



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión de la NaTrxh recombinante y de las distintas
mutantes en su extremo amino en *Saccharomyces
cerevisiae***

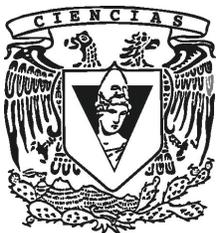
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA GUADALUPE ARZATE PEÑA



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

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos de la alumna

Arzate Peña Diana Guadalupe

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311273191

2. Datos del tutor

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dra. Patricia Ramos Morales

5. Datos del sinodal 3

Dr. Luis David Alcaraz Peraza

6. Datos del sinodal 4

Dra. María Sandra Cabrera Benítez

7. Datos del trabajo escrito

Expresión de la NaTrxh recombinante y de las distintas mutantes en su extremo amino en

Saccharomyces cerevisiae

78 pp.

2018

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

Agradecimientos

En primer lugar a la UNAM, y a la Facultad de Ciencias, mi *alma mater*, por haberme brindado incontables oportunidades, así como permitirme completar mis estudios.

A todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto:

A mis padres. Por brindarme todo su apoyo, amor y comprensión. Por ser quienes me han impulsado e inspirado a continuar en este arduo camino y porque sé que siempre puedo contar con ustedes. Los quiero mucho.

A mis hermanas. Gracias por apoyarme en todo lo que hago y por brindarme su ayuda para poder terminar esta hermosa carrera.

A Christian, por siempre estar ahí, apoyándome e inspirándome a volverme una mejor persona y terminar este proyecto de la mejor manera. Gracias por tu paciencia y cariño durante este tiempo. Te quiero.

A mi asesor de tesis, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, gracias por todo tu apoyo y comprensión. Por los buenos y malos momentos que me han hecho crecer como persona y todas las enseñanzas, tanto académicas como personales. Gracias por siempre prestar la atención necesaria y guiarme en todo este camino de formación profesional y personal, por tener la paciencia (aunque a veces no tanto) para enseñarme un poco de todo lo que sabes. Las palabras me faltan para expresarte lo agradecida que estoy.

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

A todo el Laboratorio de Desarrollo de Plantas, en especial a la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, la Dra. Margarita Collazo Ortega y la Dra. Sonia Vázquez Santana por ser unas increíbles personas que nunca dudaron en apoyarnos. De igual manera, a la Dra. Karina Jiménez Durán tanto por su asistencia técnica como críticas al trabajo.

Por todas las enseñanzas, aprendizaje y apoyo recibido por parte del Dr. Felipe Cruz García del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, así como a los miembros de su laboratorio, en especial a la M. en C. Yuridia Cruz González Zamora por su apoyo y asistencia técnica.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos por su valioso apoyo y asistencia técnica en el Invernadero de la Facultad de Ciencias, así como ser una increíble persona.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León (Taller de Biología de Plantas I y II), por la asistencia técnica recibida a lo largo del desarrollo de este trabajo, por todo su tiempo prestado y haberme recibido siempre con una sonrisa y disposición de ayudar.

A la Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezno (Taller de Biología Molecular de la Célula), por su asistencia técnica en la transformación de levadura.

Al laboratorio de la Dra. Rosario Muñoz Clares (Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM) y al M. en C. Carlos Mujica por su asistencia técnica, así como a todos los integrantes de ese laboratorio. A la Dra. Ana Lilia Juárez Vázquez, gracias por todos esos buenos consejos que nos dabas a los pequeños de licenciatura, a José Antonio (Tony) por hacer el ambiente siempre divertido y en especial a Erick Palomo por ser un gran maestro y amigo, gracias por la paciencia y por contagiarme esa sed de ciencia.

Al Dr. Víctor Javier Zaldívar Machorro y a la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida también por su valiosa asistencia técnica.

A mis compañeros de laboratorio que recorrimos este camino juntos, de los cuales he aprendido mucho. Isabel, gracias por ser un ejemplo de fuerza y determinación, Daniel Muro, siempre has sido y serás un muy increíble amigo, Juan Bartolo, gracias por siempre escucharme y brindarme un buen consejo, además a todos los *in vitro* chicos y orquideólogos que habitan el invernadero, a TODOS, muchas gracias por compartir este tiempo conmigo.

A mis amigos de la carrera, por compartir increíbles momentos y siempre estar en los momentos difíciles y hacerlos más amenos. Son unas increíbles personas: Lucero, Rodrigo, Dianita, Alex, Kelly, Jesús, Dieguito, Jorge, Mariannita, Sarai, Carito, Rubi, Jonhy y TODOS los que faltan.

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

Resumen

La secreción de proteínas en células eucariontes puede ocurrir por dos vías: (1) la vía clásica, que es propia de todas las proteínas con un péptido señal, mismas que se traducen hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE), después, por acción del complejo COPII, pasan al aparato de Golgi, el cual se encarga de secretarlas por medio de vesículas de secreción; y (2) la vía no convencional, la cual se puede dividir en dos: (a) cuando las proteínas con péptido señal pasan por el RE pero, en pasos siguientes, son direccionadas a Golgi sin necesidad del complejo COPII, o bien, son secretadas sin pasar por Golgi; y (b) las proteínas nucleares y citoplasmáticas que carecen de péptido señal que son secretadas por vías alternas/independientes a la vía RE-Golgi.

La NaTrxh, una tiorredoxina tipo *h* de *Nicotiana glauca* (Na: *Nicotiana glauca*; Trxh: tiorredoxina tipo *h*), es una proteína que se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar. Se sabe que la región comprendida entre los residuos Ala-17 y Pro-27 se encuentra un motivo, denominado N β , que contiene la información para dirigir su secreción. Las características de este motivo, tanto bioquímicas como por su posición dentro de la estructura primaria de la proteína, hacen que se considere como un péptido señal no ortodoxo. De manera interesante, solo se encuentra una secuencia similar en otra proteína que se asocia a la membrana y que también es de plantas.

Con la finalidad de analizar la vía de secreción que pudiese seguir la NaTrxh, se escogió un sistema eucarionte heterólogo, *Saccharomyces cerevisiae*, el cual, al ser un organismo modelo en el que se han descrito rutas no convencionales de secreción, permitiría dilucidar si la información contenida en el motivo N β es reconocida por otros organismos o si se trata de un sistema propio de plantas. Por lo tanto, en el presente trabajo se expresó la proteína NaTrxh recombinante y a tres formas mutantes de su extremo amino (NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$) en células de *S. cerevisiae* usando el vector de expresión pYES/DEST-52. Las proteínas recombinantes resultantes contienen una cola de 6 histidinas en el extremo carboxilo para facilitar su inmunodetección. Los resultados indicaron que ninguna versión de la NaTrxh se secretó, lo cual sugiere que *S. cerevisiae* es un sistema que no reconoce la información de secreción de dicha proteína, permitiendo sugerir que la función de localización celular del motivo N β es específico de plantas.

Índice general

	Página
Resumen	i
Índice general	ii
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Abreviaturas	vi
I. Introducción	1
I.1. Vías de secreción de proteínas en células eucariontes	1
I.2. Tiorredoxinas, proteínas presentes en todos los organismos	4
II. Antecedentes	8
II.1. NaTrxh, una tiorredoxina tipo <i>h</i> de localización extracelular	8
II.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes	11
III. Hipótesis	14
IV. Objetivos	15
V. Materiales y métodos	16
V.1. Amplificación de la secuencia <i>NaTrxh</i> y las diferentes mutantes para su clonación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO	16
V.2. Clonación de la <i>NaTrxh</i> y las diferentes mutantes en el vector de entrada pENTR/D-TOPO	19
V.3. Reacción de amplificación por PCR directamente de colonias bacterianas	21
V.4. Purificación de DNA plasmídico	25
V.5. Verificación de que las secuencias de la NaTrxh (NaTrxh, NaTrxhΔNα, NaTrxhΔNβ y NaTrxhΔNαβ) en el vector de entrada no presentara mutaciones	26
V.6. Clonación de las secuencias <i>NaTrxh</i> , <i>NaTrxhΔNα</i> , <i>NaTrxhΔNβ</i> y <i>NaTrxhΔNαβ</i> en el vector destino pYES-DEST52	27
V.7. Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> InvSc1	30
V.8. Sobreexpresión de la NaTrxh y las mutantes NaTrxhΔNα, NaTrxhΔNβ y NaTrxhΔNαβ	31
V.9. Extracción de proteína total por ruptura celular de levadura	33
V.10. Cuantificación de proteína total	34
V.11. Análisis de las proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y ensayos tipo Western-blot	35
V.12. Inmunodetección de las diferentes proteínas recombinantes	36
VI. Resultados	38
VI.1. Clonación de las secuencias que corresponden a la NaTrxh, NaTrxhΔNα, NaTrxhΔNβ y NaTrxhΔNαβ en el vector de entrada pENTR/D-TOPO	38
VI.2. Análisis de las secuencias <i>NaTrxh</i> , <i>NaTrxhΔNα</i> , <i>NaTrxhΔNβ</i> y <i>NaTrxhΔNαβ</i> clonadas en el vector de entrada	41
VI.3. Corroboración de la orientación de <i>NaTrxhΔNα</i> clonada en pENTR	43
VI.4. Generación de las construcciones moleculares en el vector destino pYES/DEST-52	45
VI.5. Expresión en <i>S. cerevisiae</i> e inmunodetección de la NaTrxh y de las	47

mutantes recombinantes	
VII. Discusión	58
VII.1. <i>S. cerevisiae</i> como sistema de expresión para la NaTrxh y sus mutantes	58
VII.2. Inmunodetección y niveles de expresión de la NaTrxh y sus diferentes mutantes del extremo amino en <i>S. cerevisiae</i>	59
VII.3. Secreción de la NaTrxh en dos reinos diferentes	61
VII.4. Características que vuelven único al motivo N β y posibles escenarios de secreción de la NaTrxh en células vegetales	62
VIII. Conclusiones y perspectivas	68
IX. Bibliografía	69
Anexo 1	76
Anexo 2	77

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Mecanismos de secreción de proteínas en células eucriontes	4
Figura 2. Esquema de los resultados de los ensayos de expresión transitoria de la NaTrxh y sus diversas mutantes en células de cebolla (Ávila-Castañeda <i>et al.</i> , 2014)	9
Figura 3. Análisis por alineamiento de los motivos N β y los motivos que se presentan en Trxh1 y Trxh2	10
Figura 4. Esquema de la secuencia <i>NaTrxh</i> y las mutantes <i>NaTrxh</i> Δ N α , <i>NaTrxh</i> Δ N β y <i>NaTrxh</i> Δ N $\alpha\beta$ indicando la posición de alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos que se emplearon para su amplificación por PCR	18
Figura 5. Mapa del vector de clonación pENTR/D-TOPO	24
Figura 6. Secuencia reportada del cDNA de la NaTrxh en la base de datos NCBI (número de acceso DQ021448.1) y la secuencia de los aminoácidos a partir de esta	27
Figura 7. Mapa del vector de expresión en levadura pYES/DEST-52 (Invitrogen)	28
Figura 8. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR de cada una de las construcciones de la NaTrxh clonadas en pENTR/D-TOPO (<i>NaTrxh</i> , <i>NaTrxh</i> Δ N α , <i>NaTrxh</i> Δ N β y <i>NaTrxh</i> Δ N $\alpha\beta$)	39
Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia reportada de la NaTrxh (número de acceso: DQ021448.1) con las secuencias en las construcciones pENTR: <i>NaTrxh</i> , pENTR: <i>NaTrxh</i> Δ N α , pENTR: <i>NaTrxh</i> Δ N β y pENTR: <i>NaTrxh</i> Δ N $\alpha\beta$ a nivel de nucleótidos y a nivel de proteína	42
Figura 10. Corroboración de la orientación de pENTR: <i>NaTrxh</i> Δ N α	44
Figura 11. Análisis por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR de las construcciones de la NaTrxh clonadas en pYES/DEST52 (<i>NaTrxh</i> , <i>NaTrxh</i> Δ N α , <i>NaTrxh</i> Δ N β y <i>NaTrxh</i> Δ N $\alpha\beta$)	46
Figura 12. Primera expresión de las cuatro proteínas recombinantes en <i>S. cerevisiae</i>	49
Figura 13. Expresión basal de las proteínas recombinantes en medios sin inducción	51
Figura 14. Migración de las proteínas recombinantes a los 12 kDa	53
Figura 15. Sobreexpresión de la NaTrxh y las mutantes con los vectores pET28b en <i>E. coli</i>	54
Figura 16. Extracción diferencial de los extractos crudos de la NaTrxh y las mutantes en <i>S. cerevisiae</i>	56
Figura 17. Inmunodetección en el medio extracelular	57
Figura 18. Perfil de hidrofobicidad del amino terminal de la NaTrxh y de un péptido señal canónico (p11)	63

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la <i>NaTrxh</i> y sus mutantes	17
Tabla 2. Condiciones de la PCR utilizando a la <i>Phusion Hot Start Flex</i> (New England BioLabs)	19
Tabla 3. Condiciones de PCR utilizando a la <i>TEMPase Hot Start</i> (Ampliqon)	22
Tabla 4. Secuencias señal de tránsito que direccionan a las proteínas del citosol a diferentes organelos	65
Tabla 5. Componentes del gel de poliacrilamida	78

Abreviaturas

Acb1	Proteína de unión del acil coenzima-A
AcPPO	Polifenol oxidasa de <i>Annona cherimola</i>
AqpZ	Acuaporina Z
ATP	Adenosín trifosfato
BGH	Hormona del crecimiento bovino
BiP	Proteína de unión a inmunoglobina
BSA	Albúmina de suero bovino
COPII	Proteína de cubierta
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina
dominio ABC	Dominio de unión a ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAD2	Δ -12 Fatty acid desaturase
FBPasa	Fructuosa-1,6 bifosfatasa
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GFP	Proteína verde fluorescente
Gu-HCl	Guanidina-HCl
LB	Lysogenic Broth (Luria-Bertani)
MTD	Manitol hidrogenasa
NADP-MDH	Malato deshidrogenasa dependiente de NADP
nBT	Cloruro de azul de nitro tetrazolio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-kB	Factor nuclear kB
ORF	Marco de lectura abierto
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pEG103	pEarleyGateway103
pENTR	pENTR/D-TOPO
pYES	pYES/DEST-52
Pfu	<i>Phusion Hot Start Flex (New England BioLabs)</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polivinil difluoruro
RE	Retículo endoplásmico

SC(U-)	Medio SC sin uracilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SRP	Signal recognition particle
SRP54	Subunidad 54k de SRP
SRPR	Receptor de SRP
Trx	Tiorredoxina(s)
YPD	Medio compuesto de extracto de levadura, peptona y dextrosa

I. Introducción

I.1. Vías de secreción de proteínas en células eucariontes

La secreción de proteínas en células eucariontes puede ocurrir por dos vías: (1) la vía clásica; y (2) la vía no convencional. La vía clásica, que es propia de todas las proteínas con un péptido señal, el cual, al inicio de la traducción por los ribosomas en el citoplasma es reconocido por SRP (partícula de reconocimiento de señal). SRP es un complejo de 7 moléculas de RNA y 6 polipéptidos que alenta el proceso de la traducción. El complejo que se forma, mRNA-proteína naciente-ribosoma-SRP, difunde por el citoplasma hasta alcanzar la membrana del retículo endoplásmico (RE), a la que se une gracias a un receptor que reconoce a SRP (receptor de SRP; SRPR). El SRPR unido al complejo interacciona con el translocador, el cual es un canal por el que penetra la cadena polipeptídica naciente hacia el lumen del RE. El péptido señal se queda unido al translocador para después ser cortado por una peptidasa del retículo o bien, se inserta entre los ácidos grasos de la membrana para su posterior tráfico hacia otro organelo de la célula (Megías *et al.*, 2014). Una vez en el lumen del RE, las proteínas se modifican por adición de residuos de carbohidratos y se dirigen por medio de vesículas COPII al aparato de Golgi, el cual se encarga de secretarlas, transportándolas en vesículas de secreción, mismas que se fusionan a la membrana plasmática, liberando así su contenido. La denominada vía no convencional, se puede dividir en dos (Nickel y Rabouille, 2009): (a) cuando las proteínas con péptido señal pasan por el RE pero, en pasos siguientes, son direccionadas a Golgi sin necesidad del complejo COPII, como la HSP150 de levadura o bien, son secretadas sin pasar por Golgi, como la CD45, que es una proteína receptora de la Tyr fosfatasa, enzima esencial para el desarrollo de las células T (Baldwin y Ostergaard, 2001; 2002) o la proteína Ist2 de levadura (Juschke *et al.*, 2005); y (b)

cuando la secreción se lleva a cabo por vías alternas/independientes de RE-Golgi, como es el caso de algunas proteínas nucleares y citoplasmáticas que a pesar de que carecen de un péptido señal, son secretadas (Nombela *et al.*, 2006; Nickel y Rabouille, 2009).

I.1.1. Características de los péptidos señal y secreción de proteínas sin péptido señal

Un péptido señal se caracteriza por ser de entre 16 y 30 residuos de aminoácidos de longitud, encontrarse en el N-terminal o muy cerca a éste y tener un punto de corte, generalmente en algún residuo de aminoácido pequeño y neutro, como la alanina (González, 2010), así como poseer un perfil de alta hidrofobicidad (Gierasch, 1989).

La interleucina-1 β es el ejemplo de una proteína que se secreta a pesar de carecer de un péptido señal (Rubartelli *et al.*, 1990). Otros ejemplos son la proteína anticoagulante PP4 de humano (Grundmann *et al.*, 1988).

En *Plasmodium falciparum* (parásito que causa la malaria en el humano), también se han descrito algunas proteínas que no contienen péptido señal y aun así se secretan (Foley y Tilley, 1998; Náquira *et al.*, 2013).

En levaduras se han encontrado varias proteínas que se secretan por una vía no convencional, tal como la Acb1, que carece de un péptido señal y se secreta por medio de autofagosomas, los cuales son organelos rodeados por una doble membrana que contienen residuos citoplásmicos durante las fases iniciales de la autofagia (Kuchles *et al.*, 1989; Duran *et al.*, 2010; Alberts *et al.*, 2015).

Otro ejemplo de una proteína que se transporta al espacio extracelular por medio de una vía de secreción independiente de RE-Golgi es el Factor α , una feromona de levadura. Este factor es un péptido pequeño de 12 residuos de aminoácidos y su secreción es mediada

por Ste6. Ste6 es una proteína de la familia de los transportadores con dominio ABC (casete de unión a ATP), que en eucariontes están relacionados con la translocación de péptidos a través de la membrana del RE o del colesterol en la membrana plasmática (Zsebo *et al.*, 1986; Nombela *et al.*, 2006; Nickel y Rabouille, 2009).

No existe evidencia de que la exportación del lipopéptido factor α esté relacionada con la translocación directa de membrana de proteínas secretoras no convencionales. Por ejemplo, a diferencia del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), el factor α se secreta por un transportador ABC y, por lo tanto, depende de la hidrólisis de ATP. Además, los inhibidores generales de diversas clases de transportadores ABC no bloquean la secreción de FGF2. Finalmente, se cree que FGF2 se transporta en un estado plegado, que es un mecanismo que los transportadores ABC probablemente no admiten (Fig. 1) (Nombela *et al.*, 2006).

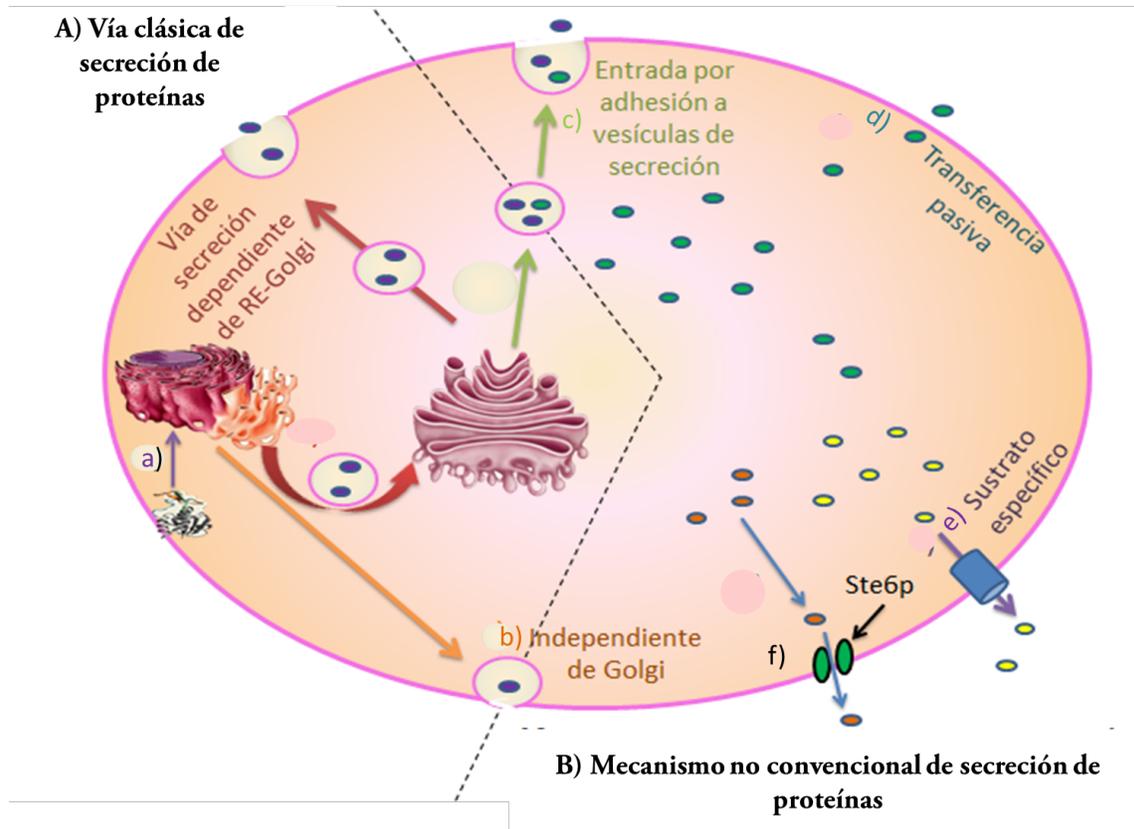


Figura 1. Mecanismos de secreción de proteínas en células eucariotas. Se muestran los posibles mecanismos de secreción de proteínas sin péptido señal, algunos basados en evidencias a partir de proteínas de levadura, mamíferos y sistemas de parásitos, que podrían operar en secreción alternativa. Para comparación, se muestra la vía clásica de secreción (A), dependiente del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi (RE-Golgi), en donde la proteína que se secreta contiene un péptido señal. Con respecto al mecanismo de secreción no convencional (B), se muestra el plegamiento citosólico de proteínas que posteriormente son dirigidas al RE para seguir la vía de secreción (a), la exportación de proteínas independientes de Golgi (b), la propiedad de algunas proteínas con afinidad a las vesículas de secreción que podrían conducir su adhesión a las mismas (c). Otros posibles mecanismos por los cuales las proteínas sin péptido señal podrían atravesar la membrana incluyen la transferencia pasiva (d) y la especificidad de la proteína a secretarse por un transportador específico (e y f). Los ejemplos en levadura incluyen la secreción del péptido de α -feromona (f) que es conducido específicamente por el transportador de casete de unión a ATP Ste6p. Modificado de Nombela *et al.*, 2006.

I.2. Tiorredoxinas, proteínas presentes en todos los organismos

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas cuya masa varía entre los 12 y los 15 kDa, son ubicuas, termoestables y se encuentran conservadas en procariontes y eucariotes (Holmgren, 1985). Las Trx están presentes en todos los organismos que catalizan intercambios tiol-disulfuro, ya que regulan el ambiente redox de la célula, controlando una

amplia variedad de procesos bioquímicos. Esta regulación depende, en la mayoría de los casos, de la capacidad de las Trx de reducir los puentes disulfuro de sus proteínas blanco (Miranda-Vizueté, 1994).

Las Trx poseen un sitio activo redox que contiene dos residuos de cisteína en la secuencia Trp-Cys-Gly-Pro-Cys y puede encontrarse de dos formas (Holmgren, 1985): (1) en su forma reducida o ditiólica: Trx-(SH)₂; o (2) en su forma oxidada: Trx-S₂. En el estado Trx-(SH)₂, la Trx es capaz de reducir los puentes disulfuro de sus proteínas blanco (Holmgren, 1985; Laloí *et al.*, 2001), influyendo así en su actividad, ya sea activándolas o inhibiéndolas. Por ejemplo, la primera tiorredoxina que se identificó y caracterizó es la donadora de electrones de la ribonucleótido reductasa de *E. coli*, activándola y siendo, por lo tanto, fundamental para la síntesis de desoxirribonucleótidos (Laurent *et al.*, 1964). Se han identificado tres tiorredoxinas en levaduras, la Trx1 y Trx2, que son proteínas citosólicas y la Trx3, que es mitocondrial (Pedrajas *et al.*, 1999).

Actualmente, se sabe que la diversidad de los procesos fisiológicos en que las Trx están involucradas depende de sus proteínas blanco y, por lo tanto, es muy amplia, sobre todo en células vegetales, donde se ha encontrado una gran variedad de tipos de Trx, lo cual contrasta con los demás organismos tanto procariontes como eucariontes (Laloí *et al.*, 2001; Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

1.2.1. Diversidad de tiorredoxinas en plantas

El sistema de las Trx es particularmente complejo en las plantas, ya que existen múltiples isoformas y genes que codifican cada una de éstas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado al menos 20 genes que codifican proteínas tipo Trx (Marchand *et*

al., 2004). Todos estos genes se encuentran en el genoma nuclear, independientemente de la localización subcelular de la proteína (Miranda-Vizueté, 1994; Meyer *et al.*, 2005).

Las Trx vegetales se dividen en 8 grupos con base en su secuencia; *f*, *m*, *x*, *y*, *z*, *o*, *s* y *h*. Las de tipo *f* y *m* desempeñan una importante función en la regulación de la fotosíntesis reduciendo a la fructuosa-1,6 bifosfatasa (FBPasa) y a la malato deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-MDH), respectivamente (Kagawa *et al.*, 1977; Jacquot *et al.*, 1978; Buchanan y Luan, 2005). La del tipo *x* está implicada en la respuesta al estrés oxidante en cloroplastos (Mestres-Ortega y Meyer 1999; Collin *et al.*, 2007; Simková *et al.*, 2012); el tipo *y* y el tipo *z* se expresan en etapas tempranas del desarrollo de la hoja, siendo importantes para el desarrollo del cloroplasto (Wimmelbacher y Bornke, 2014; Arzova *et al.*, 2010). Todos estos tipos de Trx (*f*, *m*, *x*, *y*, y *z*) se localizan en los cloroplastos. Adicionalmente, se encuentra el tipo *o*, el cual pertenece al sistema Trx mitocondrial (Laloi *et al.*, 2001); la del tipo *s* se ha observado que cumple una función en algunas interacciones simbióticas específicas de leguminosas y está asociada al RE (Alkhalfioui *et al.*, 2008); y por último, las del tipo *h* (Trx *h*), que forman el grupo más abundante de las Trx y se han encontrado en citoplasma, mitocondrias y en el apoplasto (Gelhaye *et al.*, 2004; Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

I.2.2. Tiorredoxinas de tipo *h*

Las Trx *h* forman el grupo más abundante de los 8 tipos de Trx identificados y descritos hasta ahora en plantas. Este grupo se divide a su vez, de acuerdo a sus estructuras primarias, en tres subgrupos. Las del subgrupo 2 se caracterizan por contener una extensión en el extremo amino (Gelhaye *et al.*, 2004), la cual se ha demostrado en tres Trx que está relacionada con su localización celular. En el caso de la PtTrxh2, una proteína de *Populus*

tremula, se demostró que sirve para su transporte hacia la mitocondria (Gelhaye *et al.*, 2004). El otro ejemplo es el de la RPP13-1 de *Oryza sativa*, en la cual se demostró que dicha extensión está relacionada con el tránsito intercelular a través de los plasmodesmos (Ishiwatari *et al.*, 1999). Finalmente, se encuentra la NaTrxh, que es una Trx h de *Nicotiana glauca* y se encontró que se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

II. Antecedentes

II.1. NaTrxh, una tiorredoxina tipo *h* de localización extracelular

La NaTrxh es una Trx identificada en *N. alata* que se encuentra dentro del subgrupo 2 de las Trx h. La NaTrxh contiene una extensión hacia el amino terminal y otra hacia el extremo carboxilo, se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión de los estilos de *N. alata* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), por lo que se sugiere que está involucrada en procesos de reconocimiento y rechazo del polen en el sistema de autoincompatibilidad gametofítica (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011).

Por medio de ensayos de expresión transitoria de la proteína recombinante de fusión NaTrxh: proteína verde fluorescente (GFP) en hojas de *Nicotiana benthamiana* y de *A. thaliana*, se demostró que la secuencia de la NaTrxh tiene la información suficiente para dirigir su secreción (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Generando cuatro mutantes con diferentes deleciones hacia su extremo amino y carboxilo (*NaTrxh* Δ *N* α , que no contiene los residuos Met-1 a Ala-16, motivo *N* α ; *NaTrxh* Δ *N* β , que no contiene los residuos Ala-17 a Pro-27, los cuales forman lo que se denomina motivo *N* β ; *NaTrxh* Δ *N* α β , que no contiene la extensión del extremo amino; y *NaTrxh* Δ *COO*, que no contiene el extremo carboxilo, eliminando desde la posición E-136), fusionadas a GFP y expresándolas de manera transitoria en células de epidermis de cebolla, se demostró que es el motivo *N* β el responsable de la localización extracelular de la NaTrxh (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Además, fusionando el motivo *N* β a GFP, se encontró que esta se secreta en las células de epidermis de cebolla, lo que sugiere que de alguna manera el motivo *N* β es reconocido para secretar a la proteína que lo contenga (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014) (Fig. 2).

Con respecto al extremo carboxilo (a partir de la posición E-136), se propone que es necesario para la interacción de la NaTrxh con la que hasta ahora se ha identificado como su proteína blanco, la S-RNasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), enzima responsable del rechazo del polen en los estilos de *N. alata* (McClure *et al.*, 1989). De manera interesante, se comprobó que hay un aumento considerable en su actividad de ribonucleasa después de ser reducida por la NaTrxh, a diferencia de lo que ocurre con una reducción por ditioneitol (DTT), que la inhibe (Torres, 2016).

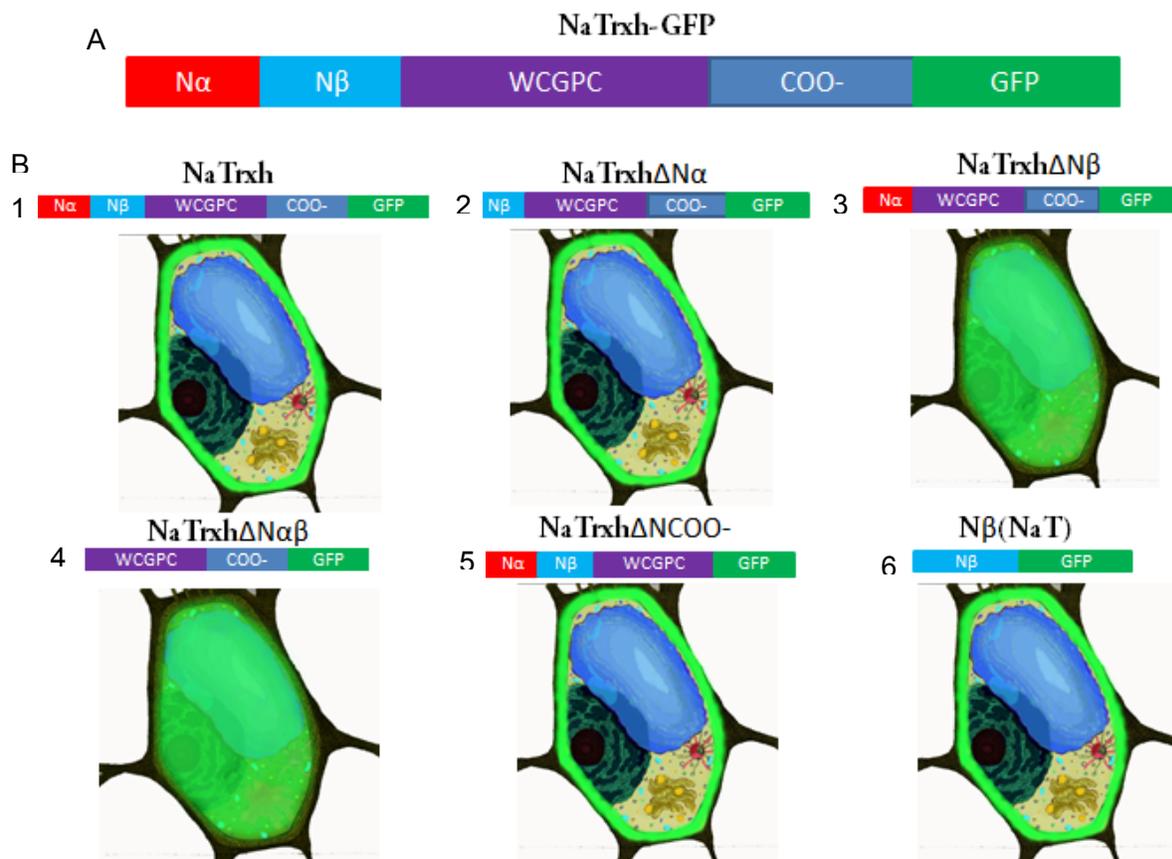


Figura 2. Esquema de los resultados de los ensayos de expresión transitoria de la NaTrxh y sus diversas mutantes en células de cebolla (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). A. Esquema de la secuencia de la NaTrxh fusionada a GFP. En rojo se esquematiza el motivo N α ; en azul claro el motivo N β ; en morado el cuerpo de la Trx representadola con su sitio activo WCGPC; en azul fuerte el extremo carboxilo (COO $^-$); y en verde la proteína GFP. B. Esquemas de la localización celular de las proteínas de fusión NaTrxh:GFP, NaTrxh Δ N α :GFP, NaTrxh Δ N β :GFP, NaTrxh Δ N $\alpha\beta$:GFP, NaTrxh Δ NCOO $^-$:GFP, N β (NaT):GFP. 1) NaTrxh completa, localizada en la pared celular (Color verde) 2) NaTrxh Δ N α , localizada en pared celular. 3) NaTrxh Δ N β , localizada en citosol. 4) NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, localizada en el citosol, 5) NaTrxh Δ NCOO $^-$, localizada en la pared celular. 6) N β (NaT), localizada en pared celular.

Al analizar la secuencia de la NaTrxh por medio del algoritmo Secretome 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/>) (Bendtsen *et al.*, 2004; Juárez-Díaz *et al.*, 2006), se obtuvo que podría tratarse de una proteína que se secreta por una vía no convencional (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), ya que el algoritmo la compara con la Trx-1 de humano, misma que se ha encontrado en el torrente sanguíneo a pesar de carecer de un péptido señal (Perez *et al.*, 2013). Sin embargo, se encontró que la NaTrxh sí pasa por el RE, que usa al aparato de Golgi para su secreción y se localiza relacionada a cuerpos membranosos que sugieren ser vesículas de secreción, por lo que todo indica que al menos sí utiliza los elementos de la vía clásica de secreción (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Al ser el motivo N β el responsable de la secreción de la NaTrxh y de la GFP cuando lo contiene en su extremo amino (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), se realizó una búsqueda por similitud de dominios y se observa cierta similitud con los motivos que se encuentran en el N-terminal de las tiorredoxinas Trxh1 y Trxh2 de soya (Fig. 3), las cuales están asociadas a membranas (Shi y Bhattacharyya, 1996; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), sugiriendo que este motivo solo se encuentra en una cantidad muy limitada de proteínas, sugiriendo que sea exclusivo de células vegetales.

```

Gmax [TRX2]      MGGILSGLLGS---DAAAASSPESSTSRVSSFHSSPRWQLYFNEIKDCLKLVVIDFSAS
Gmax [TRX1]      MGAILSALTGG---AATAATSSPESASRVQSFHSSARWQLHFNELKETNKLVIDFSAS
Nala [DQ021448]  MGSYLSSLLGGGAEEAEAEESGSSSEPSRVIAFHSSNRWQLHFNSSKQLNKLIVVDFEAT
                **  **.* *  * : * *...*.*** :**** ***:** * : **:***:***:
                *

Gmax [TRX2]      WCGPCKFIEPAIHAMADKFNVDVFKIDVDELDPVAQEFQVQAMPFVFLWKKGKEVDKVV
Gmax [TRX1]      WCGPCKFIEPAIHAMSEKFTDVFVFKIDVDELDPVAKEFNVQAMPFVFLCKGKEVDKVV
Nala [DQ021448]  WCGPCKMMEPVINAMSAKYTDVDFVKIDVDELSDVAQEFQVQAMPFVFLLLKQKEVERVV
                *****:*.*:** * :*.*****.***:** * :*****:* * :*****:***
                *

Gmax [TRX2]      GAKKDELEKKIEKHS-----
Gmax [TRX1]      GAKKDELEKKIEKHSQS-----
Nala [DQ021448]  GAKKDELEKKILKHREAPKFAASNYRTKPHVQ
                ***** **

```

Figura 3. Análisis por alineamiento de los motivos N β , y los motivos que se presentan en Trxh1 y Trxh2. Tomado del material suplementario de Ávila-Castañeda *et al.* (2014).

En el presente trabajo se propone probar si con otro sistema eucarionte, como lo es *Saccharomyces cerevisiae*, al sobreexpresar a la NaTrxh, así como a las diferentes mutantes de su extremo amino (sin el motivo N α , sin el N β y sin ambos), se puede generar una herramienta genética que permita el estudio de la vía de secreción de esta proteína. De igual manera, será posible contar con una buena evidencia celular que indique la posibilidad de que la función del motivo N β (o péptidos de naturaleza similar) sea propia de células vegetales o si también es reconocida por otros sistemas eucariontes que, como *S. cerevisiae*, se sabe presenta vías no convencionales de secreción.

II.2. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes

S. cerevisiae es uno de los modelos biológicos eucariontes más usados y estudiados en la ciencia. El análisis de esta levadura ha contribuido de manera muy importante a dilucidar los procesos básicos de la fisiología celular, principalmente de los eucariontes. Cabe mencionar que dos productos obtenidos por tecnología del DNA recombinante, la primera vacuna generada contra la hepatitis B, aprobada posteriormente para su aplicación en humanos (Valenzuela *et al.*, 1982), y el primer producto para uso alimenticio, la renina, fueron producidos en levadura (Mellor *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1992).

S. cerevisiae es un organismo unicelular con un ciclo de vida ideal para su uso en diversos estudios científicos. Algunas de sus grandes ventajas son la obtención de grandes cantidades celulares en cultivo, debido a su fácil crecimiento y su estabilidad genética; además, cuenta con un ciclo de vida con una fase asexual y una fase sexual.

El primer genoma eucarionte completamente secuenciado fue el de *S. cerevisiae*, el cual consta de 16 cromosomas en una célula haploide variando en un tamaño de 200 a 2200 kb, en los cuales se encontraron 6,275 potenciales marcos de lectura abiertos (ORF), de los cuales se predijo que solo 5,885 podrían codificar proteínas. Es un genoma compacto, dado que el 72% de la secuencia es codificante. El tamaño promedio de los genes de levadura es de 1.45 kb, o 483 codones, y solamente el 3.8% de los ORF contienen intrones (Goffeau *et al.*, 1996).

Aun cuando la bacteria *Escherichia coli* constituye un magnífico sistema para la expresión de genes heterólogos, la levadura también ha tenido un papel importante en el desarrollo de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

S. cerevisiae se ha utilizado como modelo biológico para la expresión de diversas proteínas heterólogas. Por mencionar algunos ejemplos, se encuentra un péptido quimérico de múltiples epítopes de *Mycobacterium tuberculosis*, denominado péptido B2, siendo de gran importancia clínica, ya que la obtención de estos péptidos por la vía recombinante tiene aplicaciones en el desarrollo de futuros candidatos para la producción de vacunas, así como en el desarrollo de sistemas de diagnóstico serológicos (García *et al.*, 2007). Algunos ejemplos de proteínas de plantas expresadas en *S. cerevisiae* son la Δ -12 desaturasa de ácidos grasos (FAD2) de *A. thaliana*, donde se utilizó el promotor inducible *GAL1* del gen de la galactocinasa 1 (Kajiwara *et al.*, 1996); la sintetasa de flavonoides I y II (FSI y FSII, respectivamente); y metabolitos secundarios de plantas (Leonard *et al.*, 2005).

Algunas de las características que hacen a *S. cerevisiae* un buen sistema para la expresión de proteínas recombinantes son: (a) las levaduras carecen de endotoxinas; (b) en algunos casos, los productos en la levadura pueden tener mayor actividad biológica que los

que se expresan en *E. coli*, principalmente porque la levadura es capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales, tales como la miristoilación, la acetilación de extremos amino y el procesamiento proteolítico, indispensables para que el producto posea actividad biológica; y (d) las proteínas heterólogas secretadas por cepas especialmente diseñadas, son fácilmente recuperadas del medio de cultivo (González y Valenzuela, 2002).

Adicionalmente, en *S. cerevisiae* se ha logrado un gran avance en el estudio de rutas no convencionales de secreción de proteínas (Nombela *et al.*, 2016), por lo que lo hace un modelo muy atractivo para el análisis de la vía de secreción de la NaTrxh, la cual es un proteína de secreción en plantas (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

III. Hipótesis

El motivo N β es el responsable de la secreción de la NaTrxh en células vegetales, de tal manera que es posible que funcione de manera específica como “péptido señal” en otro sistema heterólogo eucarionte como lo es *S. cerevisiae*.

IV. Objetivos

IV.1. General

Expresar a la proteína NaTrxh silvestre y las diferentes formas mutantes (NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$) en células de *S. cerevisiae*.

IV.2. Particulares

- Clonar las secuencias *NaTrxh*, *NaTrxh Δ N α* , *NaTrxh Δ N β* y *NaTrxh Δ N $\alpha\beta$* en un vector de expresión inducible para *S. cerevisiae*.
- Inducir la expresión de las proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*.
- Inmunodetectar a las proteínas recombinantes correspondientes para proponer su posible localización intra o extracelular.

V. Materiales y métodos

V.1. Amplificación de la secuencia *NaTrxh* y las diferentes mutantes para su clonación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

Las secuencias que codifican a la proteína *NaTrxh* y las tres formas mutantes, *NaTrxh* Δ N α , *NaTrxh* Δ N β y *NaTrxh* Δ N $\alpha\beta$, clonadas en el vector binario pEarleyGateway103 (pEG103) fueron donadas por el Dr. Felipe Cruz García (Facultad de Química, UNAM), que se usaron para un trabajo previo, en el que se demostró que el motivo N β es el responsable de la secreción de la *NaTrxh* en células de epidermis de cebolla (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Estas construcciones se usaron como molde para amplificar cada una de las secuencias codificantes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar las secuencias que corresponden a la *NaTrxh*, la *NaTrxh* Δ N α y la *NaTrxh* Δ N $\alpha\beta$ se usó a la construcción pEG103:*NaTrxh* como molde, mientras que para la *NaTrxh* Δ N β se usó a la pEG103:*NaTrxh* Δ N β .

En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron para las diferentes reacciones de PCR y en la Figura 4 se muestra el sitio donde cada uno de estos se alinea dentro de la secuencia de la *NaTrxh*, de tal manera que para amplificar a la *NaTrxh* y a la *NaTrxh* Δ N β se usaron los oligonucleótidos NaT-F1 y NaT-R*; para la *NaTrxh* Δ N α , los oligonucleótidos NaT-F2 y NaT-R*; y para la *NaTrxh* Δ N $\alpha\beta$, los oligonucleótidos NaT-F3 y NaT-R*.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la *NaTrxh* y sus mutantes.

Los oligonucleótidos en sentido para las diferentes versiones de la *NaTrxh* (con la letra F en su nombre) contienen en el extremo 5' la secuencia CACC, la cual sirve para la clonación de los productos de amplificación en el vector de entrada pENTR/D-TOPO, e inmediatamente a ésta contienen el codón de inicio ATG. El antisentido (con la letra R*) elimina en los productos de amplificación el codón de término de la *NaTrxh*.

Nombre	Secuencia	Tamaño (nt)
NaT-F1	5' CACCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTGCTCGGTG 3'	34
NaT-F2	5' CACCATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCG 3'	31
NaT-F3	5' CACCATGTGCGGTGTGATTGCTTTTCATTC 3'	30
NaT-R*	5' TTGGACATGAAATTTAGTTCGATAATTACTAGCAGC 3'	36
M13-F(-20)	5'GTAAAACGACGGCCAG 3'	16
M13-R	5'CAGGAAACAGCTATGAC 3'	17

Los oligonucleótidos en sentido (con la letra F en su nombre) contienen la secuencia CACC en el extremo 5' (Tabla 1) con la finalidad de que los productos de la amplificación se clonen directa y correctamente orientados en el plásmido pENTR/D-TOPO (pENTR) (Invitrogen); todos contienen inmediatamente después de CACC el codón ATG para que inicie la traducción cuando se exprese cada uno de los genes a partir del vector destino (*i. e.* el de expresión pYES-DEST52; Invitrogen). El oligonucleótido NaT-R* corresponde al antisentido, por lo que se alinea en el extremo 3' de la *NaTrxh* (Fig. 4) eliminando el codón de término con la finalidad de que cuando se clone en el vector de expresión, sea posible agregar el epítipo V5 y una cola de 6 residuos de histidinas [His(6x)] en el extremo carboxilo de las proteínas recombinantes como más adelante se describirá.

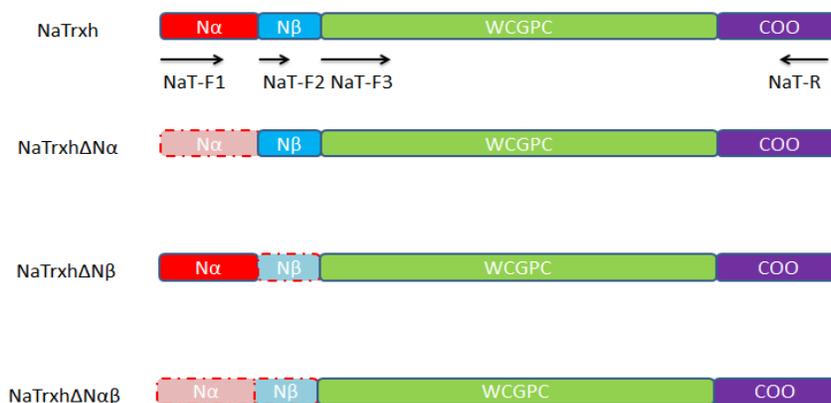


Figura 4. Esquema de la secuencia *NaTrxh* y las mutantes *NaTrxh Δ N α* , *NaTrxh Δ N β* y *NaTrxh Δ $\alpha\beta$* indicando la posición de alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos que se emplearon para su amplificación por PCR.

Para la reacción de PCR se utilizó la DNA polimerasa *Phusion Hot Start Flex (Pfu)* (New England BioLabs). Otra característica importante es que esta enzima está inhibida a temperatura ambiente y solo se activa con una incubación a 98 °C por 30 s previo a la reacción de PCR (desnaturalización inicial; Tabla 2). Además, con la *Pfu* se obtienen productos de amplificación con extremos romos, lo cual es fundamental para su clonación directa en el vector de entrada pENTR.

Para la PCR usando la *Pfu* se utilizó la siguiente mezcla de reacción, utilizando un volumen final de 25 μ L de reacción y las condiciones de la Tabla 2.

- a) 12.5 μ L de la solución amortiguadora con la enzima y la mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTP)
- b) 1.25 μ L de cada oligonucleótido 10 μ M
- c) 0.5 μ L de DNA molde (o agua en el caso del control negativo)

Tabla 2. Condiciones de la PCR utilizando a la *Phusion Hot Start Flex* (New England BioLabs). El paso de desnaturalización inicial además de asegurar la desnaturalización del DNA molde y completa linealización de los oligonucleótidos, sirve para la activación de la DNA polimerasa. Se utilizó el tiempo de extensión que sugiere el proveedor (30 s/kb de producto de amplificación).

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

V.2. Clonación de la NaTrxh y las diferentes mutantes en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

Cada uno de los productos de la amplificación por PCR utilizando la *Pfu* y las condiciones descritas en la Tabla 2, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% para después purificarlos a partir del mismo. La purificación del DNA a partir de gel se realizó siguiendo el protocolo que a continuación se describe (Qiagen).

- a) Cortar la banda del gel de agarosa que contenga el fragmento de DNA.
- b) Pesar el fragmento de agarosa en un tubo de 1.5 mL.
- c) Añadir 3 volúmenes del amortiguador QG (astringente con indicador de pH que se utiliza en los procesos de limpieza del DNA) por cada volumen de gel, considerando que 1 mg de gel equivale a 1 μ L de amortiguador.
- d) Incubar a 50°C por 10 min. Mezclar vigorosamente cada 2 o 3 min a lo largo de dicha incubación para ayudar a disolver completamente el gel.
- e) Una vez completamente disuelto el gel, añadir 1 μ L de isopropanol por cada 1 mg de gel y mezclar por inversión.

f) Colocar una columna MinElute (intercambio iónico) en un tubo de colecta de 2 mL.

g) Añadir la solución del paso e en la columna y centrifugar por 1 min a 12,000 rpm. Descartar el fluido del tubo de colecta y volver a colocar la columna en el tubo colector.

h) Añadir 500 μ L de amortiguador QG a la columna y centrifugar por 1 min a 12,000 rpm. Desechar el fluido del tubo de colecta y volver a colocar la columna en el mismo tubo.

i) Lavar la columna añadiéndole 750 μ L de amortiguador PE y centrifugar por 1 min a 12,000 rpm. Descartar el fluido del tubo de colecta y volver a colocar la columna en el mismo.

j) Centrifugar la columna por 1 min adicional para remover por completo los residuos del amortiguador PE, sobre todo el etanol.

k) Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 mL y eluir el DNA agregando 10 μ L de agua estéril desionizada en el centro de la membrana de la columna e incubando por 1 min a temperatura ambiente; finalmente, se centrifuga a 12,000 rpm por 1 min.

l) La solución (eluato) se puede guardar a -20°C hasta su uso.

Para introducir el inserto (*i. e.* los productos de amplificación purificados de gel), al vector de entrada pENTR, se siguió el protocolo del proveedor (Invitrogen) con algunas modificaciones, quedando en un volumen final de 3.0 μ L la siguiente reacción:

- a) 0.5 μ L de solución salina (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl_2)
- b) 0.5 μ L de solución del pENTR/D-TOPO

- c) 1.0 μ L producto de amplificación purificado de gel

La mezcla de reacción se incubó a 22 °C por al menos 12 h, misma que se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 (preparadas como se describe en el Apéndice) por choque térmico, siguiendo la metodología que a continuación se describe.

- a) Agregar los 3.0 μ L de la mezcla de reacción de inserción al vector pENTR a una alícuota de células quimiocompetentes y mezclar cuidadosamente con la punta de la pipeta.
- b) Incubar en hielo por 30 min.
- c) Incubar a 42 °C por 40 s y pasar a hielo inmediatamente, donde se incuban por 5 min.
- d) Agregar 500 μ L de medio Luria-Bertani (LB) con glucosa 20 mM e incubar a 37 °C con agitación por 1 h.
- e) Centrifugar a 15,000 rpm por 30 s a temperatura ambiente y decantar.
- f) Resuspender el botón celular con el medio residual.
- g) Seleccionar las células transformantes creciéndolas en medio LB-agar con kanamicina (50 μ g/mL) a 37 °C por 12 – 16 h.

V.3. Reacción de amplificación por PCR directamente de colonias bacterianas

Con la finalidad de corroborar que las secuencias de la NaTrxh silvestre y mutantes efectivamente se clonaron en el vector de entrada, se hizo un ensayo de PCR directo de bacterias, para lo cual se seleccionaron 15 colonias resistentes a kanamicina de cada transformación. Se sembraron en medio LB líquido con kanamicina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C por 12 – 16 h con agitación constante.

Para los ensayos de amplificación por PCR directo de colonia se utilizó la DNA polimerasa *TEMPase Hot Start* (Ampliqon), la cual es una *Taq* DNA polimerasa modificada que se activa por calor (desnaturalización inicial; Tabla 3). Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 3 y la mezcla de reacción fue la siguiente (volumen final: 10 μ L):

- a) 5 μ L de la solución amortiguadora con la enzima y la mezcla de los cuatro dNTP
- b) 0.5 μ L de cada oligonucleótido 10 μ M (el NaT-F3 se usó como universal para todas las versiones de la NaTrxh en un ensayo inicial)
- c) 0.5 μ L de medio LB con bacterias (DNA plasmídico en el caso del control positivo; agua en el caso del negativo)

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizando a la *TEMPase Hot Start* (Ampliqon). El paso de desnaturalización inicial también sirve para la activación de la DNA polimerasa. Se utilizó el tiempo de extensión que sugiere el proveedor (1 min/kb).

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	15 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Alineamiento	60 °C	30 s	30
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión final	72 °C	5 min	1

De las clonas que dieron un resultado positivo, es decir, de aquellas que se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado, se escogieron tres de cada una, las cuales se crecieron en medio LB líquido selectivo (LB + kanamicina 100 μ g/mL) y se guardaron en LB con glicerol al 30% (v/v) a -70 °C.

Finalmente, se realizó una reacción de PCR con los tres pares de oligonucleótidos (NaT-F1 y NaT-R*, NaT-F2 y NaT-R*, NaT-F3 y NaT-R*), y la enzima *TEMPase Hot Start* (Ampliqon) (Tabla 3), utilizando el plásmido recombinante purificado de una de las tres clonas seleccionadas de la NaTrxh y las mutantes como molde.

En el caso de la NaTrxh Δ N α fue necesario corroborar también la dirección en la cual se clonó el inserto, es decir su orientación dentro del vector pENTR.

El vector pENTR/D-TOPO tiene características que permiten identificar la orientación en la cual se insertaron las secuencias de interés, como lo son las secuencias M13, las cuales flanquean el sitio de inserción, permitiendo ratificar por PCR que el inserto se encuentra en la orientación deseada (Fig. 5).

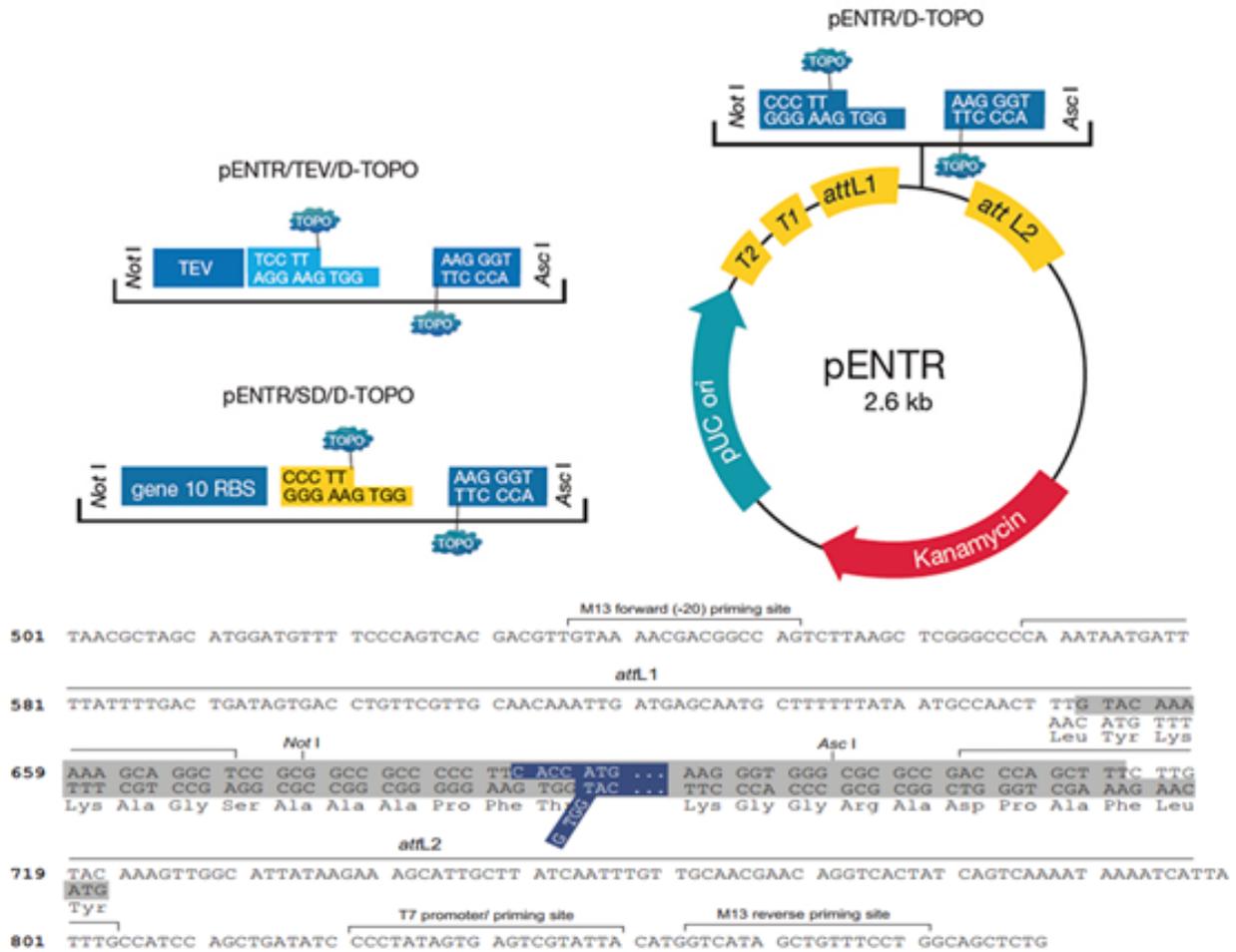


Figura 5. Mapa del vector de clonación pENTR/D-TOPO. En el mapa se muestra lo sitios *attL1* y *attL2* para realizar una recombinación sitio-específicos de un gen destinado a un vector que cuente con el sistema Gateway, un gen *T7* que es un potenciador de la traducción del producto de PCR en procariontes, los sitios de clonación TOPO®, los cuales garantizan una clonación direccional rápida y eficiente de los productos de PCR de extremos romos, la señal de término de la transcripción *rrnB*, el gen de resistencia a kanamicina en *E. coli* y el origen de replicación bacteriana *pUC*, además de los sitios M13, que permiten verificar la correcta orientación del inserto.

Para verificar la correcta orientación del inserto *NaTrxhΔNα* en pENTR, se realizó una PCR con las otras dos colonias de bacterias resistentes a kanamicina. Se cultivaron en medio LB líquido con kanamicina (100 µg/mL) a 37°C por 12 – 16 h. Para la reacción de amplificación se utilizó la enzima *TEMPase Hot Start* (Ampliqon). Se utilizaron las condiciones de PCR de la Tabla 3 cambiando la temperatura de alineamiento por 50°C, ya que la *Tm* de los oligonucleótidos M13 es más baja a los usados anteriormente, y un volumen final de

reacción de 10 µL. La diferencia es que en este caso se utilizaron los oligonucleótidos M13-F(-20) y M13-R (Tabla 1) o en combinación con el NaT-R* y NaT-F2, respectivamente (Tabla 1).

V.4. Purificación de DNA plasmídico

Para purificar el DNA plasmídico, se crecieron las bacterias transformantes en medio selectivo. En el caso de las bacterias transformadas con el vector pENTR/D-TOPO se usó kanamicina (100 µg/mL) como agente de selección y ampicilina (100 µg/mL) para las que se transformaron con el plásmido pYES-DEST52. El protocolo de purificación fue el siguiente (QIAprep® Spin Miniprep kit; QIAGEN).

- a) Crecer una colonia en 5 mL de medio selectivo a 37 °C de 12 - 16 h con agitación constante.
- b) Colectar las células por centrifugación a 15,000 rpm por 30 s a temperatura ambiente.
- c) Resuspender el botón celular en 250 µL de amortiguador P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg/mL RNasa A)
- d) Añadir 250 µL de la solución de lisis – P2 (NaOH 200mM y 1% de SDS), mezclar por inversión de 4 a 6 veces e incubar por no más de 5 min.
- e) Añadir 350 µL de la solución de neutralización – N3 (4.2 M Guanidina-HCl, 0.9 M acetato de potasio, pH 4.8) y mezclar inmediata y cuidadosamente por inversión 4 a 6 veces.
- f) Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm.
- g) Tomar el sobrenadante y transferirlo a una columna QIAprep 2.0 spin. Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm y desechar el fluido de la columna.

- h) Lavar el DNA añadiendo 500 μ L de amortiguador PB (5 M Guanidina-HCl, 30% isopropanol) a la columna. Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm
- i) Realizar un segundo lavado del DNA añadiendo a la columna 750 μ L de amortiguador PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% etanol). Centrifugar 1 min y desechar el fluido.
- j) Centrifugar por 1 min adicional para remover el etanol residual, el cual forma parte del amortiguador.
- k) Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL. Eluir el DNA agregando 50 μ L de agua estéril desionizada, incubar por 1 min a temperatura ambiente y, finalmente, centrifugar por 1 min.
- l) Guardar hasta su uso a -20°

V.5 Verificación de que las secuencias de la NaTrxh (NaTrxh, NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$) en el vector de entrada no presentaron mutaciones

Se analizó la secuencia de cada una de las versiones de la NaTrxh clonadas en el vector de entrada (pENTR) para verificar que no presentaran mutaciones y que correspondieran a la versión correspondiente. Para esto se mandaron a secuenciar en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las secuencias obtenidas se analizaron por medio de un alineamiento con la secuencia reportada de la NaTrxh en el banco de datos NCBI (número de acceso DQ021448.1) (Fig. 6) usando el programa ClustalW (www.genome.jp/tools-bin/clustalw).

```

1   CCACGCGTCCGGGAAAATCGAATTCACAATAGGAGCTGCGCGTAATATAAAAAGCAGTGCTTTTATT
67  ACCGTCTCAGTAGTTTCTTCCCTATTTTGACTACTTTGTGCGTAAGGAGAGAGAGAGAGTGAAGAA
    M G S Y L S S L L G G G A A E A A E A E S           21
133  TCCAATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAATC
    G S S S E P S R V I A F H S S N R W Q L H F           43
199  AGGATCGTTCGTCAGAACCGTTCGGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTT
    N S S K Q L N K L I V V D F A A T W C G P C           65
265  CAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC GGCTACATGGTGTGGGCCCTG
    K M M E P V I N A M S A K Y T D V D F V K I           87
331  CAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACCGACGTTGACTTCGTCAAAAT
    D V D E L S D V A Q E F G V Q A M P T F L L           109
397  CGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGGCT
    L K Q G K E V E R V V G A K K D E L E K K I           131
463  GCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGAT
    L K H R E A P K F A A S N Y R T K F H V Q Stop       152
529  TCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATA
595  AATTAACAGAAAAAGAAAGCATCATTTTTACTTTACTACCGGATTGGGATGAACCGAATATTGTTG
661  AATTGCTTTGGGGGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 6. Secuencia reportada del cDNA de la NaTrxh en la base de datos NCBI (número de acceso DQ021448.1) y la secuencia de los aminoácidos deducida a partir de esta. En rojo se muestra la secuencia que corresponde al motivo N α , en azul al motivo N β y en verde al sitio activo de la NaTrxh.

V.6. Clonación de las secuencias *NaTrxh*, *NaTrxh* Δ N α , *NaTrxh* Δ N β y *NaTrxh* Δ N α β en el vector destino pYES-DEST52

Ambos vectores, el de entrada (pENTR) y el destino (pYES/DEST-52) cuentan con la tecnología Gateway®, la cual es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades de recombinación sitio-específicas del bacteriófago lambda (Landy, 1989) para proporcionar una forma rápida y altamente eficiente de transferir el gen de interés de forma correcta del vector de entrada al vector destino. Con la finalidad de evitar falsos positivos, los vectores destino contienen entre los sitios de recombinación *attR1* y *attR2* un gen suicida (*ccdB*), de tal manera que en caso de que no se lleve a cabo la recombinación, las bacterias transformantes con el plásmido “vacío” mueren.

Otra ventaja del plásmido pYES-DEST52 es que proporciona la posibilidad de fusionar la secuencia que codifica el epítipo V5 y una cola 6X(His) hacia el extremo 3' del gen de

interés, lo cual ayuda a reconocer a la proteína recombinante con anticuerpos específicos para estas regiones/secuencias (Fig. 7).

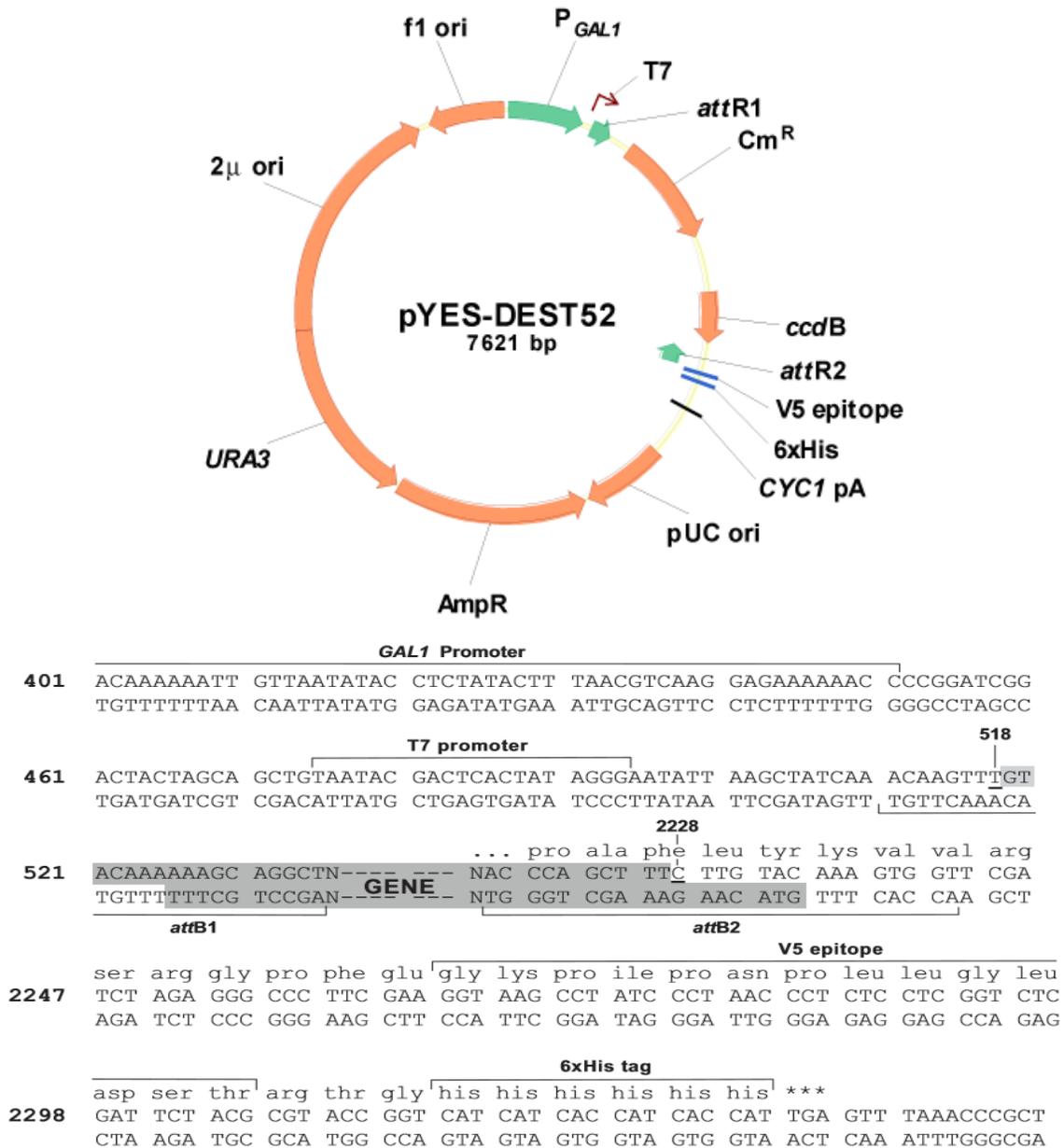


Figura 7. Mapa del vector de expresión en levadura pYES/DEST-50 (Invitrogen). Se muestra el promotor inducible por galactosa *pGAL1*, el cual dirige la transcripción del gen de interés, dos sitios de recombinación, *attR1* y *attR2*, río abajo del promotor *pGAL1*, para clonar por recombinación el gen de interés a partir de un vector de entrada, el gen de resistencia a cloranfenicol que se encuentra entre los sitios de recombinación *attR*, el gen *ccdB* para selección negativa, el V5 epítipo y la región de polihistidinas (6x) para inmudetección, la señal de término de la transcripción *CYC1*, el origen de replicación bacteriano *pUC*, el origen de replicación eucarionte (2μ), el gen de resistencia a ampicilina de las bases, y el gen *URA3*, que sirve como marcador de selección para las levaduras transformantes.

Para insertar las secuencias correspondientes a cada una de las versiones de la NaTrxh en el vector destino pYES-DEST52, se realizó una reacción de recombinación tipo *LR*, para lo cual se usó la mezcla de enzimas *LR clonasa* (Invitrogen). La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera en un tubo de 1.5 mL.

- a) 2 μ L de la construcción generada en el vector de entrada (pENTR:NaTrxh, pENTR:NaTrxh Δ N α , pENTR:NaTrxh Δ N β o pENTR:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$)
- b) 1 μ L de vector destino (pYES-DEST52)
- c) 2 μ L de amortiguador de reacción 5x *LR clonasa*
- d) 2 μ L de *LR clonasa*
- e) Aforar a 10 μ L con amortiguador TE (Anexo 1)

La reacción se incubó a 25 °C por 1.5 h. Después, se agregó 1 μ L de proteinasa K (mezclando suavemente) y se incubó a 37°C por 10 min. Finalmente, se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* TOP 10 agregando 3 μ L de la reacción de recombinación, siguiendo el protocolo del Anexo 2.

Se seleccionaron 15 colonias de cada transformación creciéndolas en medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) durante 12 – 16 h a 37 °C y se realizó una reacción de PCR directo de las células bacterianas. Las clonas que dieron un resultado positivo, es decir, a partir de las cuales se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado, se cultivaron para almacenar a -70 °C en LB-glicerol (30% v/v), así como para la purificación del plásmido.

El DNA plasmídico purificado se usó para las reacciones de PCR con la enzima *TEMPase Hot Start* (Ampliqon) bajo las condiciones antes descritas (Tabla 3) y se utilizó, posteriormente, para transformar las células de *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen).

V.7. Transformación de células de *S. cerevisiae* INVSc1

Las células de *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen) se transformaron por choque térmico, para lo cual se usó acetato de litio y polietilenglicol (PEG) para estimular la captura del DNA plasmídico a una temperatura de 42°C por 15 min.

Para transformar a las levaduras fue necesario realizar el siguiente protocolo.

1. Crecer una colonia de *S. cerevisiae* INVSc1 en 5 mL de YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 2%) a 30 °C por 12 – 16 h con agitación constante (preinóculo).
2. Inocular con 1 mL del preinóculo 30 mL de YPD fresco e incubar con agitación constante hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5 – 0.6.
3. Centrifugar en tubos estériles de 50 mL todo el cultivo durante 5 min a 2500 rpm y decantar.
4. Resuspender el botón celular con un volumen de agua estéril fría (4 °C) para lavar las células y centrifugar a 2,500 rpm por 5 min.
5. Repetir dos veces los pasos 3 y 4.
6. Resuspender el botón en 1 mL de agua estéril fría (4 °C) y transferir a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
7. Centrifugar 5 s a máxima velocidad y decantar.
8. Resuspender el botón en 1 mL de solución TE/acetato de litio que se prepara a partir de una solución madre TE 10X y acetato de litio 10X.
9. Centrifugar por 5 s a máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 300 μ L de TE/acetato de litio.

10. Etiquetar cuatro tubos de 1.5 mL estériles, a los cuales se les agrega 50 μ L de células y 50 μ g de DNA de espermatozoos de salmón sonicado y hervido.

11. Agregar el plásmido que contiene el gen de interés al tubo correspondiente y añadir 300 μ L de polietilenglicol al 40%/acetato de litio/TE (recién preparado). Mezclar vigorosamente e incubar a 30°C por 30 min.

12. Agregar 40 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) y aplicar el choque térmico incubando a 42°C por 15 min.

13. Incubar durante 1 min en hielo y centrifugar a máxima velocidad por 5 s. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 μ L de agua estéril.

Sembrar las células en placas con medio mínimo SC sin uracilo [SC (U-)], ya que el vector (Fig. 7) contiene el gen necesario para cubrir la auxotrofia de uracilo (*URA3*), misma que posee la cepa INVSc1.

V.8. Sobreexpresión de la NaTrxh y las mutantes NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$

Una vez clonadas las secuencias de las diferentes versiones de la NaTrxh en el vector pYES/DEST-52 en las células de *S. cerevisiae* INVSc1, se indujo la expresión de cada una de las proteínas recombinantes. Los genes de interés quedan bajo el control del promotor *GAL1* (Fig. 7), el cual se induce con galactosa en ausencia de glucosa.

Para la inducción se siguió el protocolo que a continuación se describe.

1. Crecer un preinóculo de 20 mL en SC (U-), el cual contiene glucosa al 2% como fuente de carbono, durante 16 h a 30°C en agitación constante.

2. Medir la DO_{600} del preinóculo para preparar 50 mL de medio de inducción [SC (U-) con galactosa al 2% y rafinosa al 1% en lugar de glucosa] a una DO_{600} de 0.4.

a. El volumen de preinóculo calculado se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 min, se decanta y se resuspende en 1 mL de medio de inducción.

b. Se vuelve a centrifugar durante 5 min a 3,000 rpm, para evitar que queden residuos de glucosa, ya que esta puede inhibir al promotor *GAL1*.

c. Inocular el medio y determinar la DO_{600} . Tomar una alícuota de 10 mL (tiempo 0). Incubar a 30 °C con agitación constante.

3. Tomar alícuotas de 5 mL a las 4, 6, 8, 12 y 24 h de inducción y determinar la DO_{600} de cada una.

4. Las alícuotas se centrifugan 5 min a 15000 rpm a 4°C, a partir de las cuales se recuperan 3 mL de sobrenadante, por un lado, y el botón celular por otro.

a) Al sobrenadante, agregar 9 mL de acetona fría al 80% e incubar a -20°C para provocar la precipitación de las proteínas en el medio. Posteriormente, se centrifugan a 6,000 rpm por 5 min. Se decanta y se deja secar a temperatura ambiente.

b) El botón celular se resuspende en 500 µL de agua estéril, se centrifuga a máxima velocidad por 1 min y se repite el lavado al menos 2 veces. Se decanta y se puede almacenar a -20°C hasta por un

periodo de tres días o de forma inmediata se puede realizar la lisis celular.

V.9. Extracción de proteína total por ruptura celular de levadura

Los extractos de proteína total de levadura se obtuvieron principalmente por ruptura mecánica de las células con perlas de vidrio lavadas con ácido clorhídrico (HCl) de un tamaño de 0.4 – 0.6 μm (Sigma-Aldrich). Se realizaron tres tipos de extracciones variando el amortiguador de extracción de proteínas: (1) amortiguador 1: fosfato de sodio 500 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, glicerol al 5% y 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); (2) amortiguador 2: el amortiguador 1 con NaCl 0.3 M; y (3) amortiguador 3: amortiguador 2 con Tritón X-100 al 1% (v/v). Para los tres amortiguadores se siguió el protocolo que se describe a continuación.

1. El botón celular de cada alícuota se resuspende en 500 μL del amortiguador de extracción (el 1, el 2 o el 3). En caso de que el botón se haya almacenado a -20°C , solo se descongela en hielo y se centrifuga a 15,000 rpm por 5 min a 4°C .
2. Eliminar el sobrenadante y calcular la cantidad de amortiguador necesaria para que cada muestra tenga una DO_{600} 50-100.
 - a. Resuspender en dicha cantidad de amortiguador y agregar una cantidad de perlas de vidrio similar al tamaño del botón.
3. Agitar vigorosamente durante 30 s, seguidos de 30 s en hielo por alrededor de 4 min y repetir al menos 4 veces.

4. Centrifugar por 10 min a 15,000 rpm (4°C) y rescatar toda la fase acuosa en tubos limpios de 1.5 mL correctamente etiquetados, los cuales se pueden guardar a -20°C hasta su uso o procesarlos inmediatamente.

El otro protocolo de ruptura que se siguió consistió en:

1. Tomar 1.5 mL de precultivo (DO_{600}) y centrifugar a 14,000 rpm 1 min.
2. Resuspender el botón en 500 μ L de acetato de litio 2M e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
3. Centrifugar a 14,000 rpm por 1 min y desechar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón en 500 μ L de NaOH 400 mM e incubar en hielo por 5 min.
5. Centrifugar por 1 min a 14, 000 rpm y decantar.
6. Resuspender el botón en 100 μ L de amortiguador de carga SDS-PAGE 6X (más adelante se describe su preparación) e incubar a 95°C por 5 min.
7. Centrifugar a 14, 000 rpm por 1 min y recuperar el sobrenadante para analizar directamente por SDS-PAGE

V.10. Cuantificación de proteína total

La concentración de proteína en todos los experimentos se determinó utilizando la técnica de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para generar una curva de calibración.

Las muestras, en un volumen final de 30 μL , tanto de calibración (BSA) como de los extractos, se mezclaron con el reactivo de Bradford (BioRad) en un volumen final de 180 μL . Cada muestra se colocó en una microplaca para determinar la A_{595} usando el lector de placas EPOC.

V.11. Análisis de las proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y ensayos tipo Western-blot

Con el fin de separar las proteínas del extracto de proteína total de levadura y, posteriormente, inmunodetectar a la proteína recombinante, se hizo primero una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12.5% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (la preparación de los geles de poliacrilamida se describe en el Anexo 2). Previo al SDS-PAGE, las proteínas se solubilizaron en amortiguador de muestra [amortiguador 6X: Tris·HCl 0.28 M, pH 6.8, glicerol al 30% (v/v), SDS al 1% (p/v), DTT 0.5 M y azul de bromofenol al 0.0012 % (p/v)] y se desnaturizaron por incubación a 95 °C por 10 min. Después se atemperaron y se cargaron en el gel.

Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron las proteínas en el gel con azul brillante de Comassie. En el caso de que las proteínas se transfirieran a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF), al finalizar la electroforesis se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en amortiguador de transferencia (Anexo 1) con agitación suave por 10 min. Se hizo la electrotransferencia a la membrana (Western-blot) para posteriormente, hacer la inmunodetección de las proteínas recombinantes correspondientes.

Cuando se utilizó el sistema húmedo de transferencia, las condiciones fueron a 100 V por 1 h 20 min; mientras que cuando se usó el sistema semiseco fueron 10 V por gel por 15 min.

V.12. Inmunodetección de las diferentes proteínas recombinantes

El protocolo que se siguió para la inmunodetección de las proteínas recombinantes es el que se muestra a continuación.

- 1) Bloquear la membrana con solución de bloqueo [leche descremada al 5% y Tween-20 al 0.1% en amortiguador salino de fosfatos (PBS)] por un mínimo de 2 h (máximo 12-16 h) a temperatura ambiente.
- 2) Retirar la solución de bloqueo y agregar el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo e incubar por 2 – 3 h a temperatura ambiente o por 12-16 h a 10 °C. La dilución del anticuerpo primario fue de 1:5000 para el anti-NaTrxh y de 1:10,000 para el anti-His(6x).
- 3) Retirar la solución con el anticuerpo primario y lavar la membrana con PBS dos veces. El primer lavado de 5 min y el segundo de 10 min a temperatura ambiente.
- 4) Agregar el anticuerpo secundario (anti-conejo con fosfatasa alcalina conjugada) diluido en solución de bloqueo (1:10,000) e incubar al menos por 1 h a temperatura ambiente.
- 5) Retirar la solución del anticuerpo secundario y lavar 3 veces con PBS por 10 min cada lavado.

6) Lavar con una solución de Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5, NaCl 0.1 M y $MgCl_2$ 0.05 M por 10 min a temperatura ambiente.

7) Agregar los sustratos de la fosfatasa alcalina [18.75 mg/mL cloruro de azul de nitro tetrasolio (NBT), 9.4 mg/mL de sal de toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en 67% de DMSO) e incubar hasta que las bandas sean visibles.

VI. Resultados

VI.1. Clonación de las secuencias que corresponden a la NaTrxh, NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

Para clonar la secuencia de la NaTrxh así como de las mutantes NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ en el vector de entrada pENTR, se amplificó cada una de las secuencias usando los oligonucleótidos en sentido correspondientes para cada una y el mismo en antisentido para todas (Fig. 4 y Tabla 1).

Para las secuencias NaTrxh, NaTrxh Δ N α y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ se usó como molde la construcción pEG103:NaTrxh, mientras que para la NaTrxh Δ N β , se utilizó pEG103:NaTrxh Δ N β .

Los productos de amplificación tienen las siguientes características.

- a) Contienen la secuencia CACC en el extremo 5', la cual permite la inserción directa y orientada correctamente en el vector pENTR.
- b) Poseen extremos romos, los cuales son necesarios para la inserción en el plásmido pENTR. Esta es también una de las razones por lo que se usó una DNA polimerasa de alta fidelidad (Pfu) que tiene actividad de exonucleasa 3'-5', lo que disminuye la tasa de errores/mutaciones con respecto a la de la *Taq* DNA polimerasa.
- c) No contienen codón de término, de tal manera que cuando se clone en el vector de expresión, la proteína contenga en su extremo carboxilo el epítipo V5 y la cola 6X(His).

Posteriormente, se escogieron las colonias 1 y 2 de pENTR:NaTrxh, las 1 y 2 de pENTR:NaTrxh Δ N β y la 1 y la 2 de pENTR:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ y las colonias 1 y 5 para pENTR:NaTrxh Δ N α . El resultado del análisis por PCR que se hizo para demostrar que el inserto clonado corresponde a la secuencia esperada, se muestra en la Figura 8C. Para este fin se realizaron tres reacciones de PCR, usando tres pares diferentes de oligonucleótidos: (1) NaT-F1+NaT-R*, que daría un producto de amplificación de 459 pb en el caso de la NaTrxh y de 415 pb en el de la NaTrxh Δ N α ; (2) NaT-F2 +NaT-R*, donde se espera un producto de amplificación de 426 pb; (3) NaT-F3 + NaT-R*, obteniendo un producto de amplificación de 382 pb.

Se observó que la colonia 5 de la NaTrxh Δ N α amplificó con los oligonucleótidos NaTF1+NaT-R* (Fig. 8B), por lo que se descartó su uso, seleccionando así solo la colonia 1 de todas las construcciones para verificar que las secuencias estuvieran bien y realizar con ellas los pasos posteriores (Fig. 8D). Este resultado indicó que se tienen clonadas a la NaTrxh y las tres mutantes (NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$) en el vector de entrada pENTR, teniendo como resultado las construcciones moleculares denominadas pENTR:NaTrxh, pENTR:NaTrxh Δ N α pENTR:NaTrxh Δ N β y pENTR:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, respectivamente (Fig. 8D).

Se mandaron a secuenciar en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

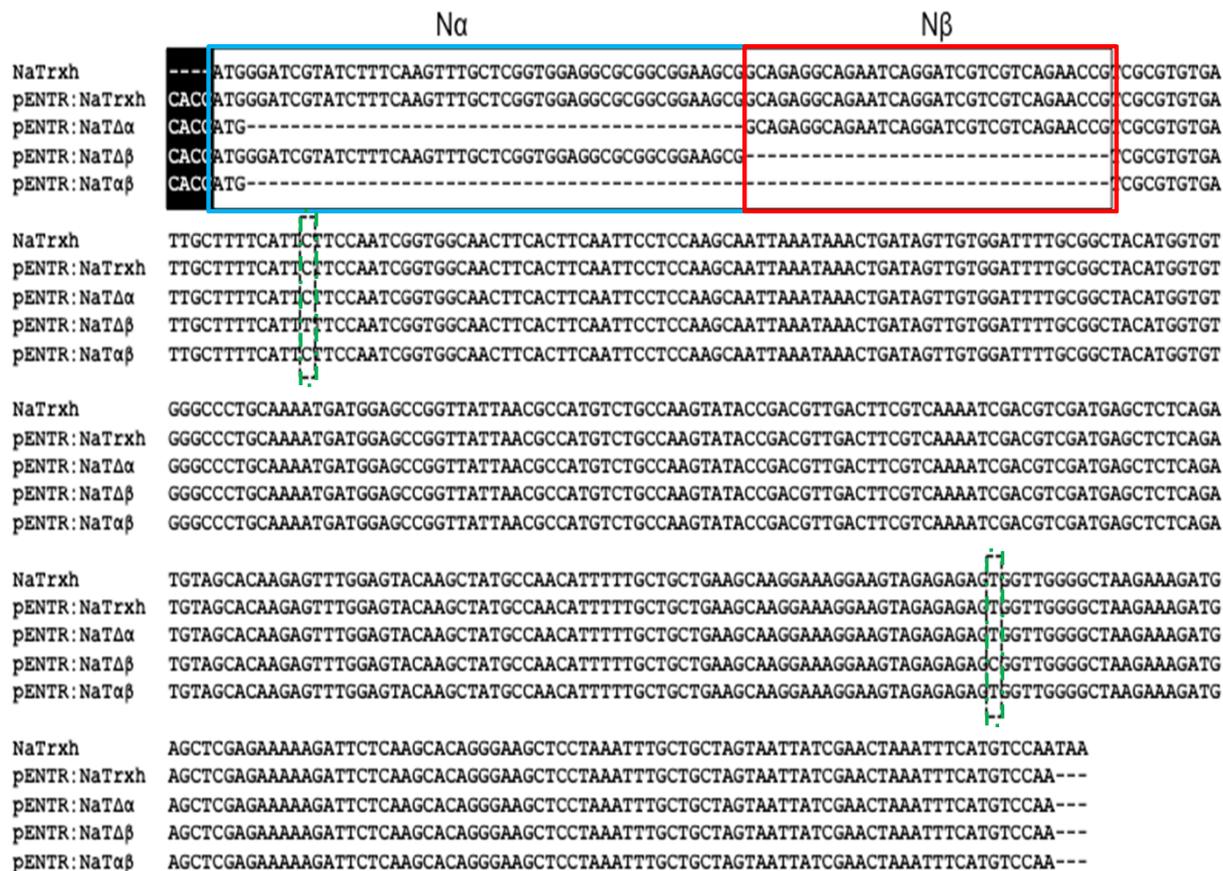
VI.2. Análisis de las secuencias *NaTrxh*, *NaTrxhΔNα*, *NaTrxhΔNβ* y *NaTrxhΔNαβ* clonadas en el vector de entrada

Se analizó la secuencia de cada una de las versiones de la *NaTrxh* clonadas en el vector pENTR, así se corroboró que no tuvieran mutaciones y que, además, correspondieran a la versión correspondiente.

Al realizar un alineamiento con la secuencia *NaTrxh* reportada en la base de datos (número de acceso DQ021448.1) (Fig. 6), se encontraron 2 mutaciones en la secuencia *NaTrxhΔNβ*. Ambas mutaciones produjeron un cambio de aminoácidos; el primero fue Ser-35 por una Phe, y el segundo de Val-119 por Ala. Se sabe que las secuencias de las tiorredoxinas son altamente variables, teniendo un solo sitio conservado, el sitio activo. Además, debido a que las mutaciones aquí presentes no se encuentran en este sitio, ni en el extremo amino, se decidió utilizar dicha construcción (Fig. 9).

La secuencia de la *NaTrxhΔNα* mostró que se insertó al revés (datos no mostrados), por lo que se tuvo que recuperar una de las tres colonias seleccionadas anteriormente (Fig. 8B).

A.



B.



Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia reportada de la NaTrxh (número de acceso: DQ021448.1) con las secuencias en las construcciones pENTR:NaTrxh, pENTR:NaTrxhΔNα (pENTR:NaTrΔα), pENTR:NaTrxhΔNβ (pENTR:NaTΔβ) y pENTR:NaTrxhΔNαβ (pENTR:NaTΔαβ) a nivel de nucleótidos (A) y a nivel de proteína (B). En la caja negra está la secuencia añadida correspondiente al sitio de inserción a pENTR (CACC); la caja azul Nα corresponde al motivo Nα de la Natrxh; la caja roja Nβ corresponde al motivo Nβ de la NaTrxh. Las cajas verdes punteadas indican las mutaciones que se encontraron en la secuencia de la NaTrxhΔNβ.

VI.3. Corroboración de la orientación de *NaTrxhΔNα* clonada en pENTR

Como ya se mencionó, *NaTrxhΔNα* se clonó al revés de como se esperaba, por lo que se tuvieron que recuperar otras colonias transformantes.

Se utilizaron los sitios M13, para verificar la correcta direccionalidad, ya que se encuentran en el vector pENTR/D-TOPO, flanqueando la secuencia que se inserta, de tal manera que ayudan a determinar la orientación del gen clonado (Fig. 5).

Para verificar la orientación del inserto en pENTR se utilizaron las otras tres colonias obtenidas anteriormente (Fig. 8B), se realizó un análisis por PCR con el par de oligonucleótidos NaT-F2 y NaT-R*, para cerciorar que se encontraran los insertos (Fig. 10A). Se descartó el uso de la colonia 4, ya que no se observó una banda clara. Con las colonias restantes (colonias 2 y 3), se realizó un análisis por PCR con los siguientes pares de oligonucleótidos: (1) M13-F(-20) + NaT-R*, esperando un producto de amplificación de 454 pb; (2) NaT-F2+M13-R, esperando uno de 570 pb, y; (3) M13-F(-20)+M13-R esperando un producto de amplificación de 638 pb; con la colonia 2 y 3.

El resultado del análisis con los oligonucleótidos M13 y los de la *NaTrxh* (Fig. 10B) corroboraron que la secuencia de la *NaTrxhΔNα* se encontraba clonada con la orientación correcta. Como control positivo se usó la construcción pENTR:*NaTrxh* cuya secuencia y clonación fueron correctas (Fig. 8D y 9A).

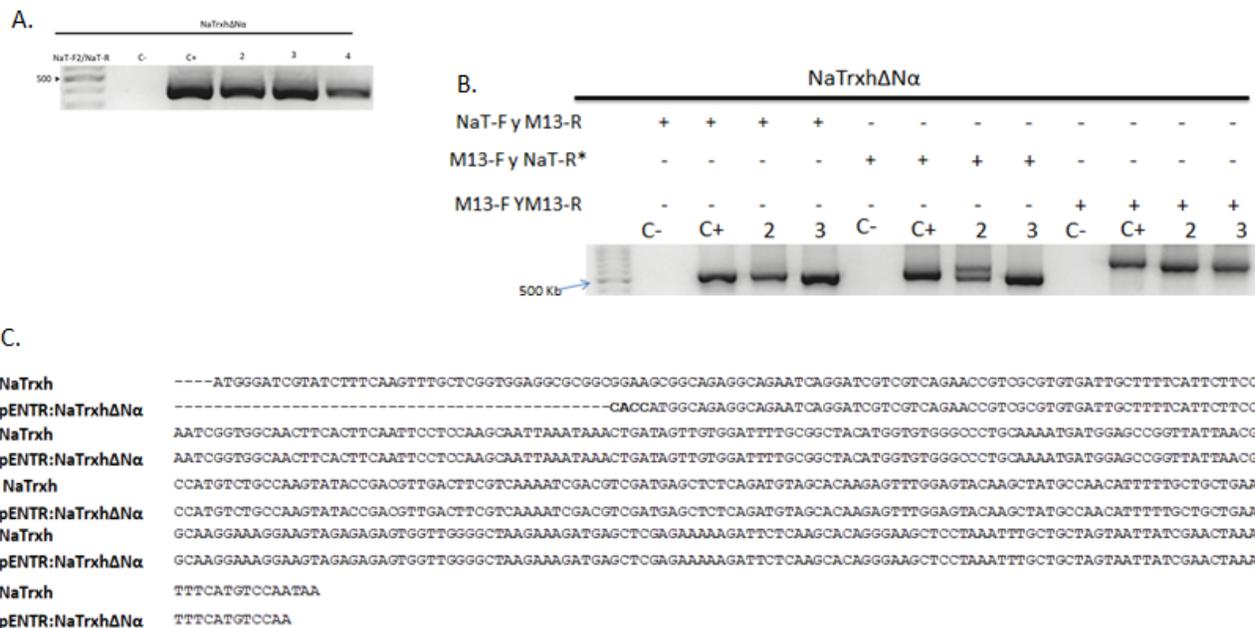


Figura 10. Corroboración de la orientación de pENTR:NaTrxhΔα. A. Análisis por electroforesis de gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR de las clonas 2, 3 y 4 de pENTR:NaTrxhΔα que comprueban que las colonias están transformadas. B. Análisis por electroforesis del gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR usando como molde a pENTR:NaTrxhΔα (clonas 2 y 3). C Análisis por alineamiento de la construcción pENTR:NaTrxhΔα rescatada de la colonia 3. C-: H₂O como molde; C+: pENTR:NaTrxh como control positivo.

Finalmente, la secuencia obtenida de la colonia seleccionada (número 3) con la construcción pENTR:NaTrxhΔNα se analizó para corroborar la ausencia de mutaciones y su correcta orientación (Fig. 9A y 10C).

VI.4. Generación de las construcciones moleculares en el vector destino pYES/DEST-52

Una vez obtenidas y seleccionadas las construcciones pENTR:NaTrxh, pENTR:NaTrxh Δ N α , pENTR:NaTrxh Δ N β y pENTR:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, se purificaron para realizar la recombinación tipo *LR* con el vector destino pYES/DEST-52.

Para la recombinación tipo *LR* se utilizó la mezcla de enzimas *LR clonasa* (Invitrogen) y, una vez finalizada la reacción, se transformaron células competentes de *E coli* TOP10. La selección de las células transformantes se realizó creciéndolas en medio con ampicilina (100 μ g/mL). De esta manera, se clonaron las construcciones pYES:NaTrxh, pYES:NaTrxh Δ N α , pYES:NaTrxh Δ N β y pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$.

Se seleccionaron 15 colonias de cada transformación, excepto de la NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (de la cual se obtuvo solo una colonia), a partir de las cuales se hizo una reacción de PCR para evaluar la presencia del inserto (Fig. 11A).

De las clonas positivas, es decir, con el inserto, se escogieron tres de pYES:NaTrxh, dos de pYES:NaTrxh Δ N α , una de pYES:NaTrxh Δ N β y una de pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, las cuales se cultivaron para: 1) almacenarlas a -70°C; y 2) para realizar la purificación del plásmido recombinante, mismo que se utilizó como molde para las reacciones de PCR utilizando los tres diferentes pares de oligonucleótidos (NaT-F1 + NaT-R*; NaT-F2 + NaT-R*; NaT-F3 + NaT-R*) (Fig. 11B y 11C).

El resultado fue que a partir de la construcción pYES:NaTrxh, se obtuvo producto de amplificación usando los tres pares de oligonucleótidos. A partir de pYES:NaTrxh Δ N α , se obtuvo un producto de amplificación cuando el oligonucleótido en sentido fue el NaT-F2 y otro con el NaT-F3. Con la construcción pYES:NaTrxh Δ N β no se obtuvo producto cuando el oligonucleótido en sentido fue el NaT-F2, ya que no tiene dónde alinearse (Fig. 11C).

Finalmente, partir de pYES:NaTrxh Δ N α β , sólo se obtuvo producto de amplificación con el par de oligonucleótidos NaT-F3 + NaT-R* (Fig.11B y C).

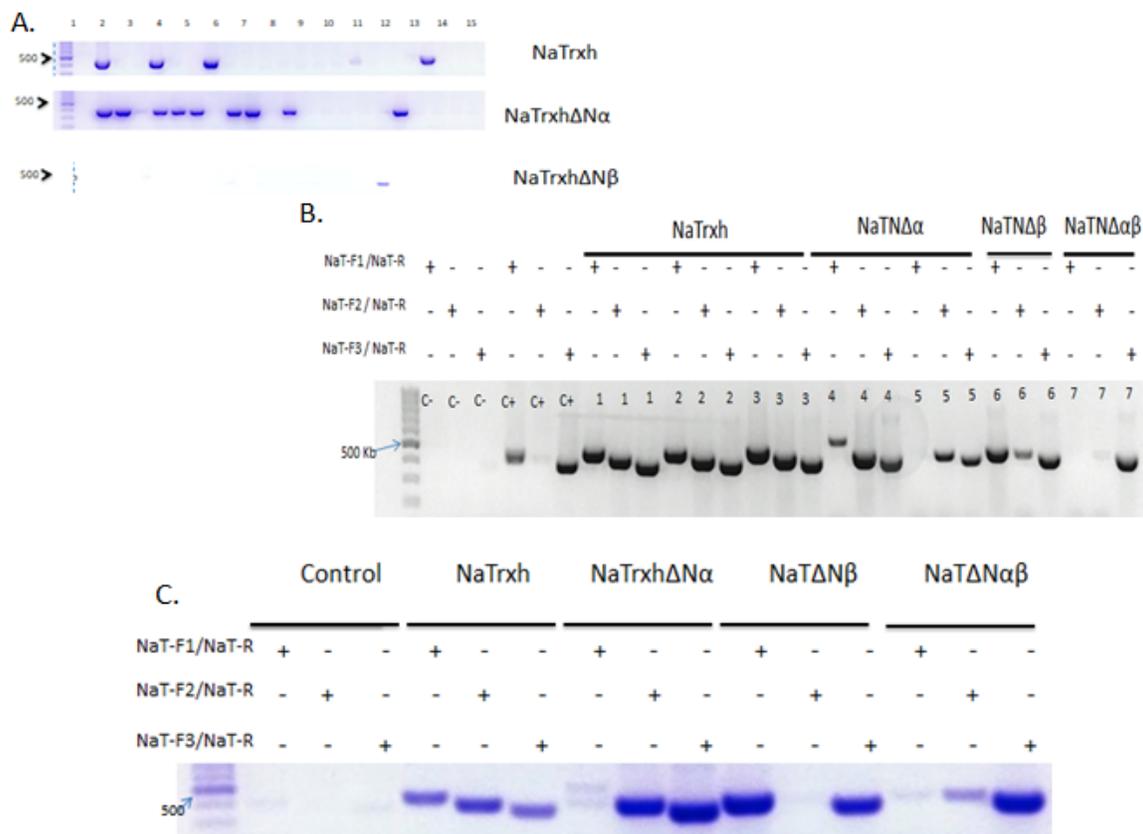


Figura 11. Análisis por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR de las construcciones de la NaTrxh clonadas en pYES/DEST-52 (NaTrxh, NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N α β). Control negativo: H₂O como molde y control positivo: pENTR:NaTrxh Δ N β como molde. A. Análisis por electroforesis de los productos de amplificación de 15 colonias de los insertos *NaTrxh*, *NaTrxh Δ N α* , *NaTrxh Δ N β* con el par de oligonucleótidos NaT-F3 y NaT-R*. B. Análisis por electroforesis de los productos de amplificación de PCR con los tres pares de oligonucleótidos; 1, 2 y 3 colonias seleccionadas para la construcción *NaTrxh*; 4 y 5 colonias de la construcción *NaTrxh Δ N α* ; 6 construcción *NaTrxh Δ N β* ; y 7 construcción *NaTrxh Δ N α β* . C. Productos de amplificación de plásmido de cada construcción.

VI.5. Expresión en *S. cerevisiae* e inmunodetección de la NaTrxh y de las mutantes recombinantes

Una vez corroborada la generación de las construcciones pYES:NaTrxh, pYES:NaTrxh Δ N α , pYES:NaTrxh Δ N β y pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (Fig. 11), se purificaron para realizar la transformación de *S. cerevisiae* InvSc1 por choque térmico. Las células transformantes se seleccionaron creciéndolas en medio mínimo sin uracilo, ya que el vector contiene el gen *URA3*, necesario para la síntesis de dicha pirimidina y el cual tiene mutado la cepa InvSc1.

Se seleccionaron las colonias transformantes de pYES:NaTrxh, pYES:NaTrxh Δ N α , pYES:NaTrxh Δ N β y pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$. Se hicieron ensayos de sobreexpresión por 24 h. Las muestras a analizar consistieron en las proteínas que se encuentran en el medio extracelular (analizando el sobrenadante), el extracto celular (analizando el lisado de las células) y los residuos de pared celular (analizando el botón que se forma al realizar el lisado).

Los extractos de proteína total se analizaron por SDS-PAGE al 12.5 y al 15% y analizadas por réplica en Western-blot (Fig.12), esperando encontrar una banda cercana a los 20 kDa, correspondiente a la masa molecular teórica de la NaTrxh completa (16 kDa) y el epítipo V5 más la cola 6X(His) (4 kDa).

Se hicieron ensayos de inmunodetección para cada una de las proteínas recombinantes en las cuales se detectó fuertemente una banda a la altura correspondiente a los 35 kDa, aproximadamente, en todos los casos, lo que indicó que el anticuerpo anti-NaTrxh presenta reacción cruzada con otras proteínas. Para la NaTrxh y la NaTrxh Δ N α se observó un par de bandas, una a la altura de 20 kD y la otra por debajo de 17 kD (Fig. 12A) pudiendo ser una de estas la banda de interés.

A partir de las células con la construcción pYES:NaTrxh se volvió a detectar una gran cantidad de bandas en el lisado celular, ninguna en el botón celular ni en el medio (fracción extracelular) usando el anticuerpo anti-NaTrxh (Fig.12B).

Con extractos obtenidos a partir de levaduras con la construcción pYES:NaTrxh Δ N α se probó el anticuerpo anti-NaTrxh, por un lado, y anti-6X(His) por el otro. El anti-6X(His) es un anticuerpo monoclonal, por lo que se esperaba que no presentara un entrecruzamiento. Se obtuvo una única banda a la altura de 20 kDa que es más intensa a las 6 h de inducción (Fig. 12C).

Se hicieron las mismas pruebas con los dos anticuerpos para los extractos a partir de *S. cerevisiae*::pYES:NaTrxh Δ N β y pYES:NaTrxh Δ N α β pero no se detectó ninguna banda, probablemente debido a que se cargaron menos de 20 μ g de proteína total por carril (Fig. 12D y E).

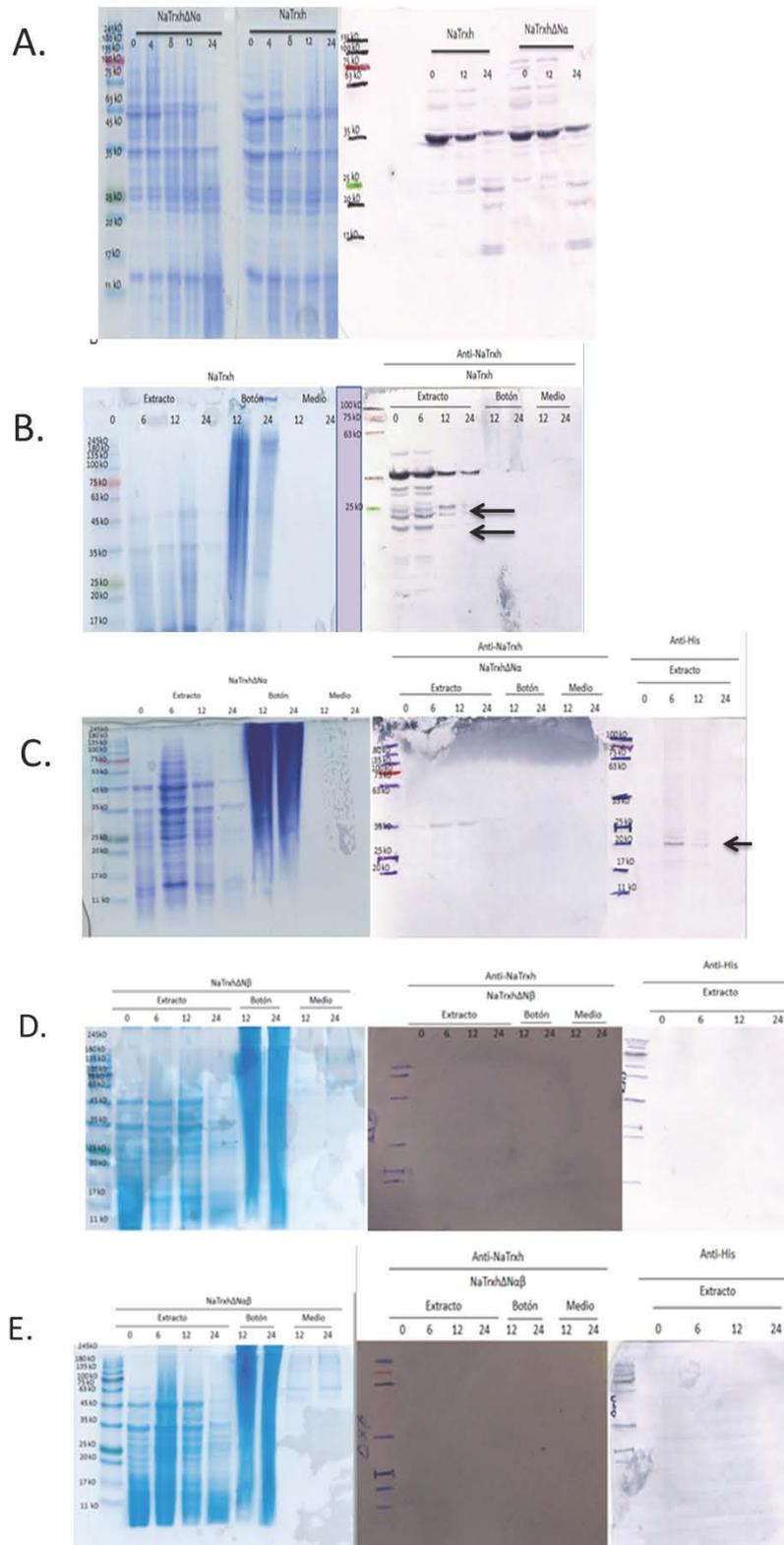


Figura 12. Primera expresión de las cuatro proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Análisis por electroforesis de geles de poliacrilamida y réplicas de Western blot de las proteínas recombinantes. A. Expresión de 24 horas del lisado celular de las proteínas NaTrxh y NaTrxhΔNα, inmunodetección contra NaTrxh. B. Análisis del lisado celular, el medio extracelular y el botón celular de la NaTrxh e inmunodetección contra NaTrxh. C.

Análisis del lisado celular, el medio extracelular y el botón celular de la NaTrxh Δ N α e inmunodetección con ambos anticuerpos. D. Análisis del lisado celular, el medio extracelular y el botón celular de la NaTrxh Δ N β e inmunodetección con ambos anticuerpos. E. Análisis del lisado celular, el medio extracelular y el botón celular de la NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ e inmunodetección con ambos anticuerpos.

En la Figura 12, cuando se detecta una banda, también se observó a las 0 h de inducción, por lo que se hizo un ensayo de sobreexpresión de 6 h, donde, además de la inducción (con galactosa) se usó la misma alícuota de cada construcción para crecerlas en medios con glucosa, la cual actúa como inhibidor del promotor *GAL1* y así determinar si existe una expresión basal del gen de interés a pesar de estar en un medio con glucosa.

Cuando se probó la construcción pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ y se analizó con ambos anticuerpos, se detectó una banda por debajo de los 20 kDa con el anticuerpo anti-6X(His) en todos los tiempos de inducción (Fig. 13A), por lo que se hicieron ensayos de inmunodetección solo con el anticuerpo anti-6X(His) sobre las líneas con las otras construcciones (Fig. 13B y C).

A las 0 h se detectó una banda que no está presente a las 6 h para la NaTrxh. Con respecto a la NaTrxh Δ N α se obtuvo un bandeo similar a la misma altura, pero debajo de esta se observa una única banda a las 6 h de inducción; para la NaTrxh Δ N β y la NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (Fig. 13C) se visualizó un bandeo similar al obtenido con las construcciones pYES:NaTrxh y pYES:NaTrxh Δ N α (Fig. 13B) en todos los tiempos de inducción, así como el control (tiempo 0).

Estos resultados no son concluyentes porque se puede observar una mejor definición de las bandas de mayor masa molecular y no se presentan proteínas de baja masa molecular, probablemente debido a un problema con el tiempo de transferencia que pudiera estar ocasionando que no se visualicen las proteínas recombinantes de interés.

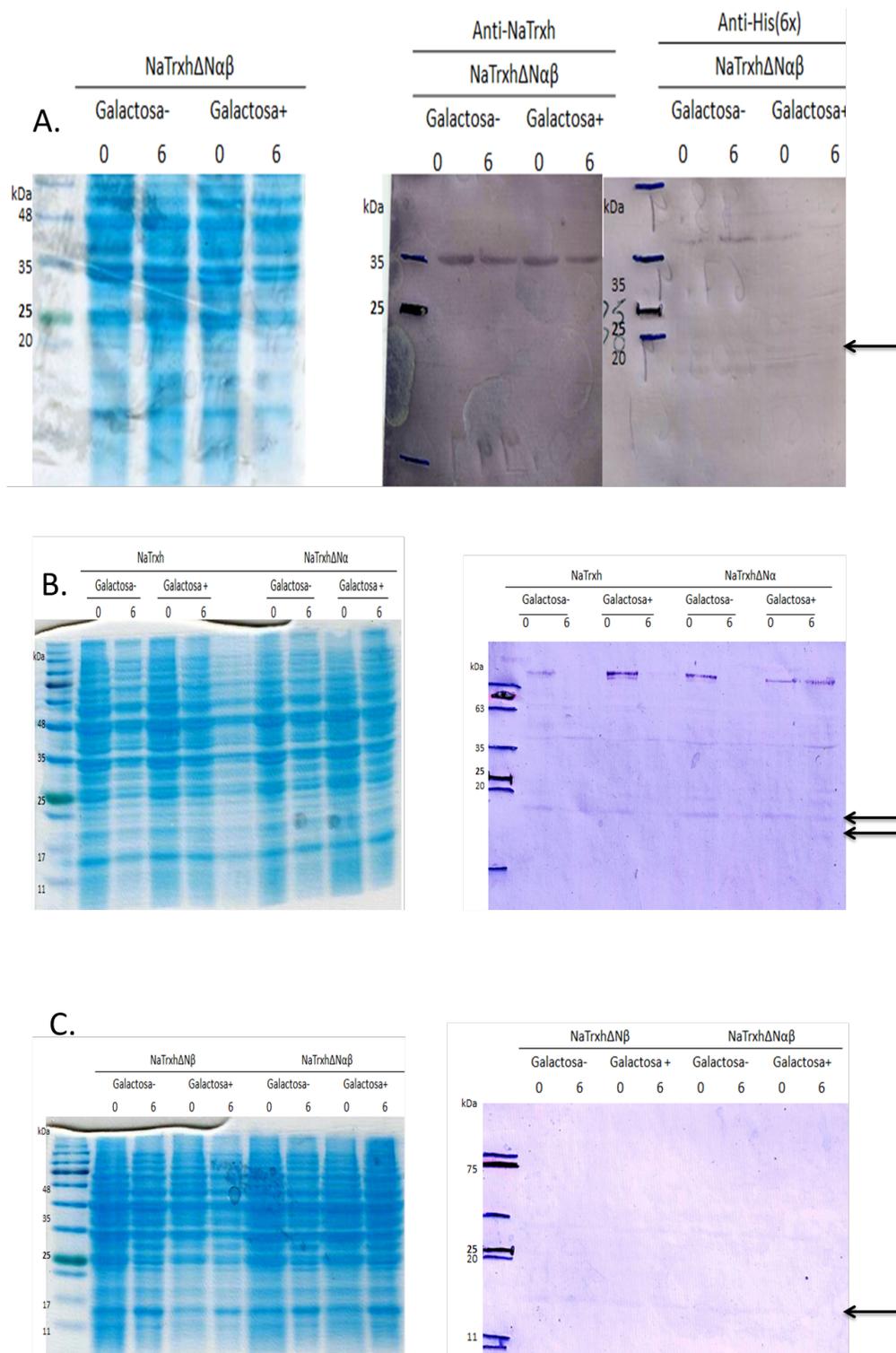


Figura 13. Expresión basal de las proteínas recombinantes en medios sin inducción. Análisis por electroforesis y replica de Western blot de una sobreexpresión de 6 horas para las cuatro construcciones con inducción (Galactosa +) y sin inducción (Galactosa -). A. Expresión de 6 horas del lisado celular de la proteína NaTrxhΔNαβ sin inducción (Galactosa -) y con inducción (Galactosa+) e inmunodetección con ambos anticuerpos. B. Análisis del extracto celular de una expresión de 6 horas de las proteínas NaTrxh y NaTrxhΔNα sin inducción y con inducción e inmunodetección

con anti-6X(His). C. Análisis del extracto celular de una expresión de 6 horas de las proteínas NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ sin inducción y con inducción e inmunodetección con anti-6X(His).

Se probó un sistema semihúmedo de transferencia en el cual se pudo visualizar mejor a las proteínas de menor masa molecular, ya que se redujo el tiempo de transferencia a 15 min, además de que se usó NaCl al 10% en los lavados previos a la inmunodetección, con el fin de eliminar reacciones cruzadas del anticuerpo. Al revelar la inmunodetección con los dos anticuerpos diferentes, se observó la misma banda a los 12 kD a las 4 y 6 h de inducción, posiblemente correspondiente a la proteína recombinante NaTrxh (Fig. 14A). En estos ensayos se utilizó como control negativo a la cepa de *S. cerevisiae* INVSc1 sin transformar (crecida en medio YPD), a partir de la cual no se detectó la banda aquí mencionada. Se probaron las líneas de levadura con las construcciones pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ y pYES:NaTrxh Δ N β (Fig. 14B) y se observó una banda de 12 kDa (con ambos anticuerpos) a las 6 y 12 h solo de la que corresponde a pYES:NaTrxh Δ N β .

La colonia de *S. cerevisiae*::pYES:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ no expresó la proteína, por lo cual se probó otra clona de las almacenadas a -70°C y también se analizó otra con la NaTrxh Δ N α (Fig.14C). Para estas últimas construcciones se aumentó el porcentaje de poliacrilamida para el SDS-PAGE a 15%, con el objetivo de obtener una mejor separación de las proteínas de menor masa molecular y se reveló una banda que no está presente en el control negativo (levadura sin transformar) ni a las 0 h de inducción (levaduras transformantes), pero sí a las 6 y 12 h de inducción a partir de ambas colonias. Esta banda migró entre los 11 y 17 kD, tal y como se esperaba.

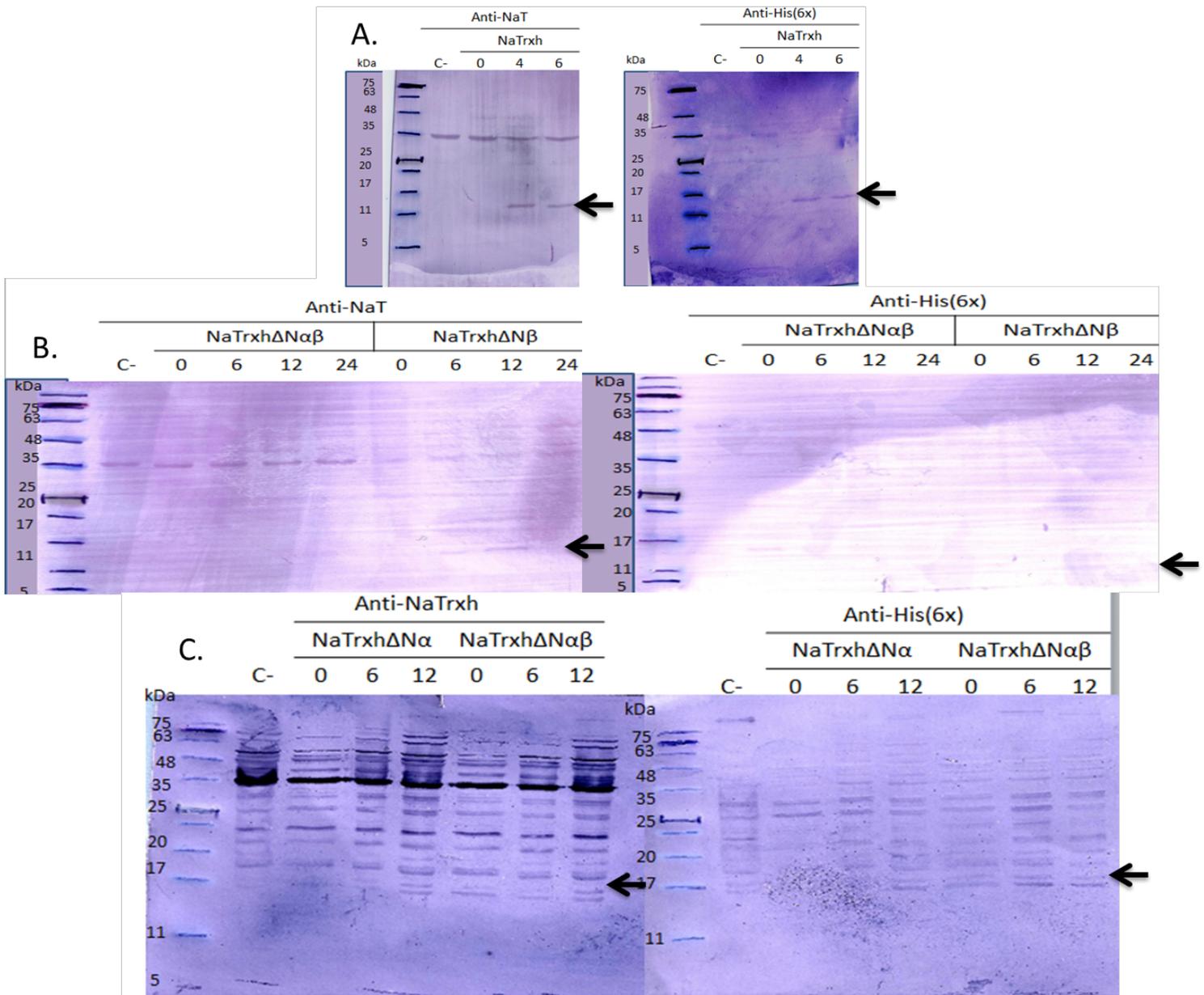


Figura 14. Migración de las proteínas recombinantes a los 12 kDa. Análisis por electroforesis y réplica de western blot de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes por distintos tiempos en *S. cerevisiae*. A. NaTrxh, inmunodetectada con anti-NaTrxh y anti-6X(His) (0, 4 y 6 h de inducción). B. NaTrxhΔNαβ y NaTrxhΔNβ inmunodetectadas con ambos anticuerpos (0, 6, 12 y 24 h). C. NaTrxhΔNα y NaTrxhΔNαβ (0, 6 y 12 h) inmunodetectadas con ambos anticuerpos. C-: control negativo (*S. cerevisiae* sin transformar).

Debido a que las bandas que se sugiere corresponden a la NaTrxh, así como a sus versiones mutantes (NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$) (marcadas con flechas negras en las figuras anteriores) se inmunodetectaron a diferentes masas moleculares, se probó que no fuera un problema de migración provocado por la cola 6X(His). En el laboratorio se cuenta con todas las versiones de la NaTrxh clonadas en el plásmido pET28b, el cual es un vector de expresión para *E. coli* que agrega al extremo carboxilo de las proteínas de interés una cola 6X(His). La sobreexpresión en *E. coli* se indujo con isopropil tiogalactósido (IPTG) y se analizaron las células resuspendidas, la fracción insoluble y la fracción soluble, obtenidas de la lisis por sonicación de las células. En la Figura 15 se muestran los análisis de los extractos de proteína de cada una de las líneas de *E. coli* por medio de tinción con azul brillante de Comassie. En cada uno de los geles se observó la inducción de todas las proteínas recombinantes en *E. coli*. Como se esperaba, la NaTrxh se observa en mayor proporción en la fracción soluble, al igual que la NaTrxh Δ N α (Fig. 15-1 y 15-2). Con respecto a la NaTrxh Δ N β (Fig. 15-3) se observó en mayor proporción en la fracción insoluble, tal y como se esperaba (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014) y la NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (Fig. 15-4) no se indujo adecuadamente, por lo que no se observó sobreexpresión.

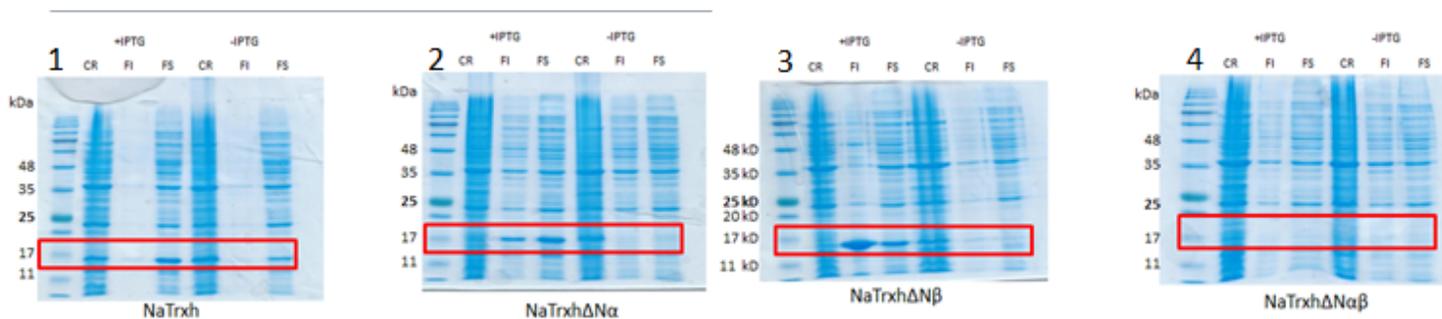


Figura 15. Sobreexpresión de la NaTrxh y las mutantes con los vectores pET28b en *E. coli*. 1) NaTrxh; 2) NaTrxh Δ N α ; 3) NaTrxh Δ N β ; 4) NaTrxh Δ N $\alpha\beta$. Tinción con Comassie de las proteínas recombinantes inducidas con IPTG y sin inducir de una sobreexpresión en *E. coli*; CR, células resuspendidas, FI, fracción insoluble, FS, fracción soluble.

Todas las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se observaron en gran cantidad a la altura de 16 kD, por lo cual se hicieron ensayos de inmunodetección con ambos anticuerpos [anti-NaTrxh y anti-6X(His)] de la fracción soluble de cada una de las proteínas recombinantes resultantes de *E. coli* y los extractos crudos de proteína de 6 h de inducción de *S. cerevisiae*, utilizando cuatro procedimientos de lisis celular (Materiales y Métodos V.9.), esto con el fin de ver si existen diferencias entre cada extracción y si la baja cantidad de proteína que se detectó (Fig. 12, 13 y 14) fue debido a una extracción deficiente (debido posiblemente a que el amortiguador solo contiene fosfatos) o a si efectivamente, la cantidad de proteína que se expresa en *S. cerevisiae* es baja.

Todas las proteínas de interés se inmunodetectaron con ambos anticuerpos [*i. e.* anti-NaTrxh y anti-6X(His)]. De hecho, las bandas correspondientes en los extractos de levadura migraron una distancia similar a las de *E. coli* (*i. e.* a los 16 kD), aunque es claro que la cantidad es mínima en el caso de las proteínas recombinantes de *S. cerevisiae*. (Fig. 16). Con el anticuerpo anti-NaTrxh se observó una diferencia con respecto a la cantidad de la NaTrxh inmunodetectada, pero también se observó una alta reacción cruzada. Debido a la falta de especificidad en todos los resultados obtenidos en este trabajo, esta diferencia al utilizar un amortiguador de extracción con NaCl (amortiguador 2) o con NaCl y tritón X-100 (amortiguador 3) no representa un cambio en la cantidad de proteína, sino una posible reacción cruzada con otras proteínas de masa similar al usar los diferentes amortiguadores de extracción. Esta hipótesis se refuerza al analizar el resultado con el anti-6X(His), a partir del cual no se encontró diferencia notable entre las cantidades obtenidas de proteína recombinante en cada extracción de proteína, sugiriendo que *S. cerevisiae* la expresa en baja cantidad y, muy importantemente, que se encuentran todas las NaTrxh dentro de la célula.

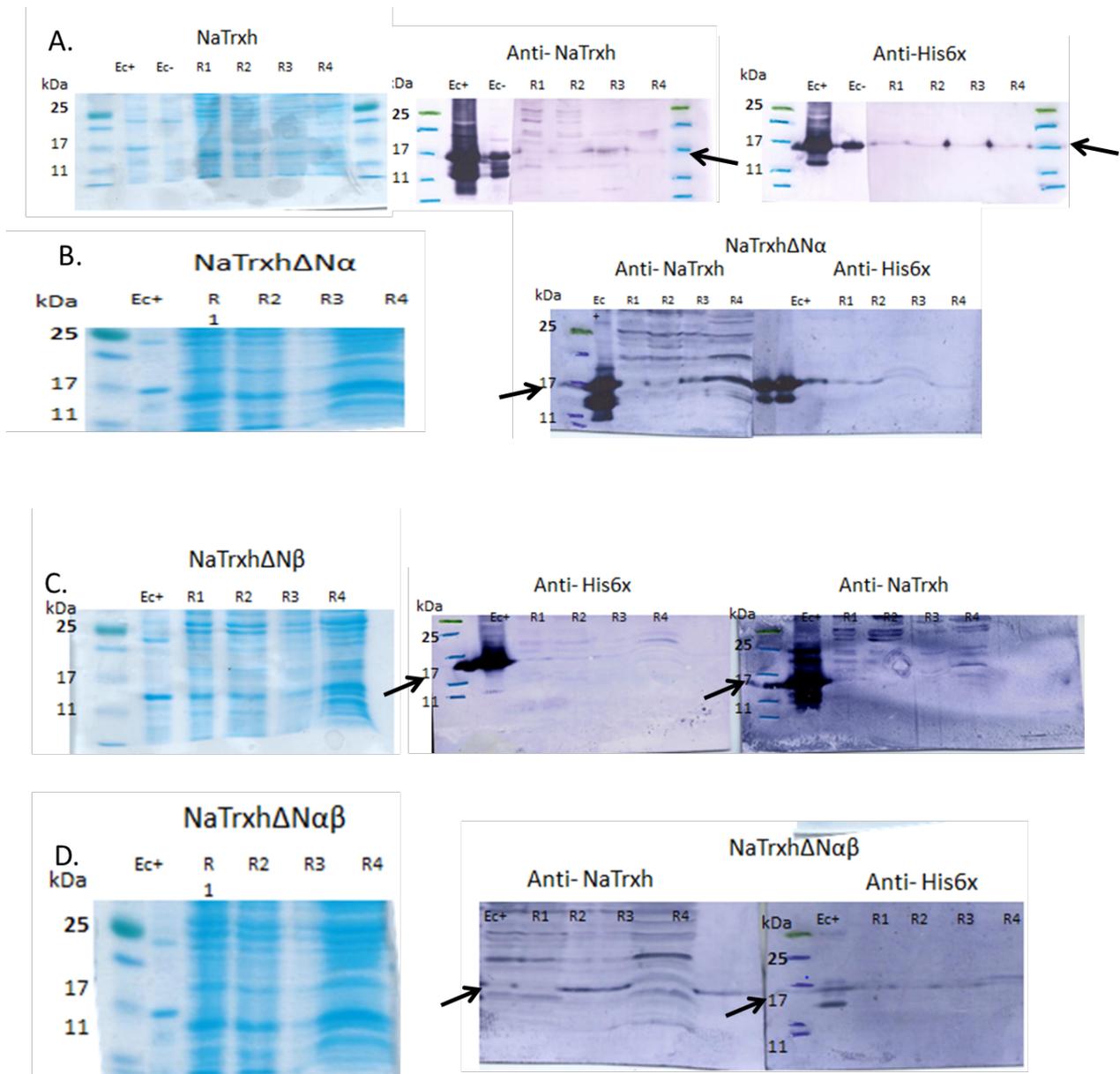


Figura 16. Extracción diferencial de los extractos crudos de la NaTrxh y las mutantes en *S. cerevisiae*. Ensayos de inmunodetección de las proteínas recombinantes con los anticuerpos contra NaTrxh e His(6x) con cuatro tipos de lisis celulares. A. NaTrxh B. NaTrxh Δ N α C. NaTrxh Δ N β D. NaTrxh Δ N $\alpha\beta$. Ec+ Fracción soluble de *E. coli* inducida con IPTG. Ec- Fracción soluble de *E. coli* sin inducir. R1, Lisis mecánica con baja fuerza iónica con el amortiguador 1, 500 mM fosfato de sodio pH 7.4, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1mM de PSMF; R2, Lisis mecánica con fuerza iónica (NaCl 300 mM) y amortiguador 1; R3, Lisis mecánica con NaCl y agentes tensoactivos (extracto celular total) amortiguador 2 más Tritón 1%; R4Lisis con amortiguador y calor con NaOH y acetato de litio.

Finalmente, se hizo un análisis del medio extracelular, precipitando las proteínas por un día con acetona fría en una proporción 3:1 (acetona al 80% (v/v):medio). En los ensayos de inmunodetección se visualizaron proteínas de una masa molecular mayor a 48 kDa (Fig. 17), lo que sugiere que no se encuentran proteínas de menor masa molecular en el medio extracelular, incluyendo a la NaTrxh (Fig. 17), lo cual refuerza la hipótesis de que *S. cerevisiae* no la secreta.

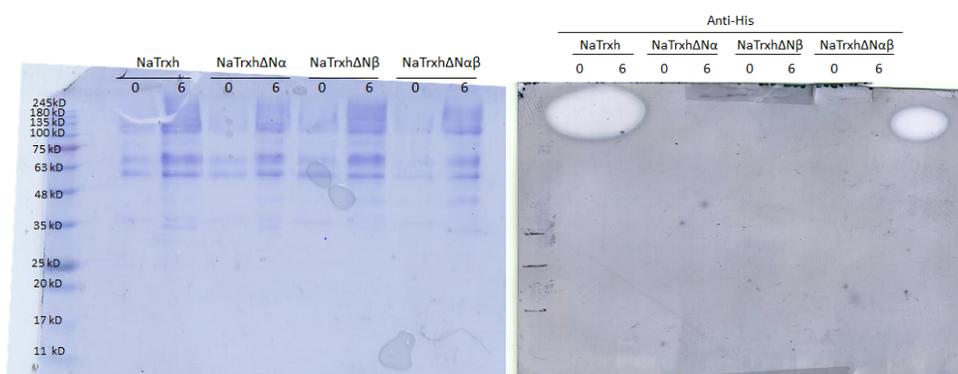


Figura 7. Inmunodetección en el medio extracelular. Análisis por electroforesis y réplica de Western blot del medio extracelular que se obtuvo de una sobreexpresión de 6 horas para las cuatro construcciones.

VII.Discusión

VII.1. *S. cerevisiae* como sistema de expresión para la NaTrxh y sus mutantes

S. cerevisiae es un sistema donde se ha descrito un número importante de proteínas secretadas al medio extracelular siguiendo vías de secreción no convencionales (Nombela *et al.*, 2009; Matlack *et al.*, 1997), como se cree que lo hace la NaTrxh en células vegetales (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), por lo cual, se intentó observar si *S. cerevisiae* reconocía a esta proteína como de secreción.

S. cerevisiae se ha utilizado como un buen modelo para la expresión de proteínas recombinantes propias de plantas, como el caso reportado por Leonard *et al.* (2005), donde se logró hacer una vía completa, que consiste en 4 enzimas relacionadas con la síntesis de flavonoides, metabolitos secundarios de plantas, que al sobreexpresarse sintetizan tres diferentes flavonoides, sugiriendo que *S.cerevisiae* es un sistema sin problemas de compatibilidad con proteínas de plantas.

En todos los ensayos realizados en el presente trabajo, solo se inmunodetectó a la NaTrxh, así como a todas las mutantes de su extremo amino, en el extracto crudo proveniente de la fracción intracelular (Fig.12, 13, 14 y 16); además, al realizar la extracción de proteína total con diferentes amortiguadores, variando la fuerza iónica y agregando un tensoactivo con la finalidad de romper estructuras celulares (Fig. 16), se encontró que todas las versiones de la NaTrxh efectivamente se localizan en el citoplasma.

Estos resultados se refuerzan fuertemente con otros datos obtenidos en el laboratorio, en donde se expresan en *S. cerevisiae* a las diferentes versiones de la NaTrxh fusionadas a GFP y la fluorescencia se observa en el citoplasma de *S. cerevisiae* (datos no publicados),

sugiriendo que la NaTrxh no está siendo secretada como ocurre en las células vegetales (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.* 2014), lo que implica que el motivo N β no es reconocido por *S. cerevisiae*, a pesar de que en este eucarionte se han descrito varios métodos de secreción no convencionales (Nombela *et al.*, 2009). Esto sugiere, a su vez, que la información de secreción es reconocida únicamente por un sistema vegetal, siendo una ruta no convencional muy posiblemente propia de plantas que utiliza los elementos de la vía clásica: RE, Golgi y vesículas de secreción.

VII.2. Inmunodetección y niveles de expresión de la NaTrxh y sus diferentes mutantes del extremo amino en *S. cerevisiae*

En el presente trabajo se mostró que la NaTrxh y sus mutantes sí se expresan en *S. cerevisiae* utilizando el vector de expresión pYES-DEST52, ya que se inmunodetectaron a la altura de 12 – 16 kDa. Esta migración es similar a la que se observó usando proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*, por lo que seguramente migran a esta altura por la cola 6X(His).

Berninsone *et al.* (1997), describe a una proteína, el transportador de CMP-ácido salicílico de mamífero fusionada con el epítipo HA, de una masa molecular que se predice de 39 kDa, el cual al expresarse en *S. cerevisiae* InvSc1, se encontró de una masa menor, 30 kDa, proponiendo que esto se debe a la movilidad de la proteína, ya que, al expresarla en células de mamífero, se encontró a la misma altura.

Se sugiere que tanto la NaTrxh como las mutantes (NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$), corresponden a las bandas que migraron en 12 y 16 kDa porque: (1) se observaron las mismas bandas como resultado de la inmunodetección con dos anticuerpos

diferentes en todos los ensayos; (2) estas bandas no se observaron en extractos de proteína a partir de la cepa sin transformar; (3) son de masa molecular similar a la NaTrxh nativa; y (4) migran a la misma altura que las proteínas recombinantes con la cola 6X(His) expresadas en *E. coli*.

Con respecto a los bajos niveles de expresión de las diferentes versiones de la NaTrxh en *S. cerevisiae*, se ha reportado que la presencia de la 6X(His) puede afectar la expresión. Mohanty y Cois (2003) reportan que al variar el número de histidinas y su posición, en el extremo amino o carboxilo de la acuaporina Z (AqpZ), en *E. coli* observan que: (1) la mejor expresión de la AqpZ se consiguió usando la versión con 6X(His) en el amino terminal; (2) la expresión disminuyó tres veces cuando se usó la etiqueta 10X(His); (3) se disminuyó seis veces cuando se cambió la posición de la etiqueta a la región del extremo carboxilo. De igual manera, en *Pichia pastoris*, el nivel de expresión de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con etiqueta en la región amino resulta mayor que la versión con la etiqueta en el carboxilo e incluso que con la versión sin etiqueta (Rocha, 2005).

Las proteínas recombinantes que en este trabajo se obtuvieron contienen la secuencia 6X(His) fusionada al extremo carboxilo, hecho que puede estar afectando su expresión en levadura, tal y como se ha reportado (Mohanty y Coris, 2003; Rocha, 2005). Los niveles de expresión, por otro lado, fueron elevados usando *E. coli* (Fig. 15 y 16). Para mejorar la expresión de las diferentes versiones de la NaTrxh se propone: (1) pasar la secuencia 6X(His) al extremo amino; o (2) eliminar cualquier epítotope. La primera opción no es viable para este estudio, pues la secuencia responsable de la secreción de la NaTrxh se encuentra justo en el extremo amino, por lo que seguramente la secuencia 6X(His) en esta región bloquearía su función. En cuanto a la segunda, es más viable; sin embargo, los resultados indican que no se

secreta, por lo que, aunque en niveles bajos de expresión, se puede sugerir que la información contenida en la secuencia de la NaTrxh para su secreción no es reconocida en este sistema eucarionte.

VII.3. Secreción de la NaTrxh en dos reinos diferentes

Hay distintas evidencias en las cuales se observa que en distintos órganos vegetales (estilos de *N. alata*, hojas de *N. benthamiana* y de *A. thaliana* y células de epidermis de *Allium cepa*) la NaTrxh se secreta, localizándose en lo que corresponde al apoplasto (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Al expresar a la NaTrxh y a las diferentes mutantes fusionadas a GFP en células de epidermis de cebolla, estas se comportaron de la siguiente manera: la NaTrxh y la NaTrxh Δ N α se secretan y localizan en la pared celular; las mutantes NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ se localizan en el citoplasma (Fig. 2) (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que es el motivo N β el responsable de la localización extracelular de la NaTrxh, lo cual se demostró fusionando este motivo a GFP y encontrando que se secreta en células vegetales (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Los resultados que se obtuvieron en este trabajo, sugieren que *S. cerevisiae* no reconoce a la NaTrxh como proteína de secreción, de tal manera que todas las versiones de la misma se inmunodetectaron en la fracción citoplasmática, lo que sugiere una localización intracelular.

VII.4. Características que vuelven único al motivo N β y posibles escenarios de secreción de la NaTrxh en células vegetales

Se sabe que un péptido señal, canónicamente es una secuencia de aminoácidos localizados en el extremo amino de las proteínas nascentes, de 8 – 30 residuos hidrofóbicos que son reconocidos por la subunidad 54k de la SRP (SRP54), particularmente por el dominio M (rico en metioninas y otros residuos de aminoácidos con cadenas hidrofóbicas) (Egea *et al.*, 2005), donde se llevan a cabo interacciones hidrofóbicas, en el citosol.

El motivo N β consiste en 11 residuos de aminoácidos que comprenden de la Ala-17 a la Pro-27 en la secuencia de la NaTrxh, es decir, no está exactamente ubicada en el extremo amino. Además, posee un perfil bajo de hidrofobicidad (Fig. 18) (Ávila-Casteñeda *et al.*, 2014). Estas son características totalmente contrarias a las propias de un péptido señal convencional (González, 2010; Gierasch, 1989); sin embargo, el motivo N β es necesario para la secreción de proteínas en células vegetales (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), y se demostró, además, que para la secreción usa los organelos de la vía de secreción clásica (*i.e.* RE y Golgi). Esto a pesar de que el motivo N β no tiene un perfil de alta hidrofobicidad (Fig. 18) como los péptidos señal que son reconocidos por SRP y el translocón Sec61 (Osborne *et al.*, 2005; Wickner y Schekman, 2005).

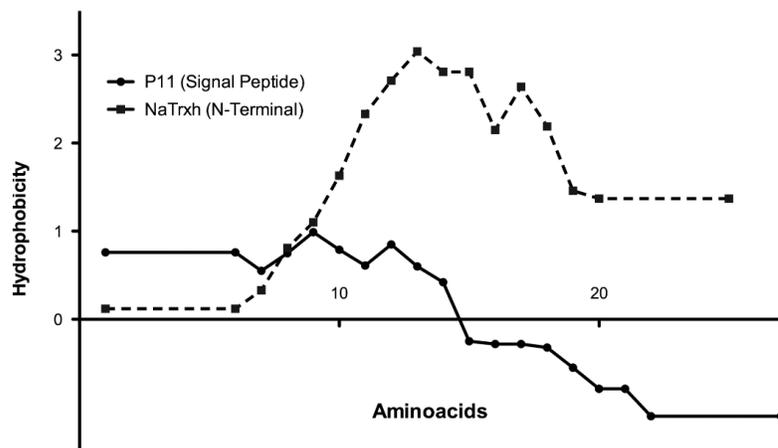


Figura 18. Perfil de hidrofobicidad del amino temrinal de la NaTrxh y de un péptido señal canónico (P11). Tomado del material suplementario de Ávila-Castañeda *et al.*, 2014.

Estas características sugieren que el motivo N β es reconocido por un sistema en particular, que si bien usa elementos de la vía convencional, como RE y Golgi, también tiene particularidades para poder reconocer tan peculiar péptido, por lo que se clasifica como un sistema no convencional de secreción.

Algunas de las posibles explicaciones a este fenómeno son las siguientes.

- 1) Al no presentar las características esenciales para ser reconocido por SRP, se propone que es reconocida por un factor diferente, pero que es capaz de realizar la función de reconocer al motivo N β y dirigir el complejo NaTrxh naciente-ribosoma-mRNA al RE para que se traduzca en su lumen. Si esto es cierto, el factor que reconocería al motivo N β parece ser exclusivo de plantas, lo que hace muy interesante al sistema.
- 2) Que ocurra una translocación postraduccion, la cual consiste tanto en levaduras como en animales, en la traducción de la NaTrxh en el citoplasma. Posteriormente, debe transportarse al RE al interactuar el polipéptido con el translocón (Sec61) independientemente de SRP y del receptor de SRP

(SRPR), la energía para este proceso es provista por un complejo proteínico adicional, Sec62 o Sec63, el cual se encuentra en la membrana del RE cerca del translocón y por la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), que tiene un dominio de unión a péptido y un dominio de ATPasa que está dentro del lumen del RE, la cual reconoce el péptido señal una vez dentro del RE. El péptido señal se une a una bomba proteica dirigida energéticamente, la cual hace pasar toda la proteína al lumen del RE. Durante el proceso de translocación, la proteína está desplegada transitoriamente (mecanismo dependiente de ATP por las Hsp70) y cuando pasa al lumen, la proteína se pliega y adopta la conformación nativa (Matlack *et al.*, 1997). Esto a su vez implicaría que el motivo N β podría estar siendo reconocido como una señal de tránsito a RE y, al no contener una señal que lo retenga como KDEL o BiP, continúa la vía de secreción. Este proceso se ha observado ampliamente en las proteínas que se direccionan a algunos organelos como mitocondrias (Schmidt *et al.*, 2010), cloroplastos (Li y Chi, 2010), lisosomas, peroxisomas (Dammai y Subramani, 2011) y núcleo (Chook y. Blobel, 2001) (Tabla 4), donde incluso se tienen identificados los residuos que funcionan como péptido de tránsito, como en el caso de la polifenol oxidasa de chirimoya (*Annona cherimola*) (AcPPO), proteína que afecta el procedimiento de pardeamiento del fruto de dicha planta y que es direccionada a cloroplasto por medio de una secuencia mínima de 50 aminoácidos denominada CLORO (Montes, 2007). Otro claro ejemplo es el del factor nuclear kB (NF-kB), que es

translocado al núcleo y su sobreexpresión está relacionada con la respuesta inflamatoria y el cáncer (Echeverri et al., 2008)

Tabla 4. Secuencias señal de tránsito que direccionan a las proteínas del citosol a diferentes organelos.
Modificado de Lodish *et. al.*, 2016.

Organelo blanco	Localización de la secuencia en la proteína	Remoción de la secuencia	Naturaleza de la secuencia
Retículo endoplasmático (lumen)	N-terminal	Sí	Núcleo de 6-12 aminoácidos hidrófobicos, a menudo precedido por uno o más aminoácidos básicos (Arg, Lys)
Mitocondria (matriz)	N-terminal	Sí	Hélice anfipática, 20-50 residuos de longitud, con Arg y residuos de Lys en un lado y residuos hidrofóbicos en el otro
Cloroplasto (estroma)	N-terminal	Sí	Sin motivos comunes; generalmente rico en Ser, Thr y pequeño residuos hidrofóbicos y pobres en Glu y Asp
Peroxisoma (matriz)	C-terminal (con más frecuencia) N-terminal (con menos frecuencia)	No	Señal de PTS1 (Ser-Lys-Leu) en el extremo C-terminal extremo; Señal PTS2 en el N-terminal
Núcleo (nucleoplasma)	Varía	No	Múltiples tipos diferentes; un motivo común incluye un segmento corto rico en residuos de Lys y Arg

- 3) Otra posibilidad es que la NaTrxh podría asociarse a los sistemas de endomembrana a través de modificaciones lipídicas. Traverso *et al.* (2013) descubrieron que la NaTrxh sufre una miristoilación de la Gly-2 en ensayos *in vitro*, lo que sugiere que NaTrxh puede ser una proteína asociada a la

membrana en plantas. Sin embargo, este escenario se descarta con los resultados que sugieren que los primeros 16 residuos de aminoácidos no son esenciales para la secreción de la NaTrxh, sino que es el dominio interno, el motivo N β , el que dirige directamente su secreción (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Sin embargo, esto nos hace pensar en un posible escenario donde la NaTrxh se asocie a la membrana del RE para su posible reconocimiento o transporte, aunque es cuestionable, ya que la secreción sigue ocurriendo sin el motivo N α .

Los estudios de secreción en plantas son complejos. Un análisis realizado con el programa Secretome ha revelado que más del 50% de las proteínas secretadas en plantas carecen de un péptido señal, determinando que son proteínas de secreción no convencional (Agrawal *et al.*, 2010). El campo de estudio de las rutas no convencionales en plantas aún está poco explorado y los estudios proteómicos revelan que la mayoría de estas proteínas están relacionadas con algún tipo de estrés o la infección por patógenos (Nickel y Seedorf, 2008). No se ha demostrado en las plantas la translocación directa de dichas proteínas a través de la membrana plasmática. Otros estudios sugieren que la secreción directa puede ser respuesta a hormonas. En tabaco, la enzima citosólica manitol deshidrogenasa (MTD), que no contiene un péptido señal, se secreta directamente al apoplasto en respuesta al ácido salicílico, hormona de defensa en plantas (Cheng y Williamson, 2010; Chung y Zeng, 2017).

Los estudios sobre las rutas no convencionales de secreción en plantas aún son escasos, lo que no sucede con *S. cerevisiae*, donde se han observado diversos factores que

han permitido dilucidar estos factores y vías alternativas de secreción, razón por la cual se decidió explorar si la levadura era capaz de secretar a la NaTrxh y así tratar de identificar su ruta de secreción. Sin embargo, lo que se encontró sugiere que *S. cerevisiae* no reconoce a esta proteína como una de secreción.

VIII. Conclusiones y perspectivas

Es posible expresar a la NaTrxh y las mutantes de su extremo amino en *S. cerevisiae* utilizando el vector de expresión pYES-DEST52.

S. cerevisiae no resultó ser un buen sistema para sobreexpresar a la NaTrxh y las distintas versiones, ya que las cantidades que se detectaron de proteína fueron muy bajas, apenas reveladas por inmunodetección, ya sea porque la secuencia 6X(His) del extremo carboxilo no favorece su expresión o que la levadura la reconozca como una proteína ajena.

No se detectó ninguna de las versiones de la NaTrxh, tanto la silvestre como las mutantes (NaTrxh, NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N β y NaTrxh Δ N $\alpha\beta$) en el espacio extracelular, lo que sugiere fuertemente que *S. cerevisiae* no reconoce a esta proteína como una proteína de secreción.

Por lo tanto, se propone que la función del motivo N β es exclusivo de células vegetales, lo que a su vez evidencia que las plantas poseen una vía diferente de secreción a lo descrito en sistemas como la levadura; sin embargo, para dar sustento a este argumento ,se propone realizar un análisis bioinformático donde se busque la frecuencia del motivo N β en proteínas de diversos organismos reportadas en la base de datos para analizar en cuáles se presentan y si es un motivo propio de células vegetales.

Además, se plantea conocer cual es el sitio mínimo del motivo N β para la dirigir la secreción de la NaTrxh en células vegetales.

IX. Bibliografía

- Agrawal G. K., N. S. Jwa, M. H. Lebru, D. Job, R. Rakwal. 2010. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10(4): 799–827.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter., J. Wilson y T. Hunt. 2015. *Molecular biology of the cell*. 6ª edición, Garland Science, Taylor & Francis Group, E.U.A.
- Alkhalifioui F., M. Renard, P. Frendo, C. Keichinger, Y. Meyer, E. Gelhaye, M. Hirasawa, D. B. Knaff, C. Ritzenthaler, F. Montrichard. 2008. A Novel Type of Thioredoxin Dedicated to Symbiosis in Legumes. *Plant Physiology* 148(1): 424-435.
- Arsozva B, U. Hoja, M. Wimmelbacher, E. Greiner, S. Ustun, M. Melzer, K. Petersen, W. Lein, Bornke, F. 2010. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 22(5): 14981515.
- Ávila-Castañeda A., J. A. Juárez-Díaz, R. Rodríguez-Sotro, C. Bravo-Alberto, C. P. Ibarra-Sánchez, A. Zavala-Castillo, Y. Cruz-Zamora, L. Martínez-Castilla, J. Márquez-Guzmán, F. Cruz-García. 2014. A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase *in vitro*. *BMC Plant Biology* 14:147.
- Baldwin T. A. y H. L. Ostergaard. 2001. Developmentally regulated changes in glucosidase II association with, and carbohydrate content of, the protein tyrosine phosphatase CD45. *The Journal of Immunology*. 167: 3829–3835.
- Baldwin T. A. y H. L. Ostergaard. 2002 The protein-tyrosine phosphatase CD45 reaches the cell surface via Golgi dependent and -independent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 50333–50340.
- Bendtsen J. D., L. J. Jensen, N. Blom, G Von-Heijne, S. Brunak. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection* 4: 349-356.
- Black S., E. M. Harte, B. Hudson, L. Wartofsky. 1960. A specific enzymatic reduction of L methionine sulfoxide and a related non specific reduction of disulfides. *The Journal of Biological Chemistry* 235: 2910-2916.
- Buchanan B. y S. Luan. 2005. Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. *Journal of Experimental Botany*. 56(416): 1439-1447.
- Centers For Disease Control. Recommendations for protection against viral hepatitis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1985; 34: 313-324, 329-335.
- Chan K. M, Y. T. Liu, C. H. Ma, M. Jayaram, S. Sau. 2013. The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: a miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid*. 70(1): 2-17.

- Cheng F.Y. y J. D. Williamson. 2010. Is there leaderless protein secretion in plants? *Plant Signaling and Behavior* 5(2):129–131.
- Chook Y. M., and G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology*. 11:703–715.
- Chung K. P., Y. Zeng. 2017. An Overview of Protein Secretion in Plant Cells. En: Jiang L. (eds) *Plant Protein Secretion. Methods in Molecular Biology*, vol 1662. Humana Press, Nueva York. 19-27 pp.
- Collin V., E. Issakidis-Bourguet, C. Marchand, M. Hirasawa, J. M. Lancelin, D. B. Knaff, M. Miginiac-Maslow. 2003. The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *Journal of Biological Chemistry* 278(26): 23747-23752.
- Collin V, P. Lamkemeyer, M. Miginiac-Maslow, M. Hirasawa, D. B. Knaff, K.J. Dietz, E. Issakidis-Bourguet. 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new γ -type. *Plant Physiology* 136(4): 4088-4095.
- Dammai V., S. Subramani. 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105:187–196.
- Durán J. M., C. Anjard, C. Stefan, W. F. Loomis, V. Malhotra. 2010. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *The Journal of Cell Biology*. 188(4): 527-536.
- Earley K., J. Haag, O. Pontes, K. Opper, T. Juenhe, K. Song, C. Pikaard. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* 45: 616-629.
- Echeverri R., P. Nancy, S. Mockus, Ismena. 2008. Factor nuclear kb (NF-KB): señalósoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 56(2): 133-146
- Egea P. F., R. M. Stroud, P. Walter. 2005. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current Opinion in Structural Biology*. 15:213–220
- Fatal N, L. Karhinen, E. Jokitalo, y M. Makarow. 2004. Active and specific recruitment of a soluble cargo protein for endoplasmic reticulum exit in the absence of functional COPII component Sec24p. *Journal of Cell Science*. 117: 1665–1673.
- Folch-Mallol J. L., A. Garay-Arroyo, F. Lledias, A. A. Covarrubias-Robles. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Latinoamericana de microbiología*. 46 (1-2): 24-46
- Foley M. y L. Tilley. 1998. Protein trafficking in malaria infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology* 28: 1671-1680.
- Francis A. y F. Path. 1989 Summary of safety and efficacy data on a yeast-derived hepatitis B vaccine. *The American Journal of Medicine*. 87: 14S-9S.
- Gaude T. y D. Cabrillac. 2001. Self-incompatibility in flowering plants: the *Brassica* model. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences III* 324(6): 537-542.
- García M. A, M. E. Sarmiento, R. Coria, L. Kawasaky, L. Ongay, A. Acosta. 2007. Expresión heteróloga de un péptido multiepitópico de células B de *M. tuberculosis* en *Saccharomyces cerevisiae*. *Vaccinmonitor*, 16(2): 15-20.

- Gelhaye E, N. Rouhier, J. Gérard, Y. Jolivet, J. Gualberto, N. Navrot, P. Ohlsson, G. Wingsle, M. Hirasawa, D. B. Knaff, H. Wang, P. Dizengremel, Y. Meyer, and J. P. Jacquot 2004. A specific form of *thioredoxin h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(40): 14545–14550.
- Gelhaye E., N. Rouhier, J.P.Jacquot. 2004. The *thioredoxin h* system of higher plants. *Plant Physiology Biochemistry*. 42: 265-271.
- Gierasch L. 1989. Signal sequences. *Biochemistry*. 28(3): 923-930.
- González V. 2010. Tráfico intracelular de proteínas. Universidad de Salamanca. Recursos en línea: <http://diarium.usal.es/vgnunez/files/2012/11/10.-Trafico-Intracelular-de-Proteinas.pdf>
- González A. y L. Valenzuela. 2002. Capítulo 16 *Saccharomyces cerevisiae* En: .Martínez Romero E, J. C. Martínez Romero. 2002. *Microbios en línea*. UNAM. México. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>
- Grundmann U., K. J. Abel, H. Bohn, H. Lobermann, F. Lottspeich, H. Kupper. 1988. Characterization of cDNA encoding human placental anticoagulant protein (PP4): Homolgy with the lipocortin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85: 3708-3712.
- Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*. 54: 237-271
- Ishiwatari Y, C. Honda, I. Kawashima, S. I. Nakamura, H. Hirano, S. Mori, T. Fujiwara, H. Hayashi, y M. Chino. 1995. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport. *Planta* 195: 456–463
- Jacquot J. P, J. Vidal, P. Gadad, P. Schürmann. 1978. Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. *FEBS Letters* 96(2): 243-246.
- Jones E. W., J. R. Pringle, and J. R. Broach. (Eds). 1992. The Molecular and Cell Biology of *Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 2. Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Nueva York.
- Juárez-Díaz J. A. 2006. NaTrxh es una tiorredoxina de secreción que reduce in vitro a la S-RNasa de *Nicotiana glauca*. Tesis doctoral. Facultad de química. UNAM. México pp113.
- Juárez-Díaz J.A., B. Mc Clure, S. Vázquez- Santana, A. Guevara-García, P. León-Mejía, J. Márquez-Guzmán , F. Cruz-García. 2006. A novel Thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase In Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 281(6): 3418-3424.
- Juschke C., A. Wachter, B. Schwappach, y M. Seedorf. 2005. SEC18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*. 169: 613–622
- Kagawa T. y M. D. Hatch. 1977. Regulation of C4 photosynthesis: characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 184(1): 290-297.

- Kajiwara S., A. Shirai, T. Fujii, T. Toguri, K. Nakamura, K. Ohtaguchi. 1996. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of ethanol tolerance and the FAD2 gene from *Arabidopsis thaliana* *Applied and environmental microbiology*. 62(12): 4304-4313.
- Kuchler K., R. E. Sterne, J. Thorner. 1989 *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *The EMBO Journal* 8(13): 3973-3984
- Laloi C., N. Rayapuram, Y. Chartier, J.M. Grienenberger, G. Bonnard, y Y. Meyer. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(24): 14144–14149.
- Laloi C, D. Mestres-Ortega, Y. Marco, Y. Meyer, J. P. Reichheld. 2004. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* 134(3): 1006-1016.
- Landy A. 1989. Dynamic, Structural, and regulatory aspects of lambda Site-specific recombination. *Annual reviews* 58: 913-949
- Laurent T.C., E.C. Moore, P. Reichard. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 3436-3444
- Leonard E., Y. Yan, K. H. Lim, M. A.G. Koffear. 2005. Investigation of two distinct flavone synthases for plant-specific flavone biosynthesis in *S. cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 71 (12): 8241-8248.
- Li H. M. y C. C. Chiu. 2010. Protein transport into chloroplasts. *Annual Review of Plant Biology*. 61:157–180
- Lodish H., A. Berk, C.A. Karier, M. Krieger, A. Breticher, H. Ploegh, A. Amon, K. C. Martin. 2016. (8^o eds) *Molecular Cell Biology*. W. H. freeman Macmillan Learning. Nueva York.400-670 pp.
- Lutomski D., M. Fouillit, P. Bourin, D. Mellottée, N. Denize, M. Pontet, D. Bladier, M. Caron, R. Joubert-Caron. 1997. Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid differentiation. *Glycobiology* 7: 1193-1199
- Malhotra V. 2013. Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *The EMBO Journal*. 32 (12): 1660-1664
- Marchand C., P. L'Marechal, Y. Meyer, M. Migoniac-Maslow, E. Issakidis-Bourguet y P. Decottignies. 2004. New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 4: 2696–2706
- Matlack K. E., K. Plath, B. Misselwitz, T. A. Rapoport. 1997. Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science*. 277(5328): 938-941
- McClure B., F. Cruz-García, C. Romero. 2011. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of botany* 1-12

- Mellor, J., M. J. Dobson, N. A. Roberts, M. F. Tuite, J. S. Emtage, S. White, P. A. Patel, A. J. Kingsman and S. M. Kingsman. 1983. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 24: 1-14.
- Menges M, L. Hennig, W. Gruissem, J. A. Murray. 2002. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277(44): 41987-42002.
- Mergías M, P. Molist, M.A. Pombal. 2014 Tráfico vesicular. En: Mergías M, P. Molist, M.A. Pombal.(5° eds) La célula: Atlas de histología vegetal y animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Mestres-Ortega D, Y. Meyer. 1999. The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* 240(2): 307-316.
- Meyer Y, J. Reichheld, F. Vignols. 2005. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynthesis Research* 86(3): 419-433.
- Mewes, H. W, K. Alberman, M. Bahr, D. Frishmann, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maieri, S. G. Oliver, F. Pfeifer, y A. Zollner. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* 387: 7-9.
- Miranda-Vizuet A. 1994. Efectos fisiológicos de la ausencia de tiorredoxina y glutarredoxina en *Escherichia coli*. Tesis doctoral en ciencias. Departamento de genética y bioquímica y departamento de biología molecular. Universidad de Córdoba, España. Córdoba, 153 pp.
- Montes C.F. 2007. Estudio de la destinación intracelular de la polifenol oxidasa de chirimoya (*Annona chorimela*) mediante la expresión transitoria de construcciones quiméricas con la proteína verde fluorescente. Tesis para conseguir el título de bioquímico. Universidad de Chile. Santiago 44 pp.
- Moore E.C., P. Reichard , L. Thelander. 1964. Enzymatic síntesis of deoxyribonucleotides. V Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 3445-3452
- Mou Z Fan W, X. Dong . 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113(7): 935-944.
- Náquira C., G. Hajar, C. Padilla. 2003. Identificación y caracterización de proteínas secretadas de *P. falciparum* en la vía alterna de secreción. Ministerio de salud. Instituto Nacional de Salud Centro de información y documentación científica.
- Nickel W, M. Sedorf. 2008. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24:287–308.
- Nickel, W. y C. Rabouille. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 148–155.
- Osborne, A. R., T. A. Rapoport, B. van den Berg. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21:529–550

- Perez V., V. D'Annunzio, C. Labonia, A. C. R. Deutsch, R. J. Gelp. 2013 Thioredoxin-1 reduces infarct size but does not improve postischemic ventricular dysfunction. *Revista Argentina de Cardiología*. 81: 202-207
- Pfalz J, K. Liere, A. Kandlbinder, K. J. Dietz, R. Oelmüller. 2006. pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18(1): 176197
- Pfeffer S. R. 2007. Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annual Review of Biochemistry* 76: 629–645.
- Pooja K., G. Stanislav, A. Daniel, M. Paul, S. Fred, H. John. 2015. 2 μ plásmido en especies de *Saccharomyces* y en *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 15(8):
- Pringle, J. R., J.R. Broach y W. E. Jones. 1993. Vol. 3. Cell Cycle and Cell Biology En: Pringle J. R., J.R. Broach y W. E. Jones. The Molecular and Cell Biology of *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York.
- Pulido P, M. C. Spinola, K. Kirchsteiger, M. Guinea, M. B. Pascual, M. Sahrawy, L.M. Sandalio, K. J. Dietz, M. Gonzalez, F. J. Cejudo. 2010. Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 61(14): 4043-4054.
- Rivas S, A. Rougon-Cardoso, M. Smoker, L. Schausser, H. Yoshioka, J. D. Jones. 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO Journal* 23(10): 2156-2165.
- Rocha M. R. 2005. Utilidad de una etiqueta de poli-Histidina para la purificación de la hormona del crecimiento bovino recombinante. Tesis de Maestría en ciencias. Facultad de Medicina. Universidad Autonoma de Nuevo León. México. pp 69
- Rubartelli A., F. Cozzolino, M. Talio, R. Sitia 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *The EMBO Journal* 9(5): 1503-1510.
- Santos A, 2006. Interleucina-15: una citocina relevante en la homeostasis linfóide y en enfermedades autoinmunes. *Biotecnología Aplicada* 23(2); 79-86
- Schmidt, O., N. Pfanner, C. Meisinger. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11:655–667
- Shi J y M. K. Bhattacharyya 1996. A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. *Plant Molecular Biology*. 32(4): 653-562
- Simková K., F. Moreau, P. Pawlak, C. Vriet, A. Baruah, C. Alexandre, L. Hennig, K. Apel, C. Laloi. 2012. Integration of stress-related and reactive oxygen species-mediated signals by Topoisomerase VI in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(40): 16360-16365
- Torres Rodríguez M. D. 2016 NaTrxh regula positivamente la actividad catalítica de la S-RNasa. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. UNAM. México. 82 pp.
- Traverse J A., C. Micallella, A. Martinez, S.C. Brown, B. Satiat-Jeunemaître, T. Meinrel, C. Giglione. 2013. Roles of N-terminal fatty acid acylations membrane compartment

- partitioning *Arabidopsis* h-type thioredoxins as a core study. *The Plant Cell*. 25: 1056-1077
- Valenzuela P, A. Medina, W. J. Rutter, G. Ammerer, y B. D. Hall. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 298(5872): 347.
- Wickner W., R. Schekman. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science* 310:1452–1456
- Wimmerlbacher M., F. Bornke 2014. Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*
- Wilson LG, T. Asahi, R. Bandurski. 1961. Yeast sulfate reducing system I. Reduction of sulfate to sulfide. *The Journal of Biological* 236: 1822182
- Zsebo K. M., H. S. Lu, J. C. Freschko, L. Goldstein, J. Dvis, K. Duker, S. V. Suggs, P. H. Lai, G. A. Bitter. 1986. Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro-alpha-factor leader region. *Journal of biological chemistry*. 261(13): 5858-5865.

Anexo 1

Amortiguador tris-acético-EDTA (TAE) 50x (1L)

Para electroforesis de DNA

- Tris 242 g
- Ácido acético glacial 57.1 mL
- EDTA 0.5M, pH8.0 100 mL

Amortiguador tris EDTA (TE) 50 x

- Tris 0.5 M, pH 8.0
- EDTA 0.05 M, pH 8.0

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

- NaCl 80.068g
 - KCl 2.013 g
 - Na₂HPO₄·7H₂O 11.527 g
- Ajustar pH a 7.3 y esterilizar.

Amortiguador de glicina 10 x (1L)

Para electroforesis de proteínas

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

Amortiguador de transferencia (1L)

- Amortiguador de corrida SDS-PAGE 10x, 100 mL
 - Metanol 200 mL
- Aforar a 1 L

Acilamida:bis-acilamida 29:1 (100 mL)

- Acilamida 29 g
 - Bis-acilamida 1.0 g
- Filtrar en membrana con un poro de 0.45 µm de diámetro
-

Solución de bloqueo (en PBS)

- Leche descremada 5 % (p/v)
- Twin 20 al 0.1%

Amortiguador separador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL (pH 8.8)

- Tris 18.17 g
- SDS al 20% 2 mL

Amortiguador apilador (SDS-PAGE, tris-glicina) – 100 mL (pH 6.8)

- Tris 6.06 g
- SDS al 20% 2 mL

Amortiguador de muestra 6X (SDS-PAGE)

- Tris HCl 0.28 M, pH 6.8
 - Glicerol al 30% (v/v)
 - SDS al 1% (p/v)
 - DTT 0.5 M
 - Azul de bromofenol al 0.0012 % (p/v)
- Separar en alícuotas y almacenar a -70°C

Amortiguador 9.5

- NaCl 0.1 M
- Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5

Amortiguador de lisis Triton SDS

- SDS al 1% (p/v)
- NaCl 100 mM
- EDTA 1mm
- Tritón X-100 al 10% (v/v)

Anexo 2

Preparación de células quimiocompetentes de E. coli

La transformación bacteriana se realizó en células competentes de *E. coli* de la cepa TOP10, para lo cual se hizo un preinóculo en medio LB el cual se dejó crecer por 12 h a 37°C. Se inoculó 50 mL de LB fresco con 5 mL del preinóculo y se incubó a 37°C, alrededor de 3 horas, hasta que alcanzó una $DO_{600}=0.6$. Una vez listo se centrifugó el medio a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C, y se decantó el sobrenadante. Se prosiguió a resuspender el botón celular en 5 mL de una solución estéril de $CaCl_2$ 100mM e incubó por 15min a 4°C. Se realizaron estos lavados 3 veces más.

Al cabo de estos se resuspendió en 5 mL de una solución estéril de $CaCl_2$ 50mM y glicerol al 20%, se hicieron alícuotas de 45 μ L que se mantuvieron guardadas a -80°C hasta que fueron utilizadas para realizar la transformación.

Se agregó el vector de entrada con los insertos correspondientes a las células competentes y permanecieron en hielo durante 30 minutos.

Transformación de bacterias por choque térmico

Después se realizó el choque térmico a 42°C por 40 seg, y se dejaron durante cinco minutos en hielo. Se prosiguió a incubar las células por 1 hora a 37°C. Una vez terminado el tiempo se transfirieron las células a una placa de LB con kanamicina (50 mg/mL) y se dejaron en la estufa a 37°C por un periodo de 12-16 horas. Se seleccionan colonias resistentes a kanamicina, ya que el vector utilizado contiene los genes que confieren la resistencia a dicho antibiótico a las células transformantes y se corroboró por PCR la presencia del inserto.

Preparación de los geles de poliacrilamida para SDS-PAGE

1. Montar el “sandwich” con dos placas de vidrio (uno tiene un rebaje de 1 mm de grosor) e introducir al soporte.
2. Hacer geles separadores con 12.5 % o 15% de acrilamida y el gel apilador con un 2.25% de acrilamida.
3. Los geles se preparan mezclando los componentes indicados en la Tabla 5 (el persulfato de amonio (PSA 20%) y el TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina) inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar)
4. Se llena el molde colocando primero el gel separador hasta unos 3 cm del borde superior del cristal corto y añadir un poco de agua destilada hasta que polimerice (20-30 min). Retirar el agua y vaciar el apilador hasta el borde del cristal corto y colocar el peine. Esperar a que polimerice.
5. Retirar con cuidado el peine al gel y lavar cuidadosamente con agua destilada. Sacar del soporte de geles el “sandwich” de placas de vidrio y montar el sistema en la cámara de electroforesis

6. Llenar con amortiguador de glicina el sistema de modo que entre en contacto con ambos extremos del gel.
7. Vaciar las muestras en los pozos y cargar en otro pozo el marcador de peso molecular.

Tabla 5. Componentes del gel de poliacrilamida.

	Gel separador		Gel apilador	
	12.5%	15%		2.25%
No. de geles	1	1	No. de geles	1
H ₂ O	1.375 mL	1 mL	H ₂ O	1
Acrilamida/bisacrilamida	1.625 mL	2 mL	Acrilamida/bisacrilamida	300 µL
Amortiguador separador	1 mL	1 mL	Amortiguador separador	444 µL
Persulfato de amonio (20%)	25 µL	25 µL	Persulfato de amonio (20%)	20 µL
TEMED	2.5 µL	2.5 µL	TEMED	5 µL