



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Estudio de la regulación transcripcional y post-traducciona de los Arestin Related Trafficking Adaptors (Art4 y Art7) bajo la influencia de diferentes fuentes de carbono en el organismo *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo de Fin de Grado
Grado en Biotecnología
2010-2014

AUTOR: Pablo José Sancho Pla
DIRECTORA: Lynne Paula Yenush

València, Septiembre 2014



Datos Personales:

Nombre y Apellidos: PABLO JOSÉ SANCHO PLA

Datos del Trabajo de Fin de Grado:

Título:	Estudio de la regulación transcripcional y post-traducciona de los Arrestin Related Trafficking Adaptors (Art4 y Art7) bajo la influencia de diferentes fuentes de carbono en el organismo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Lugar de realización:	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
Fecha de Lectura:	Septiembre, 2014
Titulación:	Grado en Biotecnología
Directora:	LYNNE YENUSH

Resumen:

Para mantener la viabilidad celular, las células necesitan adaptarse a los cambios en el medio. La endocitosis de transportadores de membrana mediada por ubiquitinación, juega un papel importante en este proceso ya que, proporciona el mecanismo para eliminar proteínas transportadoras de la membrana celular. Arrestin-related Trafficking Proteins (ARTs) son importantes reguladores de la endocitosis en levadura. Estas facilitan la ubiquitinación de proteínas diana por la E3 ubiquitina ligasa, Rsp5. Otro posible mecanismo de regulación de la composición proteica de la membrana, previo a la endocitosis de transportadores, es la regulación transcripcional.

En un estudio previo de nuestro grupo, se observó un incremento en la expresión del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6 en cepas mutantes *art4* y *art7* al cambiar la fuente de carbono. En trabajo que se presenta, se midió la actividad del promotor de *HXT6* en la cepa silvestre y en los mutantes *art4* y *art7* bajo la presencia de diferentes fuentes de carbono, para determinar si los cambios previamente observados en la expresión del transportador de alta afinidad Hxt6 se deben a una regulación transcripcional.

Por otra parte, se pretendió observar diferencias en el fenotipo tanto de mutantes para *art4* y *art7* como en cepas que sobreexpresan los genes *ART4* y *ART7* cuando son cultivadas con diferentes fuentes de carbono. Además, se intentó determinar mediante western blot, diferencias en la expresión de estas proteínas cuando se cultivaban en medios con diferente fuente de carbono y siempre bajo el control de su propio promotor.

Palabras clave:

Proteínas de membrana plasmática, transportador, tráfico intracelular, endocitosis, ubiquitinación familia ART, adaptadores de Rsp5

Resum:

Per mantindre la viabilitat cel·lular, les cèl·lules necessiten adaptar-se als canvis en l'entorn. La endocitosis de transportadors de membrana mitjançant ubiquitinació, juga un paper important en aquest procés ja que, proporciona el mecanisme per a eliminar proteïnes transportadores de la membrana cel·lular. Arrestin-related Trafficking Proteins (ARTs), son importants reguladors de l'endocitosis en llevat. Estes faciliten l'ubiquitinació de proteïnes diana mitjançant la E3 ubiquitina lligasa, Rsp5. Altre possible mecanisme de regulació de la composició proteica de la membrana, previ a l'endocitosis de transportadors, es la regulació transcripcional.

En un estudi previ d'aquest grup, es va observar un increment en l'expressió del transportador de glucosa d'alta afinitat Hxt6 en soques mutants *art4* y *art7* al canviar la font de carboni. En el treball que aquí es presenta, es va mesurar l'activitat del promotor *HXT6* en la soca silvestre y en els mutants *art4* y *art7*.baix la presencia de diferents fonts de carboni, per tal de determinar si els canvis prèviament observats en l'expressió del transportador Hxt6 es deuen a una regulació transcripcional.

Per altra banda, es pretengué observar diferencies al fenotip tant de mutants *art4* y *art7* com en soques que sobreexpresaven aquestos gens quan son cultivades en diferents fonts de carboni. A més a més, es va intentar determinar mitjançant western blot, diferencies en la expressió de estes proteïnes quan eren cultivades en medis de cultiu amb diferent font de carboni y sempre baix el control del seu propi promotor.

Praules clau:

Proteïnes de membrana plasmàtica, transportador, transit intracel·lular, endocitosis, ubiquitinació, família ART, adaptadors de Rsp5

Abstract:

To maintain cell viability, cells need to adapt to changes in the environment. The endocytosis of membrane transporters mediated by ubiquitination, plays an important role in this process since, it provided the mechanism to remove transporter proteins from the cell membrane. Arrestin-related Trafficking Proteins (ARTs) are important regulators of endocytosis in yeast. Those facilitate the ubiquitination of target proteins by the E3 ubiquitin ligase, Rsp5. Another possible regulation mechanism of membrane protein composition, prior to endocytosis of transporters is transcriptional regulation.

In a previous study from our group, was observed an increase in the expression of high-affinity glucose transporter Hxt6 in mutant strains *art4* and *art7* when changing the carbon source. In the work presented, the *HXT6* promoter activity in the wild type strain and in mutant *art4* and *art7* was measured under the presence of different carbon sources, to determine if the changes previously observed in the expression of high-affinity transporter Hxt6 were due to transcriptional regulation. On the other hand, was intended to observe differences in the phenotype of both mutants *art4* and *art7* and in strains over expressing genes *ART4* and *ART7* when are cultivated with different carbon sources. In addition, we attempted to determine by Western blot, differences in expression of these proteins when were grown in media with different carbon source and always under the control of its own promoter.

Key words:

Membrane Proteins, transporter, intracellular trafficking, endocytosis, ubiquitination, ART family, Rsp5 adaptors.

AGRADECIMIENTOS

Terminar el Grado en Biotecnología es la culminación de cuatro años de estudio, trabajo, esfuerzo y dedicación completa. Sin el apoyo ni la ayuda de un círculo muy grande de personas, no habría sido posible finalizar de forma satisfactoria este proyecto que me ha formado tanto profesionalmente como personalmente.

Haciendo analogía a una célula, el citoesqueleto es la parte que le da la estructura y es el andamio de la célula. Este lo han formado profesores, compañeros y amigos, que son los que le han dado forma y estructura a estos cuatro años de vida.

Quiero agradecer a los profesores la buena formación que he tenido y a la dedicación que han puesto en cada asignatura.

El centriolo es donde se organiza el citoesqueleto. Aquí cabe mencionar a la directora y organizadora de este proyecto la Dra Lynne Yenush. Quiero darle las gracias por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su grupo y por todo el apoyo y confianza que ha mostrado. Gracias a ella, a sus explicaciones y enseñanzas, este trabajo se ha podido convertir en una realidad.

Mencionar también a Vicent, Ceci, Mari Carmen y Khaled. Vuestros consejos y optimismo han sido de gran ayuda. Sabéis trabajar duro pero al mismo tiempo pasar buenos momentos en el laboratorio y eso ha hecho que mi estancia en el laboratorio haya sido muy agradable. Si ahora soy un poco más eficiente experimentalmente es gracias a Vicent, el ha sido el que ha estado ahí día a día con mucha paciencia corrigiendo mis errores.

Agradecer a mis amigos del pueblo Javi, Lluch, Natxo, Galera, Dani, Daimi... por los buenos momentos que me han hecho pasar y por lo importante que ha sido poder desconectar del mundo académico en ciertos momentos. Pero agradecer también a los amigos que he encontrado en este viaje. A Víctor, Miquel, Ximo, Dani... quiero agradecerles las buenas tardes de cervezas y buenos momentos que nos han acompañado durante estos años. Esas tardes en las que la penúltima cerveza siempre hacía que volviéramos a casa un poco más tarde de la cuenta. ¡Eso sí que han sido fructíferos momentos!

En la parte más interna de la célula tenemos el núcleo. Aquí se encuentran mi Padre, Madre, Hermano y Abuela. Sin ninguna duda esto no hubiera sido posible sin vosotros. Vuestro sustento tanto moral como económico ha sido clave en este viaje que decidí tomar hace cuatro años. Padre y Madre, todo lo que soy, es gracias a vosotros y a la dedicación que habéis puesto en mi educación. En algunos momentos no ha sido fácil pero siempre habéis sabido cómo afrontar de forma satisfactoria cada situación. Inyaki, siempre has sido una constante inspiración y admiro muchísimo tu fuerza de voluntad. El fuerte vínculo que tenemos ha hecho posible que cada fin de semana me cargara de fuerzas para poder continuar. Uela, siempre has estado ahí cuando lo he necesitado. Y, ¡hay que ver!, como he disfrutado tus maravillosas comidas guardadas en esas fiambreras que nunca te devolvía. Quiero agradecerte que cada fin de semana que volvía a casa intentaras llenarme la nevera de comida. Eso ha sido de mucha ayuda.

Finalmente, y sin analogías en células, -pues está en mi corazón y es mi vida, quiero darle las gracias profundamente a Irene. Tres de estos años han sido posibles gracias a ti. A tu constante preocupación por mí y a toda esa dedicación en cada trabajo, que hemos llevado a cabo como un equipo altamente eficiente. A ti quiero agradecerte el estar ahí día a día, en lo bueno y en lo malo.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LA CÉLULA DE LEVADURA	1
1.2	LA ENVOLTURA CELULAR.....	1
1.3	EL SISTEMA DE SECRECIÓN Y LAS VACUOLAS	2
1.4	VARIEDAD DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN <i>S. CEREVISIAE</i>	2
1.5	TRANSPORTE DE NUTRIENTES Y AMONIO	2
1.6	TRANSPORTE DE GLUCOSA.....	3
1.7	REGULACIÓN DE TRANSPORTADORES	3
1.7.1	Regulación de transportadores a nivel transcripcional.....	3
1.7.2	Regulación de transportadores a nivel post-traducciona l	4
1.8	Rsp5 Y LA UBIQUITINACIÓN	7
1.8.1	La maquinaria de ubiquitinación	7
1.8.2	Rsp5	8
1.8.3	Función	9
1.9	ADAPTADORES DEL TRÁFICO RELACIONADOS CON ARRESTINA: FAMILIA ART	9
1.9.1	Adaptadores de Rsp5.....	9
1.9.2	Características de la familia ART.....	10
1.9.3	Funciones de la familia ART	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PROMOTORES DE <i>HXT6</i> , <i>ART4</i> Y <i>ART7</i>	14
2.2	ESTUDIO FENÓTIPICO	14
2.3	PERFIL DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>ART4</i> Y <i>ART7</i>	14
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	15
3.1.1	Bacterias	15
3.1.2	Levaduras.....	15
3.2	TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA.....	16
3.2.1	Transformaciones en bacteria: transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	16
3.2.2	Transformación en levadura.....	16
3.2.3	Inserción de GFP en el genoma	16
3.3	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA	17
3.3.1	Diseño de oligonucleótidos	17
3.3.2	Extracción de ADN genómico de levadura:	18

3.3.3	Extracción de ADN plasmídico.....	18
3.3.4	Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR):.....	19
3.4	DIGESTIÓN Y LIGACIÓN DE PLÁSMIDOS	19
3.4.1	Vector de expresión en bacteria	19
3.4.2	Ligación en el vector pGEM-T Easy.....	19
3.4.3	Vectores de expresión en levadura	20
3.4.4	Digestión y ligación en el vector pACTII y YEp366.....	20
3.5	ANÁLISIS FENOTÍPICO DE CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO POR GOTEO	21
3.6	ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOT”	22
3.6.1	Electroforesis de proteínas.....	22
3.6.2	Transferencia a membrana (Western Blot).....	22
3.6.3	Tinción de membrana con <i>Direct Blue</i>	22
3.6.4	Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	22
3.7	ENSAYOS ENZIMÁTICOS β -GALACTOSIDASA.....	23
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	ANÁLISIS DE LOS PROMOTORES DE <i>HXT6</i> , <i>ART4</i> y <i>ART7</i>	24
4.2	SELECCIÓN DEL PROMOTOR.....	24
4.3	CLONAJE DE LOS PROMOTORES DE <i>ART4</i> , <i>ART7</i> Y <i>HXT6</i> EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN YEp366	24
4.4	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR A TRAVES DE ENSAYOS BETA GALACTOSIDASA	27
4.4.1	Funcionalidad del promotor	27
4.4.2	Determinación de la regulación transcripcional.....	28
4.5	ANÁLISIS FENOTÍPICO DE CEPAS MUTANTES <i>ART4</i> Y <i>ART7</i>	30
4.6	CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE Art4 Y Art7	31
4.6.1	Regulación post-traducciona.....	31
4.6.2	Generación de herramientas para estudiar interacciones proteína-proteína de Art7 con la proteína kinasa Snf1	34
5	CONCLUSIONES	36
5.1	ESTUDIO DEL PROMOTOR <i>HXT6</i>	36
5.2	ESTUDIO FENOTÍPICO	36
5.3	REGULACIÓN POST TRADUCCIONAL	36
6	BIBLIOGRAFÍA	37
7	ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Micrografía de una célula de levadura dividiéndose. Figura adaptada de (Feldman, 2012).	1
Figura 2: Tres mecanismos de inducción diferentes de los genes <i>HXT</i> según el nivel de glucosa. A) Transportador de afinidad intermedia. B) Transportador de alta afinidad. C) Transportador de baja afinidad. Una flecha implica regulación positiva y una línea con una barra regulación negativa. Figura adaptada de (Özcan and Johnston, 1999).	4
Figura 3: Representación esquemática del polipeptidoubiquitina. La imagen fue creada usando PyMOL de PDB id 1ubi.	5
Figura 4: Funciones de la ubiquitinación en función de la cadena de ubiquitina formada. Los colores de los cuadros indican la unión de las correspondientes cadenas de poli-ubiquitina a través de los residuos de lisina, como se define en las flechas de la izquierda. Figura adaptada de Pickart and Fushman, 2004.	6
Figura 5: Modelo que muestra los factores de unión a ubiquitina que están involucrados en el marcaje vacuolar de permeasas de nutrientes. Figura adaptada de (Lawers et al., 2010).	7
Figura 6: Sistema de ubiquitinación: El enzima activador de ubiquitina (E1) inicia la activación de ubiquitina al unir la a su extremo C-terminal con consumo de ATP. Después es transferida a los residuos de cisteína del enzima conjugador de ubiquitina (E2). Esta proteína se conjuga con la ubiquitina ligasa (E3). Este complejo une a proteínas sustrato y catalizan la transferencia de ubiquitina a grupos lisina de la proteína sustrato. Figura adaptada de (Di Fiore et al., 2003).	8
Figura 7: Estructura de la familia Nedd4 E3 ligasa, A) Dominios conservados de la familia Nedd4 E3 ligasa. B) Comparación entre Rsp5 y sus homólogos humanos. Figura adaptada de (Harvey and Kumar, 1999).	9
Figura 8: Homología entre las arrestinas de mamíferos y Art1. A) Estructura de la proteína bovina β arrestina (izquierda) y Art1 (derecha). B) Motivos conservados entre las arrestinas de mamíferos y Art1. Figura adaptada de (Lin et al., 2008).	10
Figura 9: Los miembros de la familia de proteínas ART en levadura son adaptadores de Rsp5. Figura adaptada de (Lin et al., 2008).	11
Figura 10: Los miembros de la familia de proteínas ART en levadura son adaptadores de Rsp5 y actúan en función del estímulo. (M.C. Marqués).....	11
Figura 11: Modelo de regulación de transportador por endocitosis mediante señalización intracelular y activación por arrestina. Figura adaptada de (Becuweet al., 2013).....	12
Figura 12: Western blot de la expresión de proteína Hxt6-GFP bajo diferentes fuentes de carbono. Las células fueron crecidas en glucosa y recogidas a OD _{660nm} 0.5, 1.0 y 3.0 (izquierda). Las células fueron crecidas en rafinosa y recogidas a OD _{660nm} 0.5, 1.0 y 2.5 (derecha). (V. Llopis y L. Yenush, datos no publicados).....	12

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 13: Electroforesis en gel de los productos de PCR que contiene las secuencias promotoras de los genes indicados.....	24
Figura 14: Promotor <i>HXT6</i> (Gris) clonado en el vector de expresión YEp366.....	25
Figura 15: Promotor <i>ART4</i> (Gris) clonado en el vector de expresión YEp366.....	25
Figura 16: Promotor <i>ART7</i> (Gris) clonado en el vector de expresión YEp366.....	26
Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa resultado de la digestión con <i>SacI</i> . La figura muestra dos clones positivos de cada promotor insertado y un control negativo con el plásmido vacío YEp366 Φ	27
Figura 18: Ensayo β -galactosidasa realizado con glucosa como fuente de carbono. Las células fueron recogidas a diferentes tiempos a partir de una inoculación inicial de células en fase exponencial. Ensayo realizado con la cepa BY4741 [YEp366- <i>HXT6</i>].....	28

Figura 19: Ensayo β -galactosidasa realizado con glucosa como fuente de carbono. Las células fueron recogidas a diferentes OD _{660nm} (0.5, 1.0, 3.0) a partir de una inoculación inicial de células en fase exponencial. Ensayo realizado con la cepa silvestre (fondo BY4741) transformado con YEp366- <i>HXT6</i> (Azul), <i>art4</i> [YEp366- <i>HXT6</i>](Rojo) y <i>art7</i> [YEp366- <i>HXT6</i>](Verde).....	29
Figura 20: Ensayo β -galactosidasa realizado con rafinosa como fuente de carbono. Las células fueron recogidas a diferentes OD _{660nm} (0.5, 1.0, 2.5) a partir de una inoculación inicial de células en fase exponencial. Ensayo realizado con la cepa silvestre (fondo BY4741) transformado con YEp366- <i>HXT6</i> (Azul), <i>art4</i> [YEp366- <i>HXT6</i>] (Rojo) y <i>art7</i> [YEp366- <i>HXT6</i>](Verde).....	29
Figura 21: Análisis fenotípico de las cepas mutantes para <i>art4</i> , <i>art7</i> y cepas a las que se les introdujo la proteína de fusión GFP. Se muestran los goteos en tres medios de cultivo diferente SD (SyntheticDropout), HG (High Glucose, 4% Glucosa) y LG (LowGlucose, 1% Glucosa). Están representadas tres diluciones diferentes.	30
Figura 22: Análisis fenotípico de las cepas mutantes para <i>art4</i> , <i>art7</i> y cepas a las que se les introdujo la proteína de fusión GFP. Se muestran los goteos en tres medios de cultivo diferente S Raf (SyntheticDropout raffinose), SGal (SyntheticDropout galactose) y SMal (Synthetic Dropout maltose). Están representadas tres diluciones diferentes.	31
Figura 23: Amplificación por PCR del fragmento final de <i>ART7</i> que incorpora GFP en su parte terminal sin codón de <i>stop</i> . Se analizaron 5 clones y en todos se obtuvo amplificación.	32
Figura 24: Análisis cualitativo de proteínas mediante western blot. En la figura se muestra la cepa salvaje y dos clones de Art4-GFP y Art7-GFP. Las células se cultivaron en glucosa hasta fase exponencial y se realizó el experimento.	33
Figura 25: Análisis cualitativo de proteínas mediante western blot. En la figura se muestra la cepa salvaje, la cepa Art4-GFP y Art7-GFP. Las células se cultivaron en rafinosa hasta fase exponencial y añadió un 2% de glucosa.....	33
Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa resultado de la digestión con <i>HindIII</i> . La figura muestra un clon positivo de cada fragmento insertado y un control negativo con el plásmido vacío pACTII Φ . Notar que la banda pequeña del vector vacío no se aprecia muy bien pero está presente en las 700 pb.	35

ANEXOS

Figura 27: Vector pGEM-T Easy.	41
Figura 28: Vector YEp 366.	41
Figura 29: Vector pACT II.	42
Figura 30: Vector pBTM 116.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1: Cepas de <i>S.cerevisiae</i> derivadas del fondo genético BY4741 (Mat a <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>) y THY.AP4 de la colección de mutantes EUROFAN.	15
Tabla 2: Descripción de los cebadores usados. Notar que el sitio de restricción esta subrayado.....	17
Tabla 3: Descripción de los cebadores usados. Notar que la secuencia de hibridación con GFP esta subrayada.	18
Tabla 4: Descripción de los cebadores usados. Notar que el sitio de restricción esta subrayado.....	18

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 5: Tamaño esperado después de la digestión con <i>SacI</i>	26
Tabla 6: Tamaño esperado después de la digestión con <i>HindIII</i>	34

ABREVIATURAS

ARTs	<i>Arrestin-Related Trafficking Adaptors</i> , Adaptadores de tráfico relacionados con arrestina
ATP	Adenosin Trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Basica
dNTPs	DesoxirribonucleótidosTrifosfato
DTE	1,4-DiThioErithrol
EDTA	<i>Ethilen Diamine Tetra Acetic acid</i> , ácido etilen-di-amino-tetra-acético
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i> , Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte
HA	Hemaglutinina
IPTG	IsoPropil- β -D-1-TioGalactopiranidoso
Kac	<i>Potassium Acetate</i> , Acetato de Potasio
LB	Medio Luria-Bertani
MVB	<i>Multi-Vesicular Bodies</i> , Cuerpos Multivesiculares
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Poli Etilen Glicol
PY domain	Dominio Prolina Tirosina
SCD	<i>Synthetic Complete Drop-out</i> , Medio mínimo complete
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Dodecil Sulfato Sódico
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i> , Electroforesis en Gel de PoliAcrilamida-Dodecil Sulfato Sódico
TBS	<i>Tris-Buffered-Saline</i>
TEMED	<i>N,N,N,N'-tetrametiletildiamina</i>
Ub	<i>Ubiquitina</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract.Peptone-Dextrose</i> , Medio rico
WT	<i>Wild Type</i> , <i>Cepa Silvestre</i>

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA CÉLULA DE LEVADURA

El microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* es actualmente uno de los organismos biotecnológicos más usados para producir compuestos con un beneficio comercial. En un contexto científico de investigación, es un organismo apto para usarse como modelo de los mecanismos moleculares que ocurren en las células eucariotas. Además, es relativamente fácil de cultivar, manipular y presenta una genética accesible comparada con otros eucariotas.

En el año 1996 hubo un gran avance con la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), lo que permitió la identificación de todos los genes que codifican para diferentes proteínas de este microorganismo. Además, a pesar de su simplicidad, tiene procesos celulares básicos de organismos más complejos (por ejemplo: El proceso biosintético y regulación, transcripción, regulación del ciclo celular, etc.), lo cual permite la transferencia de información obtenida en levadura a organismos más complejos, incluyendo los humanos. Por tanto, este organismo es un excelente sistema de modelo.

Para una mejor comprensión de lo que se va a discutir en este trabajo, en primer lugar se describirá la estructura celular de una levadura y los elementos más importantes para la comprensión del trabajo. En la figura 1 se presenta una micrografía de una célula en división en la que se apuntan algunos de los orgánulos más importantes. En esta primera sección se explicará detalladamente la función de la envoltura celular. En secciones posteriores se abordaran más específicamente temas de regulación de transportadores de membrana y el sistema que lo lleva a cabo.

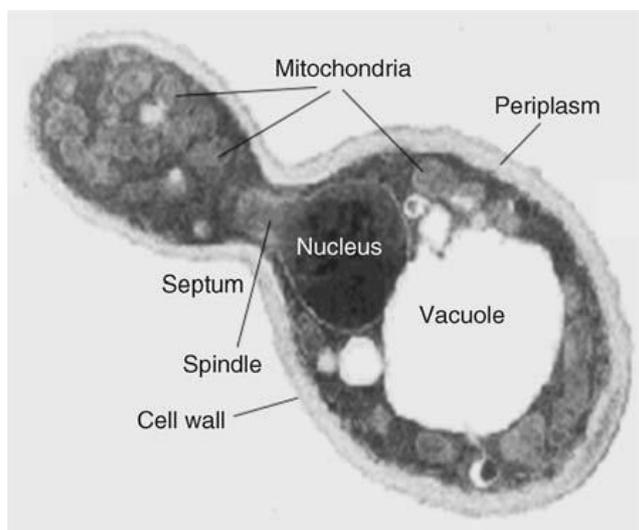


Figura 1: Micrografía de una célula de levadura dividiéndose. Figura adaptada de (Feldman, 2012).

1.2 LA ENVOLTURA CELULAR

En *Sachharomyces cerevisiae*, la envoltura celular ocupa aproximadamente el 15% del volumen celular total y su principal función es controlar las propiedades osmóticas y de permeabilidad de la célula (Feldman, 2012). Mirando desde el interior de la célula hacia el exterior, el citosol de la levadura está rodeado por la membrana plasmática, el espacio periplásmico y la pared celular. La pared celular de las levaduras está compuesta de cuatro clases de macromoléculas: glicoproteínas altamente glicosiladas (“mannoproteins”),

dos tipos de β -glucanos y quitina. La composición de la pared celular está sujeta a una considerable variación de acuerdo a las condiciones de crecimiento (Feldman, 2012).

La membrana plasmática, como otras membranas biológicas, pueden ser descritas como una bicapa lipídica que contiene proteínas que sirven de anclaje para el citoesqueleto, enzimas para la síntesis de la pared celular, transducción de señales y proteínas de transporte. Al igual que la pared celular, la membrana plasmática cambia tanto estructuralmente como funcionalmente dependiendo de las condiciones de crecimiento (Klis, 1994).

1.3 EL SISTEMA DE SECRECIÓN Y LAS VACUOLAS

Muchos compartimentos que están delimitados por membrana, presentes en el citoplasma de la levadura, juegan papeles importantes en el tráfico de proteínas tanto hacia el exterior como al interior de la célula. La exportación de proteínas por secreción, involucra un tráfico tanto intra como inter-membranoso en el cual participan el retículo endoplasmático (ER), el aparato de Golgi y la membrana plasmática. La importación de proteínas por endocitosis esta mediada de manera similar por vesículas membranosas que liberan su carga en la vacuola para su procesamiento proteolítico (Feldman, 2012). Como se ha visto tanto la pared como la membrana responden a cambios en las condiciones de crecimiento (condiciones de estrés) y varían tanto funcional como estructuralmente. Estos sistemas de regulación funcional y estructural, están mediados por endocitosis y secreción mediante vesículas membranosas. En la siguiente sección del trabajo se estudiarán con más detalle, como se regulan estas membranas ante cambios en el entorno celular y que mecanismos activa la célula para responder a estos cambios.

1.4 VARIEDAD DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN *S. CEREVISIAE*.

Las superficies celulares membranosas, contienen una gran variedad de proteínas integrales que aseguran un transporte de solutos del exterior al interior celular y viceversa (Singer and Nicolson, 1972). La entrada y salida de solutos a través de las membranas se realiza con la ayuda de los transportadores. Esto asegura un flujo de solutos en orgánulos como mitocondria, vacuola, peroxisomas u orgánulos de secreción. Estas proteínas transportadoras suelen estar conservadas en todas las especies, desde bacterias hasta humanos y sus proteínas homologas suelen tener un alto grado de similitud (Higgins, 1992; Martin et al., 1987).

Actualmente, la Yeast Transport Protein database (YTPdb) proporciona información anotada manualmente de 299 transportadores de membrana en levadura, clasificadas como establecidos (199) o predichos (100) (Brohée et al., 2010). Algunos de estos transportadores como la ATPasa de protones Pma1, son esenciales en todas las condiciones de crecimiento, y por tanto, están continuamente sintetizándose y presentes en una forma activa en la superficie celular (Tsapis and André, 2004). Sin embargo, la mayor parte de los transportadores, están estrechamente regulados por las condiciones ambientales. Los mecanismos de esta regulación actúan a tres niveles: transcripción génica, tráfico intracelular y modulación de la actividad.

Las proteínas de transporte pueden ser clasificadas en tres categorías principales: canales, transportadores (permeasas) y bombas (ATPasas) (André, 1995). En este trabajo se estudiarán principalmente los transportadores de membrana cuya función es transportar nutrientes, y que son regulados por endocitosis.

1.5 TRANSPORTE DE NUTRIENTES Y AMONIO

La membrana plasmática de levadura dispone de una gran variedad de transportadores para nutrientes, como carbohidratos, aminoácidos y amonio, entre otros (André, 1995).

Los transportadores de amonio merecen una atención especial ya que dieron pistas para determinar la función del factor Rhesus humano (RhAG y RhGK) (Marini et al., 2000). Sin embargo, el estudio de otros transportadores como los transportadores de hexosas es también de gran importancia. La glucosa se comporta como un sustrato metabólico, pero al mismo tiempo, se comporta como molécula de señalización que regula procesos fisiológicos y patológicos (André, 1995). Los mamíferos mantienen un nivel de glucosa en la sangre estrechamente regulado, dentro de unos niveles homeostáticos debido a una dosificación intermitente. Una regulación inadecuada de los niveles de glucosa en sangre puede llevar a desordenes como la diabetes.

Además, las células cancerígenas pueden metabolizar grandes cantidades de glucosa a través de la glicólisis y producir abundante ácido láctico incluso en presencia de oxígeno (Warbureffect) (Cori and Cori, 1925a), (Cori and Cori, 1925b). Es por eso, que el estudio de esta regulación despierta una gran atención y sus posibles aplicaciones, abren un campo de trabajo muy amplio. En este trabajo se estudiara la regulación por endocitosis de los transportadores de glucosa mediada por la familia de proteínas ART (Arrestin Related Trafficking Adaptors).

1.6 TRANSPORTE DE GLUCOSA

Saccharomyces cerevisiae tiene el mayor número de transportadores de hexosas de todos los organismos cuyo genoma ha sido secuenciado hasta la fecha (Kim et al., 2013). Se conoce del proyecto genoma de levadura que existen 18 genes putativos de transportadores de hexosa *HXT1-17* y *GAL2*, y dos genes sensores de hexosas *SNF3* y *RGT2* (Boles and Hollenmberg, 1997). En efecto, todos los transportadores de hexosas, excepto Hxt12 (que viene de un pseudogen), han demostrado ser capaces de transportar hexosas. No obstante, los transportadores de hexosas más importantes, se ha visto que son Hxt1-4 y Hxt6-7 (Towle, 2005). Las levaduras solo expresan los transportadores que mejor se adaptan a la cantidad de glucosa disponible en el medio: El transportador de baja afinidad Hxt1 solo se expresa cuando los niveles de glucosa son altos ($\geq 1\%$); por el contrario, los transportadores de alta afinidad Hxt2, Hxt4 y Hxt6 se expresan cuando los niveles de glucosa son bajos ($\sim 0.2\%$); el transportador de afinidad intermedia Hxt3 se expresa en ambas concentraciones (Özcan and Johnston, 1995). La expresión de los transportadores de alta afinidad Hxt6-7, es altamente inducible bajo condiciones de baja glucosa o por la presencia de fuentes de carbono no fermentables como glicerol o etanol, pero es altamente reprimido por altas concentraciones de glucosa (Reifenberger et al., 1995; Gibson et al., 2008).

1.7 REGULACIÓN DE TRANSPORTADORES

La composición proteica de la membrana plasmática está altamente regulada. Los mecanismos por los cuales las células controlan los transportadores actúan principalmente en tres niveles: i) transcripción génica, ii) tráfico intracelular de las proteínas sintetizadas y iii) modulación de la actividad intrínseca (Tsapis and André, 2004). Este mismo principio, parece ser que gobierna la regulación de los transportadores en células de plantas y animales, por tanto la levadura es una herramienta poderosa para diseccionar y comprender estos mecanismos en mayor detalle (Maier et al., 2002).

1.7.1 Regulación de transportadores a nivel transcripcional

Las células deben coordinar los ajustes en la expresión génica para acomodarse a cambios en el entorno. Aunque no se comprende el mecanismo completo y el conjunto entero de genes que están involucrados en estos cambios, investigadores han identificado activadores y represores transcripcionales que contribuyen a remodelar la expresión génica. Por ejemplo, se ha identificado el represor Rgt1 que inhibe la expresión de

cuatro genes *Hxt* en ausencia de glucosa (Özcan and Johnston, 1995). Tanto altas como bajas concentraciones de glucosa inducen la transcripción de *Hxt* inhibiendo la función de *Rgt1* (Figura 2) (Özcan and Johnston, 1999). La proteína *Grr1* es necesaria para la inhibición mediada por glucosa de *Rgt1* (Flick et al., 2003). La señal de glucosa intracelular para la inhibición de *Rgt1* mediada por *Grr1* parece ser generada por *Snf3* y *Rgt2*, dos proteínas similares a los transportadores de glucosa que actúan como sensores de glucosa para bajas y altas concentraciones de glucosa respectivamente (Özcan et al., 1998). En el caso de *Hxt2* y *Hxt4*, la represión por glucosa es mediada por el represor *Mig1* (Özcan and Johnston, 1996). La imposición de esta ruta reguladora sobre la ruta mediada por *Rgt1* en los promotores de *Hxt2* y *Hxt4* tiene como consecuencia que estos genes solo son inducidos por bajas concentraciones de glucosa (Özcan and Johnston, 1996). En el caso de *Hxt1*, se requiere altas concentraciones de glucosa para inducir la expresión. *Rgt2* y *Snf3* son activados por diferentes niveles de la glucosa, probablemente debido a sus diferentes afinidades por la glucosa. *Rgt2* se activa por altos niveles de glucosa y genera una señal que estimula la expresión transportadores de glucosa baja afinidad como *Hxt1* (Kim et al., 2013).

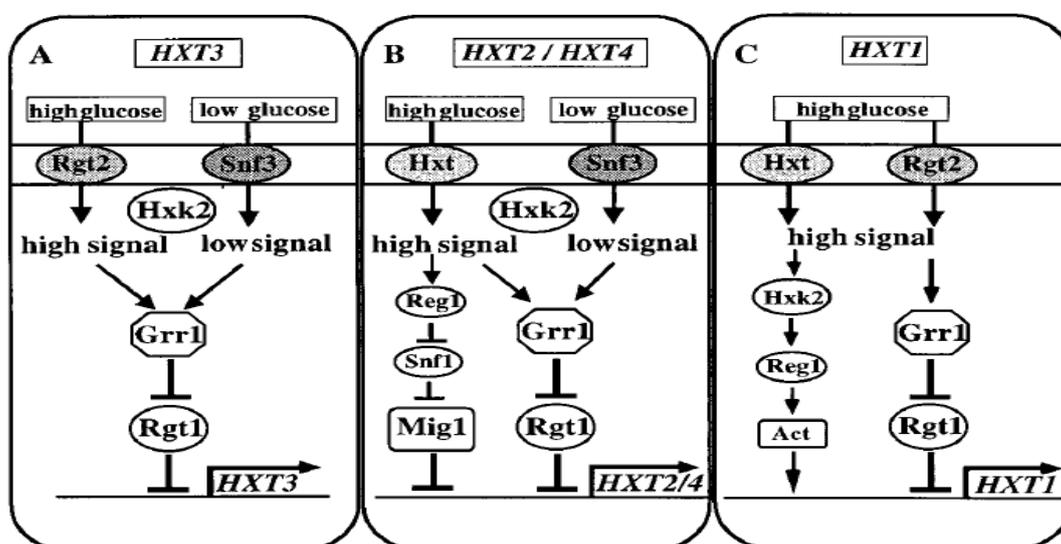


Figura 2: Tres mecanismos de inducción diferentes de los genes *HXT* según el nivel de glucosa. A) Transportador de afinidad intermedia. B) Transportador de alta afinidad. C) Transportador de baja afinidad. Una flecha implica regulación positiva y una línea con una barra regulación negativa. Figura adaptada de (Özcan and Johnston, 1999).

1.7.2 Regulación de transportadores a nivel post-traducciona

La correcta organización intracelular de las proteínas de membrana es indispensable para que la célula pueda responder a señales y cambios extracelulares, de forma que pueda adaptarse al entorno manteniendo la viabilidad. Así, los mecanismos responsables de la composición proteica de la membrana plasmática deben integrar las cadenas de señalización y responder rápidamente a cualquier cambio dado en el ambiente (Reifenberger et al, 1995). En este apartado se explicaran con más detalle los mecanismos por los cuales las células responden a estos cambios.

Aunque como se ha explicado, existen diferentes mecanismos de regulación, uno de los mecanismos por el cual la célula es capaz de regular que proteínas deben estar presentes en cada momento, es la endocitosis. De forma general, la endocitosis comienza con el marcaje de la proteína objetivo mediante el polipéptido de marcaje ubiquitina; en segundo lugar se produce la invaginación de la membrana de forma que la proteína objetivo queda internalizada formando una vesícula. Por último, para ser degradadas, estas vesículas se

fusionan con los lisosomas en el caso de mamíferos, o con la vacuola en el caso de hongos y plantas (Raiborg et al., 2003).

La endocitosis puede ser dividida en eventos tempranos (marcaje e internalización del *cargo* desde la membrana plasmática) y eventos tardíos (trafico endosomal y la liberación del *cargo* en la vacuola/lisosoma). La señal o marcaje de internalización de las proteínas de membrana eucariotas es la ubiquitinación (Tsapis and André, 2004).

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona reversible en la que un polipéptido de 76 amino ácidos conocido como ubiquitina (Ub), que se une covalentemente al grupo ϵ -amino del residuo lisina de la proteína diana mediante el residuo glicina (G76) de su extremo C-terminal (Figura 3). Existen diversas formas de ubiquitinación: i) la monoubiquitinación es la unión de una única ubiquitina a una lisina de una proteína diana, ii) la multi-ubiquitinación es la unión de una molécula de ubiquitina a varias lisinas de una misma proteína y iii) la poli-ubiquitinación que involucra la adición de una cadena de ubiquitinas unidas por residuos de lisina internos de la anterior ubiquitina. Tanto mono como multi-ubiquitinación son señales necesarias para la internalización de *cargos* a las vesículas en distintos estados de la vía secretora/endocítica (Hike, 2001), en cambio, la poli-ubiquitinación se asocia principalmente con la degradación proteosoma aunque tiene una función más amplia dependiendo de la cadena de ubiquitina formada (Pickart and Fushman, 2004) (Figura 4).

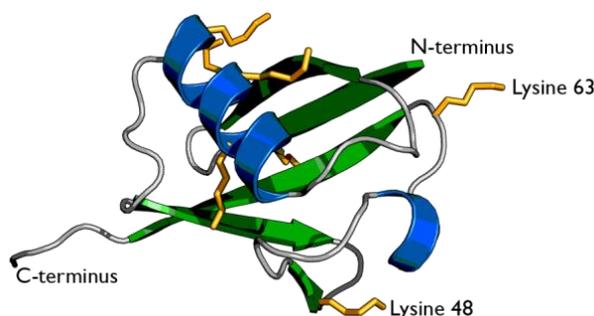


Figura 3: Representación esquemática del polipeptido ubiquitina. La imagen fue creada usando PyMOL de PDB id 1ubi.

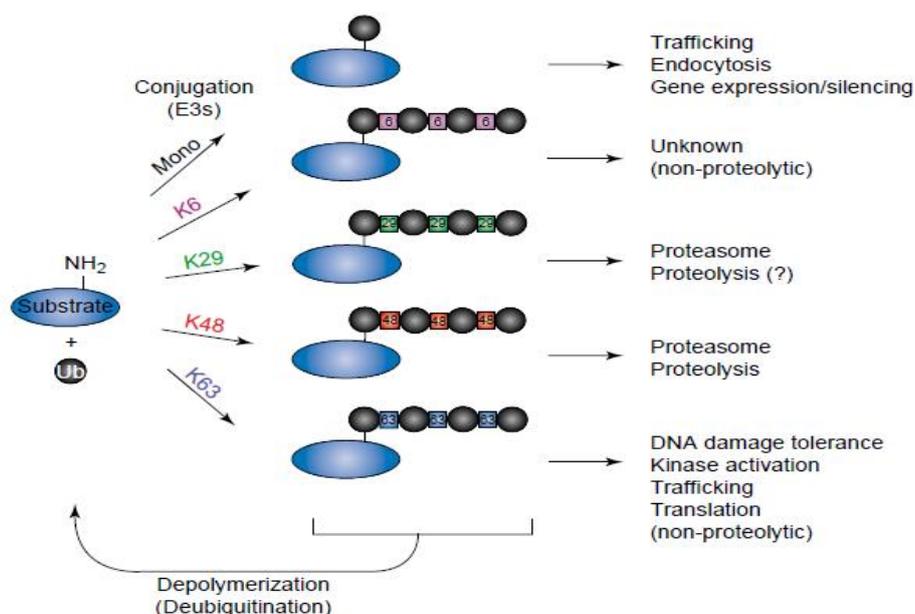


Figura 4: Funciones de la ubiquitinación en función de la cadena de ubiquitina formada. Los colores de los cuadros indican la unión de las correspondientes cadenas de poli-ubiquitina a través de los residuos de lisina, como se define en las flechas de la izquierda. Figura adaptada de Pickart and Fushman, 2004.

En levaduras, para la mayoría de proteínas estudiadas, se ha visto que una vez se ha unido la ubiquitina covalentemente al transportador de membrana, comienza la endocitosis (Figura 5). No obstante, en algunos casos se ha descrito internalización sin ubiquitinación (Clague et al. 2012 and MacGurn et al. 2012). En primer lugar la proteína es ubiquitinada en internalizada en vesículas endocíticas mediante invaginaciones de la membrana plasmática. Estos *cargos* pasan por endosomas tempranos antes de alcanzar endosomas tardíos. Los transportadores también pueden ser ubiquitinados en el trans-Golgi network (TGN) y ser directamente transportados a los endosomas tardíos. Finalmente, los transportadores ubiquitinados que están en endosomas tardíos se internalizan en el lumen mediante el Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte (ESCRT) y son madurados a cuerpos multivesiculares (MVB) (Hurley et al., 2006).

Durante la maduración de los cuerpos MVB los *cargos* son acumulados selectivamente en vesículas donde las proteínas permanecen en la membrana de la vesícula (Woodman and Futter, 2008). Cuando los MVB se funden con la vacuola su contenido se libera al lumen vacuolar donde lipasas y proteasas ejercen la degradación de los *cargos* endocitados y la activación proteolítica de algunas proteínas vacuolares (Lawers et al., 2010). Las proteínas de membrana que han sido excluidas de los MVB pueden ser, o bien reciclados a través de TGN, o transferidos a la membrana de la vacuola. Por tanto, la ruta de MVB juega un papel importante en la regulación de la composición lipídica y proteica de la vacuola.

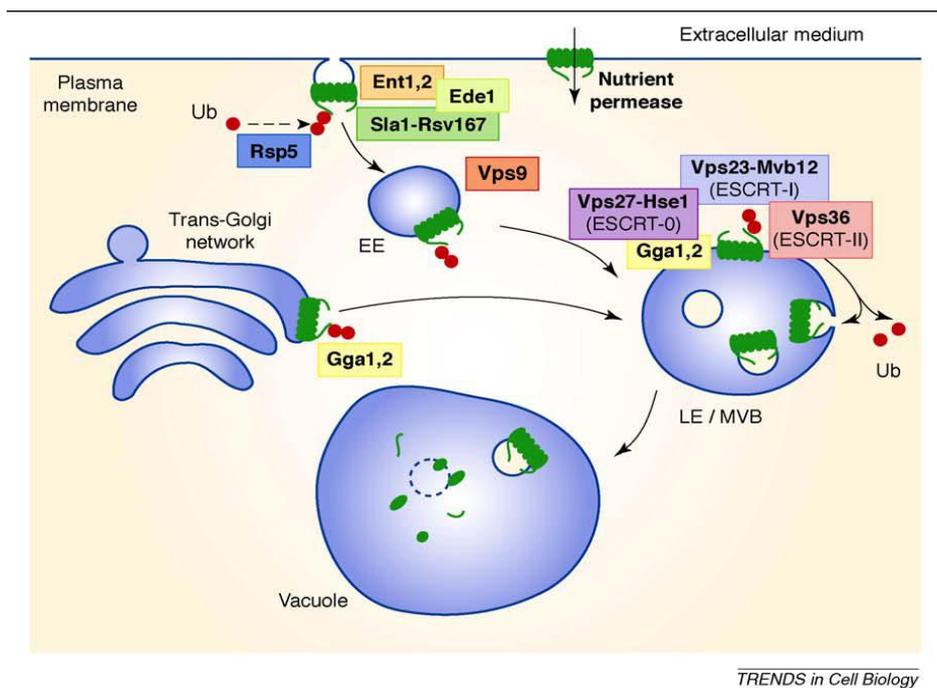


Figura 5: Modelo que muestra los factores de unión a ubiquitina que están involucrados en el marcaje vacuolar de permeasas de nutrientes. Figura adaptada de (Lawers et al., 2010).

1.8 Rsp5 Y LA UBIQUITINACIÓN

1.8.1 La maquinaria de ubiquitinación

La ubiquitinación ocurre por la acción de tres enzimas que actúan de forma secuencial: Un enzima activador de ubiquitina (E1), un enzima de unión a ubiquitina (E2) y el E3 ubiquitina ligasa. El proceso comienza con la formación de un enlace de alta energía tioéster entre la glicina (G76) del extremo carboxi-terminal de la ubiquitina y el enzima E1, con presencia de ATP. Posteriormente, la ubiquitina se transfiere al enzima E2. Por último, el E3 ubiquitina ligasa transfiere la ubiquitina activada mediante un enlace amida a un grupo ϵ -amino de una lisina de la proteína diana. Dependiendo de su mecanismo de acción y su estructura las E3 se clasifican en dos tipos: RING (Really Interesting New Gene) E3 ligasas y HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) E3 ligasas. (Hershko and Ciechanover, 1992)(Figura 6).

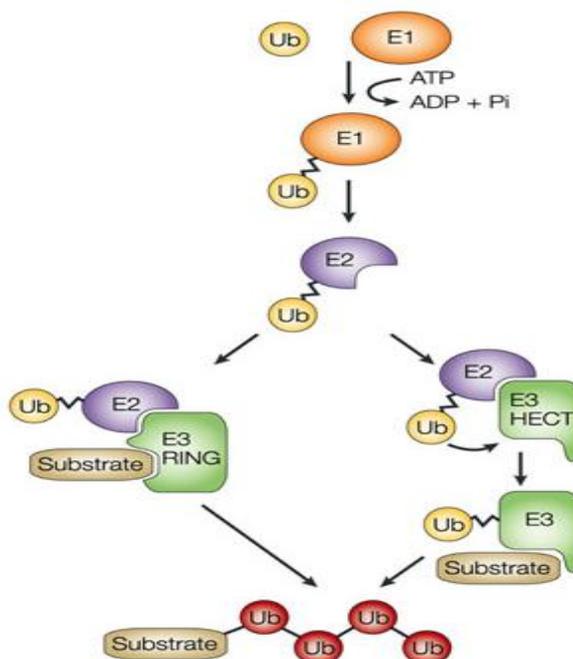


Figura 6: Sistema de ubiquitinación: El enzima activador de ubiquitina (E1) inicia la activación de ubiquitina al unirla a su extremo C-terminal con consumo de ATP. Después es transferida a los residuos de cisteína del enzima conjugador de ubiquitina (E2). Esta proteína se conjuga con la ubiquitina ligasa (E3). Este complejo une a proteínas sustrato y catalizan la transferencia de ubiquitina a grupos lisina de la proteína sustrato. Figura adaptada de (Di Fiore et al., 2003).

1.8.2 Rsp5

El microorganismo modelo *S. cerevisiae*, posee una única enzima E3 ubiquitina ligasa tipo HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) denominada Rsp5. Está implicada en funciones de regulación del tráfico de proteínas de membrana, que incluye, la ubiquitinación de la mayoría de las proteínas de membrana provocando su endocitosis y la ubiquitinación de proteínas endosomales provocando su clasificación en MVB. Esta proteína es ortóloga a la familia de E3 ubiquitina ligasa de tipo HECT humana denominada Nedd4. Esta familia está formada por nueve miembros: NEDD 4.1, NEDD 4.2, ITCH, SMURF1, SMURF2, WWP1, NEDL1 y NEDL2 (Figura 7). El gen que codifica para Rsp5 es esencial para la viabilidad de *S. cerevisiae* y dicha proteína es clave para el tráfico intracelular de proteínas, la respuesta al choque térmico, la transcripción, la endocitosis y la estabilidad ribosomal (Harvey and Kumar, 1999).

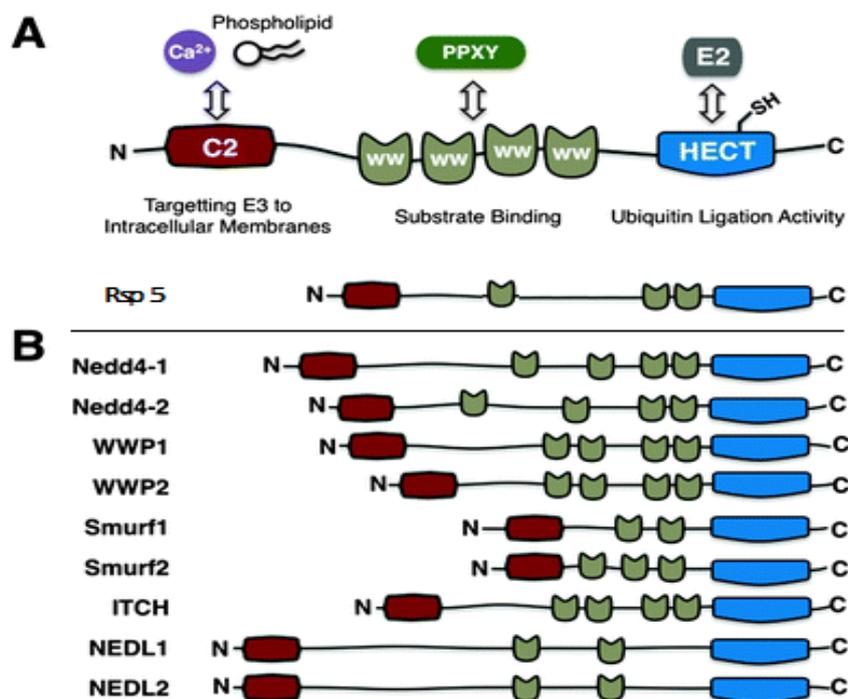


Figura 7: Estructura de la familia Nedd4 E3 ligasa, A) Dominios conservados de la familia Nedd4 E3 ligasa. B) Comparación entre Rsp5 y sus homólogos humanos. Figura adaptada de (Harvey and Kumar, 1999).

1.8.3 Función

Una de las funciones más estudiadas de Rsp5 es el papel que juega en el tráfico intracelular de proteínas, en concreto la internalización durante la endocitosis y la distribución de los *cargos* en los MVB. Participa en la ubiquitinación de las proteínas de membrana para promover su internalización y su posterior clasificación en los MVB; también está implicado en la ubiquitinación de las proteínas transmembrana procedentes de biosíntesis (TGN) y que tienen como destino celular biosintético la vacuola.

1.9 ADAPTADORES DEL TRÁFICO RELACIONADOS CON ARRESTINA: FAMILIA ART

1.9.1 Adaptadores de Rsp5

Rsp5 reconoce a las proteínas diana mediante la interacción de sus dominios WW con un motivo PY (PPXY) de las proteínas sustrato (Hofmann and Bucher, 1995); sin embargo gran parte de proteínas de membrana reguladas por Rsp5, no contienen el motivo PY necesario para que sean reconocidas y endocitadas, lo que sugiere la posibilidad de que Rsp5 requiera de adaptadores específicos que medien la interacción entre Rsp5 y las sustratos que no presenten el dominio PY (Beck and Hall, 1999) (Lin et al., 2008) (Nikko and Pelham, 2009) (León et al., 2008).

En mamíferos se sabe que las proteínas arrestina intervienen de manera general en la endocitosis y regulación negativa de diferentes familias de proteínas de membrana (Lefkowitz et al., 2006). El descubrimiento en levadura de una proteína (posteriormente denominada Art1), que contiene un motivo altamente conservado en los miembros de la familia arrestinas y que es capaz de unirse a Rsp5 actuando como regulador específico de endocitosis, condujo a buscar en el genoma de levadura otras proteínas que contuvieran dicho motivo. Se han identificado hasta la fecha 10 proteínas Art (Art1-Art10). Por su relación con las arrestinas de mamíferos, se denominaron Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina o

familia ART (Figura 8) (Lin et al., 2008). Además de la familia ART existen otros adaptadores de Rsp5, como Bul1 y Bul2 (León et al., 2008).

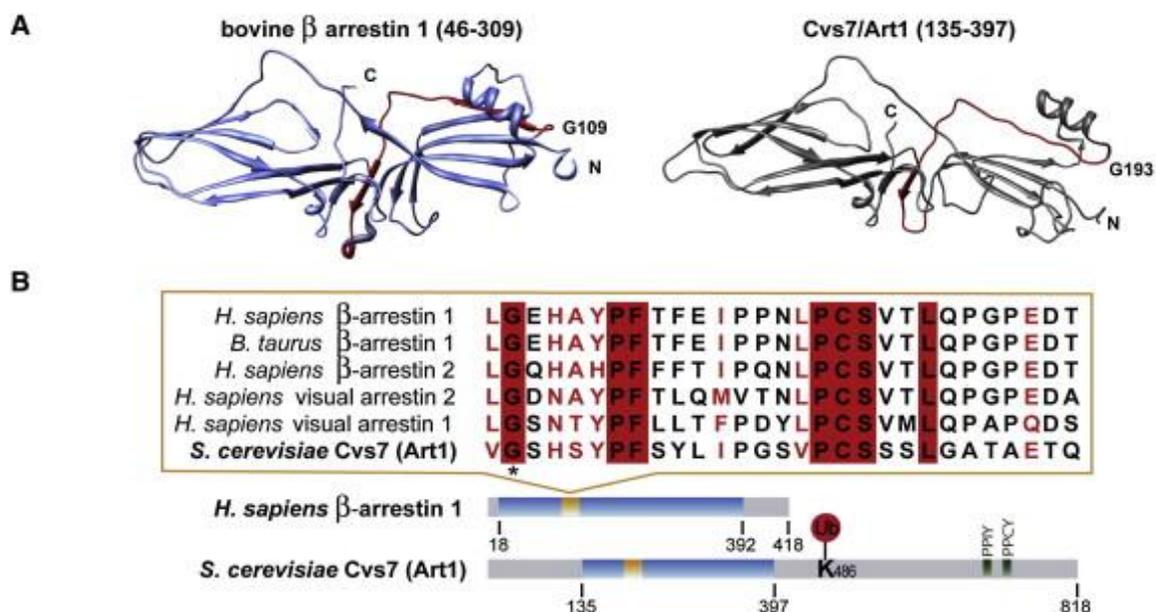


Figura 8: Homología entre las arrestinas de mamíferos y Art1. A) Estructura de la proteína bovina β arrestina (izquierda) y Art1 (derecha). B) Motivos conservados entre las arrestinas de mamíferos y Art1. Figura adaptada de (Lin et al., 2008).

1.9.2 Características de la familia ART

Las proteínas de la familia ART tienen una longitud comprendida entre los 500 y 1200 aminoácidos. Excepto Art2 y Art8, los miembros de la familia contienen un dominio de plegamiento tipo arrestina en la parte N-terminal (Figura 9) y todos ellos contienen diversos motivos PY en el extremo C-terminal, lo que sugiere su papel como adaptador de Rsp5 (Lin et al., 2008).

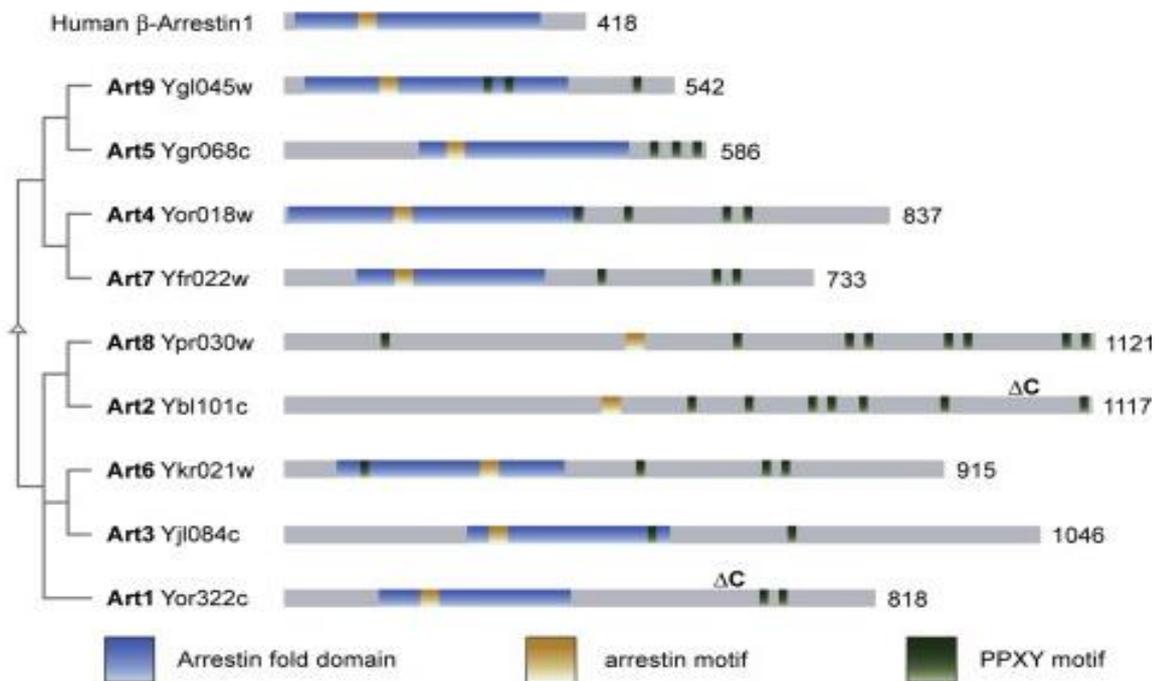


Figura 9: Los miembros de la familia de proteínas ART en levadura son adaptadores de Rsp5. Figura adaptada de (Lin et al., 2008).

Cada miembro de la familia ART tiene como blanco diversas proteínas de membrana, pero que en algunos casos son compartidos y en otros son específicos. Un mismo ART puede actuar sobre diferentes transportadores así como un mismo transportador puede encontrarse regulado por diferentes ARTs. Sin embargo, no se trata de redundancia completa ya que existen muchos casos en los que un determinado transportador requiere de un ART u otro dependiendo de la clase de estímulo (Figura 10), como el exceso de sustrato o un tipo de estrés.

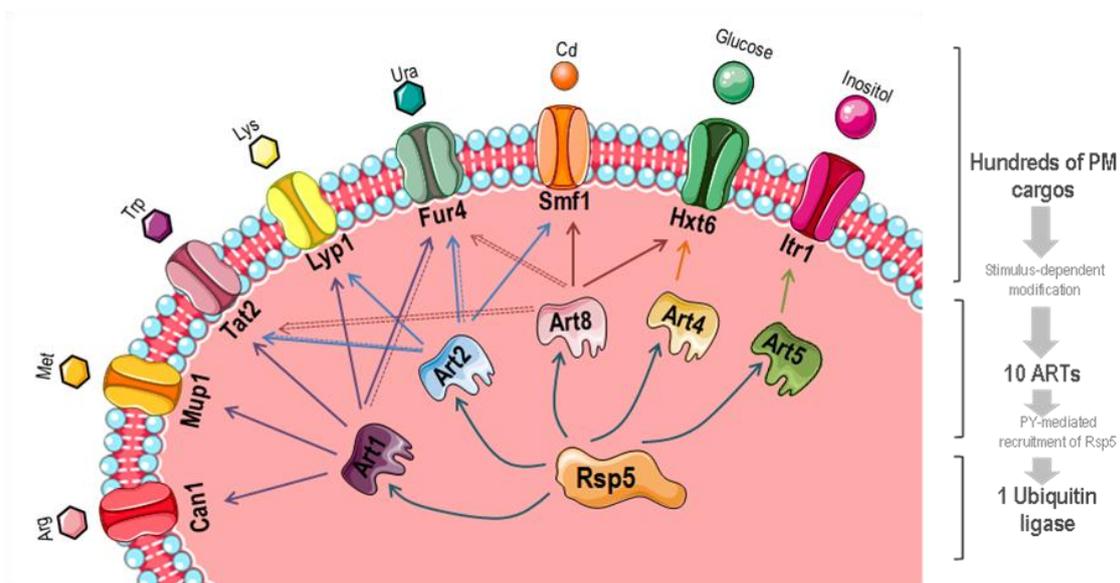


Figura 10: Los miembros de la familia de proteínas ART en levadura son adaptadores de Rsp5 y actúan en función del estímulo. (M.C. Marqués)

1.9.3 Funciones de la familia ART

Las proteínas adaptadoras y principalmente las proteínas ART, son las que confieren especificidad a la ubiquitinación de las proteínas de la membrana y contribuyen al mantenimiento de un correcto repertorio de proteínas en la superficie celular. La interacción de proteínas Art promueven la internalización específica de un *cargo* (Nikko and Pelham, 2009). En la figura abajo se muestra un modelo de endocitosis mediada por Art4 (Rod1) y ubiquitinación del transportador de lactato (Jen1).

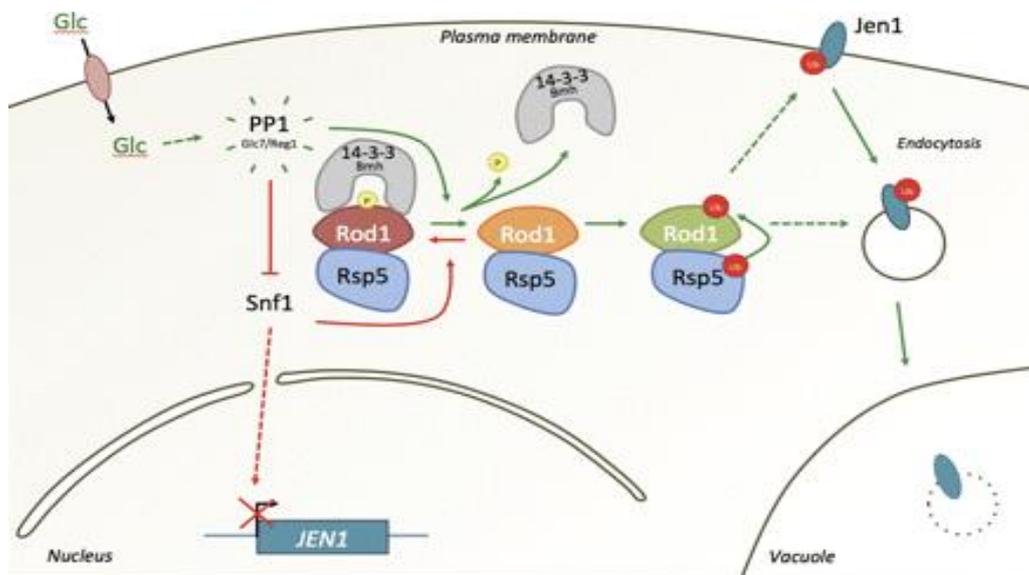


Figura 11: Modelo de regulación de transportador por endocitosis mediante señalización intracelular y activación por arrestina. Figura adaptada de (Becuweet et al., 2013).

La endocitosis del transportador de hexosas de alta afinidad Hxt6 en respuesta a alta concentración de glucosa es regulada por Art4 y Art8 (Nikko and Pelham, 2009). En situación normal, la endocitosis de Hxt6 inducido por glucosa es mediada por Art4, mientras que en situación de estrés en presencia de cicloheximida, la internalización de Hxt6 es mediada por Art8 (Nikko and Pelham, 2009).

Se sabe que la identidad que comparten Art4 y Art7 es del 43% y que son funcionalmente homólogos (Andoh et al., 2002). Debido a esta similitud y homología en su función, se estudió el comportamiento de mutantes para estas dos proteínas cuando crecen en diferentes fuentes de carbono. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, el nivel de proteína Hxt6 en mutantes *art4* y *art7* comparado con una cepa silvestre fue determinado bajo diferentes fuentes de carbono (Figura 12).

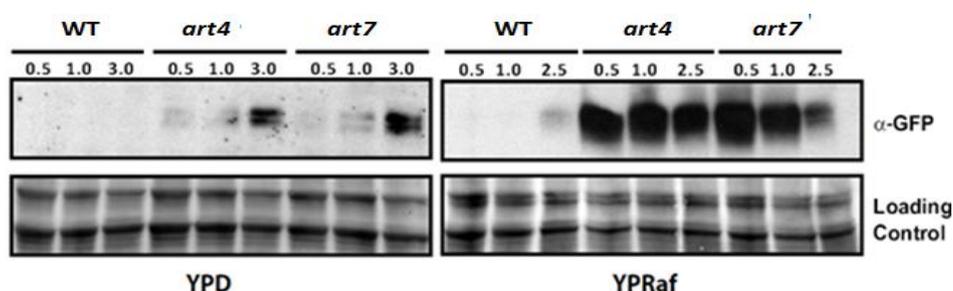


Figura 12: Western blot de la expresión de proteína Hxt6-GFP bajo diferentes fuentes de carbono. Las células fueron crecidas en glucosa y recogidas a OD_{660nm} 0.5, 1.0 y 3.0 (izquierda). Las células fueron crecidas en rafinosa y recogidas a OD_{660nm} 0.5, 1.0 y 2.5 (derecha). (V. Llopis y L. Yenush, datos no publicados)

El nivel de Hxt6 es mayor en las cepas mutantes que en la cepa silvestre. Debido a la falta de glucosa, a mayor densidad óptica y en medio con rafinosa, también se vio observado un incremento en la acumulación de la proteína. Como se ha explicado anteriormente la regulación del transportador puede llevarse a cabo al menos en dos niveles. El transportador puede ser regulado por endocitosis a través de la maquinaria de ubiquitinación o también puede ser regulado a nivel de transcripción génica.

En este estudio, se realizaron ensayos para medir la actividad del promotor de *HXT6* tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *art4* y *art7* bajo la presencia de diferentes fuentes de carbono, para determinar si los cambios observados en la expresión del transportador de alta afinidad Hxt6 (Figura 10) se deben a una regulación transcripcional.

Por otra parte, se pretendió observar diferencias en el fenotipo tanto de mutantes para *art4* y *art7* como en cepas que sobreexpresan los genes *ART4* y *ART7* cuando son cultivadas con diferentes fuentes de carbono. Además, se intentó determinar mediante western blot, diferencias en la expresión de estas cuando se cultivaban en medios con diferente fuente de carbono y siempre bajo el control de su propio promotor.

Se ha observado que el incremento en la expresión de Hxt6 a nivel de proteína, no se presenta en los ensayos enzimáticos a nivel de promotor, sugiriendo que no se trata de una regulación transcripcional. Se ha observado un cambio en la expresión de Art4 y Art7 al crecer en diferentes fuentes de carbono.

2 OBJETIVOS

2.1 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PROMOTORES DE *HXT6*, *ART4* Y *ART7*

- Clonar las regiones del promotor de forma que no se perturbe la pauta de lectura del gen *lacZ* dentro del vector de expresión YEp366.
 - Seleccionar la región del promotor.
 - Amplificar por PCR la región del promotor del gen *HXT6*, *ART4* y *ART7*.
 - Ligar la secuencia en el vector de destino YEp366.
- Transformar las cepas de *S.cerevisiae* (BY4741, BY4741 *art4::kanMX4* and BY4741 *art7::kanMX4*) con el plásmido YEp366-*HXT6*.
- Realizar ensayos enzimáticos β -galactosidasa bajo diferentes condiciones con el fin de comprobar una regulación transcripcional.

2.2 ESTUDIO FENÓTIPICO

- Transformar la cepa BY4741 con los plásmidos (pACTII-Art4, pACTII-Art7, pNTrp-Art4 y pNTrp-Art7).
- Realizar un perfil de crecimiento en diferentes fuentes de carbono con cepas mutantes para ambas proteínas y con cepas sobre expresando *ART4* y *ART7*.

2.3 PERFIL DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE *ART4* Y *ART7*

- Insertar la proteína de fusión GFP en pauta de lectura abierta con Art7 en el genoma de *S. cerevisiae*.
- Realizar un análisis de proteínas al cultivar las células con diferentes fuentes de carbono.
- Analizar la proteína de fusión por microscopia confocal.
 - Construcción de plásmidos para estudiar las interacciones proteína-proteína de Art7 Clonar los fragmentos N-terminal y C-terminal en el vector pACTII para realizar un ensayo de doble híbrido con las proteínas Art4, Art7, sus fragmentos y Snf1.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.1.1 Bacterias

Se empleó la cepa *Escherichia coli* DH5 α para la amplificación de plásmidos. El medio de cultivo empleado fue LB, con un contenido del 1% en triptona, 0.5% en extracto de levadura y 1% en cloruro sódico. Al medio de cultivo se añadió 0.01% de ampicilina.

Para la preparación de medio sólido, se añadió a todo lo anterior más un 2% de agar. Las células se cultivaron a una temperatura de 37 °C.

3.1.2 Levaduras

Se trabajó con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de fondo genético BY4741 y THY.AP4. Todas las cepas empleadas se muestran en la Tabla 1. El fondo genético BY4741 se utilizó para realizar la extracción de ADN genómico y por tanto, a partir del cual se realizó el clonaje de los genes de la familia ART; mientras que el fondo genético THY.AP4 fue empleado para realizar los ensayos de rastreo fenotípico y de interacción por doble híbrido.

Tabla 1: Cepas de *S.cerevisiae* derivadas del fondo genético BY4741 (Mat a *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) y THY.AP4 de la colección de mutantes EUROFAN.

Nombre	Genotipo	Origen/Referencia
BY4741	Mat a <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741art4	BY4741 <i>art4::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 art7	BY4741 <i>art7::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
THY.AP4	Mat a <i>ura3, leu2, lexA::lacZ:trp1, lexA::His3, lexA::ADE2</i>	(Paumi, 2007)

Los medios de cultivo empleados fueron medio rico o complejo YPD, medio mínimo SD (Synthetic Dropout), SRaf, SMal, Sgal, HG (high glucose), LG (low glucose) y medio definido SCD. El medio YPD está constituido por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa. El medio SD contiene 0.7% de *Yeast Nitrogen Base* (YNB), 2% de glucosa y 50mM de ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris. El medio SRaf contiene lo mismo que el SD pero la glucosa se sustituye por rafinosa. De igual manera, los medios SMal y SGal en los que la glucosa se sustituye por maltosa y galactosa respectivamente. Los medio HG y LG también se prepare de la misma forma pero la concentración de glucosa fue del 4% y 1% respectivamente. El medio SCD contiene lo descrito anteriormente pero además contiene 10 μ g/ml de adenina; 20 μ g/ml de arginina, lisina y metionina; 30 μ g/ml de isoleucina, serina, treonina, tirosina y valina; 50 μ g/ml de fenilalanina; 85 μ g/ml de inositol y 90 μ g/ml de ácido p-aminobenzoico. En el momento de cultivar las células a los dos medios anteriores se añadieron los aminoácidos (100 μ g/ml de histidina, 100 μ g/ml de leucina y 100 μ g/ml metionina) y bases nitrogenadas (20 μ g/ml de adenina y 30 μ g/ml de uracilo) adecuadas en función de las

necesidades de cada cepa y de la selección que se quiera llevar a cabo. En la preparación de medios sólidos, se añadió a estos un 2% de agar.

La temperatura empleada para el crecimiento fue de 28 °C.

3.2 TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA

3.2.1 Transformaciones en bacteria: transformación de *E. coli* por choque térmico

Para la transformación de *E. coli* se empleó un protocolo estándar de transformación por choque térmico (Hanahan, 1983). Se mezclaron 10 µl del mix de ligación con 50 µl de células competentes (DH5α). Se incubó la mezcla a 4 °C durante 30 minutos, se realizó el choque térmico calentando a 42 °C durante un minuto e incubando de nuevo a 4 °C. Seguidamente se añadieron 600 µl de medio LB y se incubó a 37 °C durante 45 minutos. Por último se realizó una extensión en placa con medio LB ampicilina con el objetivo de seleccionar las células transformadas.

Para la selección de los clones que contienen el vector recombinante (pACT II o YEp366) se asumió que todas las colonias con capacidad de crecer en el medio de selección eran recombinantes. Esta selección se pudo llevar a cabo debido a que los vectores recombinantes (pACT II o YEp366) contienen un gen de resistencia a ampicilina.

La selección de aquellos clones que contienen el vector recombinante (pGEM-T *Easy* gen ART) es mediante diferenciación de colonias blancas y azules; la inserción del gen ART en el pGEM-T *Easy* interrumpe la pauta de lectura del gen *LacZ* cuyo producto es el enzima β-galactosidasa. Este enzima tiene la capacidad de degradar el reactivo X-gal en un producto con una coloración azul, por ello las colonias recombinantes serán blancas. Para este tipo de selección se añadió IPTG y X-gal a las placas con LB ampicilina.

3.2.2 Transformación en levadura

Para la transformación de las células de levadura se utilizó un protocolo rápido de transformación (Ito et al., 1983). Se mezcló 5 µl de 1% ssDNA y 10 µl de la mezcla de plásmido. Esto se llevó con H₂O a un volumen de 50 µl. A esta mezcla se le añadió un asa de siembra llena de células de levadura que estuvieron cultivadas en medio YPD no más de 48 horas. Seguidamente se añadió 0.5 ml de solución de PLATE (240µl PEG 50%, 36µl LiAc [1M], 10µl ss-DNA [10mg/ml], 64µl H₂O) y se mezcló vigorosamente. Se incubó 6 horas a temperatura ambiente para incubar posteriormente 15 minutos a 42 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó, se desechó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 200 µl de agua estéril. Esta mezcla se vertió en placas con medio selectivo (Adams et al., 1997).

3.2.3 Inserción de GFP en el genoma

Para ver el comportamiento de la proteína Art7 dentro del espacio celular, es necesario que esta molécula sea visible. Uno de los métodos disponibles consiste en añadir *Green Fluorescent Protein* (GFP) en la parte terminal sin interrumpir la pauta de lectura, es decir, quitando el codón de stop de *ART7* y añadiendo la secuencia codificante para GFP sin que los tripletes de codones varíen, creando una proteína de fusión.

Para el marcaje de *ART7* con GFP en la parte COOH-terminal, se tuvieron que diseñar unos oligonucleótidos más largos de lo habitual. Estos oligonucleótidos poseen una secuencia de recombinación en el genoma de levadura y una secuencia que hibrida con GFP. La recombinación será más eficiente si existen unas 20 pb

entre las dos secuencias de recombinación (Esquema 1 resultados). El cebador directo se diseñó de forma que, la primera parte fuera complementaria a la parte final de *ART7*, sin el codón de *stop*. Y una segunda parte que era complementaria a la primera parte de GFP. Esta segunda parte, es necesaria si se quiere obtener el fragmento de oligonucleótido deseado para la recombinación cuando se produce la amplificación por PCR (Figura 19 resultados). El cebador reverso se diseñó de forma que la secuencia de recombinación en el genoma de levadura estuviera 20 pb aguas abajo del codón de *stop* y la otra parte del oligonucleótido hibridara con la parte final de *HIS3*.

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se realizó una PCR con un DNA plasmídico que ya contenía el *caset* GFP-*HIS3*. El producto obtenido, se clono en la cepa de levadura BY4741 como se ha explicado anteriormente. De esta forma los mecanismos celulares, gracias a las secuencias de recombinación introducen GFP en el genoma. Para su selección, se utiliza un medio selectivo ya que al producirse la recombinación, se ha insertado GFP más el gen de selección de *HIS3* que le da a la célula capacidad de sintetizar histidina. Para comprobar que la construcción estaba integrada en el genoma y que la pauta de lectura estaba correcta se secuenció la parte del genoma de las cepas candidatas en el servicio de secuenciación del IBMCP, utilizando un oligo que hibrida al menos 50 pb antes de la secuencia 5' de la recombinación con un primer reverso que hibrida con los primero nucleótidos del gen *HIS3*.

3.3 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA

3.3.1 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para amplificación de los promotores *HXT6*, *ART4* y *ART7*, se diseñaron a partir de la secuencia existente en la base de datos de levadura (*Saccharomyces Genome Database*). Para el diseño del oligonucleótido se tuvo en cuenta la T_m . Además, se introdujo una diana de restricción con el objetivo de fusionar el promotor con la pauta de lectura del gen *lacZ*. También se evitaron codones de *stop* entre el primer codón de metionina del gen de interés y la secuencia de *lacZ*. Para la correcta inserción, asegurando un clonaje direccional de los promotores en el vector de destino YEp366, una diana de restricción *Bam*HI fue introducida en el cebador directo, mientras que *Sall* fue introducida en el cebador reverso (Tabla 2).

Tabla 2: Descripción de los cebadores usados. Notar que el sitio de restricción esta subrayado.

Nombre	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
Art4p_5'_fw	CGGGATCCTAGAAGACAGTAGTCAGCGTTGG	57.31
Art4_3_Rv_2	CGCGTCGACATGGCTCTTTTGAAGGTCGAG	56.70
Art7p_5'_fw	CGGGATCCACGGAAGTGTCTCGCGC	59.41
Art7p_3'_rv	ACGCGTCGACGAGGCTTTTTCTTAGTTGATTACC	56.90
Hxt6p_5'_fw	CGGGATCCCGTGCTTTCAGAGGAACAAAG	58.42
Hxt6p_3'_rv	ACGCGTCGACGATGCTCCACAGGAGTTTGC	59.24

Para el marcaje de *ART7* con GFP en la parte terminal, se tuvieron que diseñar unos oligonucleótidos más largos de lo habitual (Tabla 3). Estos oligonucleótidos poseen una secuencia de recombinación en el genoma de levadura y una secuencia que hibrida con GFP.

Tabla 3: Descripción de los cebadores usados. Notar que la secuencia de hibridación con GFP esta subrayada.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
Art7_GFP_5'_fw	TAAGCTGGGTTTATGGGAGGTTTTCTATCAAAGGGTACCAAACGAG <u>GTCGACGGATCCCCGGGT</u>	48
Art7_GFP_3'_Rv	CTATATACATCACTTTCTATATGAAACTATACAAGCTTAATGCACTCG <u>ATGAATTCGAGCTCGT</u>	38

Los oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de los genes ART fueron diseñados a partir de la secuencia génica existente en la base de datos de levadura *Saccharomyces Genome Database*. Para el diseño se tuvo en cuenta la temperatura de hibridación del oligonucleótido y que el mismo presentara al menos una G/C al final para mejorar la hibridación. Por otra parte, se creó una diana de restricción para un enzima que no cortara en la parte génica pero que en cambio, esta diana estuviera presente en MCS (*Multi Cloning Site*) del vector destino (pACT II). Para asegurar el clonaje direccional del gen, se usaron dos enzimas de restricción distintas, *SfiI* en el cebador directo y *XhoI* en el reverso (Tabla4).

Tabla 4: Descripción de los cebadores usados. Notar que el sitio de restricción esta subrayado.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
Art7_NT_5'_fw	CTGGCCATGGAGGCCATGGGCTTCAGTAGCGGT	58
Art7_NT_3'_Rv	<u>CTCGAGAAATGGTGAATAAAAAGTTGAAT</u>	58
Art7_CT_5'_fw	CTGGCCATGGAGGCCGTCGCACTTTCAATAAAACCAT	60
Art7_CT_3'_rv	<u>CTCCAGCTATGAGCGATCCCGTTTTTCG</u>	60

3.3.2 Extracción de ADN genómico de levadura:

El ADN de levadura se extrajo siguiendo un protocolo de extracción estándar (Sambrook et al., 1989). Las células fueron crecidas con medio YPD hasta fase exponencial. Se recogieron las células de 1,5 ml y se lavaron con agua estéril. Las células se resuspendieron en 200 µl de buffer de protoplasto (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1000 unidades de Zymoliasa/ml, 10 µl de β-mercaptoetanol/ml) y se incubó a 37 °C durante 2 horas. A la mezcla se le añadieron 200 µl del buffer de lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se mezcló cuidadosamente. Se incubó a 65 °C durante 20 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Se añadieron 200 µl de 5M KAc, se mezcló cuidadosamente y se incubó 15 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf donde se añadieron 2 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Seguidamente se vertieron 600 µl de Isopropanol, se mezcló cuidadosamente, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó (13000 rpm, 30 segundos). En este paso se puede observar que el ADN ha precipitado y forma un pellet de color blanco. Finalmente se lavó el precipitado con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 50 µl de tampón TE (5ml Tris pH8 [1M], 1ml EDTA [0.5 M] pH8, 496ml H₂O).

La integridad del ADN genómico extraído se comprobó corriendo un gel de agarosa al 0.7%.

3.3.3 Extracción de ADN plasmídico

3.3.3.1 Kit de purificación de Roche

Para la extracción y purificación de plásmidos, se empleó el protocolo recomendado por Roche para el aislamiento de plásmidos de alta pureza (High Pure plasmid isolation kit Roche). En este protocolo, primero se produce una lisis alcalina para posteriormente purificar el ADN plasmídico mediante columna de alta afinidad.

En la purificación de ADN plasmídico de las colonias recombinantes con pGEM-T *Easy*-ART, la digestión se realizó con *Eco*RI cuyas enzimas se encuentran en el MCS del vector pGEM-T *Easy*.

Las colonias recombinantes con pACTII-ART, se digirieron secuencialmente con *Sfi*I y *Xho*I. El objetivo en ambos casos, fue resolver los fragmentos producto de la digestión con un gel de agarosa y comprobar que el tamaño de los fragmentos corresponde con el vector recombinante.

Por otra parte, las colonias recombinantes YEp366-ART4, YEp366-ART7 y YEp366-HXT6, se digirieron con *Sac*I para asegurar que el clonaje fue satisfactorio.

3.3.3.2 Purificación de ADN a partir de agarosa y purificación de producto de PCR

Para realizar la purificación de los fragmentos de ADN aislados del plásmido, después de las digestiones que separan los fragmentos de interés del plásmido y que los dejan con los extremos adecuados, se sigue el mismo protocolo recomendado por Roche, pero en este caso para purificación de ADN a partir de agarosa (High Pure plasmid isolation kit Roche). Para ello, antes de seguir el protocolo y después de la digestión, se corre un gel de agarosa al 0.7% para separar los productos de la digestión y se corta la banda que contiene el fragmento de interés y se sigue el protocolo de purificación.

3.3.4 Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Con el ADN genómico extraído y con los cebadores adecuados, se procedió a la amplificación de los fragmentos.

La reacción tuvo lugar en una mezcla de 0.2 mM de dNTPs, 0.1 mg del ADN genómico, 0.5 μ M de cada cebador, 0.75 U de enzima Taq ADN polimerasa y 2 mM del tampón de reacción correspondiente. Usando un volumen final de 25 μ l por reacción. Se realizaron varias PCR usando distintas concentraciones de ADN genómico (1/1, 1/50, 1/100) con el fin de conocer la concentración óptima que amplifique los fragmentos.

Los ciclos de amplificación utilizados fueron: Un primer ciclo de 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de: un minuto a 95 °C, un minuto a 58 °C y 3 minutos a 68 °C. En último lugar un ciclo de 10 minutos a 72 °C. Para finalizar, las muestras se conservan a 4 °C.

3.4 DIGESTIÓN Y LIGACIÓN DE PLÁSMIDOS

3.4.1 Vector de expresión en bacteria

Se requiere del vector de expresión pGEM-T *Easy* (Promega), para introducir el producto de la PCR (fragmentos de genes ART), y a continuación seleccionar los clones que hayan incorporado el inserto. Este vector tiene un tamaño de 3015 pb, y el sistema de selección de clones se basa en la α -complementación de la β -galactosidasa. Para la aparición de la β -galactosidasa se requiere de la expresión del gen Lac Z que codifica para la proteína reportera β -lactamasa cuya región codificante está interrumpida por el MCS y el operón lacZ. Este vector permite una ligación fácil de los productos de PCR y la selección blanco-azul de los clones recombinantes (ver en anexo).

3.4.2 Ligación en el vector pGEM-T Easy

El plásmido pGEM-T *Easy* utiliza el método de clonaje “TA cloning”, esto permite una clonación directa entre el inserto de interés y el plásmido. El plásmido contiene extremos cohesivos los cuales constan de una

desoxitimina libre (3'T) y los productos de la amplificación contienen una desoxiadenosina (3'A) que ha añadido la Taq Polimerasa durante la PCR.

La ligación tiene lugar en un eppendorf que contiene 1U de ADN ligasa T4, 1X de tampón ligasa, 1.875 ng/ μ l del fragmento ART, 2.5 ng/ μ l de pGEM-TEasy con un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla se incubaba toda la noche a 16 °C.

3.4.3 Vectores de expresión en levadura

Para los ensayos β -galactosidasa se emplea el vector de expresión YEp366 (Myers et al., 1986) tiene la secuencia que codifica para la β -galactosidasa. Se clona el fragmento del promotor del gen de interés de forma que no se perturbe la pauta de lectura abierta (Reynolds et al., 2001). Con esto se puede estudiar cuanta β -galactosidasa se forma según la expresión del promotor y posteriormente medir esta actividad enzimática al añadir el sustrato del enzima (Ortho-Nitrophenyl- β -Galactosidase ONPG). Además, este vector contiene un gen que codifica para leucina y una resistencia a ampicilina de forma que se usan para seleccionar colonias positivas al clonar en *S. cerevisiae* y *E. coli* respectivamente (ver anexo).

En levadura se emplea el vector de expresión pACTII para generar una proteína de fusión con la proteína de interés (fragmentos ART), mediante su introducción en el MCS en la dirección correcta. La proteína Gal4 AD (dominio de activación de la transcripción de 113 aminoácidos) y un epítipo de HA (hemaglutinina). (Clontech)

Este vector contiene el promotor *ADH1* el cual proporciona altos niveles de expresión a la proteína de fusión. La proteína es dirigida al núcleo debido a la señal de localización nuclear del antígeno T de SV4 que está clonado en el extremo 5' del Gal4 AD. El vector se replica de forma autónoma en *E. coli* y *S. cerevisiae*, lleva el gen *Bla* que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli* y el gen *LEU2* que permite a *S. cerevisiae* crecer en un medio sintético carente de leucina. Por tanto, las colonias transformadas, pueden crecer en sus medios selectivos respectivamente. Este vector también es adecuado para ensayos de doble híbrido en el que el dominio Gal4 AD contiene la región proteica que activa la transcripción de un gen reportero que se une o interacciones físicamente con dominio de unión a ADN (Clontech) (ver anexo).

El vector de expresión de levadura pBTM116 genera una proteína de fusión con la proteína de interés introducida en el MCS en la dirección adecuada y la proteína LexA (dominio de unión de ADN). La proteína de fusión tiene altos niveles de expresión en la célula huésped debido al promotor constitutivo del gen *ADH1*. (Bartel et al., 1993) La proteína es dirigida al núcleo donde se une al ADN. El vector se replica de forma autónoma en *E. coli* y *S. cerevisiae*, lleva el gen *Bla* que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli* y el gen *TRP1* que permite a *S. cerevisiae* crecer en un medio sintético carente e triptófano. Por lo tanto, las colonias transformantes son seleccionadas por esta capacidad. Este vector también es adecuado para ensayos de doble híbrido en el que dominio LexA contiene la región proteica de unión al ADN que permite la activación de la transcripción de un gen reportero si se une o interacciona físicamente con un dominio de activación de la transcripción (ver anexo).

3.4.4 Digestión y ligación en el vector pACTII y YEp366

Una vez obtenidos los fragmentos de los genes de la familia ART insertados en el pGEM-T Easy y haberse comprobado que no tienen mutaciones que comprometan la función de la proteína que codifican, éstos se

digirieron con los enzimas de restricción cuyas dianas de restricción se diseñaron en sus extremos para aislarlos del plásmido con los finales adecuados que luego permitieron el clonaje en pACTII.

De forma paralela se llevó a cabo la digestión de pACTII con los mismos enzimas, que cortarían el MCS dejando el vector lineal y con extremos cohesivos para el clonaje direccional de los distintos fragmentos usando los mismos encimas de restricción que en el caso anterior.

Para las digestiones se utilizan los enzimas de restricción (*SfiI* y *XhoI*). Estos enzimas de restricción cortan de modo específico y eficiente usando tampones distintos (buffer *Green*) para *SfiI* y (buffer *Red*) para *XhoI*. Es por ello por lo que se realizó una digestión en dos pasos. Primero se cortó con *XhoI* (temperatura óptima 37 °C), y posteriormente con *SfiI* (temperatura óptima 50 °C).

Para la purificación de los fragmentos de los genes ART, se corre un gel de agarosa a 0,7% con carril doble para separar por tamaño del vector (asegurando una buena cantidad de DNA) y a continuación se corta la banda y se purifica mediante el protocolo de purificación de ADN de agarosa (*High Pure plasmid isolation kit* Roche).

Seguidamente, se llevó a cabo la reacción de ligación en la cual se introdujo el fragmento del gen ART purificado con los extremos cohesivos, el vector con los extremos adecuados y la enzima ligasa. La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche, se transformó en *E.coli* y se cultivó placas de LB con ampicilina. Finalmente, se llevó a cabo la purificación del plásmido y la digestión con los enzimas de restricción adecuados para comprobar la presencia del vector pACTII con el inserto correspondiente.

Por otra parte, una vez los promotores de los genes (*ART4*, *ART7* y *HXT6*), fueron obtenidos por PCR, se purificaron y se digirieron con los enzimas de restricción adecuados para el correcto clonaje en YEp366.

De forma simultánea, YEp366 se digirió con los mismos enzimas de restricción que cortan el MCS dejando extremos cohesivos y aptos para el clonaje direccional.

Para las digestiones, se usaron los enzimas de restricción *Sall* y *BamHI*. La digestión se llevó a cabo en dos pasos. Primero se cortó con *Sall* (Temperatura óptima de 37 °C), se inactivo aumentando la temperatura a 65 °C, y después con *BamHI* (temperatura óptima de 37 °C).

Seguidamente, se llevó a cabo la reacción de ligación en la cual se introdujeron el fragmento del promotor purificado con extremos cohesivos, el vector propiamente cortado y la enzima ligasa. La mezcla se incubo toda la noche a 16 °C, se transformó en *E. coli* y se sembró en placas con LB ampicilina. Se asumió que todos los clones supervivientes son recombinantes. Finalmente, se llevó a cabo la purificación del plásmido y digestión con el enzima apropiado (*SacI*), para verificar la presencia del vector recombinante YEp366 y el fragmento clonado. El plásmido se llevó al servicio de secuenciación del IBB para comprobar que no se había generado ninguna mutación y se transformó en levadura.

Todas las construcciones se secuenciaron para comprobar que se realizaron satisfactoriamente.

3.5 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO POR GOTEO

Se emplearon diluciones seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000) de cultivos en estado líquido que contenían la cepa de levadura a analizar. Posteriormente, se depositaron en las placas de medio sólido con las diferentes condiciones a estudiar. Las gotas contienen aproximadamente 3 µl de cada dilución y se sembraron

empleando un replicador (Sigma). Las placas se incubaron a 28°C los días convenientes, y transcurridos de 2 a 7 días (en función de las condiciones de crecimiento) se observó cada placa.

En este análisis de crecimiento, se tuvo en cuenta las diluciones en las que se observaba el crecimiento así como el tamaño de colonia en cada cepa y condición para un tiempo de crecimiento determinado.

3.6 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOT”

3.6.1 Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Empleando el sistema *MiniProtean3* (BioRad). Primeramente, se prepararon los geles de poliacrilamida. Estos constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:biscrilamida 30:0.8 al 8%, 125 mM Tris-HCl pH 6.8 y SDS 0.1%) y una zona inferior de separación (acrilamida:biscrilamida 30:0.8 al 8%, 375 mM Tris-HCl 8.8 y SDS 0.1%). El tampón de resolución empleado fue SDS-PAGE 1X compuesto por 0.19 M glicina y 0.1% SDS (pH ajustado a 8.3 con Tris).

La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a una diferencia de potencial de 80 V mientras que la segunda etapa (resolución) se llevó a cabo a una diferencia de potencial de 120 V.

3.6.2 Transferencia a membrana (Western Blot)

Las proteínas separadas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore). La transferencia se realizó utilizando el set *Mini-Trans Blot* (BioRad) y tampón de transferencia Towbin (0.19M glicina, 0.01% SDS y 20% de metanol, ajustado a pH 8.3 con Tris). La transferencia se realizó con una diferencia de potencial inicial de 100 V durante 2 horas a una temperatura de 4 °C.

3.6.3 Tinción de membrana con *Direct Blue*

Con las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa, esta se tiño con la solución *Direct Blue* (Aldrich Chemistry) para comprobar la eficiencia de la transferencia proteica y obtener un control de carga. Se sumergieron las membranas en la solución colorante (0.008 [w/v] *Direct Blue*71, 40% etanol absoluto y 10% ácido acético) durante dos minutos en agitación. Posteriormente, se eliminó el exceso de colorante con la solución de lavado de *Direct Blue* (mezcla de 40% etanol absoluto y 10% de ácido acético glacial en agua destilada).

Se capturo la imagen de la membrana teñida y se eliminó el colorante con la solución de des tinción de *Direct Blue*, que contiene una mezcla de 50% etanol absoluto y bicarbonato sódico (NaHCO₃) 1M en agua destilada.

3.6.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana

Para detectar las proteínas, primero fue necesario bloquear los sitios de unión inespecíficos sumergiendo la membrana en una solución de bloqueo (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris.HCl pH 7.6 y 2% leche desnatada) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente, se retiró la solución y se añadió la solución con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés en la dilución adecuada. Esta se dejó incubando a 4 °C en agitación aproximadamente 16 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos en

TBS-Tween 20 (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl y 20 mM Tris-HCl pH7.6). En el siguiente paso, se añadió el anticuerpo secundario específico en la solución de bloqueo y la dilución adecuada y se dejó incubar a temperatura ambiente en agitación durante 2 horas. Finalmente, se realizaron tres nuevos lavados como los anteriores.

La detección se realizó utilizando el sistema de quimioluminiscencia *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal de quimioluminiscencia se detectó usando películas de rayos X (Biomax Light-1, Kodak).

3.7 ENSAYOS ENZIMÁTICOS β -GALACTOSIDASA

Las cepas que contenían el plásmido YEp366-*HXT6* se cultivaron hasta fase exponencial en medio sintético sin leucina, acorde con la competencia del plásmido. Se recogieron alícuotas de 1ml a las densidades ópticas de 0.5, 1.0 y 3.0 unidades de absorbancia, medidas a 660nm. Seguidamente se centrifugaron 5 minutos a 3000rpm y las células fueron recogidas.

El ensayo β -galactosidasa se llevó a cabo tal y como está indicado en (Reynolds et al., 1997). Las células recogidas se resuspendieron en 300 μ l de buffer Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 35 mM 2-mercaptoethanol). Cien μ L de la suspensión celular se diluyó en tubos de ensayo que contenían 900 μ L de buffer Z. Después, se añadieron 40 μ l de cloroformo y 20 μ l de SDS 0.1 %, para permeabilizar las células después de agitar 15 segundos. Los 200 μ l de suspensión celular que quedaron en el buffer Z se almacenaron a 4 °C. La suspensión de células permeabilizadas se atemperó colocando los tubos de ensayo a 30 °C en un baño de agua. Después de 15 minutos, 0.2 ml de ONPG (4 mg / ml) se añadieron como sustrato con el fin de empezar la reacción enzimática, la cual se puede evidenciar por la aparición de un color amarillo. La reacción enzimática se detuvo por un cambio de pH al añadir 500 μ l de Na_2CO_3 1 M. La formación de producto se evaluó por espectrofotometría al medir 350 μ l de la solución a 405 nm en una placa de 96-pocillos usando el lector de placas Labsystems y EMS Reader (Labsystems). La cantidad de suspensión celular se analizó midiendo la absorbancia a 630 nm. La actividad β -galactosidasa se expresó en unidades de Miller usando la siguiente fórmula: $[(1000 \times \text{OD}_{405}) / (\text{OD}_{660} \times \text{tiempo de reacción})]$.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE LOS PROMOTORES DE *HXT6*, *ART4* y *ART7*

En esta primera sección se analizarán los resultados del estudio del promotor de *HXT6* como regulador de la expresión de este transportador. A parte del promotor de *HXT6*, también se realizaron las construcciones de otros dos promotores *ART4* y *ART7* que por falta de tiempo no se pudieron estudiar.

4.2 SELECCIÓN DEL PROMOTOR

Como los promotores de los genes no estaban descritos en la bibliografía, para asegurar que todos los elementos reguladores fueron seleccionados, la región seleccionada fue delimitada desde aproximadamente primer codón del gen de interés, hasta al menos 400 pb aguas arriba del codón inicial. La secuencia fue buscada en la Base de datos de Genoma *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>), y las longitudes de promotor resultantes fueron 413, 556 y 767 pb para *ART4*, *ART7* y *HXT6*, respectivamente.

4.3 CLONAJE DE LOS PROMOTORES DE *ART4*, *ART7* Y *HXT6* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN YEp366

El clonaje de los promotores en el vector YEP366 se llevó a cabo tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El proceso comenzó con la extracción de ADN genómico de la cepa BY4741 vía el protocolo descrito anteriormente. Entonces, se realizaron 3 PCRs cada una con los cebadores específicos para la amplificación del promotor apropiado (*ART4*, *ART7* y *HXT6*). Para comprobar que la amplificación fue realizada correctamente, después de la reacción se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR (Figura 13).

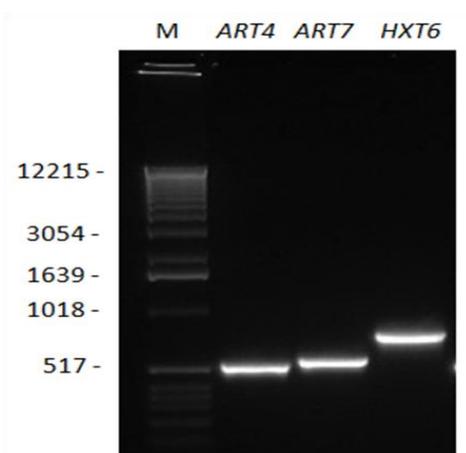


Figura 13: Electroforesis en gel de los productos de PCR que contiene las secuencias promotoras de los genes indicados.

Los cebadores fueron diseñados como se describe en materiales y métodos. Se insertaron dianas de restricción específicas al final de los cebadores. Se tuvo en cuenta que: los sitios de restricción no estaban en la región de promotor, que clonaje era direccional y que el promotor estaba en pauta de lectura con el gene *lacZ* del plásmido. Los oligonucleótidos resultantes se muestran en la tabla 2.

Después de la amplificación, se realizó la ligación en el vector de destino (YEp366), cortado con los mismos enzimas. El método se describe en la sección de Materiales y Métodos. Seguidamente, fue transformado en la cepa de *E.coli* DH5 α y fue purificado usando el kit de purificación de Roche. Las figuras a continuación muestran los constructos.

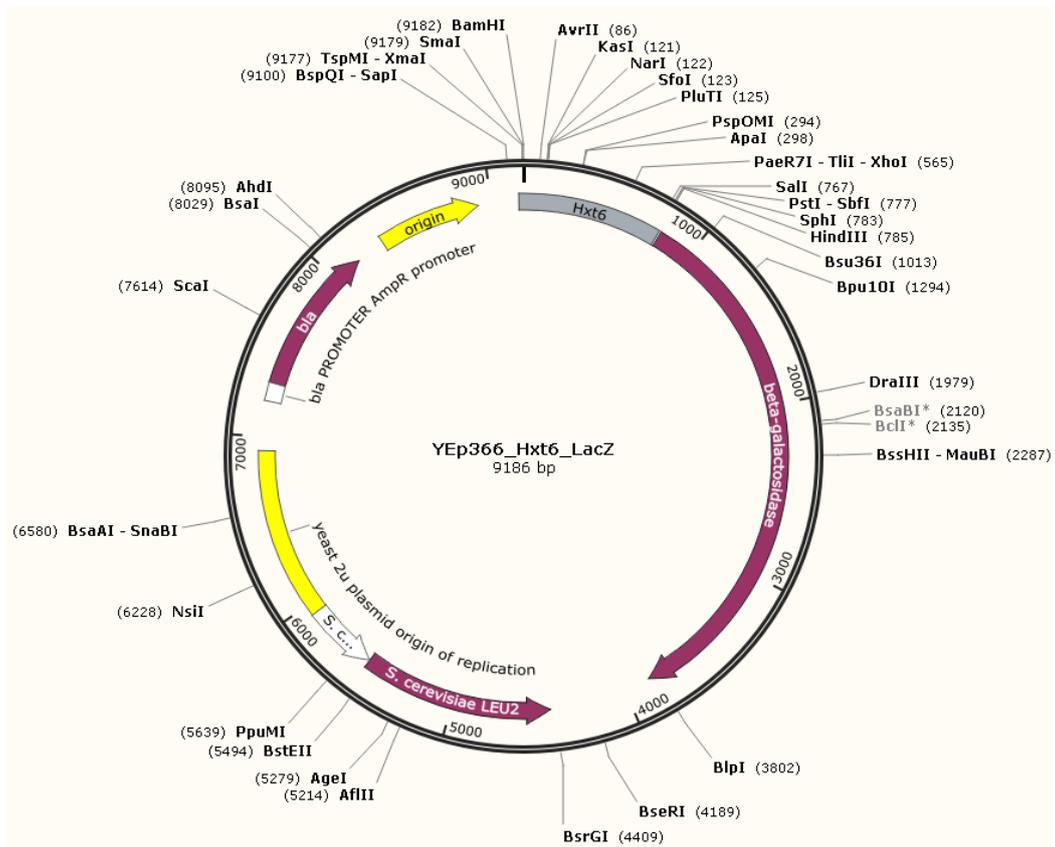


Figura 14: Promotor *HXT6* (Gris) clonado en el vector de expresión YEp366.

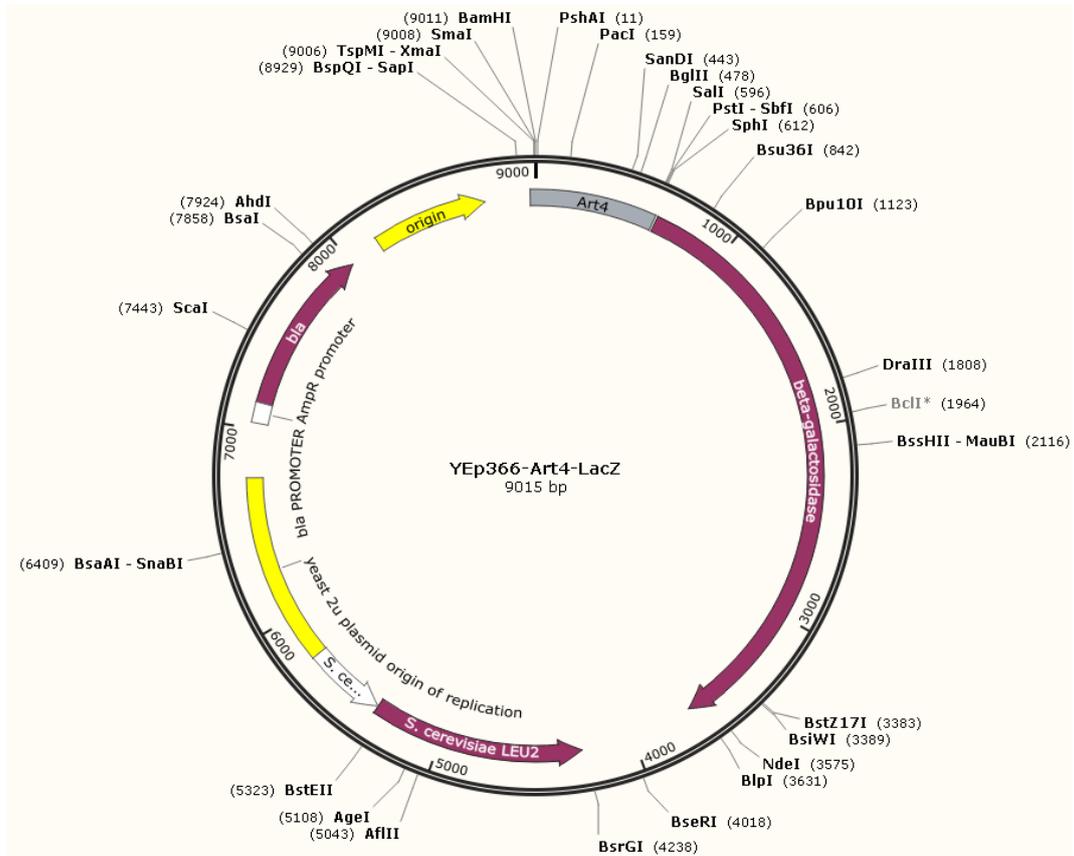


Figura 15: Promotor *ART4* (Gris) clonado en el vector de expresión YEp366.

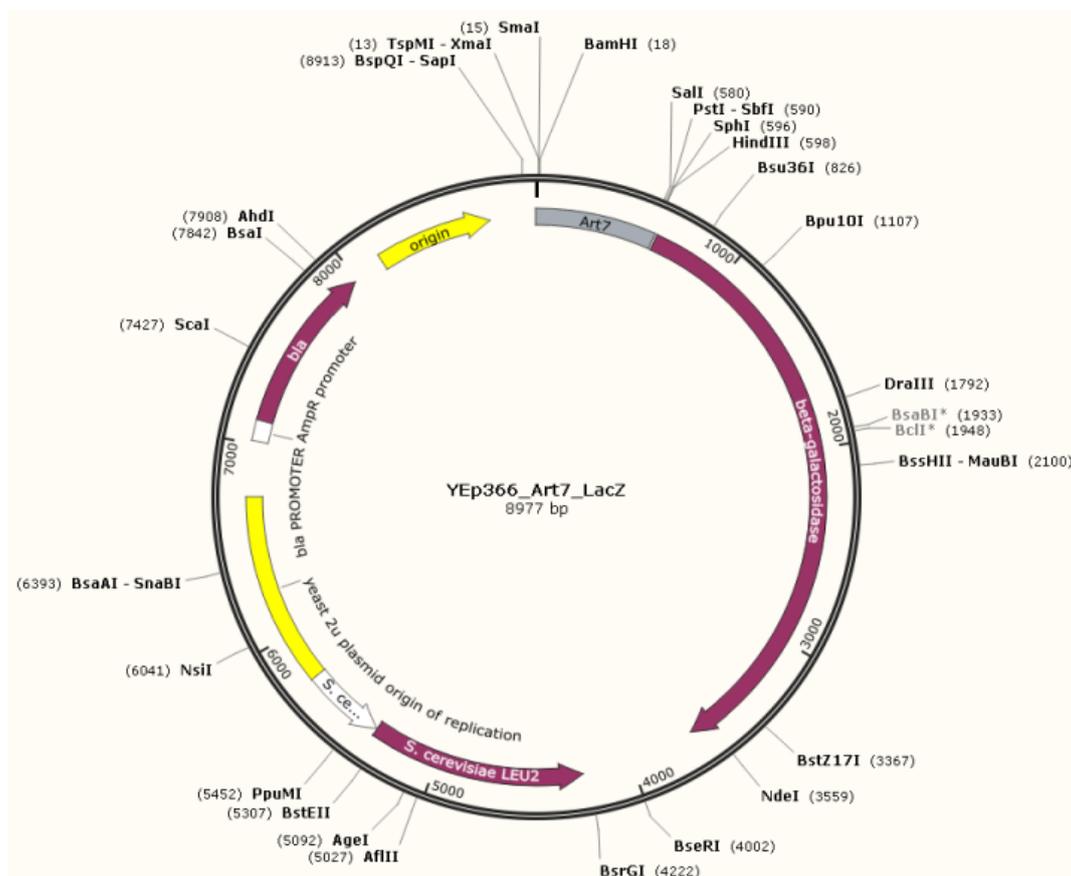


Figura 16: Promotor ART7 (Gris) clonado en el vector de expresión YEp366.

Posteriormente, la incorporación del promotor de interés en el vector se confirmó por digestión con el enzima de restricción *SacI* al analizarlo por la electroforesis en gel de agarosa. El tamaño esperado de los fragmentos después de la digestión se muestra en la tabla 5 y la electroforesis en la figura 17.

Tabla 5: Tamaño esperado después de la digestión con *SacI*.

Constructo	Tamaño molecular (pb)	Fragmentos de restricción con <i>SacI</i> (pb)
YEp366-HXT6	9186	6438 + 2159 + 589
YEp366-ART4	9015	6438 + 2577
YEp366-ART7	8977	6438 + 2539
YEp366	8427	6438 + 1989

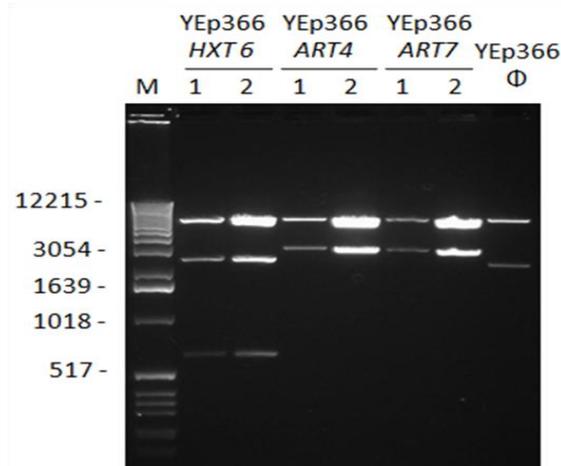


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa resultado de la digestión con *SacI*. La figura muestra dos clones positivos de cada promotor insertado y un control negativo con el plásmido vacío YEp366 Φ .

Los datos de secuenciación mostraron que el fragmento clonado no tenía mutaciones y el marco de lectura abierto de *lacZ* no fue perturbado. Aunque YEp366-ART4 y YEp366-ART7 también fueron construidos, más adelante no son usados para los ensayos β -galactosidasa ya que no hubo suficiente tiempo para realizar los experimentos. El objetivo de aquellas construcciones era de determinar si realmente estos promotores son regulados cuando se produce un cambio en la fuente de carbono.

4.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR A TRAVES DE ENSAYOS BETA GALACTOSIDASA

4.4.1 Funcionalidad del promotor

Para demostrar que promotor del gen *HXT6* tiene una actividad apropiada, se realizó un ensayo enzimático (Figura 18). Las células fueron crecidas en glucosa hasta fase exponencial. Entonces, nuevo medio fue añadido dejando el cultivo a $OD_{660nm} = 0.6$. Las células fueron recogidas a tiempos 0, 1, 2, 4 y 6 horas. Los resultados se muestran más abajo. Se puede observar que a tiempos mayores la expresión del promotor de *HXT6* es mayor. Estos resultados son coherentes ya que Hxt6 es un transportador de glucosa de afinidad que es expresado cuando los niveles de glucosa son bajos (Özcan and Johnston, 1999). A tiempos más largos, menos glucosa queda en el medio y por tanto la expresión de *HXT6* es más alta. El experimento sugiere que la región de promotor seleccionada ha incluido los dominios de regulación necesarios para mantener la funcionalidad del promotor.

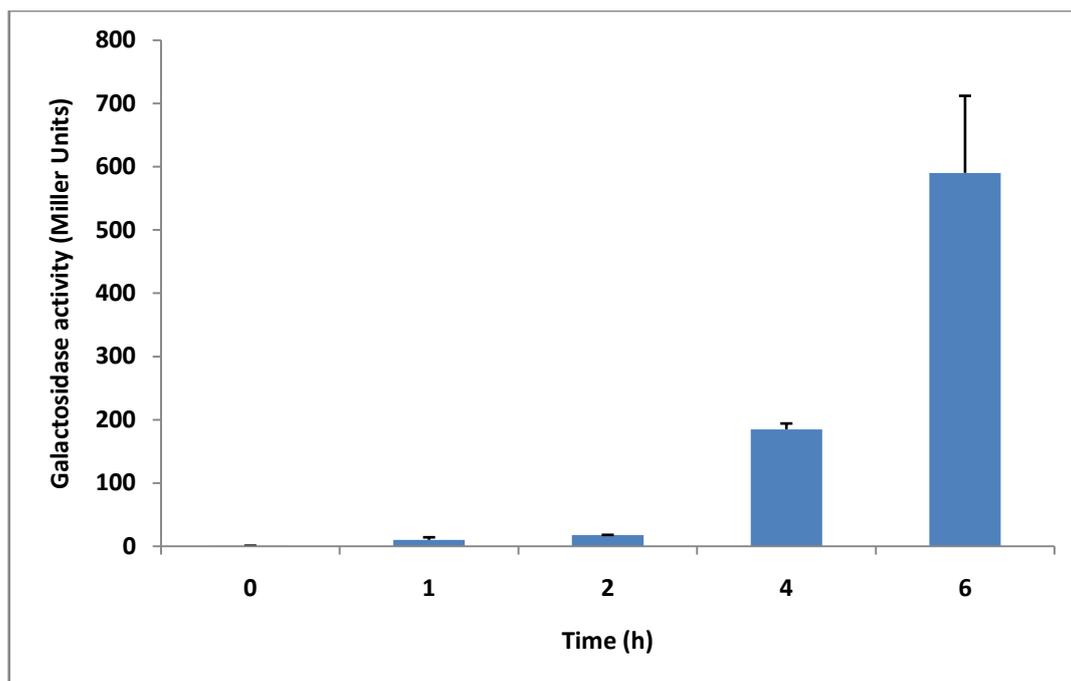


Figura 18: Ensayo β -galactosidasa realizado con glucosa como fuente de carbono. Las células fueron recogidas a diferentes tiempos a partir de una inoculación inicial de células en fase exponencial. Ensayo realizado con la cepa BY4741 [YEp366-HXT6]

4.4.2 Determinación de la regulación transcripcional

Los ensayos enzimáticos β -Galactosidasase realizaron tal cual se explica en materiales y métodos. El plásmido YEp366-HXT6 fue transformado en la cepa silvestre y en cepas que carecen del gen *ART4* o *ART7*. Las células fueron cultivadas hasta fase exponencial en la cual alícuotas de 1ml fueron tomadas a diferentes densidades ópticas. Se realizaron dos experimentos diferentes. En el primero (Figura 19), las células fueron cultivadas con medio sintético de glucosa. Alícuotas de 1ml fueron tomadas a $OD_{660nm}=0.5$, $OD_{660nm}=1.0$ y $OD_{660nm}=3.0$. En el segundo experimento (Figura 20), las células fueron cultivadas en el medio sintético de rafinosa y las alícuotas de 1ml fueron tomadas a $OD_{660nm}=0.5$, $OD_{660nm}=1.0$ y $OD_{660nm}=2.5$. Después de recoger las células se añadió el buffer Z y el sustrato de la β -galactosidasa (ONPG) a la mezcla de reacción. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.

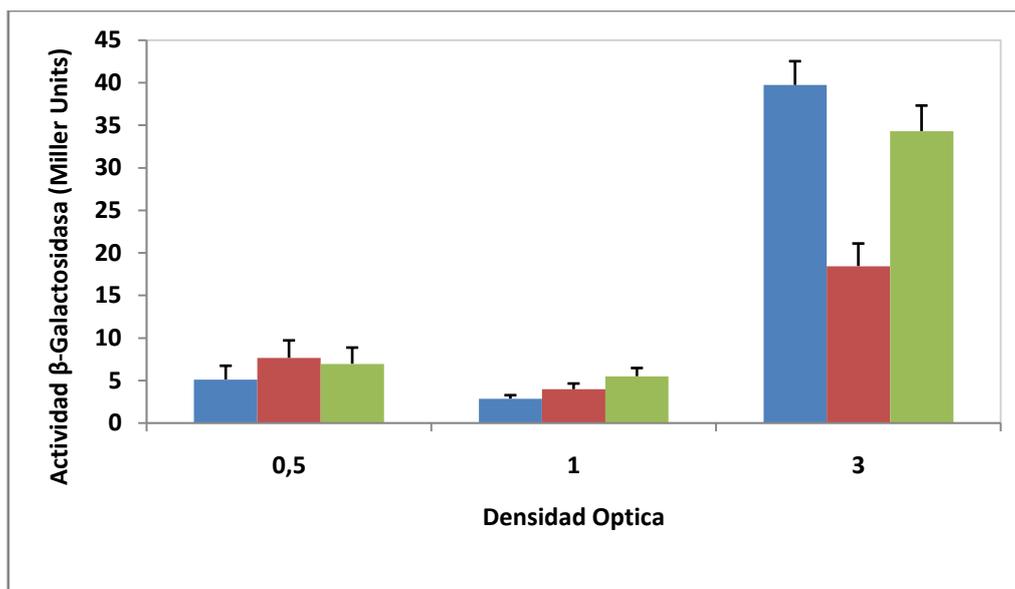


Figura 19: Ensayo β -galactosidasa realizado con glucosa como fuente de carbono. Las células fueron recogidas a diferentes OD_{660nm} (0.5, 1.0, 3.0) a partir de una inoculación inicial de células en fase exponencial. Ensayo realizado con la cepa silvestre (fondo BY4741) transformado con YE366-HXT6 (Azul), *art4*[YE366-HXT6](Rojo) y *art7*[YE366-HXT6](Verde).

En el experimento en el que se cultivaron células en glucosa, no se observan diferencias significativas en la expresión de Hxt6 entre la cepa de tipo salvaje y las cepas mutantes a densidades ópticas iniciales ($OD_{660nm} = 0.5$ y $OD_{660nm} = 1.0$). En contraste, a una $OD_{660nm} = 3.0$, pudo observarse que el nivel de expresión Hxt6 es ligeramente menor en los mutantes que en el tipo salvaje. Por otra parte, a mayor densidad óptica se puede ver un aumento en la expresión Hxt6. Este incremento se debe a la disminución de glucosa en el medio. Como se sabe, Hxt6 es un transportador de glucosa alta afinidad y cuando la concentración de glucosa es baja, la expresión de este promotor es muy activa (Özcan and Johnston, 1999).

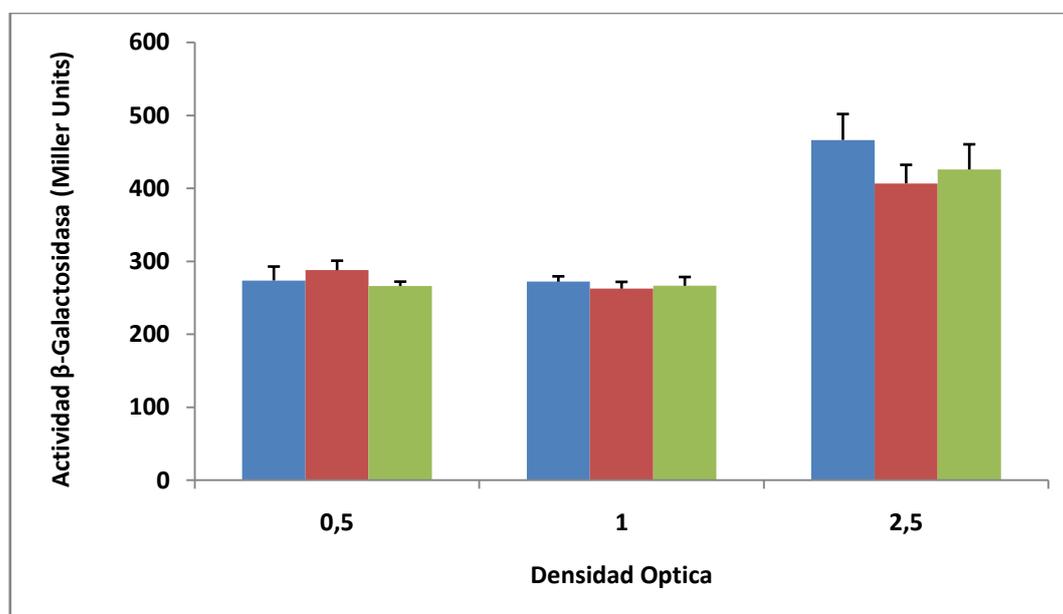


Figura 20: Ensayo β -galactosidasa realizado con rafinosa como fuente de carbono. Las células fueron recogidas a diferentes OD_{660nm} (0.5, 1.0, 2.5) a partir de una inoculación inicial de células en fase exponencial. Ensayo realizado con la cepa silvestre (fondo BY4741) transformado con YE366-HXT6 (Azul), *art4*[YE366-HXT6] (Rojo) y *art7*[YE366-HXT6] (Verde).

En el experimento en el que se cultivaron las células en rafinosa, se observó una actividad mucho mayor (máximo de 40 unidades Miller en glucosa vs. 500 unidades en rafinosa). Lo que apoya los resultados previamente obtenidos (Figura 13). Además, no hay diferencias en la expresión de Hxt6 entre cepa silvestre y cepas mutantes.

En el estudio anterior, se determinó la acumulación de Hxt6 a nivel de proteína (Figura 12) en las mismas condiciones. En este caso, el nivel de proteína en las cepas mutantes es mucho mayor que en el tipo silvestre, y más destacada en las células que se cultivaron en medio rafinosa. En nuestro experimento no se observa que el nivel de expresión del promotor *HXT6* es mayor en las cepas mutantes que en la cepa de tipo salvaje. Estos resultados muestran que el aumento de expresión en el nivel de proteína no es debido a un aumento de la expresión génica de *HXT6*. Por tanto, sugiere que estas diferencias tan grandes en la acumulación de Hxt6 se deben a modificaciones post-traduccionales en la proteína, como un retraso en la endocitosis. Este experimento se incorporará en un manuscrito del grupo del trabajo que se mandará a publicar en breve.

4.5 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE CEPAS MUTANTES *ART4* Y *ART7*

Al observar un incremento en la expresión del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6, con los mutantes *art4* y *art7*, se realizó un análisis fenotípico de cepas que contienen esta mutación y se comparó con una cepa salvaje. Al mismo tiempo se estudió el posible efecto fenotípico causado por la introducción de la proteína de fusión GFP en las proteínas Art4 y Art7. Esta fusión se ha hecho a nivel genómico, tal y como se explica para el caso de Art7 en el apartado 3.2.3. Al introducir una modificación en la secuencia codificante, siempre existe un riesgo de alterar la actividad de la proteína codificada. Por tanto, es importante realizar un análisis fenotípico de las cepas modificadas. Para ello, se realizaron goteos en placa como se explica en el apartado de materiales y métodos, de cepas indicadas, en medios de cultivo con diferente fuente de carbono. Se sembraron diferentes diluciones (1/10, 1/100 y 1/ 1000) y se analizaron dos clones. Los resultados de los goteos en los que se compara la cepa silvestre con las cepas mutantes se muestran a continuación. Solamente se muestra uno de los clones analizados.

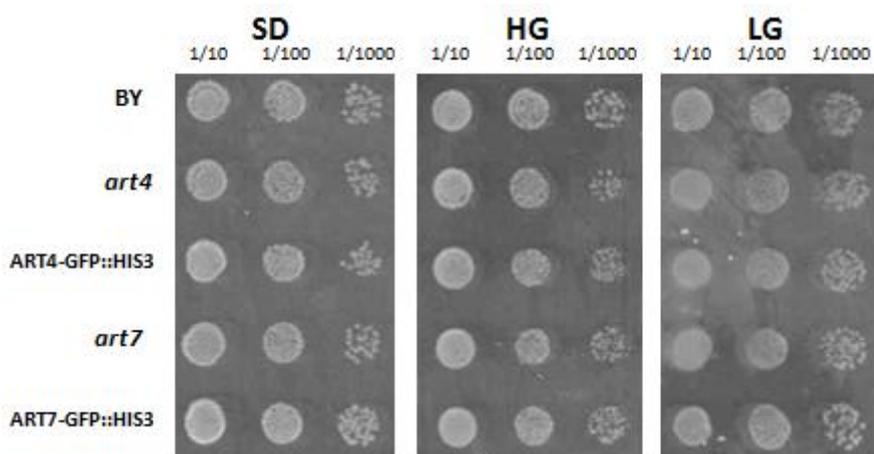


Figura 21: Análisis fenotípico de las cepas mutantes para *art4*, *art7* y cepas a las que se les introdujo la proteína de fusión GFP. Se muestran los goteos en tres medios de cultivo diferente SD (Synthetic Dropout), HG (High Glucose, 4% Glucosa) y LG (Low Glucose, 1% Glucosa). Están representadas tres diluciones diferentes.

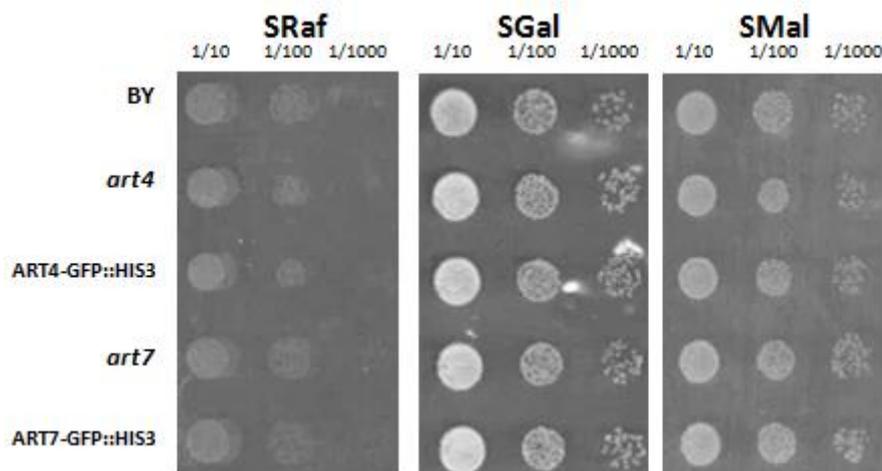


Figura 22: Análisis fenotípico de las cepas mutantes para *art4*, *art7* y cepas a las que se les introdujo la proteína de fusión GFP. Se muestran los goteos en tres medios de cultivo diferente SRaf (SyntheticDropout raffinose), SGal (SyntheticDropout galactose) y SMal (Synthetic Dropout maltose). Están representadas tres diluciones diferentes.

No se observó ningún efecto fenotípico y no se observan diferencias en el crecimiento entre las cepas mutantes y salvajes. Es posible que la célula pueda tener un crecimiento normal aunque falten estos reguladores del tráfico de proteínas. Pueden existir otras vías de señalización que substituyan esta falta y por tanto no observarse ningún cambio fenotípico. Un posible análisis para un experimento futuro sería comprobar si una cepa que carga ambas mutaciones tiene un cambio fenotípico en el crecimiento en diferentes fuentes de carbono. Con estos resultados, no podemos concluir si la fusión de GFP al final de las secuencias codificantes para Art4 y Art7 altera la actividad de las mismas, ya que no se ha encontrado ningunas condiciones donde el comportamiento del crecimiento de los mutantes se ve cambio.

Por otra parte se realizaron goteos con las proteínas sobre expresadas en dos vectores diferentes (pNTrp y pACT II). Del mismo modo que en el experimento anterior, no se observa ningún cambio fenotípico. Estos resultados no se muestran en este trabajo.

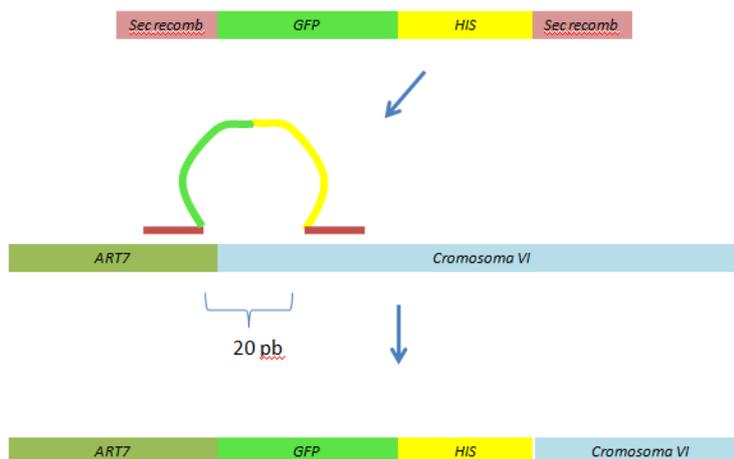
4.6 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE Art4 Y Art7

4.6.1 Regulación post-traducciona

Con el fin de estudiar el perfil de acumulación de las proteínas Art4 y Art7, se introdujo la proteína de fusión GFP en el genoma justo después de *ART7*. La cepa que contiene una modificación análoga de *ART4* ya estaba disponible en el laboratorio.

4.6.1.1 Diseño de los oligos

Para el marcaje de *ART7* con GFP en la parte COOH-terminal, se tuvieron que diseñar unos oligonucleótidos un más largos de lo habitual. Estos oligonucleótidos poseen una secuencia de recombinación en el genoma de levadura y una secuencia que hibrida con GFP. Para que la inserción sea más efectiva se dejan 20 pb entre las secuencias de recombinación (Esquema 1).



Esquema 1: Modelo de integración de GFP fusionada con ART7.

El cebador directo se diseñó de forma que, la primera parte fuera complementaria a la parte final de *ART7*, eliminando el codón de *stop*. Y una segunda parte que fuera complementaria a la primera parte de GFP. Esta segunda parte, es necesaria si se quiere obtener el fragmento de deseado para la recombinación cuando se produce la amplificación por PCR. El cebador reverse se diseñó de forma que la secuencia de recombinación estuviera unas 20 pb aguas abajo de la secuencia de recombinación anterior y que el oligonucleótido hibridara también con la parte final de *HIS3* que en el caso utilizado era un casete de histidina que usamos como marcador de selección.

Una vez obtenido el producto de PCR se realizó la integración en el genoma tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez integrado en el genoma se realizó otra PCR para comprobar que se había integrado correctamente (Figura 23) y el producto de PCR se purificó y se secuenció en el servicio de secuenciación del IBMCP. Se comprobó que la proteína GFP estaba en pauta de lectura con Art7 y que no se había producido ninguna mutación debido a la amplificación.

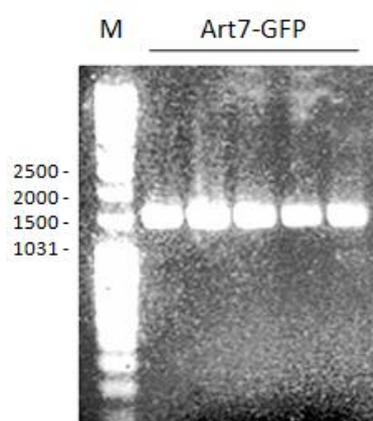


Figura 23: Amplificación por PCR del fragmento final de *ART7* que incorpora GFP en su parte terminal sin codón de *stop*. Se analizaron 5 clones y en todos se obtuvo amplificación.

4.6.1.2 Análisis de proteínas

Se estudió la expresión de las proteínas Art4 y Art7 fusionados al GFP a nivel genómico al cambiar la fuente de carbono. Primero se estudió la expresión de Art4 y Art7. Se crecieron las células en medio de cultivo

glucosa porque es cuando se postula que estas proteínas estarán expresadas. Recordemos que Hxt6 es un transportador de glucosa de alta afinidad y que solamente se expresa cuando los niveles de glucosa son bajos. Al haber niveles altos de glucosa se espera que tanto Art4 como Art7 deben de estar expresadas, ya que son los encargados de promover la ubiquitinación y posterior degradación de Hxt6 en la vacuola. Los resultados lo confirman, sin embargo el nivel de proteína es bajo ya que el número de células necesario para detectar estas proteínas fue muy alto. Incluso así, no se pudo detectar Art7 (Figura 24).

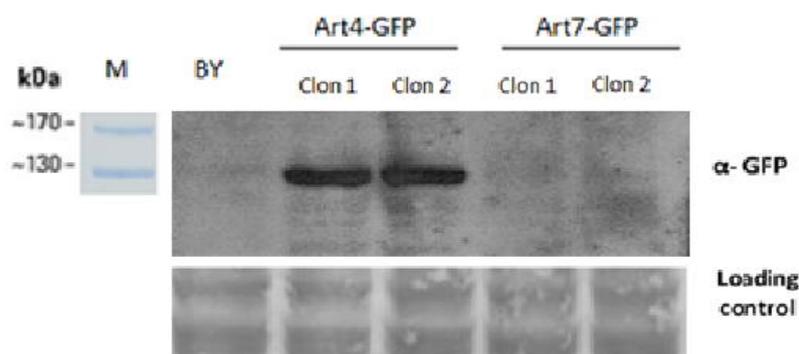


Figura 24: Análisis cualitativo de proteínas mediante western blot. En la figura se muestra la cepa salvaje y dos clones de Art4-GFP y Art7-GFP. Las células se cultivaron en glucosa hasta fase exponencial y se realizó el experimento.

Como un abordaje alternativa para intentar detectar Art7-GFP, se realizó un experimento para comprobar si este se acumula al cambiar la fuente de carbono a tiempos cortos. Este experimento se diseñó así basándonos en resultados del laboratorio empleando *ART4* y *ART7* expresados en plásmidos usando este mismo protocolo (A. Ferri y L. Yenush, datos no publicados). Primero se crecieron las células en medio de cultivo rafinosa hasta fase exponencial y posteriormente se añadió un 2% de glucosa tomando alícuotas a diferentes tiempos como se ha explicado anteriormente. En la figura 25 se muestra el análisis por western blot.

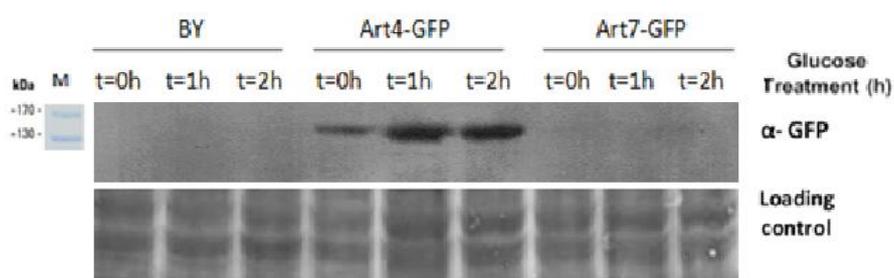


Figura 25: Análisis cualitativo de proteínas mediante western blot. En la figura se muestra la cepa salvaje, la cepa Art4-GFP y Art7-GFP. Las células se cultivaron en rafinosa hasta fase exponencial y añadió un 2% de glucosa.

Se puede observar un incremento en la expresión de Art4. Sin embargo, incluso con este protocolo de crecimiento, no ha sido posible detectar Art7-GFP. Como se sabe, Hxt6 disminuye su expresión en presencia de glucosa (Figura 12). Para que el transportador pueda ser degradado de la membrana es necesario el adaptador del tráfico de proteínas Art4. Con la proteína Art4 sucede lo contrario que con la proteína Hxt6, se acumula al cambiar a glucosa como fuente de carbono. Por tanto, los resultados obtenidos son coherentes.

Es posible que suceda lo mismo con la proteína Art7. Sin embargo, sus niveles de expresión son todavía más bajos que Art4 y no es posible detectar mediante western blot.

Una vez la proteína Art4 se detectó mediante western blot, se analizó por microscopia de fluorescencia para estudiar una posible acumulación en los orgánulos como puede ser vesículas endocíticas o el retículo endoplasmático o TGN, donde es posible que pueda ser degradado Hxt6 o una acumulación en la membrana donde tenemos la presencia de este transportador. Sin embargo, no se pudo observar ningún tipo de señal de fluorescencia con lo que no se pudo proseguir por esta vía. La falta de señal en este caso se debe a la baja expresión proteica que no genera suficiente señal en el microscopio confocal como para diferenciarla del ruido de fondo.

4.6.2 Generación de herramientas para estudiar interacciones proteína-proteína de Art7 con la proteína kinasa Snf1

Se planteó generar herramientas para estudiar otros aspectos de la regulación de la proteína Art7, como sus interacciones proteína-proteína. Para ello, se construyó plásmidos para ampliar los estudios de interacción entre Art7 y la proteína kinasa Snf1. Estudios previos del laboratorio han revelado que tanto Art4 como Art7 forma un complejo físico con la kinasa Snf1 en el sistema del doble híbrido de levadura (E. Deffontaines y L. Yenush datos no publicados). Además, se ha visto que es la región N-terminal de Art4, que contiene el dominio arrestina, que media la interacción con Snf1. Quisimos generar herramientas para extender este estudio para incluir a Art7. Para ello se clono por separado el extremo N-terminal y el C-terminal de Art7 en el vector pACTII como se explica en materiales y métodos. Una vez que estaban los fragmentos clonados en el vector pACTII se realizó una digestión con *HindIII* para comprobar que se habían introducido correctamente. En la tabla 6 se muestran los fragmentos generados y en la figura 26 la separación por electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 6: Tamaño esperado después de la digestión con *HindIII*.

Constructo	Tamaño molecular (pb)	Fragmentos de restricción con <i>HindIII</i> (pb)
pACTII	8100	7352 + 748
pACTII-ART7	10298	7352 + 2946
pACTII-ART7-CT	9119	7352 + 1767
pACTII-ART7-NT	9279	7352 + 1927

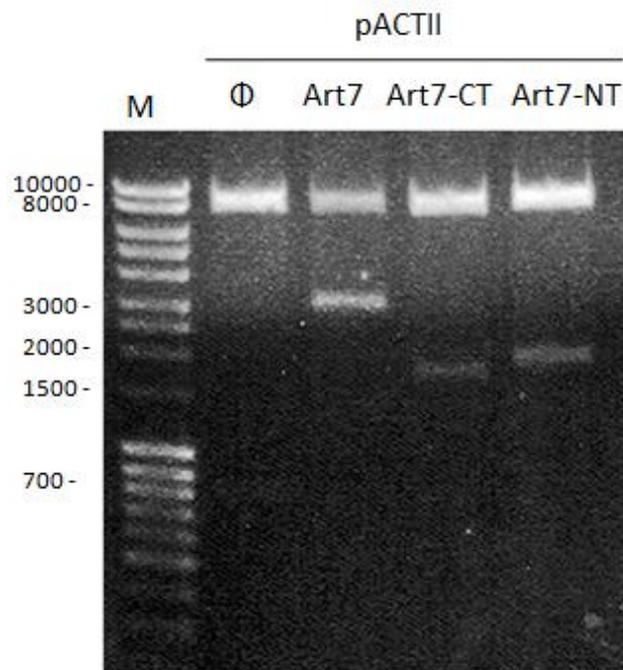


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa resultado de la digestión con *Hind*III. La figura muestra un clon positivo de cada fragmento insertado y un control negativo con el plásmido vacío pACTII Φ . Notar que la banda pequeña del vector vacío no se aprecia muy bien pero está presente en las 700 pb.

Con estas construcciones, y con las que se habían realizado en trabajos anteriores, se realizará ensayos de doble híbrido de levadura en los que se mapeara los fragmentos de Art7 que interaccionan con la proteína quinasa Snf1, ya que por falta de tiempo no se pudo realizar en el contexto de este trabajo.

5 CONCLUSIONES

5.1 ESTUDIO DEL PROMOTOR *HXT6*

El promotor se comporta de la forma esperada. A tiempos mayores, la expresión de *HXT6* es también mayor.

No hay una regulación diferente entre los mutantes *art4*, *art7* y la cepa salvaje. Tanto en fuente de glucosa como en rafinosa las unidades de actividad son similares. Además en fuente de rafinosa la expresión es mucho mayor que en fuente de glucosa.

5.2 ESTUDIO FENOTÍPICO

No existe ningún efecto fenotípico entre los mutantes *art4* y *art7* y la cepa salvaje al crecerlas en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono. Del mismo modo, tampoco se ha detectado condiciones de crecimiento donde se aprecia diferencias en las cepas controles y las que sobreexpresan *ART4* o *ART7*.

5.3 REGULACIÓN POST TRADUCCIONAL

Tanto Art4 como Art7 se expresan muy poco y son muy difíciles de detectar mediante western blot y mediante microscopia de fluorescencia, sugiriendo que se expresan a niveles bajos. Esta hipótesis será confirmada por análisis de β -galactosidasa empleando las construcciones de *ART4*-YEp366 y *ART7*-YEp366 generado en este trabajo.

Los análisis de proteínas indican que hay un incremento en la expresión de Art4 al añadir un 2% de glucosa al medio. Estos resultados son coherentes con la cantidad de transportador Hxt6 que se degrada al añadir un 2% de glucosa al medio. Por tanto sugiere que Art 4 sufre una regulación a nivel transcripcional o post-traducciona (o ambos) en función de la fuente de carbono. Este tipo de regulación no se ha observado en los casos de las proteínas de la familia ART y por tanto representa una línea de investigación muy interesante para el futuro.

6 BIBLIOGRAFÍA

ADAMS A., GOTTSCHLING D. E., KAISER C. A., AND STEARNS T. (1997) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

ANDOH T., HIRATA Y., AND KIKUCHI A., (2002), "PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance", *FEBS Letters*, **525**, 131-134.

ANDRÉ B., (1995), "An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*, **11**, 1575-1611.

BARTEL P., CHIEN C. T., STERNGLANZ R. AND FIELDS S., (1993), "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system", *BioTechniques*, **14**, 920-924.

BECK T. AND HALL M.N., (1999), "The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient regulated transcription factors", *Nature*, **402**, 689-692.

BECUWE M., VIEIRA N., LARA D., REZENDE J. C., CUNHA C. S., CASAL M., et al., (2012), "A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis", *Journal of Cell Biology*, **196**, 247-259.

BOLES E. AND HOLLENMBERG C. P., (1997), "The molecular genetics of hexose transport in yeast", *FEMS microbiology reviews*, **21**, 85-111.

BROHÉE S., BARRIOT R., MOREAU Y. AND ANDRÉ B., (2010), "YTPdb: A wiki database of yeast membrane transporters", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1798**, 1908-1912.

CLAGUE M. J., LIU H., AND URBÉ S., (2012), "Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation", *Developmental Cell*, **23**, 457-467.

CORI C. F. AND CORI G.T., (1925a), "The carbohydrate metabolism of tumors. I. The free sugar, lactic acid, and glycogen content of malignant tumors", *Journal of Biological Chemistry*, **64**, 11-22.

CORI C. F. AND CORI G.T., (1925b), "The carbohydrate metabolism of tumors. II. Changes in the sugar, lactic acid, and co-combining power of blood passing through a tumor", *Journal of Biological Chemistry*, **65**, 397-405.

DI FIORE P. P., POLO S. AND HOFMANN K., (2003), "When ubiquitin meets ubiquitin receptors : a signaling connection", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 491-497.

FELDMAN H., (2012). *YEAST Molecular and cell biology*. Chapter 2. Weinheim-Germany, Wiley-Blackwell.

FLICK K. M., SPIELEWOY N., KALASHNIKOVA T. I., GUADERRAMA M., ZHU Q., CHANG H.C. AND WITTENBERG C., (2003), "Grr1-dependent Inactivation Mth1 Mediates Glucose-induced Dissociation of Rgt1 from HXT Gene Promoters", *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 3230-3241.

- GIBSON B. R., BOULTON C. A., BOX W. G., GRAHAM N. S., LAWRENCE S. J., LINFORTH R. S. AND SMART K. A., (2008), "Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation", *Yeast*, **25**, 549-562.
- GOFFEAU A., BARREL B. G., BUSSEY H., DAVIS R. W., DUJON B., FELDMANN H., et al., (1996), "Life with 6000 genes", *Science*, **274**, 546-567.
- HANAHAH D., (1983), "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- HARVEY K.F. AND KUMAR S., (1999), "Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions", *Trends in Cell Biology*, **9**, 166-169.
- HERSHKO A. AND CIECHANOVER A., (1992), "The ubiquitin system", *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 425-479.
- HIGGINS C. F., (1992), "ABC Transporters: From Microorganisms to Man", *Annual Review of Cell Biology*, **8**, 67-113.
- HIKE L., (2001), "A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin", *Cell*, **106**, 527-530.
- HOFMANN K. AND BUCHER P., (1995), "The Rsp5-domain is shared by proteins of diverse functions", *FEBS letters*, **358**, 153-157.
- HURLEY J. H. AND EMR S.D., (2006), "The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network" *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **35**, 277-298.
- ITO H., FUKUDA Y., MURATA K., AND KIMURA A., (1983), "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations", *Journal of Bacteriology*, **153**, 163-168.
- KIM J. H., ROY A., JOUANDOT D., AND CHO K. H., (2013), "The glucose signaling network in yeast", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 5204-5210.
- KLIS F. M., (1994), "Cell wall assembly in yeast", *Yeast*, **10**, 851-869.
- LAWERS E., ERPAPAZOGLU Z., TSAPIS R. H. AND ANDRÉ B., (2010), "The ubiquitin code of yeast permeasetrafficking", *Trends in Cell Biology*, **20**, 196-204.
- LEFKOWITZ R. J., RAJAGOPAL K. AND WHALEN E. J., (2006), "New roles for β -arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors", *Molecular Cell*, **24**, 643-652.
- LEÓN S., ERPAPAZOGLU Z. AND TSAPIS R. H., (2008), "Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies", *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 2379-2388.
- LIN C. H., MACGURN J. A., CHU T., STEFAN C. J. AND EMR S. D., (2008), "Arrestin Ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface", *Cell*, **135**, 714-725.

- MACGURN J. A., HSU P-C. AND EMR S. D., (2012), "Ubiquitin and Membrane Protein Turnover: from Cradle to Grave", *Annual Review of Biochemistry*, **81**, 231-259.
- MAIER A., VÖLKER B., BOLES E. AND FUHRMANN G. F., (2002), "Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters", *FEMS Yeast Research*, **2**, 539-550.
- MARINI A. M., MATASSI G., RAYNAL V., ANDRÉ B., CARTRON J. P., AND CHÉRIF-ZAHAR B., (2000), "The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast", *Nature Genetics*, **26**, 341-344.
- MARTIN C. J. M., ELAINE O. D., STEPHEN A. B., DUNCAN C. M. M. AND PETER J. F. H., (1987), "Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous", *Nature*, **325**, 641-643.
- MYERS A. M., TZAGOLOFF A., KINNEY D. M. AND LUSTY C. J., (1986), "Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions", *Gene*, **45**, 299-310.
- NIKKO E. AND PELHAM H. R., (2009), "Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters", *Traffic*, **10**, 1856-1867.
- ÖZCAN S. AND JOHNSTON M., (1995), "Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose", *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 1564-1572.
- ÖZCAN S. AND JOHNSTON M., (1996), "Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes HXT2 and HXT4 to low levels of glucose", *Molecular and cellular Biology*, **16**, 5536-5545.
- ÖZCAN S., DOVER J. AND JOHNSTON M., (1998), "Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *The EMBO Journal*, **17**, 2566-2573.
- ÖZCAN S. AND JOHNSTON M., (1999), "Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 554-569.
- PICKART C. M. AND FUSHMAN D., (2004), "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals", *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**, 610-616.
- RAIBORG C., RUSTEN T. E. AND STENMARK H., (2003), "Protein sorting into multivesicular endosomes", *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 446-455.
- REIFENBERGER E., FREIDEL K. AND CIRIACY M., (1995), "Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux" *Molecular Microbiology*, **16**, 157-167.
- REYNOLDS A., LUNDBLAD V., DORRIS D. AND KEAVENEY M., (2001), "Yeast vectors and assays for expression of cloned genes", *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter **13**, Unit 13.6.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. AND MANIATIS T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SINGER S. J., AND NICOLSON G. L., (1972), "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes", *Science*, **175**, 720-731.

TOWLE H. C., (2005), "Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription", *Trends Endocrinology and Metabolism*, **16**, 489-494.

TSAPIS R.H. AND ANDRÉ B., (2004), "Membrane Trafficking of yeast transporters: Mechanisms and physiological monitoring of downregulation", *Topics in Current Genetics*, **9**, 273-323.

WOODMAN P. G. AND FUTTER C. E., (2008), "Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity", *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 408-414.

YOUNG K. H., (1998), "Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time", *Biology of Reproduction*, **58**, 302-311.

7 ANEXOS

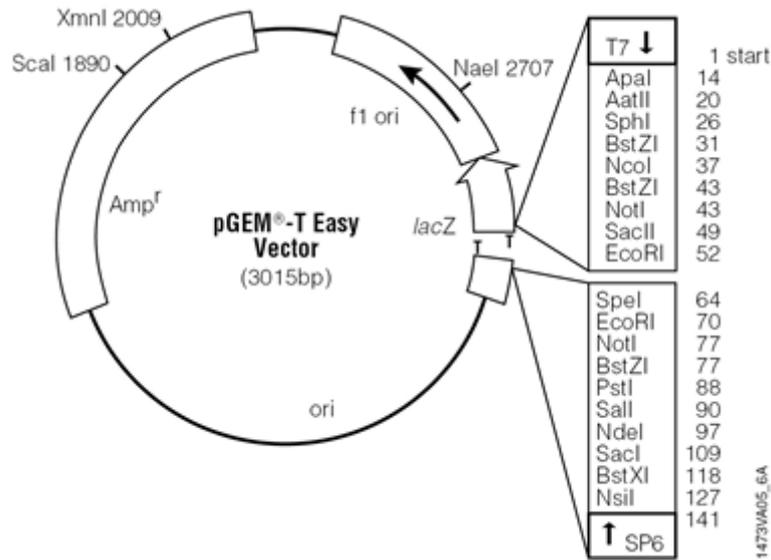


Figura 27: Vector pGEM-T Easy.

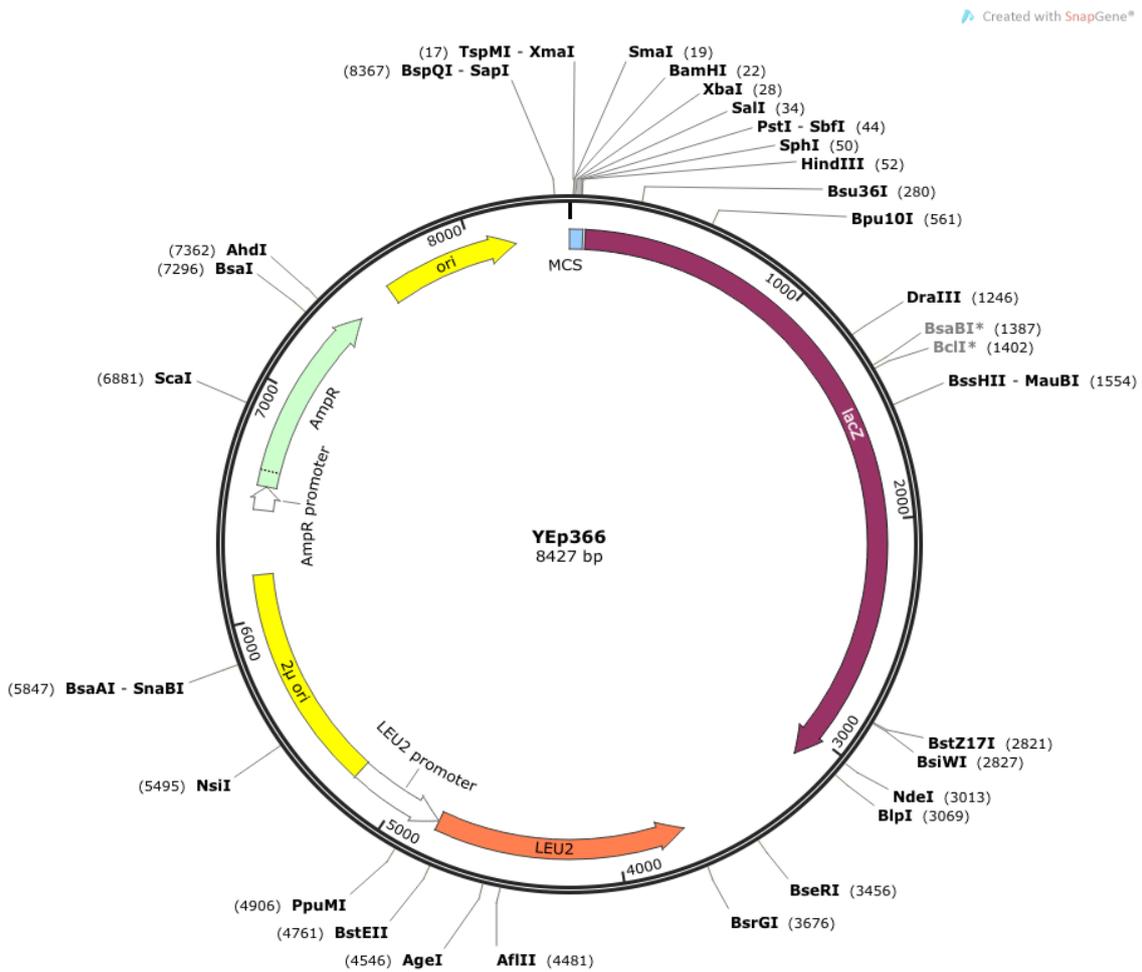


Figura 28: Vector YEp 366.

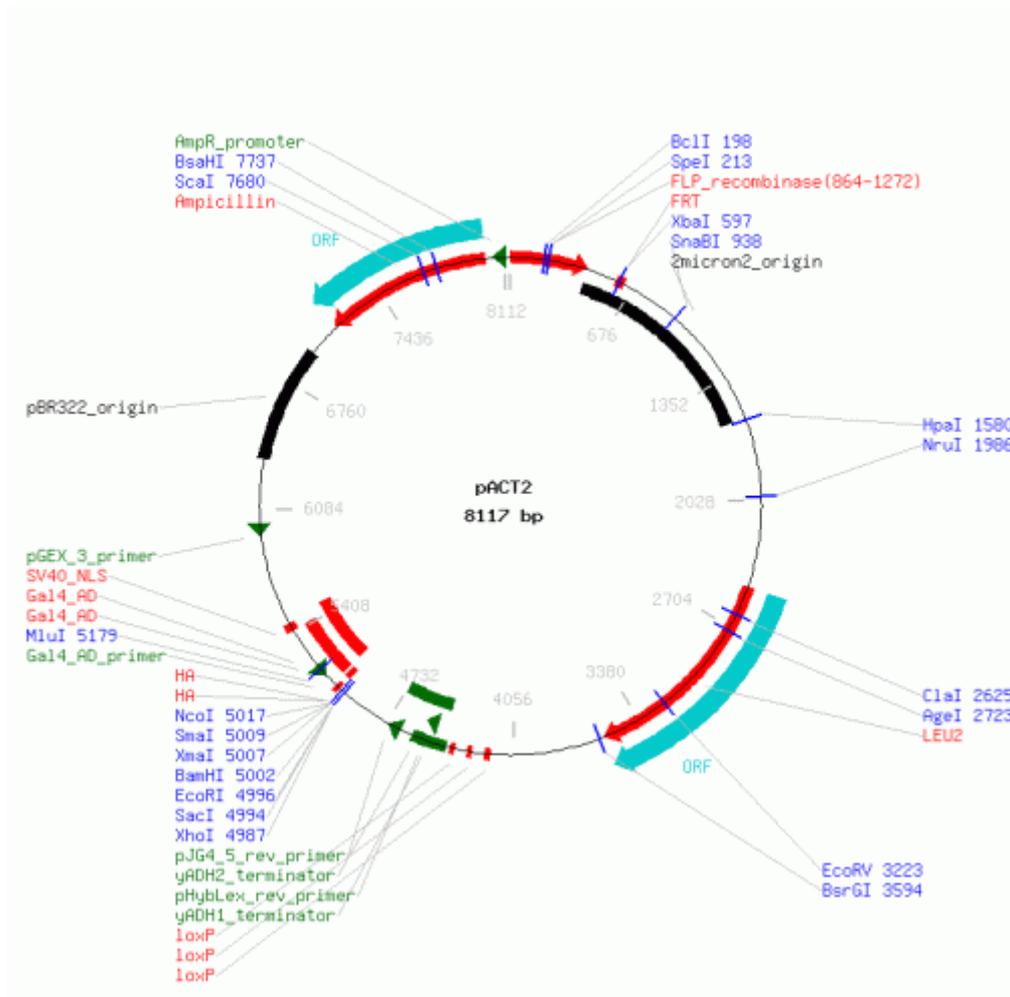


Figura 29: Vector pACT II.

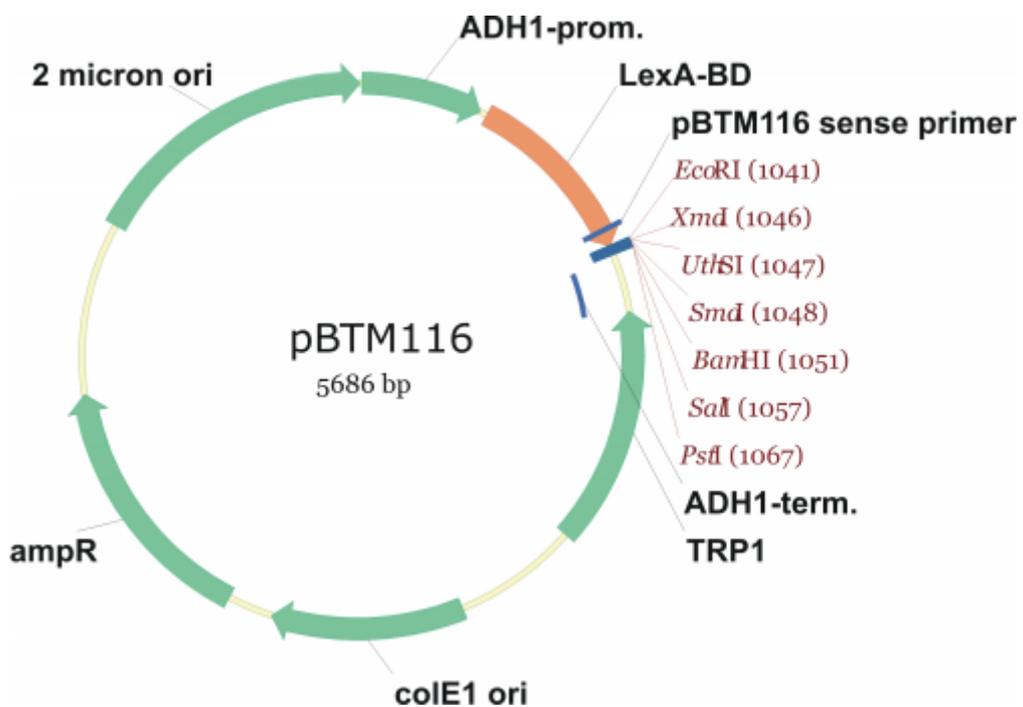


Figura 30: Vector pBTM 116.