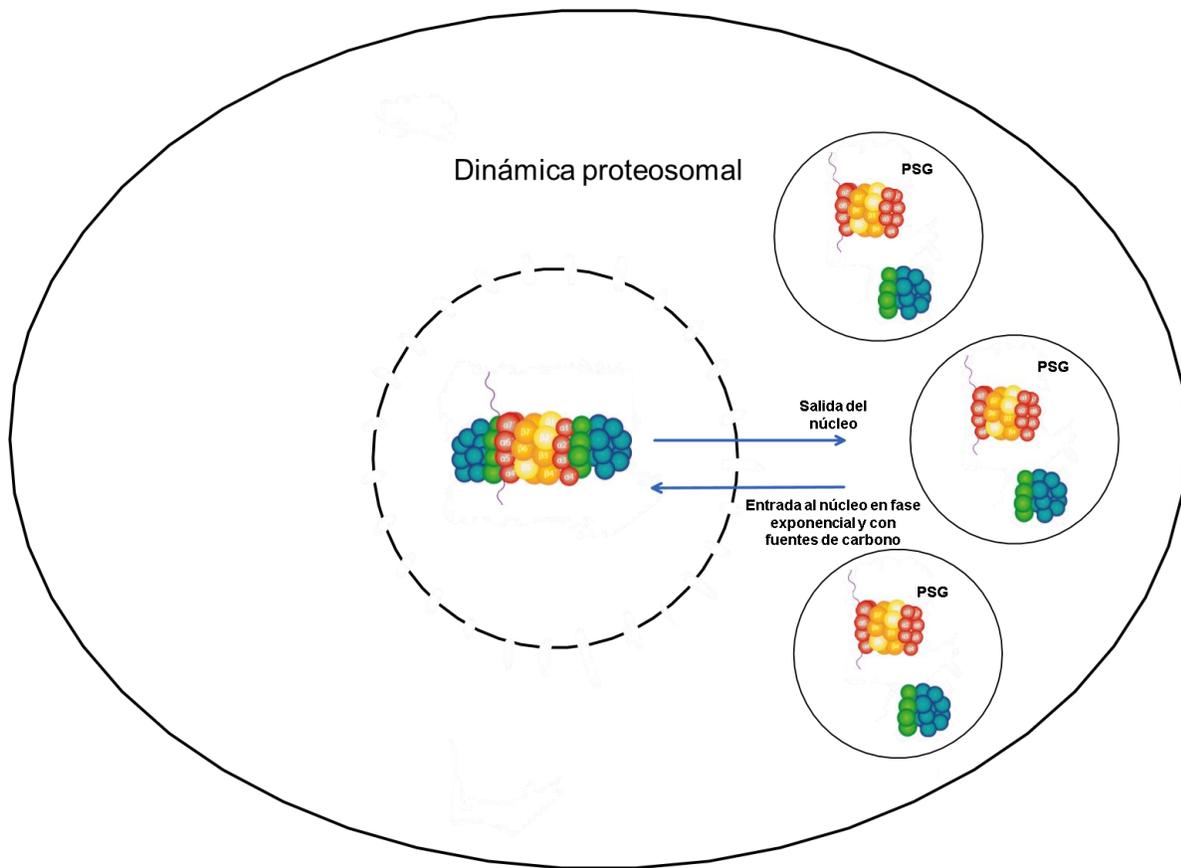


Figura 48. Dinámica proteosomal.

Se muestra la dinámica proteosomal que ocurre en la cepa silvestre.

Los complejos 19S y 20S son sintetizados en el citosol e importados al núcleo donde se ensamblan en el 26S.

Cuando hay ausencia de fuentes de carbono y las células entran en fase estacionaria, el proteosoma 26S se desensambla en sus complejos 19S y 20S que son exportados al citoplasma y se agregan en PSGs.

Estos complejos son nuevamente importados al núcleo cuando hay fuentes de carbono disponibles en el medio.

Se muestra con flechas azul la dinámica de cambio de localización descrita. También se muestra una representación esquemática de los extremos carboxilo terminal de Pup2 ($\alpha 5$) y Pre10 ($\alpha 7$).

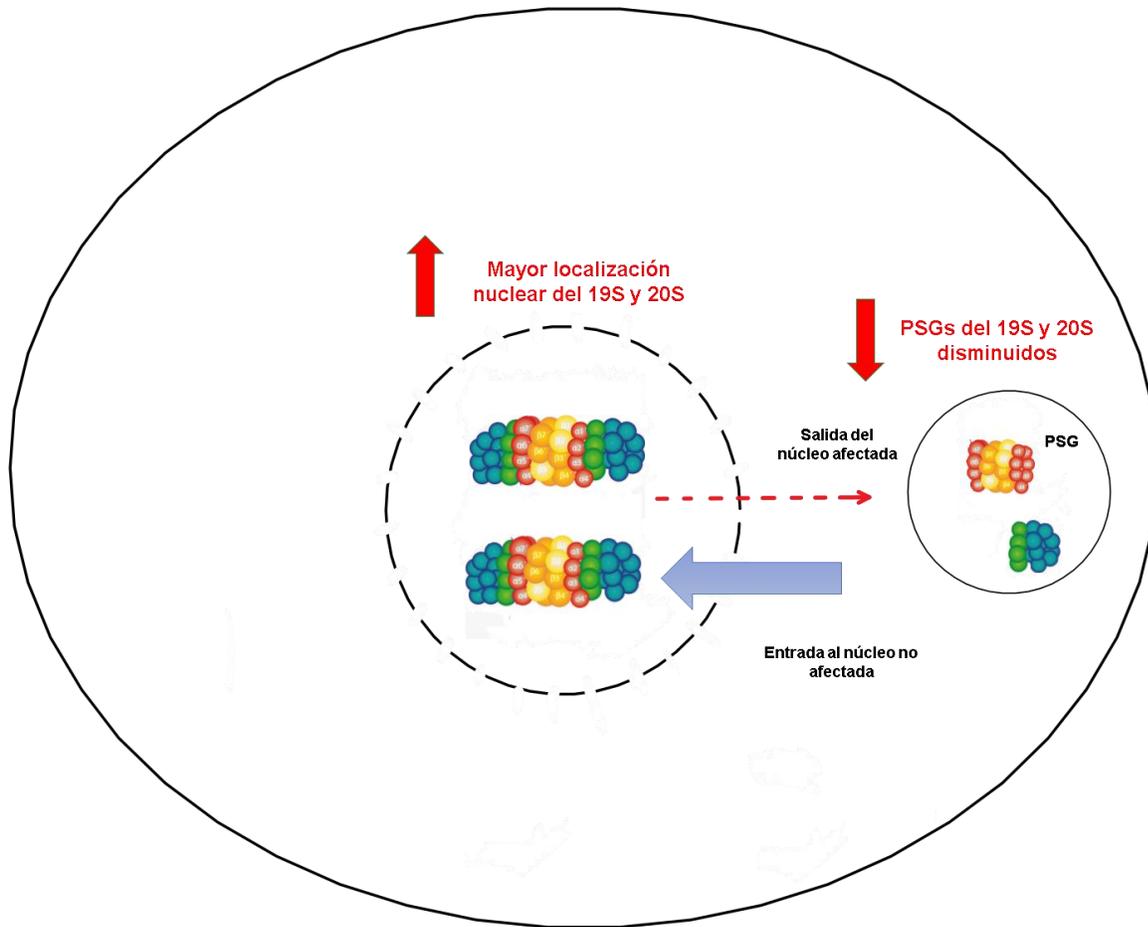


Figura 49. Dinámica proteosomal en ausencia de los extremos carboxilo terminal de Pre10 y Pup2.

La ausencia de los extremos carboxilo terminal de subunidades Pup2 ($\alpha 5$) y Pre10 ($\alpha 7$) alteran la salida del proteosoma desde el núcleo al citoplasma (línea roja), conllevando a una menor formación de PSGs, en la fase estacionaria, sin alterar la re-localización hacia el núcleo cuando hay fuentes de carbono en el medio (flecha azul).

Dentro de las repercusiones biológicas que genera la ausencia del extremo carboxilo de Pre10, observamos un retraso en el crecimiento tanto en condiciones estándar de laboratorio como de estrés por privación de fuentes de carbono y de nitrógeno.

Esto podría deberse a que hay una menor formación de PSGs (Marshall *et al.*, 2018) (aunque no ocurre lo mismo con la cepa con delección del gen *ZDS1*), sin embargo, la viabilidad de la cepa es similar o superior a la cepa silvestre, lo que podría implicar que aun cuando no se formen los gránulos almacenadores de proteosoma, la ausencia de este extremo carboxilo, no tiene un impacto desfavorable para la supervivencia de las células.

Con respecto a la delección de los extremos carboxilo terminal de las subunidades Pup2, Pre6 y Pre9, se observó que a pesar de que su ausencia no afecta la dinámica proteosomal, las cepas resultantes tienen una viabilidad disminuida en comparación con la cepa silvestre.

También se encontró que la delección del extremo carboxilo terminal de Pre9 confiere una mayor resistencia a estrés oxidativo inducido con peróxido, en comparación con la cepa silvestre.

Este fenotipo observado exclusivamente en la cepa Pre9 Δ C, podría implicar que este extremo carboxilo terminal se encuentra involucrado en la regulación de la actividad catalítica intrínseca que tiene el complejo 20S y podría sugerir una regulación a través de intermediarios o una regulación estructural, que podría permitir una mayor actividad del complejo 20S independiente del 19S que confiere una mayor resistencia a condiciones de estrés oxidativo.

10.2 Los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* son necesarios para que ocurra una adecuada dinámica proteosomal, de manera distinta en las cepas BY4741 y BY4742.

Con los resultados obtenidos en la delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*, podemos inferir que estos genes están involucrados en la dinámica proteosomal.

La delección del gen *ZDS1* en la cepa BY4742 compromete la localización del complejo 20S en gránulos almacenadores de proteosoma durante la fase estacionaria. En este caso se observa una señal difusa en todo el citoplasma, además que hay un retraso en la re-localización del 20S al núcleo al restablecer la fuente de carbono en el medio de cultivo.

Con estos hallazgos se puede inferir que el papel del gen *ZDS1* en la regulación del proteosoma es de permitir la adecuada formación de gránulos almacenadores de proteosoma y la re-localización de estas subunidades al núcleo, sin embargo, aún falta determinar si existe una re-localización retrasada del proteosoma o si la señal que se observa al restablecer la fuente de carbono es de subunidades sintetizadas *de novo*.

También será importante evaluar si la señal difusa observada corresponde a la degradación del 20S o si la señal observada es del complejo ensamblado que no se agrega en PSGs.

Este fenotipo de localización del complejo 20S predominantemente disperso en el citoplasma, que se observa en la mutante sin el gen *ZDS1*, ocurre en ambas cepas BY4742 y BY4741.

El fenotipo en ausencia del gen *ZDS1* podría indicar que la exportación nuclear del proteosoma no se ve comprometida, sino que se afecta la adecuada agregación del 20S en el citoplasma (hay una señal difusa en todo el citoplasma, con una menor formación de PSGs) y que es indispensable para la adecuada re-importación nuclear del complejo 20S (posterior a estar en fase estacionaria y agregar fuentes de carbono).

Por otro lado, la ausencia *ZDS1* afecta exclusivamente la localización del complejo 20S y no la localización del complejo 19S, ya que la delección de este gen no altera la localización de subunidades del 19S ni la formación adecuada de gránulos almacenadores de proteosoma.

También la marcada diferencia de cantidad de gránulos almacenadores de proteosoma entre las cepas Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$ y Rpn5:: γ -GFP $\Delta zds1$, podría implicar que en estos gránulos almacenadores pueden encontrarse cantidades distintas de complejos 19S y 20S o que los PSGs pueden estar conformados solamente de complejos 19S o 20S, sin encontrarse siempre juntos en cada PSGs.

Con respecto al gen *ZDS2*, su delección en la cepa BY4742 produce un fenotipo similar a la cepa silvestre tanto para el complejo 19S como para el complejo 20S, es decir, la formación de gránulos almacenadores de proteosoma en fase estacionaria no se afecta, sin embargo, en la ausencia del gen *ZDS2* en la cepa BY4741 el complejo 20S muestra un fenotipo similar a la delección del gen *ZDS1*, durante la fase estacionaria, donde la señal es predominantemente dispersa en el citoplasma.

Este mismo fenómeno dependiente de fondo genético ocurre con *BLM10*, ya que su delección en el fondo BY4742 produce un fenotipo similar a la cepa silvestre en cuanto a la dinámica de los complejos 19S y 20S, sin embargo, su delección en la cepa BY4741 produce que el complejo 20S se encuentre disperso en el citoplasma con un grado de enriquecimiento nuclear en fase estacionaria, similar a lo reportado previamente, en la cepa BY4741, por Weberruss *et al.* 2013.

La cepa BY4741 es MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0* y la cepa BY4742 es MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*, siendo las únicas diferencias genómicas la presencia distinta de los genes *MET15 / LYS2* y los genes de sexo α y α , esto sugiere que el sexo o la presencia de los genes *MET15* o *LYS2* juegan un papel en este fenotipo observado.

En la figura 50 se muestra un esquema con el modelo propuesto basado en nuestros hallazgos.

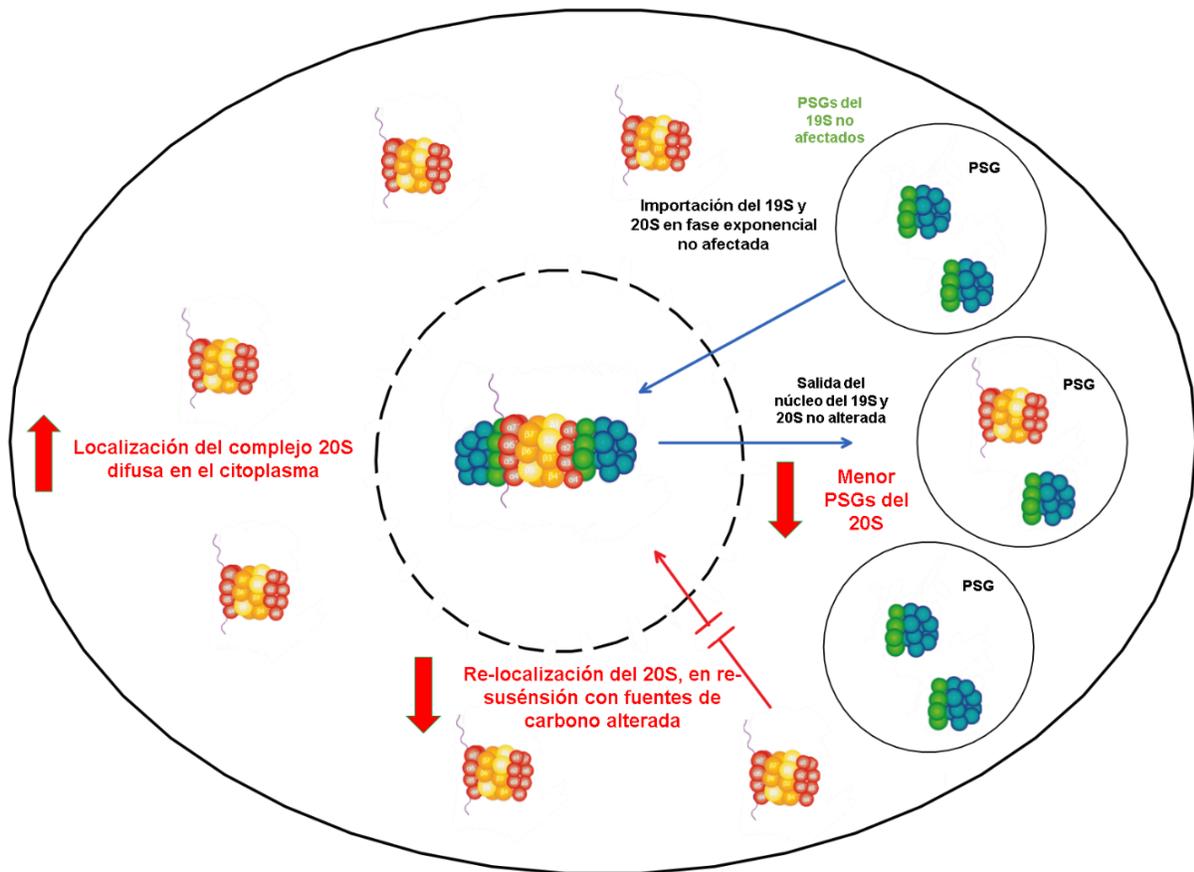


Figura 50. Modelo de la dinámica proteosomal en ausencia de los genes *ZDS1* y *ZDS2*.

La ausencia de los genes *ZDS1* (en las cepas BY4741 y BY4742) y *ZDS2* (en la cepa BY4741) afecta la localización del complejo 20S, durante la fase estacionaria, encontrándose disperso en el citoplasma y formando una menor cantidad de PSGs del complejo 20S con una formación normal de PSGs de complejo 19S, además, la re-localización del 20S en la delección del gen *ZDS1* se ve alterada cuando vuelve a haber fuentes de carbono en el medio (flecha roja interrumpida).

Esto sugiere que *ZDS1* y *ZDS2* (en fondo BY4741) son indispensables para que el complejo 20S pueda agregarse en PSGs y pueda volver a importarse al núcleo, pero no para que sea exportado en fase estacionaria e importado en fase exponencial (flechas azules).

11. Conclusiones.

	Función de los extremos carboxilo terminal de Pup2, Pre6, Pre9 y Pre10	Función de los genes <i>ZDS1</i> , <i>ZDS2</i> y <i>BLM10</i>
Dinámica proteosomal	<ul style="list-style-type: none"> La delección del extremo carboxilo terminal de las subunidades Pre10 ($\alpha 7$) y Pup2 ($\alpha 5$) afecta la dinámica proteosomal, ya que impide parcialmente la salida de los complejos proteosomales 19S y 20S, del núcleo al citoplasma, durante la fase estacionaria. <p>En la ausencia de estos extremos carboxilo terminal, también se disminuye la cantidad de PSGs formados, sin afectar la re-localización de ambos complejos hacia el núcleo, al restablecer las fuentes de carbono al medio.</p> <p>Estos hallazgos no dependen de la cepa usada BY4741 / BY4742.</p>	<ul style="list-style-type: none"> La delección del gen <i>ZDS1</i> afecta la agregación del complejo 20S en PSGs durante la fase estacionaria y la re-localización al núcleo al restablecer las fuentes de carbono en el medio, sin afectar la importación de ambos complejos durante fase exponencial y la exportación de ambos complejos durante fase estacionaria. <p>Esto ocurre independiente del fondo genético BY4741 y BY4742.</p>
Funciones biológicas	<ul style="list-style-type: none"> La delección de extremos carboxilo terminal de las subunidades Pre6 y Pre9 no afectan la localización del proteosoma durante la dinámica proteosomal. Las células sin extremo carboxilo terminal de la subunidad Pre10 muestran un crecimiento lento, después de estar bajo estrés por falta de nutrientes en el medio, en comparación con la cepa silvestre. Las células sin extremo carboxilo terminal de la subunidad Pre10 muestran mayor viabilidad en tiempo con respecto a la cepa silvestre. Las células sin extremo carboxilo terminal de la subunidad Pre9, muestran una mayor resistencia a estrés oxidativo, inducido con H_2O_2, en comparación con la cepa silvestre. 	<ul style="list-style-type: none"> La delección del gen <i>ZDS2</i> produce efectos distintos, según la cepa usada, encontrando que: en la cepa BY4741 se afecta la formación de PGSs del complejo 20S en fase estacionaria y la relocalización al núcleo, y en la cepa BY4742, la dinámica proteosomal no se ve alterada. La delección del gen <i>BLM10</i> produce alteraciones según la cepa usada, encontrando que: el complejo 20S presenta una localización nuclear y dispersa en fase estacionaria en la cepa BY4741, y en la cepa BY4742 la dinámica proteosomal no se ve alterada.

12. Perspectivas.

12.1 Función de los extremos carboxilo terminal de subunidades del complejo 20S en la dinámica proteosomal.

- Evaluar si las modificaciones postraduccionales de fosforilación y desfosforilación en los residuos de aminoácidos S258, S263, S264, T278 y T279 del extremo carboxilo terminal de Pre10 son necesarias para que se lleve a cabo la dinámica de agregación y desagregación proteosomal; mediante mutaciones con cambio de residuos de aminoácidos a residuos fosfomiméticos y no fosforilables.
- Evaluar la localización proteosomal del 19S y 20S en la ausencia de Ecm29 para determinar si Ecm29 está involucrado en la dinámica proteosomal; construyendo cepas en las que se elimine el gen *ECM29* y las subunidades de los complejos proteosomales 19S y 20S se encuentren fusionadas con proteínas reporteras fluorescentes.
- Evaluar si Pre10 y Ecm29 interactúan durante la dinámica proteosomal que ocurre en privación de fuentes de carbono. Esto se puede probar por diferentes estrategias experimentales para evaluar interacciones proteicas (por ejemplo: espectrometría de masas de captura por afinidad, espectrometría de masas con marcaje por isótopos, sistema de doble híbrido, ensayo de complementación de fragmentos de proteínas, entre otros).
- Hacer un análisis cuantitativo del estudio de viabilidad con las cepas que no tienen extremo carboxilo terminal.
- Valorar cuantitativamente el efecto de estrés oxidativo en las cepas sin extremo carboxilo terminal, para confirmar en qué grado la delección del extremo carboxilo terminal de Pre9 favorece una mayor resistencia al estrés oxidativo.

12.2 Papel de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* en la dinámica proteosomal.

- Valorar qué funciones biológicas están afectadas en las cepas $\Delta zds1$ y $\Delta zds2$ en los fondos genéticos BY4741 y BY4742, mediante ensayos de viabilidad cualitativos y cuantitativos, curvas de crecimiento y viabilidad en diversas condiciones de estrés.
- Cuantificar los fenotipos de localización de señal de las subunidades de los complejos 19S y 20S en las cepas sin los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* en el fondo genético BY4741 y realizar una comparación cuantitativa entre la localización de estas subunidades entre los fondos genéticos BY4741 y BY4742.
- Determinar si la señal nuclear observada del complejo 20S, después de restaurar las fuentes de carbono en el medio, en la cepa $\Delta zds1$ se debe a una verdadera re-localización retrasada o es debido a que ocurre síntesis de nuevas subunidades que son importadas al núcleo; mediante experimentos con cultivos en fase estacionaria que se re-suspendan en medio con fuente de carbono en presencia de cicloheximida, para inhibir la síntesis proteica.

- Determinar si la diferencia en la agregación del complejo 20S, en ausencia del gen *ZDS2*, que ocurre en los fondos genéticos BY4741 y BY4742, depende de la auxotrofia, generando cepas que anulen la diferencia de auxotrofías entre los fondos genéticos BY4741 (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) y BY4742 (MATα *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*); mediante la introducción de un plásmido que contenga el gen en cuestión o mediante transformantes genómicas.
- Determinar si la diferencia en la agregación del complejo 20S, en ausencia del gen *BLM10*, que ocurre en los fondos genéticos BY4741 y BY4742, depende de la auxotrofia, generando cepas que anulen la diferencia de auxotrofías entre los fondos genéticos BY4741 (MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) y BY4742 (MATα *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*); mediante la introducción de un plásmido que contenga el gen en cuestión o mediante transformantes genómicas.
- Evaluar si Pre10 interactúa con Zds1 y Zds2, durante la dinámica proteosomal que ocurre en privación de fuentes de carbono. Esto se puede probar por diferentes estrategias experimentales para evaluar interacciones proteicas (por ejemplo: espectrometría de masas de captura por afinidad, espectrometría de masas con marcaje por isótopos, sistema de doble híbrido, ensayo de complementación de fragmentos de proteínas, entre otros).

13. Anexos.

13.1 Preparación de medios y amortiguadores.

- Medio de cultivo YPD líquido y sólido.

Se coloca en agua destilada: extracto de levadura 1% p/v, peptona 2% p/v, dextrosa 2% p/v y agar 2% p/v (si se prepara medio sólido), posteriormente se esteriliza por autoclave 120°C por 20 minutos.

- Medio de cultivo YPD con antibióticos Nourseotricina (CloNat) y G418 líquido y sólido.

Se prepara YPD, al salir de autoclave se deja enfriar a temperatura ambiente y se colocan antibióticos respectivos, para una concentración final: Nourseotricina (CloNat): 100 ng/μL y G418: 1 ng/μL

- Medio de cultivo sintético sin Histidina líquido y sólido.

Se coloca en agua destilada: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (yeast nitrogen base, YNB por sus siglas en inglés) 0.17% p/v, dextrosa 2% p/v, sulfato de amonio 0.5% p/v, agar 2% p/v (si se prepara medio sólido), posteriormente se esteriliza por autoclave 120°C por 20 minutos.

Al salir de autoclave, se deja enfriar a temperatura ambiente y se coloca volumen de *Drop out* 10x de aminoácidos sin Histidina y sin Uracilo para concentración final 1x; se coloca volumen de Uracilo 100x para concentración final 1x.

- Medio de cultivo sintético sin Histidina y con antibióticos Nourseotricina (CloNat) y G418 líquido y sólido.

Se prepara medio sintético sin Histidina como indicador, sin agregar sulfato de amonio y colocando: Glutamato monosódico a 0.1% y antibiótico para concentración final Nourseotricina (CloNat): 100 ng/μL, G418: 1 ng/μL.

- Medio sintético completo.

En agua destilada se colocan: YNB 0.17% p/v, dextrosa 2% p/v, sulfato de amonio 0.5% p/v, posteriormente se esteriliza por autoclave 120°C por 20 minutos.

Al salir de autoclave, se deja enfriar a temperatura ambiente y se coloca volumen de aminoácidos para concentración final 1x: Histidina, Leucina, Lisina y Uracilo

- Medio sintético sin fuente de carbono.

En agua destilada se colocan: YNB 0.17% p/v, sulfato de amonio 0.5% p/v, posteriormente se esteriliza por autoclave 120°C por 20 minutos.

- Medio sintético sin fuente de nitrógeno.

En agua destilada se colocan: YNB 0.17% p/v, dextrosa 2% p/v, después se esteriliza por autoclave 120°C por 20 minutos.

- Medio sintético sin fuente de carbono y nitrógeno.

En agua destilada se coloca YNB 0.17% p/v, después se esteriliza por autoclave 120°C por 20 minutos.

- Preparación de gel de agarosa 0.8%

En matraz estéril se coloca agarosa a 0.8% p/v en amortiguador SB 1x, se funde en microondas, se deja enfriar a temperatura ambiente y se coloca en la bandeja o porta geles de la cámara de electroforesis junto con el peine, para que se formen los pozos donde se cargaran las muestras.

- Preparación de FS-PBS

En PBS 1x se colocan: Formaldehído 4% v/v, Sacarosa 3.4% p/v.

- Preparación de PBS 10X

En agua destilada se colocan: NaCl 7.6% w/v, Na₂HPO₄•12H₂O 2.5% w/v, NaH₂PO₄•H₂O y se ajusta pH a 7.2 con NaOH y HCl.

- Preparación de PBS 1X

Se realiza dilución 1:10 de PBS 10X y agua destilada, se ajusta pH a 7.49 con NaOH y HCl y posteriormente se filtra para esterilizar.

- Preparación de SORB

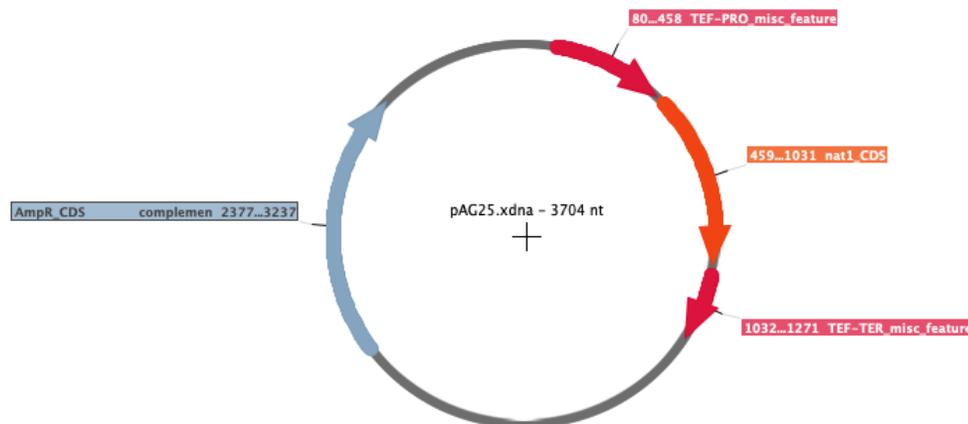
En agua destilada se colocan reactivos para obtener una concentración final: LiOAc 100mM, Tris pH 8.0 10mM, EDTA 1mM, sorbitol 1M. Posteriormente se filtra para esterilizar.

- Preparación buffer QTP

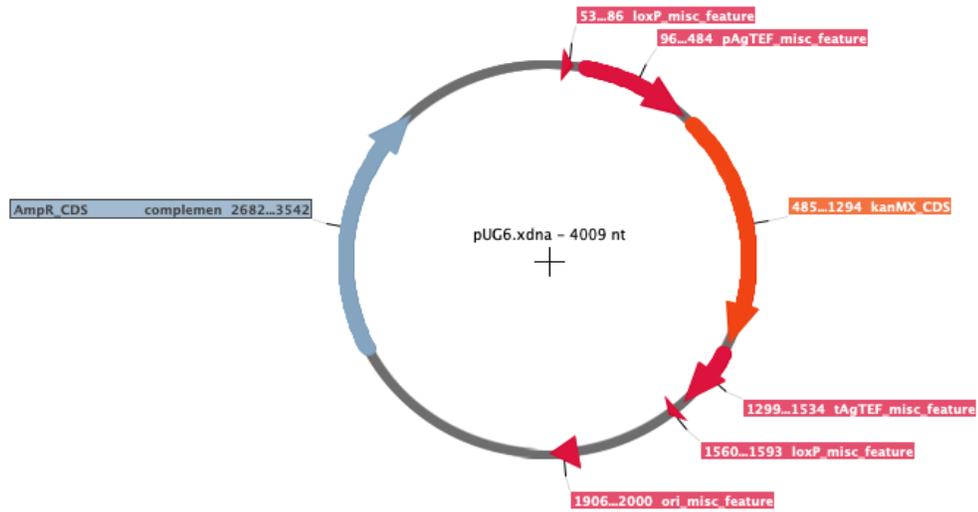
Se colocaron los siguientes reactivos, para preparar 50 ml, con una concentración final: Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-Cl pH 8.0 10mM, Na₂EDTA 1mM, aforar con agua destilada para el volumen necesario

13.2 Plásmidos

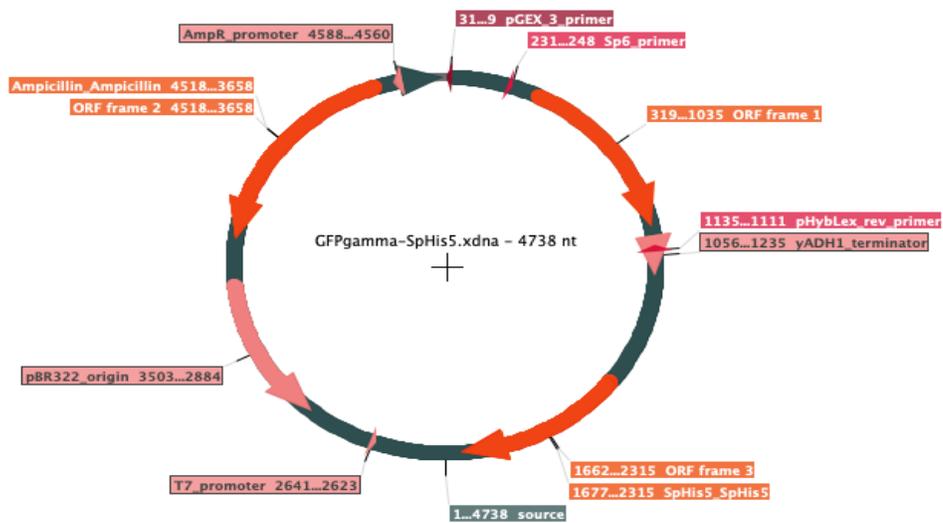
- pAG25



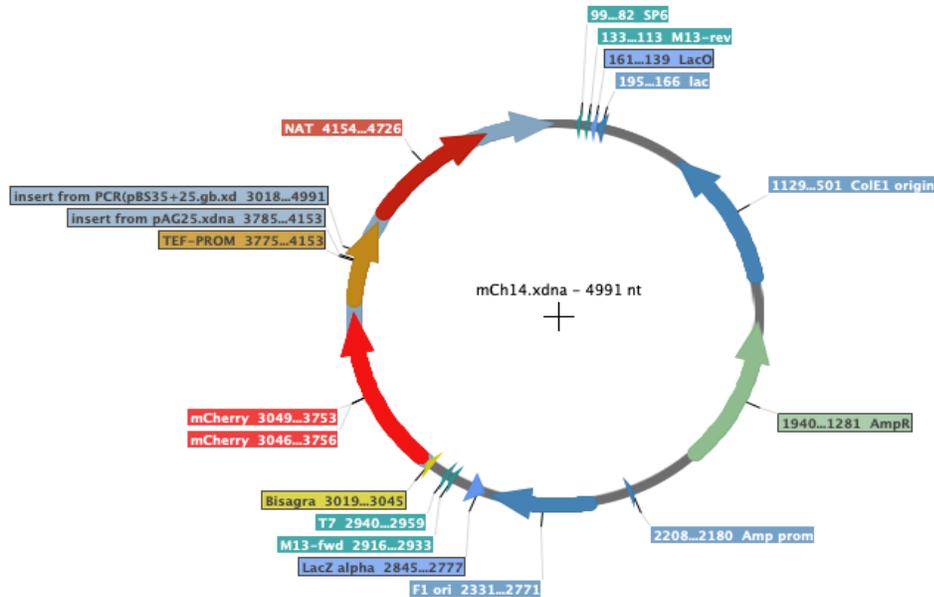
- pUG6



- GFPgamma-SpHis5



- mCh14



13.3 Secuencias de desoxioligonucleótidos.

a) PUP1

Pup1CompF	5'GTATTGTCAATATTTGTGACATACAAGAAGAACAAGTCGATATAACGGC Tatcgggtgacgggtgctggttta 3'.
Pup1R	5'TGAACAATGATTTACTATACTAAAATATACTTAAGTTCTATGTTTTACTTg gatggcggcgtagtatcg 3'.
Pup1C	5'GGTAAAGATGCAGAATACTTGAGGA 3'.

b) PUP2

Pup2CompF	5'AAGAGAAAGAAGCTGCAGAAAGTCCAGAAGAAGCGGATGTTGAAATGT CAatcgggtgacgggtgctggttta 3'.
Pup2IncompF	5'AACTGCTGAATTGATAAAAGAGTTGAAAGAGAAAGAAGCTGCAGAAA GTatcgggtgacgggtgctggttta 3'.
Pup2Cter	5'AACTGCTGAATTGATAAAAGAGTTGAAAGAGAAAGAAGCTGCAGAAA GTcagctgaagcttctgacgc 3'.
Pup2R	5'TTTCTTTCTTTGTTAGTGTGACGTTGGTATTTACCTTTATGTA ACTATATg gatggcggcgtagtatcg 3'.
Pup2C	5'GCAGAACCATCTGGGACATTTTACC 3'.
Pup2D	5'AGCAACAAATATCAGAAGATGGAAG 3'.

c) *PRE6*

Pre6CompF	5' AAGAAAAGCAAGAGCAGCAAGAGCAGGACAAAAAGAAAAATCTAACC ATatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Pre6IncompF	5' ACCAGTACGTCACCCAAATCGAACAAAGAAAAGCAAGAGCAGCAAGAGC AGatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Pre6Cter	5' ACCAGTACGTCACCCAAATCGAACAAAGAAAAGCAAGAGCAGCAAGAGC AGTAAcagctgaagcttcgtacgc 3'.
Pre6R	5' TTATTGCTGTTATTTTATATAGGTTTTATGCCCAATATATATCGCCGTTTg gatggcggcgtagtatcg 3'.
Pre6C	5' GTGAGTTTTTGGAGAAGAATTACGA 3'.
Pre6D	5' ATGGAAAGAAAATTATGGGAAAAAG3'.

d) *PRE9*

Pre9CompF	5' CTGGTATTACCAAGAAGGATGAAGACGAAGAAGCTGATGAAGATATGA AAatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Pre9IncompF	5' TCAAGCCTCAAGAGATAAAGGATATATTGGTAAAGACTGGTATTACCAA Gatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Pre9Cter	5' TCAAGCCTCAAGAGATAAAGGATATATTGGTAAAGACTGGTATTACCAA GTAAcagctgaagcttcgtacgc 3'.
Pre9R	5' CTATGCGTACATATTTATATAAGCATGAAGTCAAACAATACTTTCCAACC ggatggcggcgtagtatcg 3'.
Pre9C	5' GGAAGGCTATTAGTGTGGCGCTAA 3'.
Pre9D	5' ATCGCTTTTGTATTTTTGAAGTG 3'.

e) *PRE10*

Pre10CompF	5' CTACGAATGCAAACGCTACCACTGACCAAGAGGGTGATATTCACCTAG AAatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Pre10IncompF	5' TGCTACAGGAAGCTATCGATTTTGCCCAAAAAGAAATTAACGGCGATG ATatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Pre10Cter	5' TGCTACAGGAAGCTATCGATTTTGCCCAAAAAGAAATTAACGGCGATG ATTAGcagctgaagcttcgtacgc 3'.
Pre10R	5' CATATTATTTCAACTCTTTGGTTCTTCTTAACGTATTATCAGAATGTCAC ggatggcggcgtagtatcg 3'.
Pre10C	5' TGAATTGGAAAAATTAGTTGACCAT 3'.
Pre10D	5' TTGAATTATCTTTGACCTTTTGAGC 3'.

f) *RPN1*

Rpn1F	5' TTGAGGGCGTAGTAATTTTAAAGAAGAACCCTGACTATCGTGAAGAGG AGatcgggtgacggtgctggttta 3'.
Rpn1R	5' GGTTTTGAATTTTCTATTCTGGTTGATATTGCCCAAAAGCTATTCAGT ggatggcggcgtagtatcg 3'.
Rpn1C	5' AGCGATGGGTATTGTTTCCGTTTCT 3'.

g) *RPN5*

Rpn5F	5'TAGGCCATTTAATTACAAAAGAGGAAATCATGCACGGTTTGCAAGCTAA Aatcggtgacggctgctggtta 3'.
Rpn5R	5'TAAAATCAAACCGGATCTGAGATAATCCGACACTTACTCGAAAATCTC Tggatggcggcgtagtatcg 3'.
Rpn5C	5' CAAGAGAGAATACCTAGAAGTTGCG 3'.

h) *ZDS1*

Zds1F	5'TTGTGGGTTACATATTTTCAATTCAAAGGAGAATTTAGCTGTC TTTTATAcagctgaagcttcgtacgc 3'.
Zds1R	5'GTATGTACGTGTGATGTGTATATGTCTATGTATGCAGCGCTG AAGCCTTcatagccactagtgatc 3'.
Zds1A	5' CTATTATGGAATTCTATCGAGCGAC 3'.
Zds1D	5' AAAATTA ACTGCGAAAAGATGTCAC 3'.

i) *ZDS2*

Zds2F	5'CTTTACATTGATCACGTTTGC ACTATAGACTGAATTTAAATTAGAATTTT cagctgaagcttcgtacgc 3'.
Zds2R	5'AAATATGTGGCCTTATATAGGTATCTATCAATCTTGTAACAGTTATGAG catagccactagtgatc 3'.
Zds2A	5' ACTCAGAAATTTAGGCTGTGTATCG 3'.
Zds2D	5' TACTCTTGGACATTTTCGTTTTTCTC 3'.

j) *BLM10*

Blm10F	5'ATTGTTTCGTTAGCTAGCTTTGCACATTAATTTTTCGATTTGTTACCGCCA cagctgaagcttcgtacgc 3'.
Blm10R	5'GATGTACATATATGTCTAGATATGTGCTTAATATCCTATACTAATATGAA catagccactagtgatc 3'.
Blm10A	5' ACGCAGAATAATCTATGAAACCAAC 3'.
Blm10D	5' ATCCGATCAGAAATGGTAAAACATA 3'.

k) Desoxioligonucleótidos que se unen a secuencias insertadas de los plásmidos

GFPR	5'CTTTCAATTCGATTCTATTAAC 3'.
mChR	5' cgccgtcctcgaagttcatc 3'
TefPromTest	5' CGGCGTGGGGACAATTCAA 3'
TefTerm	5' CGCCTCGACATCATCTGCCCA 3'

13.4 Cepas para valorar el papel de los extremos carboxilo terminal de subunidades del 20S

a) Fusión genómica de proteína verde fluorescente (γ -GFP) a subunidades proteosomales en los fondos genéticos BY4741 y BY4742

Pup1:: γ -GFP (β 2)	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pup1- γ GFP::SpHIS5
Pup2:: γ -GFP(α 5)	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pup2- γ GFP::SpHIS5
Pre6:: γ -GFP(α 4) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre6- γ GFP::SpHIS5
Pre9:: γ -GFP (α 3) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9- γ GFP::SpHIS5
Pre10:: γ -GFP (α 7) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP::SpHIS5
Rpn1:: γ -GFP	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn1- γ GFP::SpHIS5
Rpn5:: γ -GFP	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn5- γ GFP::SpHIS5
Pup2 Δ C:: γ -GFP(β 2) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pup2 Δ C- γ GFP::SpHIS5
Pre6 Δ C:: γ -GFP(α 4) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre6 Δ C- γ GFP::SpHIS5
Pre9 Δ C:: γ -GFP (α 3) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9 Δ C- γ GFP::SpHIS5
Pre10 Δ C:: γ -GFP (α 7) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10 Δ C- γ GFP::SpHIS5
Pre10:: γ -GFP (α 7)	BY4741	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP::SpHIS5
Pre10 Δ C:: γ -GFP (α 7)	BY4741	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10 Δ C- γ GFP::SpHIS5

* Ya se contaba con estas cepas, las cuales fueron construidas en el laboratorio por Maria José Blanco, alumna de la licenciatura en investigación biomédica básica de la UNAM.

a) Delección de extremo carboxilo terminal de subunidades del 20S sin fusión a γ -GFP

Pup2 Δ C (β 2) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pup2 Δ C::NAT1
Pre6 Δ C (α 4) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre6 Δ C::NAT1
Pre9 Δ C (α 3) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9 Δ C::NAT1
Pre10 Δ C (α 7) *	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10 Δ C::NAT1

* Ya se contaba con estas cepas, las cuales fueron construidas en el laboratorio por Maria José Blanco, alumna de la licenciatura en investigación biomédica básica de la UNAM.

b) Delección de extremo carboxilo terminal de Pre10 y Pup2, en cepas con γ -GFP fusionado a subunidades proteosomales del 19S y 20S.

Pup1:: γ -GFP Pre10 Δ C	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pup1- γ -GFP::SpHIS5 Pre10 Δ C::NAT1
Pre9:: γ -GFP Pre10 Δ C	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9- γ -GFP::SpHIS5 Pre10 Δ C::KanMx
Rpn1:: γ -GFP Pre10 Δ C	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn1- γ -GFP::SpHIS5 Pre10 Δ C::NAT1
Rpn5:: γ -GFP Pre10 Δ C	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn5- γ -GFP::SpHIS5 Pre10 Δ C::NAT1
Pre9:: γ -GFP Pup2 Δ C	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9- γ -GFP::SpHIS5 Pup2 Δ C::KanMx
Rpn5:: γ -GFP Pup2 Δ C	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn5- γ -GFP::SpHIS5 Pup2 Δ C::KanMx

c) Delección de extremo carboxilo terminal de Pre10 fusionado a γ -GFP, en cepas con mCherry fusionado a subunidades proteosomales del 19S y 20S.

Pre9::mCherry Pre10 Δ C:: γ -GFP	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9-mCherry::NAT1 Pre10 Δ C- γ GFP::SpHIS5
Rpn5::mCherry Pre10 Δ C:: γ -GFP	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn5-mCherry::NAT1 Pre10 Δ C- γ GFP::SpHIS5

13.5 Cepas para valorar el papel de los genes ZDS1, ZDS2 y BLM10 en la dinámica proteosomal.

a) Delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*

$\Delta zds1$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 $\Delta zds1$::NAT1
$\Delta zds2$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 $\Delta zds2$::NAT1
$\Delta blm10$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 $\Delta blm10$::NAT1

b) Delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* en cepas con γ -GFP fusionado a subunidades proteosomales del 19S y 20S, en los fondos genéticos BY4741 y BY4742

Pre9:: γ -GFP $\Delta zds1$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre9- γ GFP $\Delta zds1$::NAT1
Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta zds1$::NAT1
Pre10:: γ -GFP $\Delta zds2$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta zds2$::KanMx

Pre10:: γ -GFP $\Delta blm10$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta blm10$::KanMx
Rpn1:: γ -GFP $\Delta zds1$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 $\Delta zds1$::KanMx
Rpn1:: γ -GFP $\Delta zds2$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn1- γ GFP $\Delta zds1$::KanMx
Rpn1:: γ -GFP $\Delta blm10$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn1- γ GFP $\Delta blm10$::KanMx
Rpn5:: γ -GFP $\Delta zds1$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn5- γ GFP $\Delta zds1$::KanMx
Rpn5:: γ -GFP $\Delta zds2$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Rpn5- γ GFP $\Delta zds2$::KanMx
Rpn5:: γ -GFP $\Delta blm10$	BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta zds1$::KanMx
Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$	BY4741	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta zds1$::KanMx
Pre10:: γ -GFP $\Delta zds2$	BY4741	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta zds2$::KanMx
Pre10:: γ -GFP $\Delta blm10$	BY4741	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 Pre10- γ GFP $\Delta blm10$::KanMx

13.6 Localización de los complejos 19S y 20S en delección del extremo carboxilo terminal de Pup2.

Se muestran las cepas Pre9 y Rpn5 con fusión a proteína reportera, con delección del extremo carboxilo terminal de Pup2 donde se observa que presentan un cambio de localización, durante la fase estacionaria, similar a lo observado en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10, donde hay una menos formación de gránulos almacenadores de proteosoma con una señal predominantemente nuclear (figura 51).

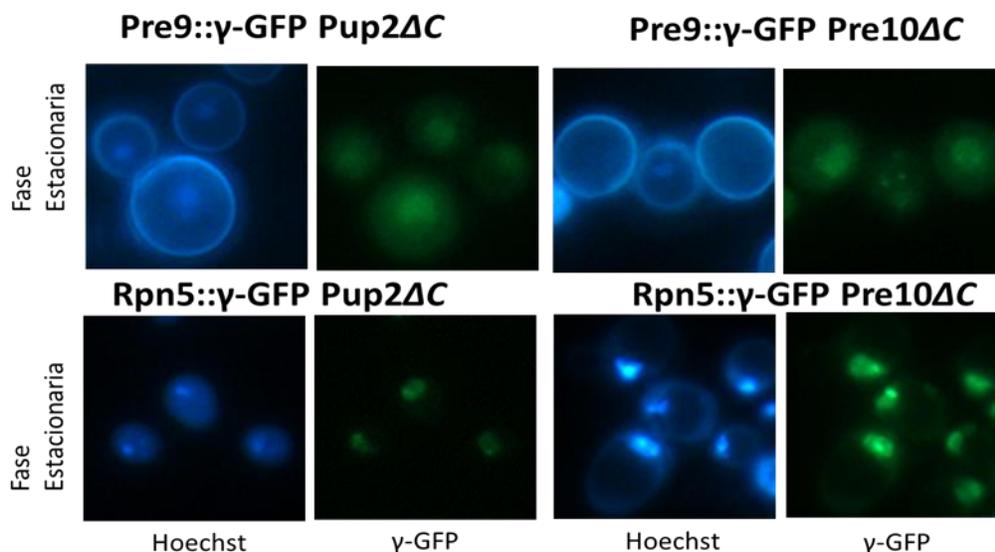


Figura 51. Fotografías en microscopio de epifluorescencia de subunidad Pre9 y Rpn5 con delección de los extremos carboxilo terminal de Pup2 y Pre10.

Se observa que en la delección del extremo carboxilo terminal de Pup2 hay un fenotipo similar al observado en la delección del extremo carboxilo terminal de Pre10, durante la fase estacionaria.

13.7 Localización de Pre10 con y sin extremo carboxilo terminal en fondo genético BY4741

Por las diferencias de fenotipos encontrados entre los fondos genéticos BY4741 y BY4742 en las cepas con delección de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10* se buscó valorar si se encontraba el mismo fenómeno en el fenotipo encontrado en las cepas sin extremo carboxilo terminal de Pre10.

Para valorar esto, se generaron la mismas cepa Pre10:: γ -GFP y Pre10 Δ C:: γ -GFP en el fondo genético BY4741, por ser el principal fondo genético usado en el estudio de la dinámica proteosomal.

Se encontró un fenotipo similar en ambos fondos genéticos BY4742 y BY4741, por lo que se concluyó que la localización de la señal de Pre10 no depende del fondo genético (figura 52).

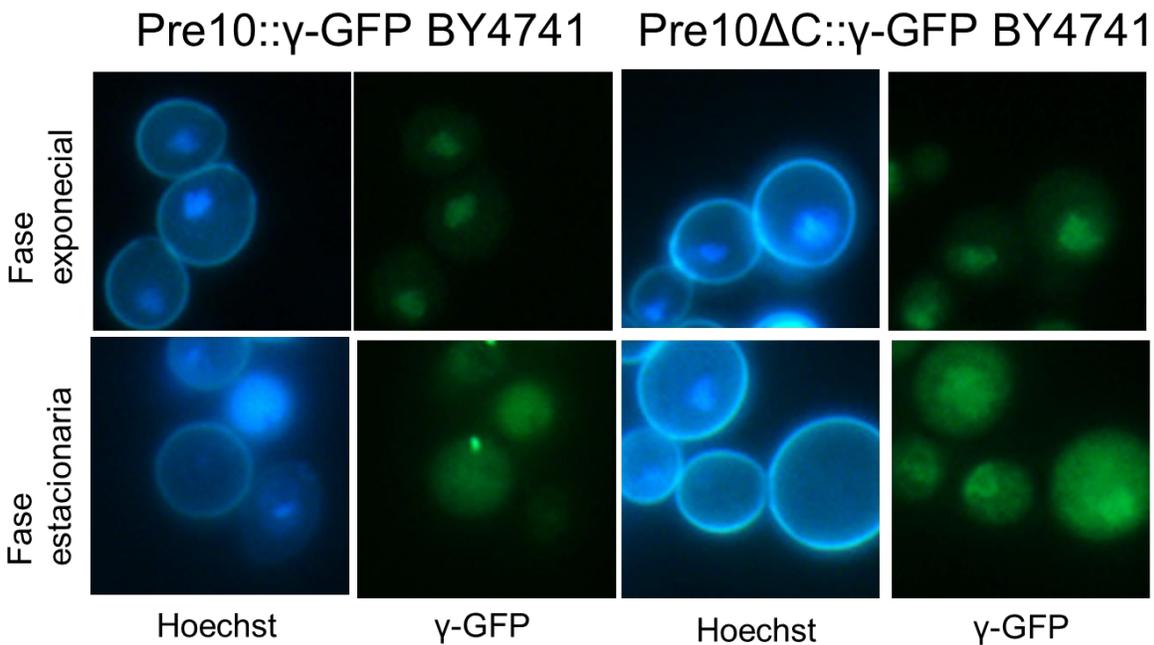


Figura 52. Fotografías en microscopio de epifluorescencia de subunidad Pre10 (α 7) con extremo carboxilo terminal completo e incompleto en fondo BY4741

No se observan diferencias significativas de las cepas Pre10:: γ -GFP y Pre10 Δ C:: γ -GFP entre los fondos genéticos BY4741 y BY4742

13.8 Localización de la señal de Pre10 con y sin extremo carboxilo terminal en estrés Oxidativo

Se tomaron fotografías de las cepas Pre10:: γ -GFP y Pre10 Δ C:: γ -GFP durante las fases exponencial y estacionaria posterior a inducir estrés oxidativo con H₂O₂ sin encontrar diferencias en la señal con respecto a las cepas sin inducción de estrés oxidativo (figura 53).

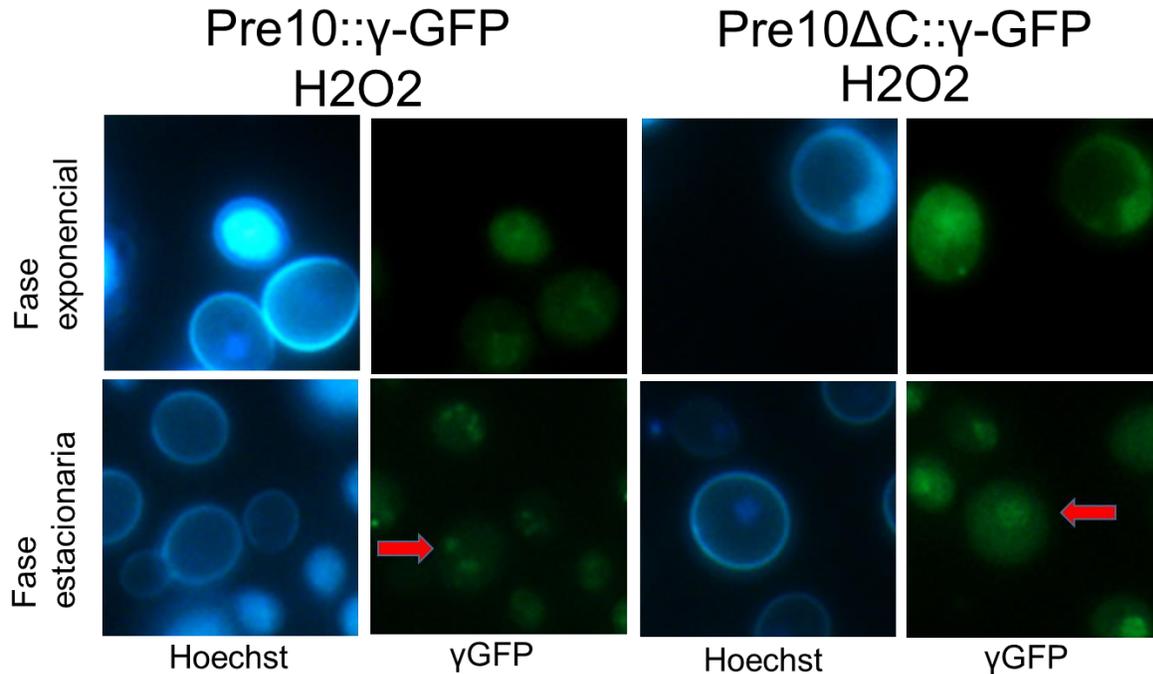


Figura 53. La inducción de estrés oxidativo agudo, con H₂O₂, no modifica la localización de la subunidad Pre10 con extremo carboxilo terminal completo e incompleto, durante la dinámica proteosomal.

Fotografías tomadas por microscopía de epifluorescencia de las cepas Pre10:: γ -GFP y Pre10 Δ C:: γ -GFP crecidas en medio con H₂O₂.

Las células se dejaron crecer en medio YPD líquido y se tomaron muestras en el día 1 y día 6, posterior a inducir 3 horas con H₂O₂ en ambas muestras. Las células se fijaron y tiñeron con tinción de ácidos nucleicos para observar en microscopio de epifluorescencia.

No se observaron diferencias significativas de la señal de Pre10 en ambas cepas, durante las fases exponencial y estacionaria, con respecto a las mismas cepas sin inducción de estrés oxidativo agudo (figura 18).

13.9 Re-localización nuclear de Pre10 a las 2 horas de re-suspensión en medio con fuentes de carbono en la delección del gen *ZDS1*

En la figura 54 se muestra el retraso de re-localización de la subunidad Pre10 hacia el núcleo al re-suspender células estacionarias en medio con fuentes de carbono, en la cepa Pre10:: γ -GFP $\Delta zds1$

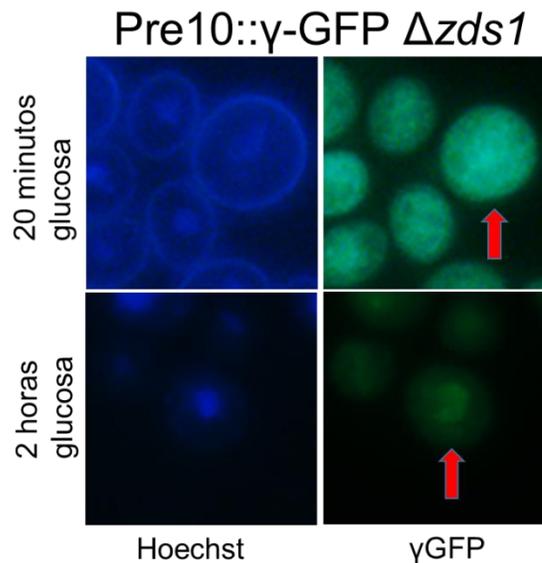


Figura 54. La delección del gen *ZDS1* retrasa la re-localización nuclear de Pre10 al re-suspender células estacionarias en medio con fuente de carbono.

Se muestra la comparación de señal de Pre10 en la delección del gen *ZDS1* a los 20 minutos y 2 horas de re-suspensión en medio con fuente de carbono, donde se observa que la señal a los 20 minutos sigue siendo dispersa en el citoplasma a diferencia de lo que ocurre con la cepa control (figuras 18 y 19) y que esta se encuentra predominantemente nuclear a las 2 horas de encontrarse en medio con fuente de carbono, sin saber si la señal nuclear es por síntesis e importación de nuevas subunidades o por una verdadera re-localización de Pre10 al núcleo.

13.10 Comparación gráfica de la dinámica proteosomal de las distintas cepas usadas

En las figuras 55-57, se muestra una comparación de las gráficas de barras de las cepas usadas con fusión a γ -GFP, en la cepa BY4742.

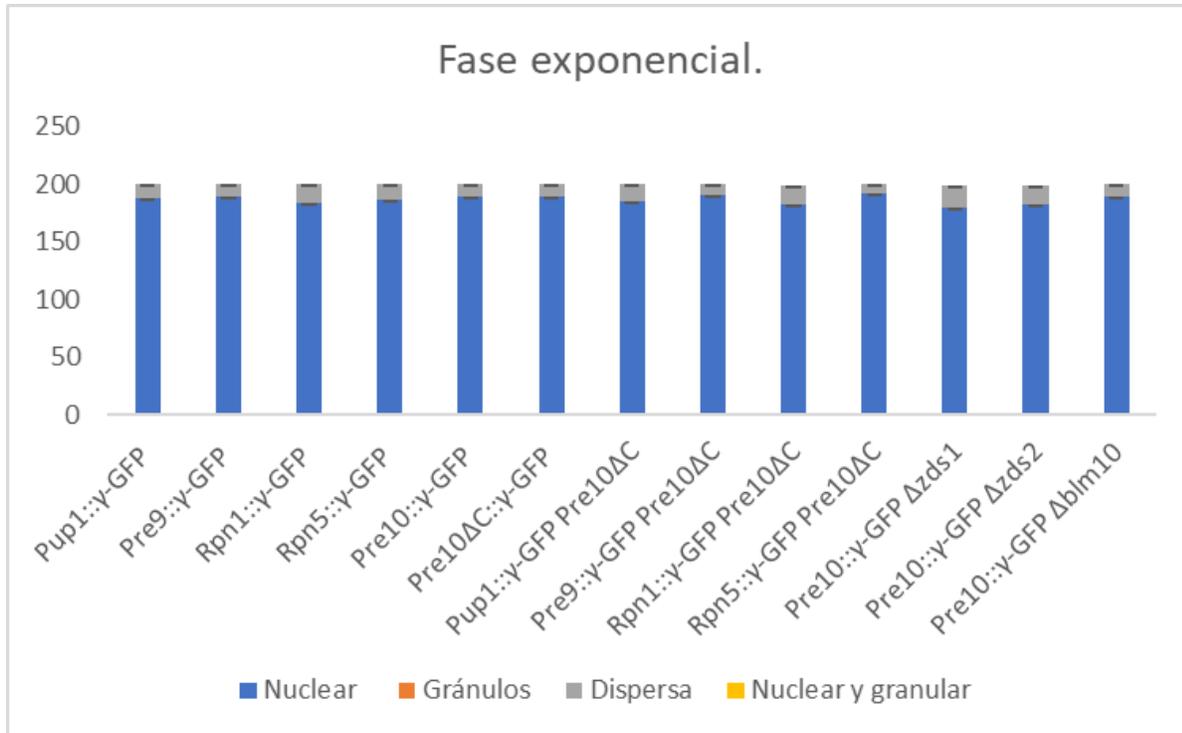


Figura 55. Gráficas de barras en fase exponencial

Se muestran las gráficas de barra de las cepas usadas para valorar la función del extremo carboxilo terminal de Pre10 y la función de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

Se observa que la señal de todas las cepas en fase exponencial es predominantemente nuclear.

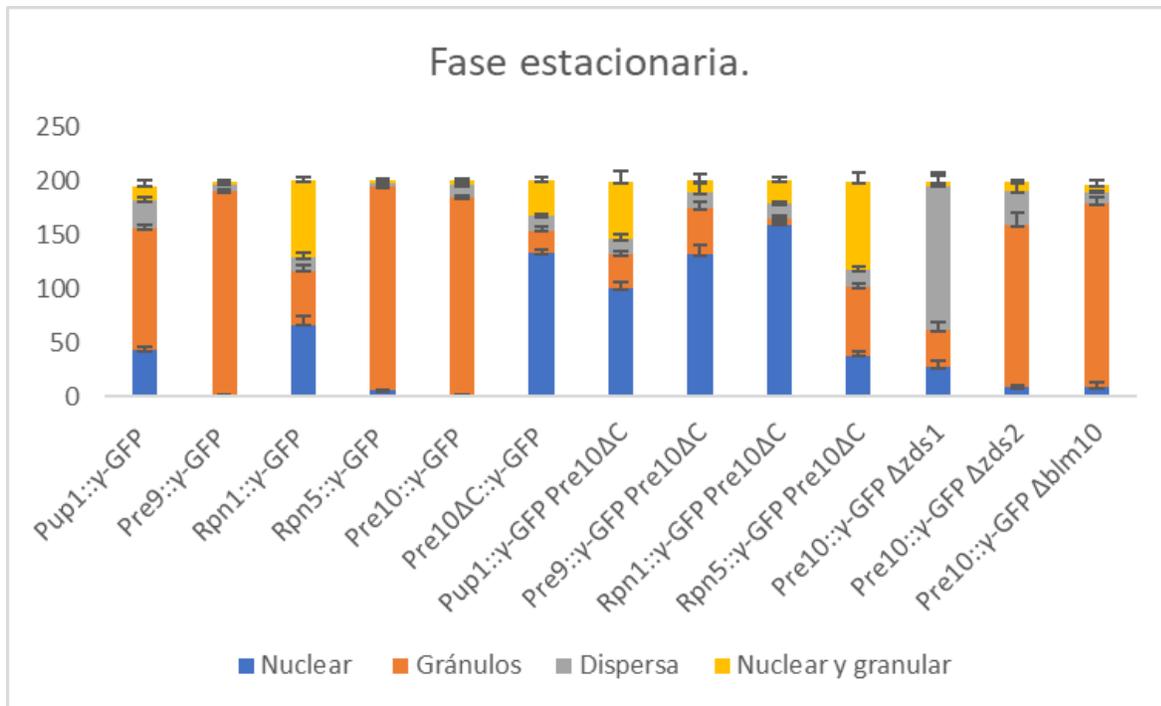


Figura 56. Gráficas de barras en fase estacionaria

Se muestran las gráficas de barra de las cepas usadas para valorar la función del extremo carboxilo terminal de Pre10 y la función de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

Se observa que la señal de las cepas control es predominantemente en PSGs, excepto Pup1 y Rpn1, que presentan importante señal nuclear; la señal de Pup1, Pre9 y Rpn1 sin extremo carboxilo terminal de Pre10 es similar a la cepa Pre10ΔC::y-GFP, con mayor localización nuclear y menor formación de PSGs, siendo la cepa Rpn1::y-GFP Pre10ΔC la que menos PSGs presenta con mayor señal nuclear y Rpn5::y-GFP Pre10ΔC la que menos señal exclusivamente nuclear presenta y forma más PSGs.

Se observa que la señal de Pre10 en la cepa con delección de *ZDS1* es la única que se encuentra predominantemente dispersa en citoplasma.

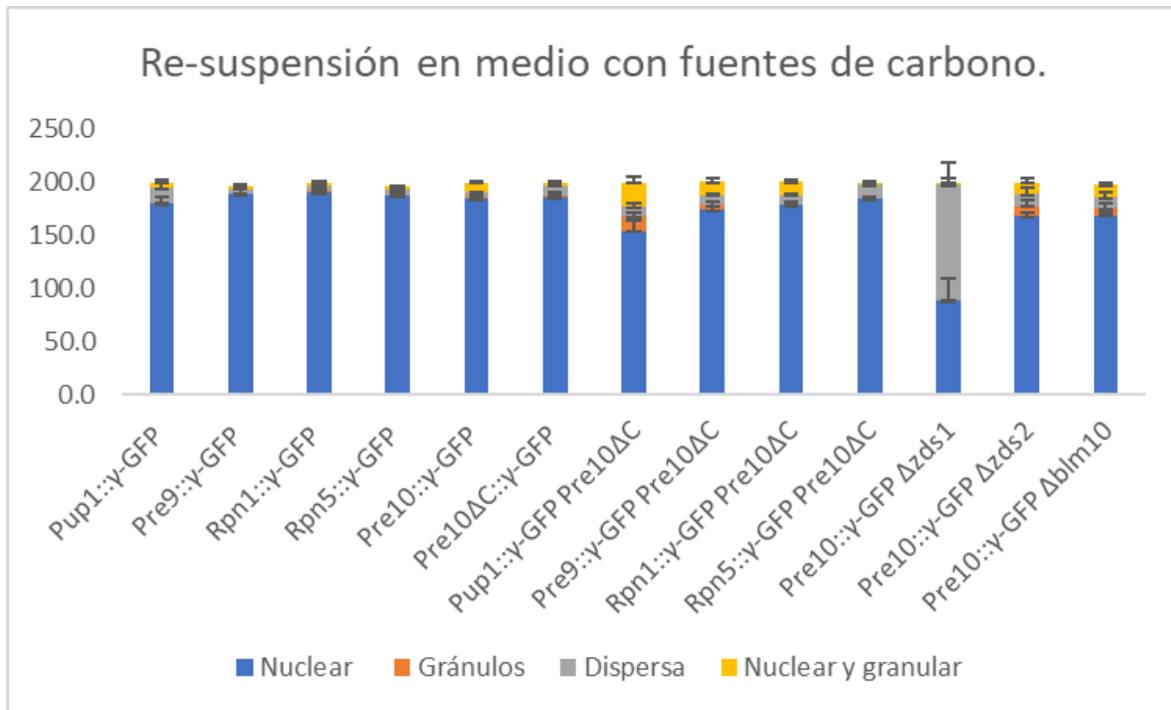


Figura 57. Gráficas de barras en re-suspensión de células estacionarias en medio con fuente de carbono.

Se muestran las gráficas de barra de las cepas usadas para valorar la función del extremo carboxilo terminal de Pre10 y la función de los genes *ZDS1*, *ZDS2* y *BLM10*.

Se observa que la señal de todas las cepas re-localiza en el núcleo a los 20 minutos de re-suspender en medio con fuente de carbono, excepto la cepa Pre10::y-GFP $\Delta zds1$, que muestra una importante señal dispersa en el citoplasma.

14. Bibliografía

- Arendt, C. S., & Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), 7156-7161.
- Bajorek, M., Finley, D., & Glickman, M. H. (2003). Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. *Current Biology: CB*, 13(13), 1140-1144.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., & Seemüller, E. (1998). The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3), 367-380.
- Ben-Aroya, S., Agmon, N., Yuen, K., Kwok, T., McManus, K., Kupiec, M., & Hieter, P. (2010). Proteasome nuclear activity affects chromosome stability by controlling the turnover of Mms22, a protein important for DNA repair. *PLoS Genetics*, 6(2), e1000852.
- Budenholzer, L., Breckel, C., Hickey, C. M., & Hochstrasser, M. (2020). The Sts1 nuclear import adapter uses a non-canonical bipartite nuclear localization signal and is directly degraded by the proteasome. *Journal of Cell Science*, 133(6).
- Cabrera, R., Sha, Z., Vadakkan, T. J., Otero, J., Kriegenburg, F., Hartmann-Petersen, R., Dickinson, M. E., & Chang, E. C. (2010). Proteasome nuclear import mediated by Arc3 can influence efficient DNA damage repair and mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*, 21(18), 3125-3136.
- Calabria, I., Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J.-A., Russiñol, N., & Queralt, E. (2012). Zds1 regulates PP2A(Cdc55) activity and Cdc14 activation during mitotic exit through its Zds_C motif. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 12), 2875-2884.
- Campbell, K., Vowinkel, J., & Ralsler, M. (2016). Cell-to-cell heterogeneity emerges as consequence of metabolic cooperation in a synthetic yeast community. *Biotechnology Journal*, 11(9), 1169-1178.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., & Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4898), 1576-1583.
- Chen, L., Romero, L., Chuang, S.-M., Tournier, V., Joshi, K. K., Lee, J. A., Kovvali, G., & Madura, K. (2011). Sts1 Plays a Key Role in Targeting Proteasomes to the Nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 3104-3118.
- Chen, L., & Madura, K. (2014). Yeast importin- α (Srp1) performs distinct roles in the import of nuclear proteins and in targeting proteasomes to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 32339-32352.
- Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K. M., Stewart, A. G., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Stewart, M., Vértessy, B. G., Forwood, J. K., & Kobe, B. (2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 428(10 Pt A), 2060-2090.
- Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Fabre, B., Ziv, T., Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2016). P62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(47), E7490-E7499.
- Coletta, A., Pinney, J. W., Solís, D. Y. W., Marsh, J., Pettifer, S. R., & Attwood, T. K. (2010). Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles. *BMC Systems Biology*, 4(1), 43.
- Dechant, R., Binda, M., Lee, S. S., Pelet, S., Winderickx, J., & Peter, M. (2010). Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *The EMBO Journal*, 29(15), 2515-2526.
- DePristo, M. A., Zilversmit, M. M., & Hartl, D. L. (2006). On the abundance, amino acid composition, and evolutionary dynamics of low-complexity regions in proteins. *Gene*, 378, 19-30.
- De La Mota-Peynado, A., Lee, S. Y.-C., Pierce, B. M., Wani, P., Singh, C. R., & Roelofs, J. (2013). The proteasome-associated protein Ecm29 inhibits proteasomal ATPase activity and in vivo protein degradation by the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(41), 29467-29481.
- Dick, T. P., Nussbaum, A. K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanović, S., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G., & Schild, H. (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25637-25646.
- Doherty, K. M., Pride, L. D., Lukose, J., Snysman, B. E., Charles, R., Pramanik, A., Muller, E. G., Botstein, D., & Moore, C. W. (2012). Loss of a 20S proteasome activator in *Saccharomyces cerevisiae* downregulates genes important for genomic integrity, increases DNA damage, and selectively sensitizes cells to agents with diverse mechanisms of action. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2(8), 943-959.
- Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33-48.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 197-208.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 5(6), 435-445.
- Enenkel, C., Lehmann, A., & Kloetzel, P. M. (1998). Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *The EMBO Journal*, 17(21), 6144-6154.
- Estrin, E., Lopez-Blanco, J. R., Chacón, P., & Martin, A. (2013). Formation of an intricate helical bundle dictates the assembly of the 26S proteasome lid. *Structure (London, England: 1993)*, 21(9), 1624-1635.
- Estruch, F., Hodge, C. A., Rodríguez-Navarro, S., & Cole, C. N. (2005). Physical and genetic interactions link the yeast protein Zds1p with mRNA nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9691-9697.
- F, E., Ca, H., S, R.-N., & Cn, C. (2004). Physical and genetic interactions link the yeast protein Zds1p with mRNA nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9691-9697.
- Finley, D., Ozkaynak, E., & Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, 48(6), 1035-1046.
- Finley, Daniel. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 477-513.
- Frey, S., Richter, R. P., & Görlich, D. (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5800), 815-817.

- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., & Vierstra, R. D. (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 1970-1981.
- Fukunaga, K., Kudo, T., Toh-e, A., Tanaka, K., & Saeki, Y. (2010). Dissection of the assembly pathway of the proteasome lid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(4), 1048-1053.
- Funakoshi, M., Tomko, R. J., Kobayashi, H., & Hochstrasser, M. (2009). Multiple Assembly Chaperones Govern Biogenesis of the Proteasome Regulatory Particle Base. *Cell*, 137(5), 887-899.
- Gatchel, J. R., & Zoghbi, H. Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: Mechanisms and common principles. *Nature Reviews. Genetics*, 6(10), 743-755.
- Gavin, A.-C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A.-M., Cruciati, C.-M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., ... Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), 141-147.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A., & Finley, D. (1998). The Regulatory Particle of the *Saccharomyces cerevisiae* Proteasome. *Molecular and Cellular Biology*, 18(6), 3149-3162.
- Golding, G. B. (1999). Simple sequence is abundant in eukaryotic proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 8(6), 1358-1361.
- Görlich, D., & Kutay, U. (1999). Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 607-660.
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., & Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping Beauty": Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 187-206.
- Grignaschi, E., Cereghetti, G., Grigolato, F., Kopp, M. R. G., Caimi, S., Faltova, L., Saad, S., Peter, M., & Arosio, P. (2018). A hydrophobic low-complexity region regulates aggregation of the yeast pyruvate kinase Cdc19 into amyloid-like aggregates in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(29), 11424-11432.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., & Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology*, 7(11), 1062-1067.
- Gu, Z. C., Wu, E., Sailer, C., Jando, J., Styles, E., Eisenkolb, I., Kuschel, M., Bitschar, K., Wang, X., Huang, L., Vissa, A., Yip, C. M., Yedidi, R. S., Friesen, H., & Enenkel, C. (2017a). Ubiquitin orchestrates proteasome dynamics between proliferation and quiescence in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 28(19), 2479-2491.
- Hanssum, A., Zhong, Z., Rousseau, A., Krzyzosiak, A., Sigurdardottir, A., & Bertolotti, A. (2014). An inducible chaperone adapts proteasome assembly to stress. *Molecular Cell*, 55(4), 566-57.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., & Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 25200-25209.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425-479.
- Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., & Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*, 437(7063), 1381-1385.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-Dependent Protein Degradation. *Annual Review of Genetics*, 30(1), 405-439.
- Hoefer, M. M., Boneberg, E.-M., Grotegut, S., Kusch, J., & Illges, H. (2006). Possible tetramerisation of the proteasome maturation factor POMP/proteasembilin/hUmp1 and its subcellular localisation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(3-5), 259-267.
- Höfeld, J. (2017). Preserving protein function through reversible aggregation. *Nature Cell Biology*, 19(10), 1142-1144.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D., & Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*, 453(7194), 481-488.
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., & Tanaka, K. (2003). The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *The EMBO Journal*, 22(14), 3557-3567.
- Isono, E., Nishihara, K., Saeki, Y., Yashiroda, H., Kamata, N., Ge, L., Ueda, T., Kikuchi, Y., Tanaka, K., Nakano, A., & Toh-e, A. (2007). The Assembly Pathway of the 19S Regulatory Particle of the Yeast 26S Proteasome. *Molecular Biology of the Cell*, 18(2), 569-580.
- Jonasson, E. M., Rossio, V., Hatakeyama, R., Abe, M., Ohya, Y., & Yoshida, S. (2016). Zds1/Zds2-PP2ACdc55 complex specifies signaling output from Rho1 GTPase. *The Journal of Cell Biology*, 212(1), 51-61.
- Ju, D., Wang, X., Ha, S.-W., Fu, J., & Xie, Y. (2010). Inhibition of Proteasomal Degradation of Rpn4 Impairs Nonhomologous End-Joining Repair of DNA Double-Strand Breaks. *PLoS ONE*, 5(4).
- Kaeberlein, M. (2010). Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, 464(7288), 513-519.
- Kashi, Y., & King, D. G. (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics: TIG*, 22(5), 253-259.
- Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428(6983), 617-624.
- Kisselev, A. F., Akopina, T. N., Castillo, V., & Goldberg, A. L. (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molecular Cell*, 4(3), 395-402.
- Kusmierczyk, A. R., Kunjappu, M. J., Funakoshi, M., & Hochstrasser, M. (2008). A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(3), 237-244.
- Laporte, D., Salin, B., Daignan-Fornier, B., & Sagot, I. (2008). Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *The Journal of Cell Biology*, 181(5), 737-745.
- Lee, H.-Y., Chao, J.-C., Cheng, K.-Y., & Leu, J.-Y. (2018). Misfolding-prone proteins are reversibly sequestered to an Hsp42-associated granule upon chronological aging. *Journal of Cell Science*, 131(16).

- Lee, S. Y.-C., De la Mota-Peynado, A., & Roelofs, J. (2011). Loss of Rpt5 protein interactions with the core particle and Nas2 protein causes the formation of faulty proteasomes that are inhibited by Ecm29 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36641-36651.
- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.-M., & Enenkel, C. (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *Journal of Molecular Biology*, 317(3), 401-413.
- Lehmann, A., Jechow, K., & Enenkel, C. (2008). Blm10 binds to pre-activated proteasome core particles with open gate conformation. *EMBO Reports*, 9(12), 1237-1243.
- Lehmann, A., Niewianda, A., Jechow, K., Janek, K., & Enenkel, C. (2010). Ecm29 fulfils quality control functions in proteasome assembly. *Molecular Cell*, 38(6), 879-888.
- Li, X., Kusmierczyk, A. R., Wong, P., Emili, A., & Hochstrasser, M. (2007). Beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *The EMBO Journal*, 26(9), 2339-2349.
- Liu, C.-W., Li, X., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P. J., & DeMartino, G. N. (2006). ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Molecular Cell*, 24(1), 39-50.
- Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: From birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research*, 26(8), 869-885.
- Marcotte, E. M., Pellegrini, M., Yeates, T. O., & Eisenberg, D. (1999). A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology*, 293(1), 151-160.
- Marguerat, S., Schmidt, A., Codlin, S., Chen, W., Aebersold, R., & Bähler, J. (2012). Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells. *Cell*, 151(3), 671-683.
- Marshall, R. S., Li, F., Gemperline, D. C., Book, A. J., & Vierstra, R. D. (2015). Autophagic Degradation of the 26S Proteasome Is Mediated by the Dual ATG8/Ubiquitin Receptor RPN10 in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 58(6), 1053-1066.
- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2018). Proteasome storage granules protect proteasomes from autophagic degradation upon carbon starvation. *ELife*, 7.
- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2019). Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6.
- Martínez-Muñoz, G. A., & Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20309-20319.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., & Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature*, 392(6673), 303-306.
- Moore, M. S., & Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365(6447), 661-663.
- Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature*, 183(4677), 1751-1752.
- Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A., & Lenski, R. E. (1994). Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology: CB*, 4(1), 24-33.
- Murata, S., Yashiroda, H., & Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2), 104-115.
- Pack, C.-G., Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Yokosawa, H., Sako, Y., Baumeister, W., Tanaka, K., & Saeki, Y. (2014). Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nature Communications*, 5, 3396.
- Peters, L. Z., Hazan, R., Breker, M., Schuldiner, M., & Ben-Aroya, S. (2013). Formation and dissociation of proteasome storage granules are regulated by cytosolic pH. *The Journal of Cell Biology*, 201(5), 663-671.
- Peters, L. Z., Karmon, O., David-Kadoch, G., Hazan, R., Yu, T., Glickman, M. H., & Ben-Aroya, S. (2015). The protein quality control machinery regulates its misassembled proteasome subunits. *PLoS Genetics*, 11(4), e1005178.
- Peters, L. Z., Karmon, O., Miodownik, S., & Ben-Aroya, S. (2016). Proteasome storage granules are transiently associated with the insoluble protein deposit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 129(6), 1190-1197.
- Peth, A., Uchiki, T., & Goldberg, A. L. (2010). ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. *Molecular Cell*, 40(4), 671-681.
- Rabl, J., Smith, D. M., Yu, Y., Chang, S.-C., Goldberg, A. L., & Cheng, Y. (2008). Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Molecular Cell*, 30(3), 360-368.
- Ramos, P. C., Höckendorff, J., Johnson, E. S., Varshavsky, A., & Dohmen, R. J. (1998). Ump1p Is Required for Proper Maturation of the 20S Proteasome and Becomes Its Substrate upon Completion of the Assembly. *Cell*, 92(4), 489-499.
- Ravid, T., & Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(9), 679-690.
- Rosenzweig, R., Bronner, V., Zhang, D., Fushman, D., & Glickman, M. H. (2012). Rpn1 and Rpn2 Coordinate Ubiquitin Processing Factors at Proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 14659-14671.
- Rosenzweig, R., Osmulski, P. A., Gaczynska, M., & Glickman, M. H. (2008). The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(6), 573-580.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., & Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 148(4), 635-651.
- Russell, S. J., Steger, K. A., & Johnston, S. A. (1999). Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21943-21952.
- Sadre-Bazzaz, K., Whitby, F. G., Robinson, H., Formosa, T., & Hill, C. P. (2010). Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Molecular cell*, 37(5), 728-735.
- Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2011). AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 587-612.
- Savulescu, A. F., Shorer, H., Kleifeld, O., Cohen, I., Gruber, R., Glickman, M. H., & Harel, A. (2011). Nuclear import of an intact preassembled proteasome particle. *Molecular Biology of the Cell*, 22(6), 880-891.

- Schmidt, H. B., & Görlich, D. (2016). Transport Selectivity of Nuclear Pores, Phase Separation, and Membraneless Organelles. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 46-61.
- Schmidt, M., Haas, W., Crosas, B., Santamaria, P. G., Gygi, S. P., Walz, T., & Finley, D. (2005). The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(4), 294-303.
- Schwartz, T. U. (2016). The Structure Inventory of the Nuclear Pore Complex. *Journal of Molecular Biology*, 428(10 Pt A), 1986-2000.
- Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X. I., Deshaies, R. J., & Robinson, C. V. (2006). Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *PLoS Biology*, 4(8), e267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040267>
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. En C. Guthrie & G. R. Fink (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 350, pp. 3-41). Academic Press.
- Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B. B., Tian, G., Lee, B.-H., Shi, Y., Zhang, N., de Poot, S. A. H., Tuebing, F., Sun, S., Vannoy, J., Tarasov, S. G., Engen, J. R., Finley, D., & Walters, K. J. (2016). Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6275).
- Smith, D. M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., & Goldberg, A. L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell*, 27(5), 731-744.
- Smith, D. M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T., & Goldberg, A. L. (2005). ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Molecular Cell*, 20(5), 687-698.
- Specht, S., Miller, S. B. M., Mogk, A., & Bukau, B. (2011). Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 195(4), 617-629.
- Stadtmueller, B. M., Kish-Trier, E., Ferrell, K., Petersen, C. N., Robinson, H., Myszka, D. G., Eckert, D. M., Formosa, T., & Hill, C. P. (2012). Structure of a Proteasome Pba1-Pba2 Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 37371-37382.
- Starheim, K. K., Gevaert, K., & Arnesen, T. (2012). Protein N-terminal acetyltransferases: When the start matters. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(4), 152-161.
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A., & Ichihara, A. (1990). Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Letters*, 271(1), 41-46.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, 19(1), 94-102.
- Tomko, R. J., Funakoshi, M., Schneider, K., Wang, J., & Hochstrasser, M. (2010). Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: Implications for proteasome structure and assembly. *Molecular Cell*, 38(3), 393-403.
- Tomko, R. J., & Hochstrasser, M. (2013). Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 415-445.
- Tomko, R. J., & Hochstrasser, M. (2014). The Intrinsically Disordered Sem1 Protein Functions as a Molecular Tether During Proteasome Lid Biogenesis. *Molecular cell*, 53(3), 433-443.
- Tomko, R. J., Taylor, D. W., Chen, Z. A., Wang, H.-W., Rappsilber, J., & Hochstrasser, M. (2015). A Single α Helix Drives Extensive Remodeling of the Proteasome Lid and Completion of Regulatory Particle Assembly. *Cell*, 163(2), 432-444.
- Van Deventer, S., Menendez-Benito, V., van Leeuwen, F., & Neeffjes, J. (2015). N-terminal acetylation and replicative age affect proteasome localization and cell fitness during aging. *Journal of Cell Science*, 128(1), 109-117.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., Koonin, E. V., & Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5593), 611-615.
- Verstrepen, K. J., Jansen, A., Lewitter, F., & Fink, G. R. (2005). Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*, 37(9), 986-990.
- Wani, P. S., Suppahia, A., Capalla, X., Ondracek, A., & Roelofs, J. (2016). Phosphorylation of the C-terminal tail of proteasome subunit $\alpha 7$ is required for binding of the proteasome quality control factor Ecm29. *Scientific Reports*, 6.
- Wang, X., Chemmama, I. E., Yu, C., Huszagh, A., Xu, Y., Viner, R., Block, S. A., Cimermancic, P., Rychnovsky, S. D., Ye, Y., Sali, A., & Huang, L. (2017). The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(39), 16310-16320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.803619>
- Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., & Huang, L. (2010). Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Science Signaling*, 3(151), ra88.
- Weberruss, M. H., Savulescu, A. F., Jando, J., Bissinger, T., Harel, A., Glickman, M. H., & Enekel, C. (2013). Blm10 facilitates nuclear import of proteasome core particles. *The EMBO Journal*, 32(20), 2697-2707.
- Wendler, P., Lehmann, A., Janek, K., Baumgart, S., & Enekel, C. (2004). The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin α and proteasome functions. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37751-37762.
- Xie, Y., & Varshavsky, A. (2001). RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3056-3061.
- Yakura, M., Ozoe, F., Ishida, H., Nakagawa, T., Tanaka, K., Matsuda, H., & Kawamukai, M. (2006). Zds1, a Novel Gene Encoding an Ortholog of Zds1 and Zds2, Controls Sexual Differentiation, Cell Wall Integrity and Cell Morphology in Fission Yeast. *Genetics*, 172(2), 811-825.
- Yao, T., & Cohen, R. E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, 419(6905), 403-407.

- Yasutis, K., Vignali, M., Ryder, M., Tameire, F., Dighe, S. A., Fields, S., & Kozminski, K. G. (2010). Zds2p Regulates Swe1p-dependent Polarized Cell Growth in *Saccharomyces cerevisiae* via a Novel Cdc55p Interaction Domain. *Molecular Biology of the Cell*, 21(24), 4373-4386.
- Yu, Y., Jiang, Y. W., Wellinger, R. J., Carlson, K., Roberts, J. M., & Stillman, D. J. (1996). Mutations in the homologous ZDS1 and ZDS2 genes affect cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5254-5263.