



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la  
Salud y Biomedicina (CICSaB)**



Efecto del factor alfa en los niveles proteicos y distribución  
subcelular de la GTPasa Npa3 en la levadura *Saccharomyces  
cerevisiae*

**TESIS QUE PRESENTA**

Q.F.B Beatriz Elena González Contreras

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA  
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

**CO-DIRECTORES DE TESIS  
DR. ROBERTO SÁNCHEZ OLEA  
DRA. MÓNICA RAQUEL CALERA MEDINA**

Febrero 2023

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la Dirección del Dr. Roberto Sánchez Olea y de la Dra. Mónica Raquel Calera Medina. Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca no. 1084177 a Beatriz Elena González Contreras. Para la realización de este trabajo se contó con la aportación del proyecto de Ciencia Básica Conacyt no. A1-S-21070 (a RSO). También se agradece al Laboratorio Nacional de Ingeniería de la Materia Fuera de Equilibrio (LANIMFE) por el uso del microscopio de fluorescencia.

Tesis que presenta:

Q.F.B Beatriz Elena González Contreras

### **PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Roberto Sánchez Olea  
Dra. Mónica Raquel Calera Medina

ASESORA INTERNA

Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

ASESORA EXTERNA

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

### **JURADO**

Presidente de sinodales: Dra. Patricia Elizabeth Cossío Torres

Secretaria sinodal: Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

Sinodal: Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Sinodal suplente: Dra. Esther Layseca Espinosa

Febrero 2023



Efecto del factor alfa en los niveles proteicos y distribución subcelular de la GTPasa Npa3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. by Beatriz Elena González Contreras. is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

# **Efecto del factor alfa en los niveles proteicos y distribución subcelular de la GTPasa Npa3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Beatriz Elena González Contreras, Mónica R. Calera\*, Roberto Sánchez-Olea\*

Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Manuel Nava #6, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosí, SLP, México.

\* **Autores de correspondencia:** rsanchez@ifisica.uaslp.mx (R. Sánchez-Olea), mcalera@ifisica.uaslp.mx (M.R. Calera).

## RESUMEN

Al igual que en los eucariotas superiores, el ciclo celular de la levadura se divide en cuatro fases independientes: G1, S, G2 y M. Existen diferentes métodos que han sido utilizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para arrestar las células y liberarlas de manera sincrónica en diferentes etapas del ciclo celular. Uno de ellos es el uso de péptidos como, el factor  $\alpha$ , que permite arrestar las células en la fase G1, o el uso de fármacos, como el nocodazol, que bloquea a las células en la fase G2/M del ciclo celular, entre otros. El reinicio de la proliferación celular, después de la eliminación del factor  $\alpha$ , requiere de la activación de un programa transcripcional que involucra una gran cantidad de genes y la progresión por el punto de control "start". En esta fase la célula se compromete a un nuevo ciclo de división celular, lo que es seguido rápidamente por el inicio de la replicación del DNA, la formación de la yema y eventualmente por la formación del huso mitótico responsable de la segregación del material genético en las dos células hijas. Los resultados obtenidos por Alonso y colaboradores (2011), indican que una disminución en la expresión de Gpn1/Npa3 compromete la progresión del ciclo celular con un importante retraso en la fase S, en comparación con células que expresan la versión silvestre de esta proteína. Gpn1 forma parte de un grupo de GTPasas llamado Gpn, el cual incluye tres miembros: Gpn1, Gpn2 y Gp3. Las tres proteínas son esenciales y conservadas en todos los organismos eucariontes. La función mejor descrita para Gpn1 es participar en el transporte al núcleo de la RNA polimerasa II y favorecer su concentración en este organelo. Npa3 es el ortólogo en *Saccharomyces cerevisiae* de Gpn1 humana. En nuestro grupo de trabajo, Guerrero Serrano y colaboradores (2017) demostraron que la ausencia del extremo C-terminal de Npa3 (*npa3 $\Delta$ C*) en la cepa de *S. cerevisiae* Clal, impide el reinicio del ciclo celular después del arresto con el factor  $\alpha$  hasta 50 minutos posterior al retiro de este péptido en el cultivo, comparado con las células que expresan la versión silvestre de Npa3, las cuales rápidamente reinician la proliferación. Otro hallazgo importante fue que en células de *S. cerevisiae* arrestadas con el factor  $\alpha$  la fluorescencia de la proteína *npa3 $\Delta$ C*-GFP disminuyó drásticamente como resultado de la exposición de las células a este péptido durante 2 horas. Este efecto fue reversible y la fluorescencia se recuperó conforme pasó el tiempo después de lavarlo. Estos hallazgos sugieren que el reinicio de la proliferación celular después del arresto en G1 producido por el factor  $\alpha$  en las células de levadura *S. cerevisiae* se asocia con un aumento en la concentración de la proteína Npa3. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar en la cepa de *S. cerevisiae* BY4741, utilizada más comúnmente que la Clal, los niveles proteicos y la localización subcelular de la GTPasa Npa3 antes, durante y después de la liberación del arresto en el ciclo celular inducido por el factor  $\alpha$ . Se anticipa que el reinicio de la proliferación celular, después del arresto en G1 producido por el factor  $\alpha$ , se asocie con un aumento en los niveles proteicos y una posible acumulación nuclear de la GTPasa Npa3. Para determinar el reinicio del ciclo celular posterior al arresto en la fase G1 utilizando el factor  $\alpha$  en la cepa de *S. cerevisiae* BY4741, las células se arrestaron en presencia del factor  $\alpha$  a una

concentración final de 5-10  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas y se evaluó el cambio en la intensidad de fluorescencia mediante un curso temporal de 0-2 horas antes y posterior a la incubación con el factor  $\alpha$  por microscopía, en las células que expresaron la GTPasa silvestre (Npa3-GFP) y la versión carente del extremo C-terminal (*npa3 $\Delta$ C*-GFP). Nuestros resultados no mostraron cambios en la intensidad de fluorescencia de la proteína Npa3-GFP o *npa3 $\Delta$ C*-GFP antes o posterior al arresto del ciclo celular con el factor  $\alpha$  en ninguno de los tiempos evaluados. La localización subcelular de la GTPasa Npa3-GFP se identificó en el citoplasma en las células que expresaron la proteína silvestre. Estos resultados obtenidos en la cepa BY4741 contrastan con los obtenidos previamente en la cepa Clal, donde se observó esa disminución de la fluorescencia en la proteína *npa3 $\Delta$ C*-GFP después de arrestar las células con el factor  $\alpha$ . Es posible que estas diferencias tengan una relación directa con el fondo genético de las cepas utilizadas como modelo experimental.

## INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, a diferencia de la mayoría de los otros microorganismos, presentan un estado tanto haploide como diploide estable (Sherman, 2002). Durante el crecimiento vegetativo, las células diploides y haploides de *Saccharomyces cerevisiae* se dividen por gemación. Por lo tanto, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y la ploidía, las células de levadura tienen al menos cuatro destinos diferenciadores mutuamente excluyentes: crecimiento vegetativo, apareamiento (ciclo sexual), crecimiento de pseudohifas o esporulación (Wittenberg & La Valle, 2003).

Al igual que en los eucariotas superiores, el ciclo celular de la levadura se divide en cuatro fases independientes: G1, S, G2 y M. Las células de la fase G1 no tienen brotes y son más pequeñas que el promedio de las células en otras fases. La progresión del ciclo celular y el compromiso más allá del equivalente en levadura del punto de restricción (inicio) dependen del crecimiento hasta un tamaño celular crítico. La aparición de un pequeño brote señala la entrada en la fase S. Las yemas crecen significativamente con la progresión del ciclo celular. La etapa del ciclo celular se puede inferir comparando el tamaño de la yema con la célula madre (Smith et al., 2017).

Las células que participan en un ciclo sexual deben poseer la capacidad de diferenciarse en gametos. El apareamiento productivo implica una célula haploide de cada uno de los dos tipos de apareamiento,  $\alpha$  y  $a$ ; cada uno expresando información distinta del locus MAT, que codifica los reguladores transcripcionales que determinan la identidad del tipo celular (Wittenberg & La Valle, 2003). Las células MAT $\alpha$  secretan la feromona llamada factor  $\alpha$  que es un péptido de 13 residuos (WHWLQLKPGQPMY) y responden al factor  $a$ . Las células MAT $a$  secretan el factor  $a$ , un péptido de 12 residuos (YIIKGVFWD PAC) y responden al factor  $\alpha$ . Cuando una célula de levadura es estimulada por la feromona secretada por una célula cercana del tipo celular opuesto, presenta una serie de cambios fisiológicos en preparación para el apareamiento. Estos incluyen cambios significativos en la expresión de alrededor de 200 genes (alrededor del 3% del genoma), las células hacen una pausa en la fase G1 del ciclo celular y tienen un crecimiento orientado hacia la pareja de apareamiento (Bardwell, 2005).

El ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae* se puede bloquear en las distintas fases utilizando las feromonas de apareamiento, mutantes sensibles a temperatura o fármacos (Smith et al., 2017). Las células tratadas con la feromona de apareamiento factor  $\alpha$  se arrestan en la fase G1 y adoptan una morfología particular en forma de pera llamada "shmoo". La formación de shmoo es un claro indicador de que las células han sido detenidas en G1, lo cual es visible al analizar las células por microscopía (Juanes, 2017). Cabe mencionar que el arresto inducido por el factor  $\alpha$  es reversible. El reinicio de la proliferación celular, después de la eliminación del factor  $\alpha$  requiere de la activación de un programa transcripcional que involucra a un

gran número de genes, entre ellos, los genes de las ciclinas de G1 *CLN1* y *CLN2*. Los complejos Cln-Cdc28 activan el punto “inicio” que es el punto donde la célula decide si iniciar o no un nuevo ciclo de división celular, lo que permite el comienzo de la gemación y la duplicación del centrosoma, seguida por la replicación del ADN (Juanes, 2017).

Existe evidencia sobre algunas proteínas que son necesarias para la progresión del ciclo celular en la levadura *S. cerevisiae* como la proteína Esa1. En células que expresan una versión no funcional de esta proteína y que se arrestan en la fase G1 utilizando el factor  $\alpha$ , se observa que no progresan a la fase S como la cepa parental. Esto indica que se requiere la actividad de la proteína Esa1 para la reanudación de la progresión del ciclo celular después del arresto con el factor  $\alpha$  (Early et al., 2004).

Otra proteína involucrada en la progresión del ciclo celular es Gpn1. Se ha demostrado que la disminución en la expresión de esta proteína en *S. cerevisiae* impide la progresión de la fase S del ciclo celular. Cuando disminuye la expresión de *GPN1*, la mayoría de las células presentan un brote inusualmente grande y muy pocas células avanzan en el ciclo celular después de ser arrestadas en la fase G2/M utilizando nocodazol (Alonso et al., 2011).

Gpn1 pertenece a la familia de las GTPasas GPN, la cual está integrada por tres proteínas que contienen los cinco motivos lineales cortos característicos de las GTPasas, denominados G1 a G5; los cuales son indispensables para la unión de los nucleótidos de guanina y la hidrólisis del GTP. Estas GTPasas reciben su nombre por la presencia de un tripéptido invariable de Glicina (G) – Prolina (P) – Asparagina (N) (Gras et al., 2007). La familia está integrada por Gpn1, Gpn2 y Gpn3, cuyas funciones se conocen poco, pero se ha demostrado que las tres proteínas son esenciales para la viabilidad celular (Minaker et al., 2013). Npa3 es el ortólogo en *S. cerevisiae* de Gpn1 humana (Staresincic et al., 2011) y la función mejor descrita de esta proteína es su participación en el transporte al núcleo de la RNA polimerasa II (RNAPII), ya que una disminución en la función de Npa3 causa la localización de Rpb1, la subunidad de mayor tamaño de la RNAPII, en el citoplasma (Forget et al., 2010).

Algunas especies de arqueas contienen en su genoma un gen codificante para una sola proteína Gpn, la cual es más pequeña que la Gpn1 eucariota. Mientras que la única proteína Gpn en arqueas contiene solo el dominio de GTPasa, Gpn1 contiene un segmento adicional de aproximadamente 100 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. Esta extensión C-terminal está estrictamente conservada en la Gpn1 de todas las células eucariontes y se ha propuesto que le confiere propiedades adicionales o regulatorias al dominio de GTPasa (Guerrero Serrano et al., 2017).

Aunque Gpn1 se localiza en el citoplasma, se importa y exporta desde el núcleo celular. Se ha demostrado que la secuencia de exportación nuclear (NES) funcional de Gpn1 en células humanas se encuentra entre los aminoácidos 292-LERLRKDMGSVAL-304, dentro de la región C-terminal de Gpn1. Debido a que la

NES de Gpn1 es funcionalmente importante y a que esta secuencia se conserva desde levadura hasta los humanos, es posible que el transporte nucleocitoplasmático sea crítico para la función de Gpn1 en células eucariotas (Reyes-Pardo et al., 2012).

Recientemente en nuestro grupo de laboratorio se demostró que la región carboxilo terminal de Npa3 es prescindible para la proliferación celular en *S. cerevisiae*. Una cepa que expresa una versión de Npa3 sin la secuencia del extremo C-terminal (*npa3ΔC*) puede sobrevivir y proliferar de forma indistinguible de la cepa control que expresa la proteína completa (Guerrero Serrano et al., 2017).

Interesantemente, las células que expresan *npa3ΔC* también mostraron un marcado aumento en el tamaño celular, junto con un retraso en la salida de la mitosis y una hipersensibilidad al fungicida de la familia de los benzimidazoles, benomilo. Además, en esta misma cepa de *S. cerevisiae* que expresa *npa3ΔC*, la delección del gen *BIK1*, una proteína de unión a los microtúbulos que regula de forma crítica la interacción entre los microtúbulos y el cinetocoro conduce a la letalidad sintética de las células. En este modelo, la proteína de fusión *npa3ΔC*-GFP se acumuló fuertemente en el núcleo celular, aunque también estuvo presente en el citoplasma (Guerrero Serrano et al., 2017).

Una observación interesante en experimentos preliminares fue que la ausencia del extremo C-terminal de Npa3 impidió el reinicio del ciclo celular posterior al arresto con el factor  $\alpha$  (Guerrero Serrano, 2017). En nuestro grupo de trabajo se encontró que, en contraste con la cepa control, la cepa que expresa *npa3ΔC* no inicia el proceso de síntesis de ADN después de la liberación de un arresto en la fase G1 producido por el factor  $\alpha$  determinado mediante la incorporación del análogo de timina BdrU. Asimismo, las células que expresan Npa3 silvestre reinician la proliferación después de eliminar el factor  $\alpha$ ; sin embargo, las células que expresan *npa3ΔC* se mantienen en arresto hasta por 50 minutos posterior a la eliminación del factor  $\alpha$  del medio de cultivo (Guerrero Serrano, 2017).

Otro hallazgo importante en estos experimentos fue que la intensidad de fluorescencia de la proteína *npa3ΔC*-GFP disminuyó notablemente cuando se expusieron a las células al factor  $\alpha$  durante 2 horas. La intensidad de fluorescencia se recuperó a valores normales después de lavar el factor  $\alpha$ . Este efecto puede explicarse por 1) la proteína existente en la célula se degrada, 2) la proteína cambia de conformación y/o 3) el gen que codifica para Npa3 deja de transcribirse, o bien, una combinación de estos factores.

La GTPasa Npa3 es necesaria para el reinicio de la proliferación en la levadura *S. cerevisiae* después de un arresto al final de la fase G1 del ciclo celular inducido por exposición al factor  $\alpha$ , pero se desconoce cómo se regula su función y si ésta se lleva a cabo en el citoplasma o en el núcleo celular. Además, el reinicio de la proliferación celular después de un arresto causado por el factor  $\alpha$  involucra la

activación de un programa transcripcional de genes y la entrada inmediata de las células a la fase S. Dado que la síntesis de DNA es un proceso que ocurre en el núcleo celular, es probable que Npa3 se movilice del citoplasma a este organelo para contribuir de alguna manera al inicio y progresión de la fase S. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si los niveles proteicos de la GTPasa Npa3 varían en las células de levadura *S. cerevisiae* antes y después de arrestar las células en G1 con el factor  $\alpha$  y también si existe una acumulación nuclear de esta proteína después de la eliminación del factor  $\alpha$ . Esto se evaluó en células de levadura con fondo genético BY4741, la cual es una cepa de levadura en la que los genes que se utilizan como marcador de selección en la mayoría de los vectores de uso común fueron eliminados sin afectar la expresión de genes adyacentes (Brachmann et al., 1998).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MEDIOS DE CULTIVO**

#### **Medio de cultivo para proliferar la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

**MSC-URA+NAT.** Medio sintético completo preparado con base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB 0.17 %), una mezcla suplementaria de aminoácidos drop-out menos uracilo al 0.2%, glutamato ácido monosódico (MGS 1g/L), glucosa al 2%, adicionando el antibiótico nourseotricina (clonNAT 100  $\mu$ g/ml, Werner BioAgents, Jena, Alemania). El medio sólido se preparó con agar al 2%. Es un medio para cepas de levadura que expresan un plásmido que contiene como marcador de selección *URA3*.

**MSC-URA-TRP.** Medio sintético completo preparado con base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB 0.67 %), una mezcla suplementaria de aminoácidos drop-out menos uracilo y menos triptófano al 0.2%, glucosa al 2%. Es un medio para cepas de levadura que expresan un plásmido que contiene como marcador de selección *URA3*. Además, el triptófano se eliminó del medio para evitar el ruido de fondo generado por su autofluorescencia.

**MSC-LEU+NAT.** Medio sintético completo preparado con base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB 0.17 %), una mezcla suplementaria de aminoácidos drop-out menos leucina al 0.2%, glutamato ácido monosódico (MGS 1g/L), glucosa al 2%, adicionando el antibiótico nourseotricina (clonNAT 100  $\mu$ g/ml, Werner BioAgents, Jena, Alemania). El medio sólido se preparó con agar al 2%. Es un medio para cepas de levadura que expresan un plásmido que contiene como marcador de selección *LEU2*.

**MSC-LEU-URA+NAT.** Medio sintético completo preparado con base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB 0.17 %), una mezcla suplementaria de aminoácidos drop-out menos leucina y uracilo al 0.2%, glutamato ácido monosódico (MGS 1g/L), glucosa al 2%, adicionando el antibiótico nourseotricina (clonNAT 100 µg/ml, Werner BioAgents, Jena, Alemania). El medio sólido se preparó con agar al 2%. Es un medio para cepas de levadura que expresan dos plásmidos, uno que contiene como marcador de selección *URA3* y otro con *LEU2*.

**Medio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose).** Medio líquido con extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 2%. Para preparar el medio sólido se añadió agar a una concentración final de 2%. Es un medio para la proliferación y el mantenimiento de la levadura.

**Medio con ácido 5-fluoroorótico (5FOA).** Medio preparado con base nitrogenada de levadura con aminoácidos (YNB 0.67 %), glucosa al 2%, una mezcla suplementaria de aminoácidos drop-out al 0.2%, y ácido 5-fluoroorótico a una concentración de 0.1%, además de agar al 2%. Para la selección, las células se cultivaron en un medio que contenía ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), que en presencia del gen *URA3* funcional se convierte en un compuesto tóxico llamado 5-fluorouracilo que provoca la muerte celular (Moldrup et al., 2012).

## CEPAS DE LEVADURA

**Cepa Parental.** Cepa de *S. cerevisiae* parental MATa con fondo genético BY4741 (Brachmann et al., 1998).

**Cepa Npa3WT.** Cepa de *S. cerevisiae* BYMG15 MATa con fondo genético BY4741 que expresa la versión silvestre de Npa3-GFP desde el plásmido pRS416 con marcador de selección *URA3*, ya que el gen endógeno de *NPA3* fue inactivado por recombinación homóloga. Cepa creada por el MC. Martín Antonio Mora García.

**Cepa *npa3ΔC-GFP* y *npa3ΔC*.** Cepa de *S. cerevisiae* BYMG32 MATa con fondo genético BY4741 que expresa la versión mutante *npa3ΔC-GFP* desde el plásmido pRS416 con marcador de selección *URA3* y *npa3ΔC* desde el plásmido pRS315 con marcador de selección *LEU2*, y el gen endógeno de *NPA3* fue inactivado por recombinación homóloga. Cepa creada por el MC. Martín Antonio Mora García a la cual se le realizó el ensayo de pérdida de plásmido para mantener sólo la versión que expresa la proteína de fusión *npa3ΔC-GFP*.

**Cepa *npa3ΔC-GFP*.** Cepa de *S. cerevisiae* BYEG01 MATa con fondo genético BY4741 que expresa la versión mutante *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido pRS416 con marcador de selección *URA3*. El gen endógeno de *NPA3* fue inactivado por recombinación homóloga. Cepa creada por la QFB. Beatriz Elena González Contreras.

## **Crecimiento de las células de levadura.**

Las cepas de levaduras *S. cerevisiae* se incubaron durante aproximadamente 24 horas a 30 °C. Se realizó un subcultivo en medio de selección de cada cepa ajustando previamente densidad óptica de la suspensión celular a 0.2 (~  $2 \times 10^6$  células/ml) por 4 horas aproximadamente a 30 °C y hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento determinada por el valor de densidad óptica de 0.4 o 0.6 (~  $4-6 \times 10^6$  células/ml) según fuera el caso. Para crecer las células de levadura en medio sólido se incubaron durante 48 horas.

## **Tinción con DAPI.**

En los experimentos en los que se determinó la localización celular de Npa3-GFP en las células de *S. cerevisiae* el núcleo de la célula se visualizó con DAPI, el cual es un marcador fluorescente que se une al ADN de doble cadena, con preferencia por los grupos de adenina-timina (Chazotte, 2011). Se inocularon 5 ml del medio de selección con las células de levadura *S. cerevisiae* y se incubaron durante 24 horas aproximadamente a 30 °C. Se preparó un subcultivo y se permitió el crecimiento de las células hasta alcanzar la fase logarítmica ( $OD_{600nm} = 0.6 \sim 6 \times 10^6$  células/ml). Posteriormente, se realizó la estandarización de la tinción evaluando los tiempos 15, 30 y 45 minutos de exposición con el marcador, a una concentración final de 2.5 µg/ml. Enseguida se realizaron tres lavados con 1 ml medio líquido MSC-URA-TRP a 10 000 rpm (1344 xg) durante 3 minutos para eliminar el exceso del colorante. Al final se resuspendieron las células en 200 µL de medio MSC-URA-TRP y una alícuota de 3 µL se colocó en un portaobjetos para observar las células vivas en un microscopio de fluorescencia.

## **Arresto de las células de levadura.**

Una vez que se estandarizó el método para la tinción con DAPI, se llevó a cabo una búsqueda en la literatura de las condiciones necesarias para el arresto en la fase G1 del ciclo celular utilizando el factor  $\alpha$ . A partir de los resultados de esta búsqueda se concluyó que la concentración de factor  $\alpha$  utilizada más frecuentemente se encontraba en un intervalo de 5 a 10 µg/ml, a una temperatura de incubación de 30 °C y con un tiempo de incubación de 2 horas en la mayoría de los casos (Early et al., 2004; Angeles Juanes, 2017; Rosebrock, 2017; Smith et al., 2017). Tomando en cuenta estos datos, a partir del stock de glicerol de la cepa que expresa Npa3-GFP o *npa3ΔC*-GFP se tomó una pequeña cantidad con una puntilla estéril y se cultivaron en 5 ml de medio líquido MSC-URA+NAT durante aproximadamente 24 horas en agitación a 200 rpm a 30 °C, hasta llevarlos a saturación. Se preparó un subcultivo en medio MSC-URA-TRP comenzando en una  $OD_{600nm}$  de 0.2 (~  $2 \times 10^6$  células/ml) hasta llevarlo a una  $OD_{600nm}$  de 0.4 en la fase logarítmica temprana (~  $4 \times 10^6$  células/ml). A este cultivo se le añadió el factor  $\alpha$  a las concentraciones finales de 5, 7.5 y 10 µg/ml y se observaron las células vivas en el microscopio de fluorescencia (Axio Observer, Zeiss).

### **Liberación del arresto inducido por el factor $\alpha$ .**

A partir del stock de glicerol de la cepa que expresa Npa3-GFP o *npa3 $\Delta$ C*-GFP se tomó una pequeña cantidad con una puntilla estéril y se cultivaron en 5 ml de medio líquido MSC-URA+NAT a 30 °C por aproximadamente 24 hrs en agitación a 200 rpm hasta llevarlos a saturación. De este cultivo se preparó un subcultivo en medio MSC-URA-TRP ajustando a una OD<sub>600nm</sub> de 0.2 (~ 2x10<sup>6</sup> células) hasta llevarlo a una OD<sub>600nm</sub> de 0.4, en la fase logarítmica temprana (~ 4x10<sup>6</sup> células). A este cultivo se le añadió el factor  $\alpha$  a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml durante 2 horas para arrestar a las células en la fase G1 del ciclo celular. Posteriormente se realizaron dos lavados con 1 ml del medio líquido MSC-URA-TRP previamente calentado a 30 °C y se centrifugó a 3000 rpm (121 xg) durante 5 minutos. Al final las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de medio MSC-URA-TRP y se tomaron 3  $\mu$ L para observar las células vivas en el microscopio de fluorescencia (Axio Observer, Zeiss).

### **Visualización de las células de levadura en el microscopio de fluorescencia.**

A partir del stock de glicerol de la cepa Npa3-GFP o *npa3 $\Delta$ C*-GFP se tomó una pequeña cantidad con una puntilla estéril y se permitió el crecimiento en 5 ml de medio líquido MSC-URA+NAT a 30 °C por aproximadamente 24 horas en agitación a 200 rpm hasta llevarlos a saturación. De este cultivo se preparó un subcultivo en medio MSC –URA-TRP comenzando en una OD<sub>600nm</sub> de 0.2 (~ 2x10<sup>6</sup> células) hasta llevarlo a una OD<sub>600nm</sub> de 0.4, en la fase logarítmica temprana (~ 4x10<sup>6</sup> células) y las células se arrestaron con el factor  $\alpha$  a las concentraciones finales de 5, 7.5 y 10  $\mu$ g/ml. De ese subcultivo se tomaron directamente 3  $\mu$ L, se colocaron sobre un portaobjetos y se evaluó la fluorescencia por microscopía (Axio Observer, Zeiss). En algunos casos el colorante DAPI se agregó a las células vivas a una concentración final de 2.5  $\mu$ g/ml para identificar el núcleo.

### **Crecimiento de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que expresan *npa3 $\Delta$ C*-GFP desde un plásmido con *URA3* y *npa3 $\Delta$ C* desde un plásmido con *LEU2*.**

Cuando se realizaron los experimentos en células que expresan la proteína completa de Npa3-GFP no cambió la fluorescencia, por lo tanto, se decidió determinar si sucede lo mismo en las células que expresan *npa3 $\Delta$ C*-GFP en un fondo genético BY4741. Aunque en el laboratorio no se contaba con esta cepa, sí se tenían células que expresaban simultáneamente tanto *npa3 $\Delta$ C*-GFP desde un plásmido pRS416-*URA3*, así como otra versión de *npa3 $\Delta$ C* sin etiqueta desde un plásmido pRS315-*LEU2*, por lo que fue necesario eliminar el plásmido que contenía *npa3 $\Delta$ C* sin etiqueta por medio del ensayo de pérdida de plásmido y seleccionar aquellas células que retuvieran solo el plásmido con *npa3 $\Delta$ C*-GFP. Para ello se llevó a cabo el ensayo de pérdida de plásmido.

### **Ensayo de pérdida de plásmido.**

A partir del stock de glicerol de la cepa de levadura *S. cerevisiae* que expresa tanto *npa3ΔC* sin etiqueta desde el plásmido pRS315-*LEU2* como *npa3ΔC*-GFP desde el plásmido pRS416-*URA3* se tomó una pequeña cantidad con una puntilla estéril y se permitió el crecimiento en 5 ml de medio líquido MSC-LEU-URA+NAT a 30 °C por aproximadamente 24 horas en agitación a 200 rpm hasta llevarlos a saturación. De este cultivo se tomaron 5 μL y se añadieron a un tubo nuevo con MSC-URA+NAT, durante 24 horas. A partir del cultivo anterior, se realizó un subcultivo en las mismas condiciones y después de 24 horas de incubación, se tomó una alícuota de 1 μL y se realizó una dilución 1:1000 en agua estéril. Enseguida, se realizaron 2 diluciones seriadas 1:10 en agua estéril y finalmente se sembraron 200 μL de la última dilución en medio MSC-URA+NAT durante 48 horas. Posteriormente la placa de medio MSC-URA+NAT se replicó en los siguientes medios y en el orden indicado: MSC-LEU-NAT, MSC-LEU-URA+ NAT, 5FOA Y MSC-URA+NAT durante 24 horas. Las colonias de células que proliferaron se resebraron en medio MSC-URA+NAT para obtener colonias individuales, que enseguida se cultivaron en medio líquido MSC-URA+NAT y se criopreservaron a -70°C con glicerol al 25%.

### **Ensayo de dilución por puntos.**

La cepa parental BY4741, cepa que expresa *npa3ΔC* desde un plásmido con pRS315-*LEU2*, la cepa que expresan ambas versiones de Npa3: *npa3ΔC* desde el plásmido pRS315-*LEU2*, así como *npa3ΔC*-GFP desde un plásmido pRS416-*URA3*, y la cepa que sólo expresa *npa3ΔC*-GFP desde el plásmido pRS416-*URA3*, se cultivaron en 5 ml de medio líquido YPD, MSC-LEU+NAT, MSC-LEU-URA+NAT y MSC-URA+NAT respectivamente, durante 24 horas a 30 °C. Enseguida, 1.5 ml del cultivo se concentraron a 13,000 rpm (2271 xg) por 30 min y se resuspendió el precipitado de células en 1 ml de agua estéril. Se determinó la concentración de células a 600nm y se ajustó a 0.4 (~ 4x10<sup>6</sup> células) utilizando agua estéril.

Se colocaron 220 μL de la suspensión de células anterior y se realizaron 4 diluciones seriadas 1:10 en pozos de multiplacas de 96 pozos. Se tomaron 20 μL de cada muestra y se cultivaron en los medios MSC-LEU-URA, MSC-LEU, MSC-URA y YPD por 48 horas a 30 °C.

### **Conteo de células con la proyección denominada “shmoo”.**

Se contaron 120-150 células aproximadamente y se determinó cuántas de éstas tenían la prolongación denominada shmoo. Con estos datos se obtuvo el porcentaje de arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular con el factor α en tres experimentos independientes.

## **RESULTADOS**

### **Tinción del núcleo con el marcador DAPI en células de levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP desde un plásmido con *URA3* y observación al microscopio.**

En la Figura 1 se muestra la distribución del colorante DAPI en las células de la Levadura *S. cerevisiae*. Durante los primeros 15 minutos, el colorante DAPI no permea completamente a las células y se observa principalmente en la pared celular. A los 30 minutos los núcleos se tiñeron de azul por la presencia de DAPI y a los 45 minutos el colorante DAPI se encuentra heterogéneamente distribuido en el núcleo y citosol de las células, lo que dificultó distinguir correctamente el núcleo. Para los experimentos posteriores se utilizaron 30 minutos de incubación con el colorante DAPI.

### **Arresto con el factor $\alpha$ en la fase G1 del ciclo celular de células de levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP desde un plásmido con *URA3*.**

Como se muestra en la Figura 2, una fracción de las células de *S. cerevisiae* adquirieron la morfología clásica del shmoo, donde el crecimiento polarizado cambia la forma de la célula de esferoide a forma de pera (Aguilar et al., 2010) en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  del factor  $\alpha$  a los 120 min. El porcentaje de células en arresto en G1 identificadas por la proyección Shmoo fue únicamente del 30%. Debido a este bajo porcentaje de arresto, se incrementó la concentración del factor  $\alpha$  a 7.5  $\mu\text{g/ml}$  y a 10  $\mu\text{g/ml}$ , y los tiempos de incubación se extendieron a 2, 2.5 y 3 horas. En la Figura 3 se muestran las células de levadura a los diferentes tiempos de incubación. Como se puede observar, la fluorescencia de Npa3-GFP no cambió durante el arresto inducido por el factor  $\alpha$  a las condiciones y tiempos de incubación evaluados. Además, tampoco hubo cambio en la localización subcelular de Npa3-GFP, puesto que esta proteína se localizó exclusivamente en el citoplasma. Cabe mencionar que a las 2 horas de incubación con el factor  $\alpha$  se determinó una mayor proporción de células arrestadas para ambas concentraciones probadas, siendo a 10  $\mu\text{g/ml}$  en donde se obtuvo el porcentaje mayor, correspondiendo al 67% (n=3) de las células, mientras que a la concentración de 7.5  $\mu\text{g/ml}$ , este valor correspondió a un 45 % (n=3). Estos valores se definieron evaluando el porcentaje de las células que mostraban la proyección denominada shmoo.

### **Curso temporal después de lavar el factor $\alpha$ en células de levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP desde un plásmido con *URA3*.**

La primera muestra que se tomó fue a los 40 minutos y después de ésta se separaron células cada 20 minutos durante 120 minutos. Los resultados se encuentran en la Figura 4, donde se determinó al comparar la fluorescencia en las imágenes tomadas que a ninguno de los tiempos evaluados cambió la intensidad o la localización subcelular de la fluorescencia de la proteína Npa3-GFP, se encuentra sólo en el citoplasma.

### **Ensayo de pérdida de plásmido de una cepa de levadura *S. cerevisiae* que expresa *npa3ΔC* desde un plásmido con *LEU2* y *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*.**

Con el ensayo de pérdida de plásmido se obtuvo la cepa que expresa únicamente *npa3ΔC-GFP* (Figura 5). Los resultados se muestran en la Figura 6, donde podemos observar que no hubo proliferación celular en los medios MSC-LEU-URA+NAT, MSC-LEU+NAT, debido a que ya sólo conserva la proteína de fusión *npa3ΔC-GFP*, en un plásmido con *URA3* y, por lo tanto, no pueden sintetizar el aminoácido leucina. Tampoco se observaron colonias en el medio 5FOA pues al tener el marcador de selección *URA3* funcional, convierte el ácido 5-fluorouracilo en un compuesto tóxico llamado 5-fluorouracilo que provoca la muerte celular. Únicamente hubo proliferación en el medio MSC-URA+NAT porque las células fueron capaces de sintetizar el uracilo faltante en el medio. Fue necesario sembrar en medio MSC-URA+NAT para obtener colonias individuales (Figura 7), se utilizó una cepa diferente que expresa un plásmido con *URA3* como control positivo y una cepa que expresa un plásmido *LEU2* como control negativo.

### **Ensayo de dilución por puntos para comprobación de las tres colonias obtenidas en el ensayo de pérdida de plásmido.**

La Figura 8 muestra que la cepa BY4741 crece sólo en el medio YPD pues no tiene plásmidos que compensen la falta de los nutrientes leucina y uracilo. La cepa que expresa *npa3ΔC* desde un plásmido *LEU2* crece en el medio MSC-LEU y en YPD. La cepa que tiene los dos plásmidos *npa3ΔC-GFP* con marcador de selección *URA3* y *npa3ΔC* con marcador *LEU2* crece en todos los medios de cultivo pues puede compensar la falta de uracilo y leucina en el medio. Por último, la cepa que expresa únicamente *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*, crece sólo en MSC-URA y YPD, porque tiene el plásmido necesario para sintetizar el uracilo faltante en el medio.

### **Observación al microscopio de las células de *S. cerevisiae* que expresan *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*.**

Se utilizó la cepa de levadura *S. cerevisiae* que expresa únicamente la proteína *npa3ΔC-GFP* y que tiene una delección de la copia del gen *NPA3* en el cromosoma. Como se muestra en la Figura 9, *npa3ΔC-GFP* se acumuló principalmente en el núcleo y también se localizó en el citoplasma como se había reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación (Guerrero Serrano et al., 2017).

### **Arresto con el factor $\alpha$ en la fase G1 del ciclo celular de células de levadura *S. cerevisiae* que expresan *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*.**

Como se muestra en la Figura 10, la intensidad de fluorescencia de *npa3ΔC-GFP* permaneció constante antes y durante el arresto con el factor  $\alpha$ , la cual se determinó al observar que la fluorescencia se mantuvo igual en todas las imágenes mostradas

de las células que fueron expuestas al factor  $\alpha$  cuando se comparan con la condición control sin añadir el factor  $\alpha$ .

### **Curso temporal después de lavar el factor $\alpha$ en células de levadura *S. cerevisiae* que expresan *npa3 $\Delta$ C-GFP* desde un plásmido con *URA3*.**

Los resultados se encuentran en la Figura 11, donde se determinó que a ninguno de los tiempos evaluados hubo algún cambio en la intensidad de fluorescencia de *npa3 $\Delta$ C-GFP* en células de levadura después de lavar el factor  $\alpha$ .

## **DISCUSIÓN**

Estudios previos han demostrado que la GTPasa Gpn1 interacciona con la RNA polimerasa II (RNAPII) y que es necesaria para la localización nuclear de esta enzima (Forget et al., 2010). Aunque Gpn1 se localiza en el citoplasma, se importa y exporta desde el núcleo celular. Se ha demostrado que la secuencia de exportación nuclear (NES) funcional de Gpn1 en células humanas se encuentra dentro de la región C-terminal, la cual corresponde a una secuencia conservada desde la levadura hasta el humano y que le confieren una relevancia funcional pues la presencia de una NES es tanto necesaria como suficiente para la exportación nuclear y dota a las células eucariotas de un mecanismo molecular para controlar eficazmente la distribución subcelular y la función de esta GTPasa esencial (Reyes-Pardo et al., 2012).

Interesantemente, Npa3 cuenta con una posible NES en la región C-terminal de la proteína. Aunque la proteína completa Npa3-GFP se localiza exclusivamente en el citoplasma, la eliminación de todo el extremo C-terminal en *npa3 $\Delta$ C-GFP* resultó en una acumulación de la proteína en el núcleo celular. Dado que esta extensión del C-terminal no se encuentra en arqueas, pero está conservada en todas las células eucariotas, se ha encontrado que es fundamental para la exportación nuclear de Gpn1 (e indirectamente, para la fosfatasa Rtr1 de CTD RNAPII). regulación del tamaño, progresión mitótica y función de los microtúbulos (Guerrero Serrano et al., 2017).

Además, la ausencia del extremo C-terminal de Npa3 impide el reinicio del ciclo celular posterior al arresto con el factor  $\alpha$ . En un ensayo realizado en mi equipo de laboratorio por Guerrero-Serrano y colaboradores (2017), se encontró que la cepa que expresa *npa3 $\Delta$ C* no inicia el proceso de síntesis de ADN cuando se arrestan las células en la fase G1 del ciclo celular utilizando el factor  $\alpha$ , por lo tanto, se afecta la progresión del ciclo celular, contrario a la cepa que expresa la versión silvestre de Npa3, que después de arrestar a las células, se recuperan adecuadamente y continúan su ciclo celular de manera normal. También una observación interesante fue que disminuyó la fluorescencia de *npa3 $\Delta$ C-GFP* en células de *S. cerevisiae* con

fondo genético Clal arrestadas con el factor  $\alpha$  y ésta se recuperó conforme pasa el tiempo después de lavar el factor  $\alpha$ .

Las observaciones anteriores no constituían el objetivo central del trabajo de tesis doctoral de Gehenna Guerrero, por lo que en este trabajo abordé de forma sistemática los experimentos necesarios para investigar la reproducibilidad de estos hallazgos, pero en una cepa de levadura de *S. cerevisiae* con fondo genético BY4741. En el presente trabajo se investigó si la fluorescencia de Npa3-GFP disminuía en las células de levadura al ser arrestadas con el factor  $\alpha$  a las concentraciones finales de 5, 7.5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  y si esta proteína adquiría una localización específica después de lavar el factor  $\alpha$ , lo cual fue evaluado por medio de un curso temporal tomando muestras cada 20 minutos durante 2 horas después del lavado. En los resultados obtenidos no se observó ningún cambio en la intensidad de fluorescencia ni en la localización subcelular de Npa3-GFP en las células de levadura a ninguna de las concentraciones utilizadas del factor  $\alpha$  y en ninguno de los tiempos evaluados. Dado que no obtuvimos los resultados esperados con la proteína completa y que en los antecedentes de este proyecto se había trabajado con la proteína *npa3 $\Delta$ C-GFP*, se decidió determinar que sucedía en células que expresaban *npa3 $\Delta$ C-GFP* con un fondo genético BY4741, que, aunque es diferente al que se utilizó en los antecedentes se usó la misma proteína con el C-terminal truncado. Se realizó de esta manera ya que en el laboratorio ya no se contaba con la cepa Clal que se utilizó anteriormente, además la cepa BY4741 es una cepa ampliamente utilizada en los experimentos, ya que en esta cepa de levadura los genes que se utilizan como marcador de selección en la mayoría de los vectores de uso común fueron eliminados sin afectar la expresión de genes adyacentes (Brachmann et al., 1998). Para ello fue necesario obtener la cepa que solo expresara la versión trunca de Npa3 con GFP para tener las condiciones lo más parecidas a lo que se había hecho anteriormente. Esta cepa se obtuvo utilizando el ensayo de pérdida de plásmido y posteriormente se arrestó con el factor  $\alpha$ . Como resultados se obtuvo que no se lograron repetir los hallazgos observados anteriormente pues tampoco disminuyó la fluorescencia de *npa3 $\Delta$ C-GFP* a ninguno de los tiempos evaluados, como se esperaba con base en los antecedentes descritos. En los siguientes párrafos se comenta contrastando con la literatura cuáles pueden ser las razones que explican nuestros resultados.

Proponemos que la discrepancia en los resultados puede ser debido a que el fondo genético es diferente en ambas cepas. Los experimentos previos se realizaron en la cepa de *S. cerevisiae* Clal mientras que todos los experimentos realizados en el presente estudio se llevaron a cabo en la cepa BY4741.

La literatura nos dice que puede haber diferentes formas de genes por cada especie. La combinación de todas las versiones de todos los genes de una población determinada se llama fondo genético. El fondo genético no se mantiene igual. Con el transcurso de generaciones pueden ocurrir cambios menores en la cantidad de cada tipo de gen debido a diversos procesos. Se puede definir el fondo genético como el genotipo de todos los demás genes relacionados que pueden interactuar con el gen de interés y, por lo tanto, influyen potencialmente en el fenotipo específico (Yoshiki & Moriwaki, 2006).

El funcionamiento celular adecuado depende de redes de proteínas que interactúan física y funcionalmente para llevar a cabo procesos fisiológicos. Por lo tanto, parece lógico que el impacto de la variación de secuencia en una proteína pueda estar significativamente influenciado por variantes genéticas en otros loci en un genoma (Sardi & Gasch, 2018). Por lo tanto, las consecuencias fenotípicas de una mutación dada pueden variar entre individuos. Este llamado “efecto de fondo” se observa ampliamente, desde la aptitud mutante de variantes de pérdida de función en organismos modelo hasta la penetrancia y expresividad variable de la enfermedad en humanos. Tomando los conocimientos obtenidos de estudios recientes a gran escala de las interacciones genéticas y los análisis de supresión en la levadura, se resalta que el contexto de la red genética para una mutación dada puede dar forma a su propensión a exhibir fenotipos dependientes del fondo (Hou et al., 2018).

Por ejemplo, en un experimento llevado a cabo por Petrezselyova y colaboradores (2010), encontraron que dos cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* ampliamente utilizadas, BY4741 y W303-1A, difieren no solo en el tamaño y volumen de las células, sino también en su potencial relativo de membrana plasmática y en la tolerancia a cationes de metales alcalinos. Durante su trabajo sobre la toxicidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , identificaron diferencias en la tolerancia a la sal entre mutantes que albergan las mismas deleciones pero que se originan de diferentes cepas parentales. Encontraron que las células BY4741 proliferan en concentraciones más altas de potasio extracelular, pero concentraciones mucho más bajas de cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  en comparación con las células W303-1A. Esta diferencia en el crecimiento no puede deberse a las diferentes auxotrofias de ambas cepas, ya que crecieron de la misma forma en medio de cultivo control y en ausencia de sales; así mismo, las curvas de crecimiento o proliferación en medio YPD líquido no presentaron diferencias. Además, los resultados sugieren que, aunque las dos cepas no difieren en el contenido total de potasio, la regulación de la homeostasis del potasio intracelular probablemente no sea la misma en las células BY4741 y W303-1A (Petrezselyova et al., 2010). Por lo que el estudio comparativo de dos cepas de *S. cerevisiae* muestra que el fondo genético es una característica relevante en la interpretación de los resultados. Algunos otros estudios han demostrado que diferentes antecedentes genéticos de *S. cerevisiae* dan como resultado diferencias fisiológicas significativas. Por ejemplo, diferentes cepas parentales presentan marcadas diferencias en el contenido y composición de lípidos (Daum et al., 1999) o diferencias en la expresión de proteínas (Rogowska-Wrzesinska et al., 2001).

En conclusión, nuestros resultados al evaluar la intensidad de fluorescencia y la distribución de las proteínas de fusión Npa3-GFP y *npa3ΔC*-GFP en la cepa de levadura *S. cerevisiae* BY4741 mostraron diferencias con respecto a los resultados previos obtenidos con la cepa Clal, pues en las células con fondo genético BY4741 no se observó esa disminución de la fluorescencia en la proteína *npa3ΔC*-GFP después de arrestar las células con el factor  $\alpha$  como se observó en la cepa Clal. Es posible que estas diferencias tengan una relación directa con el fondo genético de las cepas utilizadas como modelo experimental.

## REFERENCIAS

- Aguilar, P. S., Heiman, M. G., Walther, T. C., Engel, A., Schwudke, D., Gushwa, N., Kurzchalia, T., & Walter, P. (2010). Structure of sterol aliphatic chains affects yeast cell shape and cell fusion during mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(9), 4170–4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914094107>
- Alonso, B., Chaussinand, G., Armengaud, J., & Godon, C. (2011). A role for GPN-loop GTPase yGPN1 in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle*, *10*(11), 1828–1837. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15763>
- Bardwell, L. (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, *26*(2), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.10.002>
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, *14*(2), 115–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, *6*(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>
- Daum, G., Tuller, G., Nemeč, T., Hraštnik, C., Balliano, G., Cattell, L., Milla, P., Rocco, F., Conzelmann, A., Vionnet, C., Kelly, D. E., Kelly, S., Schweizer, E., Schüller, H. J., Hojad, U., Greiner, E., & Finger, K. (1999). Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast*, *15*(7), 601–614. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199905\)15:7<601::AID-YEA390>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199905)15:7<601::AID-YEA390>3.0.CO;2-N)
- Early, A., Drury, L. S., & Diffley, J. F. X. (2004). Mechanisms involved in regulating DNA replication origins during the cell cycle and in response to DNA damage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *359*(1441), 31–38. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1362>
- Forget, D., Lacombe, A. A., Cloutier, P., Al-Khoury, R., Bouchard, A., Lavallée-Adam, M., Faubert, D., Jeronimo, C., Blanchette, M., & Coulombe, B. (2010). The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Proteomics*, *9*(12), 2827–2839. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.003616>
- Gras, S., Chaumont, V., Fernandez, B., Carpentier, P., Charrier-Savournin, F., Schmitt, S., Pineau, C., Flament, D., Hecker, A., Forterre, P., Armengaud, J., & Housset, D. (2007). Structural insights into a new homodimeric self-activated

GTPase family. *EMBO Reports*, 8(6), 569–575.  
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400958>

Guerrero Serrano, G. (2017). *Npa3/ScGpn1 carboxy-terminal tail is dispensable for cell viability and RNA polymerase II nuclear targeting but critical for microtubule stability and function*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Guerrero Serrano, G., Castanedo, L., Cristóbal-Mondragón, G. R., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruíz, L., DeLuna, A., De Las Peñas, A., Castaño, I., Calera, M. R., & Sánchez-Olea, R. (2017). Npa3/ScGpn1 carboxy-terminal tail is dispensable for cell viability and RNA polymerase II nuclear targeting but critical for microtubule stability and function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(3), 451–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.010>

Hou, J., van Leeuwen, J., Andrews, B. J., & Boone, C. (2018). Genetic Network Complexity Shapes Background-Dependent Phenotypic Expression. *Trends in Genetics*, 34(8), 578–586. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.006>

Juanes, A. (2017). Methods of synchronization of yeast cells for the analysis of cell cycle progression. *Methods in Molecular Biology*, 1505, 19–34.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_2)

Minaker, S. W., Filiatrault, M. C., Ben-Aroya, S., Hieter, P., & Stirling, P. C. (2013). Biogenesis of RNA polymerases II and III requires the conserved GPN small GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3), 853–864.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.112.148726>

Moldrup, M. E., Salomonsen, B., & Halkier, B. A. (2012). Engineering of glucosinolate biosynthesis: Candidate gene identification and validation. *Methods in Enzymology*, 515, 291–313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394290-6.00020-3>

Petrezselyova, S., Zahradka, J., & Sychrova, H. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biology*, 114(2–3), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.002>

Reyes-Pardo, H., Barbosa-Camacho, A. A., Perez-Mejia, A. E., Lara-Chacon, B., Salas-Estrada, L. A., Robledo-Rivera, A. Y., Montero-Moran, G. M., Lara-Gonzalez, S., Calera, M. R., & Sanchez-Olea, R. (2012). A nuclear export sequence in GPN-loop GTPase 1, an essential protein for nuclear targeting of RNA polymerase II, is necessary and sufficient for nuclear export. *Biochim Biophys Acta*, 1823(10), 1756–1766.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.001>

Rogowska-Wrzesinska, A., Larsen, P. M., Blomberg, A., Görg, A., Roepstorff, P., Norbeck, J., & Fey, S. J. (2001). Comparison of the proteomes of three yeast wild type strains: CEN.PK2, FY1679 and W303. *Comparative and Functional Genomics*, 2(4), 207–225. <https://doi.org/10.1002/cfg.94>

Rosebrock, A. P. (2017). Synchronization and arrest of the budding yeast cell cycle

- using chemical and genetic methods. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(1), 47–52. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot088724>
- Sardi, M., & Gasch, A. P. (2018). Genetic background effects in quantitative genetics: gene-by-system interactions. *Current Genetics*, 64(6), 1173–1176. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0835-7>
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. In *Methods in Enzymology* (Vol. 350, pp. 3–41). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)
- Smith, J., Manukyan, A., Abraham, L., Dungrawala, H., & Schneider, B. L. (2017). Chapter 12 Synchronization of Yeast. 1524, 173–200. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6603-5>
- Staresincic, L., Walker, J., Dirac-Svejstrup, A. B., Mitter, R., & Svejstrup, J. Q. (2011). GTP-dependent binding and nuclear transport of RNA polymerase II by Npa3 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35553–35561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286161>
- Wittenberg, C., & La Valle, R. (2003). Cell-cycle-regulatory elements and the control of cell differentiation in the budding yeast. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(9), 856–867. <https://doi.org/10.1002/BIES.10327>
- Yoshiki, A., & Moriwaki, K. (2006). Mouse phenome research: Implications of genetic background. *ILAR Journal*, 47(2), 94–102. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.2.94>

## PIES DE FIGURA

**Figura 1. Tinción nuclear con DAPI en células de levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP.** A partir de células de levadura en fase logarítmica ( $OD_{600nm}$  de 0.6), se realizó la tinción del núcleo con DAPI a una concentración final de 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , a los tiempos de incubación de 15, 30 y 45 minutos. De esos subcultivos se tomó una cantidad de células para visualizarlas en un microscopio de fluorescencia. Se muestran imágenes donde se observa la señal de fluorescencia verde en el citoplasma, lo que corresponde con la localización citoplasmática esperada de Npa3-GFP y el núcleo teñido de color azul debido al DAPI. Tiempo de exposición 150 ms a 60x.

**Figura 2. Curso temporal del arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por el factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ) en células de levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP.** Se tomaron células de levadura en fase logarítmica temprana ( $OD_{600nm}$  de 0.4), se añadió el factor  $\alpha$  a una la concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  y se observaron las células vivas en el microscopio de fluorescencia cada 30 minutos hasta 120 minutos. El arresto de las células de *S. cerevisiae* se identifica morfológicamente por la adquisición de la prolongación característica denominada “shmoo”. Tiempo de exposición 150 ms a 60x.

**Figura 3. Arresto en la fase G1 del ciclo celular de células de levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP a diferentes tiempos de exposición al factor  $\alpha$  (7.5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ).** Se tomaron células de levadura en fase logarítmica temprana ( $OD_{600nm}$  de 0.4), se añadió el factor  $\alpha$  a una la concentración final de 7.5 o 10  $\mu\text{g/ml}$  y las células se incubaron durante **A)** 2 horas, **B)** 2.5 horas, **C)** 3.5 horas. Muestras de las células vivas se observaron en el microscopio de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia y la localización subcelular de Npa3-GFP permanecieron constantes durante el arresto con el factor  $\alpha$  en las condiciones y tiempos de incubación evaluados. Tiempo de exposición 150 ms a 60x.

**Figura 4. Curso temporal después de la liberación del arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por el factor  $\alpha$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en células de la levadura *S. cerevisiae* que expresan Npa3-GFP.** Se tomaron células de levadura en fase logarítmica temprana ( $OD_{600nm}$  de 0.4) y se añadió el factor  $\alpha$  a una la concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas. De estos cultivos se visualizaron células vivas en un microscopio de fluorescencia. La primera muestra se observó a los 40 minutos y después de ésta se realizaron observaciones cada 20 minutos hasta 120 minutos. A ninguno de los tiempos evaluados varió la fluorescencia de Npa3-GFP ni cambió la localización subcelular de esta proteína. Tiempo de exposición 150 ms a 100x.

**Figura 5. Esquema del ensayo de pérdida de plásmido de una cepa de levadura *S. cerevisiae* que expresa *npa3 $\Delta$ C* desde un plásmido con *LEU2* y *npa3 $\Delta$ C-GFP* desde un plásmido con *URA3*.** Esquema que representa las células que

expresan *npa3ΔC* desde un plásmido con *LEU2* y *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*. Después del ensayo de pérdida de plásmido se crecieron las células en un medio que seleccione positivamente la cepa que perdió *npa3ΔC*, pero mantuvo el plásmido que expresa *npa3ΔC-GFP*. Esta estrategia se utilizó para obtener los resultados que se muestran en las figuras 6 y 7.

**Figura 6. Réplicas de las células que crecieron en medio sólido MSC-URA+NAT después del ensayo de pérdida de plásmido.** Se tomaron células de levadura *S. cerevisiae* que expresaban *npa3ΔC* y *npa3ΔC-GFP*. Se realizaron pases en MSC-URA+NAT para favorecer que se conservara solo el plásmido con *npa3ΔC-GFP*. Las células se sembraron en medio sólido MSC-URA+NAT. Las colonias que crecieron en este medio se replicaron en los siguientes medios y en el orden indicado: MSC-LEU-URA+NAT, MSC-LEU+NAT, 5FOA en los cuales no se espera crecimiento y por último MSC-URA+NAT, en el cual se espera crezcan las colonias de interés. Se marcaron con flechas azules las tres colonias que tuvieron el crecimiento esperado, es decir, que mantuvieron sólo el plásmido que expresa *npa3ΔC-GFP*.

**Figura 7. Aislamiento de colonias individuales de levadura *S. cerevisiae* que perdieron el plásmido *npa3ΔC* sin etiqueta y contienen solo la versión de *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*.** Después de las réplicas se tomaron tres colonias con el crecimiento esperado y se estriaron en medio sólido MSC-URA+NAT para aislar colonias individuales y hacer gliceroles a partir de ellas. Se utilizó una cepa diferente que expresa un plásmido con *URA3* como control positivo y una cepa que expresa un plásmido *LEU2* como control negativo.

**Figura 8. Ensayo de dilución por puntos para comprobar la presencia del plásmido *URA3* que dirige la expresión de *npa3ΔC-GFP* en las tres colonias obtenidas en el ensayo de pérdida de plásmido.** Se permitió el crecimiento de las cepas de levadura: parental BY4741, cepa que expresa *npa3ΔC* desde un plásmido con *LEU2*, la cepa que expresan ambos plásmidos *npa3ΔC* desde un plásmido con *LEU2*, así como *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*, y la cepa que sólo expresa *npa3ΔC-GFP*. En una multiplaca se armó un arreglo y se hicieron diluciones seriadas para después sembrarlas en cajas de medio sólido MSC-LEU-URA, MSC-LEU, MSC-URA y YPD. La cepa BY4741 creció sólo en el medio YPD porque no tiene plásmidos que compensen la falta de los nutrientes leucina y uracilo; La cepa que expresa *npa3ΔC* desde un plásmido *LEU2* creció en el medio MSC-LEU y en YPD; La cepa que tiene los dos plásmidos *npa3ΔC-GFP* con marcador de selección *URA3* y *npa3ΔC* con marcador *LEU2* creció en todas las cajas pues puede compensar la falta de uracilo y leucina en el medio. Por último, la cepa de interés que expresa únicamente *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con *URA3*, creció sólo en MSC-URA y YPD, pero no en medio sin leucina, como se esperaba.

**Figura 9. Visualización en el microscopio de fluorescencia de las células de levadura *S. cerevisiae* que expresan *npa3ΔC-GFP* desde un plásmido con**

**URA3.** Se tomaron células de levadura en fase logarítmica ( $OD_{600nm}$  de 0.6) y se realizó la tinción del núcleo utilizando el colorante DAPI a una concentración final de 2.5  $\mu\text{g/ml}$ . La imagen muestra la fluorescencia de *npa3 $\Delta$ C-GFP* en el citoplasma, pero es evidente que esta proteína se acumula de forma preferencial en el núcleo celular, el cual se identificó al ser teñido con DAPI. Tiempo de exposición 150 ms a 100x.

**Figura 10. Arresto en la fase G1 del ciclo celular de células de levadura *S. cerevisiae* que expresan *npa3 $\Delta$ C-GFP* utilizando el factor  $\alpha$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ).** Se tomaron células de levadura en fase logarítmica temprana ( $OD_{600nm}$  de 0.4) y se adicionó el factor  $\alpha$  a una concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas. Muestras de las células vivas se observaron en el microscopio. La intensidad de fluorescencia de *npa3 $\Delta$ C-GFP* permaneció constante antes y durante el arresto con el factor  $\alpha$ . Tiempo de exposición 150 ms a 100x.

**Figura 11. Curso temporal después de la liberación de arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por el factor  $\alpha$  en células de levadura *S. cerevisiae* que expresan *npa3 $\Delta$ C-GFP*** Se tomaron células de levadura en fase logarítmica temprana ( $OD_{600nm}$  de 0.4) y se añadió el factor  $\alpha$  a una la concentración final de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas. De estos cultivos se visualizaron células vivas en un microscopio de fluorescencia. La primera muestra se observó a los 40 minutos y después de ésta se realizaron observaciones cada 20 minutos hasta 120 minutos. A ninguno de los tiempos evaluados cambió la intensidad de fluorescencia de *npa3 $\Delta$ C-GFP*. Tiempo de exposición 150 ms a 100x.

FIGURAS

Figura 1

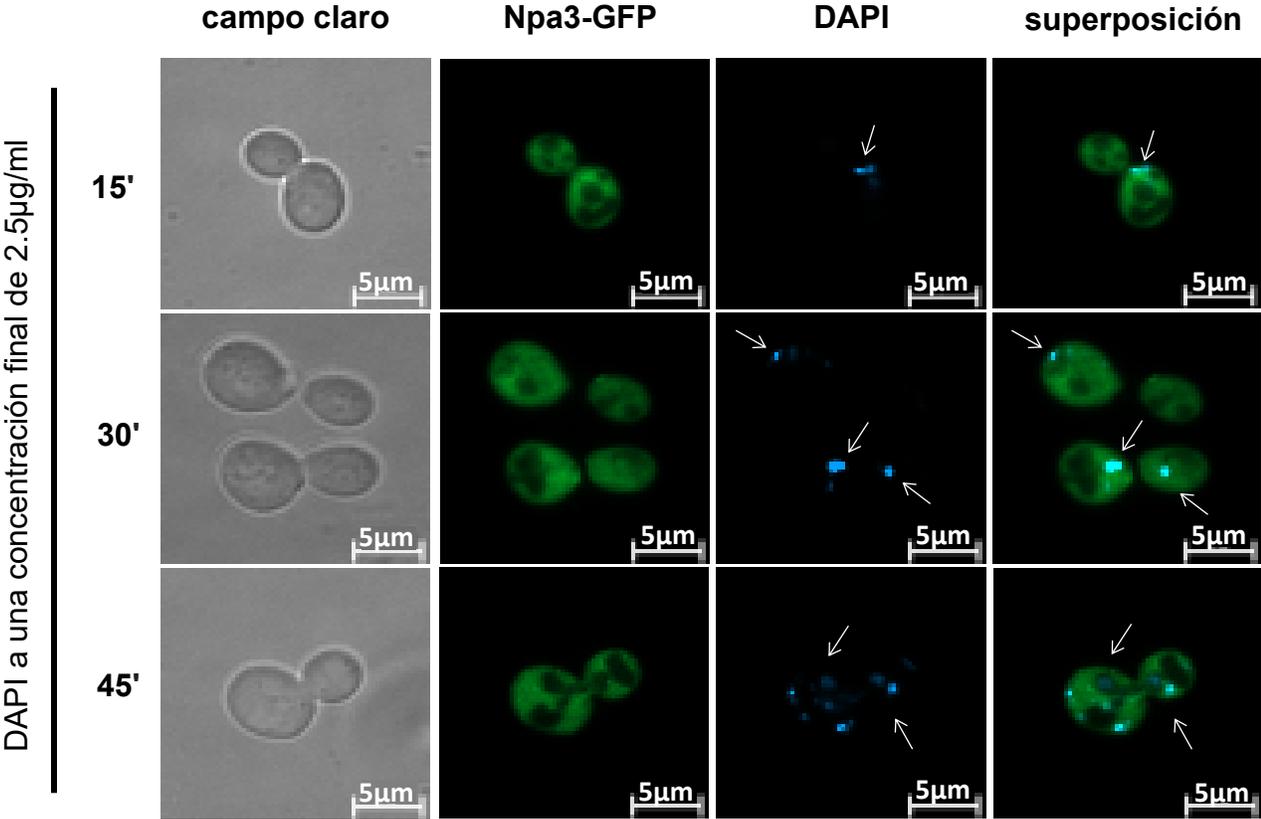
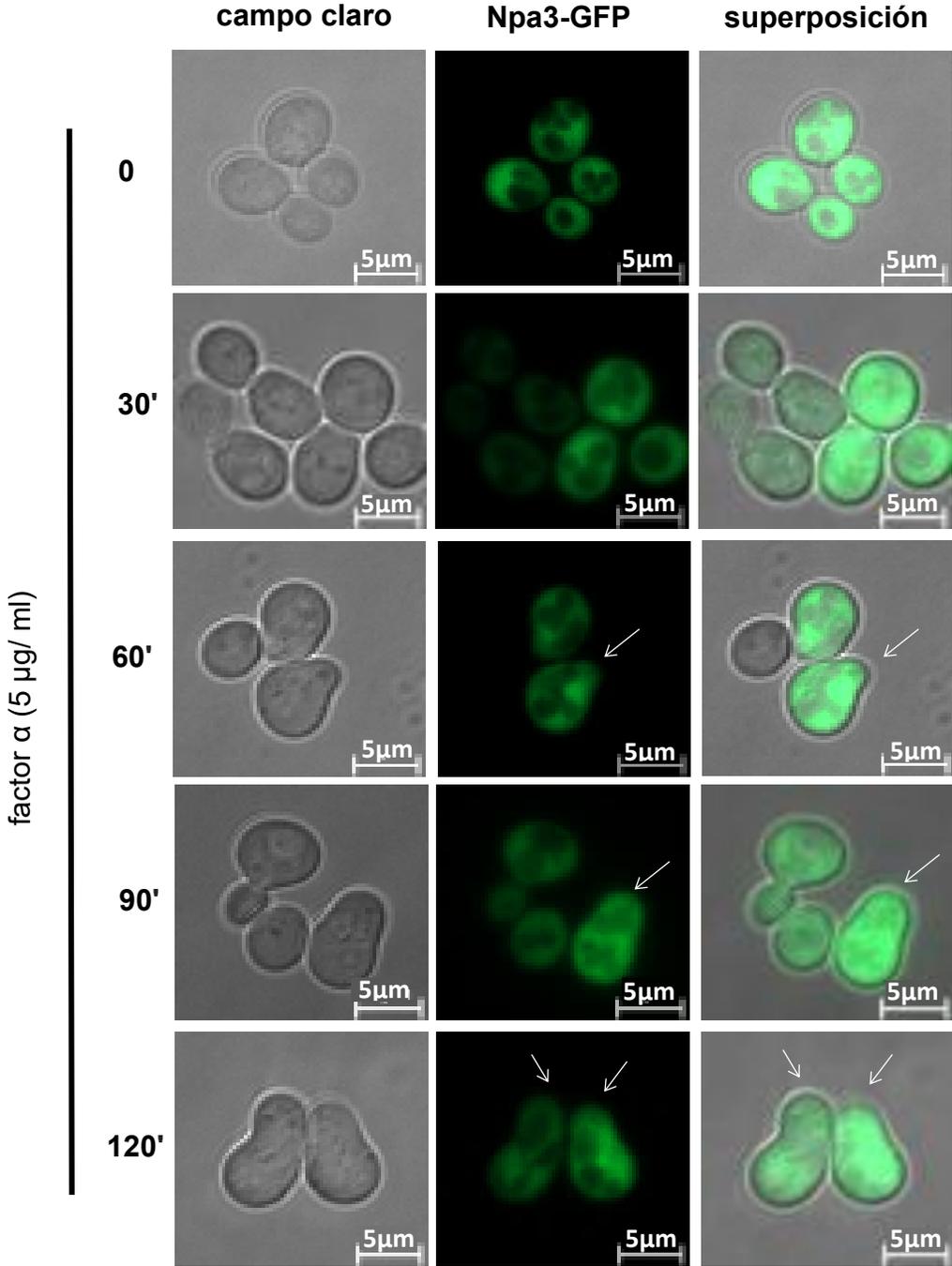
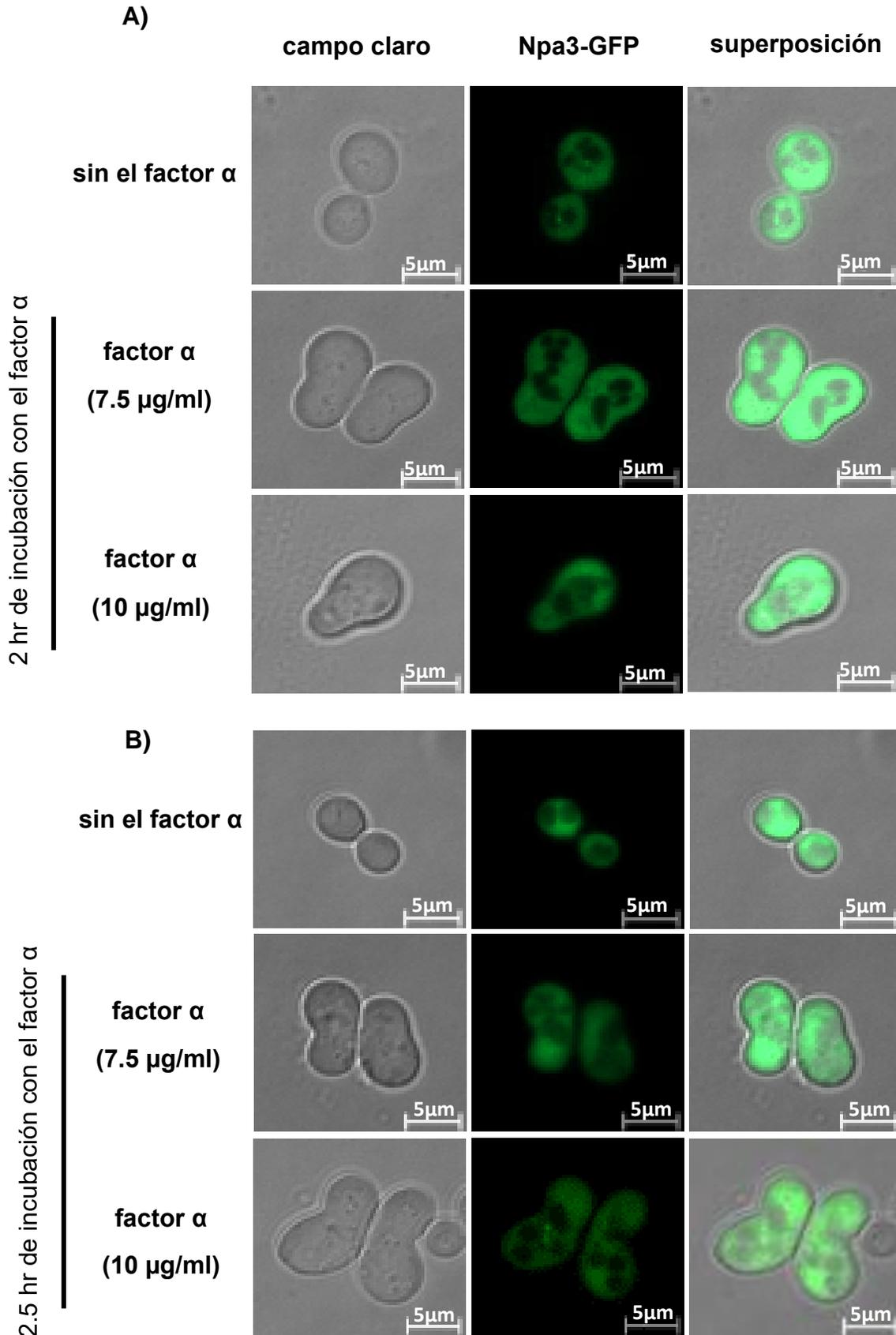


Figura 2



**Figura 3**



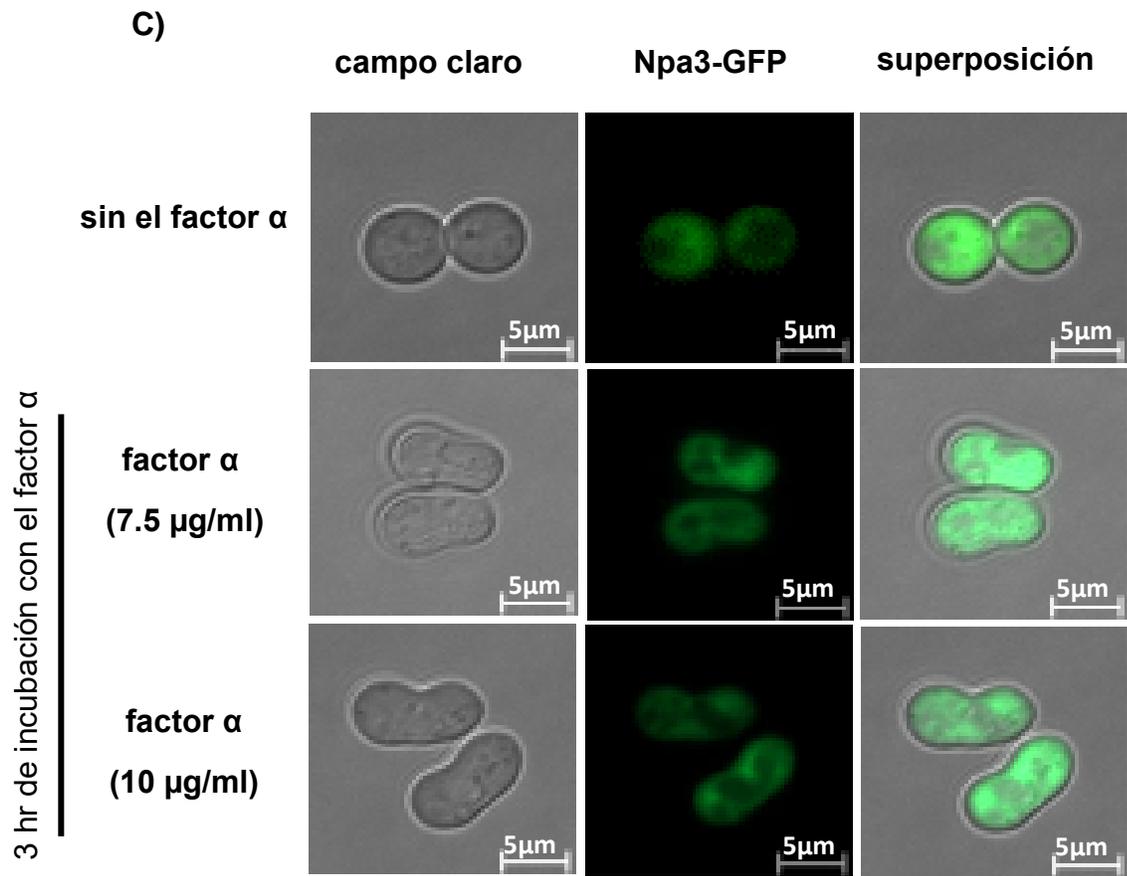


Figura 4

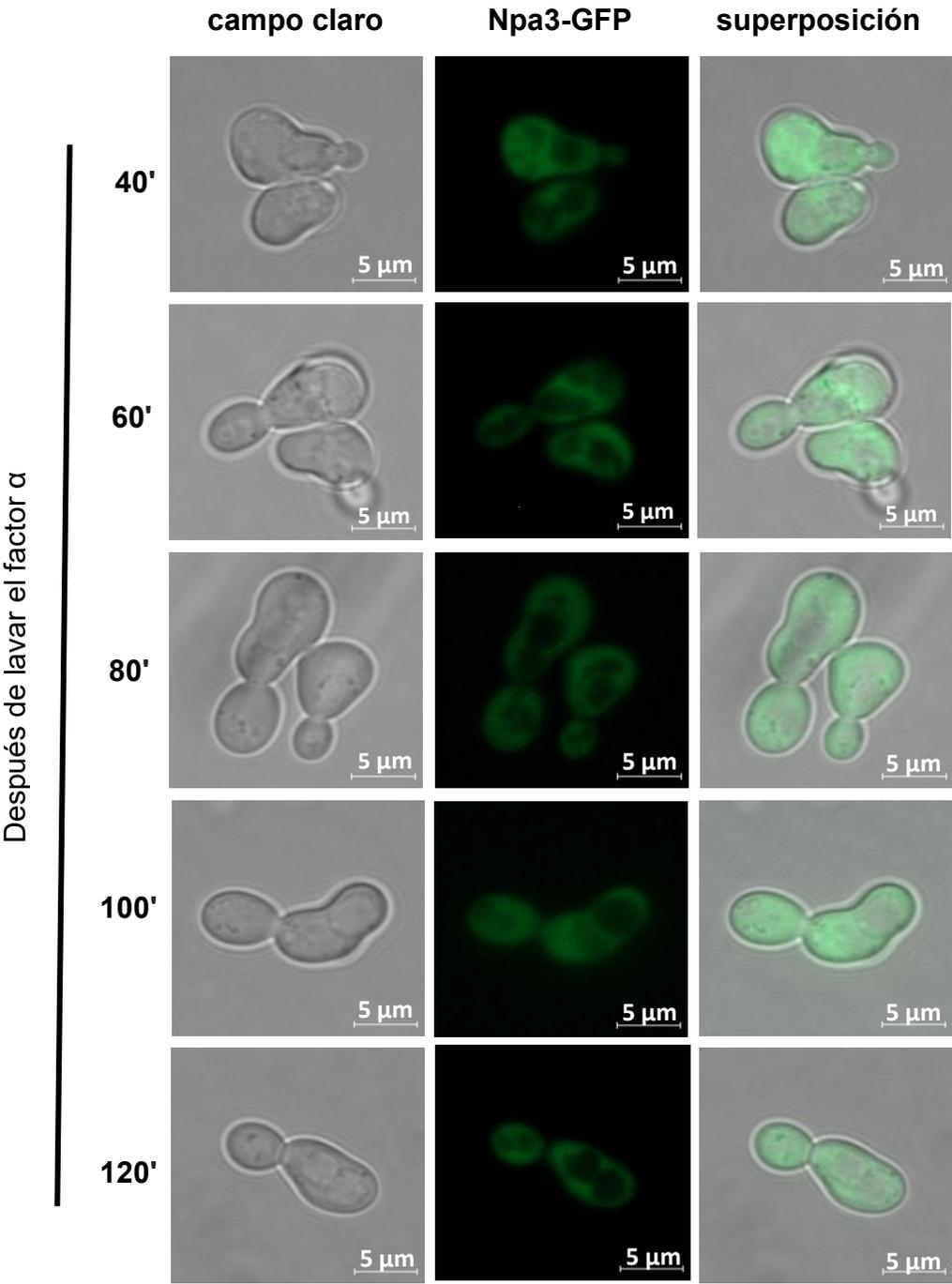


Figura 5

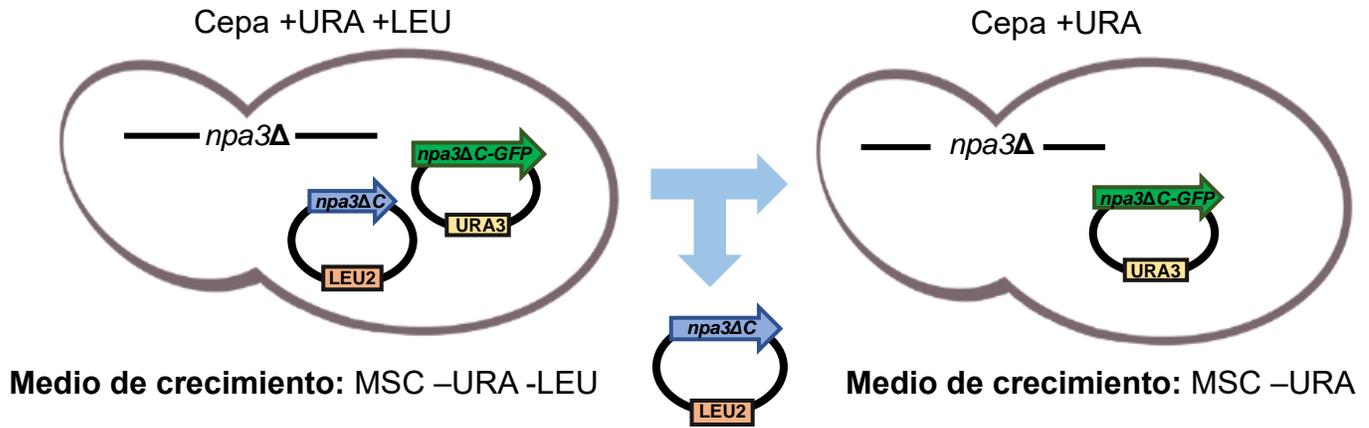


Figura 6

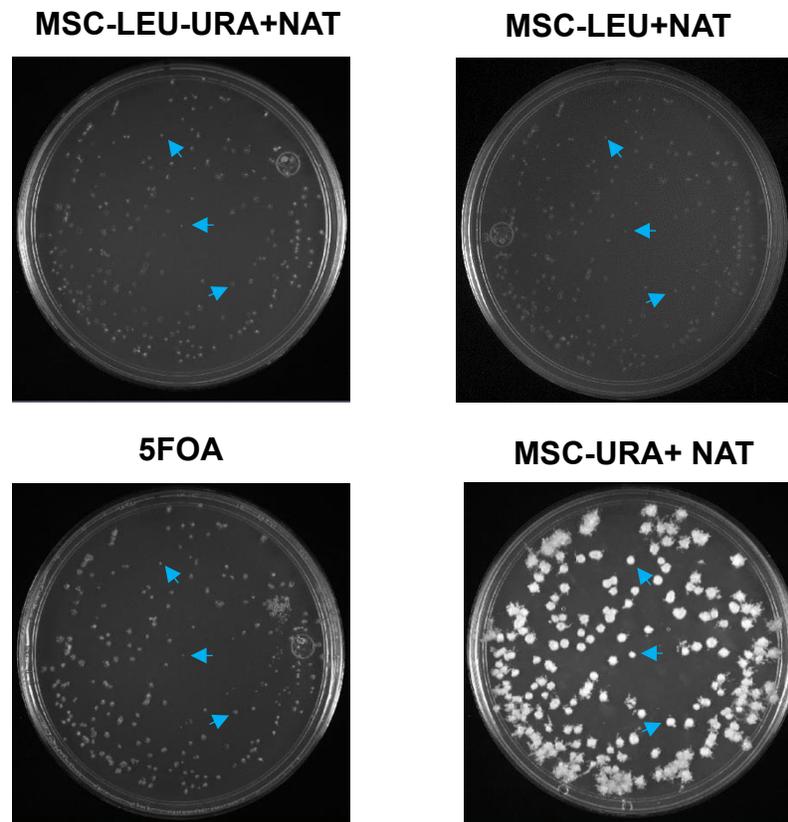


Figura 7

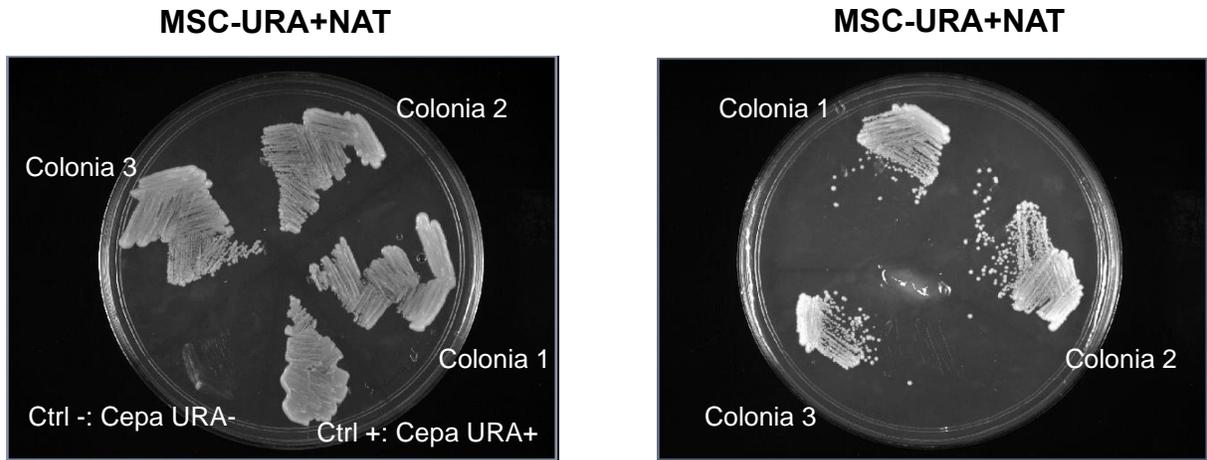


Figura 8

48 hrs

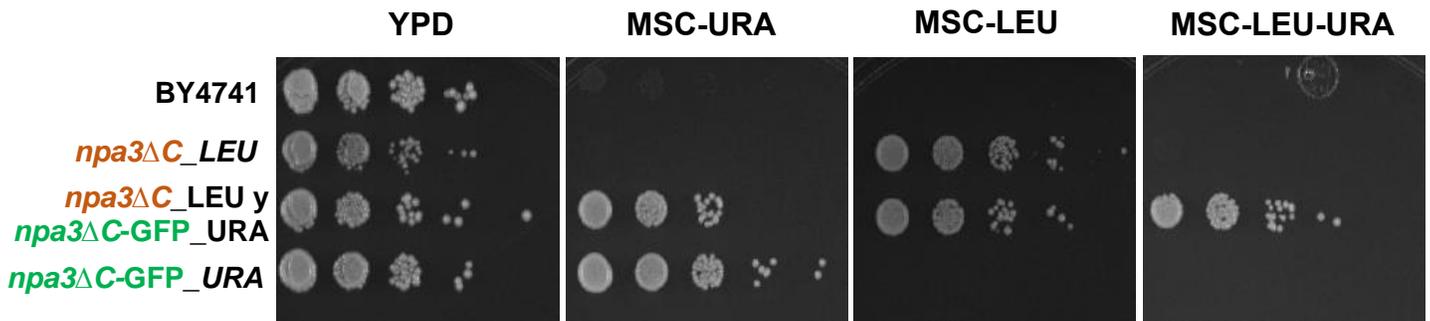


Figura 9

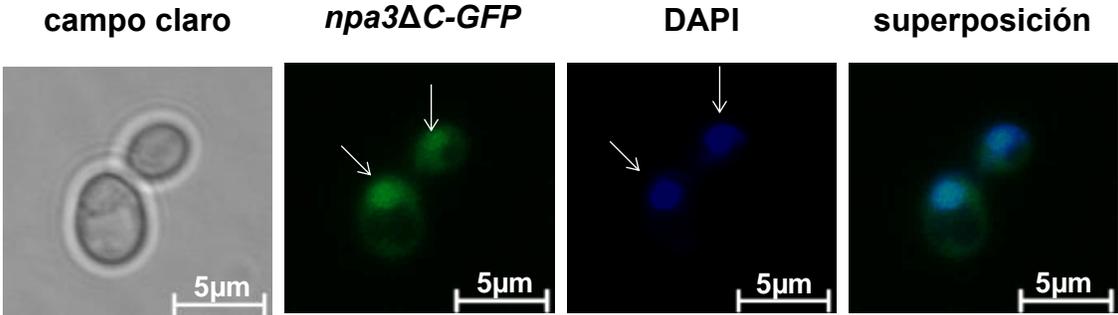


Figura 10

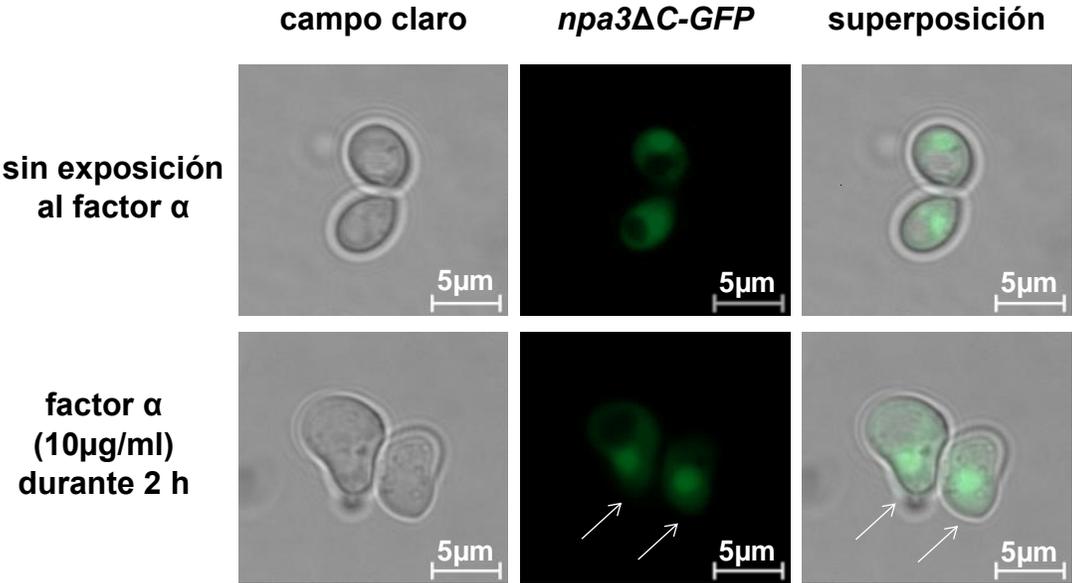
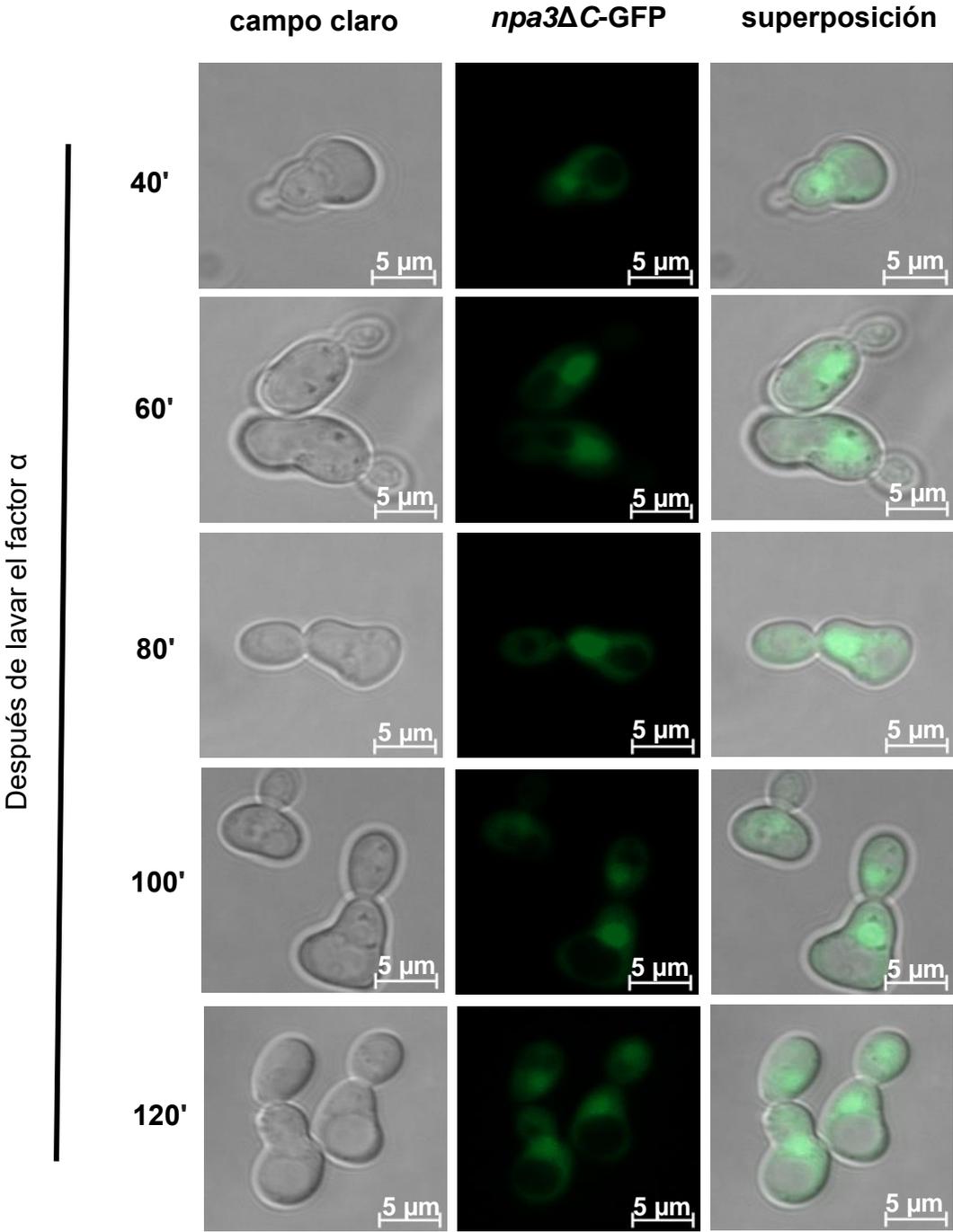


Figura 11



# DIAPOSITIVAS



DEFENSA DE TESIS DE MAESTRÍA

**"Efecto del factor alfa en los niveles proteicos y distribución subcelular de la GTPasa Npa3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*"**

---

**Presenta:** QFB. Beatriz Elena González Contreras



1

Comité Tutelar:

**Codirectores de tesis:**  
 Dr. Roberto Sánchez Olea  
 Dra. Mónica Raquel Calera Medina

**Asesora interna:**  
 Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

**Asesora externa:**  
 Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

2

Sinodales:

**Presidente de sinodales:**  
 Dra. Patricia Elizabeth Cossío Torres

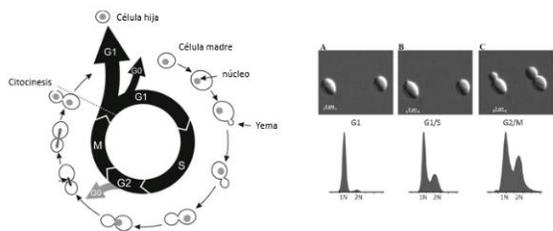
**Secretaria sinodal:**  
 Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

**Sinodal:**  
 Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

**Sinodal suplente:**  
 Dra. Esther Layseca Espinosa

3

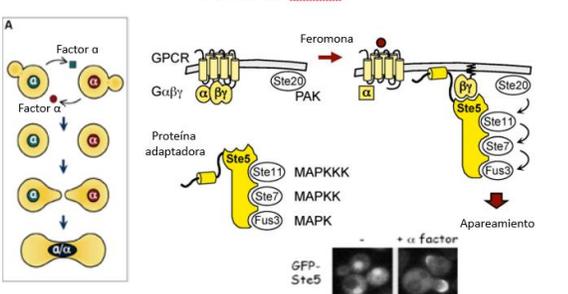
Ciclo celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*



Smith et al., 2017. *Methods Mol Biol*, 1524:215-242.

4

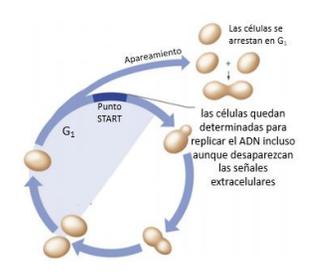
El factor alfa es una feromona de apareamiento que es reconocida por las células **MAT $\alpha$**



Repetto et al., 2018. *Mol Cell*, 69(6):938-952.

5

El factor alfa arresta las células de levadura en G1



Las células se arrestan en G<sub>1</sub>

Las células quedan determinadas para replicar el ADN incluso aunque desaparezcan las señales extracelulares

Start: Punto en el ciclo celular donde la célula decide si iniciar o no una nueva ronda de división celular.

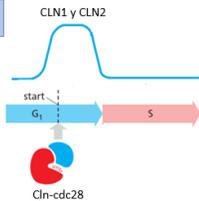
Smith et al., 2017. *Methods Mol Biol*, 1524:215-242.

6

## El arresto en G1 inducido por el factor alfa es reversible

El reinicio de la proliferación celular después de la eliminación del factor alfa requiere de:

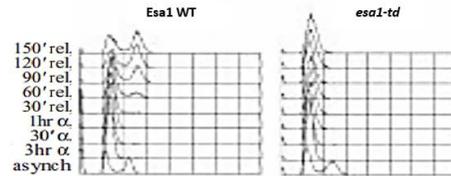
- La activación de un programa transcripcional que involucra una gran cantidad de genes, entre ellos los genes de las ciclinas reguladoras de G1 denominadas CLN1 y CLN2.
- Los complejos Cln-Cdc28 activan "Start", lo que permite el inicio de la formación de la yema y la duplicación del centrosoma seguido de la replicación del DNA.



Smith et al., 2017. *Methods Mol Biol*, 1524:215-242.

7

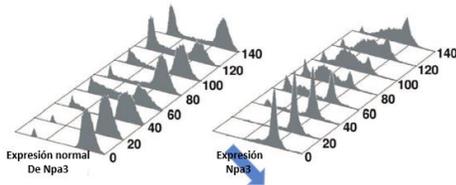
## La actividad de Esa1 es necesaria para la reanudación del ciclo celular después del arresto con factor alfa



Early et al., 2004. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359(1441):31-8.

8

## La disminución de la expresión de Npa3/Gpn1 causa un retraso en la progresión de la fase S del ciclo celular

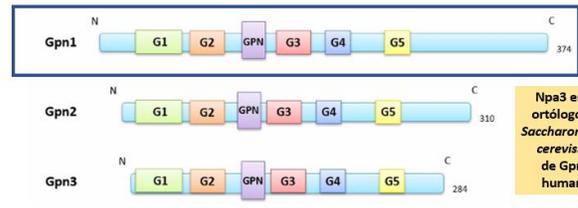


Alonso et al., 2011. *Cell Cycle*, 10(11):1828-37.

9

## Familia de las GTPasas GPN

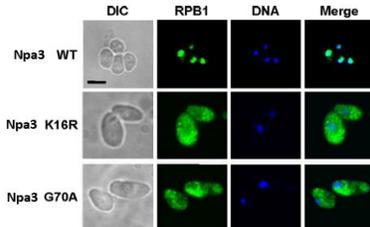
Los motivos G1-G5 unen los nucleótidos de guanina  
Tri péptido invariable: Glicina-Prolina-Asparagina



Gras et al., 2007. *EMBO Rep*, 8(6): 569-575.

10

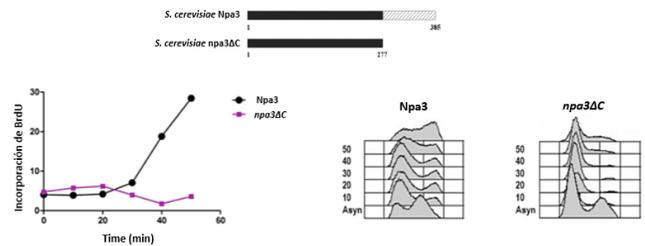
## Npa3 es necesaria para la acumulación nuclear de la RNA polimerasa II



Forget et al., 2010. *Mol Cell Proteomics*, 9(12):2827-39.

11

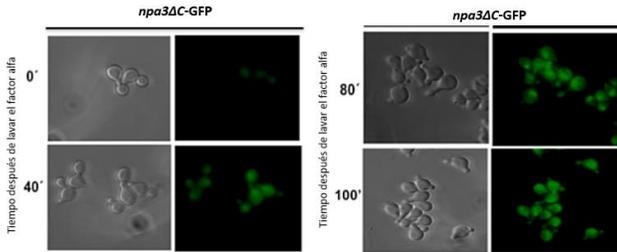
## La cepa *npa3ΔC* muestra un retraso en el reinicio del ciclo celular después del arresto con factor alfa



Guerrero-Serrano, 2017. Tesis doctoral, DICIM-UASLP (datos no publicados).

12

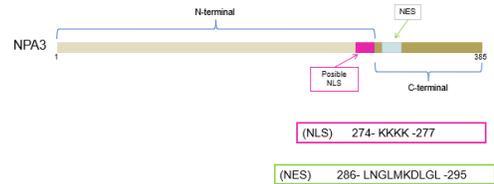
## El factor alfa causa una disminución en la fluorescencia de *npa3ΔC-GFP*



Guerrero-Serrano, 2017. Tesis doctoral, DICIM- UASLP (datos no publicados).

13

## Npa3 presenta una posible señal de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES)

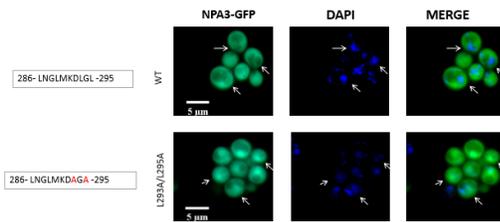


<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>  
<https://psort.hgc.jp/>  
[http://nls-mapper.lab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.lab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)

Félix-Pérez, 2021. Tesis doctoral en progreso.

14

## La señal de exportación nuclear (NES) presente en el C-terminal de Npa3 es funcional



Félix-Pérez, 2018. Tesis de maestría, PCBB-UASLP (datos no publicados).

15

## Justificación

- La GTPasa Npa3 es necesaria para el reinicio de la proliferación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de un arresto al final de la fase G1 del ciclo celular inducido por exposición al factor alfa, pero se desconoce como se regula su función y si ésta se lleva a cabo en el citoplasma o en el núcleo celular.
- El reinicio de la proliferación celular después de un arresto causado por el factor alfa involucra la activación de un programa transcripcional de genes y la entrada inmediata de las células a la fase S. Dado que la síntesis de DNA es un proceso que ocurre en el núcleo celular, es probable que Npa3 se movilice del citoplasma a este organelo para contribuir de alguna manera al inicio y progresión de la fase S.

16

## Preguntas de investigación

- ¿Los niveles proteicos de la GTPasa Npa3 varían en la levadura *S. cerevisiae* antes y después de arrear las células en G1 con el factor alfa?
- ¿Existe acumulación nuclear de Npa3 después de la eliminación del factor alfa en células de la levadura *S. cerevisiae*?

17

## Hipótesis

El reinicio de la proliferación celular después del arresto en G1 producido por el factor alfa se asocia con un aumento en los niveles proteicos y una acumulación nuclear de la GTPasa Npa3.

18

## Objetivo general

Determinar los niveles proteicos y la localización subcelular de la GTPasa Npa3 antes, durante y después de la liberación del arresto en el ciclo celular inducido por el factor alfa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

19

## Objetivos específicos

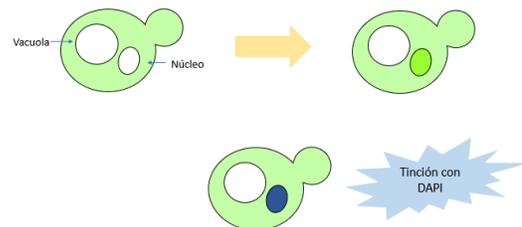
1. Evaluar la localización subcelular de Npa3-GFP en células de la levadura *S. cerevisiae* antes, durante y a diferentes tiempos después de la liberación del arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por exposición al factor alfa.
2. Determinar los niveles proteicos de Npa3-GFP en células de la levadura *S. cerevisiae* antes, durante y a diferentes tiempos después de la liberación del arresto en la fase G1 del ciclo celular inducido por exposición al factor alfa.

20

## Resultados

21

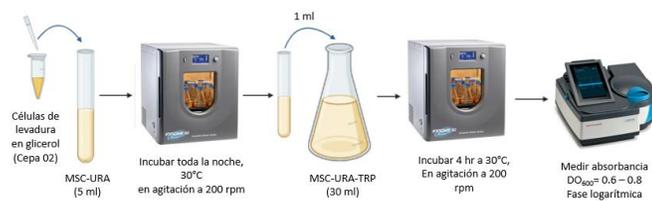
Es necesario tener un marcador nuclear para determinar si Npa3 adquiere una localización subcelular específica



22

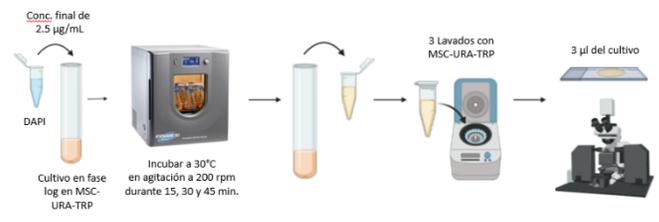
## Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

• Cepa 02: MATa *his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::NAT, pJM-NPA3GFP\_URA*



23

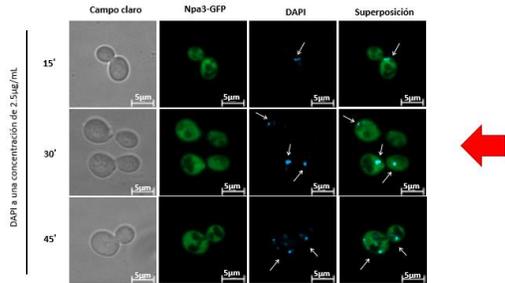
## Estandarización de la tinción con DAPI



24

Las células de la levadura *S. cerevisiae* que contienen Npa3-GFP se tiñen mejor con 30 min de incubación con el colorante DAPI

Tiempo de exposición: 150 ms, 60x



25

Condiciones para el arresto de las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en fase G1 con el factor  $\alpha$

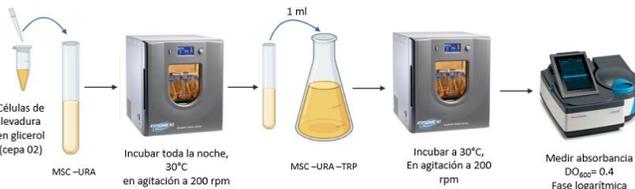
Cepa	Células/ml	Concentración final de Factor $\alpha$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tiempo de incubación (horas)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Referencia
BAR1+	$1 \times 10^6$	5-10	3	30	Smith et al., 2017 DOI 10.1007/978-1-4939-6603-5_14
BAR1+	$2-6 \times 10^6$	4	2	25	Juanes, 2017 DOI 10.1007/978-1-4939-6502-1_2
BAR1+	$5 \times 10^6$	5	2	30	Futcher, 1999 doi:10.1023/a:1009872403440
BAR1+	$2-5 \times 10^6$	5	2	30	Rosebrock, 2017 doi:10.1101/pdb.prot088724

- Temperatura: 30  $^{\circ}\text{C}$
- Tiempo de incubación: 2 hr
- Concentración de factor  $\alpha$ : 5, 7.5 y 10  $\mu\text{g/ml}$

26

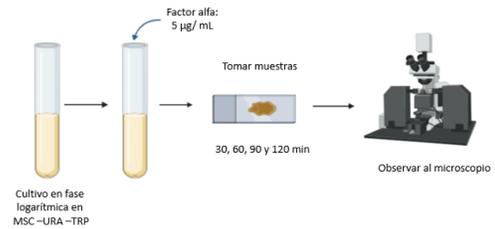
Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa 02: MATA *his3 $\Delta$ L, leu2 $\Delta$ O, ura3 $\Delta$ O, met15 $\Delta$ O, npa3A::NAT, pIM-NPA3GFP\_URA3*



27

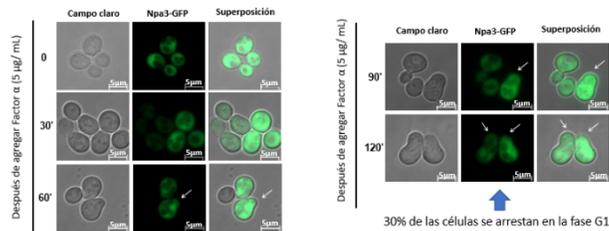
Arresto con el factor  $\alpha$  en la fase G1 del ciclo celular



28

No hay un cambio en la fluorescencia de Npa3-GFP durante el arresto en la fase G1 del ciclo celular con el factor  $\alpha$  en los tiempos evaluados

Tiempo de exposición: 150 ms, 60x



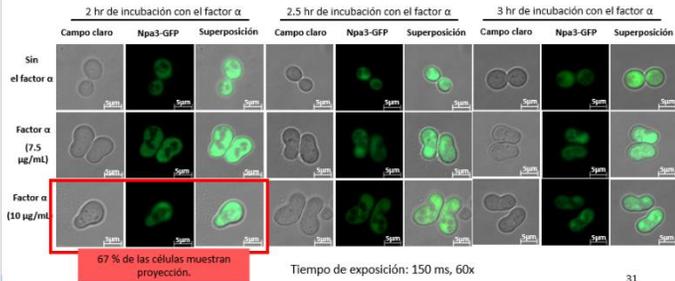
29

Arresto con el factor  $\alpha$  en la fase G1 del ciclo celular



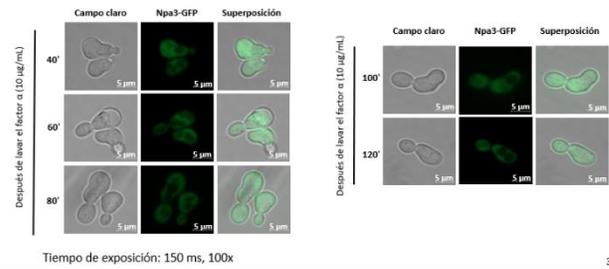
30

No hay cambio en la fluorescencia de Npa3-GFP durante el arresto en fase G1 con el factor  $\alpha$  a las concentraciones y tiempos de incubación evaluados

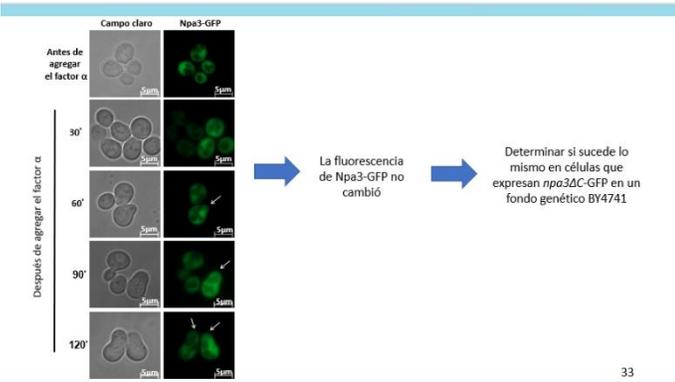


31

No hay cambio en la intensidad de la fluorescencia o la localización subcelular de la proteína Npa3-GFP después de la liberación del arresto inducido por el factor  $\alpha$



32

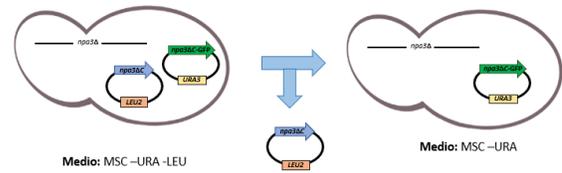


33

Eliminación del plásmido que contiene *npa3 $\Delta$ C*-*LEU2* para evitar alguna posible interferencia

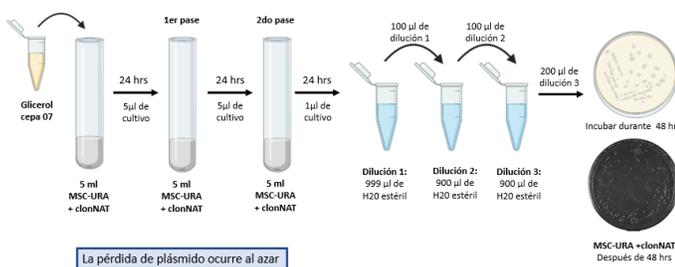
- Genotipo: *MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 npa3 $\Delta$ ::NAT pMG7-*npa3 $\Delta$ C*-*LEU2*, *npa3 $\Delta$ C*-GFP-*pJM*-*URA3**

Créditos: cepa proporcionada por el Dr. Martín Mora García



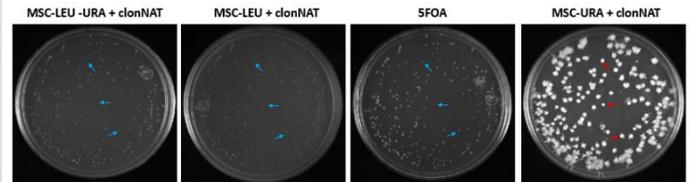
34

Procedimiento para realizar el ensayo de pérdida de plásmido



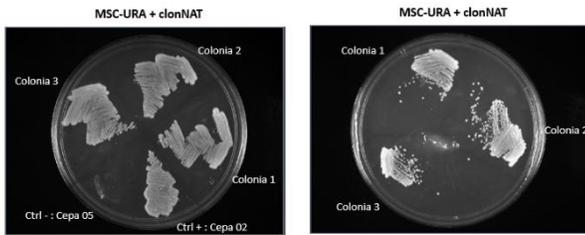
35

Se replicaron las cajas y se escogieron las colonias con el crecimiento esperado



36

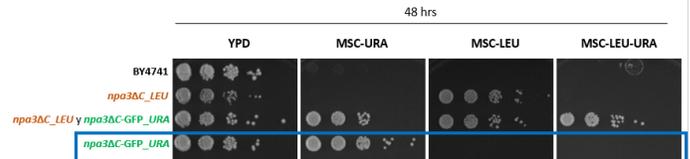
Se obtuvieron colonias individuales de las células de levadura *S. cerevisiae* que contienen solo *npa3ΔC*-GFP en un plásmido con *URA3*



**Cepa 02:** Npa3-GFP en un plásmido con *URA3*  
**Cepa 05:** Npa3 silvestre en un plásmido con *LEU2*

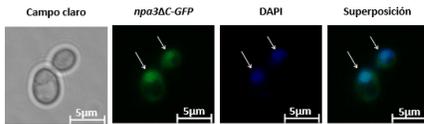
37

La cepa que expresa únicamente *npa3ΔC*-GFP desde un plásmido con *URA3*, crece sólo en los medios MSC-URA y YPD, porque tiene el plásmido necesario para sintetizar el uracilo faltante en el medio



38

La proteína *npa3ΔC*-GFP se acumuló principalmente en el núcleo y también en el citoplasma como se había reportado anteriormente

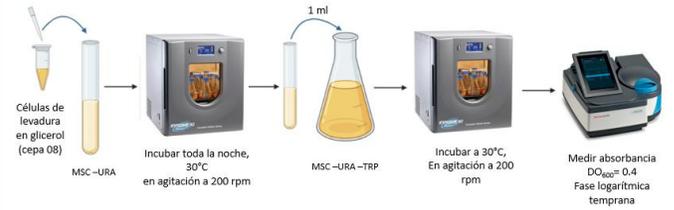


Tiempo de exposición: 150 ms, 100x

39

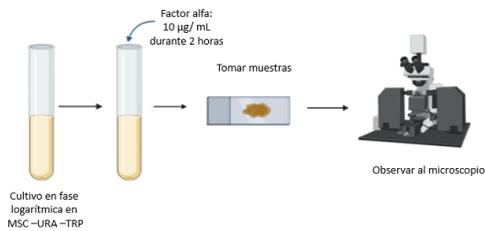
### Crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

• Cepa 08 : MATA *his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::NAT, npa3ΔC-GFP\_pIM\_URA3*



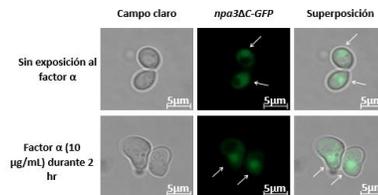
40

### Arresto con el factor alfa en la fase G1 del ciclo celular



41

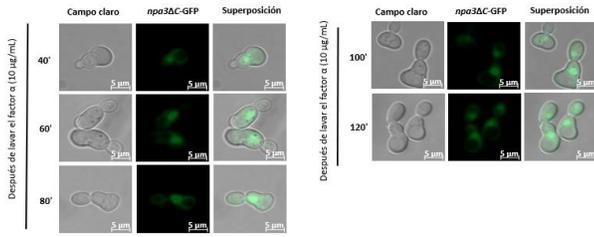
La intensidad de fluorescencia de la proteína *npa3ΔC*-GFP permaneció constante antes y durante el arresto con el factor  $\alpha$



Tiempo de exposición: 150 ms, 100x

42

No hay cambio en la intensidad de la fluorescencia de la proteína *npa3ΔC*-GFP después de la liberación del arresto inducido por el factor  $\alpha$



Tiempo de exposición: 150 ms, 100x

43



44



**Cepa de levadura *S. cerevisiae* con fondo genético BY4741**  
 MATa *his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0*  
 Plásmido con *npa3ΔC*-GFP  
 Baker Brachmann et al. 1998

Más comúnmente utilizada en comparación con la cepa de fondo genético Clal.

Los genes que se utilizan como marcador de selección en la mayoría de los vectores de uso común fueron eliminados en la cepa BY4741 sin afectar la expresión de genes adyacentes.

45



La combinación de todas las versiones de todos los genes de una población determinada se llama fondo genético.



Se puede definir el fondo genético como el genotipo de todos los demás genes relacionados que pueden interactuar con el gen de interés y, por lo tanto, influyen potencialmente en el fenotipo específico.



Las consecuencias fenotípicas de una mutación dada pueden variar entre individuos.

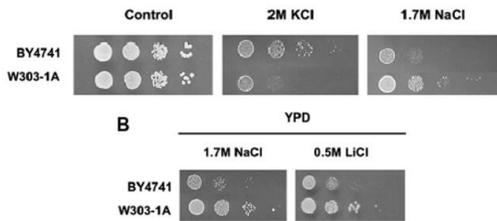


Se resalta que el contexto de la red genética para una mutación dada puede dar forma a su propensión a exhibir fenotipos dependientes del fondo.

Yoshiki & Moriwaki, 2006. *ILAR Journal*, 47(2): 94–102; Sardi & Gasch, 2018. *Current Genetics*, 64(6):1173–1176; Hou et al., 2018. *Trends in Genetics*, 34(8):578–586.

46

Las células BY4741 proliferan en concentraciones más altas de potasio, pero en concentraciones mucho más bajas de cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  en comparación con las células W303-1A.



Petreselyova et al., 2010. *Fungal Biology*, 114(2–3):144–150.

47

Distintas cepas parentales presentan diferencias en la expresión de proteínas.

Gene name	Mutant phenotype in CEN.PK2 background	Mutant phenotype in FY1879 background	Mutant phenotype in W303 background	Reference	Protein function
SLB2	Slow growth	Lethal	Not determined	Lopez et al., 1998	RNA splicing, ATP dependent RNA helicase
PH2	Lethal	No defect	Not determined	Bilal et al., 1998	Serine protein kinase
ADM4	No defect	Lethal	Not determined	Lopez et al., 1998	Component of karyopherin docking complex of the nuclear pore
ARP7	Not determined	Lethal in S288C	Slow growth	Carns et al., 1998	Serine global transcription activator complex
ARP9	Not determined	Lethal in S288C	Slow growth	Carns et al., 1998	Serine global transcription activator complex
HSL7	No defect	No defect	Abnormalities in budding	Kucharczyk et al., 1999	Negative regulator of SWI5, mitosis and cell cycle
SSH1	No defect	Slow growth	Slow growth	Duans et al., 1999	Protein translocator, subunit of SWI2 complex
DCP1	Slow growth	Lethal	Not determined	Haji et al., 1999	Interacting with ribosomes
NI-IPA	Not determined	Lethal in S288C	Grows on galactose	Yu et al., 2000	mRNA decapping enzyme involved in mRNA turnover
NI-IPB	Not determined	Lethal in S288C	Grows on galactose	Yu et al., 2000	RNA Polymerase II transcription
Double mutant GAL4	Not determined	Ser99 phosphorylation required for GAL induction	Ser99 phosphorylation not required for GAL induction	Ruhde et al., 2000	Transcription factor
ARPS	Not determined	Severe growth defect	Lethal	Gras et al., 2000	phosphorylation correlates with activity Actin-related protein

Rogowska et al., 2001. *Comparative and Functional Genomics*, 2(4): 207–225.

48

49

42