



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Caracterización de los mecanismos postraduccionales en las regiones de baja complejidad involucradas en la agregación reversible de la proteína Sbp1 en *Saccharomyces cerevisiae*”.

Tesis

Que para optar por el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

Jesús Ruiz Flores

Tutor principal

Dr. Francisco Torres Quiroz
Instituto de Fisiología Celular

Comité tutor

Dr. Roberto Coria Ortega
Instituto de Fisiología Celular

Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez
Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero 2020



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.

JURADO REVISOR

Presidente:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco (Facultad de Medicina, UNAM)

Vocales:

Dr. Roberto Hernández Fernández (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dra. Rosa Estela Navarro González (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova (Facultad de Química, UNAM)

Secretario:

Dra. Xochitl Pérez Martínez (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

AGRADECIMIENTOS

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

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

Se agradece al Dr. Roberto Coria Ortega y a los miembros de su laboratorio: la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y Abiram Eliab Olivares Reséndiz por las facilidades otorgadas con el microscopio de epifluorescencia, la asistencia y el préstamo de equipos, material y reactivos.

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

Se reconoce el apoyo técnico del Dr. Abraham Rosas Arellano para el uso de microscopía confocal.

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

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A toda mi familia, principalmente a los familiares cercanos, que siempre me ha apoyado en las buenas y en las malas situaciones que se presentan en la vida, así como seguirme alentando en conseguir mis objetivos y trabajar duro día a día.

A mi tutor el Dr. Francisco Torres Quiroz, la Dra. Paola Moreno Álvarez y todos mis profesores que he tenido durante mi vida académica, quienes se esforzaron en transmitir sus conocimientos y cuyos consejos me han ayudado a desempeñarme de la mejor manera en el ámbito escolar, como fuera de este.

A mis amigos y compañeros, todos aquellos a lo largo de mi vida, tanto quienes que se han ido, como los que aún permanecen hasta la fecha, con los cuales he compartido buenos y malos momentos y cuyo aprendizaje de estos nos ha forjado a ser lo que somos el día de hoy.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Introducción y antecedentes.....	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Agregación de proteínas.....	5
Regiones de baja complejidad (LCR).....	6
Ribonucleoproteínas (RNPs).....	9
Sbp1 (single-stranded nucleic acid-binding protein 1).....	14
Modificaciones postraduccionales.....	15
Acetilación.....	15
Fosforilación.....	16
Ubiquitinación.....	17
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19
Materiales y métodos.....	20
Cepas.....	20
Plásmidos.....	21
Fusión a γ GFP y mutaciones puntuales.....	25
Amplificación de productos de PCR.....	27
Preparación de células competentes.....	28
Transformación de levaduras.....	28
Extracción de ADN de levaduras.....	28
PCRs para confirmación de cepas.....	29
Purificación de productos de PCR.....	30
Observación de formación de gránulos en condiciones de estrés.....	30

Inducción de formación de gránulos por condiciones de estrés y fijación de células.....	30
Ensayo de viabilidad (ensayo de diluciones seriadas).....	30
Ensayo de viabilidad en medios respiratorios.....	31
Ensayo de reversibilidad de mutaciones.....	31
Extracción de proteínas de levaduras.....	31
Western Blot.....	32
Medios y soluciones.....	33
Resultados.....	36
Discusión.....	69
Conclusiones.....	75
Perspectivas.....	75
Referencias.....	76
Anexo.....	81

ABREVIATURAS

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (por sus siglas en inglés: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (por sus siglas en inglés: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

GFP: Proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés: *Green fluorescent protein*)

KAT: Lisina acetiltransferasa (por sus siglas en inglés: *Lysine acetyltransferase*)

KDAC: Lisina deacetilasa (por sus siglas en inglés: *Lysine Deacetylase*)

LCR: Regiones de Baja Complejidad (por sus siglas en inglés: *Low Complexity Regions*)

mRNA: ARN mensajero (por sus siglas en inglés: *Messenger RNA*)

NAT: N-acetiltransferasa (por sus siglas en inglés: *N-acetyltransferase*)

PAIL: Predicción de acetilación en lisinas internas (por sus siglas en inglés: *Prediction of Acetylation on Internal Lysines*)

P-bodies: Cuerpos de procesamiento (por sus siglas en inglés: *Processing bodies*)

PMSF: Fluoruro de metilfenilsulfonio (por sus siglas en inglés: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*)

PTMs: modificaciones postraduccionales (por sus siglas en inglés: *Post-Translational Modifications*)

RNPs: Ribonucleoproteínas

Sbp1: Proteína de unión a ácidos nucleicos de hebra sencilla 1 (por sus siglas en inglés: *Single-stranded nucleic acid-binding protein 1*)

SDS: Dodecilsulfato de Sodio (por sus siglas en inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (por sus siglas en inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel*)

SG: Gránulos de estrés (por sus siglas en inglés: *Stress Granules*)

WT: Cepa silvestre (por sus siglas en inglés: *Wild type*)

YPD: medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa (por sus siglas en inglés: *Yeast extract, Peptone and Dextrose*)

RESUMEN

La célula ha desarrollado diferentes mecanismos para afrontar condiciones adversas durante su ciclo de vida. Una de estas estrategias es la formación de ribonucleoproteínas (RNPs) o gránulos, compuestos por mRNA y proteínas, los cuales ayudan a la célula a detener la traducción y proteger mRNAs importantes hasta que se presenten condiciones más favorables. En levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, una condición de estrés es la falta de nutrientes, como respuesta a esto, la célula forma RNPs conocidos como P- bodies (por sus siglas en inglés: processing bodies). Los P-bodies son agregados de mRNA (reprimidos mientras se llevaba a cabo la traducción) y diversas proteínas que degradan el mRNA. Una de estas proteínas es Sbp1 (por sus siglas en inglés: single-stranded nucleic acid-binding protein-1). Se ha demostrado que Sbp1 permanece soluble en el núcleo y en el citoplasma durante la fase exponencial de crecimiento de la célula, y bajo condiciones de estrés, como la falta de glucosa, se agrega en RNPs citoplásmicos. Esta proteína presenta en su secuencia una región conocida como LCR (por sus siglas en inglés: low complexity region) en la cual se han reportado, hasta la fecha, tres aminoácidos con modificaciones postraduccionales, los cuales pueden estar relacionados con la regulación de la agregación de la proteína. En este trabajo se observó que en *S. cerevisiae*, la ubiquitinación de la lisina (K) 292 en Sbp1 es importante en la regulación de dicha agregación. Cuando se mutó el aminoácido por glutamina (Q), que mimetiza acetilación, la célula mostró un menor número de gránulos en condiciones de estrés y se comportó como la cepa silvestre. Cuando la lisina fue mutada por arginina (R), la célula mostró un mayor número de gránulos y su viabilidad disminuyó, también se presentaron fallas en la respiración celular. Estos resultados sugieren que las modificaciones postraduccionales en la proteína Sbp1 están involucradas en la regulación de la formación de agregados y el metabolismo energético.

ABSTRACT

The cell has developed different mechanisms for facing adverse conditions during their life cycle. One of these strategies is the formation of ribonucleoprotein (RNP) complexes or granules, composed by mRNA and proteins that helps the cell to repress translation and protect those vital mRNAs until more favorable conditions. These granules can be found in both, nucleus and the cytoplasm of the cell. In yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, one of such stressful condition for cells is the nutrient deprivation; in response of this, the cell forms some RNPs known as processing bodies (P-bodies). The P-bodies are aggregates of translationally repressed mRNA and are composed of several proteins related to mRNA decay machinery. One of these proteins is the single-stranded nucleic acid-binding protein (Sbp1). It has been demonstrated that Sbp1 remains soluble in the nucleus and cytoplasm during exponential growth, and under stressful conditions, such as lack of glucose, it aggregates in cytoplasmic RNPs. The protein Sbp1 shows a low complexity region (LCR) in its sequence, where it has been reported some post-translational modifications (PTM) that can be related with the regulation of protein aggregation. In this work we observed that in *S. cerevisiae*, the ubiquitination of lysine (K) 292 in Sbp1 plays an important role in this regulation. When we mutated this amino acid for glutamine (Q), which mimics acetylation, the cells showed less granules during glucose deprivation and mimicked the wild type strain. When lysine was mutated for arginine (R), the cells showed more granules and it diminished its viability, also cellular respiration was affected. These results suggest that post-translational modifications in Sbp1 protein are involved in aggregates and energetic metabolism control.

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae es un organismo eucarionte que pertenece al reino Fungi. Es una levadura que ha sido utilizada como un modelo clásico de estudio en diferentes campos de la ciencia. El genoma de *S. cerevisiae* se compone de ~12 Mbp y 6275 genes organizados en 16 cromosomas (Goffeau, et al. 1996), incluso fue el primer genoma eucarionte secuenciado. Esta levadura (Figura 1) es uno de los modelos más adecuados para el estudio de sistemas biológicos ya que tiene muchas ventajas técnicas, tienen requerimientos nutricionales muy simples y presenta un crecimiento rápido en condiciones normales de laboratorio, además de la dispersión de células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes. También destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de DNA. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con requerimientos mínimos de bioseguridad. Además, se utiliza para estudiar diferentes vías de señalización en organismos superiores como los humanos. También es un microorganismo que tiene muchas otras aplicaciones, como en la industria biotecnológica y alimentaria (Rogov, et al. 2018)

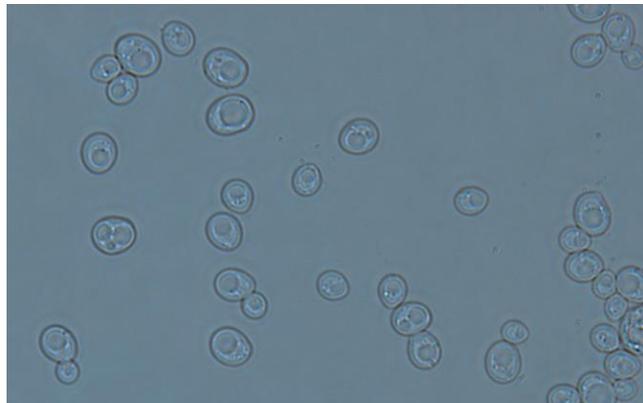


Figura 1. Células de *S. cerevisiae*. Levaduras vistas en microscopio de epifluorescencia (100X).

Agregación de proteínas

En un estudio realizado por Narayanaswamy, et al. 2009, se fusionaron aproximadamente 800 proteínas de *S. cerevisiae* con GFP, de las cuales se identificaron 180 que se agregaban cuando la célula entraba en fase estacionaria (Figura 2). Cuando la célula regresaba a un medio completo, los gránulos desaparecían, lo que indicaba que la formación de estos agregados era reversible.

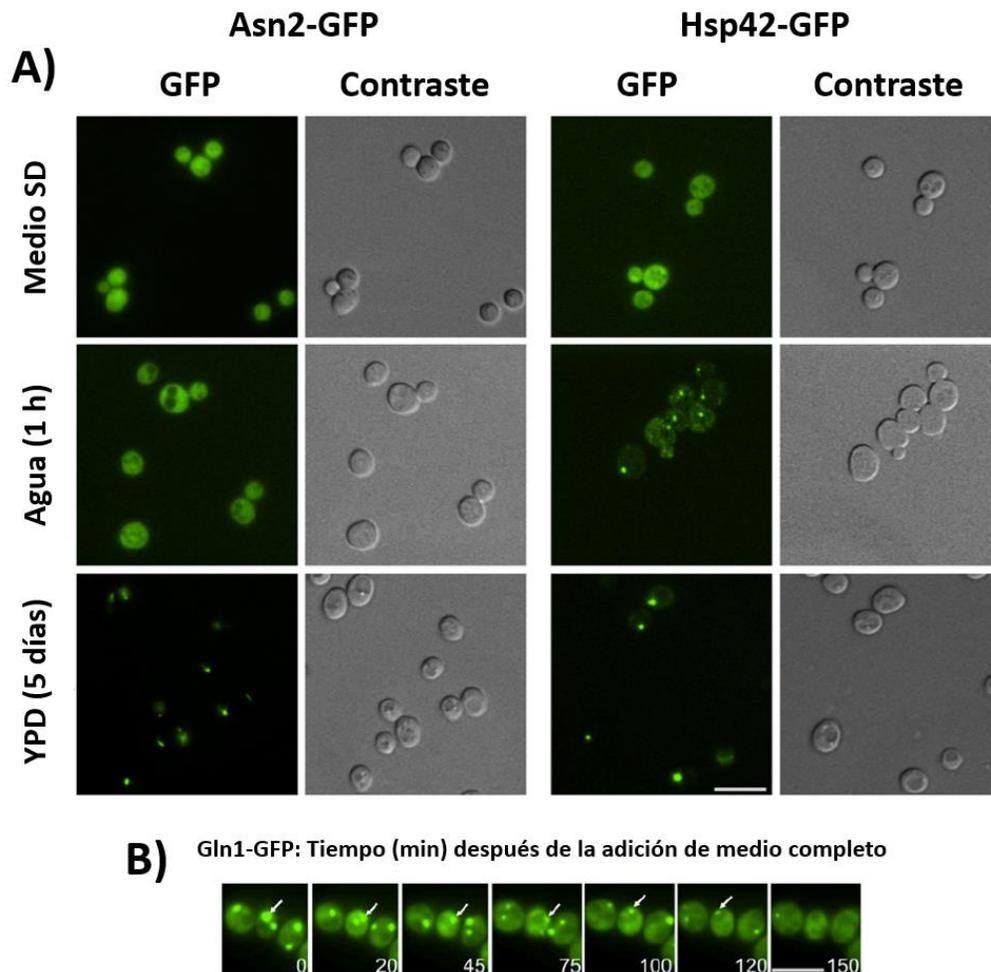


Figura 2. Proteínas de *S. cerevisiae* que forman agregados en fase estacionaria. A) La proteína asparagina sintetasa (Asn2) y proteína de choque térmico (Hsp42) forman agregados en condiciones de estrés en fase estacionaria. **B)** Estas proteínas se desagregan cuando la célula volvía a condiciones favorables en medio completo, en este caso con la proteína glutamina sintetasa (Gln1). Tomada y modificada de Narayanaswamy, et al. 2009.

En otro estudio (Saad, et al. 2017) se trabajó con la proteína piruvato cinasa de levadura (Cdc19). Se demostró que presentaba formación de agregados por la falta de fuente de carbono, independientemente de la falta de fuente de nitrógeno (Figura 3).

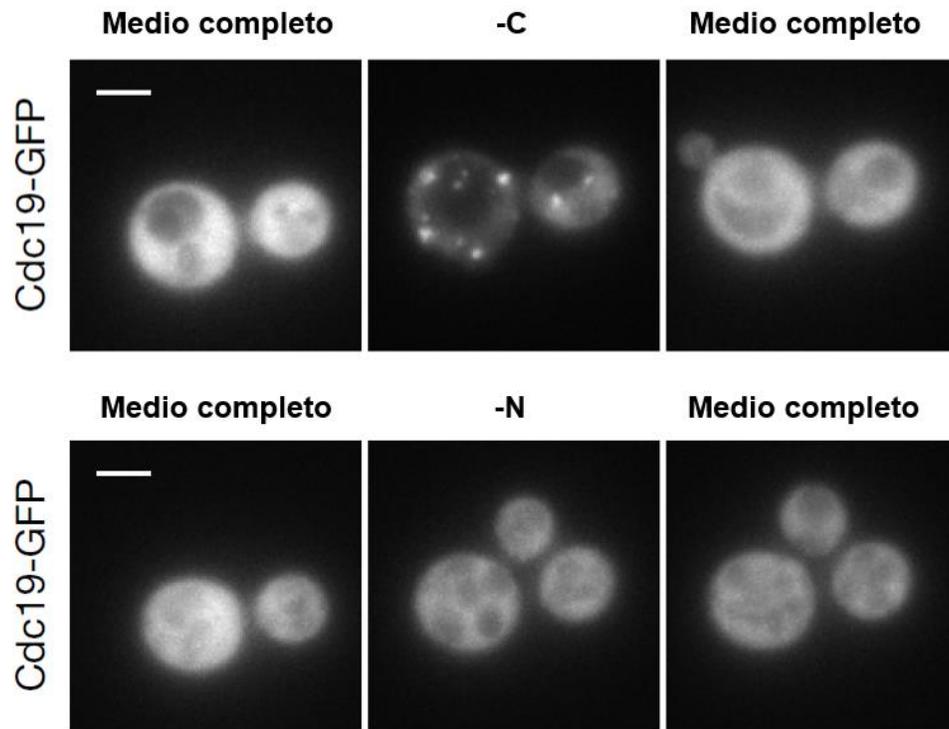


Figura 3. Proteína piruvato cinasa (Cdc19) de *S. cerevisiae*. Se demostró que la proteína piruvato cinasa presentaba formación de agregados por la falta de fuente de carbono, pero no por la falta de fuente de nitrógeno. Tomada y modificada de Saad, et al. 2017.

En dicha proteína se identificó en su secuencia una región conocida como “Región de baja complejidad” (Low complexity region, por sus siglas en inglés, LCR).

Regiones de baja complejidad (LCR)

Las regiones de baja complejidad son secuencias en las proteínas que se caracterizan por tener una baja diversidad de aminoácidos. Estas regiones pueden presentar diferentes configuraciones, desde un solo aminoácido o unos cuantos, de forma repetida y periódicamente (Coletta, et al. 2010) [Figura 4].

MSFYQPSLSLYDVLNALSNTGQ**RGQQG YPRQPQRP QRYHPHYGQVHVGGHPR**
HHPLYSRNGVPNT**YYYQFPGQAYYY SPEYG YDDEDGEEEDQDEDMVGDSGTTR**
QEDGGEDSNSRRYPSYYHCNTARNNRNTNQQANSLNDLLTALIGVPPYEGTEPEI
EANTE**QEGEKGEKDKKDKS EAPKEEA**GETNKEKPLNQLLEESRPPLAKKSSSF
AHLQAPSPIPDPLQVSKPETRMD**LPFSP EVNVYDTE**DTYVVV**LALPGAN**SRAFH
IDYHPSSHEMLIKGKIEDRVG**IDKFLK ITELKYGAFERTVKFP VLPRIKDEEI**
KATYNNGLLQIKVPKIVNDTEKPKPK**KRIAIEEIPDEELEFEENPNPTVEN**

Figura 4. Regiones de baja complejidad en la proteína heat shock protein 42 (Hsp42) de *S. cerevisiae*. Se muestra en rojo los LCRs de la proteína Hsp42, la longitud y composición de aminoácidos varía entre una región y otra. En azul se muestra la región globular de dicha proteína.

Se cree que la presencia de los LCRs es importante para la función biológica de la proteína, aunque todavía se investiga al respecto, ya que muchas proteínas que presentan estas regiones son difíciles de cristalizar (Verstrepen, et al. 2005). También se ha propuesto que los LCRs juegan un papel importante en la regulación de la agregación de proteínas (Das, et al. 2014; Höhfeld, 2017).

Se demostró que el LCR de la proteína Cdc19 era importante para la regulación de la formación de los agregados. Se fusionó el LCR de la piruvato cinasa a GFP se observó la formación de agregados en fase estacionaria. Cuando se adicionó glucosa y cicloheximida (inhibidor traduccional) al medio, se observó la desaparición de dichos gránulos (Figura 5), como ya se había demostrado anteriormente (Saad, et al. 2017). Dicho fenómeno indica que la desagregación es independiente de la síntesis de proteínas, es decir, el desensamble no se debe a que los mRNAs que conforman los gránulos son sintetizados.

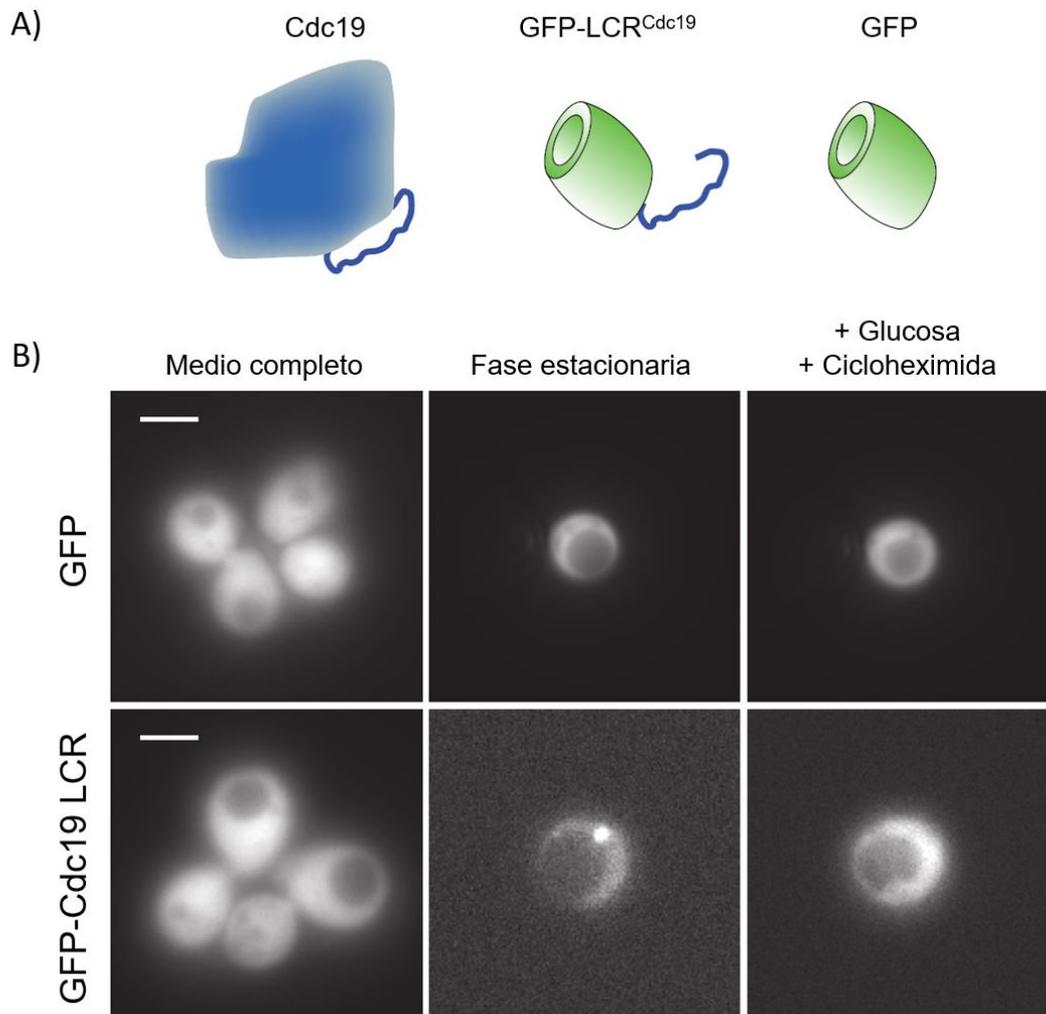


Figura 5. El LCR de la proteína piruvato cinasa (Cdc19) es importante para la formación de agregados. A) El LCR de la proteína piruvato cinasa fue fusionado a GFP. **B)** Las células se dejaron creciendo hasta que llegaron a la fase estacionaria. Posteriormente al medio se le agregó glucosa y cicloheximida (represor de la traducción). Tomada y modificada de Saad, et al. 2017.

Posteriormente se describió que esta proteína presentaba, en su LCR, aminoácidos con modificaciones postraduccionales, específicamente fosforilaciones (Thr372, Thr376, Ser377 y Ser385), las cuales se mutaron por alaninas (Ala) para evitar su fosforilación, y por ácido aspártico (Asp) para mimetizar dicha modificación postraduccionales. El número de agregados fue mayor con las mutaciones de alanina, aproximadamente un 70% de las células, mientras que el control silvestre presentaba alrededor del 50%. El número de agregados con la mutación de ácido aspártico fue menor al 10% de las células (Figura 6).

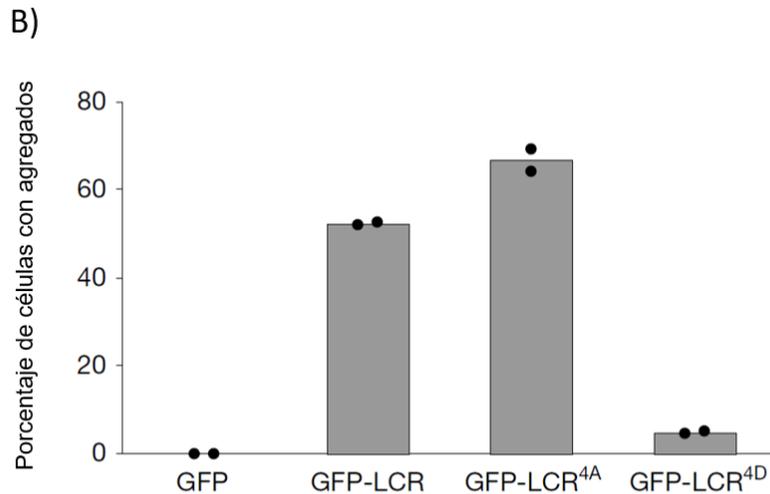
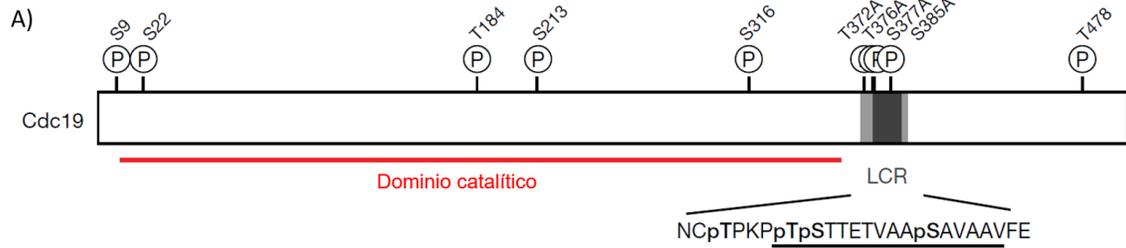


Figura 6. Se realizaron mutaciones puntuales en el LCR de la proteína piruvato cinasa (Cdc19). **A)** La proteína presentaba fosforilaciones en su LCR (Thr372, Thr376, Ser377 y Ser385) los cuales se mutaron por alaninas (Ala) para evitar su fosforilación y por ácido aspártico (Asp) para mimetizar dicha fosforilación. **B)** El número de agregados fue mayor con las mutaciones de alanina, aproximadamente un 70% de las células, mientras que el control silvestre presentaba alrededor del 50%. El número de agregados con la mutación de ácido aspártico fue menor al 10% de las células. Tomada y modificada de Saad, et al. 2017.

Los resultados de esa investigación indicaron que las fosforilaciones en el LCR de la piruvato cinasa podrían estar desempeñando un papel importante en la regulación de su agregación.

Ribonucleoproteínas (RNPs)

Las células eucariontes han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten regular su expresión génica como respuesta a diversas condiciones ambientales, tanto adversas como benéficas, y de esta manera puedan sobrevivir. Bajo condiciones de estrés, como la escasez de nutrientes, la célula presenta la formación de agregados, conformados de ARN mensajero (por sus siglas en inglés,

mRNA) y proteínas, principalmente aquellas de la maquinaria de traducción. Estos gránulos son conocidos como ribonucleoproteínas (RNPs), los cuales pueden encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo (Mao, et al. 2011) [Figura 7]. En la actualidad se han descrito diferentes tipos de RNPs, algunos son gránulos nucleares como los cuerpos de Cajal (en inglés, CB, Cajal bodies) y Paraspeckles; otros son gránulos citoplásmicos, como los gránulos de estrés (en inglés, SG, stress granules) y cuerpos de procesamiento (en inglés, PB, P-bodies) [Spector, 2006]. Los P-bodies son agregados citoplásmicos que están asociados con la represión traduccional y degradación de mRNAs (Parker, et al. 2007). Contienen mRNAs no traducidos, represores traduccionales y la maquinaria necesaria para remover la 7-metilguanosa del extremo 5' (conocida como cap) de los mRNAs (Tabla 1), además de la exonucleasa 5'-3' Xrn1 (Buchan, et al. 2008). Esta agregación de proteínas parece estar involucrada en la preservación de funciones y energía en la célula bajo las condiciones de estrés celular (Shah, et al. 2013).

Los P-bodies son estructuras conservadas, presentes en levaduras, plantas, nemátodos, moscas y células de mamíferos (Anderson, et al. 2006), el tamaño de estos agregados puede variar desde 100 hasta 300 nm. En *S. cerevisiae*, la formación de P-bodies pueden inducirse sobre expresando o limitando alguno de los componentes de estos agregados, o exponiendo a las levaduras a alguna condición de estrés, como la privación de glucosa o un choque hipotónico (Eulalio, et al. 2007).

Como ya se ha mencionado, estos agregados presentan la maquinaria de degradación de los mRNAs. Es en los gránulos donde se lleva a cabo esta degradación, aunque también llega a ocurrir en el citoplasma de la célula. La formación de estos gránulos es reversible, ya que se ha demostrado que los mRNAs llegan a salir de estos agregados para volver al proceso de traducción (Parker, et al. 2007).

Por otro lado, los gránulos de estrés son gránulos dinámicos y reversibles, se forman en respuesta al estrés ambiental y se desagregan cuando la célula se encuentra en condiciones favorables. Las proteínas y el mRNA se agregan cuando el inicio de la traducción se inhibe por algún fármaco o por respuesta a estrés, como

altas temperaturas o estrés oxidativo. Los mRNAs mensajeros que se encuentran en polisomas siendo traducidos no pueden agregarse en gránulos de estrés, sólo aquellos que están a punto de iniciar su traducción (Protter, et al. 2016). Los P-bodies y gránulos de estrés interactúan entre ellos y el citoplasma, intercambiando componentes y realizando sus respectivas funciones dependiendo de los diferentes requerimientos celulares (Figura 8).

Una característica que distingue a los gránulos de estrés de los P-bodies es que los gránulos de estrés contienen factores de inicio de la traducción y las proteínas de las subunidades ribosomales 40S. Además, algunas proteínas son encontradas exclusivamente en los gránulos de estrés como los factores eIF3 y eIF4G, las proteínas PABP y G3BP (Tabla 1). Por el contrario, las proteínas DCP1, DCP2 y GW182 se encuentran exclusivamente en los P-bodies, lo que indica que los gránulos de estrés y los P-bodies son funcionalmente distintos (Eulalio, et al. 2007).

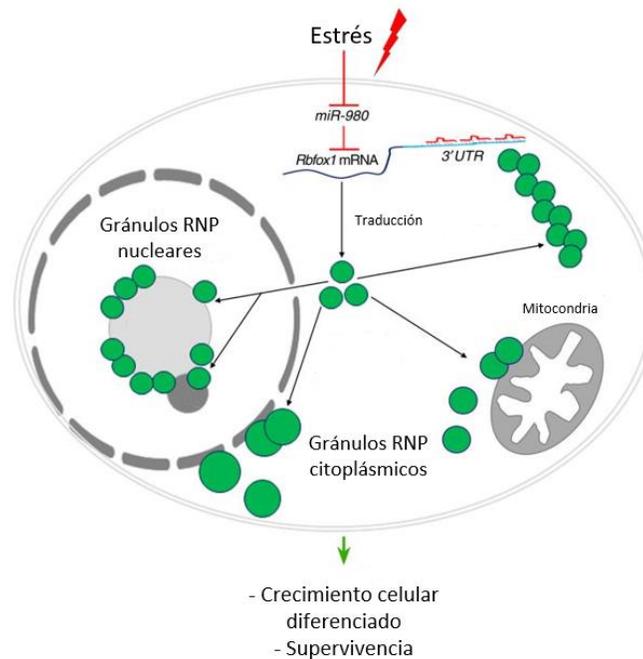


Figura 7. Localización de ribonucleoproteínas (RNPs) en la célula. Tomada y modificada de Kucherenko, et al. 2018.

Nombre	Función	Referencia
Componentes encontrados predominantemente en P-bodies		
Complejo Ccr4/Pop2/Not	Desadenilasa	Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004
Dcp1	Enzima que remueve cap	Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004
Dcp2	Enzima que remueve cap	Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004
Edc1 y Edc2	Activadores de remoción de cap	Neef and Thiele 2009
Edc3	Activador de remoción de cap	Kshirsagar and Parker 2004; Fenger-Gron et al. 2005
eIF4E-T	Represor traduccional	Andrei et al. 2005; Ferraiuolo et al. 2005
eRF1 and eRF3	Terminación de traducción	Buchan et al. 2008
GW182	Función de miRNA	Eystathioy et al. 2003
Hedls/Ge-1	Activador de remoción de cap	Fenger-Gron et al. 2005; Yu et al. 2005
Lsm 1-7 complex	Activador de remoción de cap	Ingelfinger et al. 2002; Sheth and Parker 2003
Pat1/PatL1	Represor traduccional	Sheth and Parker 2003; Scheller et al. 2007
Upf1-3	Vía NMD	Sheth and Parker 2006; Durand et al. 2007
Componentes encontrados predominantemente en gránulos de estrés		
Subunidad 40S ribosomal	T raducción	Kedersha et al. 2002; Grousl et al. 2009
Ataxina-2/Pbp1	T raducción/procesamiento RNA	Nonhoff et al. 2007; Buchan et al. 2008
DDX3/Ded1	Helicasa de RNA	Chalupnikova et al. 2008; Lai et al. 2008
eIF2 α	Inicio de la traducción	Kedersha et al. 2002; Kimball et al. 2003
eIF3	Inicio de la traducción	Kedersha et al. 2002; Grousl et al. 2009
eIF4A	Inicio de la traducción	Low et al. 2005; Buchan et al. 2011
eIF4B	Inicio de la traducción	Low et al. 2005; Buchan et al. 2011
eIF4G	Inicio de la traducción	Kedersha et al. 2005; Hoyle et al. 2007
FMRP	Represor traduccional	Mazroui et al. 2002; Kim et al. 2006
G3BP	Endoribonucleasa	Tourriere et al. 2001
Pabp	Proteína de unión a poli-A	Kedersha et al. 1999; Hoyle et al. 2007
RACK1	Proteína de señalización	Arimoto et al. 2008
TIA-1/TIAR/Pub1/Ngr1	Represor traduccional	Kedersha et al. 1999; Buchan et al. 2008
Componentes encontrados en ambos, P-bodies y en gránulos de estrés		
Proteínas argonauta	Función de miRNA	Sen and Blau 2005; Leung et al. 2006
Dhh1/Rck/p54	Represor traduccional	Sheth and Parker 2003; Wilczynska et al. 2005
eIF4E	Iniciador traduccional	Andrei et al. 2005; Ferraiuolo et al. 2005;
FAST	Activador de Fas	Kedersha et al. 2005
Rap55/Scd6	Represor traduccional	Yang et al. 2006; Teixeira and Parker 2007
Xrn1	Exonucleasa 5'-3'	Sheth and Parker 2003; Kedersha et al. 2005

Tabla 1. Proteínas que componen los P-bodies y gránulos de estrés. Tomada y modificada de Decker, et al. 2012

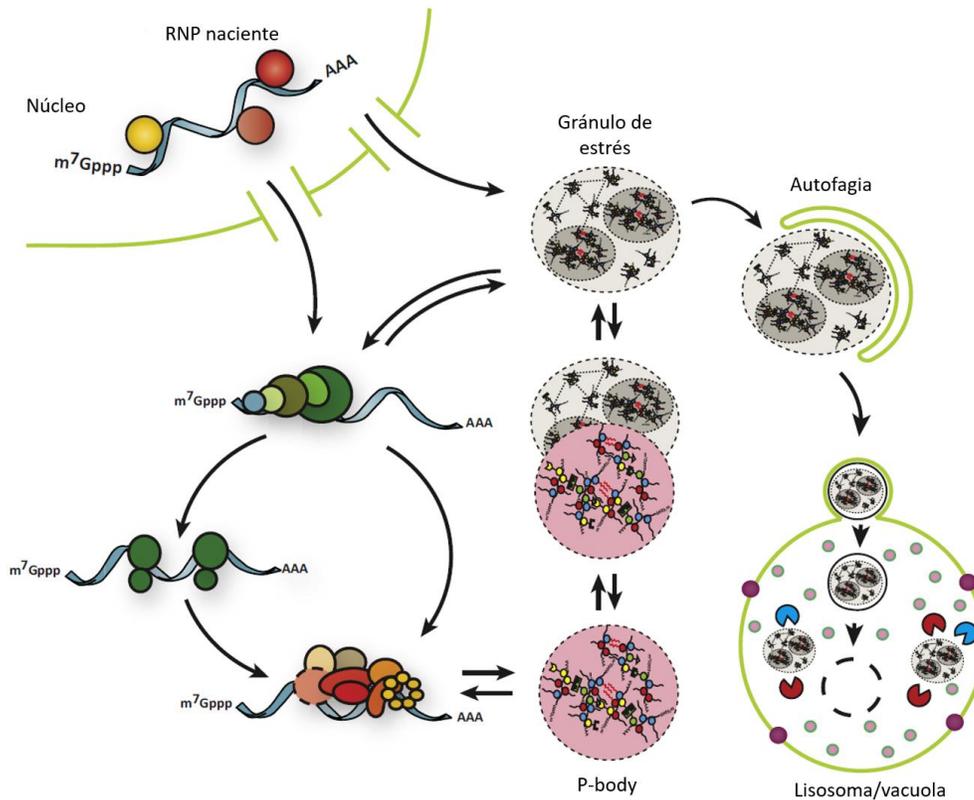


Figura 8. Interacción de gránulos de estrés y P-bodies. Los gránulos de estrés y los P-bodies pueden interactuar, intercambiar componentes entre ellos o con el citoplasma y llegar a degradarse por autofagia. Tomada y modificada de Protter, et al. 2016

En el estudio de Saad, et al. 2017 se demostró que el LCR de la proteína Sbp1 de *S. cerevisiae* también formaba gránulos reversibles bajo condiciones de estrés independientes de la síntesis de proteínas (Figura 9).

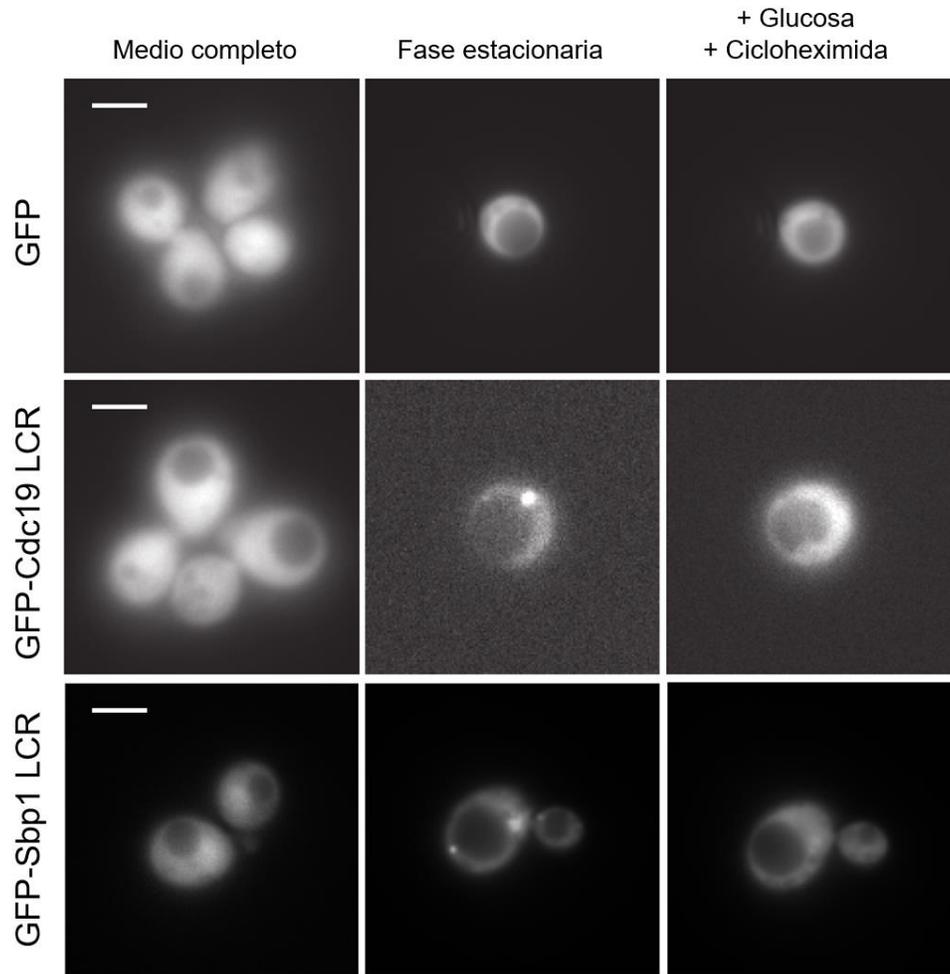


Figura 9. El LCR de la proteína Sbp1 también formaba RNPs. Se fusionó el LCR de la proteína Sbp1 a GFP, como ya se había realizado con la proteína Cdc19, y se observó su agregación en fase estacionaria. Al momento de cambiar las células a un medio fresco junto con cicloheximida, que es un represor traduccional, los agregados desaparecieron. Tomada y modificada de Saad, et al. 2017.

Sbp1 (Single-stranded nucleic acid-binding protein 1)

Sbp1 es una proteína citoplásmica que se une a eIF4G y promueve la represión traduccional de los mRNA bajo condiciones de estrés por falta de glucosa. Se ha reportado que presenta interacción con más de mil mRNAs, muchos de ellos pertenecen a diferentes vías celulares muy importantes, como la glucólisis, fosforilación oxidativa, etc (<https://www.yeastgenome.org/>). También se ha descrito que forma parte de los P-bodies y gránulos de estrés citoplásmicos (Mitchell, et al. 2013). Tiene una longitud de 294 aminoácidos, un peso aproximado de 32.99 kDa y presenta una región RGG entre los residuos 131-151 que es de unión a RNA y

dos regiones de LCR, una comprende los aminoácidos 125-170 y la segunda del 280-294 (<https://www.uniprot.org/>). De acuerdo con la base de datos, <http://yaam.ifc.unam.mx/>, en el segundo LCR presenta tres aminoácidos con modificaciones postraduccionales: fosforilación en la treonina (Thr) 287 y serina (Ser) 289 y una ubiquitinación en la lisina (Lys) de la posición 292 (Figura 10).



Figura 10. Proteína Sbp1. La proteína está compuesta de 294 aminoácidos, un peso aproximado de 32.99 kDa y presenta dos regiones de LCR, una comprende los aminoácidos 125-170 y la segunda del 280-294. En el segundo LCR presenta tres aminoácidos con modificaciones postraduccionales, una treonina (Thr) y una serina (Ser) en la posición 287 y 289, respectivamente, que presentan fosforilación y una lisina (Lys) en la posición 292 que presenta ubiquitinación.

Modificaciones postraduccionales

Una modificación postraduccional es una modificación bioquímica que ocurre en uno o varios aminoácidos de una proteína, durante o después que esta ha sido traducida por el ribosoma (Bürkle, 2001). Estas modificaciones consisten básicamente en la adición covalente o la remoción de grupos de bajo peso molecular a ciertos aminoácidos, algunos ejemplos de estos cambios son la acetilación, biotilación, glicosilación, hidroxilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, entre muchas otras más. Algunas de las modificaciones llegan a ser reversibles y son catalizadas por enzimas que reconocen secuencias específicas en las proteínas. La gran mayoría de estos cambios resultan ser fundamentales para la regulación del plegamiento de las proteínas, su interacción con ligandos u otras proteínas, e incluso sus funciones, por ejemplo, su actividad catalítica (Bürkle, 2001).

Acetilación

La acetilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes en eucariontes, en la cual, el grupo acetilo de la molécula acetil coenzima A se transfiere a un sitio específico dentro de una cadena polipeptídica

(Drazic, et al. 2016). Al conjunto de proteínas acetiladas se le conoce como acetiloma. La acetilación ocurre de dos maneras diferentes, la primera consiste en que las proteínas son acetiladas al mismo tiempo que son traducidas (en humanos esto ocurre con 80-90% de todas las proteínas), aunque también se ha demostrado que esto ocurre después de la traducción (Arnesen, et al. 2009). El otro tipo de acetilación ocurre en el grupo amino ϵ de las lisinas (Figura 11) cuya reacción es catalizada por las lisinas acetiltransferasas (KATs, por sus siglas en inglés, lysine [K] acetyltransferases) [Allis, et al. 2007].

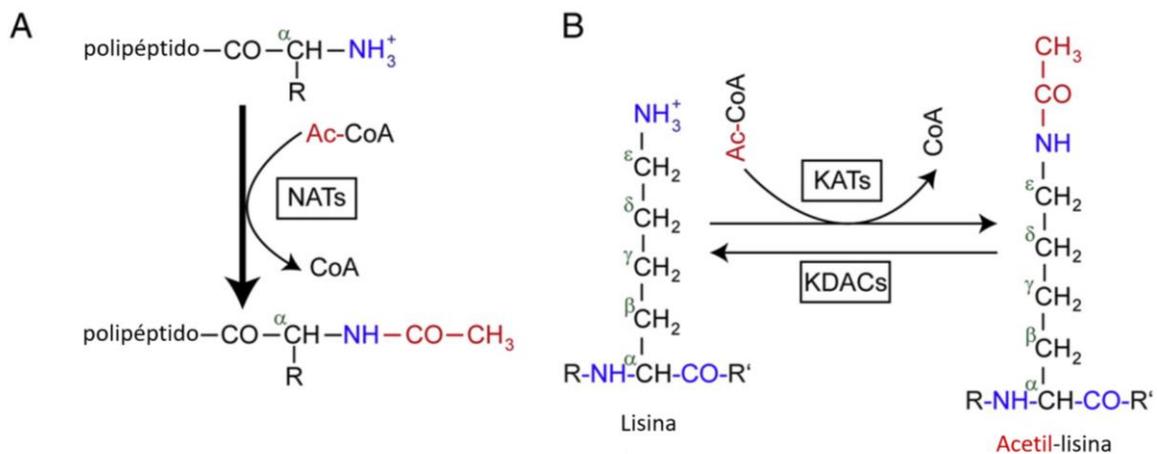


Figura 11. Acetilación de proteínas. **A.** Acetilación de las proteínas al mismo tiempo que van siendo sintetizadas, se utiliza el grupo acetilo del acetyl coenzima A. **B.** Acetilación de las proteínas por medio del grupo amino ϵ de las lisinas. Tomada y modificada de Drazic, et al. 2016. **NAT:** N-acetyl transferasa, **KAT:** lisina acetyl transferasa, **KDAC:** lisina deacetylase.

Fosforilación

La fosforilación de proteínas es la modificación postraduccional más estudiada en la transducción de señales. Está involucrada en todos los procesos celulares, como metabolismo, crecimiento, división, diferenciación, movilidad, transporte de membranas, contracción muscular, inmunidad, etc. Es realizada por una enzima conocida como protein cinasa la cual cataliza la transferencia del fosfato- γ del ATP a aminoácidos específicos en las proteínas (Figura 12). En eucariontes estos aminoácidos son comúnmente serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr) en contextos determinados (Ubersax, et al. 2007).

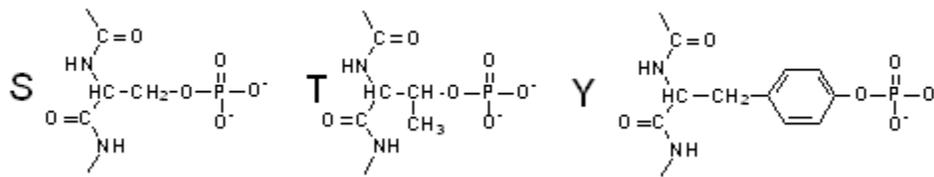


Figura 12. Fosforilación de proteínas. La fosforilación es realizada por la enzima protein cinasa, la cual cataliza la transferencia del fosfato-γ del ATP a aminoácidos específicos en las proteínas.

La treonina (Thr) y serina (Ser) en la posición 287 y 289, respectivamente, del segundo LCR de la proteína Sbp1 presentan fosforilación.

Ubiquitinación

La modificación de proteínas por la unión covalente de ubiquitina es un proceso de regulación que ocurre en todas las células eucariontes. La ubiquitinación tiene como función principal marcar las proteínas que serán destinadas hacia el proteosoma para ser degradadas (Belle, et al. 2006). Sin embargo, la unión de ubiquitina tiene también otras funciones, como la reparación del ADN, exportación del mRNA, remoción de proteínas de complejos proteicos, etc. Todas estas diferentes funciones están controladas por la propia proteína ubiquitina. Ya que una sola proteína no es suficiente, se forman cadenas y ramificaciones de ubiquitinas. La ubiquitina se une mediante su extremo carboxilo al grupo amino ε los residuos de lisina. La proteína ubiquitina tiene en su estructura siete lisinas (K6, K11, K27, K29, K33, K48, y K63) a las cuales pueden unirse otras ubiquitinas, formando cadenas de poliubiquitinas de diferente longitud, las cuales se asocian a diferentes funciones en la célula (Figura 13), por ejemplo, cadenas en la lisina 48 se relacionan con la degradación de proteínas, mientras que cadenas en la lisina 63 se asocian con reparación de ADN (Finley, et al. 2012).

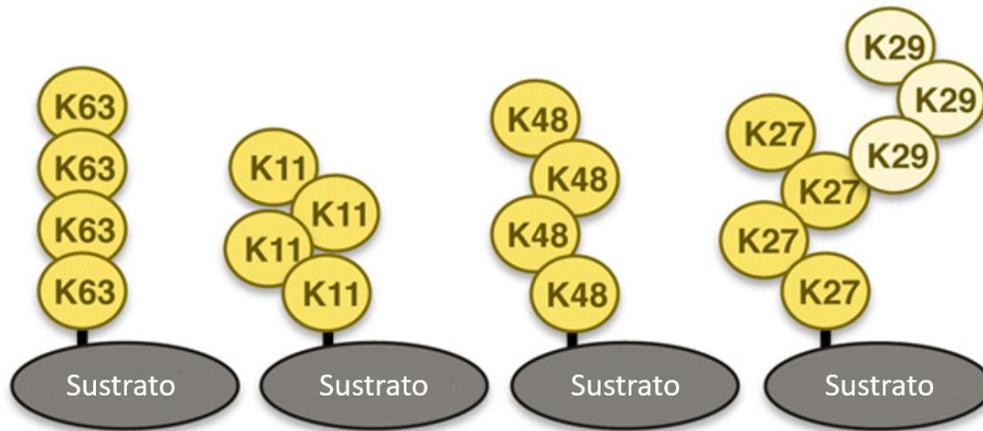


Figura 13. Ubiquitinación de proteínas. La proteína ubiquitina tiene en su estructura siete lisinas (K6, K11, K27, K29, K33, K48, y K63) a las cuales pueden unirse otras ubiquitinas, formando cadenas de poliubiquitinas de diferente longitud, las cuales se asocian a diferentes funciones celulares. Tomada y modificada de Finley, et al. 2012.

Se ha reportado que la lisina (Lys) en la posición 292 del segundo LCR de la proteína Sbp1 presenta ubiquitinación.

Hasta el momento no se ha estudiado si las modificaciones postraduccionales en el LCR de la proteína Sbp1 son importantes para la regulación de su agregación.

JUSTIFICACIÓN

Los resultados del estudio de Narayanaswamy, et al. 2009 demuestran que varias proteínas de *S. cerevisiae* se agregan de forma reversible en condiciones de estrés por falta de fuente de nutrientes. En el estudio de Saad, et al. 2017, se demostró que la agregación de la proteína piruvato cinasa, Cdc19, se relacionaba con su LCR. Esta región contenía aminoácidos con modificaciones postraduccionales, específicamente treoninas y serinas, los cuales se fosforilaban. Al mutar estos aminoácidos se obtuvo una diferencia significativa en la formación de agregados. Hasta la fecha es el único estudio que sugiere una relación directa entre las modificaciones postraduccionales y la agregación de proteínas.

La proteína Sbp1, la cual se une a mRNA en condiciones de estrés por falta de nutrientes, presenta dos LCRs en su estructura. El segundo de ellos presenta aminoácidos con modificaciones postraduccionales (Ser 287, Thr 289 y Lys 292). En el presente trabajo se evaluó si estas modificaciones postraduccionales también estaban involucradas en la regulación de la agregación de esta proteína. De esta manera, los resultados aportarían más evidencia al fenómeno descrito por Saad, et al. 2017.

II. HIPÓTESIS

Las modificaciones postraduccionales en el LCR de la proteína Sbp1 son importantes para regular su agregación/desagregación.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar si las modificaciones postraduccionales en el segundo LCR de Sbp1 están involucradas en la formación de agregados.

Objetivos particulares

- Fusionar la proteína GFP con la proteína Sbp1 y confirmar la formación de agregados bajo condiciones de estrés por falta de fuente de carbono.
- Hacer mutaciones puntuales en los residuos del segundo LCR que se han descrito que presentan modificaciones postraduccionales (Ser 287, Thr 289 y Lys 292).
- Evaluar el efecto de las mutaciones puntuales en la agregación/desagregación de la proteína Sbp1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se utilizó la cepa BY4742- α , la cual es una variante de la cepa S288C que es poco floculante y con necesidades mínimas nutricionales de crecimiento. Existe una mínima variación entre la cepa BY4742- α y S288C. La cepa BY4742- α ha sido utilizada como referencia para el proyecto internacional de interrupción de genes en *S. cerevisiae* (<https://www.yeastgenome.org/>).

Nombre	Genotipo
BY4742- α	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<i>sbp1Δ</i>	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sbp1Δ::HygR</i>
Sbp1-GFP	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1-γGFP::SpHIS5</i>
Sbp1- Δ C	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1 ΔC-γGFP::SpHIS5</i>
Sbp1_T287A,S289A	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_T287A,S289A-γGFP::SpHIS5</i>
Sbp1_T287D,S289D	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_T287D,S289D-γGFP::SpHIS5</i>
Sbp1_K292Q	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_K292Q-γGFP::SpHIS5</i>
Sbp1_K292R	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_K292R-γGFP::SpHIS5</i>
Sbp1-GFP, Edc3-mCherry	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1-γGFP::SpHIS5 EDC3-mCherry::natMX6</i>
Sbp1_K292Q, Edc3-mCherry	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_K292Q-γGFP::SpHIS5 EDC3-mCherry:: natMX6</i>
Sbp1_K292Q, Lsm12-mCherry	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_K292Q-γGFP::SpHIS5 LSM12-mCherry:: natMX6</i>
Sbp1_K292R, Edc3-mCherry	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_K292R-γGFP::SpHIS5 EDC3-mCherry:: natMX6</i>
Sbp1_K292R, Lsm12-mCherry	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SBP1_K292R-γGFP::SpHIS5 LSM12-mCherry:: natMX6</i>

Se utilizó el plásmido mCh14 para fusionar las proteínas marcadoras de P-bodies y gránulos de estrés a la proteína roja fluorescente, mCherry (Figura 15).

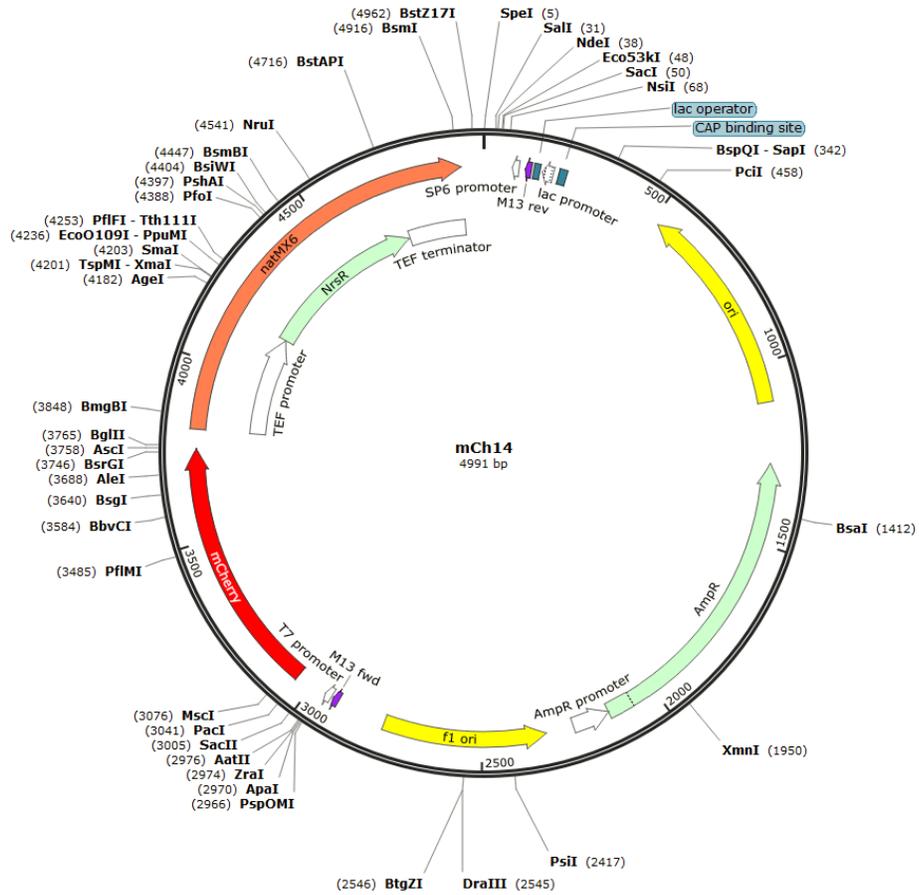


Figura 15. Plásmido mCh14. El plásmido contiene la secuencia de la proteína fluorescente mCherry y el gen *natMX6* que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina (cloNAT) como marcador de selección.

Se utilizó el plásmido pAG32 para generar la cepa mutante $\Delta sbp1$ (Figura 16).

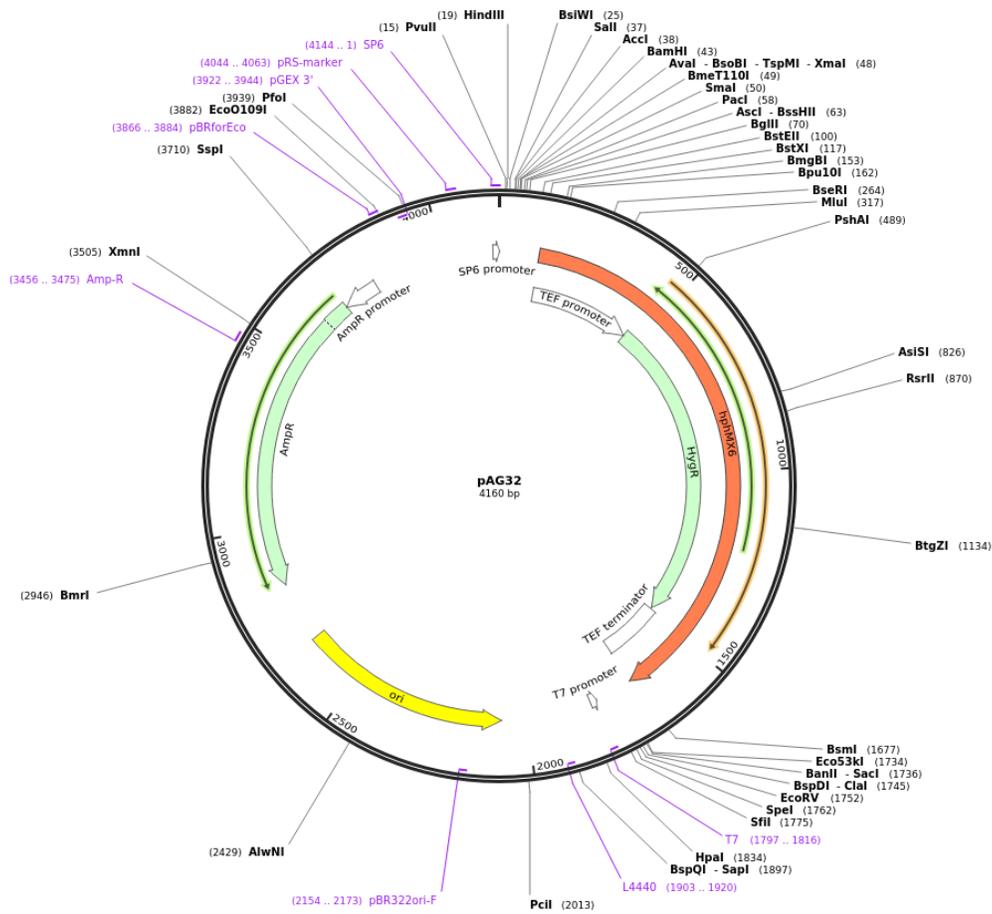


Figura 16. Plásmido pAG32. El plásmido tiene el gen *HygR* de *Klebsiella pneumoniae* que confiere resistencia al antibiótico higromicina B como marcador de selección.

Se utilizaron los plásmidos pRS416 y YEp352, de bajo y alto número de copias, respectivamente, en los cuales se insertó el gen *SBP1*. Posteriormente se transformaron levaduras mutantes con estos plásmidos con el objetivo de que revirtieran las mutaciones (Figura 17 y 18).

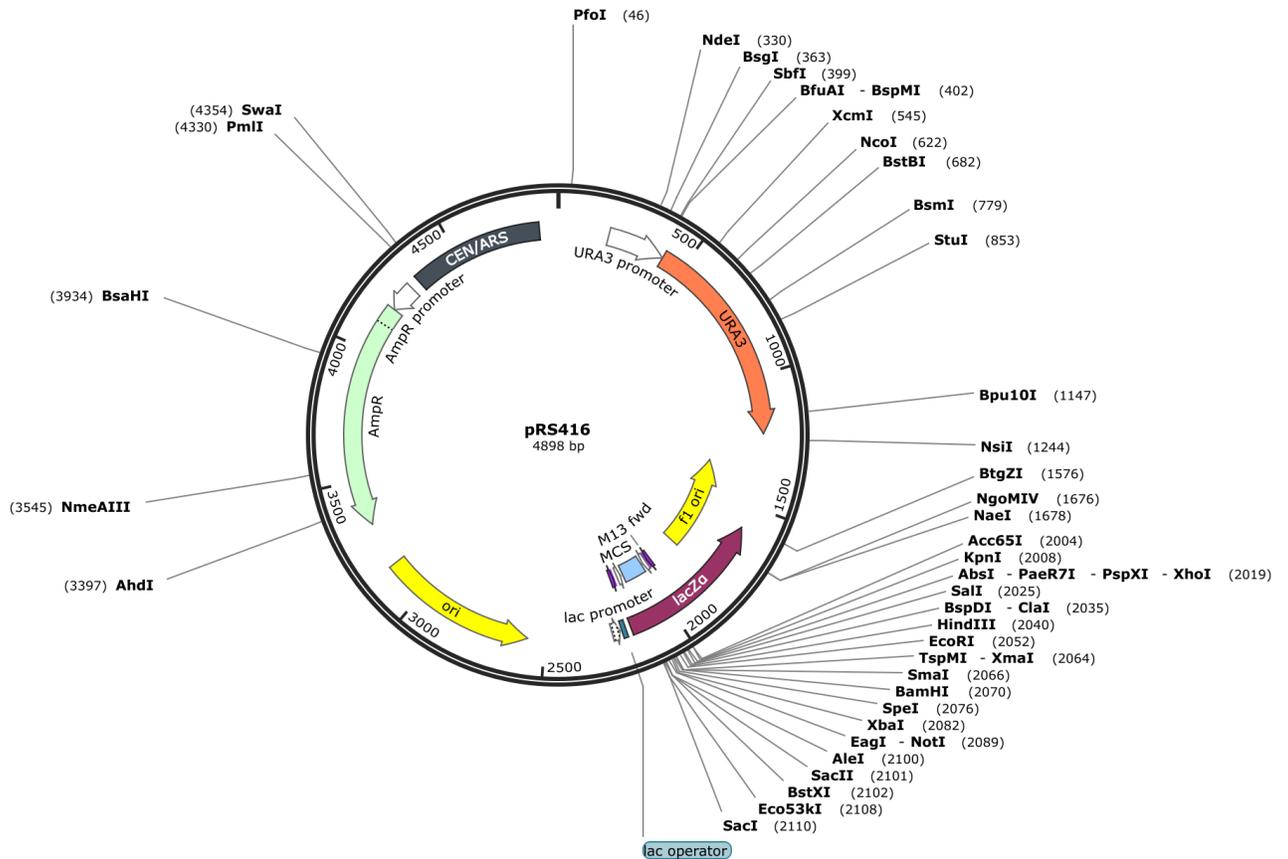


Figura 17. Plásmido pRS416. Es un plásmido centromérico de bajo número de copias. Contiene el gen *URA3* de *S. cerevisiae* como marcador de selección de auxotrofia para uracilo.

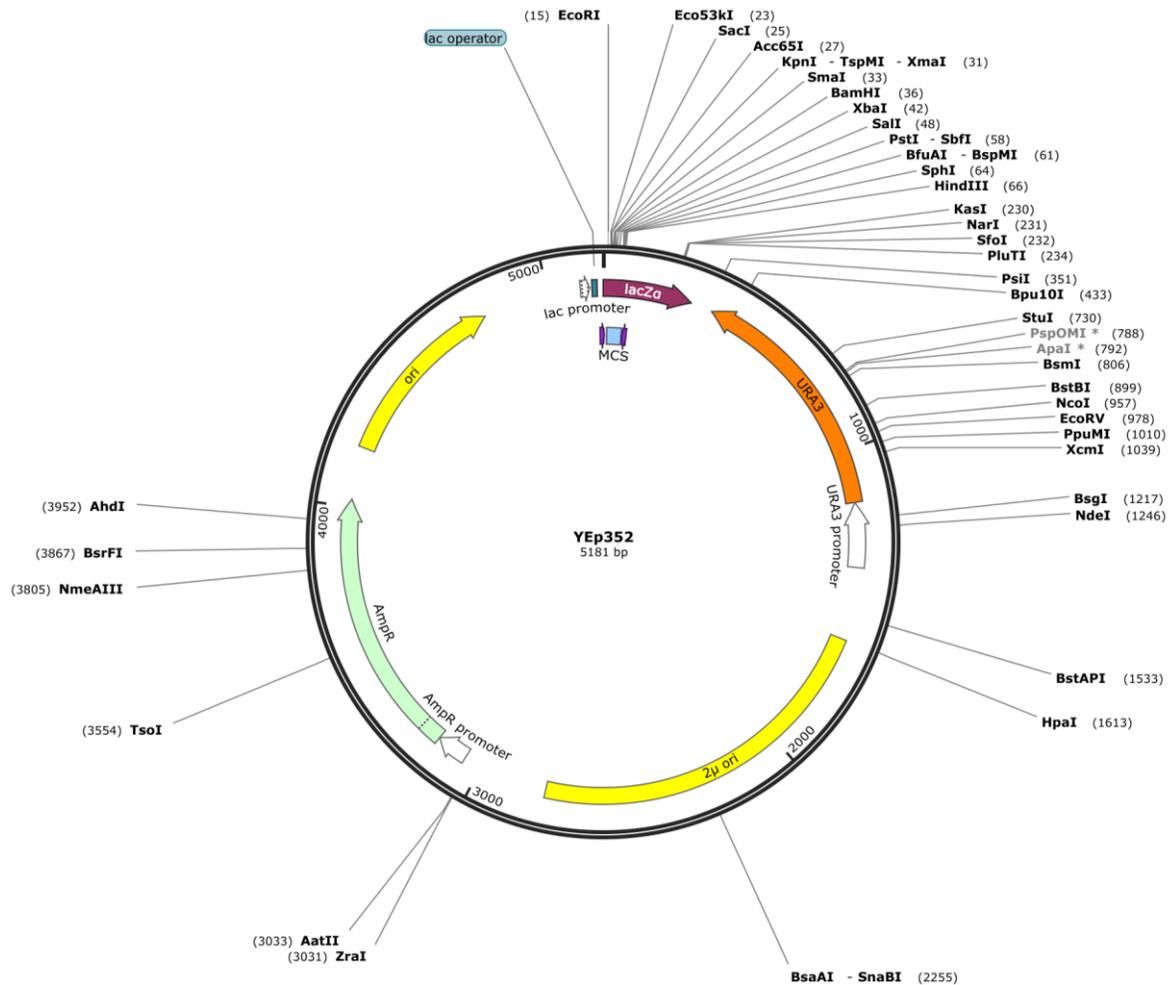


Figura 18. Plásmido YEpl352. Es un plásmido episomal, contiene un fragmento de 2 μ m que lo hace de alto número de copias. Presenta el gen *URA3* de *S. cerevisiae* como marcador de selección de auxotrofia para uracilo.

Fusión a γ GFP y mutaciones puntuales

Se procedió a realizar la fusión de γ GFP con la proteína de Sbp1. Se diseñaron oligonucleótidos con las siguientes características: 50 nucleótidos idénticos antes del codón de término y 19 nucleótidos que hibridaban con la secuencia del plásmido pFA6a-link- γ GFP γ -SpHis5 (SBP1-GFP). El oligonucleótido reverso tiene 50 nucleótidos antiparalelo después del codón de paro del gen y 21 nucleótidos en antiparalelo con la secuencia del plásmido (SBP1-GFP R) [Tabla 2]. Por medio de PCR se amplificó un fragmento que tiene secuencias del gen de interés, un marcador de selección, en este caso fue el gen *HIS5Sp* que cura la auxotrofia a histidina, y la secuencia de la proteína γ GFP. La inserción del fragmento amplificada

en el genoma de *S. cerevisiae* se llevó a cabo por recombinación homóloga. Se eligieron las colonias que crecieron en el medio con el marcador de selección. Las secuencias de reconocimiento de los primers Fwd y Rv para el plásmido pFA6a-link-yoGFPgamma-SpHis5 eran las mismas que para el plásmido mCh14.

Para hacer la cepa mutante se utilizaron los oligonucleótidos SBP1-MUT F y SBP1-GFP R, los cuales tienen las mismas características que los oligonucleótidos previamente mencionados, sólo que ahora el oligo SBP1-MUT tiene 50 nucleótidos idénticos antes del codón de inicio del gen. En este caso se utilizó el plásmido pAG32 cuyo marcador de selección es la resistencia al antibiótico higromicina B.

Posteriormente se realizaron mutaciones puntuales en el segundo LCR de la proteína Sbp1, en aquellos aminoácidos que presentan modificaciones postraduccionales (Figura 19).



Sbp1 Δ C: Glu286_Glu294del
 Sbp1_Thr287Ala,Ser289Ala
 Sbp1_Thr287Asp,Ser289Asp
 Sbp1_Lys292Gln
 Sbp1_Lys292Arg

Figura 19. Mutaciones puntuales en aminoácidos del segundo LCR de Sbp1.

Nombre	Secuencia
SBP1-GFP F	ATGATGAAGAAGAAATTGAGCAAGAAACTGGTTCTGAAGAAAAGCAAGAAatcggtgacgggtgctggttta
SBP1-GFP R	AAACTCTAGCAAAAACCTCAAGTTAGAAATAGGGATGTGGGTAAGAAAGTAAatggatggcggcggttagtatcg
SBP1-MUT F	GAAGAAGTTTCCCCAAAAGAAAAGAAAACCCCTCAACGAAGAAAAATcagctgaagcttcgtacgc
SBP1-s/mod	TAGATGTTGCTGTTATTAGACCAGAAAATGATGAAGAAGAAATTGAGCAAatcggtgacgggtgctggttta
SBP1-A	ATGTTGCTGTTATTAGACCAGAAAATGATGAAGAAGAAATTGAGCAAGAA GCTGGT GCTGA AGAAAAGCAAGAAatcggtgacgggtgctggttta
SBP1-D	ATGTTGCTGTTATTAGACCAGAAAATGATGAAGAAGAAATTGAGCAAGAA GATGGT GATGA AGAAAAGCAAGAAatcggtgacgggtgctggttta
SBP1-Q	GACCAGAAAATGATGAAGAAGAAATTGAGCAAGAAACTGGTTCTGAAGAA CAAC AAAGAAatcggtgacgggtgctggttta
SBP1-R	GACCAGAAAATGATGAAGAAGAAATTGAGCAAGAAACTGGTTCTGAAGAA AGACA AGAAatcggtgacgggtgctggttta
EDC3-F	TCCAAAACCTGTGATCTTTTCGTCACCTGACGGGTCCCTGCTATTAGATTTGatcggtgacgggtgctggttta
EDC3-R	ACCGTATGCTTATACGTATGTATCCAGTTTAGGCTAAAGTAATTCTTGGTtggatggcggcggttagtatcg
LSM12-F	TGGAAAGAAGCTGGGAGCAGCTAGAACAAAGACGATGGTAGGAAAGGTGGAatcggtgacgggtgctggttta
LSM12-R	AGTACGGATAAAATATATAACGTATATTATCGTTTTCCGTCATTAATTAATtggatggcggcggttagtatcg
SBP1-BamHI-F	actgcagatccGACCTGTACTAGTAACCTATTTT
SBP1-XbaI-R	actgcatctagaCGTTATGATGCAATCCTTCG

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para la fusión a γ GFP y diseño de cepas mutantes.

Amplificación de productos de PCR

Se amplificaron los fragmentos de interés por PCR utilizando las siguientes concentraciones: oligonucleótidos Fw y Rv 0.25 μ M, dNTPs 200 μ M, buffer Phusion HF (con $MgCl_2$) 1X, ADN polimerasa Phusion (Thermo Scientific) 0.02 U/ μ L, ADN molde 0.5-1.0 ng/ μ L y agua suficiente para obtener un volumen final de 20 μ L. Se utilizó el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad) con el siguiente programa de temperaturas (Figura 20).

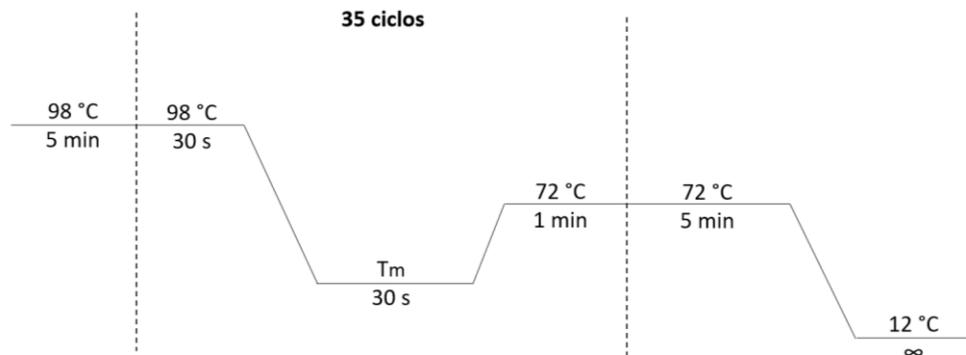


Figura 20. Termociclaje utilizado para la amplificación de productos de PCR.

Preparación de células competentes

Se dejaron creciendo 5 mL de cultivo toda una noche, a partir de este cultivo se preparó un precultivo de densidad óptica de 0.1 DO_{600nm} y se dejó creciendo en 50 mL de YPD a 30 °C unas horas hasta que alcanzara 0.5-0.7 DO_{600nm}.

Las células se centrifugaron durante 3 min a 1500-2000 rpm y se removió el sobrenadante, se lavaron con 5 mL de agua estéril y se centrifugaron por 5 min a 1500-2000 rpm (dos veces). Posteriormente se lavaron con 5 mL de SORB estéril y se centrifugaron nuevamente por 5 min a 1500-2000 rpm. Se removió el SORB y se resuspendieron en 360 µL de SORB y 40 µL de DNA de esperma de salmón (10 mg/mL). Se hicieron alícuotas de 20 µL y se congelaron a -80 °C.

Transformación de levaduras

Se mezclaron 8 µL de ADN (0.5-1.0 µg/µL), 20 µL de células de levaduras competentes y 100 µL de Plate Mixture (LiOAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA/NaOH 1 mM pH 8, PEG 3350 al 40%) se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se añadieron 15 µL de DMSO y la mezcla se colocó en un baño de agua a 42 °C durante 15-20 min. Las células se centrifugaron a 14000 rpm por 1 min, se removió el sobrenadante, se les añadió 500 µL de YPD y se dejaron a 30 °C en una incubadora Ecoshel FCD 3000 Serials al menos 4 h. Se centrifugaron las células a 14000 rpm por 1 min, se les removió la mayor cantidad de YPD, se plaquearon en cajas Petri con medio selectivo y se dejaron crecer durante 2-3 días a 30 °C.

Extracción de ADN de levaduras

Se dejaron crecer 10 mL de cultivo de levaduras en medio YPD a 30 °C durante una noche. Se colectaron las células por medio de centrifugación por 2 min a 3000 rpm, se removió el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µL de agua para transferirlas a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron durante 10 s en la microcentrífuga. Se removió el sobrenadante y se agregaron 200 µL de QTP (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), Na₂EDTA 1 mM), 100

μL de fenol, 100 μL de cloroformo y 0.3 g de perlas de vidrio, se mezcló en vortex durante 4-5 min y se agregaron 200 μL de TE (pH 8).

La mezcla se centrifugó por 5 min a 14000 rpm y se transfirió la capa acuosa a un tubo de 1.5 mL nuevo, se añadió 1 mL de etanol al 100% frío. El tubo se mezcló por inversión. Se centrifugó 2 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 400 μL de TE más 3 μL de solución de RNAsa A de 10 mg/mL. Se dejó incubar por 5 min a 37 °C y se añadieron 10 μL de acetato de amonio 4 M, mas 1 mL de etanol al 100% frío. El tubo se mezcló por inversión.

Se centrifugó durante 2 min a 14000 rpm, se removió el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, posteriormente se resuspendió en 50 μL de agua.

PCRs para confirmación de cepas

Se amplificaron los fragmentos de interés por PCR utilizando las siguientes concentraciones: primers Fw (SBP1-Conf [CTGCTAATAGAGGTATGGCATTGT]) el cual hibrida aproximadamente 100 nucleótidos antes del inicio del gen de Sbp1 y Rv (TEFprom test [CGGCGTGGGGACAATTCAA]), el cual hibrida en la secuencia promotora del gen γGFP , 0.2 μM , dNTPs 200 μM , buffer Dream Taq (con MgCl_2) 1X, 0.04 U/ μL de ADN polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific), 0.5-1.0 ng/ μL de ADN molde y agua suficientes para obtener un volumen final de 25 μL . Se utilizó el siguiente programa de en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad) con el siguiente programa de temperaturas (Figura 21).

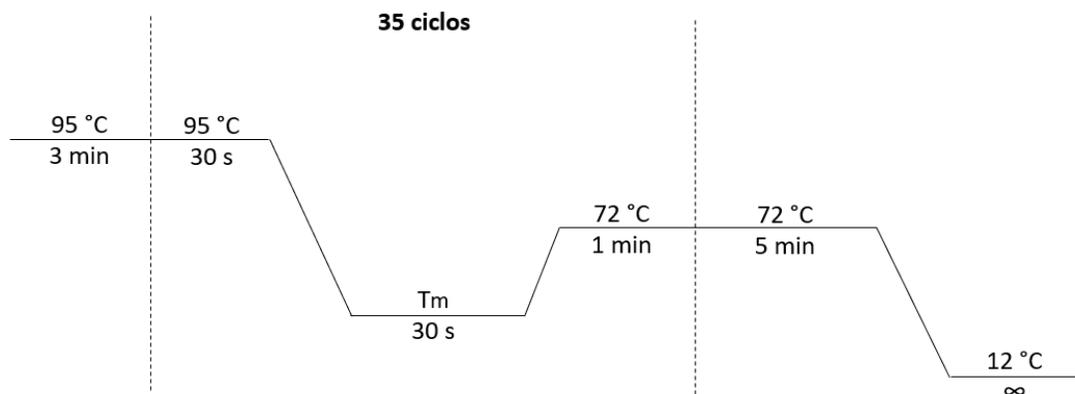


Figura 21. Termociclaje de PCR para confirmación de cepas.

Purificación de productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit GeneJet PCR Purification (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Observación de formación de gránulos en condiciones de estrés

Se prepararon cultivos de las cepas mutantes de SBP1 creadas y se dejaron creciendo a 30 °C durante 5 días. Se observaron al día 5, al momento en que la fuente de carbono se había terminado y se observaron en microscopio de epifluorescencia (Olympus BX61) para observar la formación de gránulos.

Inducción de formación de gránulos por condiciones de estrés y fijación de células

Se prepararon cultivos a 1 DO_{600nm} de las cepas mutantes de SBP1 creadas y se dejaron creciendo en medio YPD a 30 °C durante 24 h. Posteriormente se les removió el medio YPD y se dejaron en medio sintético sin fuente de carbono durante 24 h.

En tubos eppendorf de 1.5 mL se agregaron 900 µL de células y 100 µL de formaldehído al 37%, se dejaron incubar durante 15 min y posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min. Se lavaron dos veces las células con 1 mL de buffer de fosfato de potasio 0.1 M y al final el concentrado se resuspendió en 100 µL del mismo buffer. Las células se observaron en el microscopio ZEISS LSM 800 para analizar la formación de gránulos.

Ensayo de viabilidad (ensayo de diluciones seriadas)

Se prepararon 5 mL de cultivo en medio YPD y medio mínimo -His, pH 6.0 a una DO_{600nm} de 0.1, en diferentes condiciones, una serie de cultivos tanto en YPD como en MM -His pH 6.0, a 30 °C y otros a 4 °C. Cada tercer día se midió la densidad óptica y se hizo una dilución a 1 DO_{600nm}, a partir de esta se hicieron cuatro diluciones seriadas 1:10; se gotearon 5 µL de cada dilución en cajas de YPD, una caja para cada condición. Los cultivos se dejaron creciendo durante 40 días.

Ensayo de viabilidad en medios respiratorios

A partir de 5 mL de cultivo en medio YPD, se realizó una dilución a 1 DO_{600nm}, de la cual se hicieron cuatro diluciones seriadas 1:10. Se pipeteó 5 µL de cada dilución en cajas de YP-Lac 2%, YP-Glicerol 2%, YP-Glicerol/Etanol 2%.

Ensayo de reversibilidad de mutaciones

Se amplificó por PCR el fragmento de Sbp1 con los oligonucleótidos SBP1-BamHI-F y SBP1-XbaI-R. Este fragmento tenía sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y XbaI. Con estas mismas enzimas se digirieron los plásmidos YEp352 y pRS416, para posteriormente ligar el fragmento con la enzima T4 ligasa (Plásmido 20-100 ng, inserto de DNA 3:1 respecto al vector, 2 µL de buffer 10X T4 DNA ligasa, 0.2 µL de enzima T4 DNA ligasa, agua suficiente para obtener un volumen final de 20 µL) y dejarlo toda una noche a 4 °C. Posteriormente se transformó a la bacteria *Escherichia coli* DH5-α y se corroboró la ligación del fragmento cortando con la enzima EcoRI para ambos plásmidos. Se transformó las levaduras Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R. Las células se crecieron en Medio Mínimo -Ura, ya que la auxotrofia a uracilo era el marcador de selección tanto del plásmido YEp352 como del pRS416. Aquellas células que crecieron fueron sometidas al ensayo de viabilidad en medios respiratorios con el objetivo de ver si la mutación se curaba por la recombinación con el gen silvestre.

Extracción de proteínas de levaduras

Se prepararon 10 mL de cultivos a 0.1 DO_{600nm} de las cepas mutantes de SBP1 y se dejaron creciendo en medio YPD a 30 °C durante 24 h. Otros cultivos de las mismas cepas mutantes de SBP1 se ajustaron a 8 DO_{600nm}, a los cuales se les removió el medio YPD y se dejaron en 10 mL de medio sintético sin fuente de carbono durante 24 h. A partir de estos cultivos de 10 mL, los volúmenes se pasaron a tubos de plástico de 15 mL y se centrifugaron a 2400 rpm por 3 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el concentrado en 1 mL de agua y posteriormente se volvió a centrifugar. Nuevamente se descartó el sobrenadante.

Se colocaron los tubos en hielo, se resuspendió el concentrado de células con 0.5 mL de buffer de lisis (PBS 1X pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.5%, DTT 1 mM, Glicerol 10%) más inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Cocktail 10 µL/mL), la mezcla se colocó en tubos de 2 mL y se les agregó 500 µL (0.5 g) de perlas de vidrio. Se mezclaron en vortex durante 30 s y se incubó en hielo durante otros 30 s, este procedimiento se repitió 9 veces más.

Posteriormente los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 s a 4 °C, se recuperó el líquido con ayuda de una jeringa Hamilton y se colocó en tubos de 1.5 mL. Se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 20 min, el sobrenadante se guardó en tubos de 1.5 mL nuevos. Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se guardaron a -70 °C.

Western Blot

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% y se cargó en cada pozo la misma cantidad de proteína. Se utilizaron cámaras Hoefer® y se corrieron a un voltaje de 120 V antes de que salieran del gel concentrador y 150 V el resto de la electroforesis. Posteriormente se utilizó una membrana de nitrocelulosa para realizar la transferencia. Se utilizó una cámara de transferencia Bio-Rad® 170-3930 con un voltaje de 30 V durante 12 h a temperatura de 4 °C.

Posteriormente la membrana se lavó con TBS-T durante unos minutos y se dejó incubando durante 1 h con TBS-T con leche al 5 % (Svelty, baja en grasa).

Se realizaron un par de lavados de 5 min cada uno con TBS-T para eliminar los residuos. Se incubó con el anticuerpo primario, α-GFP, (Jackson Immuno Research) dilución 1:1000 en TBS-T durante 24 h a 4 °C. Para el anticuerpo α-GAPDH (Jackson Immuno Research) la dilución fue 1:5000. Se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS-T. Posteriormente la membrana se incubó con anticuerpo secundario, α-ratón (Jackson Immuno Research), para GFP, dilución 1:20000 durante 1 h. Para GAPDH se utilizó el anticuerpo secundario α-conejo (Jackson Immuno Research), dilución 1:50000 durante 1 h.

Finalmente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS-T y se procedió a revelar la membrana con H₂O₂ y luminol (Millipore).

Medios y soluciones

Medio YPD líquido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Dextrosa 2%

Medio YPD sólido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Dextrosa 2%, Agar 2%

Drop Out -His -Ura 10X

Adenina 200 mg/L, Arginina 200 mg/L, Asparagina 1 g/L, Ácido glutámico 1 g/L, Leucina 600 mg/L, Lisina 200 mg/L, Metionina 200 mg/L, Fenilalanina 500 mg/L, Serina 3.75 g/L, Treonina 200 mg/L, Triptófano 400 mg/L, Tirosina 300 mg/L y Valina 1.5 g/L.

Histidina 100X

Histidina 2 g/L

Uracilo 100X

Uracilo 2 g/L

Medio sintético sin carbono

YNB 1.6 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L

Medio sintético sin nitrógeno

YNB 1.6 g/L, Dextrosa 20 g/L

Medio Mínimo -His

YNB 1.6 g/L, Dextrosa 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, Drop Out 1X -His -Ura, Uracilo 1X

Medio Mínimo -His sólido

YNB 1.6 g/L, Dextrosa 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, Drop Out 1X -His -Ura, Uracilo 1X, Agar 20 g/L

Medio Mínimo -His, pH 6.0

YNB 1.6 g/L, Dextrosa 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, Drop Out 1X -His -Ura, Uracilo 1X, Na_2HPO_4 64.2 mM y ácido cítrico 17.9 mM, ajustado a pH 6.0

Medio Mínimo -Ura

YNB 1.6 g/L, Dextrosa 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, Drop Out 1X -His -Ura, Histidina 1X

Medio Mínimo -Ura sólido

YNB 1.6 g/L, Dextrosa 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, Drop Out 1X -His -Ura, Histidina 1X, Agar 20 g/L

Medio YP-Lac

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.12 %, KH_2PO_4 0.1%, Lactato 2%, Agar 2%

Medio YP-Lac sólido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.12 %, KH_2PO_4 0.1%, Lactato 2%

Medio YP-Glicerol

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Glicerol 2%

Medio YP-Glicerol sólido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Glicerol 2%, Agar 2%

Medio YP-Glicerol/Etanol

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Glicerol 1%, Etanol 1%

Medio YP-Glicerol/Etanol sólido

Extracto de levadura 1%, Bacto peptona 2%, Glicerol 1%, Etanol 1%, Agar 2%

Buffer de fosfatos 1M

K_2HPO_4 0.834 M, KH_2PO_4 0.166 M

Buffer de lisis de proteínas

PBS 1X pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.5%, DTT 1 mM, Glicerol 10%, PMSF 1 mM

Buffer de corrida SDS-PAGE 10X

Tris 250 mM, Glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3

Buffer de transferencia 1X

Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3

TBS 10X pH 7.6

Tris-HCl 24.2 g/L, NaCl 80.06 g/L

TBS-Tween 1X (TBS-T)

TBS 1X, Tween 0.05%

V. RESULTADOS

El primer objetivo fue fusionar la proteína Sbp1 con γ GFP, para ello se utilizaron los oligos que contenían las regiones homólogas a los últimos 50 nucleótidos codificantes y 50 nucleótidos después del codón de paro de la secuencia de la proteína, se utilizó el plásmido pFA6a-link-yoGFPgamma-SpHis5 como molde. El fragmento obtenido estaba conformado por parte de la secuencia del gen de la proteína Sbp1, el gen completo de la proteína γ GFP y el gen *HIS5*, como marcador de selección (Figura 22).

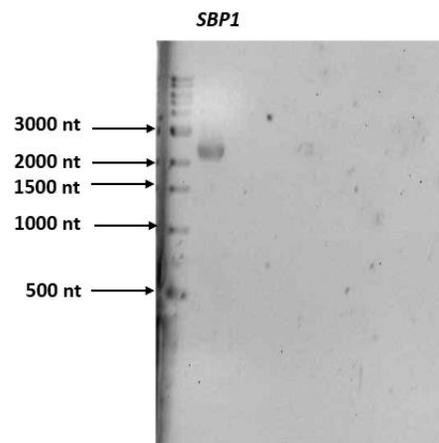


Figura 22. Amplificación por PCR del fragmento de la proteína SBP1 fusionado a γ GFP. El tamaño esperado del fragmento era de 2357 nt, agarosa 0.8%

Posteriormente se transformaron las cepas competentes de *S. cerevisiae* BY4742- α y se obtuvieron con éxito colonias transformantes, las cuales fueron confirmadas por PCR, secuenciación y microscopía (Figura 23).

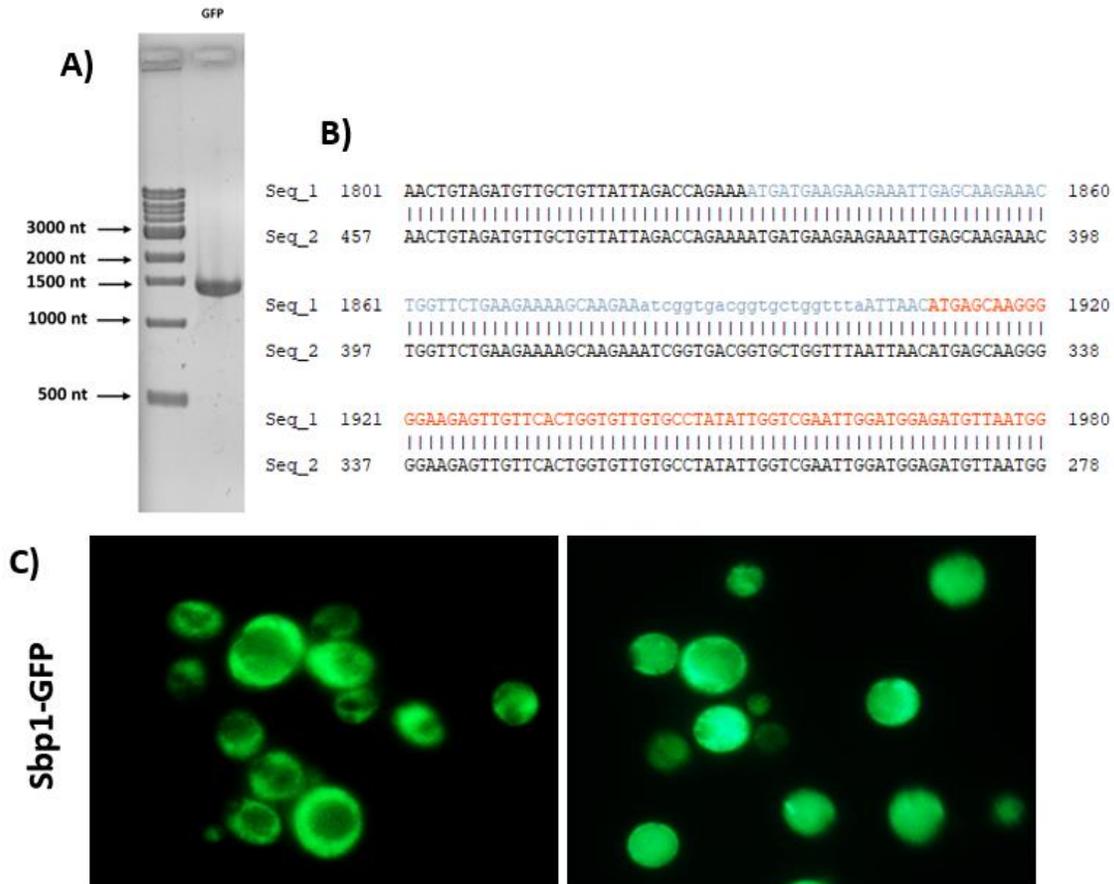


Figura 23. Confirmación de las cepas transformantes Sbp1-GFP. A) Confirmación por PCR. En el PCR de confirmación se amplificó un fragmento que consistía en la parte final de la proteína Sbp1 y nucleótidos posteriores a la secuencia proteína γGFP. El tamaño esperado del fragmento en agarosa era de 1437 nt. **B) Confirmación por secuenciación.** Seq_1, simulación en el programa Serial Cloner de la cepa Sbp1-GFP, el color azul corresponde a la secuencia de la proteína Sbp1 y en letras minúsculas, la secuencia del oligonucleótido; el color naranja corresponde a la secuencia de la proteína γGFP. Seq_2, secuencia de la cepa transformada **C) Confirmación por microscopía.** Se puede observar fluorescencia en varias células en fase exponencial. Microscopía de epifluorescencia (100X).

Posteriormente se realizó un experimento para determinar si había formación de agregados por estrés debido a la falta de fuente de carbono, como ya se había reportado en otros estudios (Saad, et al. 2017). Se dejaron crecer las células en medio YPD durante 72 h, permitiéndoles que agotaran la fuente de carbono (Figura 24).

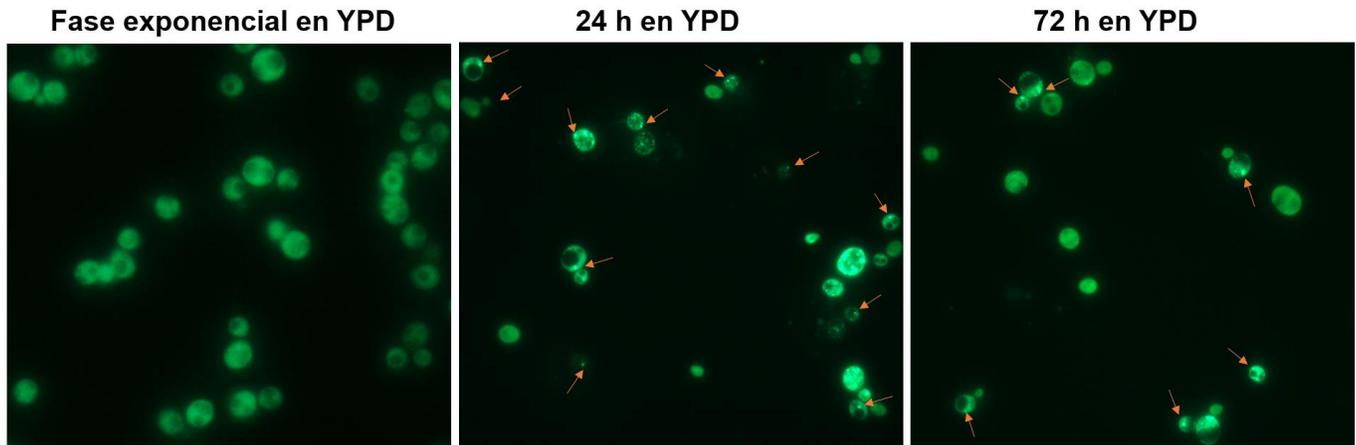


Figura 24. Observación de las células transformantes para determinar la presencia de gránulos por falta de fuente de carbono. Se observaron las células a las 24 h de crecimiento en YPD, las cuales ya comenzaban a presentar algunos gránulos. Posteriormente se observaron 72 h después. Microscopio de epifluorescencia (100X).

Se observó que a las 24 h varias células ya presentaban estos agregados, esto debido a que la fuente de carbono se había agotado. A las 72 h se sigue observando la presencia de estos gránulos, pero en menor medida, esto se debe a que los P-bodies y gránulos de estrés interactúan entre ellos (Buchan, et al. 2008) y por el tiempo que estuvieron las células en el medio comenzaron a alcanzar la fase estacionaria, donde prevalecen más los gránulos de estrés.

Sabiendo que las células transformantes presentaban formación de gránulos conforme se iba agotando la fuente de carbono, se decidió someterlas directamente a ese estrés privándolas de glucosa. Se removió el medio YPD a células creciendo en fase exponencial y se dejaron en agua durante dos horas, esto para confirmar que la presencia de gránulos se debía a la privación de nutrientes en las levaduras (Figura 25).

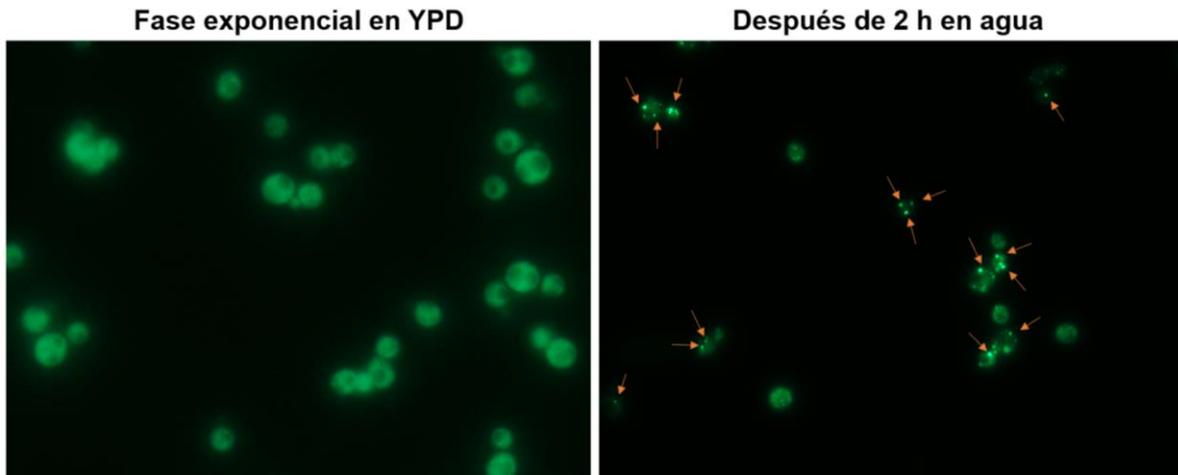


Figura 25. Observación de las células al inducirles estrés privándolas de fuente de carbono. Se removió el medio YPD a células que estaban creciendo en fase exponencial y se sustituyó por agua. Microscopio de epifluorescencia (100X).

Se observó la formación de gránulos en medio YPD a las 24 h, nuevamente debido a que la fuente de carbono comienza a agotarse. Cuando las células estuvieron en agua durante 2 h, fue evidente la presencia de estos gránulos, incluso varias células presentaron más de un agregado.

Posteriormente se decidió evaluar si la ausencia de nitrógeno o de carbono tenía influencia en la formación de los gránulos. Se crecieron células en medio sintético sin fuente de carbono, pero con nitrógeno y en medio sintético sin fuente de nitrógeno, pero con carbono, durante 24 h y fueron observadas en microscopio. A las células se les reemplazó el medio de cultivo por un medio sintético completo para poder así evaluar si la agregación era reversible (Figura 26).

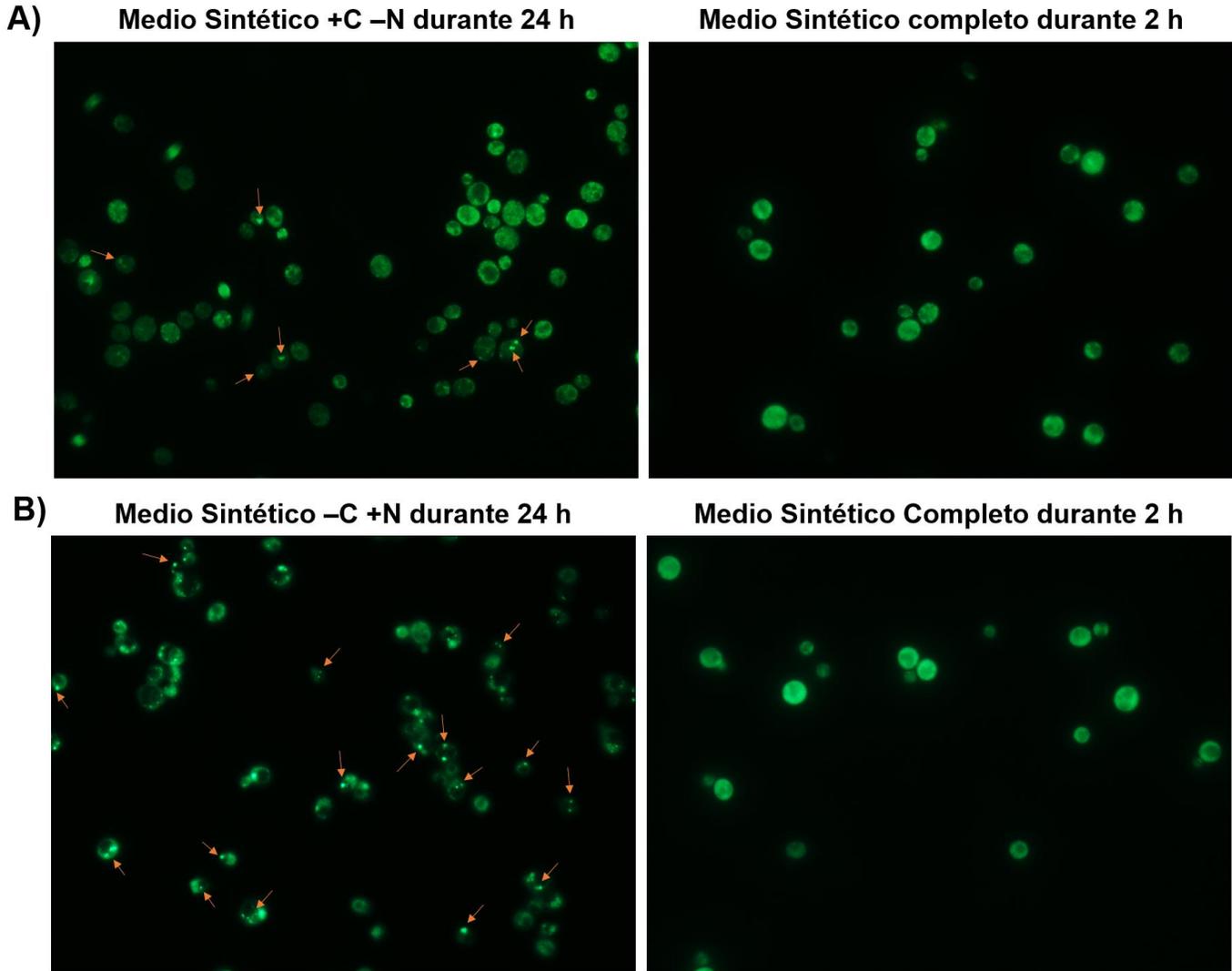


Figura 26. Observación de las células en medio sin fuente de nitrógeno y sin carbono. **A)** Se observaron las células a las 24 h de crecimiento en medio sintético sin fuente de nitrógeno, pero con carbono. Posteriormente se reemplazó el medio limitante por uno completo y las células fueron observadas 2 h después. **B)** Se observaron las células a las 24 h de crecimiento en medio sin fuente de carbono, pero con nitrógeno. El medio limitante se reemplazó por uno completo y las células se volvieron a observar 2 h después. Microscopio de epifluorescencia (100X).

Se observó que, en ambas condiciones, tanto células sin fuente de carbono (-C) como células sin fuente de nitrógeno (-N), hay formación de agregados. Sin embargo, hay un mayor número de gránulos en las células sin fuente de carbono. En las células sin fuente de nitrógeno hay un número menor de agregados, lo cual se debe a que la fuente de carbono comienza a agotarse, no por la falta de nitrógeno, como en el estudio de Saad, et al. 2017. Cuando se reemplazó el medio

por un medio fresco completo se observó la desaparición de los gránulos en ambas condiciones, lo cual confirma la reversibilidad de estos agregados igual que en el estudio de Narayanaswamy, et al. 2009.

Posteriormente se decidió corroborar que los agregados observados en las células colocalizaban con P-bodies, por lo que en la cepa Sbp1-GFP se fusionó la proteína Edc3 con la proteína roja fluorescente, mCherry. La proteína Edc3 es característica de estos agregados y participa en el proceso de remoción del cap a los mRNAs. Para inducir la formación de los P-bodies, las células se dejaron 24 h sin fuente de carbono. También se ha reportado que Sbp1 colocaliza con los gránulos de estrés (Mitchell, et al. 2013), por lo que también se fusionó la proteína Lsm12 a mCherry. La proteína Lsm12 es característica de gránulos de estrés, aunque su función es aún desconocida (<https://www.yeastgenome.org/>). Para promover la formación de gránulos de estrés, las células se dejaron 72 h sin fuente carbono y se calentaron durante 30 min a 42 °C. Se evaluó la localización de ambas señales por microscopía confocal (Figura 27).

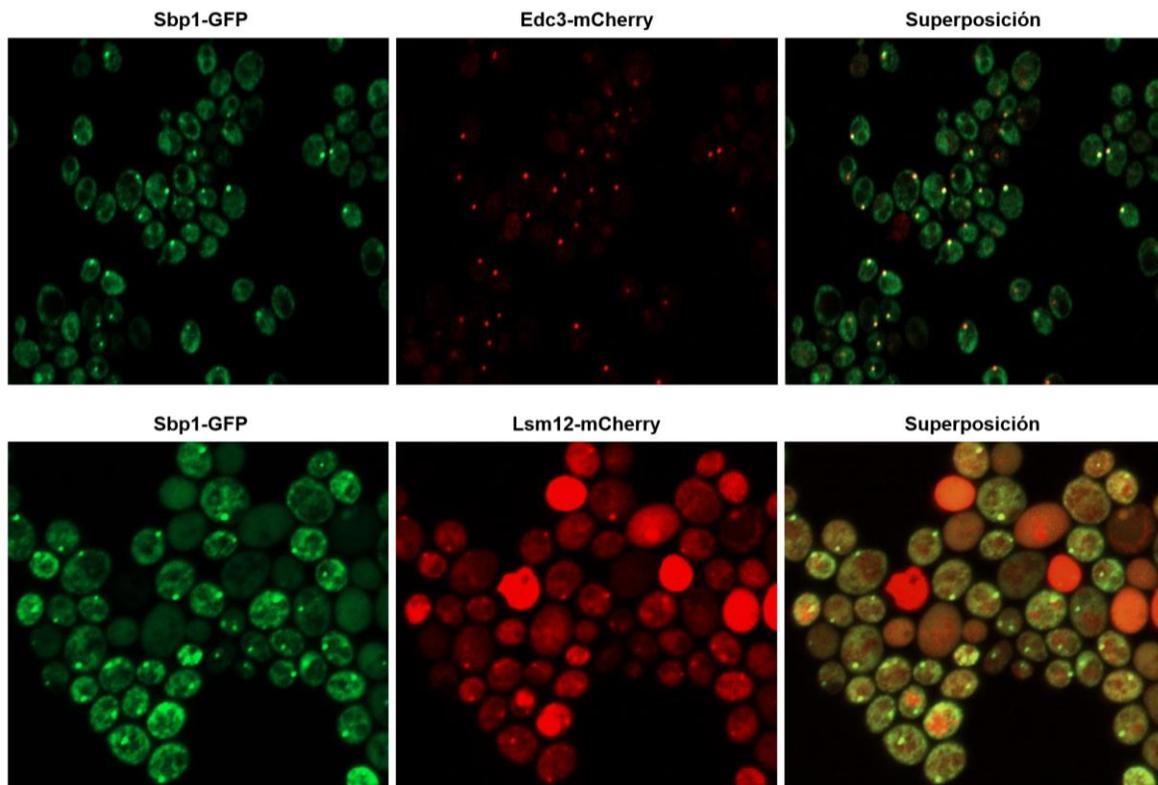


Figura 27. Los agregados de Sbp1 se encuentran en P-bodies y en gránulos de estrés. La proteína Edc3 y Lsm12 se fusionaron mCherry en cepas separadas de Sbp1-GFP. Se evaluó la localización de la señal verde y roja en las células. Microscopio confocal (60X).

Los resultados demostraron que la señal en verde de Sbp1 y en rojo, tanto de Edc3, como de Lsm12, se localizaban en la misma posición dentro de la célula con P-bodies y gránulos de estrés.

Los resultados de los experimentos anteriores confirmaron la información reportada en la literatura. El estrés al que la célula se enfrenta por la falta de nutrientes provoca la formación de RNPs. La proteína Sbp1 forma parte de estos gránulos y su agregación es dependiente de fuente de carbono; además que Sbp1 colocaliza tanto en P-bodies como en gránulos de estrés.

Posteriormente se continuó con la construcción de cepas mutantes de la proteína Sbp1 (ver materiales y métodos). Se mutaron los aminoácidos del segundo LCR que son susceptibles a presentar modificaciones postraduccionales. A una cepa se le removieron 9 aminoácidos del LCR (Glu286_Glu294del), entre estos los aminoácidos que presentaban las modificaciones postraduccionales, la cual se nombró Sbp1 Δ C. En otra cepa, la treonina (Thr) 287 y la serina (Ser) 289 fueron mutadas por alaninas (Ala) [Sbp1_Thr287Ala,Ser289Ala], lo que evitaba la fosforilación de los aminoácidos. La treonina y la serina, ya mencionadas, fueron mutadas en otra cepa por ácido aspártico (Asp) [Sbp1_Thr287Asp,Ser289Asp], lo cual mimetizaba la fosforilación de los aminoácidos. En las últimas dos cepas, únicamente se mutó la lisina (Lys) 292 por arginina (Arg) [Sbp1_Lys292Arg] para conservar la carga positiva del aminoácido; y en otra, por glutamina (Gln) [Sbp1_Lys292Gln] mimetizando una lisina acetilada (Tabla 3 y Figura 28). Los fragmentos de la proteína mutada fueron fusionados a γ GFP por PCR como ya ha sido explicado anteriormente.

Nombre de la cepa	Objetivo
Sbp1 Δ C	Remover de los últimos 9 aminoácidos del LCR, no hay PTMs
Sbp1_T287A,S289A	Evitar fosforilación de serina y treonina
Sbp1_T287D,S289D	Mimetizar aminoácidos fosforilados
Sbp1_K292Q	Mimetizar la lisina acetilada
Sbp1_K292R	Arginina presenta carga positiva, evitar ubiquitinación

Tabla 3. Nombre de las cepas con mutaciones puntuales de la proteína Sbp1.

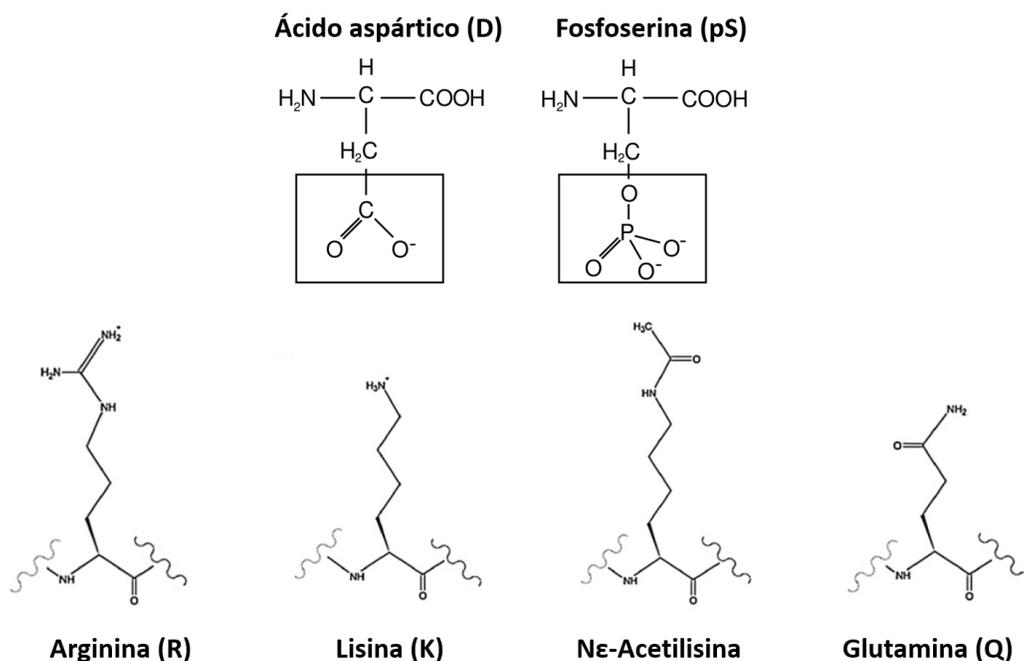


Figura 28. Similitud en estructura de los aminoácidos modificados. Arriba. Se muestra la similitud de estructura entre el ácido aspártico (D) y la serina fosforilada (pS), dicha similitud también aplica para la treonina fosforilada. Abajo. Se muestra la similitud en estructura entre la lisina acetilada (Nε-Acetilisina) y la glutamina (Q). Como ya se mencionó, la arginina (R) sólo conserva la carga positiva sin presentar alguna modificación postraduccional.

Nuevamente se transformaron las cepas competentes de *S. cerevisiae* BY4742- α y se obtuvieron con éxito las colonias transformantes, las cuales fueron confirmadas por PCR, secuenciación y microscopía (Figura 29).

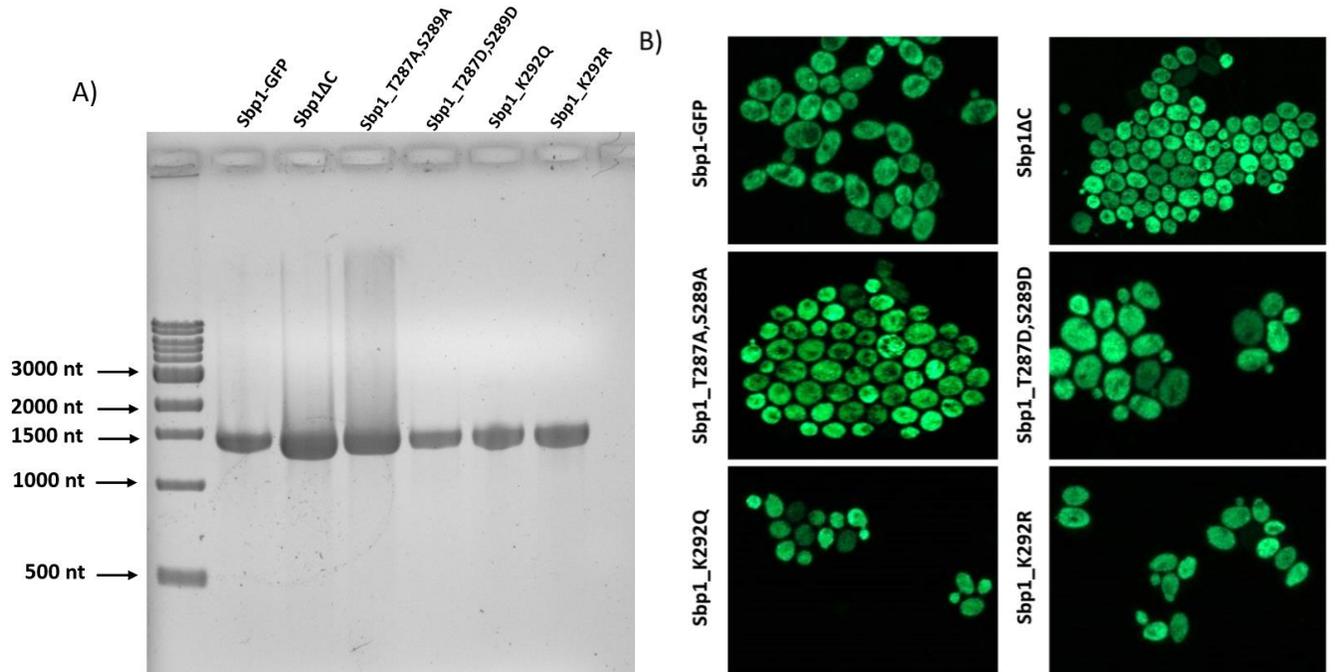
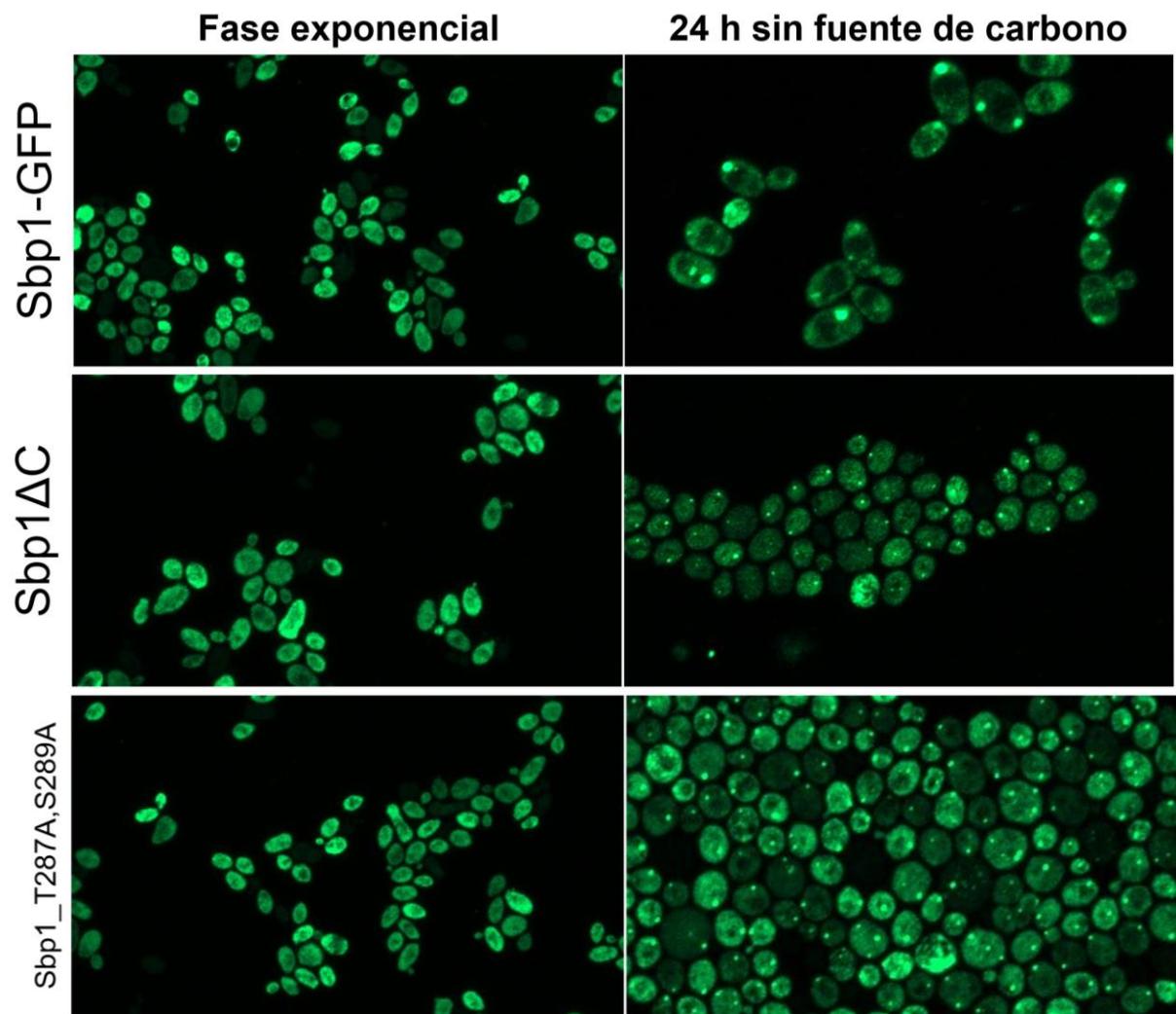


Figura 29. Confirmación de las cepas mutantes de Sbp1. **A) Confirmación por PCR.** En el PCR de confirmación se amplificó un fragmento que consistía en la parte final de la proteína Sbp1 y nucleótidos posteriores a la secuencia proteína γ GFP. El tamaño esperado del fragmento de confirmación en gel de agarosa era de 1437 nt. **B) Confirmación por microscopía.** Se observa la fluorescencia de las células durante su crecimiento en fase exponencial. Microscopía confocal (60X).

Las cepas con mutaciones puntuales se sometieron al mismo experimento que la cepa de Sbp1-GFP: se dejaron creciendo en medio YPD durante 24 h y posteriormente se les removió el medio YPD por medio mínimo sin fuente de carbono durante 24 h y se evaluó la presencia de gránulos observando las células en microscopio confocal (Figura 30).



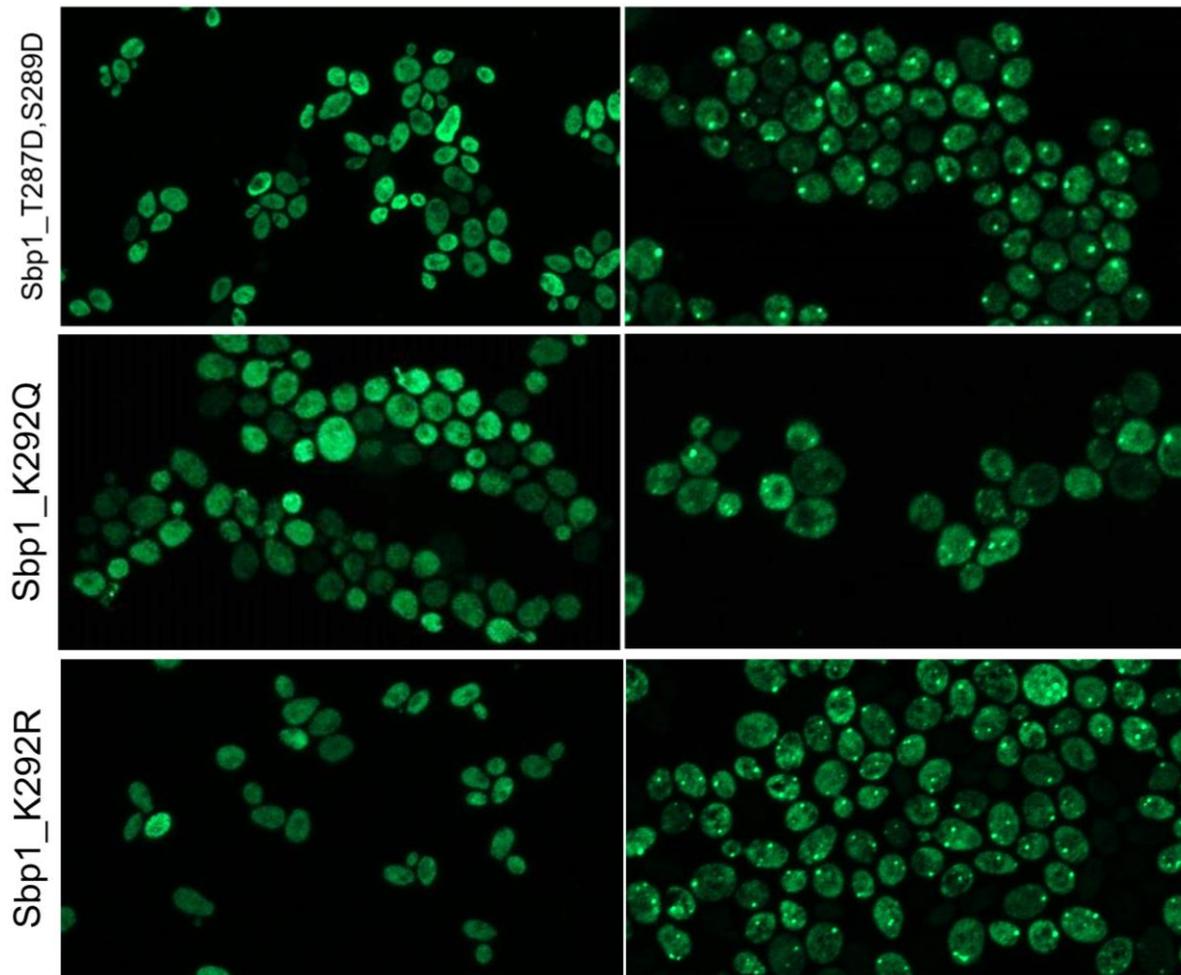


Figura 30. Observación en microscopio de las cepas mutantes en medio sin fuente de carbono. Del lado izquierdo se observan las cepas creciendo en medio YPD. Del lado derecho se observan las células después de haber estado 24 h en medio sintético sin fuente de carbono. Microscopía confocal (60X).

Los resultados demostraron que las cepas mutantes Sbp1 Δ C; Sbp1_T287A,S289A; Sbp1_T287D,S289D; y Sbp1_K292R en medio sintético sin fuente de carbono presentaron agregados en casi todas las células vistas. Por el contrario, la cepa Sbp1_K292Q, presentaba menos gránulos que las demás mutantes.

Se realizó un ensayo cuantitativo. Se contaron entre un rango de 240-250 células, de las cuales se obtuvo un porcentaje de aquellas células que presentaban al menos un agregado. Los conteos se realizaron por triplicado para cada cepa mutante y la cepa de referencia, Sbp1-GFP (Figura 31).

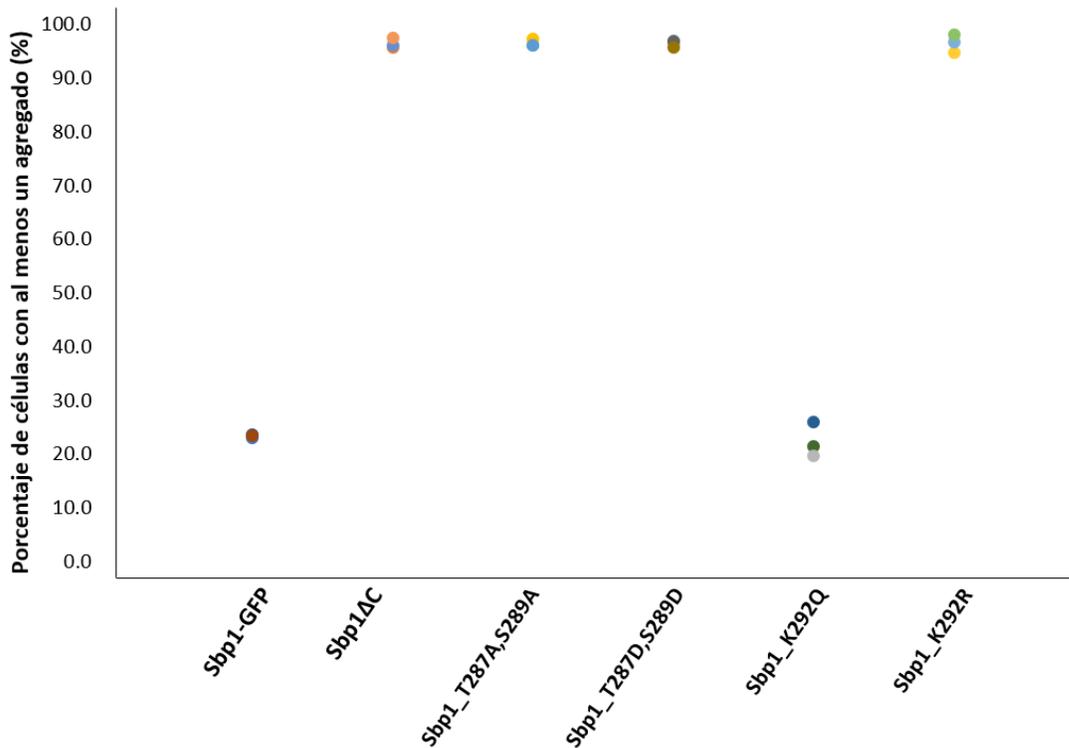


Figura 31. Porcentaje de células con al menos un agregado. Se contó el número de células que presentaban al menos un agregado. Los conteos se realizaron por triplicado (n=250) y se sacaron porcentajes de estos valores.

Los resultados mostraron que en las cepas Sbp1ΔC; Sbp1_T287A,S289A; Sbp1_T287D,S289D; y Sbp1_K292R, casi un 100% de células presentaban agregados. Esto demuestra que estas modificaciones postraduccionales influyen directamente en la regulación de la agregación de la proteína Sbp1. La cepa Sbp1_K292Q se comportó de una manera muy similar a la cepa Sbp1-GFP, ya que aproximadamente un 20% de las células presentaban agregados en ambos casos.

Se confirmó que los agregados que se observaron en las cepas mutantes colocalizaban con P-bodies y gránulos de estrés. Para esto, se fusionó la proteína Edc3 (P-bodies) y Lsm12 (gránulos de estrés) a mCherry, como ya se había hecho con la cepa de referencia (Figura 32).

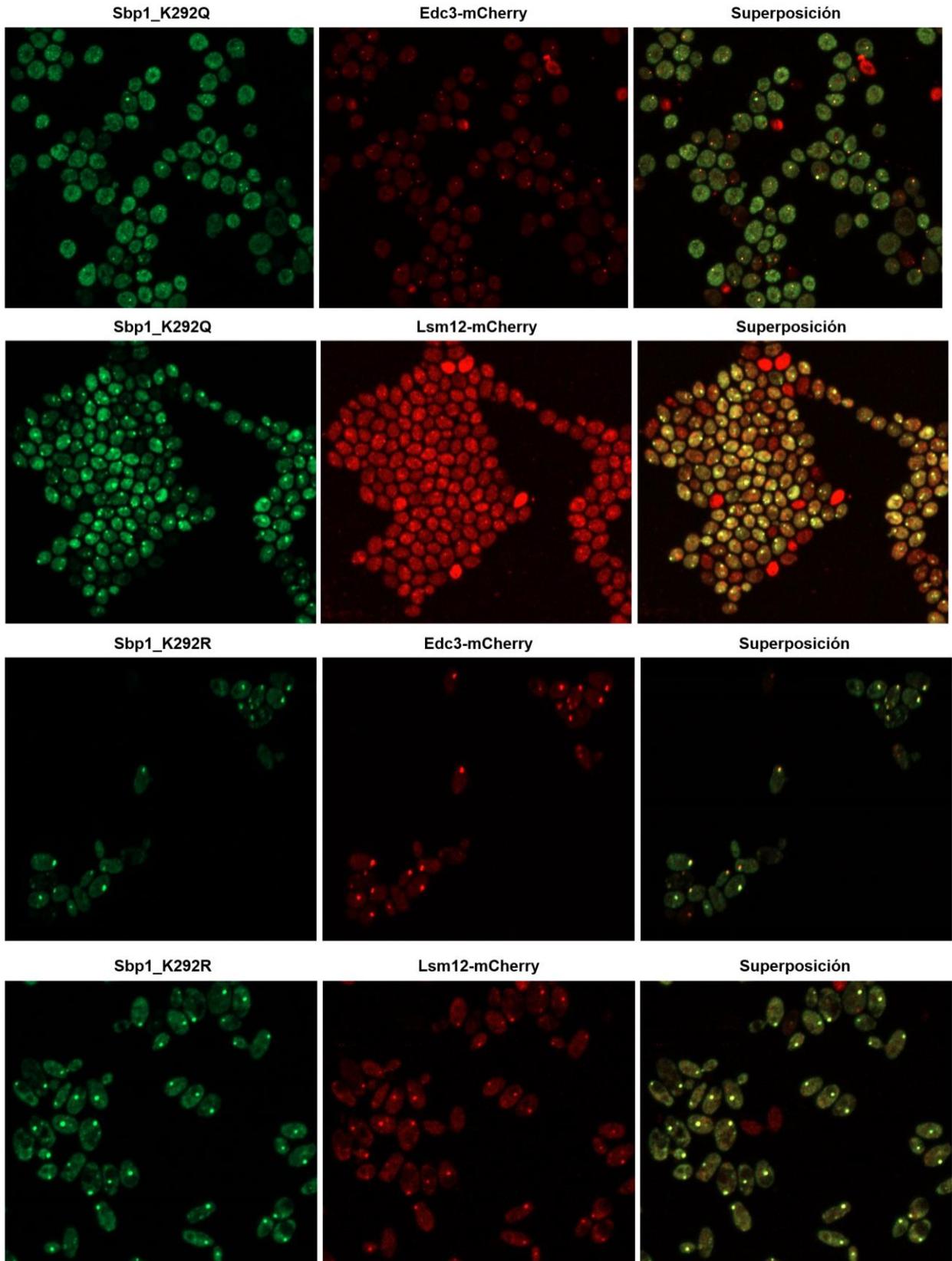


Figura 32. Confirmación de P-bodies y gránulos de estrés en las cepas mutantes de Sbp1. Se muestran las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R. Para observar los P-bodies tanto con Sbp1-GFP y Edc3-mCherry, las células se estresaron dejándolas en medio sin fuente de carbono durante 24 h. Para observar los gránulos de estrés, se utilizó Lsm12-mCherry. Las células fueron privadas de fuente de carbono durante 72 h para promover la formación de P-bodies y posteriormente fueron calentadas a 42 °C durante 30 min para promover la formación de gránulos de estrés. Microscopía confocal (60 X).

Los resultados demostraron que los agregados vistos en las cepas mutantes colocalizaron tanto en P-bodies como en gránulos de estrés, como ya ha sido reportado en otros estudios (Mitchell, et al. 2013).

Se construyó la cepa mutante para el gen de *SBP1*, $\Delta sbp1$, la cual no tiene un fenotipo descrito y se utilizó como un control para los experimentos de viabilidad. Se utilizó el plásmido pAG32 para amplificar el fragmento por PCR, con el cual se transformaron células competentes, dicho fragmento contenía el gen de *HygR*, el cual le confirió resistencia a higromicina B como marcador de selección (Figura 33).

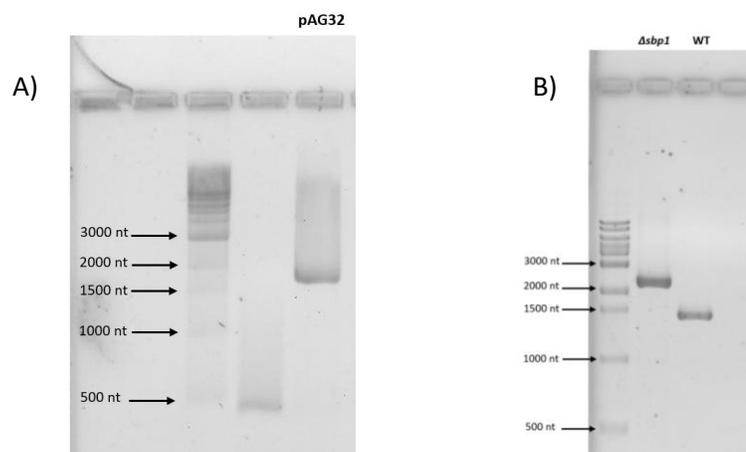


Figura 33. Amplificación por PCR de los fragmentos de la mutante del gen *SBP1*. **A)** El tamaño esperado del fragmento utilizando el plásmido pAG32 era de 1808 nt. **B)** Confirmación por PCR de la mutante $\Delta sbp1$, tamaño esperado 2391 nt, mientras que la cepa silvestre (WT) 1568 nt.

Se realizó la técnica de western blot para evaluar los niveles de expresión de la proteína Sbp1-GFP en las cepas mutantes, bajo condiciones favorables en YPD fresco y en estrés sin fuente de carbono; se cargaron aproximadamente 65 μ g de proteína de cada una de las cepas. Se normalizó contra la proteína GAPDH (Anexo, Figura 1).

Se realizó el experimento de cambiar el medio de las cepas mutantes estresadas sin fuente de carbono a un medio completo fresco, para observar si los P-bodies se desagregaban (Figura 34).

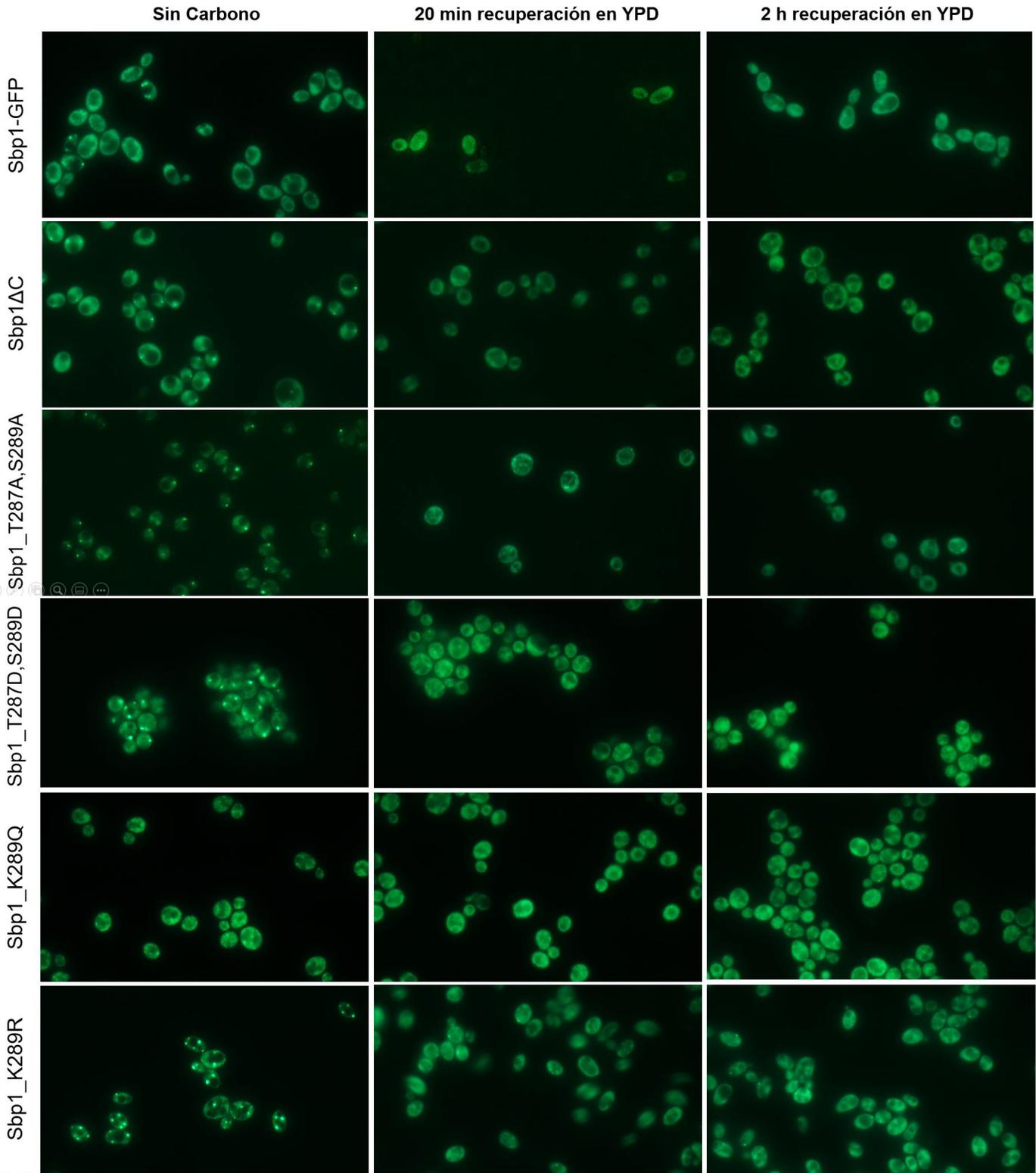


Figura 34. Observación de las cepas mutantes en recuperación con medio completo. Se observaron las células 24 h después de estar en medio sintético sin carbono. Las células se volvieron a observar 20 min y 2 h después de reemplazar el medio sin carbono por medio YPD. Microscopía de epifluorescencia (100 X).

Los resultados demostraron que 20 min después de reemplazar el medio sin carbono por un medio completo fresco, la desagregación de los P-bodies fue muy notoria en todas las cepas. Después de 2 h, algunas cepas ya no presentaban estos agregados, a excepción de la cepa Sbp1_K292R. La cepa Sbp1_K292Q presentaba muy pocos agregados en medio sin fuente de carbono. Esto demuestra nuevamente que la agregación de esta proteína es dependiente de la fuente de carbono

Las células de las cepas Sbp1 Δ C; Sbp1_T287A,S289A; Sbp1_T287D,S289D; Sbp1_K292R presentaron un gran número de agregados en condiciones sin fuente de carbono. En experimentos posteriores, en donde se requiriera tomar foto a las células para observar los agregados, se decidió concentrarse específicamente en las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R ya que en estas cepas el cambio de la lisina en la posición 292 repercutía drásticamente en la agregación de la proteína y en la formación de los P-bodies.

Se decidió repetir el mismo experimento de recuperación en medio completo observando las células en microscopio confocal para abarcar más campos y observar todos los gránulos posibles que pudieran presentar las células (Figura 35).

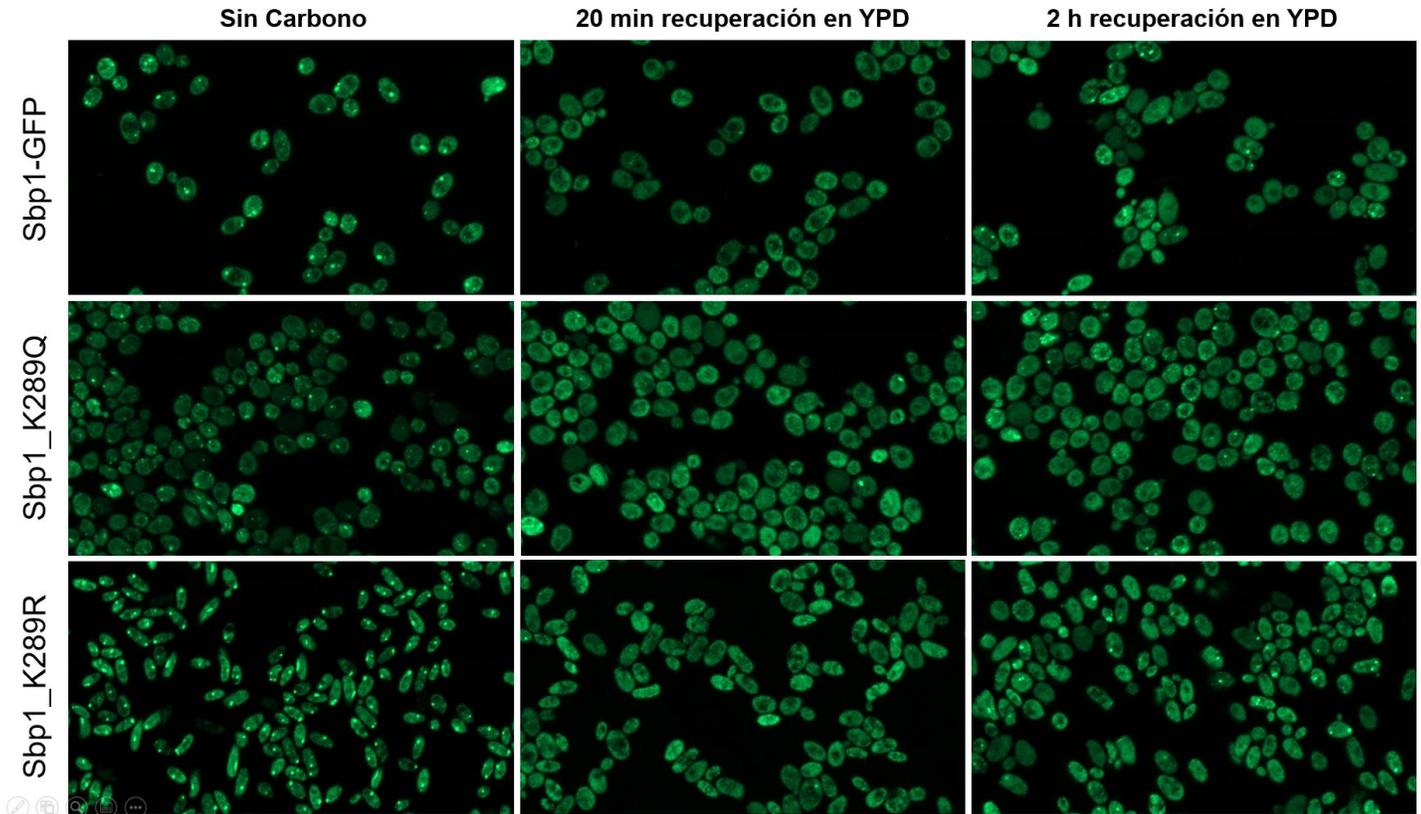


Figura 35. Observación de las cepas mutantes Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R en recuperación en medio completo. Se observaron las células a las 24 h en medio sintético sin carbono, en las cuales era muy evidente la presencia de gránulos. A los 20 min de haber reemplazado el medio por uno completo, el número de agregados disminuía considerablemente y 2 h después, los gránulos comenzaban a aparecer nuevamente. Microscopía confocal (60X).

Los resultados demostraron que la desagregación de los P-bodies fue evidente cuando las células estuvieron en medio fresco, sin embargo 2 h después los gránulos comienzan a formarse nuevamente.

Se decidió entonces aumentar el tiempo de recuperación para ver si nuevamente había formación de agregados. Se observaron las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R, a 6 y 15 h después de reemplazar el medio sin fuente de carbono por el medio YPD (Figura 36).

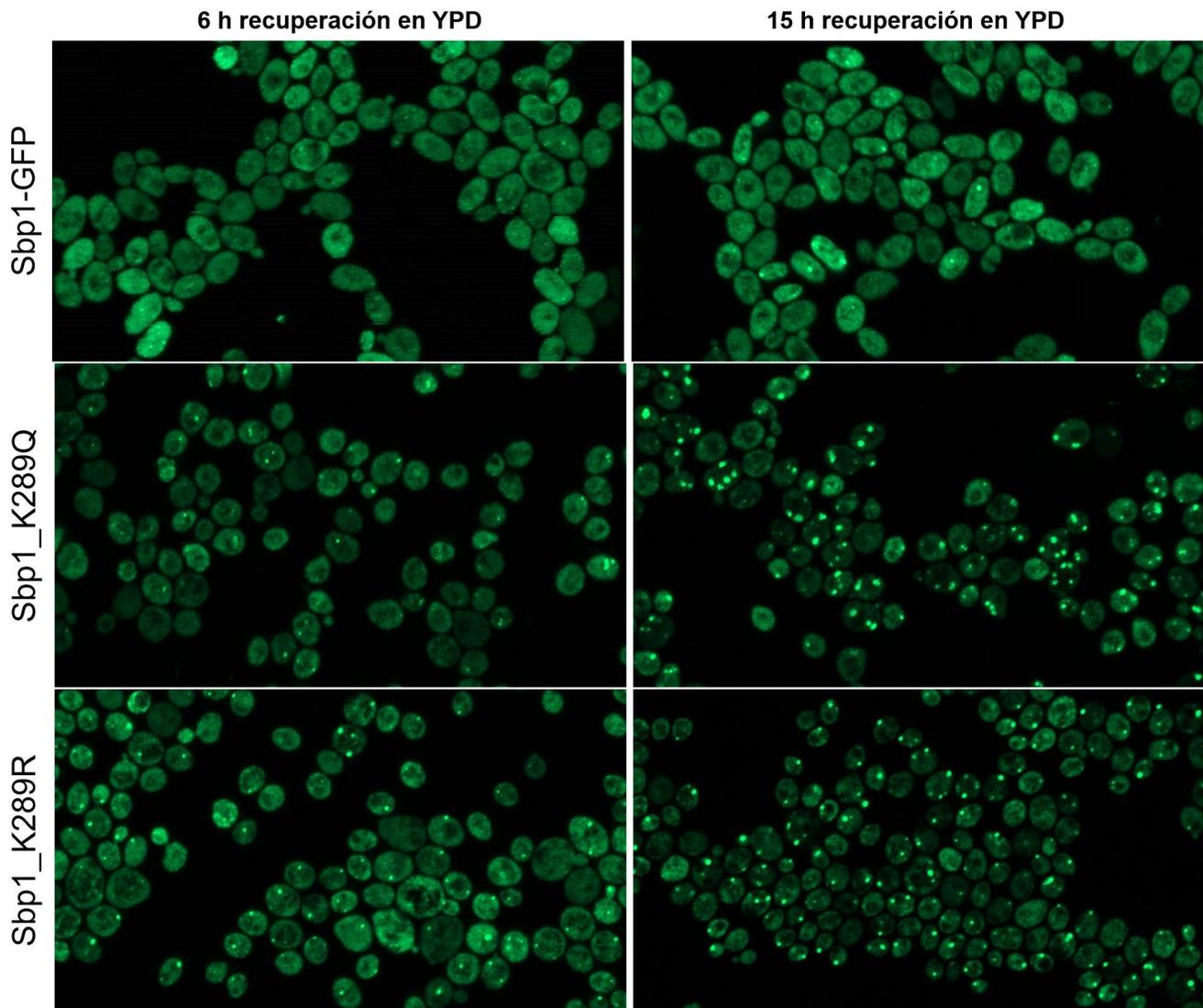
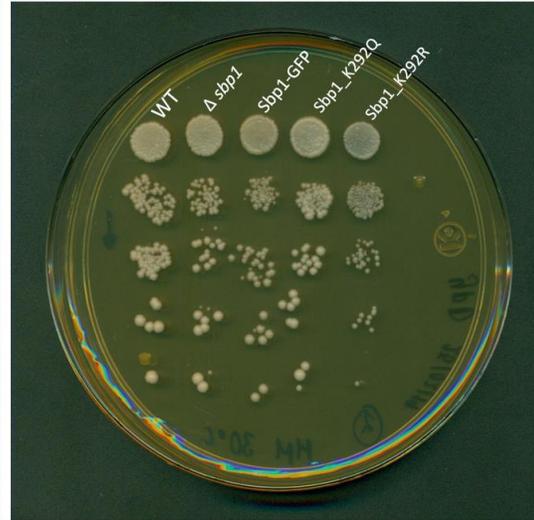
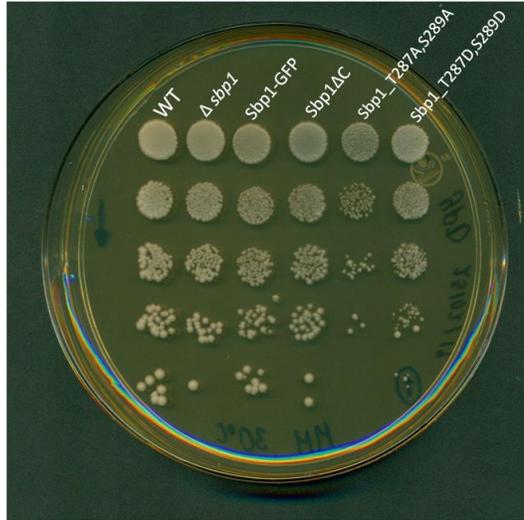


Figura 36. Observación de las cepas mutantes Sbp1-GFP, Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R en recuperación en medio completo después de 6 y 15 h. Se observaron las células a las 6 y 15 h después de haber reemplazado el medio por medio YPD. Microscopía confocal (60X).

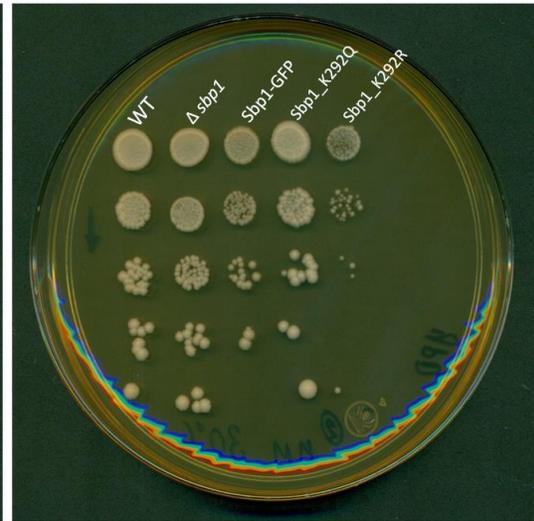
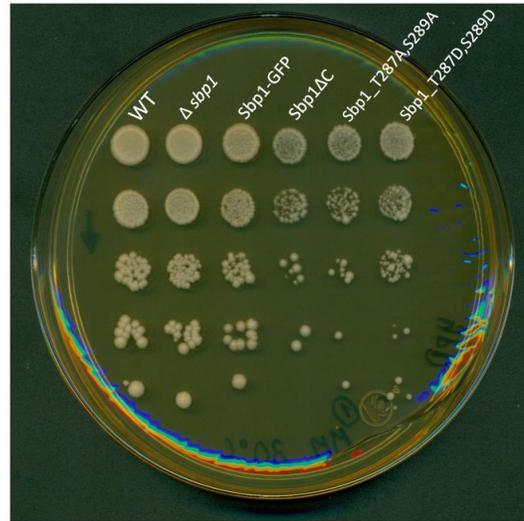
Los resultados demostraron que la formación de agregados fue muy evidente, en ambas condiciones, incluso en la cepa Sbp1_K292Q en donde en un principio la formación de P-bodies era muy baja.

Posteriormente se realizaron experimentos de viabilidad (ver materiales y métodos), ya que las cepas mutantes comenzaban a morir a los 20 días de su cultivo en cajas con marcador de selección en frío. Se prepararon cultivos en medio selectivo (Medio mínimo -His) y se realizaron goteos durante 40 días (Figura 37).

MM, 30 °C (Día 3)



MM, 30 °C (Día 27)



MM, 30 °C (Día 38)

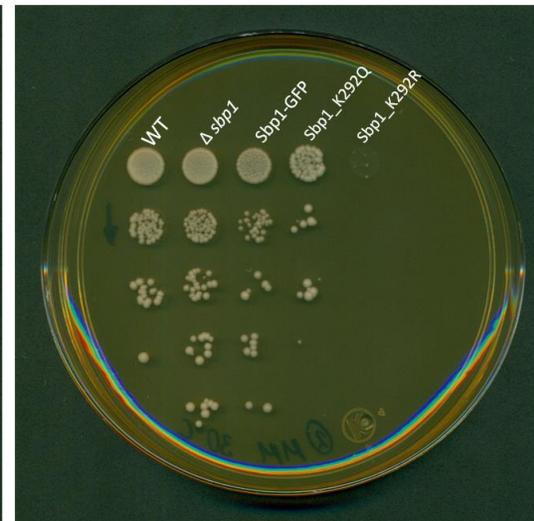
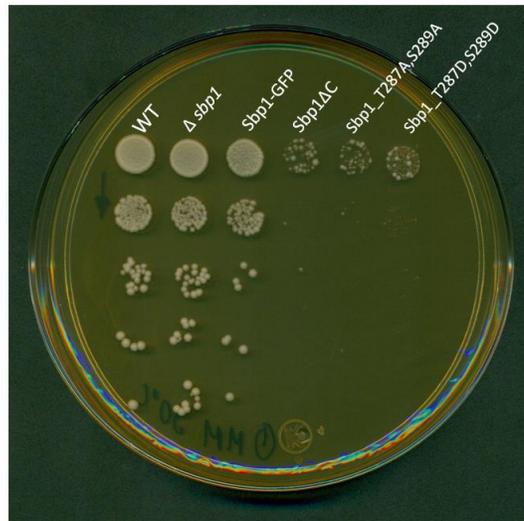


Figura 37. Ensayos de viabilidad de las cepas mutantes. Se midió la densidad óptica de los cultivos y se realizó una dilución a 1 DO_{600nm}, a partir de esta se hicieron cuatro diluciones seriadas 1:10; se gotearon 5 μL de cada dilución en cajas de YPD. Los goteos se realizaron cada tercer día durante un periodo de 40 días.

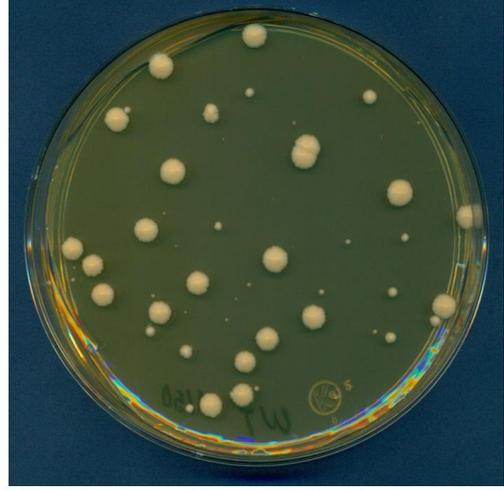
Los resultados demostraron que las cepas mutantes Sbp1 Δ C; Sbp1_T287A,S289A; Sbp1_T287D,S289D; y Sbp1_K292R se ven afectadas por las mutaciones puntuales de tal manera que las células comienzan a morir algunos días después de su cultivo. Llama la atención que la cepa mutante para el gen *SBP1* (Δ *sbp1*), fue viable aún en el día 38, al igual que la cepa silvestre. La cepa Sbp1_K292Q se comportó como la cepa Sbp1-GFP, aunque al día 38 su viabilidad disminuía. Lo anterior demuestra, como en experimentos anteriores, un comportamiento muy similar de la cepa Sbp1_K292Q a la de referencia, Sbp1-GFP.

En cultivos anteriores se observó que algunas cepas presentaban una fracción de colonias de menor tamaño, también conocidas como colonias petite, las cuales se caracterizan por tener una deficiencia en la respiración (Day, 2013), por lo que se decidió plaquear una cantidad similar de células de cada cultivo en cajas de YPD y corroborar este fenómeno. A partir de cultivos de 24 h en YPD, se realizaron diluciones de 1/25000 y 1/50000, de las cuales se pipetearon 100 μ L y se esparcieron con perlas de vidrio en cajas con medio YPD (Figura 38).

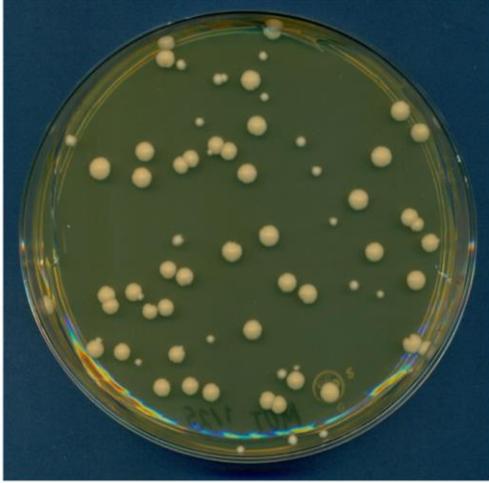
WT (1:25000)



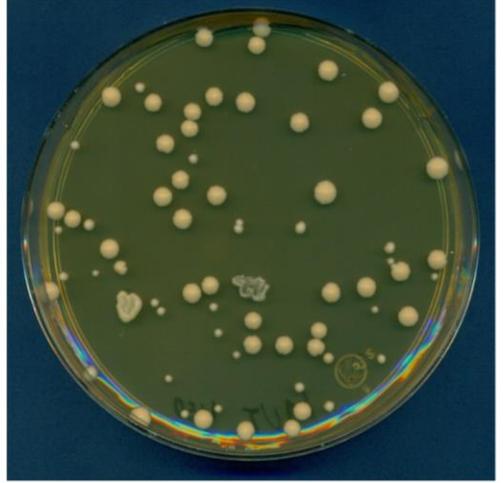
WT (1:50000)



Δ sbp1 (1:25000)



Δ sbp1 (1:50000)



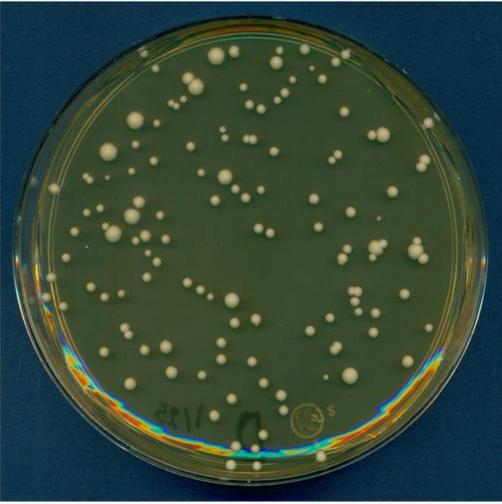
Sbp1-GFP (1:25000)



Sbp1-GFP (1:50000)



Sbp1_T287D,S289D (1:25000)



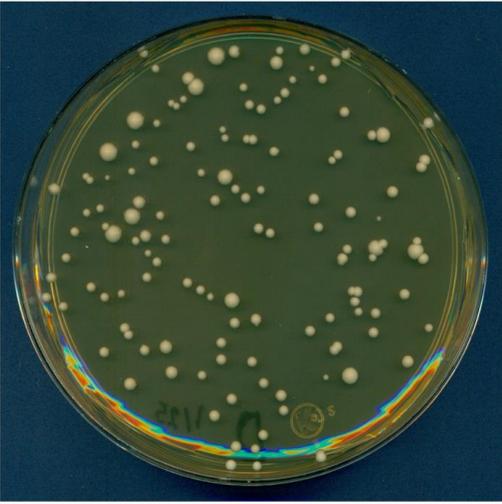
Sbp1_T287A,S289A (1:25000)



Sbp1ΔC (1:25000)



Sbp1_T287D,S289D (1:50000)



Sbp1_T287A,S289A (1:50000)



Sbp1ΔC (1:50000)



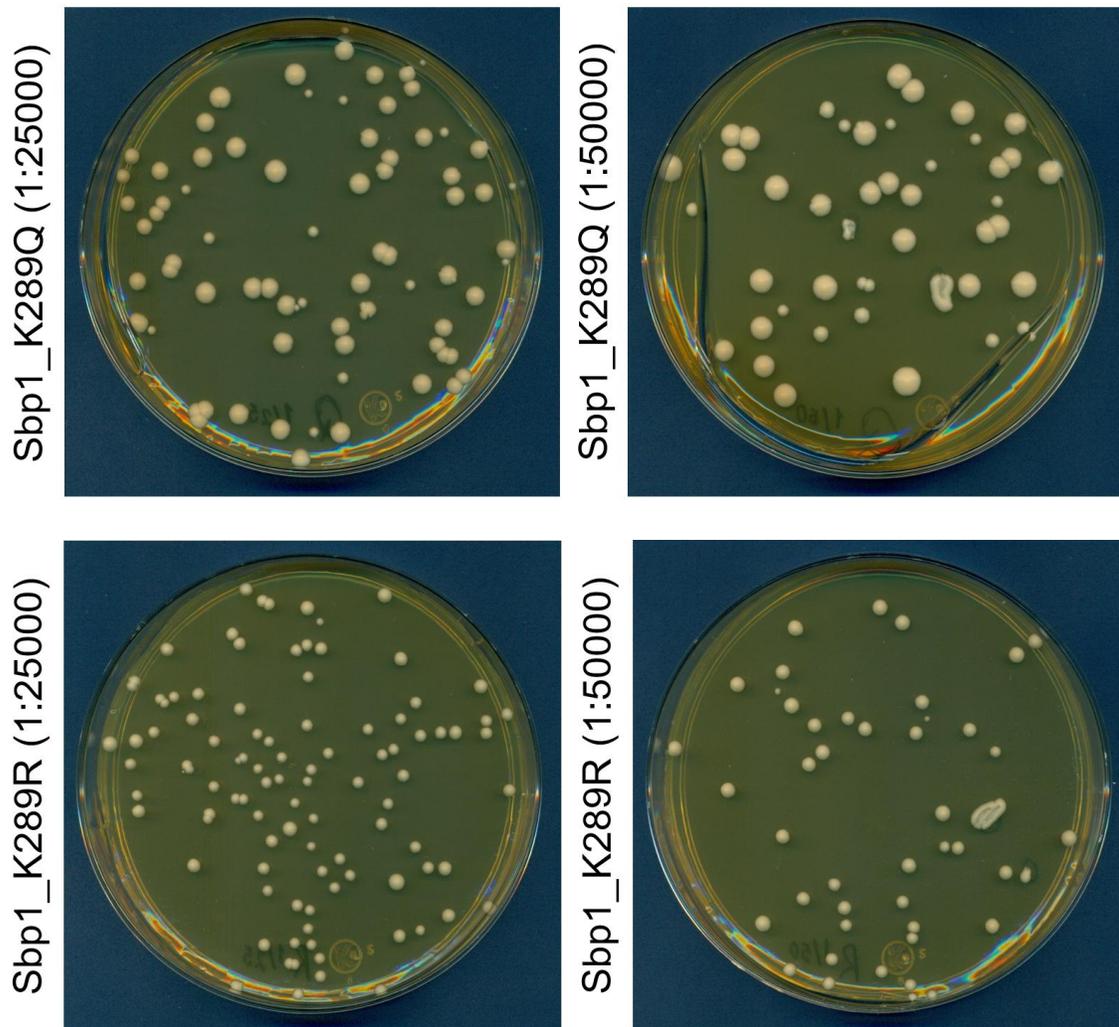
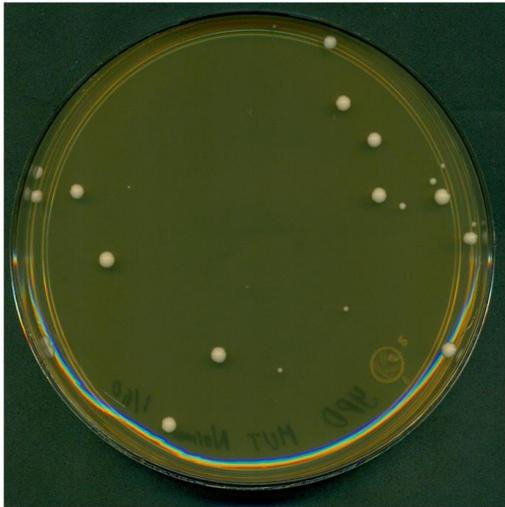


Figura 38. Observación de colonias petite. Se plaqueó una cantidad similar de células de cada cultivo en cajas de YPD para poder corroborar la formación de colonias petite. A partir de cultivos de 24 h, se realizaron diluciones de 1/25000 y 1/50000, de las cuales se pipetearon 100 μ L en cajas de medio YPD.

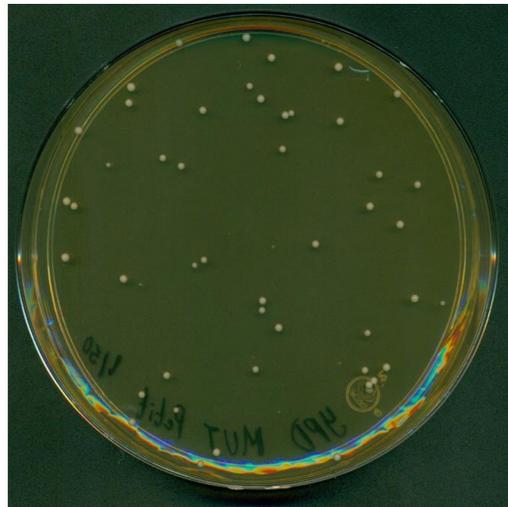
Los resultados demostraron que las cepas WT, $\Delta sbp1$ y Sbp1-GFP presentaron algunas colonias petite de un tamaño muy significativo en ambas diluciones; la cepa Sbp1 Δ C presentaba muy pocas colonias petite en la dilución 1/25000 y en la dilución 1/50000 al parecer no había ninguna; las cepas Sbp1_T287A,S289A y Sbp1_T287D,S289D presentaron una gran cantidad de células petite en ambas diluciones; la cepa Sbp1_K292Q se comportó como las cepas WT, $\Delta sbp1$ y Sbp1-GFP; mientras que en la cepa Sbp1_K292R la mayoría de las colonias eran petite y las colonias normales no eran tan grandes como en otras cepas. Se prosiguió a crecer algunas colonias de las cepas $\Delta sbp1$, Sbp1_T287A,S289A y

Sbp1_T287D,S289D, ya que en estas cepas era muy evidente la diferencia de tamaños de las colonias, y en las dos últimas había un mayor número de colonias petite. Se crecieron en medio YPD líquido y se volvieron a plaquear en cajas de YPD utilizando las mismas diluciones 1/25000 y 1/50000; de esta manera se observó si las colonias normales volvían a generar colonias petite, y si las colonias petite llegaban a revertir y formaban, nuevamente, colonias normales y petite (Figura 39).

$\Delta sbp1$ (Colonia normal)



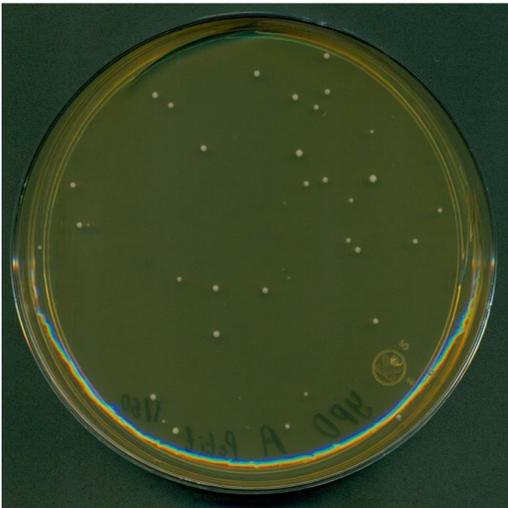
$\Delta sbp1$ (Colonia petite)



Sbp1_T287A,S289A (Colonia normal)



Sbp1_T287A,S289A (Colonia petite)



Sbp1_T287D,S289D (Colonia normal)



Sbp1_T287D,S289D (Colonia petite)

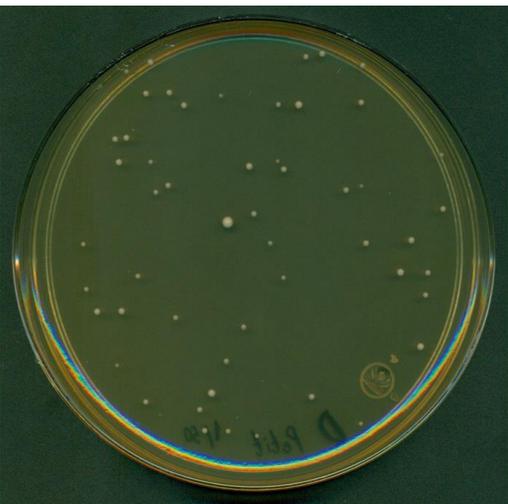
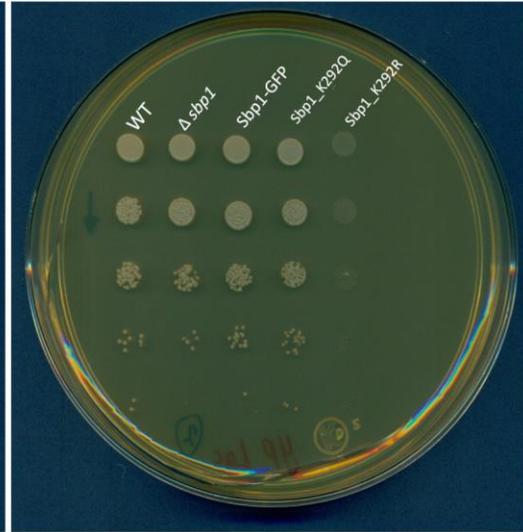
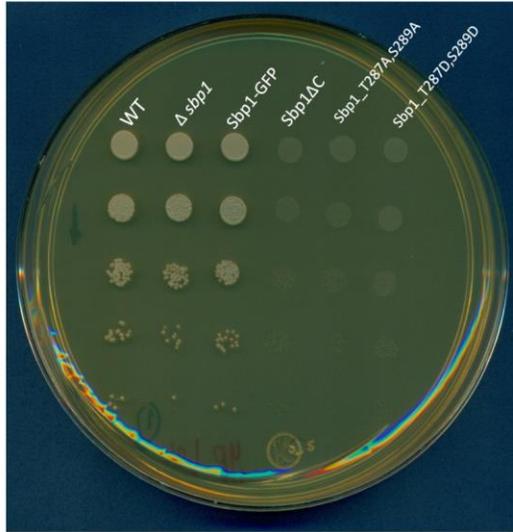


Figura 39. Crecimiento de colonias normales y petite de cepas $\Delta sbp1$, Sbp1_T287A,S289A y Sbp1_T287D,S289D. Se crecieron colonias normales y petite de las cepas ya mencionadas, las cuales se crecieron en medio YPD líquido. Se realizó una dilución 1/50000 y se plaquearon en cajas de medio YPD.

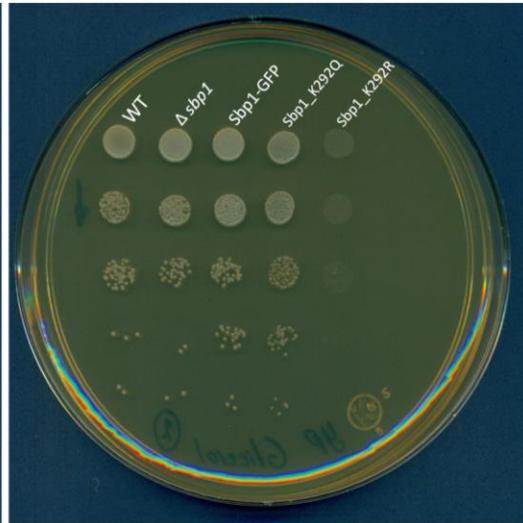
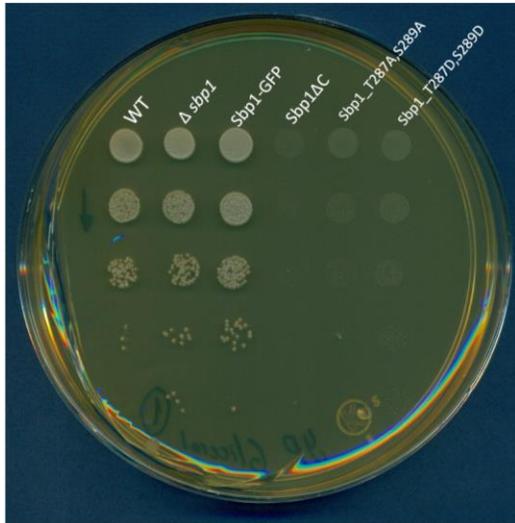
Los resultados mostraron que las colonias normales de las cepas Sbp1_T287A,S289A y Sbp1_T287D,S289D producían colonias normales. La cepa $\Delta sbp1$ presentaba mayormente colonias normales y algunas petite. En el otro caso, las colonias petite de todas las cepas producían colonias petite. Había una colonia de la cepa Sbp1_T287D,S289D que parecía haber revertido, debido a su tamaño.

Como ya se mencionó, la principal característica de las colonias petite es que presentan alteraciones en las vías de la cadena respiratoria (Day, 2013), para comprobar esto, se realizaron goteos de todas las cepas mutantes en medios con fuente de carbono no fermentable como lactato, glicerol y etanol (Figura 40).

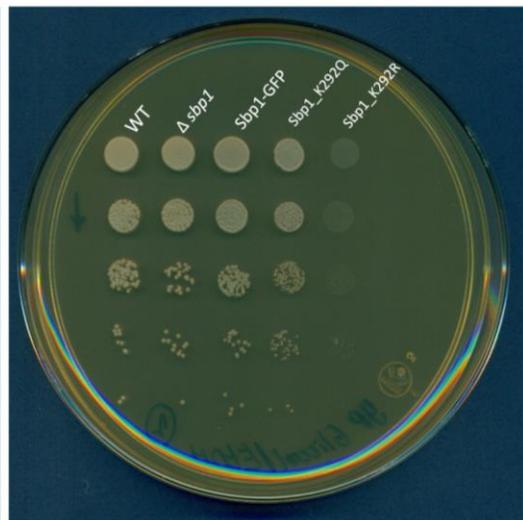
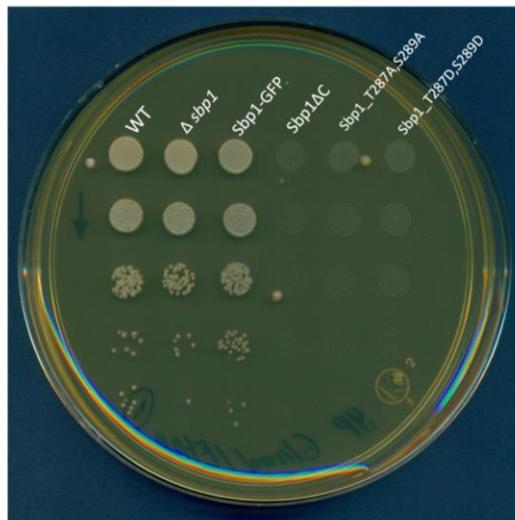
YP-Lac 2%



YP-Glycerol 2%



YP-Glycerol/Etanol 2%



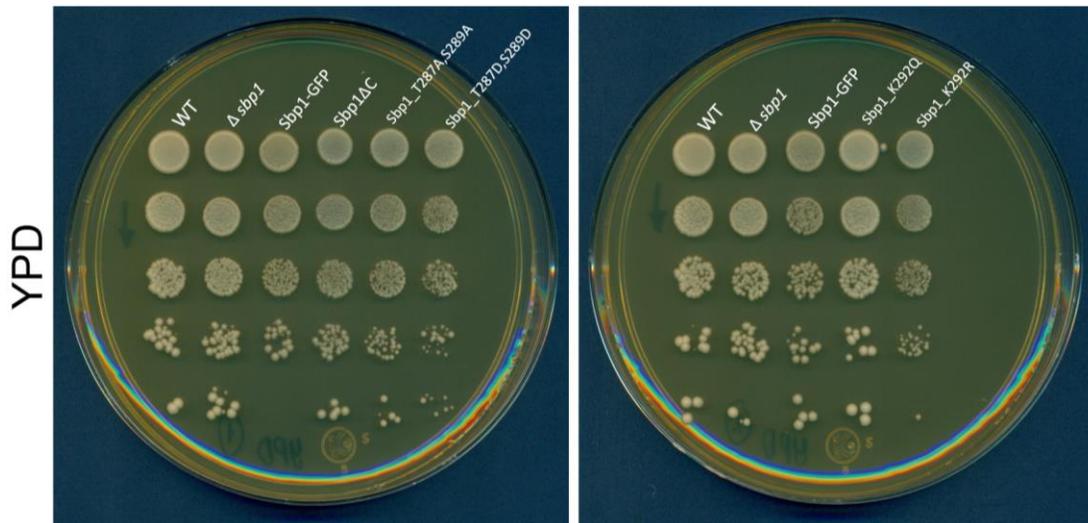


Figura 40. Ensayos de viabilidad de las cepas mutantes en medios respiratorios. Se observa que las cepas mutantes no crecen con este tipo de fuente de carbono, lo que indica que posiblemente las mutaciones que presentan le están afectando la vía de respiración oxidativa.

Se observó que las cepas mutantes no crecieron en ningún medio respiratorio. Esto indica que las mutaciones puntuales que presentan están afectando de alguna manera la vía de la fosforilación oxidativa. Como era de esperarse, la cepa *Sbp1_K292Q* sí creció en estos medios, al igual que la cepa *Sbp1-GFP*, la cepa mutante del gen, $\Delta sbp1$, y la silvestre (WT).

Se observaron las cepas *Sbp1-GFP*, *Sbp1_K292Q* y *Sbp1_K292R* cultivadas sin fuente de carbono durante 24 h. Se reemplazó el medio por un medio fresco respiratorio (glicerol y etanol). Las células se observaron a los 20 min, 2 y 4 h después de haber reemplazado el medio (Figura 41 y 42).

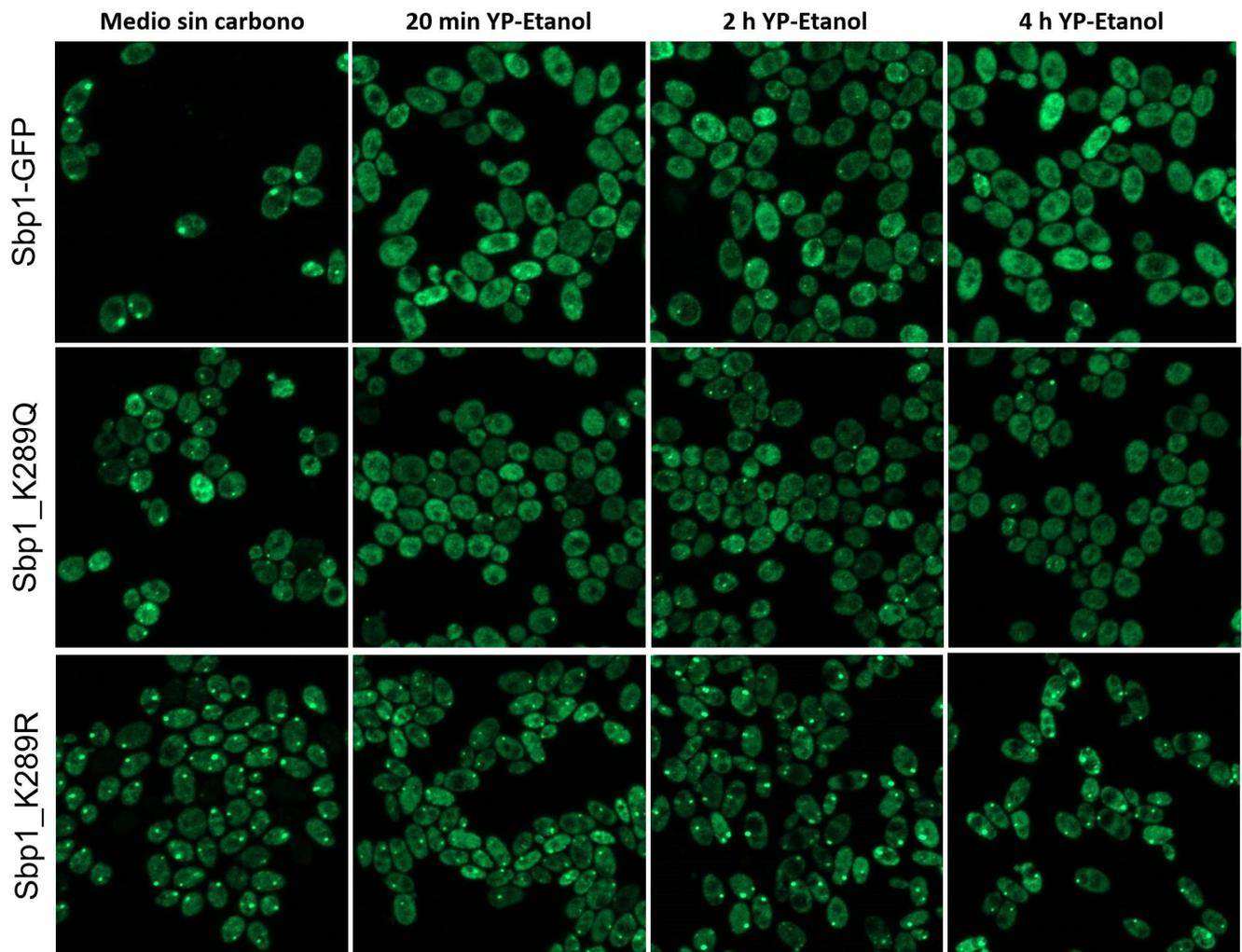


Figura 41. Observación de células al reemplazar el medio sin fuente de carbono por YP-Etanol. Se observaron las células estresadas de las cepas Sbp1-GFP, Sbp1_K289Q y Sbp1_K289R sin fuente de carbono, a los 20 min, 2 y 4 h después de haber reemplazado el medio por YP-Etanol. Microscopía confocal, 60X.

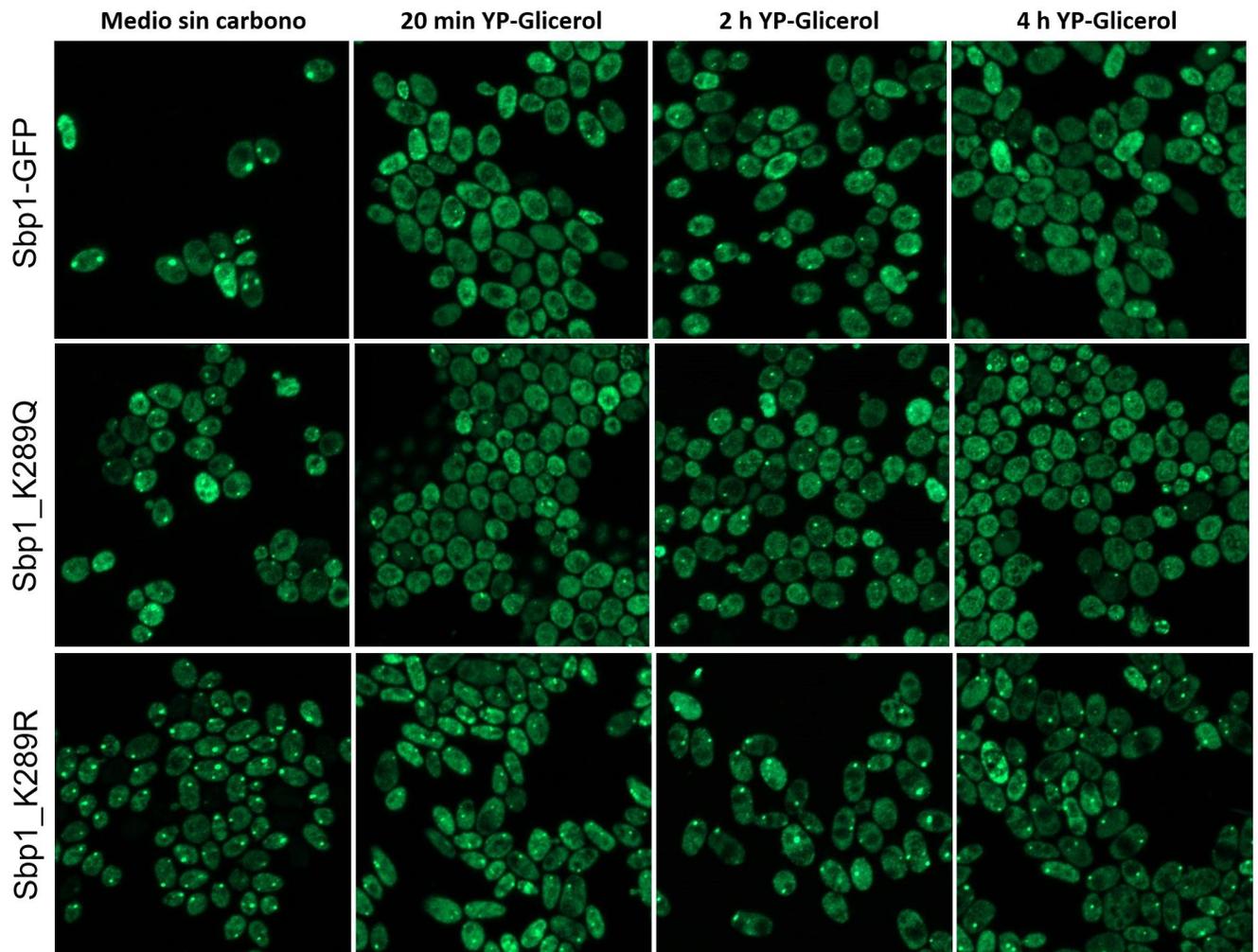
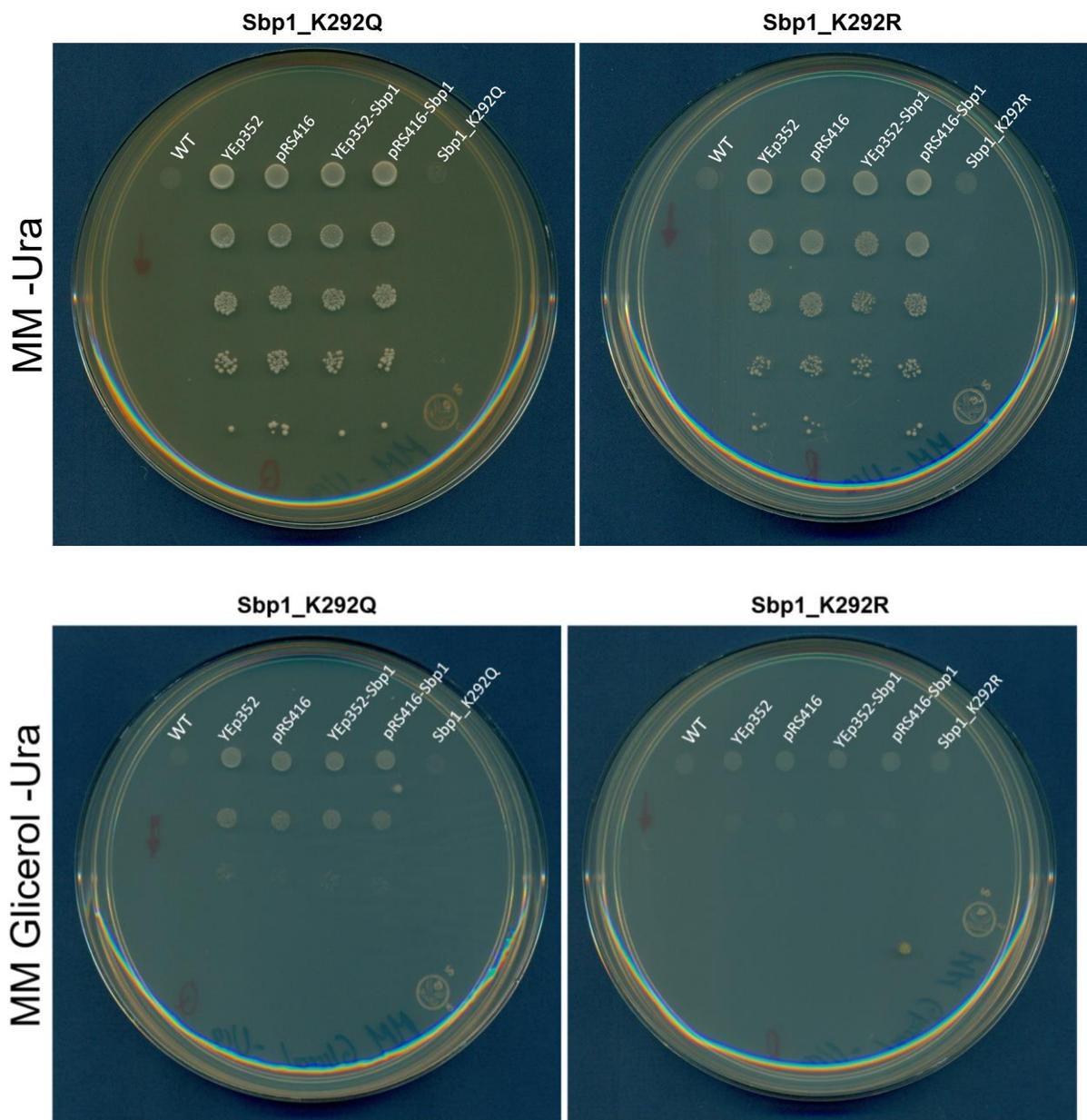


Figura 42. Observación de células al reemplazar el medio sin fuente de carbono por YP-Glicerol. Se observaron las células estresadas de las cepas Sbp1-GFP, Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R sin fuente de carbono, a los 20 min, 2 y 4 h después de haber reemplazado el medio por YP-Glicerol. Microscopía confocal, 60X.

Las imágenes demostraron que los P-bodies de las cepas Sbp1-GFP, Sbp1_K292Q desaparecían casi por completo al estar en contacto con el medio respiratorio a los 20 min. Después de 2 y 4 h, algunas células aún presentaban algunos agregados. En la cepa Sbp1_K292R siempre se observó la presencia de dichos agregados después de 20 min, 2 y 4 h lo cual podría estar relacionado con su afectación en la cadena respiratoria y su viabilidad.

Se trató de curar el fenotipo mutante, de tal modo que la cepa *Sbp1_K292R* pudiera sobrevivir en medios respiratorios, para ello se utilizaron los plásmidos YEp352 y pRS416, en los cuales se insertó el gen de *Sbp1*. Los plásmidos tenían como marcador de selección la auxotrofia a uracilo. Se transformaron las células de las cepas *Sbp1_K292Q* y *Sbp1_K292R* con los plásmidos YEp352 y pRS416 vacíos y con el gen de *Sbp1*, YEp352-*Sbp1* y pRS416-*Sbp1*. Las células transformantes se gotearon en medio selectivo (Medio mínimo -Ura), medio mínimo respiratorio selectivo (Medio mínimo, Lactato -Ura), YP-glicerol y YPD (Figura 43).



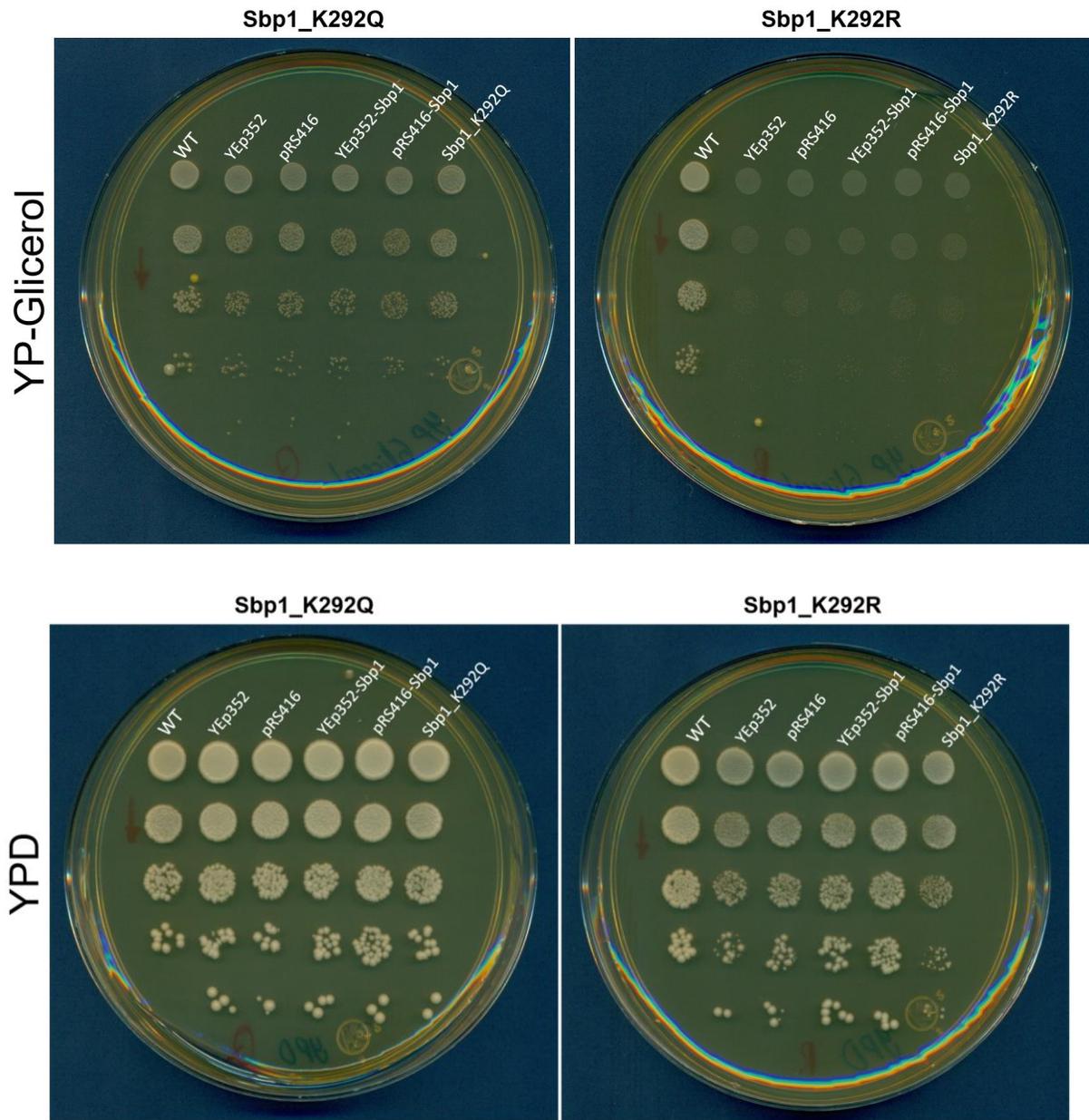


Figura 43. Goteos de cepas transformantes para observar curación del fenotipo mutante. Las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R se transformaron con los plásmidos YEp352 y pRS416, tanto vacíos como con el fragmento de Sbp1. Las células transformantes se gotearon en medio selectivo (Medio mínimo -Ura), medio mínimo respiratorio selectivo (Medio mínimo, Lactato -Ura), YP-glicerol y YPD. Se utilizó la cepa silvestre (WT), Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R sin transformar, como controles.

En medio mínimo -Ura se demostró que las células que no tienen el plásmido no crecen, tal es el caso de las cepas silvestre, Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R. En medio mínimo con lactato -Ura la única cepa que creció fue Sbp1_K292Q, en experimentos anteriores ya se había demostrado que esta cepa crecía en medio respiratorio. Los

resultados demuestran que la cepa Sbp1_K292R no se curó del fenotipo y no creció en medio respiratorio. En medio YP-Glicerol crecieron todas las células de la cepa Sbp1_K292Q y la de referencia, también como ya se había demostrado anteriormente. En medio YPD crecieron todas las células de ambas cepas.

Esto sugiere que el fenotipo de la mutación en la proteína Sbp1 está siendo dominante sobre aquel de la proteína silvestre.

IV. DISCUSIÓN

La proteína Sbp1 en *S. cerevisiae* se agrega de manera reversible en gránulos conformados por mRNA y proteínas (RNPs), conocidos como P-bodies y gránulos de estrés, que se forman cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés. La secuencia de esta proteína está conformada por dos LCRs, uno de estos presenta aminoácidos con modificaciones postraduccionales (Thr 287, Ser 289 y Lys 292). Hasta el momento no se ha estudiado si estas modificaciones son importantes para la regulación de su agregación.

Los resultados obtenidos de los experimentos de inducción de estrés permiten afirmar que la agregación de la proteína Sbp1 está relacionada con la privación de la fuente de carbono en el medio en el que se encuentran las células. Esta agregación de proteínas es reversible, ya que se confirmó su desagregación cuando las células estaban en presencia de medio completo (Narayanaswamy, et al. 2009). También se confirmó que es, específicamente, la falta de fuente de carbono y no la de nitrógeno, lo que promueve la agregación de las proteínas y formación de los P-bodies (Ramachandran, et al. 2011). Al realizar las mutaciones puntuales a la proteína Sbp1 y estresar a las células privándolas de la fuente de carbono, la formación de gránulos fue muy evidente en todas las cepas mutantes, excepto en la cepa Sbp1_K292Q que se comportó muy similar a la cepa de referencia Sbp1-GFP.

La cepa Sbp1 Δ C (que tiene la delección de 9 aminoácidos del LCR que comprende aquellos aminoácidos con modificaciones postraduccionales) presentó un gran número de células con agregados, como respuesta al estrés inducido por falta de fuente de carbono. De un número de 250 células analizadas, aproximadamente el 95% presentó gránulos. Esto puede indicar que esas modificaciones postraduccionales en la Thr 287, Ser 289 y Lys 292 están involucradas en la regulación de la agregación de esta proteína. Se obtuvieron los mismos resultados de casi un 95% de células con agregados en la cepa Sbp1_T287A,S289A (en la cual los residuos de alanina no podían ser fosforilados) y en la cepa Sbp1_T287D,S289D (en la cual el ácido aspártico mimetiza la fosforilación de los

aminoácidos treonina y serina); en ambos casos no hay fosforilación. La fosforilación por si sola puede promover un punto electrostático que podría influenciar y cambiar la conformación de la proteína o modificar la interacción proteína-proteína (Tarrant, et al. 2009). La proteína Sbp1 tiene dos dominios RRM, de los residuos 37-119 y del 186-274, además de un dominio RGG del residuo 131 al 151, las cuales son regiones responsables de unión a RNA en eucariontes. Como ya se mencionó, estas fosforilaciones podrían estar modificando la estructura de la proteína, en este caso al no estar estas fosforilaciones presentes, la estructura de la proteína también podría estar cambiando de tal manera que las regiones de unión podrían estar más expuestas, repercutiendo en una mayor formación de gránulos. Otra explicación podría ser que exista una interacción entre ambas modificaciones postraduccionales, los resultados de este trabajo sugieren que la lisina 292 también puede estar acetilada, lo cual se discute más adelante. En este caso, tal vez es necesario que ambas modificaciones postraduccionales, las fosforilaciones y la acetilación/ubiquitinación (Figura 44) estén presentes para activar alguna otra vía que esté participando en la regulación de la formación de estos P-bodies.

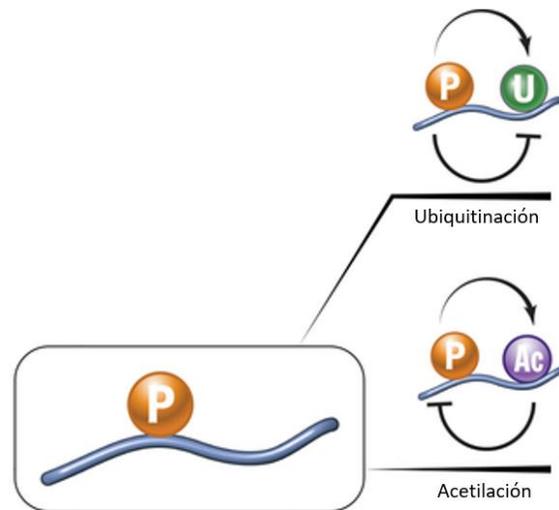


Figura 44. Ambas modificaciones postraduccionales necesarias para la regulación. Tal vez el mecanismo de regulación involucra el reconocimiento de ambas modificaciones postraduccionales, las fosforilaciones y la acetilación/ubiquitinación, de tal modo que se activa alguna vía que esté participando en la regulación de la formación de estos P-bodies. Tomada y modificada de Roux, et al. 2013.

Como ya se mencionó, la cepa Sbp1_K292Q (en la cual se mutó la lisina por una glutamina con el fin de mimetizar la acetilación) presentó un menor número de gránulos en comparación con las otras mutantes, el número de agregados fue muy similar a la cepa de “referencia”, Sbp1-GFP. La cepa Sbp1_K292R (en la cual se mutó la lisina por una arginina para que se conservara la carga positiva sin presentar alguna modificación) presentó también aproximadamente un 95% de células con gránulos. Teniendo en cuenta que la cepa Sbp1_K292Q se comportó muy similar a la cepa Sbp1-GFP, esto podría indicar que la lisina de la posición 292 presenta una acetilación, la cual no ha sido reportada. En la literatura se ha mencionado que existe una competencia directa entre la acetilación y ubiquitinación de la lisina (Figura 45), como un mecanismo de regulación que previene la ubiquitinación y la consecuente degradación de la proteína (Caron, et al. 2005).

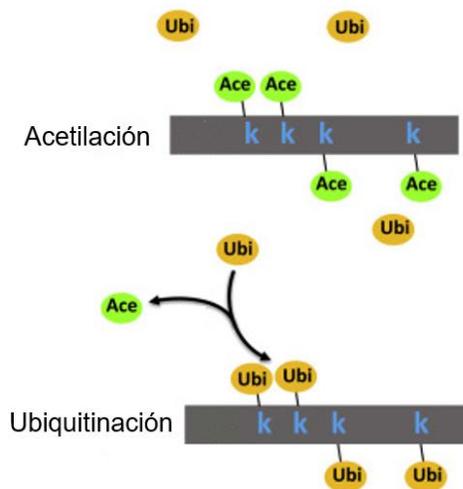


Figura 45. Competición entre la acetilación y la ubiquitinación de la lisina. Se ha reportado que existe una competencia directa entre la acetilación y la ubiquitinación de la lisina, dependiendo de las condiciones celulares, como un mecanismo de regulación que previene la ubiquitinación e impide la degradación de la proteína

Cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés por falta de fuente de carbono, la proteína Sbp1 es traducida y acetilada, de esta manera se previene su degradación y la proteína puede ejercer su función de unión a mRNA. Debido a que la cepa Sbp1_K292R conserva un aminoácido cargado positivamente sin ninguna modificación, esto puede provocar nuevamente un cambio en el arreglo de la proteína, de tal manera que ciertas regiones queden más o menos expuestas, y de

esta manera repercute en el mayor número de agregados que se observan en condiciones de estrés por falta de fuente de carbono.

El resultado de los Western blot (Anexo, Figura 1) demostró que la expresión de la proteína Sbp1 fusionada a γ GFP es muy similar en todas las cepas. En ambas condiciones, tanto a los 20 min en medio YPD fresco como 24 h sin fuente de carbono, se observaron dobletes, con excepción de la cepa Sbp1 Δ C. Cabe recordar que la cepa Sbp1 Δ C presenta un peso menor, debido a que se le quitaron 9 aminoácidos, entre ellos los tres que presentan modificaciones postraduccionales, es por eso la banda se observa un poco más abajo que las otras. Esto sugiere que la banda superior en los dobletes de las otras cepas es la proteína con modificaciones postraduccionales. La cepa Sbp1_K292Q presenta varias bandas, las cuales pueden significar proteólisis, lo cual podría repercutir en un menor número de agregados en las células en comparación con las otras cepas.

Posteriormente se evaluó si estas cepas presentaban desagregación al estar nuevamente en contacto con medio completo. Los resultados mostraron que en las cepas Sbp1 Δ C, Sbp1_T287A,S289A y Sbp1_T287D,S289D los gránulos desaparecían, tanto a los 20 min, como 2 h después. En las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R los gránulos no desaparecían por completo, simplemente había menos agregados, tanto a los 20 min como a las 2 h, por lo que se observaron 6 y 15 h después, encontrando que ambas presentaron gránulos como si no tuvieran fuente de carbono. Esto podría indicar que la desagregación no ocurre por completo en estas cepas, probablemente la mutación en la lisina 292 está afectando drásticamente la regulación de los gránulos. Como ya se mencionó anteriormente, la mutación podría influir en el arreglo de la proteína, de tal modo que esta proteína esté uniéndose con mayor afinidad a los mRNAs u otras proteínas con las que haya interacción y se encuentren “secuestrados”, por lo que no es posible la desagregación de estos gránulos en la célula aún en las condiciones favorables que le brinda el medio completo.

Estas mutaciones también repercuten en el tiempo de vida de las células ya que las células comenzaban a morir aproximadamente a los 25 días en condiciones de auxotrofia. Como se demostró en los experimentos de viabilidad, las células en

medio completo sobrevivían durante más tiempo. Otra de las características que llamó la atención fue la formación de colonias petite, se realizaron plaqueos de las células a diferentes diluciones, en las cuales se observó la formación de dichas colonias que presentan problemas para respirar. Se tomó una colonia normal y una petite de diferentes cepas y se sembraron en medio YPD líquido y en medio respiratorio; el resultado fue que las colonias petite no crecieron en el medio respiratorio, como era de esperarse (no mostrado en los resultados). Al realizar goteos en medio respiratorio se confirmó esta situación, ninguna de las cepas mutantes creció, excepto la Sbp1_K292Q, lo cual ya se ha mencionado, que presenta un comportamiento similar a la cepa Sbp1-GFP, lo que puede indicar que la proteína Sbp1 presenta una acetilación en la lisina 292 que no ha sido reportada (<http://yaam.ifc.unam.mx/>).

Las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R fueron privadas de fuente de carbono 24 h y después se les reemplazó el medio por YP-Etanol y YP-Glicerol y se observaron al microscopio después de 20 min, 2 y 4 h. Los resultados demostraron que la cepa Sbp1_K292R siempre presentó los P-bodies en todos los tiempos. Como ya se mencionó anteriormente, tal vez esta mutación está “secuestrando” mRNAs importantes para la respiración oxidativa y es por eso que las células mueren en este tipo de fuentes de carbono. Se ha reportado que Sbp1 se une a más de 1000 mRNAs (<https://www.yeastgenome.org/>).

Se utilizó el programa Prediction of Acetylation on Internal Lysines.(PAIL) con el cual se obtuvo que la lisina 292 tiene el resultado más alto respecto a su tendencia de acetilarse (Figura 46). Cabe mencionar que tal vez este programa se enfoca en proteínas de mamíferos, por lo que será necesario realizar una comprobación experimental.

```
>sp|P10080|SSBP1_YEAST Single-stranded nucleic acid-binding protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=SBP1 PE=1 SV=2
```

Peptide	Position	Score	Threshold
FRAPTHKTVIDPE	30	1.38	0.2
GHIPASKHALVKF	83	1.47	0.2
SKHALVKFPTKID	88	1.32	0.2
LVKFPTKIDFDNI	92	0.44	0.2
KENYDTKVVKDRE	105	0.28	0.2
GGFNGQKREKIPL	172	1.57	0.2
NGQKREKIPLDQM	175	0.93	0.2
INNVPFKATKEEV	196	0.83	0.2
VPFKATKEEVAEF	199	0.79	0.2
ISLPMRKMRDQHT	219	0.23	0.2
AKAEFEKGVFGD	258	1.42	0.2
ETGSEEKQE****	292	7.56	0.2

Figura 46. Resultado de predicción de acetilación de la proteína Sbp1. Se utilizó el programa Prediction of Acetylation on Internal Lysines.(PAIL) con el que se determinó que la lisina 292 tiene una gran probabilidad de presentar acetilación. Sin embargo, se tendrá que realizar una comprobación experimental, ya que este programa se enfoca en proteínas de mamíferos.

Respecto a la transformación de las cepas Sbp1_K292Q y Sbp1_K292R con los plásmidos pRS416 y YEp352 con el gen de Sbp1, el resultado obtenido demostró que la cepa Sbp1_K292R no revirtió el fenotipo y siguió sin poder crecer en medio respiratorio. Este resultado sugiere que el fenotipo que le confiere la mutación es dominante sobre aquel silvestre.

IV. CONCLUSIONES

- Las cepas mutantes Sbp1 Δ C; Sbp1_T287A,S289A; Sbp1_T287D,S289D y Sbp1_K292R presentaron un mayor número de agregados por ausencia de fuente de carbono, lo que sugiere que las modificaciones postraduccionales en el segundo LCRs participan en la regulación de dichos agregados
- Las mutaciones puntuales en la cepas Sbp1 Δ C; Sbp1_T287A,S289A; Sbp1_T287D,S289D y Sbp1_K292R afectan la capacidad para respirar de la levadura ya que no pueden crecer en fuentes de carbono no fermentables.

V. PERSPECTIVAS

- Comprobar experimentalmente la acetilación de la lisina 292 en la proteína Sbp1.
- Precipitar Sbp1-GFP en fase exponencial y sin fuente de carbono para identificar ubiquitinación y acetilación por medio de Western blot.
- Determinar la razón por la cual se forman las colonias petite.

VI. REFERENCIAS

- Allis, Berger, Cote, Dent, Jenuwien, Kouzarides, Pillus, Reinberg, Shi, Shiekhattar, Shilatifard, Workman & Zhang. **New nomenclature for chromatin-modifying enzymes.** *Cell*. 131 (4), 633–636, 2007.
- Anderson & Kedersha. **RNA granules.** *Journal of Cell Biology*. 172 (6), 803–808, 2006.
- Arnesen, Van Damme, Polevoda, Helsens, Evjenth, Colaert, Varhaug, Vandekerckhove, Lillehaug, Sherman & Gevaert. **Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 106 (20), 8157–8162, 2009.
- Belle, Tanay, Bitincka, Shamir & O'Shea. **Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 103 (35), 13004–13009, 2006.
- Buchan, Muhlrad & Parker. **P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Cell Biology*. 183 (3), 441–455, 2008.
- Bürkle. **Posttranslational modification A2-brenner.** Sydney. In: Miller, J.H. (Ed.), *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, New York. 1533, 2001.
- Caron, Boyault & Khochbin. **Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability.** *Bioessays*. 27 (4), 408–415, 2005.

- Coletta, Pinney, Solís, Marsh, Pettifer & Attwood. **Low complexity regions within protein sequences have position-dependent roles.** *BMC Systems Biology.* 4 (43), 1-13, 2010.
- Das, Pal, Das, Bagga, Roy, Mrigwani & Maiti. **Sequence Complexity of Amyloidogenic Regions in Intrinsically Disordered Human Proteins.** *PLoS One.* 9 (3), 1-19, 2014.
- Day. **Chapter One-Yeast Petites and Small Colony Variants: For Everything There Is a Season.** *Advances in Applied Microbiology.* 85, 1-41, 2013.
- Decker & Parker. **P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 4 (9), 1-16, 2012.
- Drazic, Myklebust, Ree & Arnesen. **The world of protein acetylation.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1864 (10), 1372–1401, 2016.
- Eulalio, Behm-Ansmant & Izaurralde. **P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 8 (1), 9-22, 2007.
- Finley, Ulrich, Sommer & Kaiser. **The Ubiquitin–Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics.* 192 (2), 319–360, 2012.
- Goffeau, Barrell, Bussey, Davis, Dujon, Feldmann, Galibert, Hoheisel, Jacq, Johnston, Louis, Mewes, Murakami, Philippsen, Tettelin & Oliver. **Life with 6000 Genes.** *Science.* 274 (5287), 546-567, 1996.
- Höhfeld. **Preserving protein function through reversible aggregation.** *Nature Cell Biology.* 19 (10), 1142–1144, 2017.

- Jain, Wheeler, Walters, Agrawal, Barsic & Parker. **ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure.** *Cell*. 164 (3), 487-498, 2016.
- Kucherenko & Shcherbata. **Stress-dependent miR-980 regulation of Rbfox1/A2bp1 promotes ribonucleoprotein granule formation and cell survival.** *Nature Communications*. 9 (1), 312, 2018.
- Mao, Zhang & Spector. **Biogenesis and function of nuclear bodies.** *Trends in Genetics*. 27 (8), 295–306, 2011.
- Mitchell, Jain, She & Parker. **Global Analysis of Yeast mRNPs.** *Nature Structural & Molecular Biology*. 20(1), 127–133, 2013.
- Narayanaswamy, Levy, Tsechansky, Stovall, O'Connell, Mirrielees, Ellington & Marcotte. **Widespread reorganization of metabolic enzymes into reversible assemblies upon nutrient starvation.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 106 (25), 10147-10152, 2009.
- Xue, et al. **PAIL: Prediction of Acetylation on Internal Lysines.**
- Parker & Sheth. **P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation.** *Molecular Cell*. 25 (5), 635-646, 2007.
- Protter & Parker. **Principles and Properties of Stress Granules.** *Trends in Cell Biology*. 26 (9), 668-679, 2016.
- Ramachandran, Shah & Herman. **The cAMP-Dependent Protein Kinase Signaling Pathway Is a Key Regulator of P Body Foci Formation.** *Molecular Cell*. 43 (6), 973-981, 2011.

- Rogov, Ovchenkova, Goleva, Kireev & Zvyagilskaya. **New yeast models for studying mitochondrial morphology as affected by oxidative stress and other factors.** *Analytical Biochemistry.* 552, 24-29, 2018.
- Roux & Thibault. **The Coming of Age of Phosphoproteomics—from Large Data Sets to Inference of Protein Functions.** *Molecular & Cellular Proteomics.* 12 (12), 3453-3464, 2013.
- Saad, Cereghetti, Feng, Picotti, Peter & Dechant. **Reversible protein aggregation is a protective mechanism to ensure cell cycle restart after stress.** *Nature Cell Biology.* 19 (10), 1202-1213, 2017.
- Shah, Zhang, Ramachandran & Herman. **Processing Body and Stress Granule Assembly Occur by Independent and Differentially Regulated Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics.* 193 (1), 109–123, 2013.
- Spector. **SnapShot: cellular bodies.** *Cell.* 127 (5), 1071, 2006.
- Tarrant & Cole. **The Chemical Biology of Protein Phosphorylation.** *Annual Review of Biochemistry.* 78, 797–825, 2009.
- Ubersax & Ferrell. **Mechanisms of specificity in protein phosphorylation.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 8 (7), 530-541, 2007.
- <https://www.uniprot.org/>
- Verstrepen, Jansen, Lewitter & Fink. **Intragenic tandem repeats generate functional variability.** *Nature Genetics.* 37(9), 986-990, 2005.
- <http://yaam.ifc.unam.mx/>

- <https://www.yeastgenome.org/>

VII. ANEXO

Se realizó el western blot de las células tanto en medio YPD, como en medio mínimo sin fuente de carbono (Figura 1).

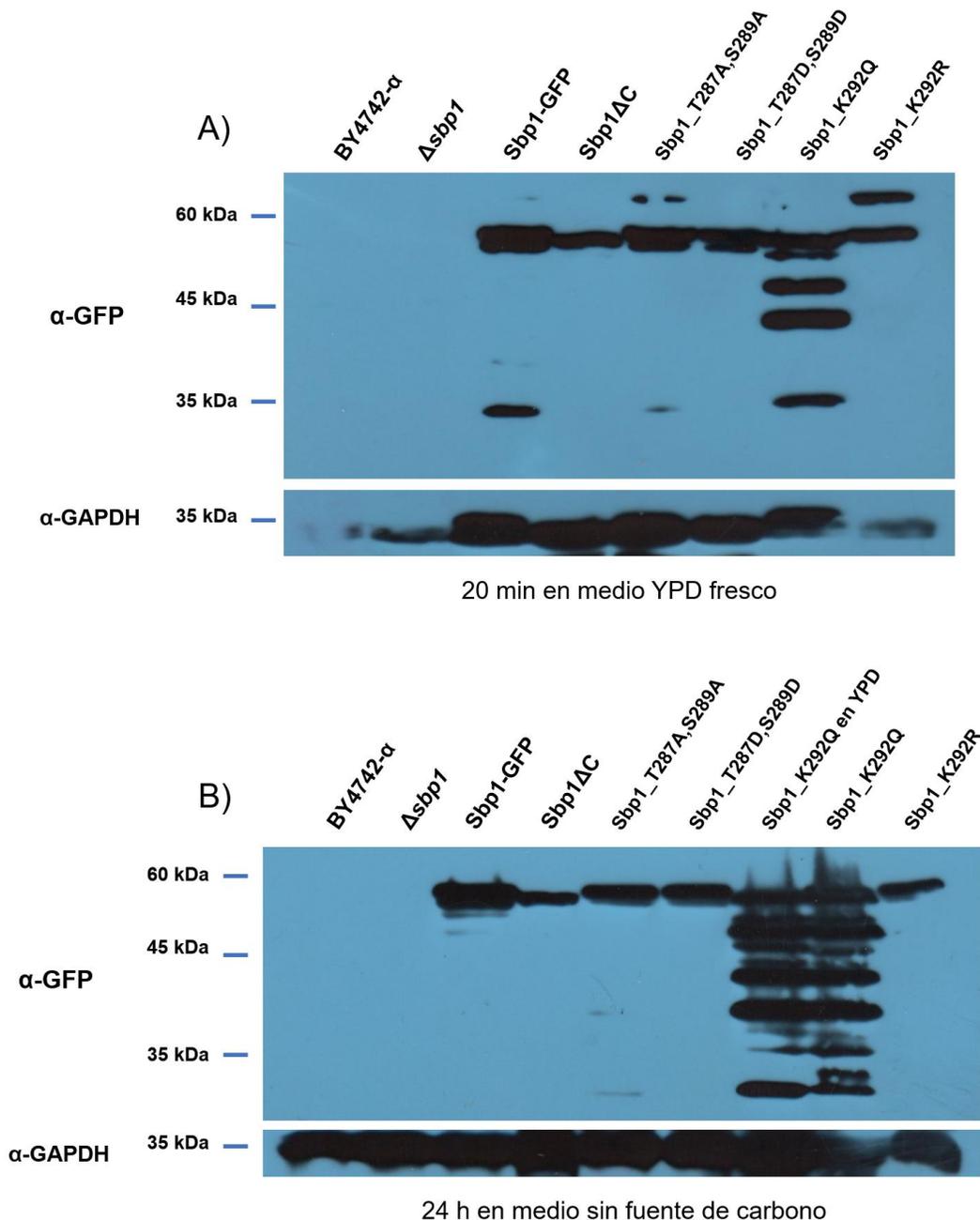


Figura 1. Western Blot. A) Western blot contra la proteína GFP después de que las cepas estuvieron 20 min en medio YPD fresco. Se utilizó la cepa silvestre, y la mutante del gen como controles. El tamaño esperado de la fusión de Sbp1 y γ GFP tiene un peso aproximado a 59 kDa.

B) Western blot contra GFP después de que las cepas estuvieron 24 h medio sin fuente de carbono. En este gel se volvió a cargar la muestra de la cepa Sbp1_K292Q en medio YPD y así compararla con aquella sin fuente de carbono. El peso aproximado de GAPDH es de 35.7 kDa. Anticuerpo α -GFP (1:1000), α -GAPDH (1:5000).

Los resultados del western blot demuestran que la expresión de la proteína es similar en todas las cepas y en ambas condiciones, tanto en medio fresco con YPD como en medio sin fuente de carbono. Algunas cepas presentan dobletes lo cual puede indicar que es la misma proteína Sbp1 sin modificaciones postraduccionales, las cuales le restan unos cuantos kDa de peso. Esto puede corroborarse con la cepa Sbp1 Δ C en ambas condiciones, la cual no presenta modificaciones postraduccionales, debido a que puede observarse una sola banda un poco abajo con respecto a las otras. La cepa Sbp1_K292Q presentó diferentes bandas de diferentes pesos en ambas condiciones, esto puede ser el resultado de proteólisis.