
Determinación de la localización subcelular de las proteínas que forman parte del regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en *Saccharomyces cerevisiae*

Andrea Stephanie de la Vega Alvarado



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Determinación de la localización subcelular de las
proteínas que forman parte del regulador
transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en
*Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo de graduación presentado por Andrea Stephanie de
la Vega Alvarado para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



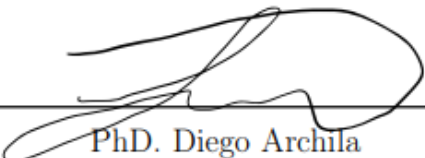
**Determinación de la localización subcelular de las
proteínas que forman parte del regulador
transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en
*Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo de graduación presentado por Andrea Stephanie de
la Vega Alvarado para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

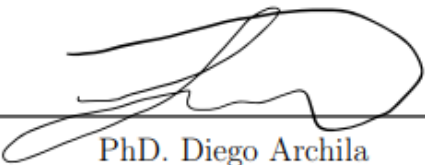
Guatemala,

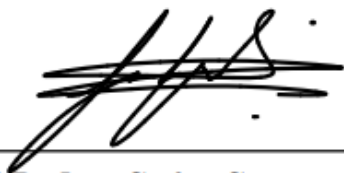
2024


Vo.Bo.:

(f) 
PhD. Diego Archila

Tribunal Examinador:

(f) 
PhD. Diego Archila

(f) 
PhD. Jose Carlos Campero

(f) 
PhD. Dalia Lau-Bonilla

Fecha de aprobación: Guatemala, 19 de Junio de 2024.

Prefacio

“Ya que absolutamente todo lo que te rodea ha contribuido a tu desarrollo personal, es menester agradecer por todo.” Wallace Wattles.

Quisiera agradecer a todas las personas que me apoyaron durante el desarrollo del presente trabajo de graduación y durante mi carrera profesional, principalmente:

A Dios, por iluminar mi camino y ser esa bendición divina en mi vida; a mi mamá Shuandy Alvarado Teni, por darme la oportunidad de crecer en el ámbito de mi interés y por enseñarme a ser una mujer fuerte y aguerrida. Asimismo, quiero agradecer a mi abuelos, Francisco y Elvia por ser fuente de inspiración en cada momento y a mi tia, Jenny Alvarado por su apoyo incondicional durante toda mi carrera universitaria.

A la Dra. Alicia González Manjarrez, Investigadora principal del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su confianza y creer en mi para la realización de esta investigación. Sus consejos y compartir sus conocimientos, me fortalecen como futura científica.

Al Dr. José Carlos Campero Basaldua, técnico del laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), director y asesor principal con quién se llevó a cabo todo este trabajo. Gracias por ser un mentor excepcional, por su paciencia y actitud positiva durante todo el proyecto y por sus enseñanzas que contribuyeron a mi desarrollo personal y profesional.

Al Dr. Diego Archila, principal asesor de la Universidad del Valle de Guatemala, por recomendarme para hacer la pasantía en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y por estar pendiente de los avances del escrito. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Dalia Lau-Bonilla, por su apoyo en la revisión de este trabajo y sus enseñanzas en el área de microbiología que han sido fundamentales para mi desarrollo académico.

A la Dra. Karina Robledo, investigadora del Instituto Potosino de Investigación

Científica y Tencología (IPICYT) por su oportuna intervención para reorientar sobre la técnica empleada en este estudio. Al equipo de Investigación de la Dra. Alicia González Manjarrez, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): Nancy Gutierrez, Sheyla Cruz, Cecilia Carretero, Yamilé Paredes, Yael Tinoco, David González, Honza y Edgar Ramírez, por su acompañamiento y apoyo. Asimismo, quisiera agradecer Dra. Ruth Rincón Heredia, por el espacio y ayuda para utilizar el área de microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para confirmar las cepas etiquetadas en este estudio. Y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT, BECA: IN207424) (<http://dgapa.unam.mx>), Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, beca: 101729) por financiar este proyecto.

A Evangelina Hernández, sus hijos Erick y Nataly, por su cariño y amistad, son como una familia para mi, gracias por la convivencia y por esos momentos inolvidables durante toda mi estancia en la Ciudad de México. A mis compañeros de carrera, especialmente a Melissa Caballeros y Andrés Say, por haberme motivado durante todo el proyecto a distancia y a Pablo Moreno, por su apoyo incondicional desde el primer año de universidad.

Prefacio	IV
Lista de figuras	IX
Lista de cuadros	XI
Resumen	XII
Abstract	XIII
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Justificación	4
4. Marco contextual	5
5. Marco teórico	6
5.1. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	6
5.1.1. Tasa de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
5.1.2. Duplicación del genoma completo y metabolismo fermentativo	8
5.2. Proteínas parálogas y su diversificación	10
5.2.1. Alt1 y Alt2: Un caso de proteínas no parálogas	13
5.2.2. Divergencia en las regiones promotoras de Alt1 y Alt2	14
5.3. Factores de transcripción y regulación génica	16
5.3.1. <i>NRG1</i> como represor en glucosa	18
5.3.2. <i>RTG3</i> como activador de la respuesta retrógrada	19
5.4. Reguladores transcripcionales híbridos	21

5.4.1.	Regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3	22
5.5.	Interacción proteína-proteína e importancia de la localización subcelular de complejos proteicos	26
5.6.	Extensión superpuesta de la reacción en cadena de la polimerasa (OE-PCR-Overlap Extension PCR)	27
5.7.	Recombinación homóloga y transformación de <i>S. cerevisiae</i>	30
6.	Metodología	33
6.1.	Diseño, enfoque y tipo de investigación	33
6.2.	Población y muestra	33
6.3.	VARIABLES	34
6.4.	Hipótesis	34
6.4.1.	Hipótesis nula	34
6.4.2.	Hipótesis alternativa	34
6.5.	Metodología	34
6.5.1.	Cepas y plásmidos	34
6.5.2.	Precultivos de cepas de levadura <i>S. cerevisiae</i>	35
6.5.3.	Precultivos de cepas <i>E. coli</i>	36
6.5.4.	Medios selectivos con antibiótico	36
6.5.5.	Obtención de secuencias de genes y plásmidos	36
6.5.6.	Curvas de crecimiento para células de levadura de <i>S. cerevisiae</i>	38
6.5.7.	Tiempo de incubación para matraces con glucosa o etanol como única fuente de carbono	39
6.5.8.	Cálculos para el análisis de curvas de crecimiento	39
6.5.9.	Herramientas bioinformáticas utilizadas para el diseño de oligos <i>in silico</i>	40
6.5.10.	Diseño de oligos <i>in silico</i> para la construcción de módulos de transformación en <i>S. cerevisiae</i>	41
6.5.11.	Extracción de ADN genómico total de <i>S. cerevisiae</i>	44
6.5.12.	Cuantificación y pureza de ADN genómico total extraído	44
6.5.13.	PCR para obtención de los fragmentos A y C de <i>NRG1</i> y <i>RTG3</i>	45
6.5.14.	Obtención de fragmentos de las proteínas fluorescentes (gen reportero)	46
6.5.15.	Optimización de la técnica OE-PCR para obtener los fragmentos de transformación de interés	49
6.5.16.	OE-PCR para fragmentos A+B , B+C y A+B+C	49
6.5.17.	OE-PCR para obtener el fragmento completo de Rtg3-mCherry	50
6.5.18.	OE-PCR para obtener el fragmento completo de Nrg1-yECitrine	57
6.5.19.	Diseño del protocolo para clonar el fragmento final en un plásmido de replicación de <i>E. coli</i>	59
6.5.20.	Protocolo para transformar <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
6.5.21.	Diseño de protocolo para observar la localización subcelular de las proteínas fluorescentes a través de microscopía con focal.	64

7. Resultados	65
7.1. Caracterización fenotípica de cepas <i>nrg1</i> Δ y <i>rtg3</i> Δ en condiciones de glucosa o etanol como única fuente de carbono comparándola con una cepa silvestre (WT).	65
7.2. Diseño de oligos <i>in silico</i> para obtener el fragmento final de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry	67
7.3. Confirmación de los fragmentos de ORF´s y UTR´s de los genes <i>NRG1</i> y <i>RTG3</i> a partir de ADN total de <i>S. cerevisiae</i> y fragmentos del marcador fluorescente de yECitrine del plásmido pKT0175 y mCherry del plásmido H2B-mcherry	69
7.4. Los fragmentos pares B+C, donde se obtiene la proteína fluorescente con el UTR3´ del gen <i>NRG1</i> o <i>RTG3</i> , son más estables que el fragmento A+B.	72
7.5. Los oligos anidados promovieron el enriquecimiento de los fragmentos finales de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry mejorando la optimización de la técnica de OE-PCR	74
7.6. El fragmento completo de Nrg1-yECitrine demostró ser efectivo etiquetar a <i>NRG1</i> con la proteína fluorescente yECitrine en <i>S. cerevisiae</i>	78
8. Discusión	81
9. Conclusiones	91
10.Recomendaciones/Espectativas	93
11.Bibliografía	95
12.Anexos	102

Lista de figuras

1.	Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	8
2.	Metabolismo fermento-respiratorio en <i>S. cerevisiae</i>	9
3.	Destino de genes parálogos.	11
4.	Mecanismos de algunas proteínas parálogas en <i>S. cerevisiae</i>	12
5.	Expresión de <i>ALT1</i> y <i>ALT2</i> en glucosa-amonio (A) y glucosa-alanina (B).	13
6.	Expresión de <i>ALT1</i> y <i>ALT2</i> en mutantes <i>nrg1</i> Δ y una cepa silvestre en glucosa-amonio y glucosa alanina.	15
7.	Expresión de <i>ALT1</i> y <i>ALT2</i> en mutantes <i>rtg3</i> Δ y una cepa silvestre en glucosa-amonio y glucosa-alanina.	15
8.	Regulación transcripcional de genes eucariotas.	17
9.	Nrg1 como represor de <i>STA1</i>	18
10.	Señalización de la respuesta retrógrada mitocondrial.	20
11.	Ensayo de Co-inmunoprecipitación para demostrar la interacción entre Nrg1 y Rtg3.	23
12.	Fenotipo petite en mutantes <i>nrg1</i> Δ y <i>rtg3</i> Δ	25
13.	Morfología mitocondrial en mutantes <i>nrg1</i> Δ y <i>rtg3</i> Δ	26
14.	PCR de extensión superpuesta.	29
15.	Recombinación Homóloga (RH).	31
16.	Plásmido pKT0175.	37
17.	Plásmido H2B-mCherry.	38
18.	Diseño de oligos para obtener el constructo completo a través de la técnica de OE-PCR.	41
19.	Diseño de oligos para Nrg1.	42
20.	Diseño de oligos para Rtg3.	43
21.	Diseño de oligos de verificación del constructo para cepas transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	43
22.	Diagrama de la amplificación de los tres fragmentos individuales.	49

23.	Optimización de la técnica OE-PCR para obtener el módulo de Rtg3-mCherry.	56
24.	Optimización de la técnica OE-PCR para obtener el módulo de Nrg1-yECitrine	59
25.	Plásmido pRS416.	60
26.	Diagrama de flujo de la metodología utilizada en este trabajo. .	64
27.	Velocidad de crecimiento (μ) en <i>S. cerevisiae</i> utilizando glucosa o etanol como única fuente de carbono.	66
28.	Fragmentos individuales para <i>NRG1</i> y <i>RTG3</i> (A, B y C): . .	71
29.	Fragmentos pares de <i>NRG1</i> y <i>RTG3</i>	73
30.	Optimización del fragmento completo de Rtg3-mCherry . . .	75
31.	Optimización del fragmento completo de Nrg1-yECitrine . .	77
32.	Fragmentos completos de <i>NRG1</i> y <i>RTG3</i>	78
33.	PCR de confirmación para la cepa etiquetada Nrg1-yECitrine. 80	
34.	Verificación de ADN genómico y plasmídico.	103
35.	PCR para verificación de los oligos anidados.	104
36.	OE-PCR para los fragmentos pares y completo de Nrg1-yECitrine con 100 ng/ μ L de cada constructo.	104
37.	PCR de comprobación de cepas etiquetadas con Rtg3-mCherry.105	
38.	Secuencia +/- 1kb de <i>NRG1</i>	106
39.	Secuencia +/- 1kb de <i>RTG3</i>	107

Lista de cuadros

1.	Variables de la investigación	34
2.	Cepas utilizadas en el estudio	35
3.	Receta para la amplificación de los fragmentos A y C.	45
4.	Condiciones para la amplificación de los fragmentos A y C.	46
5.	Receta para digestión del plásmido con la enzima <i>Hind III</i>	47
6.	Receta para la amplificación del fragmento B.	48
7.	Condiciones de amplificación del fragmento B.	48
8.	Receta de PCR para fusión de los fragmentos pares de <i>RTG3</i>	51
9.	Templado en nM/ uL de los fragmentos para fusionar Rtg3 con mCherry.	51
10.	Condiciones de la PCR de fusión de los fragmentos pares de <i>RTG3</i>	51
11.	Receta para la amplificación de los fragmentos pares de <i>RTG3</i>	52
12.	Condiciones de la amplificación de la fusión de los fragmentos A+B y B+C <i>RTG3</i>	52
13.	Receta para la amplificación del fragmento completo de <i>RTG3</i>	53
14.	Templado en nM/ uL de los fragmentos para fusionar <i>RTG3</i> con mCherry.	53
15.	Condiciones de la PCR de fusión para el fragmento completo de <i>RTG3</i>	54
16.	Receta para la amplificación del constructo completo de Rtg3-mCherry.	54
17.	Condiciones de la amplificación del constructo completo de Rtg3-mCherry.	55
18.	Receta para la amplificación del constructo completo de Nrg1-yECitrine.	57
19.	Templado en nM/ uL de los fragmentos para fusionar de Nrg1 con <i>yECitrine</i>	57
20.	Condiciones de la amplificación del constructo completo de Nrg1- <i>yECitrine</i>	58
21.	Receta para la digestión y fosforilación del plásmido y el inserto.	61
22.	Receta para la ligación del plásmido y el inserto.	61
23.	Receta de solución TE/LiOAc.	63
24.	Receta de solución PEG/TE/LiOAc.	64
25.	Valores de velocidad de crecimiento expresado en μ (h-1). (WT: Cepa Silvestre)	67

26.	Lista de oligos para obtener los fragmentos individuales y pares mediante OE-PCR para <i>NRG1</i> y <i>RTG3</i> . (Las letras en negritas representan las regiones de empalme entre la región de ORF5' y UTR3' de cada gen con la proteína fluorescente)	68
27.	Lista de oligos anidados para obtener el constructo final de Nrg1-yECitrine mediante OE-PCR. (Las letras en negrita representan los tres pares de GC y las letras en rojo el sitio de corte de las enzimas de restricción <i>KpnI</i> y <i>XhoI</i>)	69
28.	Lista de oligos anidados para obtener el constructo final de Rtg3-mCherry mediante OE-PCR. (Las letras en negrita representan los tres pares de GC y las letras en rojo el sitio de corte de las enzimas de restricción <i>KpnI</i> y <i>XhoI</i>)	69
29.	Oligos de comprobación de cepas positivas con la etiqueta de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry	105

Los reguladores transcripcionales híbridos han surgido como una ventaja evolutiva en la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que han demostrado modular procesos metabólicos y fisiológicos, como lo es el mecanismo de fermentación y respiración característico de este organismo. El regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 ha sido descubierto recientemente como un complejo que mantiene la integridad del ADN mitocondrial. La presencia de la quimera se determinó mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación, sin embargo, aún se requiere de otros métodos para determinar su estabilidad y regulación en la célula. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo fue optimizar la técnica de PCR de Extensión Superpuesta (OE-PCR) para obtener fragmentos de ADN con regiones complementarias al ORF5' y UTR3' de *NRG1* y *RTG3* fusionados con proteínas fluorescentes con el fin de generar proteínas etiquetadas, siendo Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry. Ambos fragmentos se obtuvieron empleando diferentes pasos en la técnica de OE-PCR; para Nrg1-yECitrine se utilizó una sola reacción que integró la superposición y amplificación de los fragmentos, mientras que, para Rtg3-mCherry se emplearon cuatro reacciones independientes (dos de superposición y dos de amplificación). Además, se confirmó el fenotipo de las mutantes sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ donde se determinó la función principal de la quimera respecto a lo previamente descrito. Por último, se diseñó un protocolo para la ligación del constructo a un plásmido multicopia pRS416 y su posterior transformación en *E.coli*. Se demostró la validación del protocolo de OE-PCR para el fragmento de Nrg1-yECitrine, puesto que, se obtuvieron 6 cepas etiquetadas confirmadas mediante PCR. Para el caso de Rtg3-mCherry, aún no se han obtenido cepas etiquetadas; se recomienda secuenciar ambos fragmentos para determinar errores en las secuencias y repetir la transformación en *S. cerevisiae*. . también, se recomienda un diseño correcto de oligos quiméricos y anidados, así como determinar la temperatura óptima de alineamiento de las reacciones. Se espera observar ambas proteínas etiquetadas mediante microscopía confocal y responder preguntas cómo en qué momento se forma el híbrido y si su localización subcelular influye en su función de mantener el ADN mitocondrial.

Abstract

Hybrid transcriptional regulators have emerged as an evolutionary advantage in *Saccharomyces cerevisiae* yeast, as they have been shown to modulate metabolic and physiological processes, such as the fermentation and respiration mechanism characteristic of this organism. The hybrid transcriptional regulator Nrg1-Rtg3 has recently been discovered as a complex that maintains the integrity of mitochondrial DNA. The presence of the chimera was determined by a coimmunoprecipitation assay, however, other methods are still required to determine its stability and regulation in the cell. For this reason, the main objective of this work was to optimize the Overlap Extension PCR (OE-PCR) technique to obtain DNA fragments with regions complementary to the ORF5' and UTR3' of *NRG1* and *RTG3* fused to fluorescent proteins in order to generate tagged proteins, being Nrg1-yECitrine and Rtg3-mCherry. Both fragments were obtained by employing different steps in the OE-PCR technique; for Nrg1-yECitrine a single reaction integrating the overlap and amplification of the fragments was used, whereas, for Rtg3-mCherry four independent reactions (two overlap and two amplification) were used. In addition, the phenotype of the *nrg1* Δ and *rtg3* Δ single mutants was confirmed where the major function of the chimera was determined with respect to that previously described. Lastly, a protocol was designed for the ligation of the construct to a multicopy plasmid pRS416 and its subsequent transformation in *E. coli*. Validation of the OE-PCR protocol for the Nrg1-yECitrine fragment was demonstrated, since 6 PCR-confirmed tagged strains were obtained. For the case of Rtg3-mCherry, no tagged strains have been obtained yet; it is recommended to sequence both fragments to determine errors in the sequences and repeat the transformation in *S. cerevisiae*. also, a correct design of chimeric and nested primers is recommended, , as well determining the optimal annealing temperature of the reactions. It is expected to observe both tagged proteins by confocal microscopy and to answer questions such as at what time the hybrid is formed and whether its subcellular localization influences its function in maintaining mitochondrial DNA.

CAPÍTULO 1

Introducción

La peculiaridad metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*, que le permite realizar tanto fermentación como respiración, ha sido un área de investigación esencial para entender los mecanismos moleculares y evolutivos que la han reconocido como la levadura de cerveza y pan (Erika Szymanski & Wong, 2019). Se ha identificado que para llevar a cabo estos mecanismos, *S. cerevisiae* ha desarrollado reguladores transcripcionales híbridos. Estos reguladores pueden estar compuestos por proteínas parálogas que surgieron de la duplicación del genoma completo de la levadura o de duplicaciones esporádicas a menor escala, proporcionándole una ventaja evolutiva y robustez fenotípica (Guan et al., 2007). El grupo de investigación de la Dra. Alicia González en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ha sido pionero en el descubrimiento de nuevos reguladores transcripcionales híbridos en *S. cerevisiae*.

Recientemente, este grupo ha descubierto un nuevo regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3, donde Nrg1 actúa como un regulador negativo de los genes que responden a la glucosa (Tae Soo Kim & Kang, 2004) y Rtg3 es un activador de la respuesta retrógrada en la levadura (Jazwinski, 2013), sin embargo, cuando trabajan juntos forman una quimera que regula genes relacionados con el mantenimiento de la integridad del ADN mitocondrial. En cepas mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ*, se observó un fenotipo de colonia pequeño en presencia de glucosa (“petite”) y una incapacidad para consumir etanol como única fuente de carbono. Estos resultados sugirieron un evento de neofuncionalización de Nrg1 respecto a su parálogo Nrg2 para adquirir la función que desempeña en el complejo híbrido (Campero-Basaldua et al., 2023).

La nueva quimera transcripcional Nrg1-Rtg3, fue descubierta al evaluar la divergencia de promotores en las proteínas parálogas Alt1 y Alt2 al observar que no cumplían la misma función de alaninotransferasas. Determinaron que Alt1 posee un

sitio consenso de unión tanto para Nrg1 como Rtg3, mientras que, Alt2 solamente posee una secuencia consenso para Nrg1. De igual forma, demostraron que Alt2 se regulaba negativamente en presencia de alanina en una cepa silvestre y en mutantes sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ se activaba la expresión. Mientras que, Alt1 se regulaba positivamente por alanina y no dependía de Nrg1 ni Rtg3. Esto sugirió que Nrg1 y Rtg3 podrían estar formando un complejo para reprimir la expresión de Alt2 (Márquez Gutiérrez, 2015). La formación del complejo se confirmó mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (Campero-Basaldúa et al., 2023).

Aún se debe de estudiar más a fondo la estabilidad y regulación de este nuevo regulador híbrido en la célula de la levadura. Para seguir con la investigación, se pretende localizar subcelularmente a Nrg1 y Rtg3 etiquetándolas con proteínas fluorescentes, yECitrine y mCherry, respectivamente para luego determinar los compartimientos subcelulares en los cuales operan las proteínas y el complejo transcripcional. La técnica de Extensión Superpuesta de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (OE-PCR, por sus siglas en inglés); ha demostrado ser un método estable para generar proteínas etiquetadas con marcadores fluorescentes (Nelson & Fitch, 2011). El objetivo de esta técnica es emplear una reacción de superposición sin oligos, utilizando fragmentos con regiones complementarias para fomentar el empalme entre ellas y posteriormente, llevar a cabo una reacción de amplificación (con oligos) donde se espera que la ADN polimerasa lleve a cabo la elongación del fragmento y así obtener el producto de interés (Hilgarth & Lanigan, 2021) y (Nelson & Fitch, 2011)

El presente trabajo llevará a cabo la optimización de un protocolo para obtener dos fragmentos de ADN específicos mediante la técnica de OE-PCR, con el objetivo de generar constructos con secuencias específicas de empalme amplias y generar una transformación por recombinación homóloga eficiente en *Saccharomyces cerevisiae* para etiquetar a las proteínas Nrg1 y Rtg3 con marcadores fluorescentes yECitrine (verde) y mCherry (roja). De igual forma, se busca establecer un protocolo de ligación y clonación del fragmento en un plásmido multicopia pRS416 de *E.coli* para simplificar su obtención para estudios posteriores. También, se pretende corroborar la información previamente descrita en nuestro grupo de trabajo sobre la incapacidad de consumir el etanol en mutantes sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ y se desea responder otras preguntas como en qué momento se forma la quimera durante el ciclo de vida de la levadura y cómo su ubicación puede influir en su función del mantenimiento de la integridad del ADN mitocondrial.

2.1. Objetivo general

Establecer la importancia de la localización subcelular de las proteínas que forman parte del regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en cultivos exponenciales de la levadura *S. cerevisiae*.

2.2. Objetivos específicos

- Confirmar el fenotipo de crecimiento de las cepas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ respecto a la cepa silvestre (WT) de *S. cerevisiae*, en glucosa o etanol como únicas fuentes de carbono y sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno.
- Optimizar la técnica de OE-PCR (Overlap Extension PCR) para obtener fragmentos de transformación óptimos de *S. cerevisiae* con la finalidad de etiquetar con marcadores fluorescentes a las proteínas Nrg1 y Rtg3.
- Obtener los fragmentos completos de *NRG1* y *RTG3* con secuencias de enzimas de restricción para su posterior clonación en el plásmido multicopia pRS416 y transformación en *E. coli*.
- Diseñar un protocolo para la transformación de *S. cerevisiae* y observar a través de microscopía con focal las cepas etiquetadas de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry

Justificación

En la levadura *S. cerevisiae*, se ha identificado la necesidad de formar reguladores transcripcionales híbridos que se distinguen de los reguladores convencionales debido a que están compuestos por dos o más proteínas que desempeñan una función específica y peculiar en conjunto, diferenciándose de sus roles individuales (Paiano et al., 2019). Un ejemplo representativo es el complejo Nrg1-Rtg3; ambas proteínas promueven el mantenimiento del ADN mitocondrial cuando actúan como un regulador híbrido. Sin embargo, cuando no están formando este híbrido, regulan genes diferentes involucrados en procesos metabólicos y señalización celular (Campero-Basaldúa et al., 2023). La capacidad de estos nuevos reguladores híbridos para modular una variedad de genes implicados en procesos fisiológicos y evolutivos es crucial para la supervivencia celular. Por lo tanto, el estudio de estos reguladores híbridos proporcionará una comprensión más profunda de mecanismos desconocidos y su importancia evolutiva en el metabolismo de la levadura.

Para una mejor interpretación del regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3, es fundamental determinar la localización subcelular de ambas proteínas para comprender los entornos y momentos en los que operan e influyen en su función al controlar el acceso y disponibilidad de interacción molecular en diferentes condiciones (Scott et al., 2005). Con este fin, proponemos emplear una estrategia innovadora que involucra el uso de marcadores fluorescentes como etiquetas en las proteínas de interés, como la técnica de Extensión Superpuesta de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (OE-PCR por sus siglas en inglés) (Nelson & Fitch, 2011), que ha sido descrita como una metodología versátil y eficaz para generar cepas etiquetadas con proteínas fluorescentes debido a la especificidad del inserto que promueve una recombinación homóloga más eficiente.

CAPÍTULO 4

Marco contextual

La necesidad de comprender mecanismos genéticos y moleculares que dieron lugar al proceso fermento-respiratorio en *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es indispensable para la fabricación de bebidas alcohólicas y en la industria panadera, llevó al grupo de investigación de la Dra. Alicia González en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a desarrollar proyectos sobre el descubrimiento de proteínas parálogas y su regulación transcripcional. Estas proteínas se involucran en procesos metabólicos como la asimilación de nitrógeno y la biosíntesis de aminoácidos que son indispensables para el metabolismo fermentativo y mantenimiento celular. Durante el avance de estos proyectos, surgió el interés de comprender más a fondo la interacción de estas proteínas y su potencial para formar complejos transcripcionales que fomentan nuevas funciones moleculares.

Debido a esto, durante el año 2022 se propuso un nuevo proyecto de investigación titulado “Neofuncionalización en *Saccharomyces cerevisiae*: un nuevo modulador transcripcional quimérico Nrg1-Rtg3 es esencial para mantener la integridad del ADN mitocondrial”, este fue publicado en la revista Royal Society a finales del año 2023. Los resultados que se obtuvieron en dicho estudio fueron inesperados, como la observación de que la ausencia de cualquiera de los dos componentes del regulador quimérico, Nrg1 o Rtg3 ocasionan la falta del regulador Nrg1-Rtg3 y por tanto la pérdida de la integridad del DNA mitocondrial. Así mismo, se encontró que la Neofuncionalización de Nrg1 resultó indispensable para la formación del regulador híbrido. El presente trabajo es una continuación de este proyecto, en el cuál se busca responder preguntas de investigación que ayudarán a seguir estudiando la función del nuevo complejo transcripcional. Este estudio fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT, BECA: IN207424) (<http://dgapa.unam.mx>), Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, beca: 101729).

5.1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

Saccharomyces cerevisiae también conocida como “levadura de cerveza, de panadería o en ciernes”, se clasifica en la división Ascomycota y es un organismo unicelular pequeño aproximadamente de $5\mu\text{m}$, por lo que contiene un núcleo y otros orgánulos acoplados a una membrana (Vanderwaeren et al., 2022). En 1996, *S. cerevisiae* se convirtió en el primer organismo eucariota en haber secuenciado completamente su genoma, utilizando el genoma de referencia de la cepa S288C, generada a través de varios cruces deliberados por Carl Lindegren, y posteriormente, por Robert Mortimer; consta de aproximadamente de 12.5Mb de ADN con 6,275 genes compactados en 16 cromosomas (Engel et al., 2014; W. Liu et al., 2017).

La caracterización del genoma de la levadura ha dado la oportunidad de verificar la similitud que posee con otros organismos más complejos ya que, se demostró que el 23 % de sus genes son homólogos a los seres humanos; por otro lado, también en varios estudios se menciona que el 30 % de los genes implicados en enfermedades humanas pueden tener ortólogos en el proteoma de la levadura (Karathia et al., 2011), por lo que ha sido un andamio en la investigación para estudiar mecanismos de regulación génica, transducción de señales, interacción proteica, metabolismo, ciclo celular, envejecimiento, trastornos neurodegenerativos, entre otros (Karathia et al., 2011). De igual forma, la levadura cumple con otras características que lo han convertido en un microorganismo de investigación eficaz, como la eficiencia de transformación y reparación del ADN mediante recombinación homóloga (RH) para insertar fragmentos de ADN en locis específicos que ha permitido la generación de mutantes (Onyema et al., 2023). La levadura es fácilmente de cultivar en condiciones de laboratorio especifi-

cas debido a su división celular relativamente alta (cada 90 minutos) mediante un mecanismo de gemación, donde una célula hija más pequeña (conocida como yema) con características genéticas idénticas brota de la célula madre durante la mitosis (Onyema et al., 2023), no es patógena y puede tolerar pH bajo, estrés osmótico, altos niveles de etanol y estrés de nutrientes (Onyema et al., 2023). También, se caracteriza por sobrevivir con y sin presencia de oxígeno, estableciendo una ruta de metabolismo fermentativo que le ha permitido aplicarse a niveles industriales en la fabricación de bebidas alcohólicas, pan, bioetanol y metabolitos (Erika Szymanski & Wong, 2019).

5.1.1. Tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Comprender el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido una herramienta valiosa que ha permitido identificar mecanismos fisiológicos y moleculares como procesos metabólicos y la fermentación, que pueden darse en etapas específicas del ciclo de vida de la levadura (Olivares-Marin et al., 2018). Para medir el crecimiento se utilizan tres técnicas: diluciones seriadas para pruebas puntuales, recuento de unidades formadoras de colonias y curvas de crecimiento; estas pueden ejecutarse de manera independiente o en combinación utilizando distintos sustratos, condiciones ambientales, mutantes y productos químicos para investigar respuestas y fenotipos específicos (Olivares-Marin et al., 2018). Uno de los procesos básicos donde se ha aplicado la cinética de crecimiento es la respiración mitocondrial, donde se puede aplicar fuentes de carbono no fermentables como glicerol o etanol (que se metabolizan exclusivamente por respiración mitocondrial), como única fuente de carbono, permitiendo evaluar el crecimiento respiratorio y evaluar la calidad de la actividad de fosforilación oxidativa y comprender de una mejor manera el mecanismo de fermentación (Parrella & Longo, 2008).

Las células de levadura en cultivo pueden seguir un crecimiento muy predecible que se divide en cuatro fases (Figura 1): la primera, latencia (lag): en esta fase no hay crecimiento, las células apenas comienzan a adaptarse a su entorno; la segunda fase, logarítmica (exponencial; log): las células crecen y se dividen rápidamente, en este punto la tasa de proliferación es máxima y constante por lo que el tiempo de generación puede ser de 90 a 120 min en condiciones óptimas; tercera fase, desaceleración o cambio diaúxico: a medida que aumenta el número de células, el crecimiento celular empieza a ralentizarse, ya que algunos parámetros como los sustratos y residuos comienza a ser más significativos, sin embargo, también se puede generar un cambio diaúxico debido al crecimiento fermentativo, donde el etanol es consumido luego de la depleción de glucosa, por lo que se da un cambio en el metabolismo celular que promueve la viabilidad por más tiempo de las células; y cuarta fase, estacionaria: en esta fase no se produce crecimiento debido al consumo total del sustrato (H et al., 2012; Stahl et al., 2004). Debido a la preferencia de la levadura entre el crecimiento fermentativo y respiratorio se puede obtener el significado biológico de parámetros cinéticos como el tiempo de duplicación (D_t) y la tasa de crecimiento específica (μ h⁻¹).

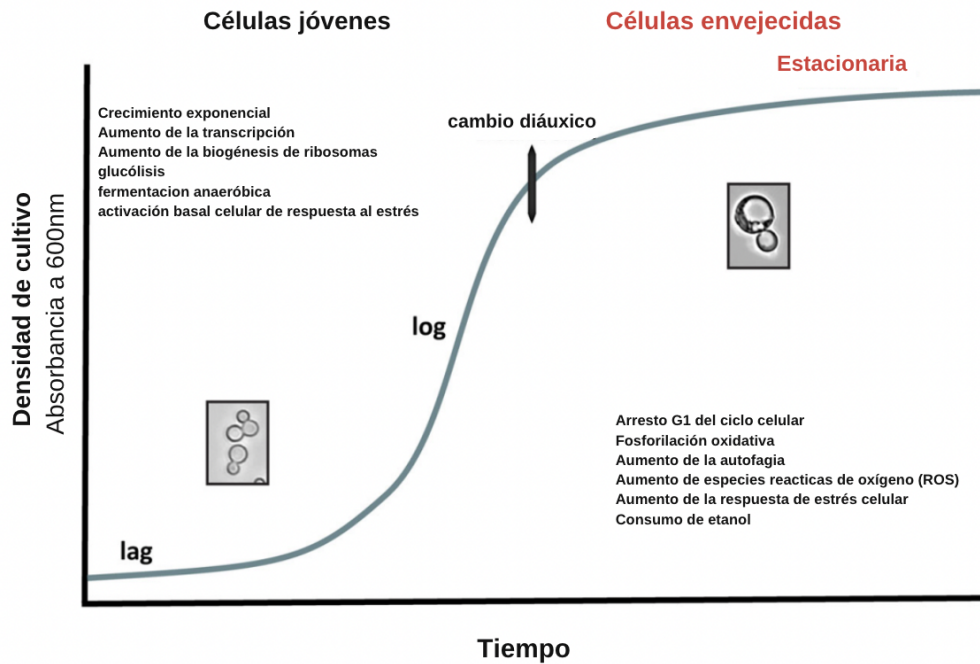


Figura 1: Curva de crecimiento de *S. cerevisiae*.

Crecimiento típico de células de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* en medio rico de extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa (YPD -por sus siglas en inglés) a 30°C por 12 horas. Adaptado y traducido de (Di Gregorio & Duennwald, 2018; H et al., 2012).

5.1.2. Duplicación del genoma completo y metabolismo fermentativo

La secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* reveló bloques de genes duplicados indicando que su linaje proviene de un evento de duplicación del genoma completo (WGD-por sus siglas en inglés) donde se generó una retención y diversificación de genes parálogos u onhólogos, que establecieron el estilo de vida fermentativo o también denominado estrategia “hacer-acumular-consumir” (cuando hay azúcar presente, se produce etanol, se acumula y por último se consume) (Escalera-Fanjul et al., 2019). Esta estrategia se sustenta con el efecto Crabtree, donde se menciona que *Saccharomyces cerevisiae* prefiere fermentar glucosa en etanol, independientemente de la disponibilidad de oxígeno; esto le permite competir con otros organismos y sobrevivir en condiciones de estrés o en bajas concentraciones de nutrientes (Pfeiffer & Morley, 2014). Debido a esto, los genes parálogos se consideran una forma de reserva genética en la cual puede existir una divergencia funcional que ayude a aumentar la supervivencia de la célula por medio de la adaptación hacia el nicho en el que se encuentre (Byrne & Wolfe, 2005).

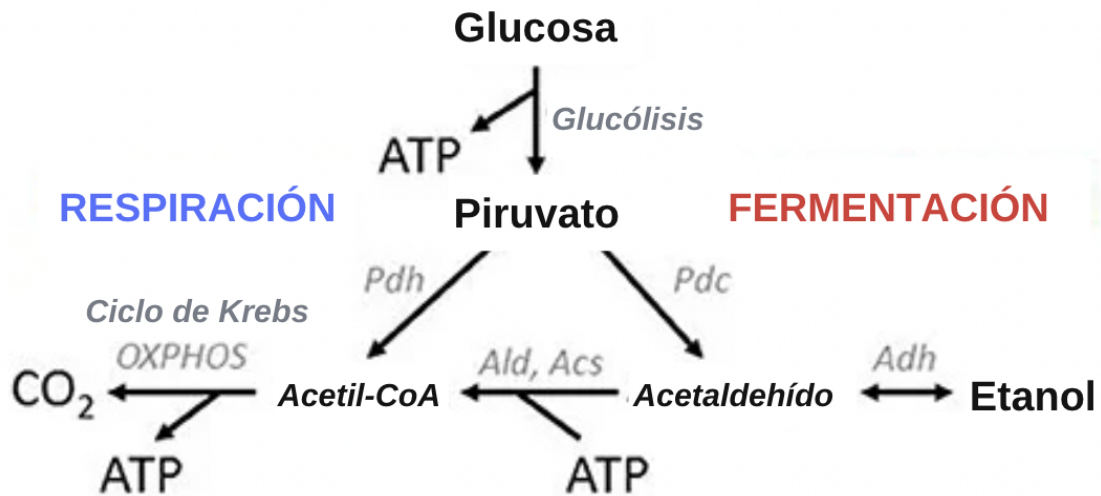


Figura 2: Metabolismo fermento-respiratorio en *S. cerevisiae*.

La glucosa es la fuente principal de carbono, la cuál se convierte en piruvato y puede llegar a convertirse en CO₂ (óxido de carbono - izquierda) en condiciones con oxígeno donde la respiración se da directamente en la célula. Por otro lado, el piruvato también puede transformarse a etanol/alcohol en condiciones sin oxígeno debido a la fermentación de la glucosa. Este producto se acumula y posteriormente la célula lo utiliza para respirar mediante la reacción irreversible de etanol a Acetil-CoA (derecha). La levadura *S. cerevisiae* posee ambas rutas, en la cuál permite respirar y fermentar. Adaptada y traducida de (Pfeiffer & Morley, 2014).

En la Figura 2, se muestra el mecanismo fermento-respiratorio que adquirió la levadura a través del WGD, donde se muestra que se produce ATP por dos vías en presencia o ausencia de oxígeno manteniendo una fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (amonio): Respiración y fermentación; ambas vías inician en la glucólisis y generan 2 moléculas de piruvato y ATP por una molécula de glucosa (Pfeiffer & Morley, 2014). En la fermentación, el piruvato se convierte en etanol a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh-por sus siglas en inglés) donde cumple una reacción irreversible, puesto que, el alcohol puede volverse sustrato y llevar a cabo el proceso de respiración mediante la producción de acetaldehído que se convierte a Acetil-CoA; De igual forma, el ATP se produce independiente del oxígeno, al reciclar el NAD⁺ utilizado en la glucólisis. Por otro lado, en la respiración el piruvato se convierte a Acetil Co-A y se oxida a CO₂ por medio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (OXPHOS- por sus siglas en inglés), produciendo ATP (Pfeiffer & Morley, 2014). El ATP es indispensable para el metabolismo energético celular, ayudando en el crecimiento, el transporte de iones y la biosíntesis de distintos compuestos, siendo indispensable el flujo que se mantiene a través de ambas vías.

De acuerdo con Marcet-Houben & Gabaldón (2015), el linaje de *S. cerevisiae* proviene de una hibridación interespecífica entre una cepa relacionada con el clado *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium* (KLE) y otra relacionada con *Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulaspurula delbrueckii* (ZT). A partir de esto, *S. cerevisiae* se considera un híbrido que resulta de la formación de una aloploidización entre estos dos clados, donde se comparten dos juegos completos de cromosomas, cada uno de una especie distinta (poliploidía), ocasionando que favoreciera el WGD (Escalera-Fanjul et al., 2019). El evento de WGD también se ha observado en otros organismos como *Plasmodium*, *Arabidopsis* y algunos vertebrados, que han demostrado estar beneficiados respecto a la riqueza de especies y a la adquisición de nuevos rasgos (Van de Peer et al., 2017). Por lo tanto, la selección selectiva de genes parálogos del WGD y la aloploidización generó un gran impacto en la evolución y adaptación en el linaje *S. cerevisiae*, pues dieron lugar a un estilo de vida fermentativo.

5.2. Proteínas parálogas y su diversificación

Dentro del mecanismo que da lugar a genes duplicados, además del WGD, también existe la “duplicación a pequeña escala” (SSD-por sus siglas en inglés) que son el resultado de duplicaciones génicas en tándem o segmentarias que dan lugar a una replicación de ADN propensa a errores (Kozul et al., 2004). En *S. cerevisiae*, se sabe que el 18 % del genoma se constituye de WGD (Guan et al., 2007), mientras que el 30 % del resto de los genes provienen del SSD (Kuzmin et al., 2022), de los cuales surgen proteínas parálogas con funciones especializadas dependiendo de su caracterización a través de estos mecanismos de duplicación. Se han establecido distintos escenarios para el destino de los genes duplicados (Figura 2):

- **Pérdida de función:** La redundancia de función no es ventajosa y el gen parálogo puede llegar a ser un pseudogen
- **Amplificación de dosis génica:** Ambas copias poseen una función necesaria para mantener varios procesos fisiológicos que puede representar una ventaja selectiva
- **Sub-funcionalización:** La función ancestral se distribuye en ambas proteínas o se diferencian especialmente en una
- **Neo-funcionalización:** Describe una nueva función para el nuevo par del gen duplicado, mientras que, el primer gen posee la función original.

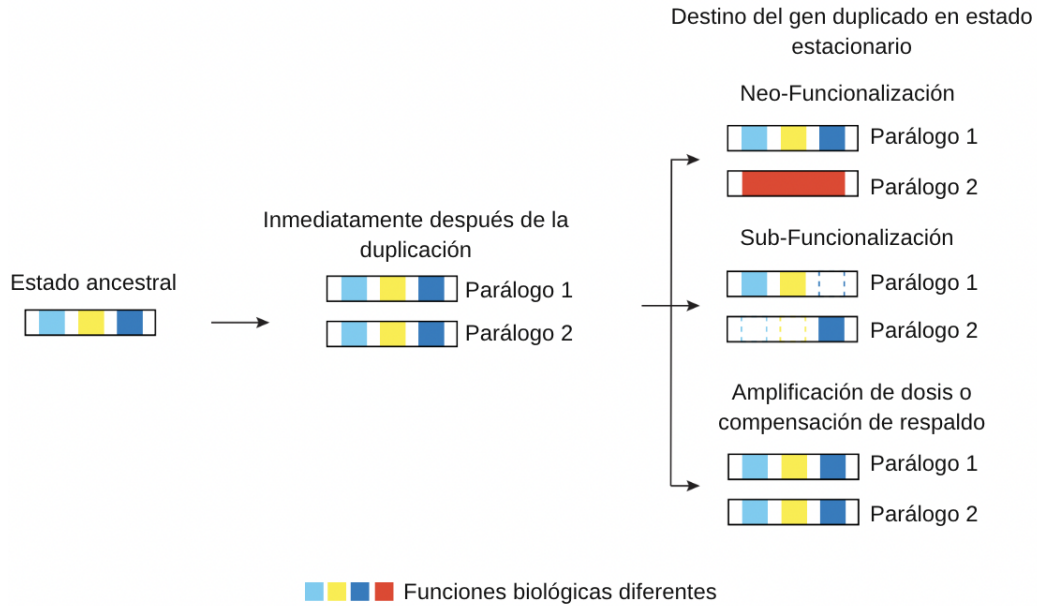


Figura 3: Destino de genes parálogos.

Se muestra el ejemplo de un gen en su estado ancestral donde tras pasar por la duplicación del genoma a gran y pequeña escala, este se copia y ambos se diferencian en distintas funciones biológicas como la Neo-funcionalización, Sub-funcionalización y amplificación de dosis génica. Adaptado y traducido de. (Kuzmin et al., 2022)

Tanto el WGD como el SSD contribuyen a la diversificación funcional de las proteínas parálogas involucradas en el proceso del metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* donde la regulación se diferencia en la expresión de los genes duplicados (Escalera-Fanjul et al., 2019; Guan et al., 2007) (Figura 3). El destino de subfuncionalización ha sido el más prevalente y característico entre las proteínas parálogas, que ha dado lugar a la formación de homo- y hetero- dímeros, dentro de los cuales se pueden mencionar: las enzimas diméricas Eno1 y Eno2, que son enolasas que catalizan la reacción de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, las cuales son reacciones involucradas tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis, y tienen la capacidad de formar homo- y hetero- dímeros (Eno1-Eno2, Eno1-Eno1, Eno2-Eno2) cuya función es la contraria respecto a la que desempeñan en la glucólisis y gluconeogénesis (Ramirez, 2012) (Figura 3); algunas isoenzimas mitocondriales también fueron parte del evento de duplicación, como es el caso de las proteínas parálogas Leu4 y Leu9, donde el heterodímero que forman (Leu4-Leu9) equilibra la producción de piruvato y Acetil-CoA al metabolismo energético usualmente en condiciones respiratorias (López Ortiz, 2015).

Además de la formación de estos hetero-dímeros también, se obtienen casos particulares como la diversificación de proteínas homólogas u homeólogas como es el caso de las aminotransferasas de cadena ramificada Bat1 y Bat2, su localización impide que

5.2.1. Alt1 y Alt2: Un caso de proteínas no parálogas

Las ALT's son alanino aminotransferasas que se han conservado en distintos organismos como plantas, hongos, mamíferos, protistas, etc; Su función principal descrita es catalizar la transaminación reversible entre L-alanina y α -cetoglutarato para formar piruvato y glutamato (Peñalosa Ruiz, 2011). En *S. cerevisiae* se encontraron dos genes parálogos: *ALT1* y *ALT2*, ubicados en un mismo bloque cromosómico duplicado originado por el WGD, por lo que, se propuso que ambas cumplieran el papel de aminotransferasas para la biosíntesis y catabolismo de alanina (Peñalosa-Ruiz et al., 2012). Sin embargo, en varios estudios se evaluó la divergencia evolutiva encontrando que Alt1 constituye una transaminasa que puede sintetizar o degradar alanina, mientras que Alt2 no posee actividad de alanino transaminasa y hasta la fecha, aún no se ha determinado su función (Escalera-Fanjul et al., 2017). De igual forma, determinaron que al tener mutantes *alt1* Δ las pozas de alanina disminuye hasta un 80 %, sugiriendo que puede existir otra ruta involucrada en la biosíntesis de este aminoácido, como se menciona en el artículo de (Márquez et al., 2021). Así mismo se ha demostrado que Alt1 constituye la única enzima capaz de degradar alanina en *S. cerevisiae*. Adicionalmente Alt1 posee una función moonlight que determina su papel en el mantenimiento de la integridad del ADN mitocondrial (Márquez et al., 2021)

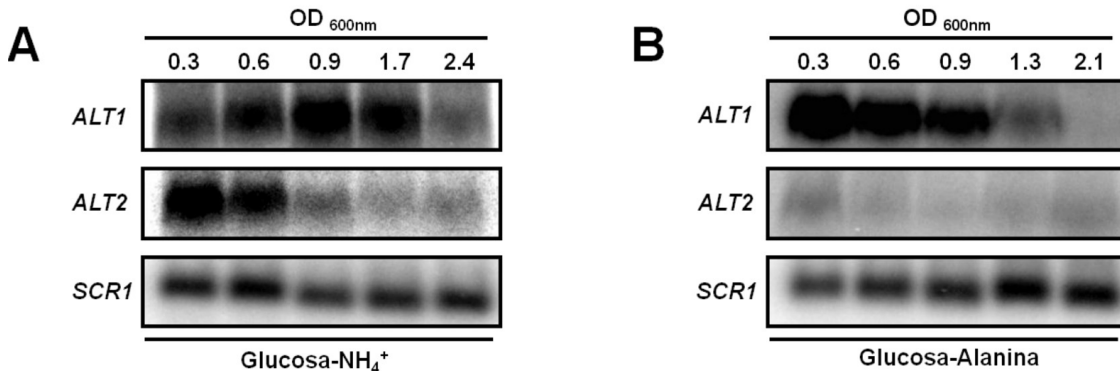


Figura 5: Expresión de *ALT1* y *ALT2* en glucosa-amonio (A) y glucosa-alanina (B).

Se muestra un Northern Blot con las muestras de *ALT1* y *ALT2* experimentales y *SCR1* (Subunidad de ARN de la partícula de reconocimiento de señales-SRP) como control positivo, obteniendo diferentes niveles de expresión a distintas densidades ópticas de crecimiento (0.3-2.4 OD) tomadas a 600nm. La expresión de *ALT2* se reprime en presencia de glucosa-alanina (B) mientras que su expresión se induce en condiciones con glucosa-amonio (A). Obtenido de (Peñalosa-Ruiz et al., 2012).

A pesar de dichos resultados, se determinó que la alanina posee un efecto respecto a la expresión de *ALT2*, puesto que, de acuerdo con Peñalosa Ruiz (2011) & Peñalosa Ruiz et al. (2012), se demostró que en un medio de glucosa-amonio la expresión de

ALT1 es constante respecto a las fases de crecimiento de la levadura, donde su mayor expresión se alcanzó en la fase exponencial (OD_{600} 0.9) y comienza a decrecer en la fase estacionaria (OD_{600} 2.0), por lo que, su activación transcripcional se mantiene constante. Mientras que, la expresión de *ALT2* solamente es significativa durante la fase exponencial (OD_{600} 0.3-0.6), mientras que en el resto de las fases su expresión comienza a disminuir, pero no desaparece. Al tener un medio con glucosa-alanina, la expresión de *ALT1* es similar a la primera condición (García-Campusano et al., 2009), pero para *ALT2* es totalmente lo opuesto, ya que su expresión se reprime casi por completo en presencia de alanina (Figura 5). Con esto, se concluye que *ALT1* juega un papel fundamental en el catabolismo de alanina y por ende, se expresa en presencia de este aminoácido mientras que, *ALT2* posee un comportamiento distinto al de *ALT1*, ya que su expresión se reprime en presencia de alanina.

5.2.2. Divergencia en las regiones promotoras de Alt1 y Alt2

Estudios previos evaluaron la divergencia estructural de los genes Alt1 y Alt2, donde encontraron que los dos poseen una similitud del 67% respecto a su secuencia de aminoácidos y conservan 11 residuos invariables que codifican para aminotransferasas de tipo I (alanina, aspartato y aminoácidos aromáticos) y los de unión del sustrato como el que forma parte del enlace covalente con la enzima PLP (Piridoxal-5-fosfato), indicando también que podrían estar cumpliendo la misma función (Rojas-Ortega et al., 2018). Sin embargo, se sabe que estas proteínas divergieron en su papel fisiológico, pues Alt2 no cumple el rol de alanina aminotransferasa como Alt1 (Peñalosa-Ruiz et al., 2012), dando lugar a que se estableciera un análisis en la reorganización de los cromosomas en diferentes sitios de la cromatina de *ALT1* y *ALT2*. Se demostró una divergencia respecto a sus secuencias promotoras determinando su regulación transcripcional, respecto a su activación y represión en distintas condiciones fisiológicas: glucosa-amonio v.s glucosa-alanina (Márquez Gutiérrez, 2015). Un dato interesante, fue que la expresión de *ALT2* se reprimió en presencia de alanina en una cepa silvestre, como se esperaba, sin embargo, en mutantes *nrg1* Δ o *rtg3* Δ la expresión de *ALT2* se desreprimió significativamente en todas las etapas de crecimiento de la levadura tanto en el medio de glucosa-amonio como en el de glucosa-alanina, (Figuras 5, 6 y 7). Esto llevó a evaluar un alineamiento de promotores para evaluar más a fondo su regulación transcripcional, y se determinó que *ALT2* solamente posee un sitio consenso de unión para *NRG1* en su promotor y no para *RTG3* (Márquez Gutiérrez, 2015), mientras que *ALT1* poseía ambos sitios consenso. Estos resultados, plantearon la pregunta si *RTG3* podría estar trabajando junto con *NRG1* para reprimir la expresión de *ALT2*.

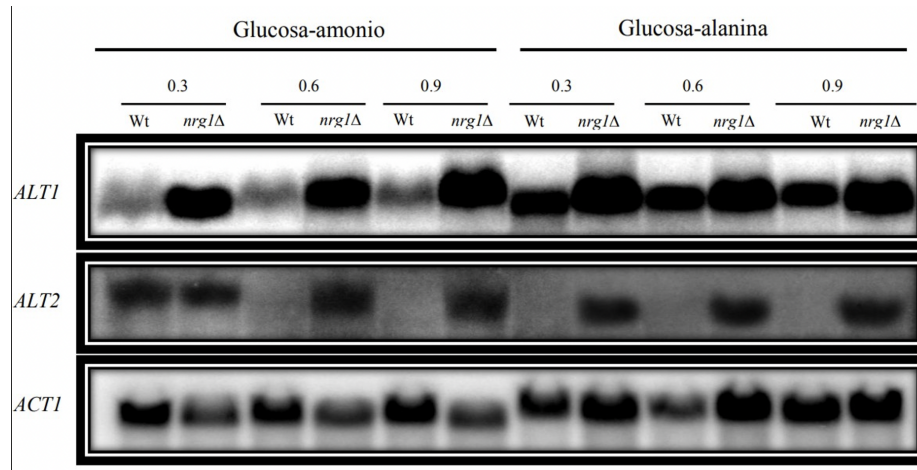


Figura 6: Expresión de *ALT1* y *ALT2* en mutantes *nrg1Δ* y una cepa silvestre en glucosa-amonio y glucosa alanina.

Se muestra un Northern Blot donde se observa a los genes *ALT1* y *ALT2* como muestras experimentales y a *ACT1* (Gen de Actina) como control positivo. En las condiciones de glucosa- amonio y glucosa-alanina se induce la expresión de *ALT1* tanto en cepas mutantes como en las silvestres, mientras que para *ALT2* solamente se expresa en las mutantes *nrg1Δ*. Obtenido de (Márquez Gutiérrez, 2015).

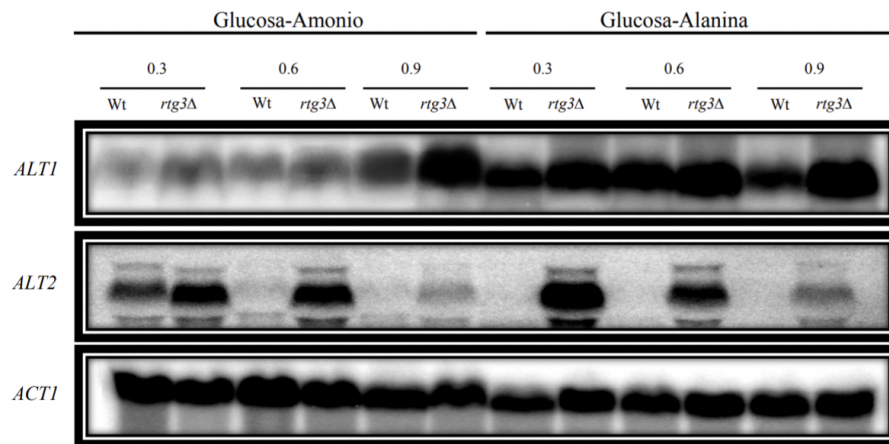


Figura 7: Expresión de *ALT1* y *ALT2* en mutantes *rtg3Δ* y una cepa silvestre en glucosa-amonio y glucosa-alanina.

Se muestra un Northern Blot donde se observan a los genes *ALT1* y *ALT2* como muestras experimentales y a *ACT1* (Gen de Actina) como control positivo. En las condiciones de glucosa-amonioy glucosa-alanina se induce la expresión de *ALT1* tanto en cepas mutantes como en las silvestres, mientras que para *ALT2* solamente se expresa en las mutantes *rtg3Δ*. Obtenido de (Márquez Gutiérrez, 2015).

5.3. Factores de transcripción y regulación génica

Los factores transcripcionales son reconocidos por tres características principales: 1). Pueden reconocer y unirse al ADN en un sitio específico a través de una secuencia corta de unión; 2). Participan en la activación transcripcional donde se activan o reprimen genes y 3). Responden señales regulatorias; usualmente, una sola proteína posee estas tres funciones localizadas en un solo polipéptido (Casamassimi & Ciccodicola, 2019). Sin embargo, también se sabe que las proteínas poseen la capacidad de interactuar con dos o más moléculas pequeñas que generan la formación de complejos con el fin de regular varios procesos fisiológicos que ayudan a estabilizar todos los mecanismos de la célula dependiendo del ambiente en el que se encuentre (Rajagopala et al., 2012).

La regulación transcripcional controla si un ARNm se transcribe o no a partir de un gen en una célula donde se requiere de una región promotora ubicada aguas arriba de la secuencia codificante; el propósito del promotor es unir factores de transcripción a través de secuencias específicas en el ADN como la caja TATA, que ayudan a ubicar a estos moduladores para construir un complejo de iniciación de la transcripción; de igual forma algunos genes poseen regiones que ayudan a aumentar o bloquear la transcripción, llamados potenciadores o represores que pueden responder a estímulos externos para determinar qué genes van a expresarse. Una vez que se ensambla todo el complejo, la ARN polimerasa se coloca en la dirección correcta y se comienza a transcribir el gen («Introduction to Eukaryotic Gene Regulation», 2022) (Figura 8).

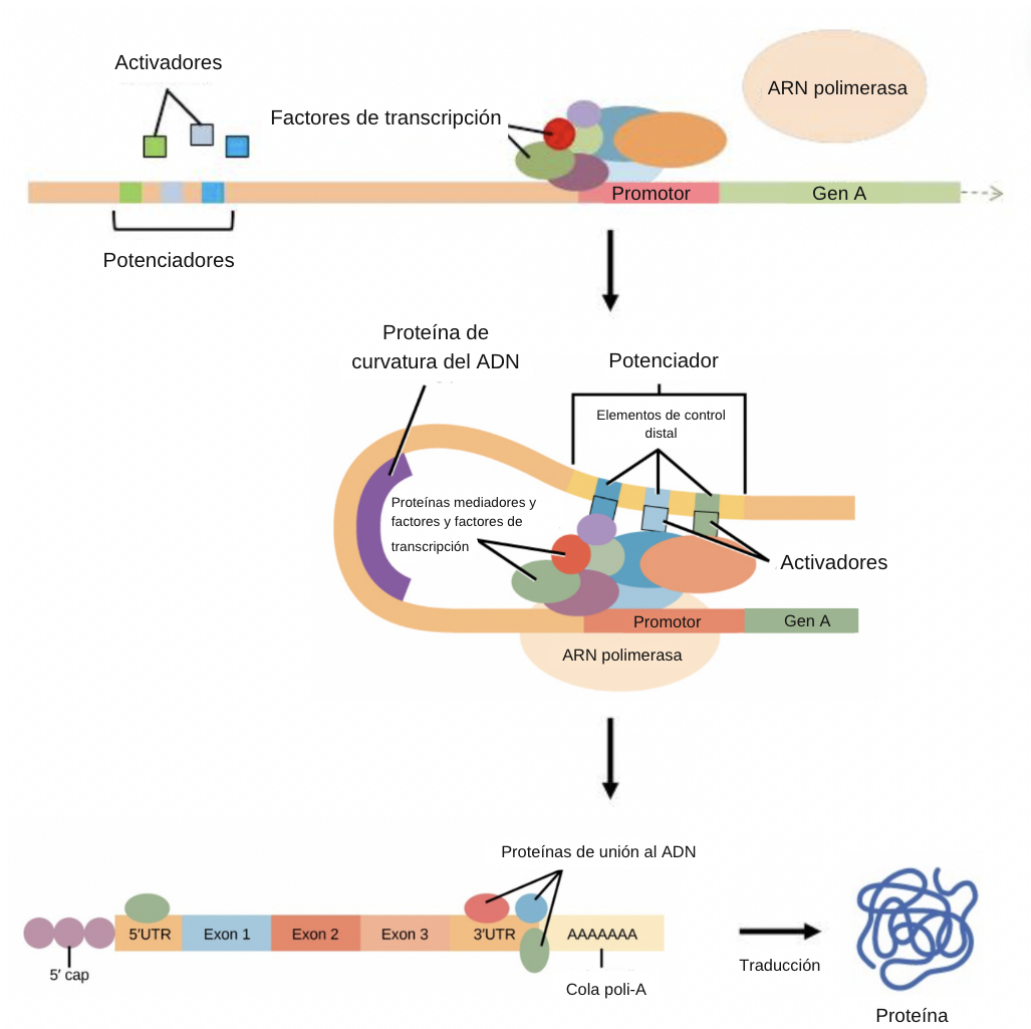


Figura 8: Regulación transcripcional de genes eucariotas.

Cada potenciador se compone por secuencias cortas de ADN denominadas elementos de control distal, estos interactúan con proteínas mediadoras y factores de transcripción que permiten ubicar a la ARN polimerasa en el promotor del gen y activar o reprimir la transcripción. El ARN mensajero resultante posee regulación post-traduccionales que lo hacen viable para la traducción de proteínas. Adaptado y traducido de («Introduction to Eukaryotic Gene Regulation», 2022).

Previo a la traducción de proteínas, el ARNm pasa por una regulación postraduccionales en la cuál se eliminan las regiones no codificantes (intrones) y la estructura final del ARNm posee la región codificante (exones) o el marco abierto de lectura (ORF- por sus siglas en inglés) del gen que se encuentra flanqueada por regiones no traducidas (UTR- por sus siglas en inglés), donde la región justo antes del ORF se llama 5'UTR, mientras que la región después del ORF se llama 3'UTR (Siddiq & Wittkopp, 2022); en estas secciones se colocan otras moléculas como las proteínas de

unión al ADN, la cola Poli-A y 5'-cap, para estabilizar el ARNm para su transporte desde el núcleo al citoplasma y unión a ribosomas (Mitsis et al., 2020) (Figura 8).

5.3.1. *NRG1* como represor en glucosa

La glucosa es la fuente de carbono preferida por *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que, cuando se encuentra presente en el medio, se activa la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa, mientras que los genes que participan para la transformación de otros azúcares, tales como rafinosa/sucrosa, maltosa, galactosa y almidón son reprimidos (Zhou & Winston, 2001). Este fenómeno, es mejor conocido como “represión por glucosa”, que involucra a varios elementos de la maquinaria de transcripción así como interacciones complejas entre los reguladores y la unión al ADN que ayuda a la represión de los genes para el metabolismo de otros azúcares, como por ejemplo: *SUC2*, *GAL1*, *MAL1*, *FLO11* y *STA1* (Tae Soo Kim & Kang, 2004); Dentro de los factores de transcripción que cumplen con este papel se encuentran los parálogos Nrg1/Nrg2 (Negative Regulator of glucose- por sus siglas en inglés-) donde ambos poseen dedos de zinc C2H2 muy similares (Tae Soo Kim & Kang, 2004).

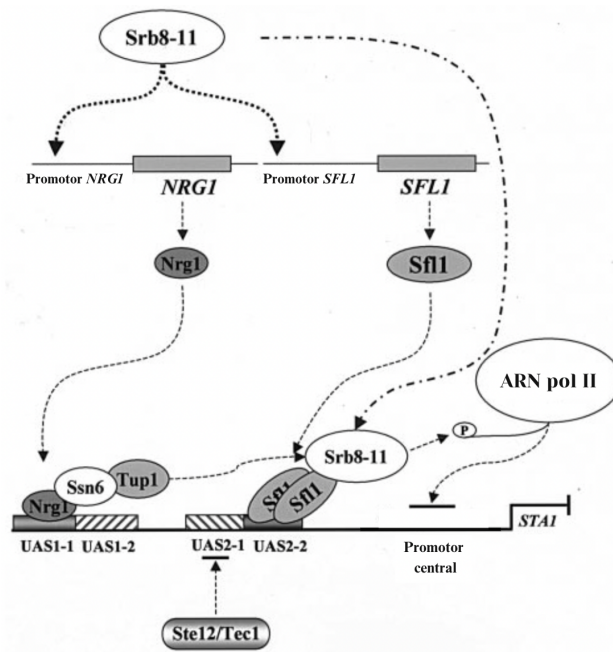


Figura 9: Nrg1 como represor de *STA1*.

Nrg1 actúa como un regulador transcripcional al “desactivar” la expresión de los genes utilizados en el metabolismo de azúcares secundarios como *STA1*, por lo que Nrg1 posee un dominio de unión específico al ADN para luego unirse a otras proteínas que conllevan a toda la cascada de regulación para inactivar la transcripción. Adaptado y traducido de (Tae Soo Kim & Kang, 2004).

En la Figura 9, se observa el papel de *NRG1* que funciona como un represor en la expresión del gen *STA1*, que codifica para una glucoamilasa extracelular que degrada el almidón, por lo que, al estar presente la glucosa la expresión de este gen se reprime a través del complejo que se forma en el promotor *UAS1-1* (Upstream Activating sequence-por sus siglas en inglés-) al unirse a *NRG1* como primer regulador transcripcional, ya que luego se reclutan otros co-reguladores como Ssn6 y Tup1 que cooperan para incorporar a otros represores como Sfl1 en el promotor *UAS2-1* para formar un complejo que ayudan a inactivar la transcripción, evitando que la ARN polimerasa II se una al ADN (Tae Soo Kim & Kang, 2004). Por lo tanto, se sugiere que Nrg1 puede tener un papel similar en el promotor de *ALT2* para reprimir su expresión en una cepa silvestre.

De igual forma, se ha demostrado que Nrg1/Nrg2 también cumplen funciones involucradas en otras respuestas al estrés, que dependen de la presencia de pH alcalino, la salinidad hiperosmótica, la regulación negativa del crecimiento pseudohifal y la formación de biopelículas (Campero-Basaldua et al., 2023). (Campero-Basaldua et al., 2023), sugiere que este par de parálogos surgió de una duplicación esporádica del ancestro de *NRG1* Y *NRG2* (SSD) (duplicación de genes a baja escala “small scale duplication”). Posteriormente, uno de los dos genes, *NRG1* Neo-funcionalizó adquiriendo una nueva función que consiste en su capacidad de unirse a Rtg3 y formar el regulador híbrido Nrg1-Rtg3. *NRG2* no neo-funcionalizó, manteniendo únicamente sus funciones ancestrales y por lo tanto no es capaz de interaccionar con Rtg3.

5.3.2. *RTG3* como activador de la respuesta retrógrada

Las mitocondrias son de gran importancia para los procesos fisiológicos de la célula, pues están involucradas en los mecanismos de producción de energía, estado redox, procesos metabólicos, entre otros (Plocek et al., 2021). La mitocondria puede ser susceptible a sufrir ciertos daños debido al estrés ambiental, por lo que, posee su propio mecanismo de “control de calidad” que le permite mantener su estructura, la organización de su ADN, la producción de intermediarios para el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa a través de la expresión de proteínas involucradas en estos procesos; este mecanismo se llama: “Señalización retrógrada mitocondrial” que funciona como una regulación homeostática para ajustar varias funciones metabólicas y biosintéticas cuando existe una alteración en la función mitocondrial. En esas condiciones la mitocondria envía una señal hacia el núcleo y así éste envía lo necesario para mantener la integridad funcional mitocondrial (Sekito et al., 2000). Se han identificado varios genes que se encuentran involucrados en la transducción de la respuesta retrógrada, tales como *RTG2*, *RTG1* y *RTG3* (Figura 10); *RTG1* y *RTG3* codifican subunidades de un factor de transcripción hetero-dimérico que es parte de la familia “hélice-bucle-hélice/zipper de leucina” y se logra unir a la secuencia GTCAC (caja R) en los promotores de los genes diana (Jazwinski, 2013).

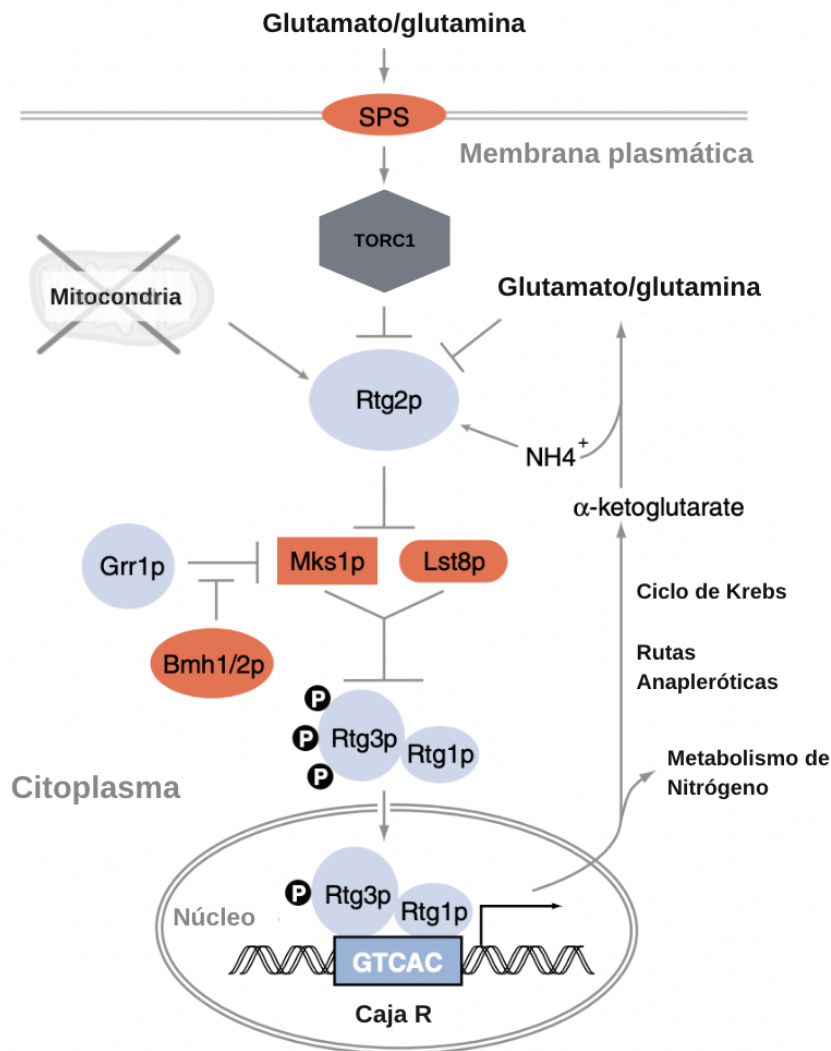


Figura 10: Señalización de la respuesta retrógrada mitocondrial.

Se observa que la respuesta retrógrada depende de varias vías de señalización, donde el principal activador es Rtg2 que desfosforila parcialmente al dímero Rtg1-Rtg3 para translocarlo al núcleo y habilitarlo para que lleve a cabo su papel de activación en la transcripción de los genes blanco implicados en la respuesta retrógrada donde promueven el metabolismo de nitrógeno sintetizando glutamina que también promueve e inhibe a Rtg2; además se puede observar que la vía de *TORC1* y *Mks1* inhiben esta respuesta. Adaptado y traducido de (Márquez Gutiérrez, 2015).

La activación de la respuesta retrógrada comienza con Rtg1-Rtg3 localizado en el citoplasma al ser trasladado al núcleo por parte de *RTG2* que cumple con su papel de fosfatasa al desfosforilar parcialmente a *RTG3* promoviendo su translocación hacia el núcleo y unirse a las secuencias promotoras para activar la expresión de genes

diana para el funcionamiento de este mecanismo; *RTG3* no puede ingresar al núcleo al estar fosforilado por completo, sin embargo, su forma parcialmente desfosforilada es necesaria para activar la maquinaria de transcripción (Jazwinski, 2013). Así mismo, existen otros reguladores, como Mks1, que funciona como modulador negativo al unirse reversiblemente a Rtg2 evitando la hiperfosforilación de Rtg3 y por lo tanto, evita su traslado al núcleo; Mks1 se degrada por ubiquitinación con la ayuda de Grr1 que es parte de la ubiquitin ligasa. Por otro lado, *TORC1* inhibe la respuesta retrógrada al detectar varios sustratos y actúa tanto a nivel de Rtg2 como en Rtg1-Rtg3 (Jazwinski, 2013). Además, cabe mencionar que Rtg1-Rtg3 asegura la continuidad de procesos anabólicos esenciales, como la biosíntesis de glutamato y glutamina que a su vez, puede inhibir la vía *RTG*; sin embargo, esta ruta es esencial para satisfacer la demanda de suministro de nitrógeno en células deficientes en respiración y se ha demostrado que las mutantes *rtg3Δ* son auxótrofas parciales de glutamato (Z. Liu & Butow, 2006).

5.4. Reguladores transcripcionales híbridos

En *S. cerevisiae* gracias al WGD y SDD se ha determinado que el papel de varias proteínas parálogas es de formar hetero- oligómeros que contribuyen a la robustez y plasticidad fenotípica, por lo que también se han formado factores transcripcionales que regulan el metabolismo del carbono y nitrógeno que contribuyen al estilo de vida fermentativo de la levadura (Escalera-Fanjul et al., 2019).

Un ejemplo de regulador transcripcional formado por varios polipéptidos o también conocido como “híbrido”, en hongos ascomicetos es el activador transcripcional híbrido Hap2-3-5-Gln3. El complejo HAP es un activador transcripcional formado por un hetero tetrámero con dominios de unión al ADN constituido por tres de sus polipéptidos: Hap2, Hap3 y Hap5. En tanto que Hap4 constituye el dominio de activación (Bolotin-Fukuhara, 2017). Los 4 dominios (Hap2,3,5,4) constituyen un regulador transcripcional que modula la expresión génica relacionada con la respuesta al estrés oxidativo, la homeóstasis del hierro y la virulencia (Mao & Chen, 2019). El activador transcripcional Gln3 es completamente independiente de HAP y participa en la activación transcripcional cuando existe una privación de aminoácidos en presencia de fuentes pobres de nitrógeno donde es transportado al núcleo para cumplir dicha función, si este no es translocado al núcleo se retiene en el citoplasma y no induce la expresión de genes (Hernández, Aranda, Riego & González, 2011). En el artículo de (Hernández, Aranda, López et al., 2011) se presentan resultados que demuestran que Gln3 es capaz de regular la expresión de *GDH1* (glutamato deshidrogenasa- síntesis de glutamato) y *ASN1* (biosíntesis de asparagina) tanto en medios de cultivo alimentados con fuentes pobres de nitrógeno por ejemplo prolina, pero también en fuentes ricas de nitrógeno (glutamina) . Esto presentaba una paradoja, ya que se había demostrado que en presencia de fuentes ricas represoras del metabolismo nitrogenado, la concentración nuclear de Gln3 era muy baja y por lo tanto no podía activar la

transcripción de sus genes blanco (Hernández, Aranda, López et al., 2011). Un cuidadoso estudio del fenómeno, demostró que en glutamina se formaba un regulador transcripcional híbrido constituido por Gln3 y Hap4 (Hap4-Gln3) que era capaz de activar la transcripción de *GDH1* y *ASN1*, aún en glutamina, ya que Hap4 actuaba como dominio de unión al ADN, con mayor afinidad que Gln3 activando los genes blanco. Quedando establecido que Hap4-2-3-5 y Gln3 poseen un papel como reguladores transcripcionales, distinto al del complejo Hap2-3-5- Gln3 (Hernández, Aranda, López et al., 2011)

5.4.1. Regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3

Se sugiere que este complejo es un regulador híbrido similar a Hap2-3-5-Gln3, pues tanto Nrg1 como Rtg3 cumplen una función distinta individualmente mientras que, cuando forman la quimera Nrg1-Rtg3, su rol es totalmente diferente; dando lugar a la propuesta que considera a Nrg1-Rtg3, como un regulador transcripcional híbrido formado por un heterodímero [(Campero-Basaldua et al., 2023)

De acuerdo con el resultado de la regulación transcripcional de *ALT2*, la cual se activa en mutantes *nrg1Δ* o *rtg3Δ* en medio con y sin alanina, mientras que en una cepa silvestre se mantienen reprimida (Peñalosa-Ruiz et al., 2012) (Figura 6 y 7), dio lugar a que se propusiera que existía una interacción entre Nrg1 y Rtg3 que permitiera modular la expresión de *ALT2*. Con esto, en la Figura 11, se presentan los resultados del artículo “Neofuncionalización en *Saccharomyces cerevisiae*: un nuevo modulador transcripcional quimérico Nrg1-Rtg3 es esencial para mantener la integridad del ADN mitocondrial”(Campero-Basaldua et al., 2023), donde realizaron un ensayo de CoIP etiquetando a Rtg3 con Tap y a Nrg1 con Myc13 (Rtg3-*Tap* / Nrg1-*Myc13*); estas etiquetas provocan la inmunoprecipitación de las proteínas etiquetadas cuando se usa el anticuerpo anti-MYC o anti-TAP que reconocen el epítipo Myc o Tap fusionado al extremo amino o carboxil terminal de proteínas objetivo («Myc-Tag Antibody», 2024).

Las muestras de proteínas obtenidas de cultivos crecidos en presencia glucosa o etanol como fuentes de carbono y GABA y alanina como fuentes de nitrógeno, se corrieron en un gel, obteniéndose una membrana donde se reveló con anti-Tap, dando lugar a los siguientes resultados: Como se observa en la Figura11, en el carril uno y cinco se observa el control positivo donde se obtuvo una banda debido la interacción entre el anticuerpo y epítipo Tap; en el carril dos y seis se presenta la muestra experimental de la cepa en la que Nrg1 se etiquetó con Myc-13 (Nrg1-*Myc13*) por lo que, se observa que al revelarse la membrana con anti-Tap, se obtiene una banda que demuestra que hay una interacción entre Myc -13 y TAP, indicando que si existe una interacción entre las proteínas Rtg3 y Nrg1 tanto en glucosa como en etanol. En el tercer y séptimo carril se presenta un control negativo donde se utilizó un anticuerpo HA+ el cual no es específico para Myc o Tap por lo que no se observa ninguna banda; en el cuarto y octavo carril no se presenta ninguna inmunoprecipitación, dado que las

muestras no se trataron con anticuerpo, por ende, no se observa ninguna banda al revelar con anti-TAP. Por último, en el noveno carril se muestra un extracto celular en el que Rtg3 se etiquetó con TAP que nos permite identificar a la proteína Rtg3-TAP, que constituye el control que muestra el lugar del gel en donde corre Rtg3-TAP. (Campero-Basaldúa et al., 2023; Márquez Gutiérrez, 2015).

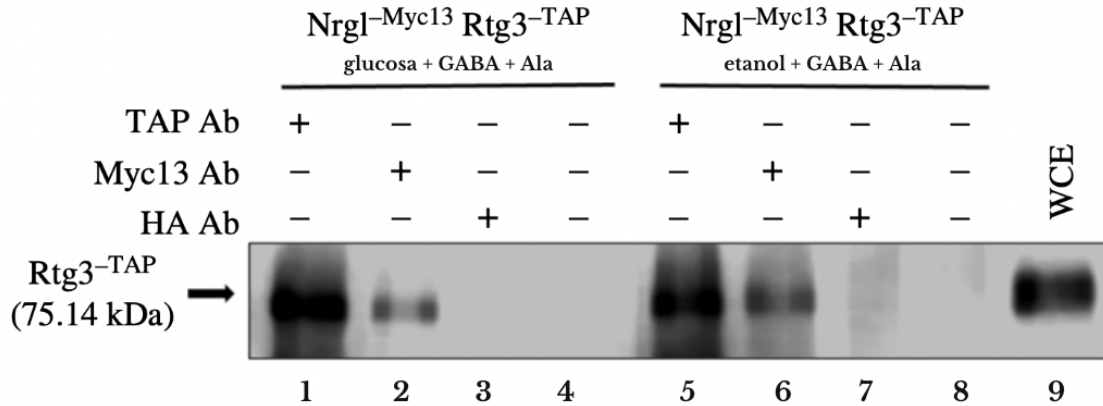


Figura 11: Ensayo de Co-inmunoprecipitación para demostrar la interacción entre Nrg1 y Rtg3.

Se observan dos condiciones: glucosa y etanol en GABA y alanina, en ambas se presentan el control positivo (carril 1 y 5), la muestra experimental (carril 2,6), el control negativo con un anticuerpo no específico (carril 3 y 7), un control negativo con ningún anticuerpo (carril 4 y 8) y una muestra con todo el concentrado de la proteína marcada (carril 9-WCE). Adaptado y modificado de (Campero-Basaldúa et al., 2023).

Por otro lado, en el mismo artículo también determinaron que además de observar el efecto de ambas proteínas en la regulación transcripcional de *ALT2* (Peñalosa-Ruiz et al., 2012); observaron que las cepas mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ* presentan un fenotipo *petite*, es decir que, las cepas son “pequeñas” en glucosa a comparación de una cepa silvestre (Campero-Basaldúa et al., 2023) (Figura 12). Esta característica hace referencia a cepas con un bloqueo en la vía de respiración aeróbica donde se genera ATP debido a mutaciones en el genoma mitocondrial, por lo que, estas colonias de menor tamaño no pueden crecer en fuentes de carbono no fermentables como glicerol y etanol, mientras que en presencia de glucosa forman colonias pequeñas (Day, 2013). Con esto, de igual forma realizaron curvas de crecimiento en etanol como única fuente de carbono y como se esperaba, las cepas mutantes sencillas *nrg1Δ* y *rtg3Δ* no mostraron una fase exponencial, por ende, la respiración no se está llevando a cabo correctamente (Figura 12). En el artículo se propuso que la función mitocondrial se ve afectada por mutantes sencillas *nrg1Δ* y *rtg3Δ*, por lo que, evaluaron la relación del ADN mitocondrial (ADNmit) vs. ADN nuclear, donde notaron que en *nrg1Δ* y *rtg3Δ* la concentración de ADNmit no se detectó; así mismo, evaluaron las cepas

mutantes a través de microscopía confocal utilizando MitoTracker[®] Green para teñir a las mitocondrias, y lograron identificar un desajuste estructural en dicho organelo, pues las “redes” mitocondriales resultaron estar fisionadas a comparación de una cepa silvestre (Figura 13). En consecuencia, concluyeron que Nrg1-Rtg3 es útil para mantener estable la mitocondria en *S. cerevisiae*.

Por último, Campero-Basaldúa et al. (2023), también determinaron que las cepas mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ* presentan un fenotipo petite, es decir que, las cepas son “pequeñas” en glucosa a comparación de una cepa silvestre (Campero-Basaldúa et al., 2023) y que no crecen en etanol (Figura 12). Esta característica hace referencia a cepas con un bloqueo en la vía de respiración aeróbica con mutaciones en la función mitocondrial. Se realizaron curvas de crecimiento en etanol como única fuente de carbono y como se esperaba, las cepas *nrg1Δ* y *rtg3Δ* no mostraron crecimiento en etanol (Figura 12), por ende, la respiración no se está llevando a cabo correctamente. Debido a estos resultados, en el artículo se propuso que la función mitocondrial se ve afectada por mutantes sencillas *nrg1Δ* y *rtg3Δ*, por lo que, evaluaron la relación del ADN mitocondrial (ADNmit) vs. ADN nuclear, donde observaron que en mutantes *nrg1Δ* o *rtg3Δ* la concentración de ADNmit fue muy baja, prácticamente no detectable, con respecto a los controles silvestres *NRG1* o *RTG3*. Se llevaron a cabo observaciones microscópicas de las mutantes, a través de microscopía confocal utilizando MitoTracker[®] Green para teñir a las mitocondrias, y se identificó un desajuste estructural en dicho organelo, pues las “redes” mitocondriales resultaron estar fisionadas a comparación de una cepa silvestre (Figura 13). En consecuencia, se concluyó que el heterodímero Nrg1-Rtg3 juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma mitocondrial en *S. cerevisiae*.

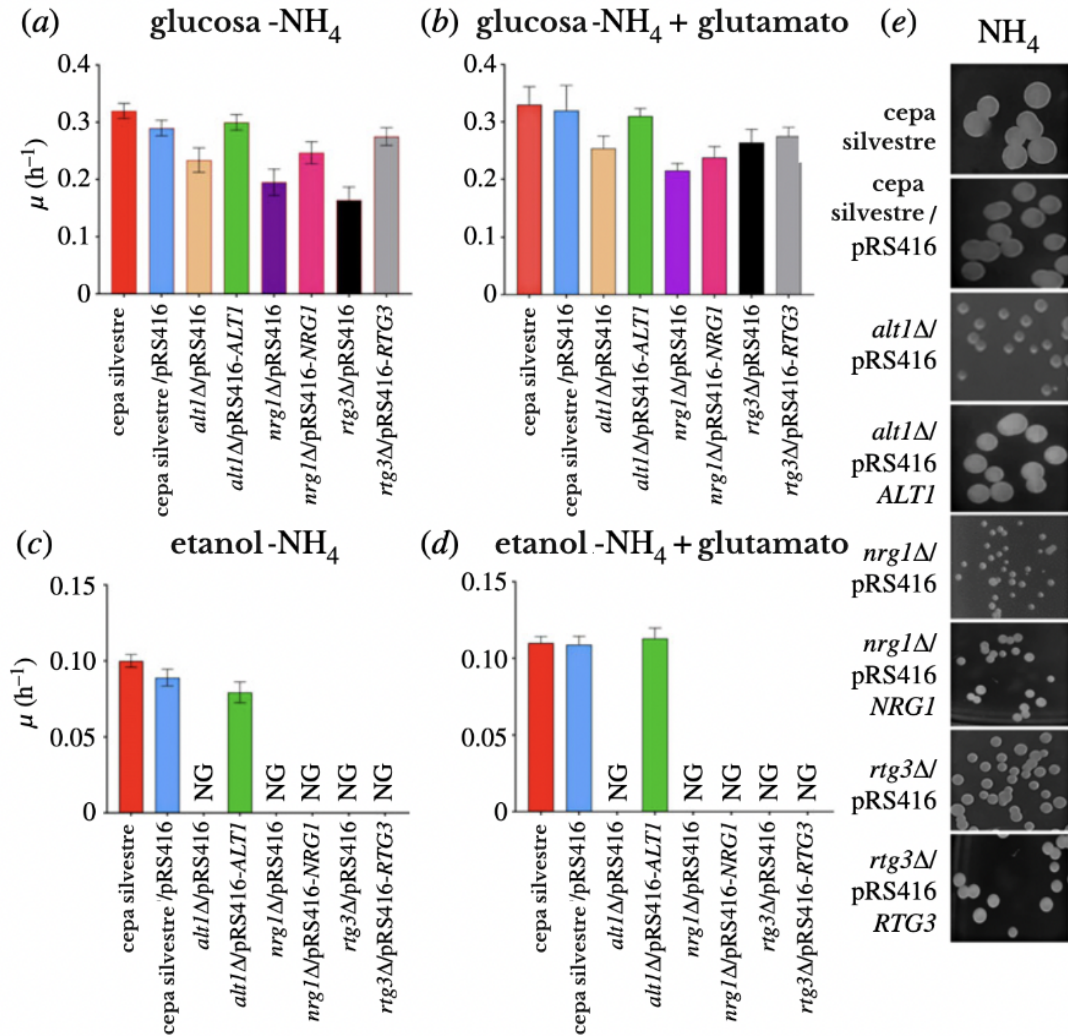


Figura 12: Fenotipo petite en mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ*.

(a) tasa de crecimiento específica en Medio Mínimo (MM) glucosa 2%-Amonio (40mM); (b) tasa de crecimiento específica en MM glucosa 2%-Amonio (40mM) + glutamato (5mM); (c) tasa de crecimiento específica en MM etanol 2% - Amonio (40mM); (d) tasa de crecimiento específica en etanol 2%-Amonio (40mM) - glutamato (5mM). Se presentan resultados de tres experimentos independientes y (e) tamaño de colonias en medios con glucosa 2% y amonio (40mM), las placas se incubaron a 30°C por 3 días. Se observa la cepa silvestre, la cepa silvestre con un plásmido vacío pRS416 donde se muestra el mismo fenotipo, un control *alt1Δ* donde el gen se involucra en la regulación mitocondrial, un control *alt1Δ* donde se le revierte el gen en un plásmido pRS416 y vuelve a presentar el fenotipo silvestre; Luego, se observa a *nrg1Δ* y *rtg3Δ* donde presenta un resultado similar el control de *alt1Δ*, pero en este caso al devolverle el gen no revierte su función a un fenotipo silvestre. Adaptada y traducida de (Campero-Basaldúa et al., 2023).

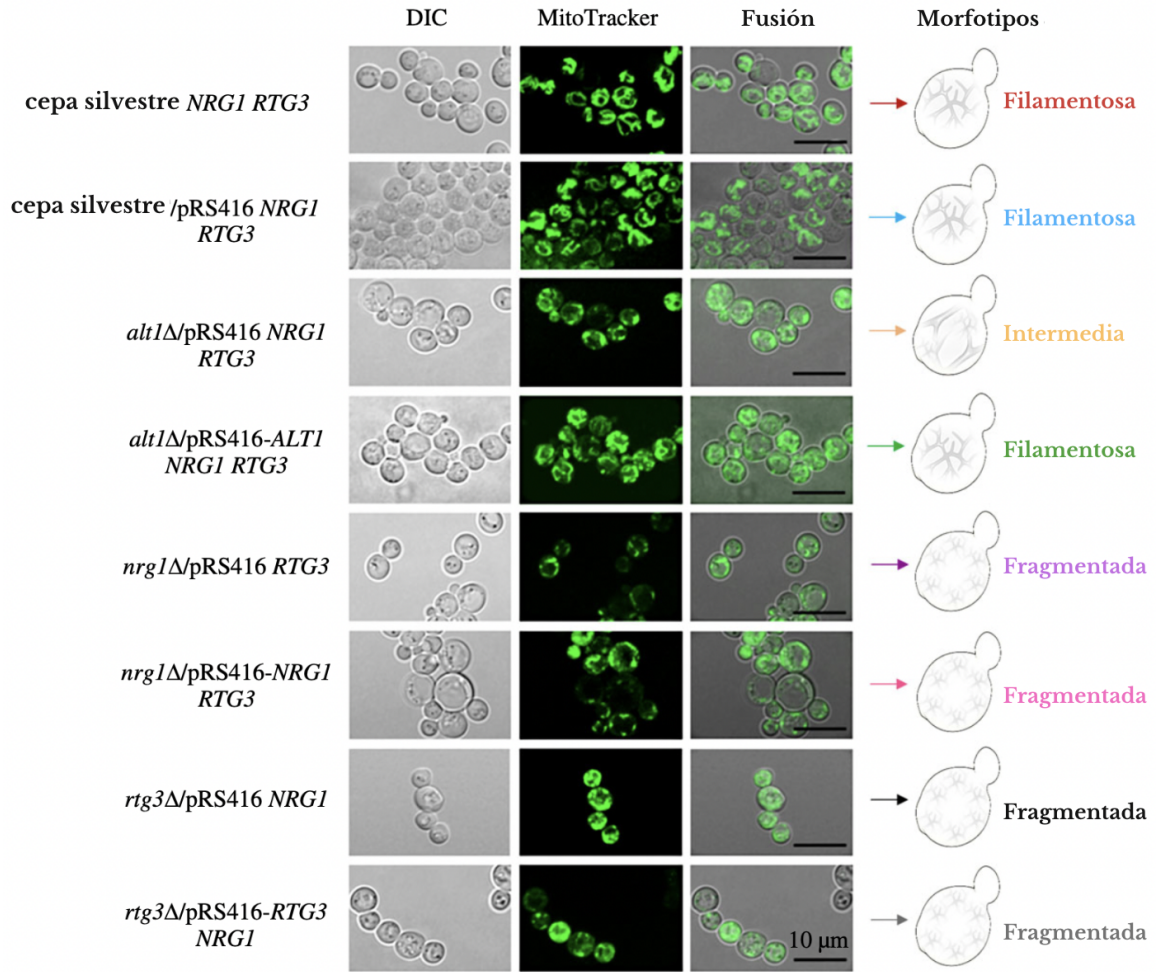


Figura 13: Morfología mitocondrial en mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ*.

Se utilizó tinción mitocondrial con MitoTracker Green FM 9074 (Molecular Probes) para determinar la morfología mitocondrial en cada cepa. La barra de escala negra corresponde a 10m. Las mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ* muestran redes mitocondriales totalmente fisionadas y no revierten el fenotipo silvestre como el control *alt1Δ*. Adaptada y traducida de (Campero-Basaldua et al., 2023).

5.5. Interacción proteína-proteína e importancia de la localización subcelular de complejos proteicos

Las proteínas en los sistemas biológicos rara vez actúan de forma aislada, ya que se unen a otras biomoléculas que suelen ser proteínas para auto-asociarse y formar dímeros u oligómeros de orden superior, tanto en aislamiento relativo como dentro de redes y cascadas de interacción proteica que son clave para la regulación de en-

zimas, canales iónicos, receptores y factores de transcripción (Marianayagam et al., 2004). Los cambios en las interacciones proteína-proteína pueden tener consecuencias importantes en la aptitud del organismo, ya que puede ser o no beneficiosas. En *S. cerevisiae* y *Drosophila melanogaster* la interacción proteica puede llegar a ser muy básica, sin embargo estos complejos se encargan de delimitar las funciones metabólicas dentro de la célula (Makino & Gojobori, 2007). Por lo tanto, se puede decir que estas interacciones son uno de los componentes más importantes de las redes biológicas y que la evolución proteica depende de sus interacciones y funcionalidad (Makino & Gojobori, 2007).

Una de las características importantes entre la interacción de proteínas es el compartimiento subcelular correcto para llevar a cabo sus funciones (Marianayagam et al., 2004), donde la identificación de la localización de las proteínas a menudo juega un papel importante en la caracterización de la función celular de proteínas hipotéticas o recientemente descubiertas que proporcionan información sobre procesos celulares globales (Scott et al., 2005). Para determinar la localización subcelular de una proteína, su gen correspondiente normalmente se fusiona con un indicador o se etiqueta con un epítipo, estos se colocan en los extremos N o C de los genes diana, siendo una elección a considerar para obtener datos de localización precisos, puesto que, los genes pueden tener secuencias importantes como péptidos de direccionamiento mitocondriales y nucleares, además de otras funciones regulatorias que al momento de alterarlas, puede ocasionar resultados anómalos (Kumar et al., 2002). También, se debe verificar el potencial de expresión del gen de interés, para que la proteína no se encuentre débilmente expresada y por lo tanto no se produzca lo suficiente para ser visualizada mediante microscopía de fluorescencia (Kumar et al., 2002). Por estas razones, es de fundamental importancia utilizar metodologías que permitan etiquetar correctamente y sin afectar su función a las proteínas cuya localización nos interesa identificar.

5.6. Extensión superpuesta de la reacción en cadena de la polimerasa (OE-PCR-Overlap Extension PCR)

La transformación en *Saccharomyces cerevisiae* ha surgido por la necesidad de modificar su genoma mediante la inserción de cassettes para la expresión de genes heterólogos que permitan realizar mutaciones puntuales, deleciones de genes, reordenamientos cromosómicos como translocaciones e inversiones, etiqueta de proteínas específicas, sobreexpresión de promotores, etc; la construcción de cepas modificadas conllevan características diferentes con el objetivo de comprender mecanismos moleculares, fisiológicos y genéticos (Stepchenkova et al., 2023). Para llevar a cabo este proceso, se requieren de métodos eficientes de clonación y ensamblaje de ADN; dependiendo del principio científico se pueden utilizar dos técnicas: basadas en res-

tricción/ligación y métodos basados en homología/complementariedad de secuencias. Este último ha tenido una mejor aceptación en el campo debido a su alta versatilidad y eficiencia de ensamblaje (Cataldo et al., 2020)

Uno de los primeros métodos sustentado en la homología de secuencia fue la técnica de Extensión Superpuesta de la Reacción en Cadena de la polimerasa (OE-PCR por sus siglas en inglés); esta metodología sin ligasa logra ensamblar fragmentos de ADN que se amplifican por separado utilizando oligos para producir regiones superpuestas (Figura 14). Luego, los productos se mezclan en una segunda reacción de PCR donde se espera que las regiones superpuestas actúen como cebadores, para que finalmente, en una tercera reacción de PCR la ADN polimerasa se extienda y genere el producto empalmado de interés (Cataldo et al., 2020). Esta técnica ha demostrado ser útil para la fusión de genes híbridos mayores 20 kb y para la introducción de mutaciones en genes específicos, utilizando adicionalmente ADN polimerasas de alta fidelidad que disminuyen la generación de mutaciones no deseadas en el producto final y permiten obtener fragmentos linealizados que simplemente pueden clonarse en un plásmido para su propagación bacteriana (Hilgarth & Lanigan, 2021; Nelson & Fitch, 2011).

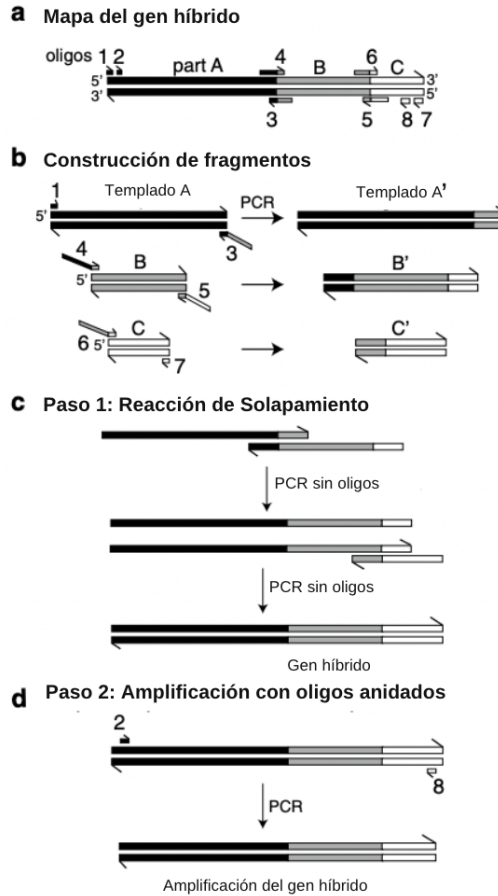


Figura 14: PCR de extensión superpuesta.

Las barras representan cadenas de ADN individuales; los diferentes tonos de las barras son secuencias distintas que se fusionarán. Se muestra el extremo 5' y 3' con una pequeña punta de flecha que sobresale del extremo de cada barra o como una etiqueta. **A)** Mapa general de la secuencias de oligos y el producto híbrido final que consta de tres partes: A, B y C; En la Figura el fragmento A, es la región reguladora 5' del gen *nhr-25* de *C.elegans*, el fragmento B es la secuencia codificante de la GFP y el fragmento C es el 3'-UTR de *nhr-25*. También, se muestran las secuencias correspondientes de los ocho oligos (barras finas) utilizados para generar el gen híbrido indicando la dirección de las secuencias (sentido arriba, antisentido abajo). **B)** Construcción de los fragmentos, los pares de oligos se unen a la secuencia molde y se utilizan para amplificar un fragmento; los extremos 5' y 3' generan porciones del fragmento que solapan con la secuencia molde diferente. **C)** Primer paso de la reacción de Extensión Superpuesta que se produce en ausencia de oligos. La extensión desde los extremos 3' de los fragmentos superpuestos darán lugar a los productos "fusionados", en realidad esto ocurrirá en al menos dos pasos, donde el fragmento A y B se combinan primero y luego, la cadena A-B se une con el fragmento C; la extensión dará lugar al producto híbrido tripartito final. **D)** En el paso 2 de la reacción superpuesta (amplificación), el gen híbrido se amplifica a través de cebadores anidados. Adaptada y traducida de (Nelson & Fitch, 2011).

5.7. Recombinación homóloga y transformación de *S. cerevisiae*

La OE-PCR promueve la maquinaria inherente de Recombinación Homóloga (HR- por sus siglas en inglés) de *Saccharomyces cerevisiae*, donde los productos linealizados se transforman directamente en la levadura y a través de la recombinación homóloga se empalman en la región de interés en todo el genoma (Cataldo et al., 2020). La recombinación homóloga junto con la unión de extremos no homólogos (NHEJ- por sus siglas en inglés) son los dos mecanismos clásicos de reparación de roturas de doble cadena del ADN (DSB- por sus siglas en inglés) causados por diferentes estímulos exógenos o endógenos, como radiación ultravioleta o ionizantes, especies reactivas de oxígeno o pueden darse accidentalmente durante la replicación, que dañan gravemente a la célula (Stepchenkova et al., 2023). NHEJ simplemente liga los extremos del ADN roto sin hacer referencia a la información que podría perderse en el sitio del daño dando lugar a que esté más propensa a errores, mientras que el HR busca una plantilla homóloga con el sitio DSB y la usa para recuperar información, por lo que busca la estabilidad del genoma y se puede considerar como un mecanismo de “copiar y pegar” de alta precisión (Bernardi & Wendland, 2020) (Figura 15).

S. cerevisiae posee un genoma que puede manipularse fácilmente debido a la alta fidelidad de recombinación homóloga promoviendo la simplicidad con la que se pueden generar fusiones de genes indicadores integrados, mientras que la recombinación no homóloga es mucho menos efectiva (Kumar et al., 2002). En diversos enfoques, la recombinación homóloga es un mecanismo obligatorio para insertar fragmentos de ADN en el gen deseado, donde los extremos del producto lineal de una PCR o un plásmido linealizado sirven como sustrato para la recombinación homóloga, o alternativamente, se puede inducir específicamente la reparación de roturas de doble cadena en el gen deseado. El fragmento del ADN del donante debe ser homólogo con el locus diana para la precisión de la recombinación, donde una vez que se crea la reparación de la doble rotura toda la maquinaria de reparación restablece la integridad de la molécula de ADN a través de la inserción del fragmento donante (Bernardi & Wendland, 2020) (Figura 15).

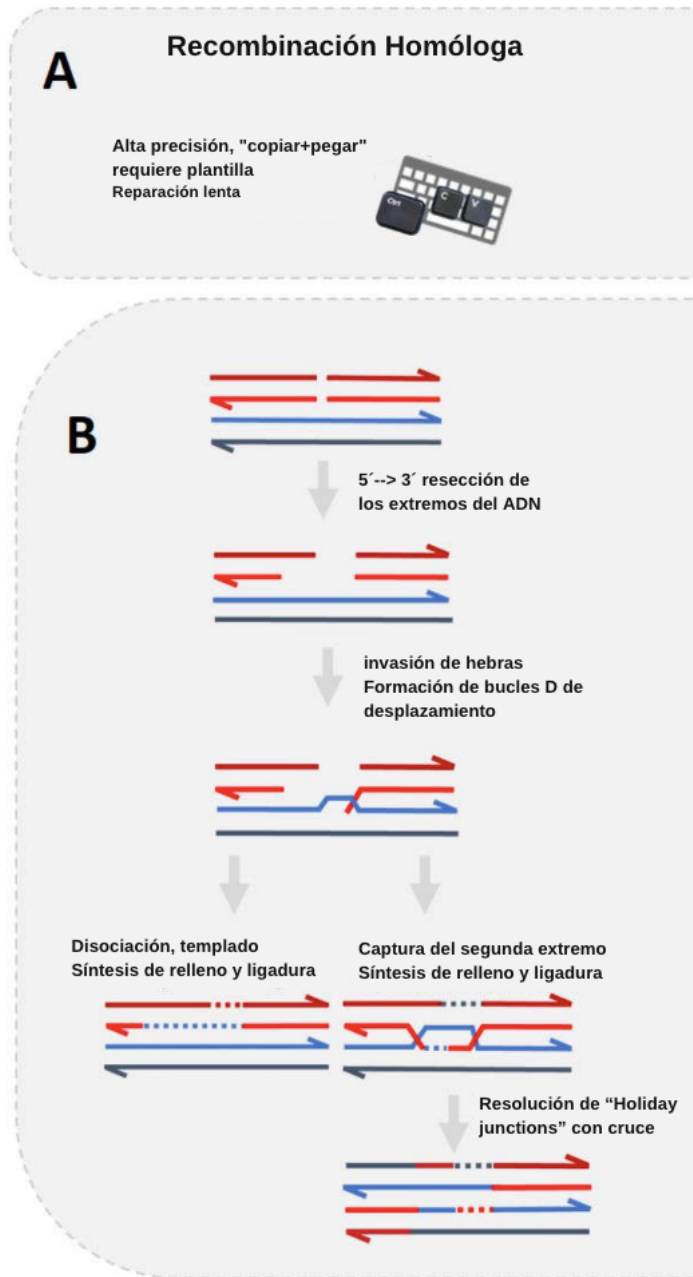


Figura 15: Recombinación Homóloga (RH).

A). El HR requiere de una plantilla y puede tardarse varias horas en completarse, pero es más preciso y se compara con el comando informático “copiar + pegar”. **B).** Después de la resección de cadenas del ADN a través de la exonucleasa Rad51 y otras proteínas, forman un complejo de nucleoproteína que invaden la cadena plantilla para formar un bucle D. Este bucle de desplazamiento puede resolverse mediante el templado o recocido de hebras independiente de la síntesis de relleno, lo que no da como resultado cruces. La reparación de roturas de doble cadena se puede resolver con o sin cruzamiento de los Holiday Junctions. *Adaptada y traducida de (Bernardi & Wendland, 2020).*

Por otro lado, la transformación genética es una forma de captar ADN exógeno para su posterior procesamiento en la célula huésped, por lo que se han desarrollado diferentes técnicas para la transformación genética de *S. cerevisiae* donde se incluyen métodos enzimáticos, químicos y físicos (Bernardi & Wendland, 2020). La levadura posee una pared celular robusta que debe de eliminarse enzimáticamente o con productos químicos para permitir el acceso al ADN; uno de los métodos más comunes debido a su simplicidad, versatilidad y eficiencia y que pueden utilizarse en cualquier entorno, es el método de acetato de litio/ADN portador monocatenario/PEG. También puede ser de gran utilidad el método de electroporación como método físico (Bernardi & Wendland, 2020).

6.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño experimental de la presente investigación permitirá obtener cepas etiquetadas con epitopos fluorescentes, verdes para Nrg1 y rojos para Rtg3, que nos permitan ver la localización diferencial de cada una de las proteínas Nrg1 o Rtg3.

6.2. Población y muestra

Las células de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* se mantienen criopreservadas a $-75^{\circ}C$ en el laboratorio de la Dra. Alicia González Manjarrez, Instituto de Fisiología celular 301-ote UNAM. Los plásmidos manipulados se mantienen en el área común de “Banco de plásmidos” del laboratorio y los oligos se solicitan a la Unidad de Biología Molecular (UBM) del mismo instituto.

6.3. Variables

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Producto de PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite aumentar el número de copias de fragmentos de ADN	Cuantitativa y cualitativa	ng/ μ L
Medio de cultivo	Conjunto de nutrientes necesarios para fomentar el crecimiento y desarrollo de microorganismos	Cuantitativa y cualitativa	OD 600 _{nm}
Fluorescencia	Emisión de fluorescencia, observada mediante microscopía confocal, resultado de la excitación de etiquetas fluorescentes en proteínas específicas.	Cualitativa	No aplica

Cuadro 1: Variables de la investigación

6.4. Hipótesis

6.4.1. Hipótesis nula

El diseño e implementación del protocolo será efectivo para determinar la localización subcelular de las proteínas que forman parte del regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en *Saccharomyces cerevisiae*

6.4.2. Hipótesis alternativa

El diseño e implementación del protocolo no será efectivo para determinar la localización subcelular de las proteínas que forman parte del regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en *Saccharomyces cerevisiae*

6.5. Metodología

6.5.1. Cepas y plásmidos

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y sus mutantes utilizadas en este estudio de describen a continuación:

Cepa	Genotipo	Descripción	Fuente
Cla 1 Silvestre (WT)	<i>MAT alfa ura3- leu2- NRG1, RTG3</i>	Cepa silvestre auxótrofa de Uracilo y Leucina utilizada como control de determinación de los fenotipos mutantes	(Valenzuela et al., 1995)
Cla 11-713	<i>MAT alfa ura3- leu2- RTG3nrg1Δ::KanMX4</i>	Mutante sencilla con delección del gen <i>NRG1</i> . Posee resistencia a G418 * y es auxótrofa de Uracilo y Leucina	(González et al., 2017)
Cla 1-3	<i>MAT alfa ura3- leu2- glutamico- NRG1, rtg3Δ::KanMX4</i>	Mutante sencilla con delección del gen <i>RTG3</i> . Posee resistencia a G418 y es auxótrofa de Uracilo, Leucina y Glutamato.	(Campero-Basaldúa et al., 2023)

Cuadro 2: Cepas utilizadas en el estudio

Las cepas con los genes noqueados solamente se utilizaron para la metodología de curvas de crecimiento; mientras que, la cepa silvestre si se manipuló durante todo el trabajo.

6.5.2. Precultivos de cepas de levadura *S. cerevisiae*

Para los precultivos de *S. cerevisiae* se utilizó 1 litro de medio rico de Extracto de Levadura Peptona de caseína y Dextrosa (YPD -por sus siglas en inglés). Este medio se compone de: extracto de levadura 1 %, peptona de caseína 2 %, dextrosa anhidra 2 %, agar 2 % en agua bidestilada. Por otro lado, se empleó medio mínimo (MM) líquido para las curvas de crecimiento compuesto por: Stock de vitaminas 1x, stock de trazas 1x, stock de sales 10x, dextrosa o etanol al 2 % como fuente de carbono, sulfato de amonio al 5 % como fuente de nitrógeno y agua bidestilada. En este caso, se adiciona a cada medio mínimo los aminoácidos necesarios dependiendo de la auxotrofia de la cepa: uracilo (20mg l^{-1}), 7 mM leucina o ácido glutámico (20mg l^{-1}). Los precultivos se dejan incubando por 14-16 hrs con agitación constante de 250 rpm a 30°C , los estriados de las cepas en las placas de agar se dejan incubando por 48hrs con las mismas condiciones.

6.5.3. Precultivos de cepas *E.coli*

El medio rico utilizado para los pre cultivos de *E.coli* fue LB (Luria-Bertani) donde 1L se compone de : Triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, cloruro de sodio 1 % y 2.5 % de agar. Los precultivos se incuban con agitación constante de 250 rpm a 37°C por 16hrs.

6.5.4. Medios selectivos con antibiótico

Para levaduras se utilizó Geneticina (G418) con una concentración de 200 mg/mL y para bacterias se utilizó el antibiótico Ampicilina (AmpR) a una concentración de 100mg/mL. En ambos casos el antibiótico se colocó al medio después de esterilizar a una temperatura menor de 45°C , manteniendo el área en condiciones asépticas (bajo mechero).

6.5.5. Obtención de secuencias de genes y plásmidos

Las secuencias completas de los genes *NRG1* y *RTG3* se obtuvieron a través de la “base de datos del genoma de *Saccharomyces*” (*Saccharomyces genome database - SGD-*); *NRG1* (ID SGD: S000002450) y *RTG3* (ID SGD: S000000199) para el análisis de secuencia se tomó un tamaño de ± 1 kb para ambos genes (Figura 38 y 39-Anexos). Las secuencias de los plásmidos se recopilaron de la base de datos de Addgene, donde se utilizó el plásmido pKT0175 (ID: Addgene n^o.8733), que posee el inserto de la proteína fluorescente yECitrine (Figura 16) y el plásmido H2B-mCherry (ID: Addgene n.^o 20972), con el inserto de la proteína fluorescente mCherry (Figura 17).

El plásmido pKT0175 fue proporcionado por el laboratorio de la Dra. Alicia González y el plásmido H2B-mCherry fue proporcionado por el Laboratorio del Dr Roberto Coria, ambos clonados en la cepa de *E.coli* DH5 α . En la presente investigación, el plásmido pKT0175 se utilizó para etiquetar a Nrg1y el plásmido H2B-mcherry para etiquetar a Rtg3 en la posición C-terminal de cada proteína manteniendo el mismo marco de lectura. (Figuras 16, 17, 18, 19)

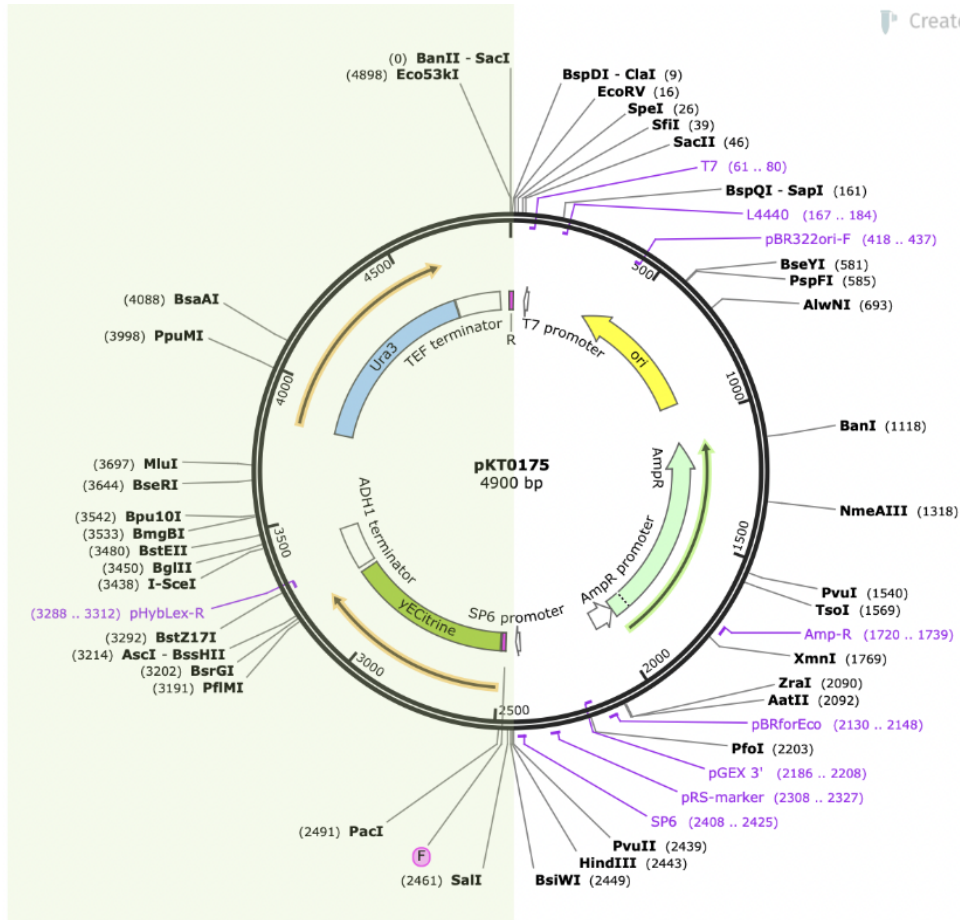


Figura 16: Plásmido pKT0175.

Posee la secuencia del inserto del marcador fluorescente yECitrine que es una variante de GFP optimizada con codones, el marcador de selección en levadura es URA3⁻ y para su clonación en la cepas de *E.coli* DH5 α posee la resistencia a ampicilina (Addgene n°.8733) adaptado en Snapgene: Se colocó como “future” la secuencia de yECitrine (verde) y la secuencia de URA3⁻ (celeste). La parte sombreada (verde claro), es el fragmento de interés final para la construcción de la cepa con Nrg1 etiquetado con yECitrine.

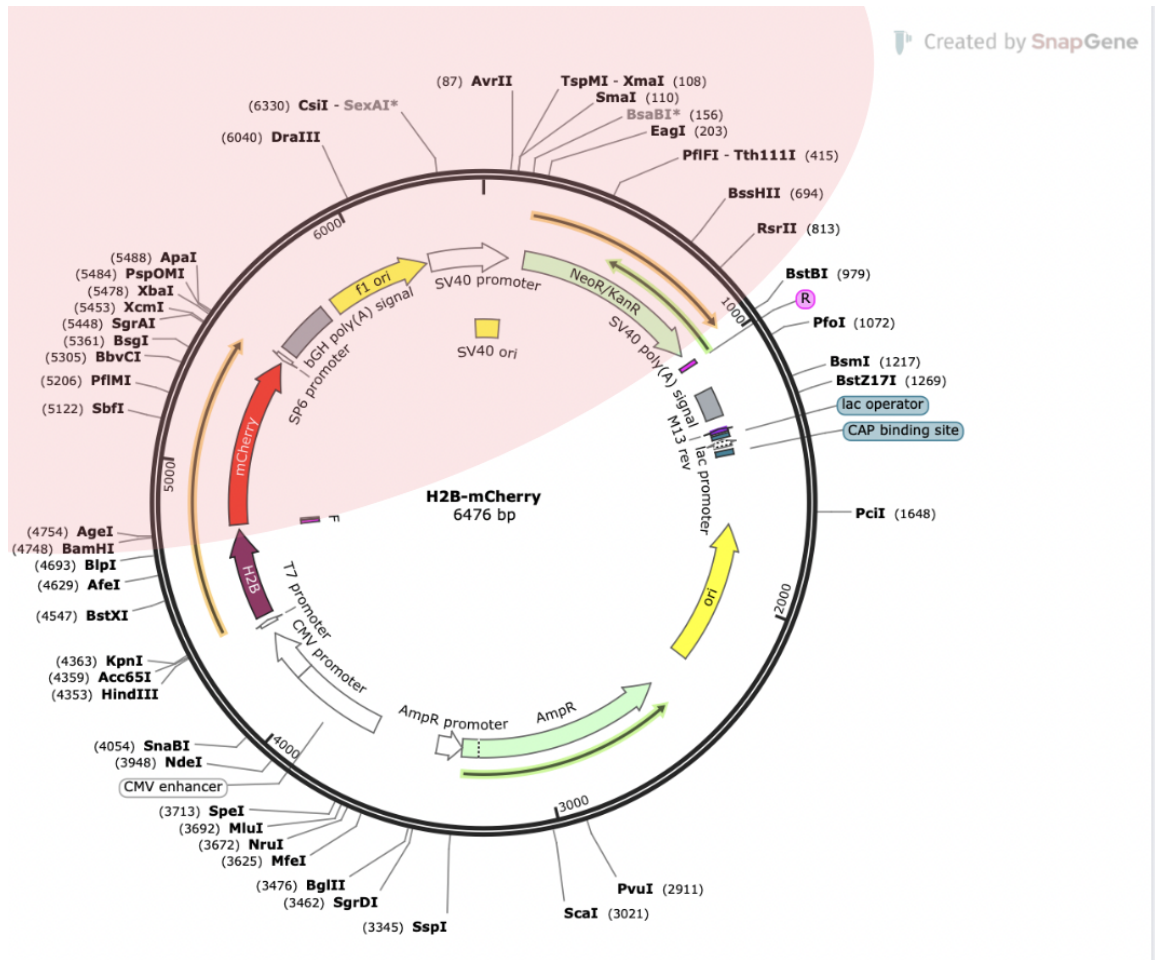


Figura 17: Plásmido H2B-mCherry.

Posee la secuencia del inserto del marcador fluorescente mCherry (color rojo) , el marcador de selección es resistencia a Kanamicina/Neomicina (selección con G418 en levadura) color verde claro y para su clonación en la cepa de *E. coli DH5α* posee la resistencia a ampicilina (verde claro) (Addgene n.º 20972) obtenido de Snapgene: sin modificaciones. La parte sombreada (rosada), es el fragmento de interés final para la construcción de la cepa con Rtg3 etiquetado con mCherry.

6.5.6. Curvas de crecimiento para células de levadura de *S. cerevisiae*.

Previo a las curvas de crecimiento, se prepararon 6 tubos cónicos de 50mL con 10mL de YPD líquido y 9 matraces Erlenmeyer de 125mL con 50mL de MM con los aminoácidos de las auxotrofías de cada cepa descrita en el cuadro 2. Se analizaron 4 condiciones variando la fuente de carbono y la presencia o ausencia de ácido glutámico:

- Glucosa / Amonio
- Glucosa / Amonio / Glutámico
- Etanol / Amonio
- Etanol / Amonio / Glutámico

Las tres cepas descritas en el Cuadro 2 se inocularon por duplicado en medio YPD líquido y se incubaron por 16 hrs en agitación constante de 250 rpms; los duplicados se juntaron en un mismo tubo y luego se centrifugaron por 5 min a 3,000 rpm, se decantó el sobrenadante, se lavó el pellet 3 veces con 10mL de agua destilada estéril y se resuspendió con el mismo volumen de agua. Para medir la biomasa de las células de levadura de las 3 cepas en el Cuadro 2, se realizó una dilución 1:10 de la biomasa obtenida en cada celda para luego determinar una concentración entre un marco de lectura de 0.04-0.5U/abs en el espectrofotómetro (Genesys 20 de Thermoscientific) a 600nm utilizando agua destilada como blanco. Para obtener la concentración real de cada muestra, el valor leído se multiplicó por el factor de dilución (10).

Dependiendo de la concentración de las muestras se realizaron cálculos para inocular en cada matraz de 50mL de MM una concentración inicial de 0.05 U/abs de células de levadura. Posteriormente, se volvió a medir en celdas cada matraz (sin dilución) para verificar la concentración inicial, tomando este valor como punto de partida para la curvas de crecimiento.

6.5.7. Tiempo de incubación para matraces con glucosa o etanol como única fuente de carbono

Para las muestras de glucosa como única fuente de carbono los matraces se miden cada 2hrs después de tomar el primer punto. En el caso de la curvas con etanol como única fuente de carbono, previo a inocular las células en los matraces de MM, se agregó 30 min antes 500 μ L de etanol en cada uno de ellos; después se tomó el primer punto y se dejó incubando por 14hrs para luego seguir midiendo cada 3 hrs. Para ambos casos se toman aproximadamente 9-10 puntos. En ambos casos las muestra se incubaron a 37°C a 250 rpm. Para el análisis de la curvas de crecimiento los puntos se anotaron en papel milimétrico de tres ciclos y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento

6.5.8. Cálculos para el análisis de curvas de crecimiento

Las ecuaciones utilizadas para evaluar la curvas de crecimiento se analizaron usando las fórmulas correspondientes con ayuda de la herramienta de Excel para su pos-

terior interpretación de resultados mediante gráficos de barras. Las ecuaciones se describen a continuación:

Pendiente:

$$P = \frac{(\log_{10}A - \log_{10}B)}{(T_f - T_i)} \quad (1)$$

A = OD 600nm antes de fase diaúxica

B=OD 600nm o inicio de la fase exponencial

T_f = Tiempo [] A, tiempo donde se toma la OD 600nm en A

T_i = Tiempo [] B tiempo donde se tomo la OD 600nm inicial en B

Tiempo de duplicación:

$$TD = \frac{(\log_{10}(b))}{(P)} \quad (2)$$

P = pendiente b = Tiempo de medición después del primer punto (2hrs, 3hrs, etc).

Velocidad de crecimiento (μ), expresado en h⁻¹:

$$\mu = \frac{(LN(b))}{(TD)} \quad (3)$$

LN = Logaritmo Natural b = Tiempo de medición después del primer punto (2hrs, 3hrs, etc).

6.5.9. Herramientas bioinformáticas utilizadas para el diseño de oligos *in silico*

Se utilizó un editor de plásmidos (Ape-por sus siglas en inglés- A plasmid Editor) conocido como un software gratuito utilizado en el diseño de plásmidos y otras construcciones mediante simulación *in silico* (Davis & Jorgensen, 2022) ; también, se empleó el software de Snapgene para obtener una mejor visualización de los oligos y constructos esperados (GSL Biotech LLC, 2024).

La verificación de $Tm^{\circ}C$, %GC, formación potencial de horquillas, complementariedad, entre otras características, se determinó a través de la calculadora de propiedades de Oligonucleótidos (Oligo Calc) (Northwestern University, s.f.).

6.5.10. Diseño de oligos *in silico* para la construcción de módulos de transformación en *S. cerevisiae*

El diseño de oligos se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Extensión Superpuesta de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (OE-PCR, por sus siglas en inglés: “Overlap Extension PCR”) o también llamada PCR de fusión, manteniendo el fundamento de la misma, donde se obtuvieron oligos de sentido o Forward (Fw) y antisentido o Reverse (Rv), con un total de 8 oligos para ambos genes (Figura 18):

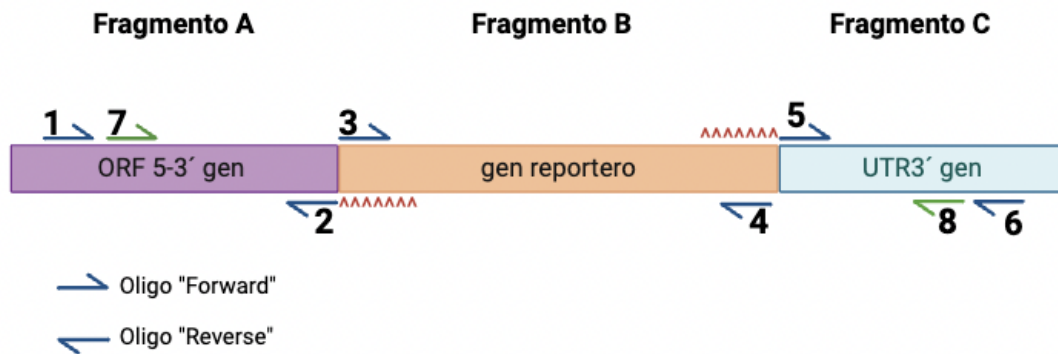


Figura 18: Diseño de oligos para obtener el constructo completo a través de la técnica de OE-PCR.

Se muestra el fragmento A (morado) que representa el ORF del gen de interés, el fragmento B (naranja) con el inserto del gen reportero que conlleva la secuencia de la proteína fluorescente y el marcador de selección y el fragmento C (celeste) que representa el UTR 3' del gen. Para todos los fragmentos se representan en flechas los oligos utilizados para amplificar todas las secciones. Adaptada y traducida de (Nelson & Fitch, 2011)

- **Oligos 1 y 6:** El tamaño de estos oligos es de 20pb. El oligo 1 es un Forward que contiene la secuencia del ORF 5' del gen de interés, manteniendo una distancia de >500pb del 3' del gen. El oligo 6 es un Reverse que contiene la secuencia del UTR 3' del gen, manteniendo una distancia de >500pb a partir del 3' del gen.
- **Oligos 3 y 4:** El tamaño de estos oligos es de 20pb. El cebador 3 es un Forward, mientras que el cebador 4 es un Reverse que contienen la secuencia de la proteína fluorescente y el marcador de selección que se utilizará como inserto (gen reportero / fragmento B).
- **Oligos 2 y 5:** El tamaño de estos oligos es de 45pb. El cebador 2 es un Reverse con aproximadamente ~25pb homólogas a la sección del ORF 3' del gen (eliminando el codón de paro de la secuencia original) y posee una cola de recombinación de ~20pb con la secuencia del inserto del gen reportero dejando entre 3-6 pb antes de su codón de inicio “ATG”. El cebador 5 es un Forward,

de igual forma con ~ 25 pb h3mologas al inicio del UTR3' del gen y una cola de recombinaci3n de ~ 20 pb de la secuencia del inserto del gen reporte. Ambos oligos son fundamentales para obtener la fusi3n de los fragmentos iniciales: A con B y B con C (fragmentos pares) previo a obtener el gen h3brido o m3dulo completo.

- **Oligos 7 y 8:** El tama3o de estos oligos es de ~ 18 pb. Ambos se consideran como "Oligos Anidados" que caen aproximadamente 100pb dentro de los oligos 1 y 6. El oligo 7 posee la secuencia del ORF5' del gen manteniendo una distancia de ~ 400 pb a partir de su 3'. El oligo 8 posee la secuencia del UTR3' del gen con una distancia de ~ 400 pb del 3'. Adem3s de este par de oligos, tambi3n se dise3o otro par con la misma secuencia adicion3ndole en la direcci3n 3' tres pares de GC y secuencias de enzimas de restricci3n: *KpnI* y *XhoI* para obtener extremos cohesivos; estos se utilizaran como oligos de clonaci3n en el pl3smido PRS416 para su posterior transformaci3n en *E.coli* DH5 α

Cabe resalta que el fragmento llamado "gen reportero" posee tanto la secuencia de la prote3na fluorescente como la secuencia del marcador de selecci3n como lo es URA3- para el pl3smido pKT0175 y resistencia a G418 (Geneticina) para el pl3smido H2B-mCherry. El dise3o de cebadores de cada gen se demuestra en la Figura 19 y 20 utilizando la plataforma de Snapgene.

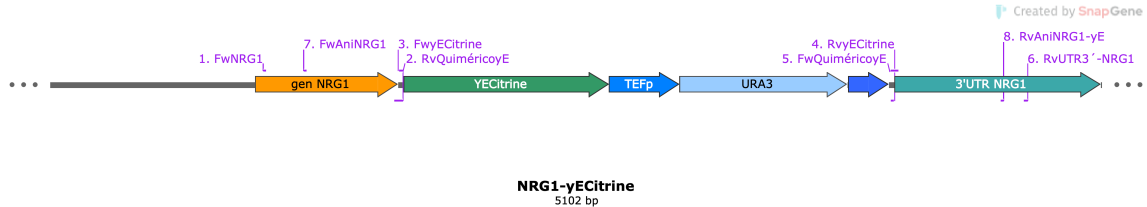


Figura 19: Dise3o de oligos para Nrg1.

Se muestra el ORF de *NRG1* (fragmento A- anaranjado), el inserto o gen reportero con la prote3na fluorescente yECitrine y el marcador de selecci3n URA3' en el mismo marco de lectura del gen (fragmento B-verde y celeste) y el UTR de *NRG1* (fragmento C- turquesa).

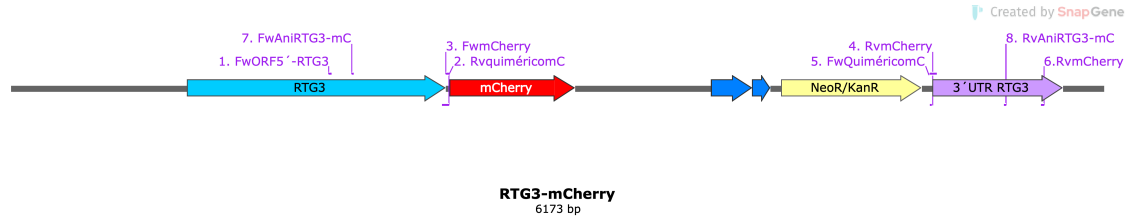


Figura 20: Diseño de oligos para RtG3.

Se muestra el ORF de *RTG3* (fragmento A-celeste), el inserto o gen reportero con la proteína fluorescente mCherry y el marcador de selección KanR (Geomicina 418) en el mismo marco de lectura del gen (fragmento B-rojo y amarillo) y el UTR de *RTG3* (fragmento C-lila).

Adicionalmente, se realizaron oligos para verificar las cepas con el inserto luego de la transformación en *S. cerevisiae* Figura 21.



Figura 21: Diseño de oligos de verificación del constructo para cepas transformantes de *S. cerevisiae*.

Se muestra el constructo y ambos UTR's del gen, estos oligos demuestran mediante una PCR convencional la presencia del inserto en las cepas manipuladas de *S. cerevisiae*.

- **Oligos 9 y 13:** El tamaño de estos oligos es de 18-20 pb. El oligo 9 es un Forward que contiene la secuencia del UTR5' del gen y se encuentra a una distancia de 20-300 pares de bases del oligo 1 y 7 (Figura 21). El oligo 13 es un Reverse que contiene la secuencia del UTR3' del gen y se encuentra a una distancia de >200pb del oligo 8 y 6 Figura 21. Ambos oligos se utilizarán para amplificar el inserto completo o la mitad en dirección río arriba y río abajo del constructo con los oligos 11 o 12.
- **Oligo 10:** Posee una longitud de 18-20pb; este oligo es un Forward con la secuencia del ORF3' del gen sin las bases del codón de paro, por lo que amplificará solamente la mitad del inserto con el oligo 12 para verificar si el constructo se encuentra en el marco de lectura.
- **Oligo 11 y 12:** Ambos poseen una longitud de 18-20 pb. El oligo 11 es un Forward y el oligo 12 es Reverse que contienen la secuencia del gen reportero para amplificar con los oligos 9 o 10 y 13 la mitad del inserto y parte del gen.

6.5.11. Extracción de ADN genómico total de *S. cerevisiae*

La extracción de ADN total, se llevó a cabo de acuerdo al protocolo desarrollado en el laboratorio de la Dra. Alicia González del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

Brevemente, se inoculó 10mL de medio YPD con una colonia aislada de la cepa silvestre *ura3⁻ leu2⁻* y se incubó a 30°C con agitación a 250 rpm por toda la noche. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min a T.A para luego recolectar las células y eliminar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0.5mL de agua bidestilada estéril y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5mL, para luego centrifugarlas a 14,000 rpm por 1 min y eliminar el sobrenadante.

Posteriormente, se adicionó al tubo Eppendorf de 1.5mL, 400µL de una solución de lisis celular que contenía: 2 % Tritón X-100, 1 % SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0 y 1mM Na-EDTA; 200µL de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (relación 25:24:1) preparada al momento y 200µL de TE pH 8.0 (Tris-HCl pH 8.0 y 1mM Na-EDTA) . Se colocaron 0.3g de perlas de vidrio de 0.1mm a cada muestra y se mezcló con vórtex a máxima velocidad por 3-4 min promoviendo lisis por ruptura mecánica; seguido de una centrifugación a 14,000 rpm por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se realizó una segunda extracción añadiendo 400µL de la solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) preparada al momento y se mezcló nuevamente con vortex por 15 seg . Se realizó una tercera extracción repitiendo el paso anterior. Transcurridos los pasos de extracción, se realizó una precipitación de la fase acuosa usando 1mL de etanol 100 % con 10µL de Acetato de Amonio 4 M, mezclando por inversión de 4 a 6 veces; la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se eliminó todo el sobrenadante. Este paso es súper importante, ya que no debe quedar rastro alguno de etanol en la muestra. El paquete celular, se resuspendió en 400µL de TE + 10µL de RNAsa (10mg/mL) y se incubaron a 37°C por 30 min.

Por último, se agregó 10µL de acetato de amonio 4M + 700µL de etanol al 100 % y se mezcló por inversión 4-6 veces; Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante; el paquete celular se lavó con 700-800µL de etanol al 70 %, usando la pipeta sin romper el paquete celular y se centrifugó por última vez a 14,000 rpm por 5 min, se elimina el sobrenadante totalmente y se deja secar el paquete celular a temperatura ambiente por 30 min. El pellet se resuspendió en 70-100µL de agua destilada o buffer TE pH 8.0.

6.5.12. Cuantificación y pureza de ADN genómico total extraído

El ADN extraído se cuantificó mediante Nanodrop 2000, Thermo Scientific, verificando una concentración de ADN genómico >100 ng/µL y manteniendo una absorbancia entre los valores óptimos: $Abs_{260/280} - Abs_{260/230} \Rightarrow 1.8 - 2.2 <$ (Banco

Nacional de ADN - España, 2020). De igual forma, la pureza del ADN se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

6.5.13. PCR para obtención de los fragmentos A y C de *NRG1* y *RTG3*

Se utilizó el protocolo de PCR Biosystems, donde se empleó una enzima de alta fidelidad (*PCRBIO Hifi polymerase Mn Systems*) y un buffer de reacción 5x *PCRBIO HiFi Mn Systems*. La PCR se realizó con el ADN molde de la cepa silvestre Ura3⁻ y Leu2⁻ de *S. cerevisiae* y los oligos empleados para cada fragmento esperado se describen a continuación Figura 19 y 20.

- ORF 5-3' *NRG1*: Fw. ORF5' *NRG1* (#1) y Rv. quiméricoyE (#2) = 658pb
- UTR 5-3' *NRG1*: Fw. quiméricoyE (#5) y Rv. UTR3' *NRG1* (#6) = 650pb
- ORF 5-3' *RTG3*: Fw. ORF5' *RTG3* (#1) y Rv. quiméricomC (#6) = 663pb
- UTR 5-3' *NRG1*: Fw. quiméricomC (#5) y Rv. UTR3' *RTG3* (#6) = 632pb

Las reacciones se prepararon en un tubo de 1.5mL con un volumen final de 500 μ L usando agua ultra pura (Mili-Q[®]) y se dividió en 5 tubos de PCR con un volumen final de 100 μ L cada uno (Cuadro 3).

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μ L)
H2O Mili-Q [®]	-	355
Buffer PCRBIO	5x	100
MgCl2	50mM	5
dNTP's	10mM	10
Oligo Forward	10 μ M	10
Oligo Reverse	10 μ M	10
Enzima Hifi PCRBIO	2u/ μ L	5
ADN	100ng/ μ L	5

Cuadro 3: Receta para la amplificación de los fragmentos A y C.

La amplificación de los fragmentos se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Thermo Cycler con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	ciclos
Desnaturalización inicial	95	3:00	1
Desnaturalización	95	0:30	30
Alineamiento	60	1:00	
Extensión	72	1:50	
Extensión final	72	5:00	1
Almacenamiento	12	∞	1

Cuadro 4: Condiciones para la amplificación de los fragmentos A y C.

Los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando Buffer TE 1x (Tris-HCl pH 8.0 y 1mM Na-EDTA), el marcador molecular 1Kb Plus Invitrogen y a 100v por 30min. La purificación de todos los productos se realizó a través del protocolo de PROMEGA Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System mediante centrifugación (Promega Corporation, 2009), manteniendo una concentración final de todos los fragmentos puros entre 100-500 ng/ μ L.

6.5.14. Obtención de fragmentos de las proteínas fluorescentes (gen reportero)

- **Transformación de *E. coli* para clonación de plásmidos:**

En el laboratorio de la Dra. Alicia, se obtuvo una alícuota almacenada a -20°C del plásmido pKT0175; esta se utilizó para transformar una cepa calcio competente de *E. coli* DH5 α para su posterior uso en este estudio. En el caso del plásmido H2B-mCherry solamente se llevó a cabo la criopreservación de la cepa.

Se utilizaron bacterias calcio competentes preparadas previamente en el laboratorio guardadas a -70°C . Se descongelaron 4 viales (control +, control - y dos muestras) de células sobre hielo por 30 min y se colocaron entre 100-500ng de vector en cada vial. Se mezcló con pipeta sin hacer burbujas, se incubaron los viales por 30min en hielo y rápidamente se llevaron a un choque térmico a 42°C por 2 min y luego las muestras se colocaron de nuevo en hielo por 2 min. Se agregó 500-800 μ L de medio LB para promover la recuperación celular y los tubos se sellaron con parafilm; se incubaron a 37°C por 1-2 hrs a 300rpm. Por último, se centrifugaron los tubos a 3,500rpm por 1 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con el remanente del medio; se plaquean en medio selectivo (LB+AmpR) en las concentraciones de 10^0 y 10^{-1} junto con los controles. Se incubaron a 37°C por 24 hrs y se interpretaron los resultados al siguiente día. Las cepas con el plásmido integrado fueron resistentes a AmpR, se seleccionaron entre 10-15 transformantes para ambas diluciones y se realizaron 3 pases para su purificación.

- **Crioconservación de cepas de *E.coli*:**

Se re-estriaron colonias en una placa petri de medio LB con sus respectivos suplementos y antibióticos para mantener la presión de selección y obtener cultivos frescos. Se incubó a $37^{\circ}C$ por 24hrs y se realizó un preinóculo en medio LB + Amp. Se incubaron por 14-16 hrs a $37^{\circ}C$. Una vez incubado el pre inóculo, se tomó $800\mu L$ del pre cultivo y se colocó en un vial para criogenizar debidamente etiquetado donde se se agregó $800\mu L$ de cultivo fresco LB + Amp+ Glicerol al 30%, Se mezclaron con vortex y se congelaron a $-70^{\circ}C$.

- **Miniprep de *E.coli*:**

Para la obtención de los plásmidos purificados de las cepas de *E.coli* crioconservadas, se llevó a cabo un Miniprep mediante el protocolo de *QIAGEN QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation, 2012). Los pre cultivos utilizados se inocularon con $10\mu L$ de AmpR para mantener la presión de selección y el ADN plasmídico obtenido se cuantificó a través del Nanodrop 2000, Thermo Scientific.

- **Digestión con enzimas de restricción para linealizar el plásmido:**

Para la digestión de los plásmidos pKT0175 y H2B-mcherry se utilizó el protocolo de la enzima *Hind III* de INVITROGEN con el buffer 10x React 2 (Technical Support Invitrogen, 2010), la receta utilizada se describe en la Cuadro 5. Adicionalmente, la mezcla se incubó por 30min a $37^{\circ}C$ y la inactivación de la enzima se generó a $65^{\circ}C$ por 5 min. Esta enzima se seleccionó de acuerdo con el múltiple sitio de clonación en ambos plásmidos que corta una vez dejando extremos cohesivos y obteniendo el plásmido lineal sin manipular el inserto de interés. Posteriormente, se cuantificó el ADN plasmídico lineal manteniendo una concentración de $\cong 20ng/\mu L$ y se verificó el fragmento linealizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Componentes	Volumen agregado (μL)
<i>Hind III</i>	1
Buffer 10x React 2	2
ADN	$\cong 1\mu g$
Agua destilada	Aforar a $20 \mu L$

Cuadro 5: Receta para digestión del plásmido con la enzima *Hind III*.

- **PCR para obtener el constructo del gen reportero fluorescente:**

Se utilizó el protocolo de PCR Biosystems con una enzima de alta fidelidad (*PCRBIO Hifi polymerase Mn Systems*) y un buffer de reacción 5x *PCRBIO Mn Systems*. Se empleó el ADN plasmídico obtenido anteriormente de los plásmidos pKT0175 con el marcador fluorescente yECitrine y H2B-mcherry con el marcador fluorescente mCherry; los oligos empleados se describen a continuación:

- yECitrine: Fw. yECitrine (#3) y Rv. yECitrine(#4) = 2,409 pb
- mCherry: Fw. mCherry (#3) y Rv. mCherry (#4) = 2, 755pb

Las reacciones se prepararon en un tubo de 1.5mL con un volumen final de 500 μ L con agua Mili-Q[®] y se dividió en 5 tubos de PCR con un volumen final de 100 μ L cada uno. Los componentes de reacción se mencionan a continuación:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μ L)
H2O Mili-Q [®]	-	355
Buffer PCRBIO	5x	100
MgCl2	50mM	5
dNTP 's	10mM	10
Oligo Forward	10 μ M	10
Oligo Reverse	10 μ M	10
Enzima Hifi PCRBIO	2u/ μ L	5
ADN	<500ng/ μ L	5

Cuadro 6: Receta para la amplificación del fragmento B.

La amplificación de los fragmentos se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Thermo Cycler con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	ciclos
Desnaturalización inicial	95	3:00	1
Desnaturalización	95	0:30	30
Alineamiento	70	1:00	
Extensión	72	2:50	
Extensión final	72	5:00	1
Almacenamiento	12	∞	1

Cuadro 7: Condiciones de amplificación del fragmento B.

Los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel al 1 % utilizando Buffer TE 1x (Tris-HCl pH 8.0 y 1mM Na-EDTA), el marcador molecular 1kb Plus Invitrogen y se corrió a 100v por 30min. La purificación de todos

los productos se realizó a través del protocolo de PROMEGA Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System mediante centrifugación (Promega Corporation, 2009), manteniendo una concentración final de todos los fragmentos puros < 200 ng/ μ L (Figura 22).

Amplificación de los tres fragmentos

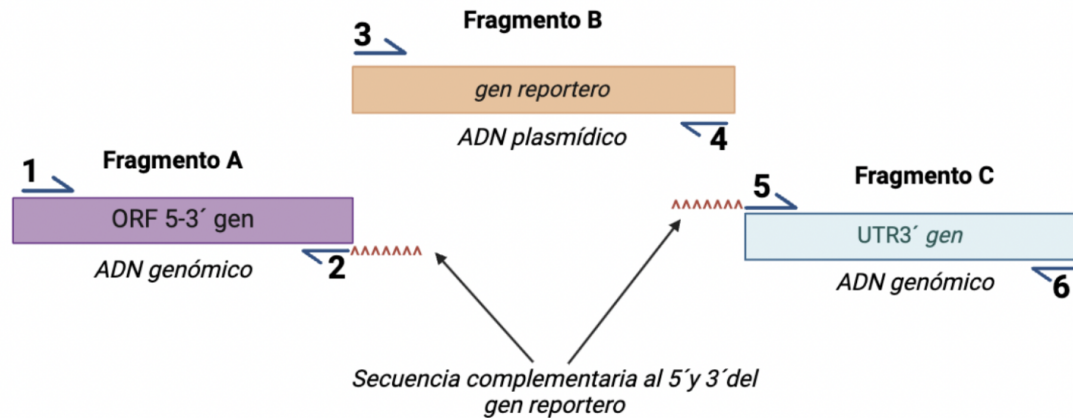


Figura 22: Diagrama de la amplificación de los tres fragmentos individuales.

En la Figura anterior se muestra el fragmento A, B y C para ambos genes, los cuales presentan cada oligo con el cual fueron amplificados; los fragmentos A y C poseen secuencias complementarias al fragmento B para llevar a cabo la superposición mediante OE-PCR.

6.5.15. Optimización de la técnica OE-PCR para obtener los fragmentos de transformación de interés

La OE-PCR se utilizó para construir un gen híbrido mediante la fusión del gen con un marcador fluorescente que se sintetizan en el mismo marco de lectura y logre expresarse en la célula. En este caso, se espera marcar a Nrg1-yECitrine (marcador fluorescente verde) y a Rtg3-mCherry (marcador fluorescente rojo). Luego de obtener los fragmentos A, B y C por separado para ambos genes, se debe seguir los siguientes pasos para generar el constructo final con una secuencia completa del gen + proteína reportera:

6.5.16. OE-PCR para fragmentos A+B , B+C y A+B+C

Para *RTG3* con el inserto de mCherry se realizó una reacción que consiste en combinar el fragmento A (individual) con el fragmento par B-C; primero se realizó

una reacción de superposición y amplificación para obtener el constructo de B+C y posteriormente, se llevó a cabo otra reacción de superposición con los fragmentos A y B+C, donde el alineamiento se verá facilitado por el plegamiento de los extremos que son complementarios del fragmento A con el fragmento B, y por último, una PCR para amplificar y purificar el constructo final. En el caso de Nrg1 con el inserto de yECitrine se realizó una reacción de un solo paso, donde se agregaron los tres fragmentos individuales (A, B y C) purificados junto con oligos en una reacción de PCR para una superposición y amplificación directa del cosntructo completo (Hilgarth & Lanigan, 2021).

En ambos casos, para que esta técnica mantenga una superposición óptima de fragmentos, es crucial que los fragmentos se agreguen en porciones equimolares, en este caso utilizamos concentraciones en nanoMolar (nM) en proporción 60:120, donde los 60 nM equivalen a los fragmentos con menor longitud de pares de bases (pb) mientras que los 120 nM equivalen a los fragmentos más largos; Los valores equimolares se obtuvieron utilizando la ecuación de conversión de $\text{ng}/\mu\text{L}$ a $\text{nM}/\mu\text{L}$ de ILLUMINA (Illumina, Inc., 2023) y con los valores de peso molecular de ácidos nucleicos dsDNA de ThermoFisher Scientific, en la sección de “pesos moleculares y conversión de ADN y ARN” (Thermo Fisher Scientific, 2024) se logró determinar la cantidad exacta de volumen (μL) para los fragmentos manteniendo la relación 60:120 nM.

Ecuación para obtener $\text{nM}/\mu\text{L}$ a partir de $\text{ng}/\mu\text{L}$:

$$nM = \left(\frac{\text{concentración del fragmento } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}}{(\text{longitud del fragmento}(pb) * 607.4) + 157.9} \right) * 10^6 \quad (4)$$

6.5.17. OE-PCR para obtener el fragmento completo de Rtg3-mCherry

Para los siguientes pasos se utilizó una enzima de alta fidelidad (*PCRBIO Hifi polymerase Mn Systems*) y un buffer de reacción 5x *PCRBIO Mn Systems*. Para los fragmentos A y C purificados se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración final $<50\text{ng}/\mu\text{L}$; para el fragmento B no se realizó dilución

▪ Fusión y amplificación de fragmentos individuales (A+B y B+C) de *RTG3*:

Para este paso no se agregaron oligos al Master Mix y se adiciona DMSO (0.5 %) a cada tubo de manera individual, siendo este el último reactivo agregado. La receta se describe a continuación con una reacción de volumen final de $25\mu\text{L}$:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μL)
H2O Mili-Q [®]	-	16.8
Buffer PCRBIO	5x	5
MgCl2	50mM	0.25
dNTP 's	10mM	0.5
Enzima Hifi PCRBIO	2u/ μL	0.25
DMSO	100 %	0.5
*Templado	-	-

Cuadro 8: Receta de PCR para fusión de los fragmentos pares de *RTG3*.

El *templado se agregó de acuerdo a la concentración de nM determinada para cada fragmento que se describe a continuación:

Nombre del fragmento	[ng/uL] del fragmento	Longitud en pb	nM/ μL	Volumen final (μL) en 60 nM	Volumen final (μL) en 120nM
<i>ORF5'RTG3</i>	29.9	663	74.42	0.8	-
mCherry	232.8	2, 733	139.1	-	0.9
<i>UTR3'RTG3</i>	25.6	632	66.63	0.9	-

Cuadro 9: Templado en nM/ uL de los fragmentos para fusionar Rtg3 con mCherry.

La reacción de PCR sin oligos para la fusión de los fragmentos se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Thermo Cycler el siguiente programa:

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	2:00	1
Desnaturalización	95	0:15	15
Alineamiento	60	10:00	
Extensión	72	2:00	
Almacenamiento	12	∞	1

Cuadro 10: Condiciones de la PCR de fusión de los fragmentos pares de *RTG3*.

Para este tipo de OE-PCR , los fragmentos no se logran visualizar en una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, por lo que se tomó directamente del tubo de PCR $5\mu\text{L}$ que se utilizó posteriormente como templado en una reacción de PCR de $50\mu\text{L}$ con oligos donde se amplificarán los fragmentos obtenidos, de igual forma, se agregó DMSO a la reacción como se mencionó anteriormente. La receta y condiciones de la reacción se describen a continuación:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μL)
<i>H2O Mili-Q</i> [®]	-	28
Buffer PCRBIO	5x	10
MgCl ₂	50mM	0.5
dNTP 's	10mM	1
Oligo Forward	10 μM	2
Oligo Reverse	10 μM	2
Enzima Hifi PCRBIO	2u/ μL	0.5
DMSO	100 %	1
ADN	-	5

Cuadro 11: Receta para la amplificación de los fragmentos pares de *RTG3*.

Los oligos utilizados en la receta anterior son:

- ORF5' *RTG3* (A) + mCherry (B): Fw. ORF5' *RTG3*(#1) y Reverse. mCherry (#4) = 3,418pb
- UTR3' *RTG3* (C) + mCherry (B): Forward. mCherry (#3) y Reverse. UTR3' *RTG3* (#6) = 3,387pb

La reacción para amplificar los fragmentos fusionados se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Thermo Cycler con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	3:00	1
<i>Desnaturalización</i>	95	0:30	30
<i>Alineamiento</i>	64.5	1:00	
<i>Extensión</i>	72	3:30	
<i>Extensión final</i>	72	5:00	1
<i>Almacenamiento</i>	12	∞	1

Cuadro 12: Condiciones de la amplificación de la fusión de los fragmentos A+B y B+C *RTG3*.

Los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando Buffer TE 1x (Tris-HCl pH 8.0 y 1mM Na-EDTA), el marcador molecular 1kb Plus Invitrogen y se corrió 100v por 40-50min. La purificación de todos los productos se realizó a través del protocolo de PROMEGA Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System mediante centrifugación (Promega Corporation, 2009), manteniendo una concentración final de todos los fragmentos puros entre 50-200 ng/ μL .

▪ **Fusión y amplificación del fragmento completo de *RTG3*:**

Para esta metodología, se realizó otra superposición de pares donde se realizó una reacción de PCR sin oligos de $25\mu\text{L}$ fusionando el módulo individual ORF5' *RTG3* (fragmento A) con los fragmentos pares de mCherry-UTR3' *RTG3* (fragmento B + C) para luego realizar una amplificación de estos mediante una PCR con oligos para purificar el constructo final. Para la fusión se utilizó la enzima *PCRBIO Hifi polymerase Mn Systems* en una reacción de $25\mu\text{L}$; la receta se describe a continuación:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μL)
<i>H2O Mili-Q</i> [®]	-	10.9
Buffer PCRBIO	5x	5
MgCl ₂	50mM	0.25
dNTP 's	10mM	0.5
Enzima Hifi PCRBIO	2u/ μL	0.25
DMSO	100 %	0.5
*ADN	-	-

Cuadro 13: Receta para la amplificación del fragmento completo de *RTG3*.

* El templado se agregó de acuerdo con a la concentración de nM determinada para cada fragmento que se describe a continuación:

Nombre del fragmento	[ng/uL] del fragmento	Longitud en pb	nM/ μL	Volumen final (μL) en 60 nM	Volumen final (μL) en 120nM
ORF5' <i>RTG3</i>	29.9	663	74.42	0.9	-
mCherry + UTR3' <i>RTG3</i>	36.5	3,365	17.8	-	6.8

Cuadro 14: Templado en nM/ uL de los fragmentos para fusionar *RTG3* con mCherry.

La reacción de PCR sin oligos para la fusión de los fragmentos se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Thermo Cycler con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura (C°)	Tiempo (min)	ciclos
Desnaturalización inicial	95	2:00	1
Desnaturalización	95	0:15	15
Alineamiento	60-65	10:00	
Extensión	72	2:00	
Almacenamiento	12	∞	1

Cuadro 15: Condiciones de la PCR de fusión para el fragmento completo de RTG3.

Posteriormente, se llevó a cabo una PCR para amplificar el constructo con los tres fragmentos (A+B+C) de *RTG3-mCherry*; donde se utilizó la enzima *PCRBIO classic Taq* (PCRBIO, 2024) de PCR Biosystems. El templado que se utilizó para esta reacción fueron $2.5\mu\text{L}$ de la fusión realizada anteriormente agregada directamente a cada tubo de PCR con un volumen final de $25\mu\text{L}$; la receta de describe a continuación:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μL)
H2O Mili-Q®	-	17
Buffer PCRBIO	10x	2.5
dNTP 's	10mM	0.25
Oligo Forward	$10\mu\text{M}$	1
Oligo Reverse	$10\mu\text{M}$	1
classic taq PCRBIO	$2\text{u}/\mu\text{L}$	0.25
DMSO	100%	0.5
ADN	-	2.5

Cuadro 16: Receta para la amplificación del constructo completo de Rtg3-mCherry.

Los oligos utilizados en la receta anterior fueron los anidados con y sin secuencia de enzimas de restricción, los cuales son:

- Con enzimas de restricción: Fw. *KpnIRtg3 – mC* y Rv. *XhoIRtg3 – mC*
- Sin enzimas de restricción: Fw. *AniRtg3 – mC* y Rv. *AniRtg3 – mC*

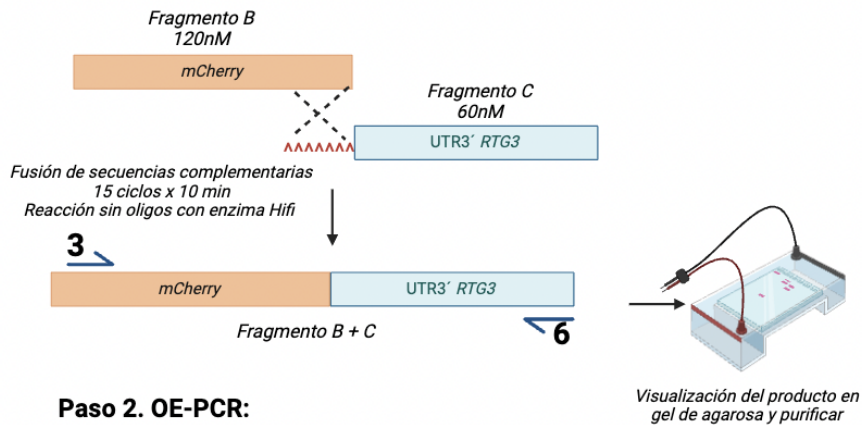
La reacción para amplificar los fragmentos fusionados se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Thermo Cycler con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura (C°)	Tiempo (min)	ciclos
Desnaturalización inicial	95	1:00	1
Desnaturalización	95	0:15	30
Alineamiento	60	0:15	
Extensión	72	3:00	
Extensión final	72	5:00	1
Almacenamiento	12	∞	1

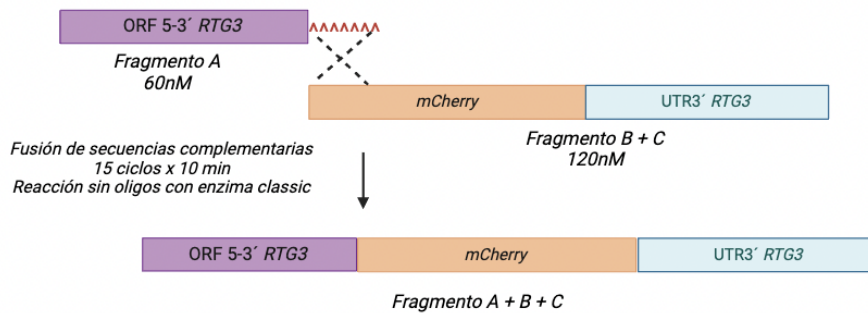
Cuadro 17: Condiciones de la amplificación del constructo completo de Rtg3-mCherry.

Los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel al 1 % utilizando Buffer TE 1x (Tris-HCl pH 8.0 y 1mM Na-EDTA) , el marcador molecular 1kb Plus Invitrogen y se corrió 100v por 40-50min. La purificación de todos los productos se realizó a través del protocolo de PROMEGA Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System mediante centrifugación (Promega Corporation, 2009), manteniendo una concentración final de todos los fragmentos puros de $>50 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Paso 1: OE-PCR y amplificación de Fragmentos pares



Paso 2. OE-PCR:



Paso 3. PCR Amplificación del constructo :

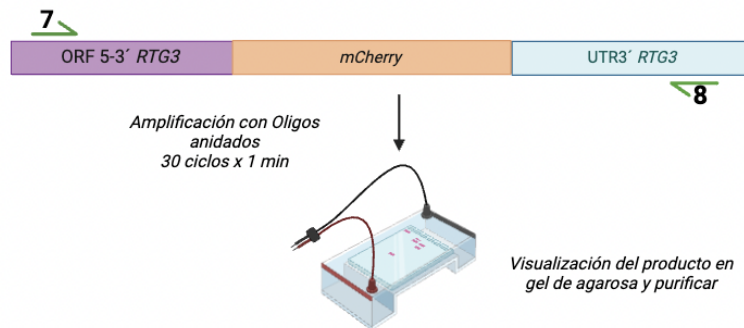


Figura 23: Optimización de la técnica OE-PCR para obtener el módulo de Rtg3-mCherry.

En la Figura se observa el paso de fusión y amplificación de las secuencias complementarias para obtener el constructo final del gen híbrido con la proteína fluorescente. Previo al primer paso, los fragmentos individuales se amplificaron y purificaron con sus oligos respectivos y durante todas las fusiones se mantuvo la relación equimolar 60:120nM. Adaptada de (Hilgarth & Lanigan, 2021)

6.5.18. OE-PCR para obtener el fragmento completo de Nrg1-yECitrine

Esta reacción se realizó en un solo paso, es decir que solamente se llevó a cabo una reacción de PCR con oligos que involucró tanto la superposición de las secuencias como la amplificación de estas, para obtener el constructo con los tres fragmentos (A, B y C) de *NRG1*-yECitrine. Se empleó la enzima de alta fidelidad *PCRBIO Hifi polymerase Mn Systems* de *PCR Biosystems* con un volumen final de $20\mu\text{L}$, no se agregó DMSO y se mantuvo la relación equimolar 60:120 entre todos los fragmentos, de igual forma se realizó una dilución 1:10 para los fragmentos OR5' y UTR3' de *NRG1*. La receta se describe a continuación:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μL)
H2O Mili-Q®	-	9.6
Buffer PCRBIO	10x	4
dNTP's	10mM	0.4
Oligo Forward	$10\mu\text{M}$	0.8
Oligo Reverse	$10\mu\text{M}$	0.8
Enzima Hifi PCRBIO	$2\text{u}/\mu\text{L}$	0.2
ADN *	-	2.5

Cuadro 18: Receta para la amplificación del constructo completo de Nrg1-yECitrine.

* El templado se agregó de acuerdo con la concentración de nM determinada para cada fragmento que se describe a continuación:

Nombre del fragmento	[ng/uL] del fragmento	Longitud en pb	nM/ μL	Volumen final (μL) en 60 nM	Volumen final (μL) en 120nM
ORF5' <i>NRG1</i>	43.3	658	108.3	0.5	-
yECitrine	291.6	2,409	199.26	-	0.6
UTR3' <i>NRG1</i>	38.1	650	96.46	0.6	-

Cuadro 19: Templado en nM/ uL de los fragmentos para fusionar de Nrg1 con *yECitrine*.

Los oligos utilizados fueron los oligos anidados con y sin secuencia de enzimas de restricción, los cuales son:

- Con enzimas de restricción. Forward. *Kpn1Nrg1-yE* y Reverse. *Xho1Nrg1-yE*
- Sin enzimas de restricción: Forward. *AniNrg1-yE* y Reverse. *AniNrg1-yE*

La reacción para amplificar los fragmentos fusionados se realizó en un termociclador BIO RAD T100 Therna Cycler con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura (°CC)	Tiempo (min)	ciclos
Desnaturalización inicial	95	3:00	1
Desnaturalización	95	0:30	30
Alineamiento	60	1:00	
Extensión	72	3:00	
Extensión final	72	5:00	1
Almacenamiento	12	∞	1

Cuadro 20: Condiciones de la amplificación del constructo completo de *Nrg1-yECitrine*.

Los productos de PCR se visualizaron a través de una electroforesis en gel al 1% utilizando Buffer TE 1x, el marcador molecular 1kb Plus Invitrogen y se corrió 100v por 40-50min. La purificación de todos los productos se realizó a través del protocolo de PROMEGA Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System mediante centrifugación (Promega Corporation, 2009), manteniendo una concentración final de todos los fragmentos puros de $>50 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Paso 1: OE-PCR y amplificación de los tres fragmentos

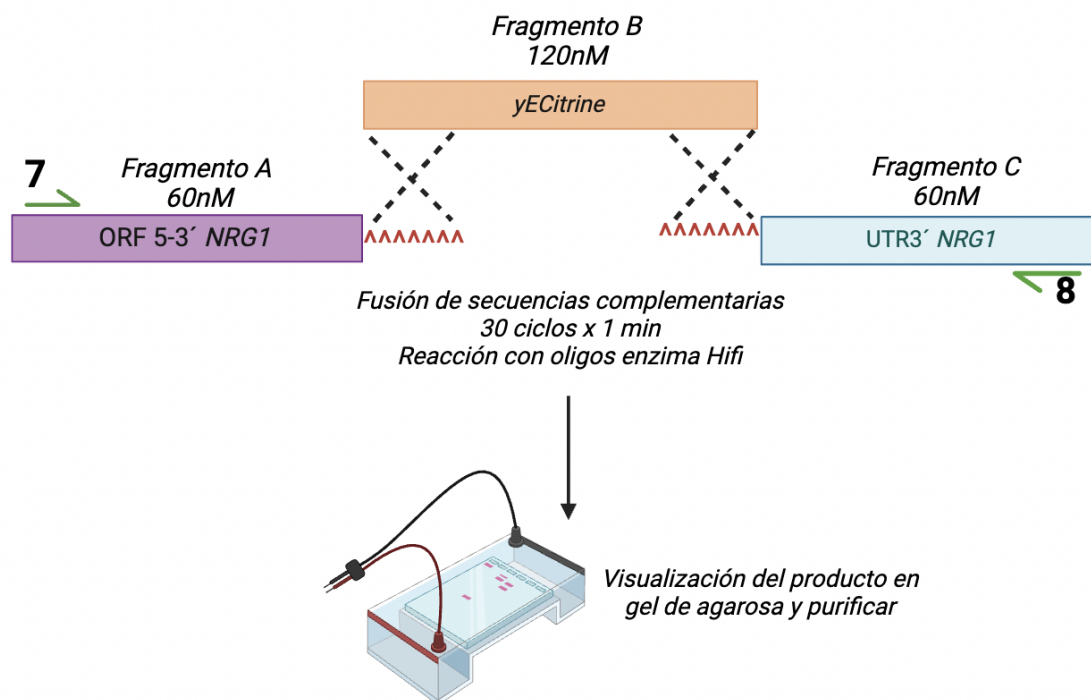


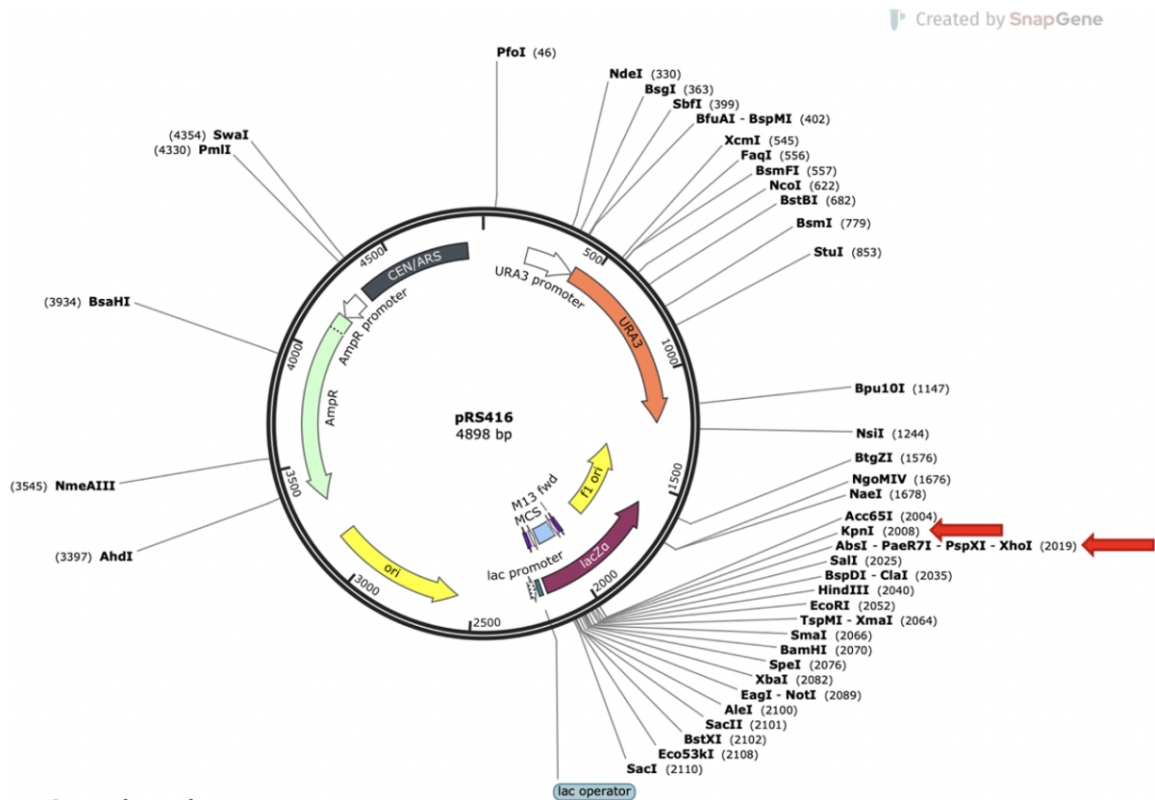
Figura 24: Optimización de la técnica OE-PCR para obtener el módulo de Nrg1-yECitrine

En la Figura se observa el paso de fusión y amplificación de las secuencias complementarias para obtener el constructo final del gen híbrido con la proteína fluorescente. Previo al primer paso, los fragmentos individuales se amplificaron y purificaron con sus oligos respectivos y durante todas las fusiones se mantuvo la relación equimolar 60:120nM. Adaptada de (Hilgarth & Lanigan, 2021).

6.5.19. Diseño del protocolo para clonar el fragmento final en un plásmido de replicación de *E. coli*

Con los constructos finales de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry por medio de OE-PCR, se debe de realizar una clonación en un plásmido para facilitar la obtención del fragmento completo, donde se utilizarán los módulos con las secuencias de enzimas de restricción. Para ambos fragmentos, se empleará el plásmido pRS416 (Figura 25) y las enzimas XhoI y KpnI de *New England's Biolabs* (NEB), las cuales generan extremos cohesivos que permiten digerir y ligar los constructos con el plásmido. Las secuencias de las enzimas se revisaron previamente en el plásmido dentro de su múltiple sitio de clonación seleccionando solamente a las de un solo corte, además, es fundamental que las enzimas seleccionadas no corten dentro del constructo o en otra sección del plásmi-

do, por lo que, al escoger diferentes enzimas se evita el autoplegamiento del plásmido al momento de realizar la ligación. Para que los fragmentos finales mantuvieran la secuencia de las enzimas se utilizó los oligos anidados 7 y 8 (Figura 18).



Corte de enzimas:

KpnI :



XhoI:

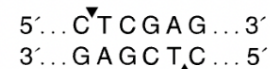


Figura 25: Plásmido pRS416.

Posee la secuencia del marcador de selección es resistencia Ampicilina (AmpR) para su clonación y replicación en la cepa de *E. coli DH5α*. Las enzimas a utilizar para la ligación se muestran con una flecha roja: *KpnI* y *XhoI*. También, se muestra la secuencia de corte en el ADN para ambas enzimas. Obtenido de (SnapGene, 2024)

■ Digestión y desfosforilación del plásmido y el inserto:

Como primer paso, se requiere de una digestión enzimática para generar los cortes necesarios que permitirán llevar a cabo la ligación a través del plegamiento de las secuencias homólogas en los extremos del inserto y el plásmido linealizado. Además, se empleará una fosfatasa alcalina de camarón (rSAP) de *New England's Biolabs*

(NEB) para eliminar el 5' fosfato de los fragmentos de ADN y reducir la aparición de un nuevo cierre del vector mediante ligación intramolecular. La receta de digestión y desfosforilación se describe a continuación con un volumen final de $50\mu\text{L}$:

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen agregado (μL) para el plásmido
H2O Mili-Q [®]	-	-	
NEB Buffer r1.1	10x		5
XhoI	1u/ μL		
KpnI	1u/ μL		
Buffer rsAP NEB	10x		5
Fosfatasa rsAP NEB	1u/ μL		2.5
ADN	-	-	$\cong 1\mu\text{g}$

Cuadro 21: Receta para la digestión y fosforilación del plásmido y el inserto.

Luego de preparar el Master Mix, las muestras se incubarán a 37°C por 1 hora y se realizará una inactivación de la fosfatasa a 65°C por 5 min. Previo a la ligación, los productos de la digestión se medirán en el Nanodrop 2000, Thermo Scientific para obtener concentraciones $\geq 20\text{ng} \div \mu\text{L}$.

▪ **Ligación del inserto al plásmido:**

Se utilizará una ADN T4 ligasa de ROCHE (Sigma-Aldrich, 2021) para la ligación del módulo y el plásmido por medio de la unión de los extremos cohesivos generados por las enzimas de restricción previamente digeridos. Se utilizará una proporción molar de ADN vectorial y de los fragmentos de 1:3 y 1:5 (vector frente al ADN de inserción); las muestras se prepararon con un volumen final de $50\mu\text{L}$ y se dejarán incubando a 16°C por 16 horas sin agitación. La receta de la ligación se describe a continuación:

Componentes	Concentración inicial	Volumen agregado (μL) relación 1:3	Volumen agregado (μL) relación 1:5
H2O Mili-Q [®]	-	Aforar a $50\mu\text{L}$	Aforar a $50\mu\text{L}$
Buffer 4T ligasa	10x	10	10
Vector	$\geq 20\text{ng}/\mu\text{L}$.	3	
*Inserto	$\geq 20\text{ng}/\mu\text{L}$.	-	
Enzima T4 ligasa	1-5U	4	4

Cuadro 22: Receta para la ligación del plásmido y el inserto.

El volumen agregado del inserto dependerá del cálculo respecto a la relación 1:3 o 1.5, para esto se describe la ecuación a continuación:

Cálculo para determinar volumen del inserto en relación molar:

$$\text{Masa del inserto}(ng) = A \times \left(\frac{\text{Longitud del inserto}}{\text{Longitud del vector}} \right) \times \text{masa del vector}(ng) \quad (5)$$

A = proporción del fragmento (3 o 5)

6.5.20. Protocolo para transformar *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizará el protocolo de acetato de litio con Polietilenglicol (PEG) proporcionado por el laboratorio de la Dra. Alicia González Manjarrez, el cual se describe a continuación:

Previo a realizar la metodología, el área debe de esterilizarse limpiándola con etanol al 70 % y todo el procedimiento se realizará en esterilidad con mechero. Se incubarán 10mL de medio YPD con una colonia aislada de la cepa de interés por 16 hrs a 30°C y 25rpm, Luego se realiza una dilución 1:10, tomando 100μL pre- inculo y 900μL de YPD para revisar la DO_{600nm} y llevar el inculo a una DO_{600nm} final de 0.2 a 0.3 en un matraz de 125mL con 50mL de YPD. Posteriormente, se incubará a 30°C y 250rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5-0.6 (2 – 3 horas aproximadamente).

Luego de alcanzar la DO_{600nm} esperada, las células se centrifugan por 5min a 3,000 rpm a temperatura ambiente, el paquete celular se resuspende en 40mL de agua destilada estéril y se vuelve a centrifugar para coleccionar las células en un 1mL de agua destilada estéril; se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5mL, se vuelven a centrifugar por 5seg a 14,000 rpm y se elimina el sobrenadante. Las células se lavan con 1mL de TE/LiOAc recién preparado y luego se resuspenden en 300-400μL de TE/LiOAc (dependiendo de la cantidad de tratamientos), y se colocarán 100μL de células en tres tubos Eppendorf de 1.5mL. Los tratamientos se describen a continuación:

- Tubo 1: 100μL de células (control negativo)
- Tubo 2: 100μL de células + 10μL de ADN acarreador (control negativo)
- Tubo 3: 100μL de células + 10μL de ADN acarreador + los microlitros necesarios del producto de PCR (inserto, dependiendo de los microgramos que se necesiten). En caso de requerirse, colocar 40μL de DMSO

El ADN acarreador que se utilizará es ADN de espermatozoos de salmón (10μg/mL) que debe de estar previamente sonificado y hervido por 5 min, luego se incubó en hielo por 5 min antes de agregarlo a los tratamientos.

Seguidamente de preparar cada tratamiento, se adicionan 300 μ L de PEG/TE/LiOAc al 50 % recién preparado y se mezcla con vórtex; Se incubarán a 30°C y 250rpm por 30min. Las células se someterán a un choque térmico de 42°C por 15min (sin agitación) y luego, se centrifugarán a 14,000rpm por 30seg, se elimina el sobrenadante con pipeta p100 y se resuspende el paquete de células con 1mL de YPD para transferirlo a un tubo conico de 50mL con 10mL de YPD para incubar las células a 30°C y 25rpm por 3 hrs (recuperación celular). Posteriormente, las células se colectan por centrifugación, se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en el remanente de medio líquido que queda de la centrifugación y se plaquean en cajas petri, dependiendo del medio de selección. Se muestra un ejemplo seleccionando las transformantes con resistencia a geneticina:

- Control positivo: 100 μ L del tratamiento del tubo 1 en medio YPD
- Control negativo: Tratamiento del tubo 2 en medio YPD + geneticina (G418)
- Concentrado: 100 μ L del tratamiento del tubo 3 en medio YPD+ geneticina
- Resto del concentrado: En medio YPD + geneticina
- Dilución 1:10 del tratamiento 3: 100 μ L de la dilución en medio YPD + geneticina
- Dilución 1:100 del tratamiento 3: 100 μ L de la dilución en medio YPD + geneticina

Las placas se incuban a 30°C por 2 días para su interpretación de resultados. Las transformantes que se seleccionan por medio de auxotrofías, se preparará medio mínimo con los aminoácidos necesarios. Las transformantes se comprobarán realizando 3 pases de purificación en sus medios selectivos y mediante una PCR convencional con los oligos de verificación (Figura 21). La receta de las soluciones de TE/LiOAc y PEG/TE/LiOAc se describen a continuación con un volumen final de 5 μ L:

Componentes	Concentración final	Volumen agregado
H2O	40.5 %	4.5mL
*LiOAc 1M pH 7.5	100mM	500 μ L
Tris-HCl 1M pH7.5	10mM	50 μ L
EDTA 0.5M	1mM	10 μ L

Cuadro 23: Receta de solución TE/LiOAc.

* LiOAc: Acetato de Litio.

Componentes	Concentración final	Volumen agregado
*PEG	40.5 %	4.5mL
*LiOAc 1M pH 7.5	100mM	500 μ L
Tris-HCl 1M pH7.5	10mM	50 μ L
EDTA 0.5M	1mM	10 μ L

Cuadro 24: Receta de solución PEG/TE/LiOAc.

*PEG: Polietilenglicol; LiOAc: Acetato de Litio.

6.5.21. Diseño de protocolo para observar la localización subcelular de las proteínas fluorescentes a través de microscopía con focal.

Para determinar la localización subcelular de las proteínas que forman parte del complejo quimérico transcripcional Nrg1-Rtg3, las cepas se analizaron por microscopía confocal. Para esto, se utilizará un microscopio confocal Fluoview Forward-100 (Olympus) con un objetivo de inmersión en aceite 60X IX81 (UPLSAPPO 60X o NA: 1.35), con un zoom de 5X y una apertura confocal de 3.5 μ m. Los parámetros de absorbancia para la yECitrine que se utilizarán son una excitación a 488nm; emisión 520nm BF 500n y un rango de 30nm. Para la mCherry se utilizará una excitación de 545nm y una emisión de 580nm. Su análisis se llevará cabo mediante el Software Olympus Fluoview Forward100 (versión 1.7) (Ramirez, 2012).

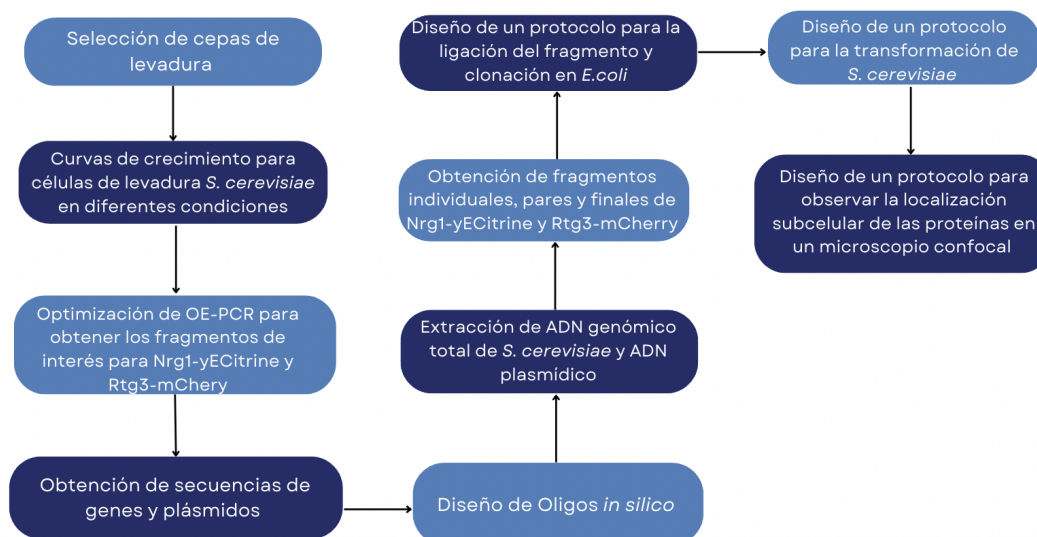


Figura 26: Diagrama de flujo de la metodología utilizada en este trabajo.

7.1. Caracterización fenotípica de cepas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ en condiciones de glucosa o etanol como única fuente de carbono comparándola con una cepa silvestre (WT).

Las cepas utilizadas fueron: Cla1 silvestre (WT), Cla 11-173 *nrg1* Δ y Cla 1-3 *rtg3* Δ (Cuadro 2). Se determinó la velocidad de crecimiento (μ h⁻¹) para cada una en diferentes condiciones modificando la fuente de carbono, siendo glucosa o etanol, la presencia o ausencia de ácido glutámico y solamente se mantuvo el amonio (NH₄) como única fuente nitrógeno para todas las pruebas.

Cuando las cepas son crecidas en glucosa como única fuente de carbono y amonio como única fuente de nitrógeno (Figura 27-A), se puede observar que en las mutantes sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ , la velocidad de crecimiento disminuye en un 40 y 45 % (valor de μ —Cuadro 25) respectivamente, comparado con la cepa silvestre (valor de μ —(Cuadro 25)). Si las cepas ahora son crecidas en presencia de glucosa como única fuente de carbono, amonio como única fuente de nitrógeno y suplementada con ácido glutámico 5mM (Figura 27-B), se puede observar que para el caso de la cepa *nrg1* Δ se mantiene la disminución en la velocidad de crecimiento de un 40 % (valor de μ —(Cuadro 25)), mientras que en la cepa *rtg3* Δ la disminución es de un 25 % (valor de μ —Cuadro 25) comparadas con la cepa silvestre (valor de μ —). Por lo que, al agregar ácido glutámico la velocidad de crecimiento de la cepa *rtg3* Δ , se incrementa, aunque no alcanza el nivel de la cepa silvestre.

Al crecer las cepas en etanol como única fuente de carbono y amonio como única

fuentes de nitrógeno (Figura 27-C), se puede observar que en las mutantes sencillas *nrg1Δrtg3Δ* la velocidad de crecimiento no es detectable (valor de μ —Cuadro 25) respectivamente, comparado con la cepa silvestre (valor de μ —Cuadro 25). Si las cepas ahora son crecidas en presencia de etanol como única fuente de carbono, amonio como única fuente de nitrógeno y suplementada con ácido glutámico 5mM (Figura 27-D), se observa que en las mutantes sencillas *nrg1Δrtg3Δ*, las velocidades de crecimiento tampoco son detectadas (valor de μ —Cuadro 25) comparadas con la cepa silvestre (valor de μ —Cuadro 25) aún cuando en glucosa este efecto no fue el mismo.

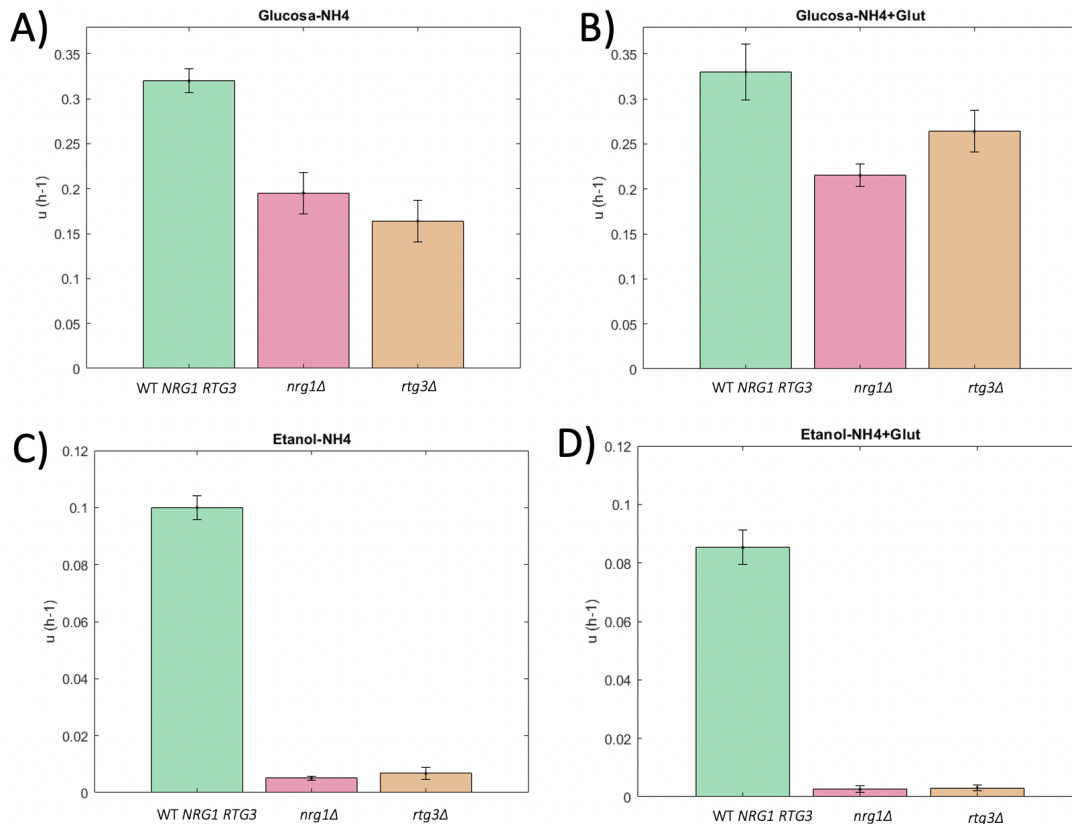


Figura 27: Velocidad de crecimiento (μ) en *S. cerevisiae* utilizando glucosa o etanol como única fuente de carbono.

En el eje X se presenta las tres cepas del estudio: Silvestre (WT), *nrg1Δ* y *rtg3Δ*; en el eje Y se muestra la velocidad de crecimiento expresada en μ (h⁻¹) en diferentes condiciones: **A)** Se utilizó glucosa como única fuente de carbono y amonio como única fuente nitrógeno; **B)** Se utilizó glucosa como única fuente de carbono, amonio como única fuente de nitrógeno y ácido glutámico 5mM. **C)** Se utilizó etanol como única fuente de carbono y amonio como única fuente de nitrógeno; **D)** Se utilizó etanol como única fuente de carbono, amonio como única fuente de nitrógeno y ácido glutámico 5mM. Para todas las curvas de crecimiento en cada medio se adicionaron los aminoácidos necesarios para suplir las auxotrofías de todas las cepas, los cuales fueron Leucina y Uracilo y la resistencia a G418 en las mutantes sencillas.

<i>Condición/ Cepa</i>	<i>Glucosa- NH₄</i>	<i>Glucosa- NH₄ + Glut</i>	<i>Etanol-NH₄</i>	<i>Etanol-NH₄ + Glut</i>
	μ (h-1)	μ (h-1)	μ (h-1)	μ (h-1)
<i>WT</i>	0.3199	0.3299	0.1000	0.0853
<i>nrg1</i> Δ	0.1951	0.2151	0.0051	0.0025
<i>rtg3</i> Δ	0.1639	0.2639	0.0067	0.0030

Cuadro 25: Valores de velocidad de crecimiento expresado en μ (h-1). (WT: Cepa Silvestre)

7.2. Diseño de oligos *in silico* para obtener el fragmento final de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry

Diseñar oligos *in silico* previo a la obtención de fragmentos es esencial para obtener insertos adecuados con las secuencias necesarias para llevar a cabo una OE-PCR estable. Con esto, primero se diseñaron oligos específicos para obtener los fragmentos individuales: A , B y C (Figura 22) para generar un gen híbrido que incluya secuencias del gen de interés (*NRG1* o *RTG3*), y de una proteína reportera, que en este caso, se utilizó una proteína fluorescente verde (yECitrine proveniente del plásmido pKT0175) con el marcador de selección URA3⁻ y una proteína fluorescente roja (mCherry proveniente del plásmido H2B-mcherry) con el marcador de selección de resistencia a Geneticina (G418).

Los oligos para obtener el fragmento B, de las proteínas fluorescentes yECitrine y mCherry, se construyeron con una longitud de aproximadamente 20 pb, donde el %GC varió entre 50-60, mientras que las $Tm^{\circ}C$ se mantuvieron similares, no menores a 60°C (Cuadro 26), oligos: 3 y 4). Los oligos para obtener los fragmentos A y C, es decir los ORF5' y UTR3' de los genes *NRG1* y *RTG3*, se construyeron a modo que el producto final mantuviera aproximadamente 20 pb homólogas/complementarias al 5' y 3' del fragmento de la proteína fluorescente. Para ello, los ORF 5' se amplificaron con un oligo Fw de 20pb convencional (26, oligo:1) y un oligo Rv quimérico de casi 45pb (26, oligo:2), que poseen entre 20-25 pb homólogas a la región 5' de la proteína fluorescente; mientras que, los UTR 3' se amplificaron de manera similar, con la diferencia de que, el oligo Fw es un oligo quimérico (26, oligo:5) y el Rv es un oligo convencional de 20pb (26, oligo:6). En este caso, el fragmento posee entre 20-25 pb homólogas a la región 3' del fragmento de la proteína fluorescente; Los oligos quiméricos mantuvieron un %GC de 49-50%; sin embargo, la $Tm^{\circ}C$ resultó demasiado alta debido a la longitud del oligo, pero esto no afectó la amplificación de fragmentos. Con estas regiones homólogas, se promueve la superposición de la OE-PCR y así se generó el fragmento completo del gen con la etiqueta de la proteína fluorescente, Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry, específicamente.

<i>NRG1</i>				
No. Oligo	Nombre	Sec 5' → 3	%GC	Tm °C
1	FwORF5' NRG1	TTCTACTATGCCCGCACTGC	55	60.5
6	RvUTR3' NRG1	CCTAGTAAAACGCTTGCAGC	50	58.4
3	FwyECitrine	CGGTGACGGTGTGGTTTAATT	50	62.1
4	RvyECitrine	GGCGGCGTTAGTATCGAATCG	57	63.2
2	RvquiméricoyE	AATTAACCAGCACCGTCAACGGTGTGCCCTTTTCAAATGTGTTC	50	81.6
5	FwquiméricoyE	CGATTTCGATACTAACGCCCGCTTGACGGTATACCCGTGTTTTTCTC	50	81.6
<i>RTG3</i>				
No. Oligo	Nombre	Sec 5' → 3	%GC	Tm °C
1	FwORF5' RTG3	GGACCTGGAAGTGTTCCTAAA	50	58.4
6	RvUTR3' RTG3	GTAGCGCATTAGTCTTCTGC	50	58.4
3	FwmCherry	TCTAAGGATCCACCGGTGCG	60	62.5
4	RvmCherry	TCTCGTGTGGCAGGTTGGG	60	62.5
2	RvquiméricomC	GCGACCGGTGGATCCTTAGACCCCGAACCAAATTCATAAAGATAG	49	80.8
5	FwquiméricomC	CCCAACCTGCCATCACGAGAGGTACAGTAAGCAAAAGCAGTAAAA	49	80.8

Cuadro 26: Lista de oligos para obtener los fragmentos individuales y pares mediante OE-PCR para *NRG1* y *RTG3*. (Las letras en negritas representan las regiones de empalme entre la región de ORF5' y UTR3' de cada gen con la proteína fluorescente)

Posteriormente, se diseñaron oligos anidados los cuales se ubicaron 100 pb downstream del oligo FwORF5' (Cuadro 26, oligo:1) y menos 100 pb upstream del oligo RvUTR3' (Cuadro 26, oligo: 6) para ambos genes. Estos se diseñaron convencionalmente, con una longitud de 18-20 pb, un %GC entre 50-56 y una $Tm^{\circ}C$ similar, mayor a $50^{\circ}C$. Además, a estas mismas secuencias de oligos, se les añadió la secuencia de dos enzimas de restricción: *KpnI* (GGTACC) para el oligo Fw y *XhoI* (CTCGAG) para el oligo Rv así como 3 pares de GC, los cuales se diseñaron para su posterior uso en la ligación del constructo final en el plásmido centromérico multicopia pRS416 y llevar a cabo una clonación en *E.coli* para facilitar la obtención del fragmento en usos futuros sin realizar una OE-PCR (Cuadro 27 y 28). A diferencia de los oligos anidados sin enzima de restricción, estos poseen un mayor %GC entre 50-60 y una $Tm^{\circ}C$ promedio de $55^{\circ}C$ (27 y 28). Estos oligos se verificaron mediante un gradiente de temperatura de PCR utilizando ADN genómico total de una cepa silvestre (WT) *ura3⁻ leu2⁻* de *S. cerevisiae*, con una enzima *PCRBIO classic Taq*, donde los oligos anidados con las secuencias de enzimas de restricción amplificaron fragmentos de 995 pb para *NRG1* y 949 pb para *RTG3*, tomando en cuenta temperaturas entre $55^{\circ}C$, $60^{\circ}C$, $65^{\circ}C$ y $70^{\circ}C$; siendo $60^{\circ}C$ y $65^{\circ}C$ las más óptima (Figura 35- Anexos).

Para determinar que el constructo final se insertó en el lugar esperado dentro del genoma de *S. cerevisiae*, también se diseñaron oligos de verificación (Cuadro 30- Anexos), los cuales se utilizaran luego de la transformación. Estos son oligos convencionales de 18-20 pb que amplificaron el constructo completo, y las mitades de la proteína fluorescente como regiones del gen, es decir que, se obtendría parte del ORF5' del gen y parte del 5' de la proteína fluorescente, así como parte del UTR 3' del gen y parte del 3' de la proteína fluorescente; los oligos poseen un %GC de 50 y una $Tm^{\circ}C$ mayor a $50^{\circ}C$. Con esto, se confirmarán las cepas etiquetadas con el gen reportero, además de su demostración en medios selectivos a través de la selección de cepas que mantengan el marcador para revertir la auxotrofia de uracilo (*URA3⁻*), en el caso de Nrg1-yECitrine y la resistencia a Geneticina (G418) para Rtg3-mCherry.

Oligos anidados Nrg1-yECitrine con secuencia de enzimas de restricción					
Nombre	Enzima	Oligo	Secuencia 5-3´	Tm°C	%GC
FwKpnNRG1-yE	<i>KpnI</i>	Fw	GCGCGC <i>GGTACC</i> GGCTCTGAAAAGTGGGAG	79°C	67%
RvXhoNRG1-yE	<i>XhoI</i>	Rv	GCGCGC <i>CTCGAG</i> CGTACATCACGTGAACTG	77.4°C	63%
Oligos anidados Nrg1-yECitrine sin secuencia enzimas de restricción					
Nombre	Oligo	Secuencia 5-3´	Tm°C	%GC	
FwAniNRG1-yE	Fw	GGCTCTGAAAAGTGGGAG	56.3°C	56%	
RvAniNRG1-yE	Rv	CGTACATCACGTGAACTG	53.8°C	50%	

Cuadro 27: Lista de oligos anidados para obtener el constructo final de Nrg1-yECitrine mediante OE-PCR. (Las letras en negrita representan los tres pares de GC y las letras en rojo el sitio de corte de las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*)

Oligos anidados Rtg3-mCherry con secuencia de enzimas de restricción					
Nombre	Enzima	Oligo	Secuencia 5-3´	Tm°C	%GC
FwKpnRTG3-mC	<i>KpnI</i>	Fw	GCGCGC <i>GGTACC</i> CCAGTTGGTTCCACCATC	79°C	67%
RvXhoRTG3-mC	<i>XhoI</i>	Rv	GCGCGC <i>CTCGAG</i> CGGGCAGCACATGTATAT	77.4°C	63%
oligos anidados Rtg3-mCherry sin secuencia enzimas de restricción					
Nombre	Oligo	Secuencia 5-3´	Tm °C	%GC	
FwAniRTG3-mC	Fw	CCAGTTGGTTCCACCATC	56.3°C	56%	
RvAniRTG3-mC	Rv	CGGGCAGCACATGTATAT	53.8°C	50%	

Cuadro 28: Lista de oligos anidados para obtener el constructo final de Rtg3-mCherry mediante OE-PCR. (Las letras en negrita representan los tres pares de GC y las letras en rojo el sitio de corte de las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*)

7.3. Confirmación de los fragmentos de ORF´s y UTR´s de los genes *NRG1* y *RTG3* a partir de ADN total de *S. cerevisiae* y fragmentos del marcador fluorescente de yECitrine del plásmido pKT0175 y mCherry del plásmido H2B-mcherry

La extracción de ADN total de *S. cerevisiae* de una cepa silvestre (WT) se realizó siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos; resultado de esta, se obtuvo una concentración de 180-200 ng/ μ L y una pureza relativamente alta (parámetros de nanodrop). La integridad se verificó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 28-A). De igual forma, la digestión de los plásmidos pKT0175 y H2B-mCherry con la enzima de restricción *Hind III* fue notable respecto a los plásmidos no digeridos, puesto que, se obtuvo solamente una banda correspondiente al peso del plásmido lineal de 4,900 pb para pKT0175 y 6,476 pb para H2B-mCherry; mientras que, los no digeridos mostraron diferentes bandas correspondientes a un plásmido superenrollado debido a su forma circular (Roy et al., 2018) (Figura 28-B). Para verificar la integridad del ADN genómico total y el ADN plasmídico, se realizó una PCR convencional de prueba donde se amplificó la codificante de NRG1 de 690 pb

usando como ADN molde el de la cepa WT, la mitad de la proteína yECitrine del plásmido pKT0175 de 713 pb y parte del marcador de selección de Geneticina (G418) junto con la mitad de la proteína mCherry del plásmido H2B-mcherry de 1,360 pb. Todos los fragmentos se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Figura 34- Anexos).

Luego de verificar la integridad de los ADN extraídos, se obtuvieron el ORF5' y UTR3' de *NRG1* y *RTG3* así como el fragmento de interés de los plásmidos, incluyendo la proteína fluorescente como el marcador de selección (Figura 22-Fragmentos A, B y C). Para esto, se utilizaron los oligos del Cuadro 26, específicamente el 1,6, 2 y 5 (Figura 18) y las bandas se verificaron por medio de un gel de agarosa al 1% (Figura 28). Para *NRG1* se obtuvo el ORF5' de 658 pb (carril 1) y el UTR3' de 650 pb (carril 3); mientras que, para *RTG3* el ORF5' fue de 663 pb (carril 5) y el UTR3' de 632 pb (carril 7). Tanto el ORF5' (fragmento A) como el UTR3' (fragmento B) de ambos genes mantuvieron tamaños similares debido a la cantidad de pares de bases requeridas en la OE-PCR, por lo que, la temperatura de alineamiento para su obtención fue la misma.

Los fragmentos del gen reportero obtenidos a partir de ADN plasmídico (fragmento B) fueron más pesados debido a su longitud en pares de bases, obteniendo para el caso de la proteína fluorescente yECitrine un peso 2,409 pb obtenido del plásmido pKT0175 y para el caso de la proteína fluorescente mCherry un peso de 2,755 pb obtenido del plásmido H2B-mcherry. La diferencia de tamaño de ambos fragmentos se notó significativamente en la electroforesis en gel al 1% en el carril 8 y 9 (Figura 28- D) y los oligos empleados fueron el 3 y 4 del Cuadro 26. Para obtener las secuencias individuales A y C de *NRG1* y *RTG3*, se verificó previamente el alineamientos de secuencias (BLAST) con los oligos empleados en esta sección (Cuadro 26) para asegurarse que la homología fuera única, en el lugar objetivo dentro del genoma de *S. cerevisiae* con el objetivo de minimizar el alineamiento de secuencias inespecíficas.

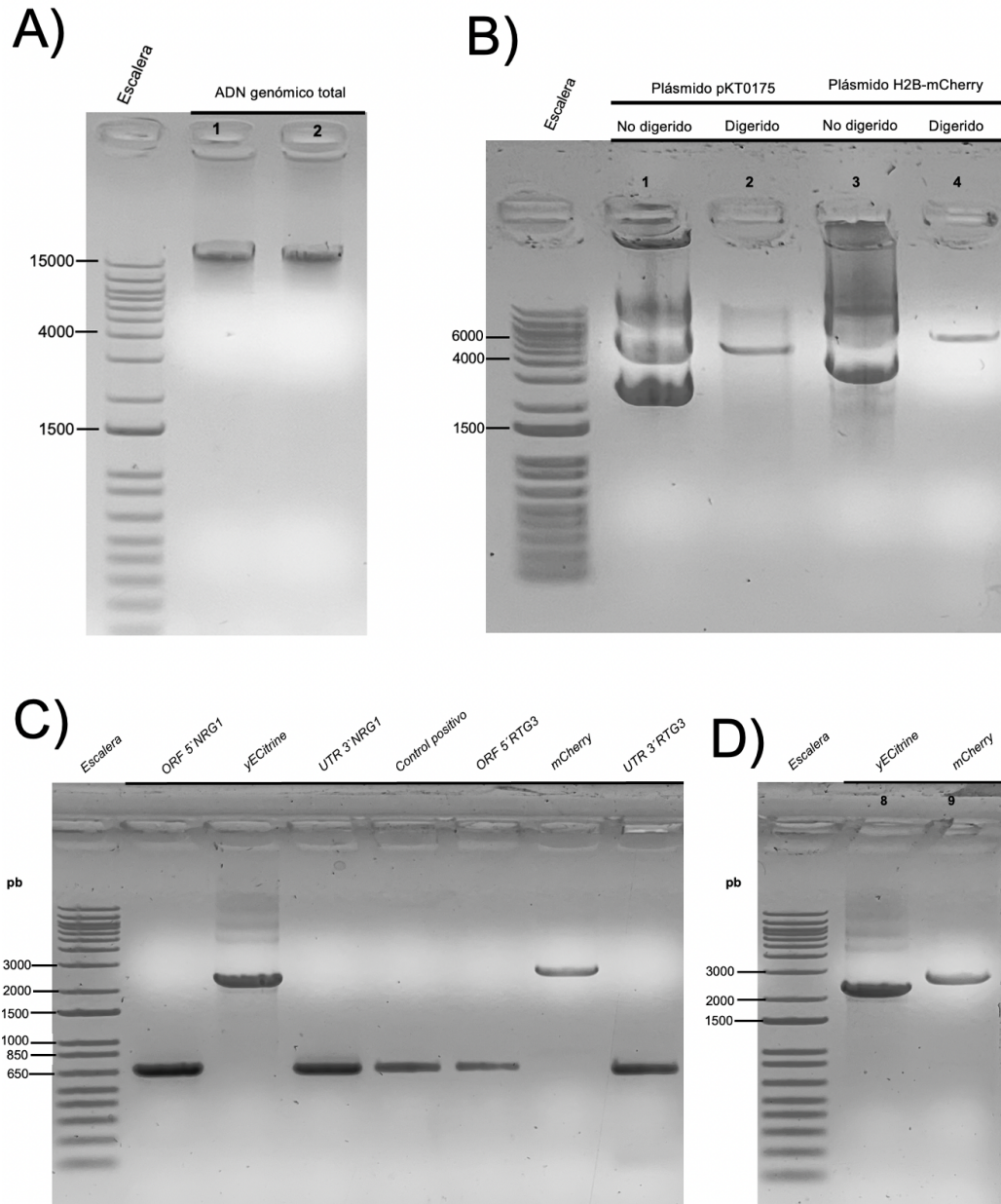


Figura 28: Fragmentos individuales para *NRG1* y *RTG3* (A, B y C):

A) Extracción de ADN genómico total de *S. cerevisiae* de una cepa silvestre (WT) *ura3-* y *leu2-*. **B)** Plásmidos pKT0175 que posee el fragmento de la proteína fluorescente yECitrine y el marcador de selección para la auxotrofia con URA3- y H2B-mcherry que contienen la proteína fluorescente mCherry y el marcador de selección de resistencia a kanamicina, digeridos y no digeridos. **C)** Fragmentos A y B: ORF's y UTR's de *NRG1* y *RTG3* (Carril 1, 3, 5 y 7); Fragmento B: gen reportero que posee la proteína fluorescente y marcador de selección obtenida de los plásmidos pKT0175 (carril 2) y H2B-mcherry (carril 6). Se utilizó la amplificación de la codificante de *NRG1* (690 pb) como control positivo (carril 4) para verificar el PCR. **D)** Diferencia de pesos del gen reportero, donde mCherry es más pesada que yECitrine debido a la cantidad de pares de bases y tamaño del fragmento (carril 8 y 9).

7.4. Los fragmentos pares B+C, donde se obtiene la proteína fluorescente con el UTR3' del gen *NRG1* o *RTG3*, son más estables que el fragmento A+B.

Previo a obtener el fragmento final, se realizó una OE-PCR específica para obtener los fragmentos “pares” de ambos genes (A+B y B+C) (Figura 18 y 22). Los productos finales se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Tanto para *NRG1* como *RTG3*, el fragmento que se logró obtener con una mayor concentración y pureza fue el B+C, donde el producto posee el UTR3' del gen con el fragmento de la proteína fluorescente incluyendo el marcador de selección, como se observa en la (Figura 29), A-B. La longitud de pares de bases de este fragmento es muy similar entre ambos genes, donde el UTR 3' *NRG1* + yECitrine se obtuvo con un peso de 3,058 pb (Figura 29-A: carril 2) y el UTR 3' *RTG3* + mCherry con 3,418 pb (Figura 29-A: carril 4). Durante la investigación, se realizaron más de tres réplicas de esta reacción, donde en todas se obtuvieron fragmentos puros, enriquecidos y estables como se muestra en la (Figura 29-B).

El resultado del fragmento A+B, donde el producto posee el ORF 5' del gen con el fragmento de la proteína fluorescente y el marcador de selección, demostró bandas con un peso de 3,067 pb para *NRG1* y de 3,387 pb para *RTG3*. Sin embargo, para ambos casos se obtuvieron bandas tenues y degradadas (Figura 29- carril 1 y 4). Así mismo, las réplicas de estas reacciones demostraron resultados similares, donde algunos productos presentaron rastros de “smear” al fondo, por lo que, tanto su obtención como purificación no fueron las más óptima para conseguir una banda más robusta. (Figura 29-B).

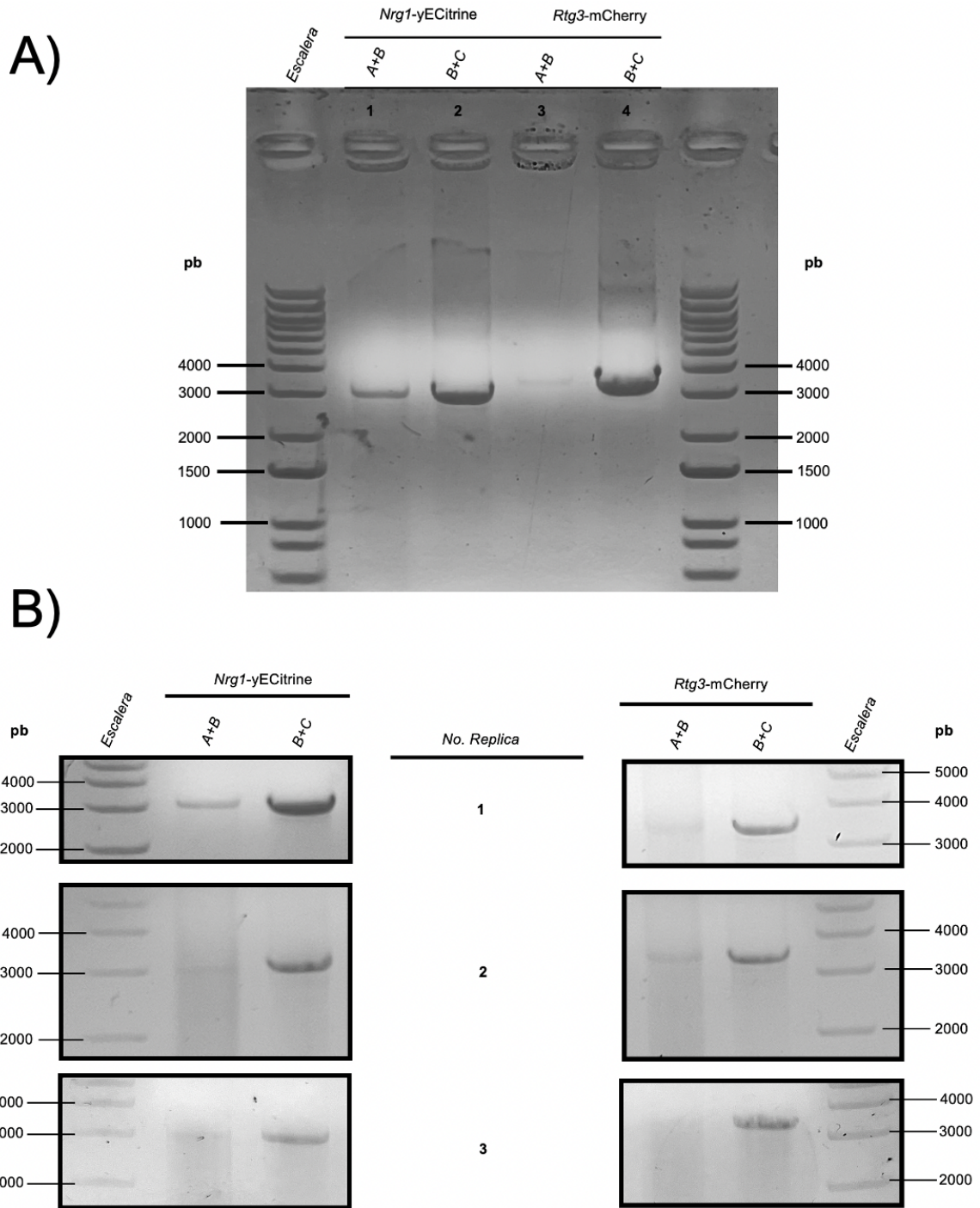


Figura 29: Fragmentos pares de *NRG1* y *RTG3*.

A) Carril 1: fragmento A+ B de *NRG1* (ORF 5' + yECitrine); Carril 2: fragmento B+C de *NRG1* (UTR 3' + yECitrine); Carril 3: Fragmento A+B de *RTG3* (ORF 5' + mCherry); Carril 4: Fragmento B+C de *RTG3* (UTR 3' + mCherry). **B)** réplicas donde se realizó la misma reacción de OE-PCR para obtener los fragmentos pares de *NRG1* y *RTG3* demostrando que la banda para ORF5' con la proteína fluorescente no es óptima respecto a la banda de UTR3' con la proteína fluorescente.

7.5. Los oligos anidados promovieron el enriquecimiento de los fragmentos finales de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry mejorando la optimización de la técnica de OE-PCR

Para la obtención del fragmento completo de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry, primero se realizó una reacción de OE-PCR utilizando ambos fragmentos pares (A+B y B+C), donde el fragmento B, llevará a cabo una extensión de sobreposición o reacción de fusión entre las pares de bases complementarias, ya que el ORF 5' y UTR 3' al estar fusionados con el fragmento B, compartían más de 2,000 pb correspondientes a la proteína fluorescente (yECitrine o mCherry). Sin embargo, a pesar que se realizó la amplificación del fragmento completo con una enzima de alta fidelidad (*PCRBIO HiFi polymerase Mn Systems*) y con una enzima *Phusion™* de alta fidelidad de Thermo Fisher (datos no mostrados), en ambos casos no se obtuvo ninguna banda al realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, para ambos genes, se optó por realizar la superposición utilizando un constructo pequeño (Fragmento A o C) con un constructo más largo (Fragmento par A+B o B+C), donde se decidió por el fragmento A y el fragmento B+C, debido a la estabilidad y mejor purificación de dicho fragmento par como se mencionó anteriormente (Figura 29-A y B). Cabe mencionar que, para estos experimentos no se contaba aún con los oligos anidados, por lo que, para obtener el fragmento completo se emplearon los oligos 1 y 6 del Cuadro 26.

Para esto, se realizó un gradiente con dos temperaturas diferentes de alineamiento en la reacción de PCR: 1) Extensión superpuesta a una temperatura de alineamiento a 56°C y amplificada a 60°C; 2) Extensión superpuesta a una temperatura de alineamiento a 60°C y amplificada a 65°C. Es importante mencionar que todas las reacciones de extensión superpuesta o de fusión (sin oligos) se llevaron a cabo empleando una enzima de alta fidelidad, y se cambió solamente las enzimas para la amplificación (con oligos) del constructo. En tal caso, las enzimas empleadas para la amplificación fueron: *PCRBIO HiFi polymerase Mn Systems* (Enzima High fidelity), enzima *Phusion™* de alta fidelidad de Thermo Fisher (*Phusion HF*) y una enzima *PCRBIO classic Taq*. Los resultados para el fragmento completo de Rtg3-mCherry fueron evidentes (Figura 30-A), ya que fue notable la diferencia entre todas las condiciones. Se demostró que no fue útil emplear una enzima de alta fidelidad (*PCRBIO* o *Phusion™*), ya que se obtuvo un bandeo más inespecífico y no se favoreció el fragmento esperado, dado que, la banda era casi imperceptible. Por el contrario, la enzima *classic Taq* presentó mejores resultados, obteniendo una banda más visible con un peso de 4,050 pb; sin embargo aún se observó bandeo inespecífico. Además, para todas las pruebas se observó que la extensión superpuesta a una temperatura de alineamiento a 60°C y amplificada a 65°C fue la que rindió mejores resultados.

También, se llevó a cabo una amplificación del fragmento final de Rtg3-mcherry

mediante una reacción para fragmentos largos siguiendo el protocolo de *QIAGEN* con la enzima *PCRBIO HiFi polymerase Mn Systems* (*QIAGEN*, 2013), esperando a favorecer el constructo, sin embargo no se obtuvo ninguna banda (datos no mostrados). De igual manera, estas pruebas también se emplearon para obtener el fragmento final de *Nrg1-yECitrine*, pero a comparación de *Rtg3-mCherry*, en este caso no se obtuvo ninguna banda esperada o inespecífica, dando como resultado degradación de ADN o “smear” en todos los pocillos (datos no mostrados).

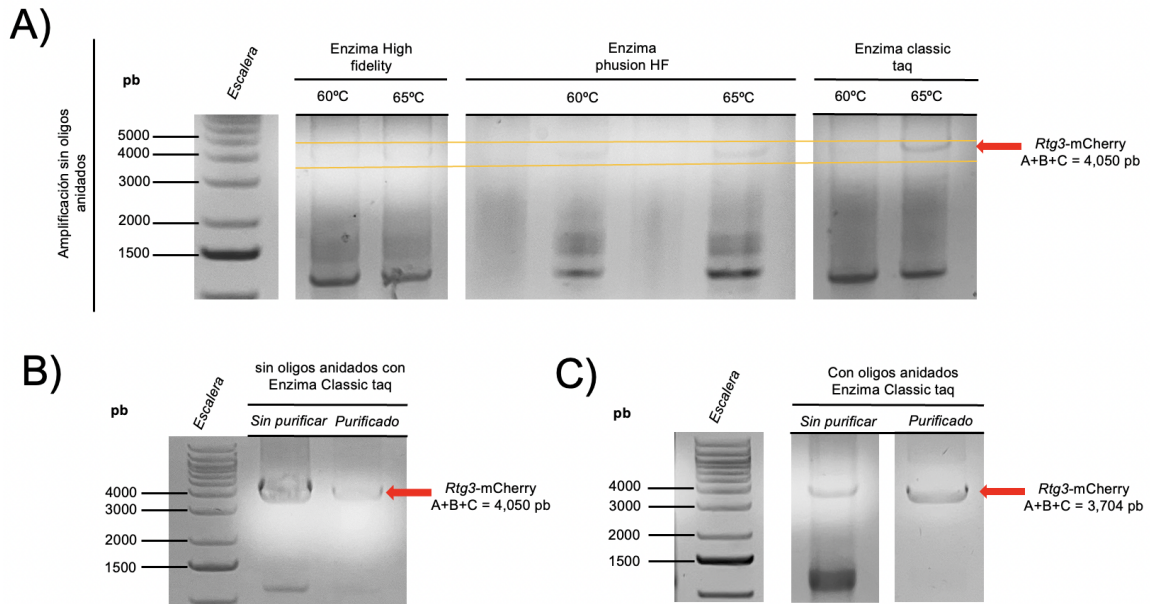


Figura 30: Optimización del fragmento completo de *Rtg3-mCherry*

A) Amplificación sin oligos anidados del fragmento final utilizando una enzima *PCRBIO HiFi polymerase Mn Systems* (*Enzima High Fidelity*), enzima *Phusion*™ de alta fidelidad de Thermo Fisher (*Phusion HF*) y una enzima *PCRBIO classic Taq*. La temperatura corresponde a una temperatura de alineamiento para la reacción de extensión sobrepuesta sin oligos (50°C y 60°C), así como la temperatura de alineamiento de la reacción de amplificación con oligos (60°C y 65°C)-solo se muestra la temperatura de amplificación-. **B)** Fragmento final de *Rtg3-mCherry* amplificado con *classic Taq* a 65°C sin oligos anidados, sin purificar (izquierda) y purificado (derecha). **C)** Fragmento final de *Rtg3-mCherry* amplificado con *classic taq* con oligos anidados, sin purificar (izquierda) y purificado (derecha). Se esperaba una banda de 4,050 pb con oligos convencionales - Fw ORF5' / Rv UTR3' y de 3,704 pb con oligos anidados - FwAniRTG3-mC / RvAniRTG3-mC-.

De acuerdo con la banda obtenida del fragmento completo de *Rtg3-mCherry* empleando la enzima *classic Taq* con una amplificación a una temperatura de alineamiento a 65°C, se realizaron más reacciones para obtener mayor cantidad del producto. Se obtuvieron las bandas esperadas y posteriormente se purificó desde el gel, sin embargo como se observa en la Figura 30-B, la banda previa a la purificación demostró degradación y después de la purificación se perdió gran cantidad de muestra; se logró

eliminar las bandas inespecíficas, pero el fragmento aún no se consideraba óptimo. Por ese motivo, era necesario encontrar una forma de enriquecimiento para el fragmento de interés; por lo que, hasta en este punto se solicitaron los oligos anidados y se llevó a cabo la amplificación con los oligos del Cuadro 27. Se observó un resultado efectivo, ya que se logró incrementar la pureza y concentración del fragmento completo de Rtg3-mCherry (Figura 30-C), teniendo una banda más robusta con un peso final de 3,704 pb; además, luego de purificar el constructo, se eliminaron las bandas inespecíficas y el fragmento se mantuvo óptimo. Con este resultado, se estableció el protocolo de optimización para el fragmento completo de Rtg3-mCherry (Figura 32).

Para el fragmento completo de Nrg1-yECitrine se optó por realizar una reacción de un solo paso, empleando una extensión superpuesta y una amplificación en una misma reacción de PCR, ya que las mismas pruebas utilizadas para el fragmento de Rtg-mCherry no fueron efectivas en este caso. Por ello, en esta ocasión se realizó una OE-PCR directa utilizando una enzima *classic Taq* y otra de *PCR BIO HiFi polymerase Mn Systems* (Enzima High Fidelity), evaluando la presencia o ausencia de DMSO y se utilizaron los oligos anidados del Cuadro 27 (Figura 31-A). Se obtuvo el fragmento esperado de 3,404 pb empleando la enzima High Fidelity, ya que a comparación de la *classic Taq*, el constructo se favoreció más y minimizó la presencia de bandas inespecíficas. El DMSO no demostró tener un efecto significativo para obtener el fragmento, por lo que se decidió no utilizarlo. Al momento de purificar el constructo, no se perdió muestra y se mantuvo una pureza óptima (Figura 31-B). También, se realizó el mismo análisis sin tomar en cuenta las proporciones 60:120 nM mencionadas en la metodología, considerándose como una opción para facilitar la obtención del fragmento final. Para esto, se colocó una misma concentración para todos los fragmentos que fue de 100 ng/ μ L y se obtuvieron bandas ligeramente visibles, con bandeo inespecífico y presencia de degradación, por lo que, no se consideró como alternativa óptima (Figura 36- Anexos). De acuerdo con esto, se mantuvo la proporción en nanomoles de 60:120 y se logró establecer el protocolo de optimización del fragmento completo de Nrg1-yECitrine (Figura 32); cabe mencionar que esta misma reacción de un solo paso también se intentó para el fragmento final de Rtg3-mCherry, con el objetivo de minimizar pasos en el protocolo, sin embargo, el fragmento se obtuvo muy degradado y con gran cantidad de bandas inespecíficas (Figura 31-B: carril 2), por lo que, se mantuvo el procedimiento de OE-PCR con una reacción de superposición o de fusión y otra de amplificación, respectivamente.

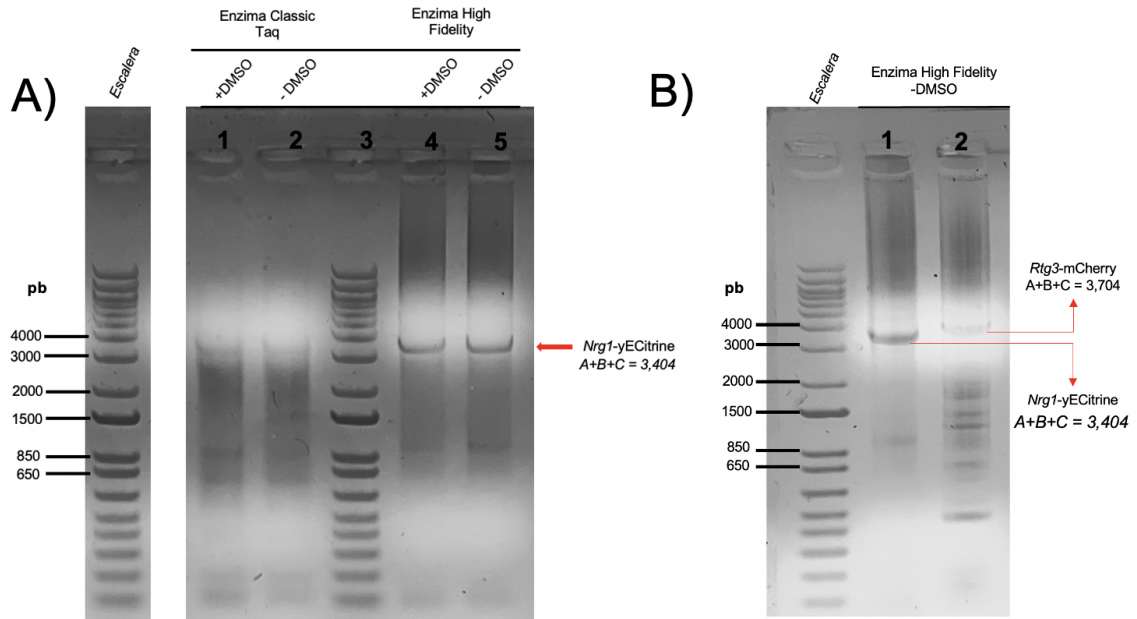


Figura 31: Optimización del fragmento completo de Nrg1-yECitrine

A). Fragmento Nrg1-yECitrine amplificado con la enzima classic taq con DMSO (carril 1) y sin DMSO (carril 2) y amplificado con una enzima *PCRBIO HiFi polymerase Mn Systems* (*Enzima High Fidelity*) con DMSO (carril 4) y sin DMSO (carril 5). **B).** Amplificación del constructo de Nrg1-yECitrine (carril 1) y Rtg3-mCherry (carril 2) con la enzima High Fidelity sin DMSO. Se esperaba un fragmento de 3,404 pb para Nrg1-yECitrine y de 3,704 pb para Rtg3-mCherry, en ambos casos utilizando los oligos anidados.

Los fragmentos finales se obtuvieron correctamente, cada uno con una metodología diferente, sin embargo, se logró mantener una pureza y concentración óptima. Además, estos constructos pueden amplificarse con los oligos anidados tanto con y sin enzimas de restricción, manteniendo un peso de aproximadamente 3,404 pb para Nrg1-yECitrine y 3,704 pb para Rtg3-mCherry. La adición de las secuencias de enzimas y los tres pares de GC no afectaron la amplificación del fragmento a las temperaturas evaluadas pero los pasos de purificación pueden afectar la cantidad del producto final (Figura 32). Ambos protocolos pueden ser utilizados para su posterior uso en la ligación y clonación del fragmento en el plásmido pRS416 o para llevar a cabo directamente la transformación en *S. cerevisiae*, tomando en cuenta que para este caso, se debe de contar con una concentración de mínimo $1\mu\text{g}$ del constructo.

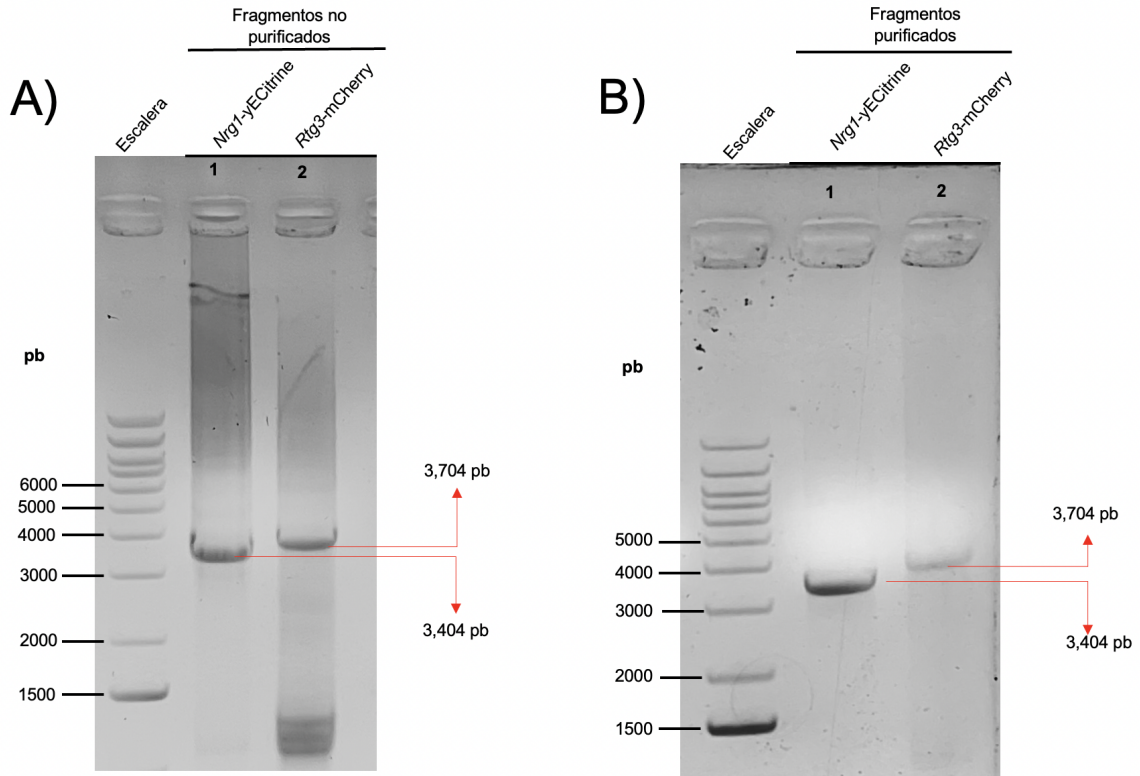


Figura 32: Fragmentos completos de *NRG1* y *RTG3*

A) Fragmento final de NRG1-yECitrine y RTG3-mCherry no purificados. B) Fragmento final de NRG1-yECitrine y RTG3-mCherry purificados en gel.

7.6. El fragmento completo de Nrg1-yECitrine demostró ser efectivo etiquetar a *NRG1* con la proteína fluorescente yECitrine en *S. cerevisiae*

Al purificar el constructo completo de Nrg1-yECitrine, se obtuvo una concentración final de 74.4 ng/ μ L con una pureza relativamente alta (parámetros de nanodrop) (Figura 32-carril 1), dando lugar a que con 13-15 μ L (aproximadamente 1 μ g) fuera suficiente para llevar a cabo el protocolo de transformación en *S. cerevisiae* descrito en la metodología. Se logró obtener colonias candidatas que después del protocolo de transformación crecían en medio selectivo siguiendo el marcador que era la prototrofia a uracilo, de las colonias después de los 3 pases de purificación recomendados para tener colonias puras monogénicas. Se decidió probar 5 posibles colonias candidatas para verificar que contenían la etiqueta de la proteína fluorescente yECitrine en el

marco de lectura de *NRG1*.

Como se puede observar en la Figura 33, después de hacer una extracción de ADN genómico total de las colonias candidatas y de la cepa silvestre como control, se hizo una PCR de punto final donde se amplificó el constructo con los oligos de verificación descritos en la metodología (Figura 21). Para el constructo completo se utilizaron los oligos 9 y 13 que abarcan del 5'ORF y UTR3' de *NRG1*; para determinar si la proteína fluorescente se encuentra en el mismo marco de lectura que el gen; también, se utilizaron los oligos internos 11 y 12 que amplifican el 5' y 3' de la proteína fluorescente, junto con los oligos 9 y 13. (Figura 21). Para la cepa silvestre, se obtuvo un fragmento de 1,000pb que corresponde al 5'ORF y UTR3' de *NRG1* (carril 2), mientras que en la amplificación con los oligos internos, no se observó una banda (carril 3 y 4); estos resultados corresponden a una cepa sin la etiqueta de la proteína fluorescente yECitrine. Por otro lado, las cepas que resultaron positivas con la etiqueta correspondiente, la amplificación del constructo completó dió lugar a una banda de 3,439 pb (carril 5), el cuál demuestra la presencia de la etiqueta yECitrine en el lugar esperado; la amplificación del constructo con los oligos internos (carril 6 y 7) demostraron bandas de 2,394 pb y 1,948 pb, las cuales eran las esperadas para la verificación del inserto.

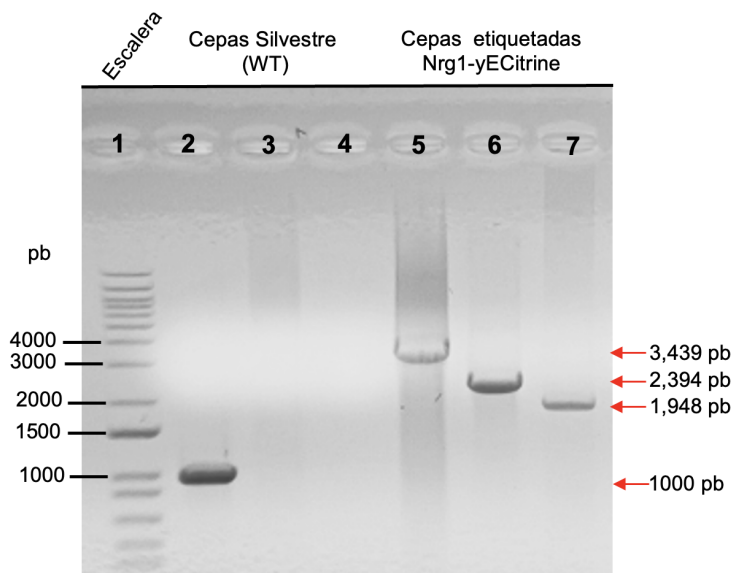


Figura 33: PCR de confirmación para la cepa etiquetada Nrg1-yECitrine.

En el carril 1 se muestra la cepa silvestre (WT) con una banda de 1,000 pb. En el carril 2-3 se muestran la amplificación de la cepa silvestre con oligos internos del constructo de yECitrine, los cuales no demostraron una banda. En el carril 5, se muestra una colonia positiva con la etiqueta Nrg1-yECitrine obteniendo una banda de 3,439pb, en carril 6 se muestra la amplificación del 5'ORF de NRG1 con un oligo interno 5' de yECitrine obteniendo una banda de 2,394 pb y en el carril 7 se muestra la amplificación del UTR 3' de NRG1 con un oligo interno del 3' de yECitrine demostrando una banda de 1,948 pb. Para las 5 cepas positivas con la etiqueta de yECitrine se obtuvieron los mismos resultados de PCR. Se utilizó la escalera molecular 1kb plus Jena Bioscience.

En el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado una alta plasticidad en la red transcripcional, en la cual, se destaca la importancia de la epistasis respecto a la interacción proteína-proteína entre la cooperatividad de los reguladores transcripcionales (Fowler et al., 2023), respectivamente. Esta característica conlleva a cambios en la regulación génica que contribuyen de manera significativa a la aparición de nuevos fenotipos representando una ventaja evolutiva; por ejemplo, el mecanismo de fermentación y respiración de la levadura que es reconocido a nivel mundial por su utilidad en la fabricación de pan y cerveza (Escalera-Fanjul et al., 2019). Esto lo hace un tema de investigación de gran importancia, pues hasta la fecha se sigue estudiando la regulación y mantenimiento tanto de genes como de organelos involucrados en el proceso. El grupo de investigación de la Dra. Alicia González en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ha sido pionero en descubrir complejos transcripcionales quiméricos tales como el complejo Hap-Gln3 (Hernández, Aranda, López et al., 2011) y el más reciente el complejo transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3, cuya principal función es mantener la integridad del ADN mitocondrial involucrado estrechamente en el proceso de fermentación (Campero-Basaldúa et al., 2023). La presencia de la quimera se evaluó mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación, sin embargo, aún se requiere validar su existencia con otros métodos para proporcionar una mayor robustez en la presencia de este nuevo complejo transcripcional, así como investigar más a fondo su regulación y estabilidad en la célula de la levadura, puesto que, se conoce la existencia del complejo quimérico, la función o daño primordial que genera en la mitocondria al ausentarse una de las proteínas que lo conforman, pero lo que se desconoce es qué regula este complejo y cómo es que lo hace. Por este motivo, el presente trabajo buscó llevar a cabo la optimización de un protocolo para obtener dos fragmentos de superposición o de fusión entre dos constructos de ADN específicos mediante la técnica de Extensión Superpuesta de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (OE-PCR, por

sus siglas en inglés), con el objetivo de aumentar la especificidad de transformación por recombinación homóloga en *Saccharomyces cerevisiae* y etiquetar a las proteínas Nrg1 y Rtg3 con marcadores fluorescentes yECitrine y mCherry, respectivamente.

La necesidad de conocer más sobre las cepas con las que trabajaría, respecto al efecto del complejo quimérico Nrg1 - Rtg3 y el fenotipo petite descrito previamente (Campero-Basaldúa et al., 2023), se realizaron curvas de crecimiento, para conocer el fenotipo de las cepas: Silvestre (WT) y de las mutantes sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ , evaluando la velocidad de crecimiento de *S. cerevisiae* en condiciones con glucosa o etanol como única fuente de carbono y sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las mutantes sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ mostraron una disminución en la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa silvestre, entre un 40-45 % respectivamente, cuando se crecieron en glucosa como única fuente de carbono; mientras que, cuando se crecieron en presencia de etanol como única fuente de carbono, las cepas mutantes *nrg1* Δ y *rtg3* Δ , obtuvieron una velocidad de crecimiento nula comparado con la cepa silvestre (valores de μ h⁻¹) (Figura 27/Cuadro 25). Los datos que se obtuvieron, se relacionan directamente con lo previamente observado por (Campero-Basaldúa et al., 2023), donde se menciona que las cepas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ demostraron un fenotipo “petite” debido a que crecen menos en glucosa como única fuente de carbono y no crecen en presencia de etanol. Este dato resulta ser de suma importancia, pues el fenotipo de crecimiento no se revierte, incluso cuando se complementan con sus genes de tipo silvestre *NRG1* o *RTG3*; es decir, mantienen el fenotipo petite comparados con la cepa silvestre. En otros artículos, se ha descrito que la característica de una levadura pequeña o petite se debe a un bloqueo en la vía de la cadena respiratoria, dañando el suministro de ATP (Day, 2013); por lo tanto, esto sugiere que *NRG1* y *RTG3* están involucrados en la regulación del genoma mitocondrial y en la ausencia de alguno de estos ocurre un daño irreversible (Campero-Basaldúa et al., 2023). Además, esto sustenta por qué las mutantes *nrg1* Δ y *rtg3* Δ se les dificulta crecer en etanol (Figura 27-C-D), ya que al ser una fuente de carbono secundaria respirable y no fermentable, las células necesitan más energía para metabolizarla y, al tener un daño en la mitocondria, este proceso no se ejecutará adecuadamente, dando lugar a que el etanol no pueda consumirse y solamente se acumula en la célula (Campero-Basaldúa et al., 2023) y (Stenger et al., 2020). En el medio con glucosa, la principal fuente de adquisición de energía en forma de ATP es la fermentación, lo que demostraría que los procesos de fermentación y respiración están separados en tiempo, pues en las mutantes *nrg1* Δ y *rtg3* Δ donde ya se ha demostrado un daño a nivel mitocondrial, las células crecen de una manera lenta, pero pueden crecer sin que se vea comprometido en su totalidad el proceso de fermentación (Stahl et al., 2004).

La característica de *rtg3* Δ al adicionar glutamato al medio de glucosa como fuente de carbono, en la que disminuyó un poco más el tiempo de duplicación a comparación de la *nrg1* Δ , se debe a que la función individual de *RTG3* es como un activador de la transcripción de la respuesta retrógrada y con ello, de genes involucrados en la síntesis de glutamato, como *CIT1*, *ACO1* e *IDH1/2*. Por lo tanto, al tener una cepa mutante sencilla del gen *rtg3* Δ genera un fenotipo de braditrofia por glutámico; es decir, la

célula puede sintetizar el aminoácido pero la velocidad de síntesis es menor, y cuando las mutantes *rtg3*Δ se crecen en presencia de glutámico 5mM se revierte el fenotipo a un fenotipo de tipo silvestre, pues recuperan la prototrofia de glutamato (Jazwinski, 2013). Esto confirma la recuperación significativa en la velocidad de crecimiento para esta mutante en el medio de glucosa-NH₄+Glut (Figura 27-B); sin embargo, no se vió dicha recuperación en el medio de etanol-NH₄+Glut, por lo ya previamente descrito (Figura 27-D) (Campero-Basaldúa et al., 2023).

De acuerdo con los resultados anteriores, se logró reproducir el fenotipo de *nrg1*Δ y *rtg3*Δ, donde junto con otros experimentos realizados en (Campero-Basaldúa et al., 2023), se estableció que la quimera transcripcional Nrg1-Rtg3 es esencial para mantener el metabolismo respiratorio y la producción de energía dependiente de la mitocondria. Posteriormente, se planteó el protocolo para obtener los fragmentos de ADN específicos y etiquetar con una proteína reportera fluorescente a las proteínas que conforman el regulador transcripcional híbrido Nrg1 y Rtg3. Para esto, se empleó la metodología de Extensión Superpuesta de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (OE-PCR) que utiliza el ensamblaje de oligonucleótidos superpuestos o de fusión para construir los fragmentos de interés (Kadkhodaei et al., 2016). Se ha descrito que *Saccharomyces cerevisiae* es reconocida por su alta eficiencia en recombinación homóloga debido a sus mecanismos de reparación del ADN, por lo tanto, un constructo con extremos de 30-60 pb o más, homólogos al lugar de inserción puede ser suficiente para obtener un alto rendimiento de transformantes (Hua et al., 1997) . A pesar de ello, se ha demostrado que la recombinación eficiente de un casete que lleva flancos homólogos cortos puede verse impedido debido a la estructura de la cromatina u otros obstáculos, donde la solución es colocar regiones más largas de aproximadamente 100 pb o más con el gen diana (Stepchenkova et al., 2023). De igual forma, se puede ocasionar una inestabilidad de la estructura resultante, dando lugar a que la secuencia del casete llegue a escindirse del cromosoma, obteniendo como resultado la restauración de la secuencia del gen de un tipo silvestre; por último, también puede ocurrir una posición genómica no deseable, puesto que, la inserción del ADN exógeno no se logra recombinar en el lugar objetivo (Stepchenkova et al., 2023). Por estos motivos, se ha optado por un método que proporcione mayor estabilidad y especificidad al inserto para una integración eficaz en el locus de interés en el genoma de *S. cerevisiae*, como lo es la OE-PCR. Asimismo, esta técnica ha demostrado ser una herramienta exitosa para la creación de “genes híbridos” , refiriéndose a genes con secuencias codificadoras de reporteros, como la proteína fluorescente verde (GFP) sin necesidad de disponer de secuencias de reconocimiento enzimático (Nelson & Fitch, 2011) , por lo que, resulta de una técnica ideal de acuerdo a los fines de este estudio.

En estudios anteriores, ya se ha etiquetado a Nrg1 (Vyas et al., 2001) y a Rtg3 (Komeili et al., 2000) y (Ruiz-Roig et al., 2012) con la proteína fluorescente verde (GFP-por sus siglas en inglés) específicamente, donde en ambos casos se utilizó un método convencional con enzimas de restricción, donde a partir de un plásmido lineal se amplifica el constructo con la proteína fluorescente y en los extremos 5´ y 3´ poseen regiones complementarias al promotor, ORF5´o UTR3´ de *NRG1* o *RTG3*

con secuencias relativamente cortas. Adicionalmente, poseen secuencias de enzimas de restricción que son específicas a plásmidos multicopia o vectores de expresión donde los fragmentos obtenidos con la etiqueta se ligaron y transformaron en *E. coli*. En el caso de Nrg1, demostraron una ubicación nuclear (Vyas et al., 2001), mientras que para Rtg3 se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo (Komeili et al., 2000), esto era de esperarse debido a que ambos cumplen un rol de factores de transcripción. Cabe mencionar que, el objetivo principal de estos artículos fue comprender la función del gen junto con su parálogo en el caso de Nrg1- Nrg2 y la función de Rtg3 junto con el complejo que forma para llevar a cabo la respuesta retrógrada con Rtg1 y Rtg2. En ninguno se menciona una relación potencial entre ambos reguladores. Cabe destacar que, existe muy poca información sobre la localización subcelular de Nrg1 y Rtg3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que solamente en (Vyas et al., 2001) se establece la ubicación Nrg1-Nrg2, mientras que otros artículos la describen en otras levaduras como *Pichia pastoris* (Wang et al., 2016). Esto mismo se observó sobre la localización subcelular de Rtg3, donde solamente se determinaron dos artículos con esta información. A pesar que el método empleado en estas investigaciones no involucran reacciones como la OE-PCR, se ve necesario buscar nuevos métodos que permitan determinar de una mejor manera la ubicación de Nrg1 y Rtg3 en la célula de *S. cerevisiae* debido a la importancia que generan ambas proteínas al formar el regulador transcripcional híbrido.

Una parte importante de la técnica de OE-PCR, es el uso de oligos que promuevan el fundamento de la superposición entre secuencias dando lugar a un empalme adecuado entre las pares de bases complementarias con el objetivo de elaborar un inserto con fragmentos específicos del gen diana que contenga en su mismo marco de lectura la etiqueta de una proteína fluorescente. En este trabajo, se seleccionó el plásmido pKT0175 que posee el casete de la proteína fluorescente verde (yECitrine), para etiquetar a Nrg1 y el plásmido H2B-mcherry que conlleva el casete de la proteína fluorescente roja (mCherry), para etiquetar a Rtg3. Además, se utilizó una cepa silvestre Ura3⁻ Leu2⁻ para obtener los ORF 5' (Open Reading Frame- por sus siglas en inglés) y los UTR 3' (Untranslated Region- por sus siglas en inglés) de los genes *NRG1* y *RTG3*; todos estos fragmentos fueron necesarios debido a que el constructo final requirió de mínimo 500 pb homólogas al sitio de inserción, por lo que, tanto el ORF 5' como el UTR 3' son esenciales para que el inserto mantuviera "colas" de recombinación o "sticky ends" lo suficientemente amplios para aumentar la especificidad del ADN exógeno y lograr introducirse en el locus objetivo de *S. cerevisiae*. Para lograr esto, se diseñaron oligos *in silico* de aproximadamente 40 pb llamados "Rv o Fw quimérico" (Cuadro 27, oligos 2 y 5), los cuales se constituyen de 20-25 pares de bases adicionales (Cuadro 27, oligo: 2 y 5 -letras en negrita) que son complementarias al 5' y 3' del casete de la proteína fluorescente (fragmento B) y el resto de la secuencia pertenece al ORF5' (fragmento A) o UTR3' (Fragmento C) del gen *NRG1* o *RTG3*. Esta secuencia adicional no es complementaria a la secuencia molde, sino a la secuencia donde se llevará a cabo la superposición entre pares de bases, por ese motivo, solamente un oligo posee dichas secuencias para obtener los fragmentos A o C, mientras que su contraparte es un oligo convencional; con esto, se llevará a cabo la

superposición en los 5' o 3' del fragmento B (Figura 22). Por esta razón, también es importante verificar que el empalme se genere en dirección 5' → 3' para obtener toda la codificación del gen híbrido en el mismo marco de lectura (Nelson & Fitch, 2011).

Estos oligos quiméricos, debido a la longitud de pares de bases pueden requerir temperaturas de $Tm^{\circ}C$ muy elevadas para su alineamiento en la reacción; sin embargo, se recomienda tomar en cuenta solamente la $Tm^{\circ}C$ de las secuencias complementarias al ADN molde y no de la secuencia adicional, dando lugar a una $Tm^{\circ}C$ más razonable similar a la del resto de oligos convencionales diseñados. De acuerdo con la técnica de OE-PCR, el fragmento de la proteína fluorescente individual no requirió de un diseño de oligos quiméricos, sino que se emplearon oligos convencionales de 20 pb que flanqueaban el casete de yECitrine o mCherry junto con su marcador de selección (Figura 16 y 17). Los fragmentos individuales correspondientes a *NRG1* y *RTG3* se obtuvieron correctamente siendo del peso esperado (Figura 28-C y D), donde los oligos empleados demostraron una alta especificidad dando lugar a fragmentos puros y concentraciones altas (parámetros del Nanodrop). Cabe mencionar que, el fragmento B requirió de una temperatura más alta para el alineamiento siendo de $70^{\circ}C$, a comparación de los fragmentos A y C, los cuales se amplificaron con una $Tm^{\circ}C$ de $60^{\circ}C$. Esto se debe al %GC de los oligos y a su longitud de pares de bases, donde un contenido de GC más alto, equivale a una temperatura de alineamiento o $Tm^{\circ}C$ más alta, por lo tanto, las condiciones de corrida fueron distintas. Previo a la obtención de los fragmentos individuales, se verificó la pureza del ADN genómico total de *S. cerevisiae* así como la digestión del ADN plasmídico mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 28-A y B); no se observaron rastros de etanol en las bandas de ADN genómico, por lo que, se consideró óptimo. Esto es importante ya que, si ambos ADN no se mantienen en condiciones adecuadas, puede ser un factor de error significativos dando resultados erróneos.

Los fragmentos A, B y C se utilizaron para obtener los constructos “pares”, los cuales incluyeron el ORF5' o UTR3' del gen diana fusionado a un extremo de la proteína fluorescente, obteniendo así constructos A+B y B+C. Se logró obtener ambos fragmentos, sin embargo, para el constructo A+B (ORF5' + gen reportero) tanto de Nrg1-yECitrine como de Rtg3-mCherry, fue el menos eficiente (Figura 29). Todas las réplicas para obtener el fragmento A+B, demostraron una mayor cantidad de “smear”, es decir, bandas difusas o degradadas, dando lugar a que su visualización en el gel fuera muy débil dificultando así su purificación obteniendo concentraciones muy bajas de ADN menores a $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (Figura 29-B). Se infirió que, lo que puede estar afectando es la estructura del ORF5' de *NRG1* y *RTG3*, de acuerdo a su %GC y por esto, no se logró una banda estable. Sin embargo, al evaluar estos valores se determinó que tanto el ORF5' y UTR3' de *NRG1* y *RTG3* se componían de un 31-38% de GC, por lo que, al haber obtenido una banda robusta y de alta pureza para el fragmento B+C de ambos genes, se descartó esta posibilidad; además, ambos fragmentos pares son de un tamaño de aproximadamente 600 pb, por lo que, la longitud del fragmento tampoco fue una variable que pudo haber afectado. Por otro lado, se ha descrito que el problema puede estar en la técnica en sí, ya que al utilizar secuencias se superposi-

ción naturales, a veces no produce ADN de fusión o sólo se detectan bandas de ADN débiles debido a la baja eficiencia de empalme entre las secuencias de superposición seleccionadas (Cha-aim et al., 2012). Varios artículos, han descrito que esto se puede resolver añadiendo secuencias cortas de 5CGC/5GCG en los extremos 5' del oligo que amplifica el fragmento que llevará a cabo el empalme entre los constructos para la superposición; debido a que estas secuencias ricas en GC promueven un ensamblaje de secuencias complementarias y se ha demostrado que son útiles para la construcción de genes quiméricos manteniéndolos en el marco de lectura y mejorando su estabilidad (Cha-aim et al., 2012) y (Nakamura et al., 2014).

En un principio, para la obtención del fragmento completo (A+B+C) de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry, se optó por una reacción de superposición o de fusión entre los fragmentos A+B y B+C empleando enzimas de alta fidelidad, sin embargo, debido a la secuencia de empalme, que en este caso fue el fragmento B, no se logró obtener ninguna banda (datos no mostrados). Esto puede deberse, a la longitud del fragmento B, que posee el casete completo de la proteína fluorescente donde, para yECitrine se obtuvo una banda de 2,409 pb y para mCherry de 2,755 pb (Figura 28 -D), por lo tanto, la superposición puede verse afectada ya que se podría requerir temperaturas de alineamiento más elevadas o muy bajas, dando lugar a un menor rendimiento de la reacción de OE-PCR (Nakamura et al., 2014). Por este motivo, además de la baja eficiencia del fragmento A+B obtenido; en el caso del fragmento completo de RTG3-mCherry, se requirió el uso del fragmento par B+C, y uno individual que fue el fragmento A, donde, solamente se llevó a cabo la reacción de superposición por parte del extremo 3' del fragmento A (ORF 5'), debido a la secuencia adicional del oligo Rv quimérico (Cuadro 26) y (Figura 30) que generó la superposición entre ambas secuencias. Se evaluó un gradiente de temperatura tanto para la reacción de superposición como para la reacción de amplificación del constructo y diferentes enzimas incluyendo de alta fidelidad y una *classic taq*. Se demostró que el empalme entre los fragmentos prefiere una $Tm^{\circ}C$ en la reacción de superposición de $60^{\circ}C$ y una amplificación a $65^{\circ}C$, puesto que a estas temperaturas se logró visualizar mejor la banda. Curiosamente, para las enzimas de restricción para la reacción de amplificación del constructo final, las menos eficaces fueron las de alta fidelidad (PCR BIO High fidelity y *PhusionTM*), a comparación de una enzima *classic Taq*, puesto que la banda esperada fue más notable. Esto no resultó ser lo esperado, ya que, en varios protocolos de OE-PCR recomiendan utilizar enzimas de alta fidelidad para la amplificación del fragmento (Nakamura et al., 2014), (Nelson & Fitch, 2011) y (Hilgarth & Lanigan, 2021). A pesar de ello, se sugiere que la enzima *classic Taq* PCR BIO demostró ser muy versátil para su uso en la técnica de OE-PCR; sin embargo, se esperaba obtener más cantidad de bandeo inespecífico que las de alta fidelidad, pero en vez de esto, se favoreció aún más la banda de interés. Esto puede deberse a la adición de DMSO, ya que pudo haber evitado la formación de estructuras secundarias de los oligos facilitando la elongación, también la temperatura de alineamiento empleada pudo favorecer la hibridación de secuencias lo que mejoró la estabilidad de la enzima (New England Biolabs, Fecha de acceso), además, esta enzima realiza la elongación de manera más irregular que una de alta fidelidad, por lo que pudo facilitar

la amplificación del fragmento. No obstante, no se descarta la posibilidad de que el fragmento final se encuentre más susceptible a errores en la secuencia, debido a que se ha descrito que esta enzima no posee ninguna actividad correctora como las de alta fidelidad, lo que significa que es más propensa a introducir algún cambio entre pares de bases durante la amplificación de la PCR, lo que puede resultar problemático para la transformación o especificidad al introducirlo en el locus de interés (Maddocks & Jenkins, 2017)

Con la enzima *classic Taq* se logró amplificar lo suficiente para obtener el constructo completo y purificado de Rtg3-mCherry, sin embargo, se seguía observando un fragmento muy tenue y degradado (Figura 30-B). Esto llevó a buscar una forma de enriquecer dicho producto, donde se encontró la utilidad de los oligos anidados, los cuáles se diseñaron hasta este punto del trabajo (Cuadro 28). Estos oligos, poseen una longitud convencional de 18-20 pb, y poseen la característica de producir amplicones más cortos debido a que se hibridan en sitios específicos dentro del producto original (Nelson & Fitch, 2011). En este caso, los oligos anidados corresponden a 100 pb río abajo del ORF5' y -100 pb río arriba del UTR3' de *NRG1* y *RTG3*. Esta técnica, aumenta la sensibilidad y especificidad de la PCR y ha demostrado ser eficaz para amplificar segmentos de plantillas largas, además, al aumentar la hibridación de los oligos al ADN molde, también se promueve el reconocimiento por parte de la ADN polimerasa (Green & Sambrook, 2019). De hecho, varios protocolos mencionan el uso de los oligos anidados, en los cuales adicionan secuencias con sitios de enzimas de restricción para manipular el gen de interés con otras técnicas moleculares como la clonación en plásmidos (Nakamura et al., 2014). Por ese motivo, también se llevó a cabo el diseño de oligos anidados con secuencias de enzimas de restricción específicas siendo *KpnI* y *XhoI*, además de tres pares de GC para aumentar la estabilidad del fragmento (Cuadro 27 y 28), con el objetivo de clonar el fragmento final a un plásmido multicopia como el pRS416, para replicar en *E.coli* y facilitar la adquisición del constructo de interés utilizando solamente una reacción de PCR. Asimismo, se verificó la $Tm^{\circ}C$ de estos oligos utilizando ADN genómico de una cepa silvestre de *S. cerevisiae*, mediante una reacción de PCR utilizando la enzima *classic Taq*, obteniéndose una temperatura óptima de alineamiento de 60 – 65°C.

Al emplear los oligos anidados para el constructo final de Rtg-mCherry, se mejoró significativamente la pureza y concentración del fragmento siendo más de 60 ng/ μL (Figura 30-C). Esto demuestra la factibilidad de los oligos anidados en la técnica de OE-PCR. De igual forma, se logró establecer la optimización del constructo Rtg3-mCherry, en la cual se necesitó de los fragmentos A y B+C para una reacción de superposición sin oligos utilizando una enzima de alta fidelidad a una temperatura de alineamiento de 60 – 65°C; posteriormente, el producto de esta reacción se utilizó como templado para una reacción de amplificación con oligos anidados a una temperatura de alineamiento similar, entre 60 – 65°C, puesto que ambas demostraron ser adecuadas. El fragmento obtuvo una longitud final de 3,704 pb (Figura 30-C)

En el caso del fragmento completo de Nrg1-yECitrine, se pretendió obtener el

constructo final utilizando la misma técnica que Rtg3-mCherry empleando el fragmento A con el B+C, sin embargo, no se obtuvo ninguna banda en todas las pruebas. Por lo tanto, se descartó esta metodología, lo que llevó a implementar otras pruebas para obtener el constructo de interés. Para esto, se propuso una reacción de un solo paso, en donde involucra la adición de los tres fragmentos individuales A, B y C, donde la superposición y amplificación se llevó a cabo a través del empalme de las secuencias en la posición 5 y 3' del casete de yECitrine (Figura 16); ya que, debido a la amplificación previa de los fragmentos A y C individuales que corresponden al ORF5' y UTR 3' de *NRG1* mediante los oligos quiméricos, promovieron la superposición entre dichas secuencias (Figura 24). De igual manera, se evaluó esta metodología utilizando la enzima *classic Taq* y una de alta fidelidad (PCRBIO High Fidelity), en ausencia y presencia de DMSO (Figura 31-A). Se empleó una temperatura de alineamiento de 60°C de acuerdo a los resultados del PCR en gradiente de los oligos anidados. En este caso, el fragmento final se consiguió empleando la enzima PCRBIO High Fidelity, donde se minimizó la presencia de bandas inespecíficas, además, el fragmento demostró baja degradación y una pureza estable para su purificación (Nakamura et al., 2014), (Nelson & Fitch, 2011), (Hilgarth & Lanigan, 2021), mientras que, con la *classic Taq*, se obtuvo todo lo contrario. Cabe mencionar que, para esta prueba se emplearon directamente los oligos anidados por lo que, también aumentó la probabilidad en la eficiencia de obtención del fragmento. Por otro lado, el DMSO no resultó demostrar una ventaja o desventaja respecto a la obtención de las bandas, dando lugar a que se descartara para esta reacción. Con esto, se logró implementar un protocolo adecuado para obtener el fragmento de Nrg1-yECitrine con una concentración y pureza óptima a través de una OE-PCR de un solo paso. Adicionalmente, se realizó esta misma metodología para verificar si Rtg3-mCherry también se podría obtener de esta manera, sin embargo, los resultados no fueron eficientes, ya que el constructo final de Rtg3-mCherry mostró una alta degradación y un aumento en la inespecificidad de los oligos (Figura 31-B). Pese a ello, la ausencia de DMSO pudo ser un factor para una reacción directa ineficiente del constructo de Rtg3-mCherry empleando este protocolo.

Es importante recalcar que para todas las reacciones de superposición, tanto de pares como de los fragmentos finales, se mantuvo una relación nanomolar específica para cada fragmento, donde los constructos más largos mantuvieron una proporción de 120nM como el fragmento B de la proteína fluorescente, mientras que, los fragmentos de menor tamaño mantuvieron una proporción de 60nM. La eficiencia de la relación equimolar se determinó cuando se realizó un experimento utilizando 100 ng/ μ L de cada fragmento individual para la OE-PCR con el objetivo de obtener de Nrg1-yECitrine, y en este caso, se obtuvieron las bandas en el tamaño correspondiente pero con muy poca visibilidad, pureza y más degradación que cuando se obtuvieron con una relación equimolar. (Figura 36-Anexos). En el artículo de (Hilgarth & Lanigan, 2021) y (Nelson & Fitch, 2011), se recalca la importancia de mantener una relación equimolar de los fragmentos presentes en la reacción de PCR, donde se permitirá que las moléculas presentes en cada fragmento encuentren a su pareja complementaria y promuevan la superposición de las secuencias, además, estas proporciones equimola-

res disminuyen la aparición de dímeros no deseados en la PCR y también, ofrece a la polimerasa un mejor acceso a los extremos se superposición, ayudando a que en la reacción de amplificación se genere una extensión eficiente. De acuerdo con esto, tanto para los productos “pares” como los finales, mantener una proporción de nanomoles entre los fragmentos resultó ser eficaz, ya que promovió la reacción de superposición entre los constructos, siendo un paso importante para esta técnica.

Se espera que el uso de ambos fragmentos completos de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry promuevan la eficiencia de recombinación homóloga al realizar la transformación en *S. cerevisiae*, respecto a la inserción del fragmento en el locus objetivo, logrando etiquetar a las proteína Nrg1 y Rtg3 con proteínas fluorescentes con el fin de visualizarlas en un microscopio con focal. Hasta ahora, se ha confirmado la efectividad del constructo completo de Nrg1-yECitrine, puesto que, se obtuvieron 5 colonias con un resultado positivo respecto a la inserción de la etiqueta de la proteína fluorescente (yECitrine) en el locus diana de *NRG1* en su genoma verificadas por PCR punto final, obteniendo un fragmento de 3,439 pb; donde, al compararla con la cepa silvestre (WT) se obtuvo un fragmento de 1,000 pb, por lo que, la diferencia de pesos debido a la presencia de la etiqueta fue muy evidente. De igual forma, se demostró que la etiqueta de yECitrine en *NRG1* se mantuvo en el mismo marco de lectura al tener las bandas esperadas cuando se amplificó con oligos internos del constructo junto con el ORF5´ y UTR3´ del gen (Figura 33). En el caso de Rtg3-mCherry, también se realizó la transformación en *S. cerevisiae* con el fragmento final obtenido, sin embargo, todas las cepas demostraron un fenotipo silvestre (Figura 37-Anexos), por lo tanto, aún se sigue haciendo experimentos para lograr etiquetar a Rtg3 con mCherry. Este resultado negativo, pudo haberse debido a la baja calidad del fragmento observado en el gel de electroforesis luego de su purificación (Figura 32), ya que a pesar que se haya obtenido una concentración final de 60-80 ng/ μ L, la calidad de la secuencia no resultó muy óptima a comparación de Nrg1-yECitrine. De igual manera, un parámetro que pudo haber afectado fue el uso de la enzima *classic Taq* para la amplificación del constructo final, ya que la secuencia puede estar más susceptible a errores cuando se genera la elongación o extensión de la PCR (Maddocks & Jenkins, 2017); por lo que, esto se podría verificar a través de una secuenciación del fragmento completo. A pesar de este resultado, al tener cepas etiquetadas con Nrg1-yECitrine confirmadas por PCR se puede validar el protocolo propuesto. Esta metodología no solo permitirá evidenciar aún más la presencia de la quimera, sino que, se podrá responder otras preguntas de cómo su localización subcelular influye en la función del mantenimiento del ADN mitocondrial, así como evaluar su regulación génica y estabilidad en la célula de la levadura.

La técnica de OE-PCR demostró ser muy flexible para obtener genes híbridos de interés, haciendo que la optimización sea más eficiente, ya que se puede analizar diferentes condiciones y pruebas para obtener el inserto final de la mejor manera posible. A pesar que se encontraron algunas limitaciones durante la técnica, se puede considerar emplearla para investigaciones futuras, donde al tenerla optimizada puede resultar mucho más práctico la obtención de insertos para transformar en *S. cerevisiae*.

Además, es importante que luego de obtener las cepas etiquetadas con Nrg1-yCitrine y Rtg3-mCherry se utilice el protocolo propuesto para la clonación en el plásmido pRS416, así como la observación de las mismas en un microscopio con focal, así visualizar la interacción entre ambas proteínas en los compartimentos subcelulares de *S. cerevisiae*, así como su localización de forma individual.

Conclusiones

1. Se verificó el fenotipo de las cepas sencillas *nrg1* Δ y *rtg3* Δ , demostrando que crecen lento en glucosa como única fuente carbono respecto a la cepa silvestre y al tener etanol como única fuente carbono las cepas mutantes no crecieron respecto a la silvestre; esto demostró el fenotipo petite debido al daño en el ADN mitocondrial que evita que las cepas mutantes consuman el etanol acumulado en la célula, descrito previamente . Además, se verificó la braditrofia por glutámico en la cepa sencilla *rtg3* Δ en glucosa como única fuente de carbono donde aumentó la velocidad de crecimiento pero, no llegó a un fenotipo silvestre.
2. Se logró optimizar adecuadamente la técnica de OE-PCR al obtener los fragmentos completos de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry en los pesos esperados de 3,304 pb y 3,704 pb, respectivamente con una pureza y concentración adecuada.
3. La técnica de OE-PCR resultó ser muy versátil puesto que la obtención de los fragmentos finales demostró ser distinta, debido a que para Nrg1-yECitrine se llevó a cabo una reacción de un solo paso donde implica la superposición y amplificación del fragmento, mientras que Rtg3-mCherry se realizó una reacción de superposición y otra de amplificación de manera independiente, en donde se varía la temperatura de alineamiento.
4. Los oligos anidados demostraron ser eficaces para enriquecer la banda del fragmento final de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry, por lo que se consideraron esenciales para la técnica, así como los oligos quiméricos que permitieron una superposición eficiente entre las secuencias complementarias.
5. Se determinó que mantener una relación equimolar entre los fragmentos individuales y pares, es de gran importancia para favorecer la superposición de constructos al disminuir la aparición de dímeros, facilitar el acceso a la ADN

polimerasa durante el empalme de las secuencias y favorecer el acercamiento entre bases complementarias durante la la reacción de superposición.

6. Los oligos anidados con las secuencias de enzimas de restricción pueden ser utilizados para su posterior uso en la ligación de un plásmido multicopia como el pRS416 y transformación en *E. coli* para obtener de una manera más eficiente el constructo final de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry.
7. Se lograron obtener cepas etiquetadas con Nrg1-yECitrine en el lugar de inserción esperado dentro del genoma de *S. cerevisiae* confirmadas por PCR, dando lugar a validar el protocolo propuesto para determinar la localización subcelular del regulador transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 y su estabilidad en la célula de levadura.

Recomendaciones/Espectativas

Se recomienda realizar una secuenciación de última generación para ambos fragmentos finales de (Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry) para verificar la especificidad de las secuencias respecto a la construcción diseñada, así como determinar errores en pares de bases o ruidos que pueden estar afectando la secuencia. De igual manera, se recomienda volver a realizar una PCR de superposición y amplificación empleando los oligos anidados con una enzima de alta fidelidad para el fragmento Rtg3-mCherry con el objetivo de determinar si se obtienen resultados similares cuando se utiliza la *Taq polimerasa*, y mejorar la pureza del producto. Además, se recomienda optar por una transformación directa al genoma de *S. cerevisiae* de los fragmentos no purificados, ya que, al tener un único sitio de homología para los genes *NRG1* y *RTG3*, se esperaría que el bandeo inespecífico no afectaría la transformación. Por último, se recomienda realizar oligos con secuencias adicionales 5CGC/5CGC y determinar si mejoran la OE-PCR en la superposición de fragmentos.

Como siguientes pasos en la investigación, se recomienda realizar la ligación de los fragmentos con las secuencias de enzimas de restricción en el plásmido multicopia pRS416 así como la transformación en *E. coli* siguiendo el protocolo descrito en este trabajo. También, se recomienda determinar la localización subcelular de las cepas positivas con la etiqueta Nrg1-yECitrine y posteriormente, las cepas etiquetadas con Rtg3-mcherry, a través de un microscopio con focal para determinar su ubicación en la células de la levadura y observar los resultados a través de “merge” para determinar la interacción del complejo quimérico, así como de las proteínas individuales. También, se recomienda utilizar los fragmentos Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry para transformar cepas Mat a BY4751 y Mat α Y8205 para generar cruces y obtener una doble mutante, o solamente transformar el módulo Rtg3-mCherry a una cepa ya etiquetada de Nrg1-yECitrine.

Por otro lado, luego de obtener a Nrg1 y Rtg3 etiquetadas con proteínas fluorescentes se esperaría responder preguntas que permitan evaluar la regulación y estabilidad del complejo transcripcional híbrido Nrg1-Rtg3 en las células de la levadura como puede ser: ¿En qué momento se llega a formar la quimera? ¿La localización subcelular del complejo afecta en su función de mantener el ADN mitocondrial?.

CAPÍTULO 11

Bibliografía

- Banco Nacional de ADN - España. (2020, octubre). Formulario de control de calidad de muestra.
- Bernardi, B., & Wendland, J. (2020). *Homologous Recombination: A GRAS Yeast Genome Editing Tool. Fermentation*, 6(2). <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/2/57>
- Bolotin-Fukuhara, M. (2017). *Thirty years of the HAP2/3/4/5 complex [Nuclear Factor Y in Development and Disease]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(5), 543-559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.10.011>
- Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). *The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. Genome Res.*, 15(10), 1456-1461. <https://doi.org/10.1101/gr.3672305>
- Campero-Basaldúa, C., González, J., García, J. A., Ramírez, E., Hernández, H., Aguirre, B., Torres-Ramírez, N., Márquez, D., Sánchez, N. S., Gómez-Hernández, N., Torres-Machorro, A. L., Riego-Ruiz, L., Scazzocchio, C., & González, A. (2023). *Neo-functionalization in Saccharomyces cerevisiae: a novel Nrg1-Rtg3 chimeric transcriptional modulator is essential to maintain mitochondrial DNA integrity. Royal Society open science*, 10(11). <https://doi.org/10.1098/rsos.231209>
- Casamassimi, A., & Ciccodicola, A. (2019). *Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation. Int J Mol Sci*, 20(6), 1281. <https://doi.org/10.3390/ijms20061281>
- Cataldo, V. F., Salgado, V., Saa, P. A., & Agosin, E. (2020). *Genomic integration of unclonable gene expression cassettes in Saccharomyces cerevisiae using rapid cloning-free workflows. MicrobiologyOpen*, 9(3), e978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mbo3.978>

- Cha-aim, K., Hoshida, H., Fukunaga, T., & Akada, R. (2012). *Fusion PCR via Novel Overlap Sequences* (J. Peccoud, Ed.). 852. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_8
- Davis, M. W., & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619>
- Day, M. (2013). *Yeast petites and small colony variants: for everything there is a season*. *Advances in Applied Microbiology*, 85, 1-41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00001-0>
- Di Gregorio, S., & Duennwald, M. (2018). *Yeast as a model to study protein misfolding in aged cells*. *FEMS yeast research*, 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy054>
- Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., & Cherry, J. M. (2014). *The Reference Genome Sequence of Saccharomyces cerevisiae: Then and Now*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 4(3), 389-398. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008995>
- Erika Szymanski, N. V., & Wong, M. (2019). *Yeast: one cell, one reference sequence, many genomes?* *New Genetics and Society*, 38(4), 430-450. <https://doi.org/10.1080/14636778.2019.1677150>
- Escalera-Fanjul, X., Campero-Basaldúa, C., Colón, M., González, J., Márquez, D., & González, A. (2017). *Evolutionary Diversification of Alanine Transaminases in Yeast: Catabolic Specialization and Biosynthetic Redundancy*. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01150>
- Escalera-Fanjul, X., Quezada, H., Riego-Ruiz, L., & González, A. (2019). *Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life*. *Trends in Genetics*, 35(1), 42-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.008>
- Fowler, K. R., Leon, F., & Johnson, A. D. (2023). *Ancient transcriptional regulators can readily develop new pairwise cooperativity* (H. M. Johnston, Ed.) [Received February 14, 2023; accepted May 26, 2023]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.2302445120>
- García-Campusano, F., Anaya, V.-H., Robledo-Arratia, L., Quezada, H., Hernández, H., Riego, L., & González, A. (2009). *ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in Saccharomyces cerevisiae* [PMID: 19396236]. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4), 368-374. <https://doi.org/10.1139/W08-150>
- González, J., López, G., Argueta, S., Escalera-Fanjul, X., El Hafidi, M., Campero-Basaldúa, C., Strauss, J., Riego-Ruiz, L., & González, A. (2017). *Diversification of Transcriptional Regulation Determines Subfunctionalization of Paralogous Branched Chain Aminotransferases in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 207(3), 975-991. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300290>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). *Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
- GSL Biotech LLC. (2024). SnapGene.

- Guan, Y., Dunham, M. J., & Troyanskaya, O. G. (2007). *Functional Analysis of Gene Duplications in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175(2), 933-943. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.064329>
- H, A., Vojisavljevic, V., & Pirogova, E. (2012). 'Effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of saccharomyces cerevisiae yeast', in World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings 39, M. Long (ed.), Springer, Beijing, China, pp. 48-51 (World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering).
- Hernández, H., Aranda, C., López, G., Riego, L., & González, A. (2011). *Hap2-3-5-Gln3 determine transcriptional activation of GDH1 and ASN1 under repressive nitrogen conditions in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 3), 879-889. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044974-0>
- Hernández, H., Aranda, C., Riego, L., & González, A. (2011). *Gln3-Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(3), 859-864. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.075>
- Hilgarth, S., & Lanigan, T. (2021). *Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction*. *MethodsX*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>
- Hua, S.-B., Qiu, M., Chan, E., Zhu, L., & Luo, Y. (1997). *Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast*. *Plasmid*, 38(2), 91-96. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1305>
- Illumina, Inc. (2023). DNA Library Preparation Reference Material List.
- International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation. (2012). UCSF Miniprep.
- Introduction to Eukaryotic Gene Regulation*. (2022, julio). Lumen Learning. [https://bio.libretexts.org/Courses/Lumen_Learning/Biology_for_Non-Majors_I_\(Lumen\)/10%3A_Gene_Expression/10.04%3A_Eukaryotic_Gene_Regulation](https://bio.libretexts.org/Courses/Lumen_Learning/Biology_for_Non-Majors_I_(Lumen)/10%3A_Gene_Expression/10.04%3A_Eukaryotic_Gene_Regulation)
- Jazwinski, S. M. (2013). *The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough*. *Biochim Biophys Acta*, 1833(2), 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.010>
- Kadkhodaei, S., Memari, H. R., Abbasiliasi, S., Rezaei, M. A., Movahedi, A., Shung, T. J., & Ariff, A. B. (2016). *Multiple overlap extension PCR (MOE-PCR): an effective technical shortcut to high throughput synthetic biology*. *RSC Advances*, Issue 71. <https://doi.org/10.1039/C6RA13172G>
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study*. *PLOS ONE*, 6(2), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>
- Komeili, A., Wedaman, K. P., O'Shea, E. K., & Powers, T. (2000). *Mechanism of Metabolic Control: Target of Rapamycin Signaling Links Nitrogen Quality to the Activity of the Rtg1 and Rtg3 Transcription Factors*. *J Cell Biol*, 151(4), 863-878. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.863>

- Koszul, R., Caburet, S., Dujon, B., & Fischer, G. (2004). *Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments*. *The EMBO Journal*, *23*(1), 234-243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600024>
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.-H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G. S., & Snyder, M. (2002). *Subcellular localization of the yeast proteome*. *Genes & Development*, *16*(6), 707-719. <https://doi.org/10.1101/gad.970902>
- Kuzmin, E., Taylor, J. S., & Boone, C. (2022). *Retention of duplicated genes in evolution* [Focus issue: Studying genetic variation through an evolutionary lens]. *Trends in Genetics*, *38*(1), 59-72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.06.016>
- Liu, W., Li, L., Ye, H., Chen, H., Shen, W., Zhong, Y., Tian, T., & He, H. (2017). *From Saccharomyces cerevisiae to human: The important gene co-expression modules*. *Biomedical Reports*, *7*(2), 153-158. <https://doi.org/10.3892/br.2017.941>
- Liu, Z., & Butow, R. (2006). *Mitochondrial Retrograde Signaling*. *Annual Review of Genetics*, *40*. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090613>
- López Ortiz, G. (2015). *Hetero-oligomerización de monómeros codificados por genes duplicados: LEU4 y LEU9 un caso específico* [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/101561>
- Maddocks, S., & Jenkins, R. (2017). *Using PCR for Cloning and Protein Expression* (S. Maddocks & R. Jenkins, Eds.), 61-71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802683-0.00006-X>
- Makino, T., & Gojobori, T. (2007). *Evolution of protein-protein interaction network*. *Genome Dynamics*, *3*, 13-29. <https://doi.org/10.1159/000107601>
- Mao, Y., & Chen, C. (2019). *The Hap Complex in Yeasts: Structure, Assembly Mode, and Gene Regulation*. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01645>
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). *The power of two: protein dimerization in biology*. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(11), 618-625. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.09.006>
- Márquez, D., Escalera-Fanjul, X., el Hafidi, M., Aguirre-López, B., Riego-Ruiz, L., & González, A. (2021). *Alanine Represses Aminobutyric Acid Utilization and Induces Alanine Transaminase Required for Mitochondrial Function in Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.695382>
- Márquez Gutiérrez, D. (2015). *Divergencia regulatoria de los genes parálogos alt1 y alt2 en Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/429346>
- Martínez Morales, J. C. (2014). *Participación de put3 y leu3 en la regulación transcripcional de los parálogos bat1 y bat2 de la levadura saccharomyces cerevisiae*

- [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/125332>
- Mitsis, T., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Vlachakis, D., Chrousos, G. P., & Eliopoulos, E. (2020). *Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review)*. *World Academy of Sciences Journal*, 2, 3-8. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.32>
- Myc-Tag Antibody*. (2024). Cell Signaling Technology. <https://goo.su/zZNavp>
- Nakamura, M., Suzuki, A., Hoshida, H., & Akada, R. (2014). *Minimum GC-rich sequences for overlap extension PCR and primer annealing*. *Methods Mol Biol*, 1116, 165-181. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_12
- Nelson, M. D., & Fitch, D. H. A. (2011). *Overlap Extension PCR: An Efficient Method for Transgene Construction*. En V. Orgogozo & M. V. Rockman (Eds.), *Molecular Methods for Evolutionary Genetics* (pp. 459-470). *Humana Press*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_27
- New England Biolabs. (Fecha de acceso). *Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase*. <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>
- Northwestern University. (s.f.). OligoCalc.
- Olivares-Marin, I. K., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C., & Madrigal-Perez, L. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism*. *J. Vis. Exp.*, 139, e58192. <https://doi.org/10.3791/58192>
- Onyema, V., Amadi, O., Moneke, A., & Agu, R. (2023). *A Brief Review: Saccharomyces cerevisiae Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes – West African Natural Yeasts Contribution*. *Food Chemistry Advances*, 2, 100162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100162>
- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M., & Bucci, C. (2019). *Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins*. *Curr Protoc Protein Sci*, 95(1), e70. <https://doi.org/10.1002/cpps.70>
- Parrella, E., & Longo, V. D. (2008). *The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae to study mitochondrial dysfunction and disease [Mitochondrial Dysfunction in Aging and Disease]*. *Methods*, 46(4), 256-262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.10.004>
- PCRBIOS. (2024). PCRBIOS PDF Manual.
- Peñalosa Ruiz, G. (2011). *Diversificación funcional de los genes parálogos ALTI y ALT2 de Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/155475>
- Peñalosa-Ruiz, G., Aranda, C., Ongay-Larios, L., Colon, M., Quezada, H., & Gonzalez, A. (2012). *Paralogous ALT1 and ALT2 Retention and Diversification Have Generated Catalytically Active and Inactive Aminotransferases in Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 7(9), e45702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045702>

- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). *An evolutionary perspective on the Crabtree effect*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Plocek, V., Fadrhonc, K., Maršíková, J., Váchová, L., Pokorná, A., Hlaváček, O., Wilkinson, D., & Palková, Z. (2021). *Mitochondrial Retrograde Signaling Contributes to Metabolic Differentiation in Yeast Colonies*. *Int J Mol Sci*, 22(11), 5597. <https://doi.org/10.3390/ijms22115597>
- Promega Corporation. (2009). Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Quick Protocol.
- QIAGEN. (2013). Amplification of Long PCR Products. <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/pcr/introduction/amplification-of-long-pcr-products>
- Rajagopala, S. V., Sikorski, P., Caufield, J. H., Tovchigrechko, A., & Uetz, P. (2012). *Studying protein complexes by the yeast two-hybrid system*. *Methods*, 58(4), 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.07.015>
- Ramirez, M. D. (2012). *Análisis in vivo de las interacciones oligoméricas de eno1 y eno2 en saccharomyces cerevisiae* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/446632>
- Rojas-Ortega, E., Aguirre-López, B., Reyes-Vivas, H., González-Andrade, M., Campero-Basaldúa, J. C., Pardo, J. P., & González, A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae Differential Functionalization of Presumed ScALT1 and ScALT2 Alanine Transaminases Has Been Driven by Diversification of Pyridoxal Phosphate Interactions*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00944>
- Roy, U., Mishra, A., Jana, P., & Karmakar, S. (2018). *A Comparative Study on Different Plasmid Isolation Procedures*. 6, 533-541. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.6988>
- Ruiz-Roig, C., Noriega, N., Duch, A., Posas, F., & de Nadal, E. (2012). *The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms*. *Molecular Biology of the Cell*, 23(21), 4286-4296.
- Scott, M. S., Calafell, S. J., Thomas, D. Y., & Hallett, M. T. (2005). *Refining Protein Subcellular Localization*. *PLOS Computational Biology*, 1(6), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010066>
- Sekito, T., Thornton, J., & Butow, R. A. (2000). *Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p*. *Mol Biol Cell*, 11(6), 2103-2115. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2103>
- Siddiq, M. A., & Wittkopp, P. J. (2022). *Mechanisms of regulatory evolution in yeast*. *Curr Opin Genet Dev*, 77, 101998. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2022.101998>
- Sigma-Aldrich. (2021). DNA Ligation Kit Protocol.
- SnapGene. (2024). pRS416 Plasmid.
- Stahl, G., Salem, S. N. B., Chen, L., Zhao, B., & Farabaugh, P. J. (2004). *Translational Accuracy during Exponential, Postdiauxic, and Stationary Growth Phases in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>*. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 331-338. <https://doi.org/10.1128/ec.3.2.331-338.2004>

- Stenger, M., Le, D. T., Klecker, T., & Westermann, B. (2020). *Systematic analysis of nuclear gene function in respiratory growth and expression of the mitochondrial genome in S. cerevisiae*. *Microbial Cell*, 7(9), 234-249. <https://doi.org/10.15698/mic2020.09.729>
- Stepchenkova, E. I., Zadorsky, S. P., Shumega, A. R., & Aksenova, A. Y. (2023). *Practical Approaches for the Yeast Saccharomyces cerevisiae Genome Modification*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 11960. <https://doi.org/10.3390/ijms241511960>
- Tae Soo Kim, S. B. L., & Kang, H. S. (2004). *Glucose Repression of STA1 Expression Is Mediated by the Nrg1 and Sfl1 Repressors and the Srb8-11 Complex* [PMID: 15314176]. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7695-7706. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7695-7706.2004>
- Technical Support Invitrogen. (2010, abril). Hind III.
- Thermo Fisher Scientific. (2024). DNA and RNA Molecular Weights and Conversions.
- Valenzuela, L., Guzmán-León, S., Coria, R., Ramírez, J., Aranda, C., & González, A. (1995). *A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the petit-negative yeast Kluyveromyces lactis uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis*. *Microbiology (Reading, England)*, 141(Pt 10), 2443-2447. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2443>
- Van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). *The evolutionary significance of polyploidy*. *Nature Reviews Genetics*, 18(7), 411-424. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., & Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>
- Vyas, V. K., Kuchin, S., & Carlson, M. (2001). *Interaction of the Repressors Nrg1 and Nrg2 With the Snf1 Protein Kinase in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 158(2), 563-572. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.563>
- Wang, X., Cai, M., Shi, L., Wang, Q., Zhu, J., Wang, J., Zhou, M., Zhou, X., & Zhang, Y. (2016). *PpNrg1 is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of AOX1 promoter in methylotrophic yeast Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 38. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1972-4>
- Zhou, H., & Winston, F. (2001). *NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genetics*, 2, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-2-5>

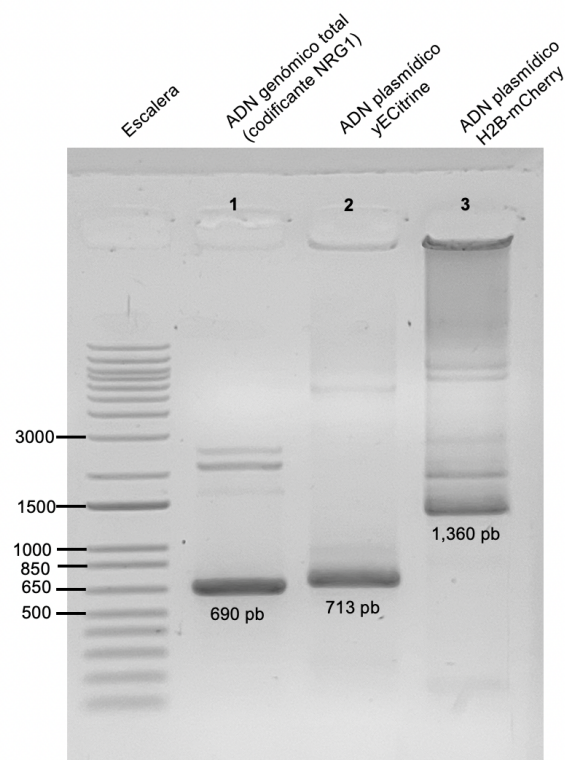


Figura 34: Verificación de ADN genómico y plasmídico.

Se realizó una PCR convencional de prueba donde se amplificó la codificante de *NRG1* de 690 pb usando como ADN molde una cepa silvestre (WT-Carril 1), la mitad de la proteína yECitrine del plásmido pKT0175 de 713 pb utilizando los oligos FwNRG1-RvDH14 (Carril 2) y parte del marcador de selección de Geneticina (G418) junto con la mitad de la proteína mCherry del plásmido H2B-mcherry de 1,360 pb, utilizando los oligos FwOriC-RvVerifKan. Todos los fragmentos se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

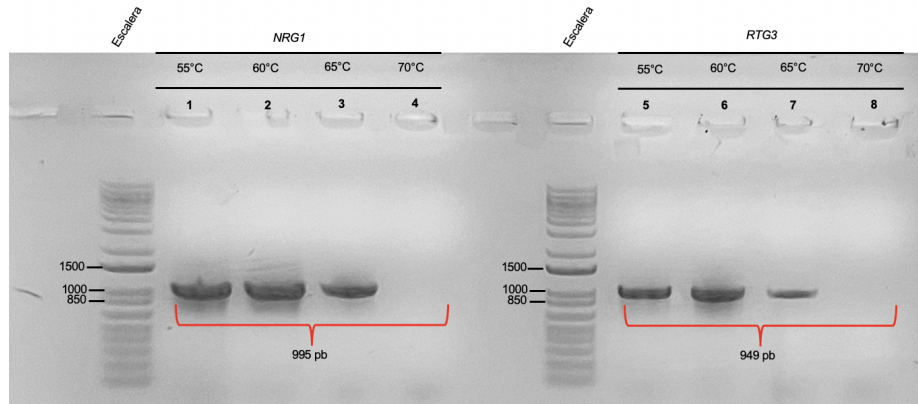


Figura 35: PCR para verificación de los oligos anidados.

Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la $T_m^{\circ}\text{C}$ óptima de los oligos anidados. Se utilizó como templado ADN molde de la cepa silvestre *ura3- Leu2-* para amplificar los fragmentos de *NRG1* y *RTG3*. Se obtuvo una banda de 995 pb para *NRG1* y 949 pb para *RTG3*. En ambos casos la temperatura más óptima fue de 60-65°C.

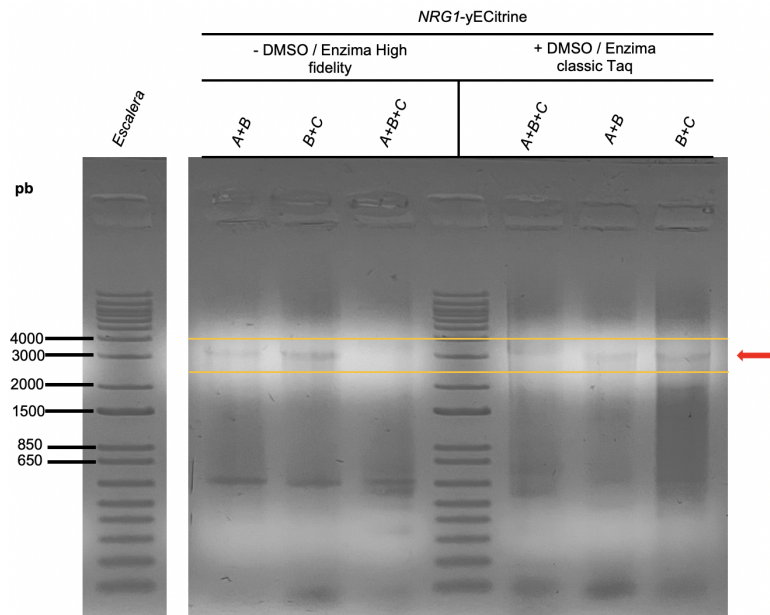


Figura 36: OE-PCR para los fragmentos pares y completo de *Nrg1-yECitrine* con 100 ng/ μL de cada constructo.

Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la $T_m^{\circ}\text{C}$ óptima de los oligos anidados. Se utilizó como templado ADN molde de la cepa silvestre *ura3- Leu2-* para amplificar los fragmentos de *NRG1* y *RTG3*. Se obtuvo una banda de 995 pb para *NRG1* y 949 pb para *RTG3*. En ambos casos la temperatura más óptima fue de 60-65°C.

Nrg1-yECitrine				
No. Oligos de Fusión	Nombre primer para Fusión	Sec 5' → 3'	%GC	Tm °C
1	FwConf NRG1	CCTCTCGACCAGCATATT	50	53.8
13	RvConf NRG1	AGTACTTGAGCCCCATGC	56	56.3
11	FwyECitrine F (TEF promoter)	ATGGAGGCCAGAAATACCCT	55	60.5
12	RvyECitrine I (TEF Promoter)	GACAGTCACATCATGCCCT	55	60.5
10	FwyECitrine 5'	GGTGACGGTGCTGGTTTA	56	56.3
RTG3-mCherry				
No. Oligos de Fusión	Nombre primer para Fusión	Sec 5' → 3'	%GC	Tm °C
1	FwConf RTG3	GGATGTGACTCTTCGCAA	50	53.8
13	RvConf RTG3	CTAAGCAGGTGATACTGC	50	53.3
11	Fw FmCherry I (fl Ori vector H2B)	GGCTCCCTTTAGGGTTCCGA	60	62.5
12	Rv mCherry F (fl Ori Vector H2B)	TAGAGCTTGACGGGGAAAGC	55	60.5
10	FwymCherry 5'	TCTAAGGATCCACCGGTC	56	56.3

Cuadro 29: Oligos de comprobación de cepas positivas con la etiqueta de Nrg1-yECitrine y Rtg3-mCherry

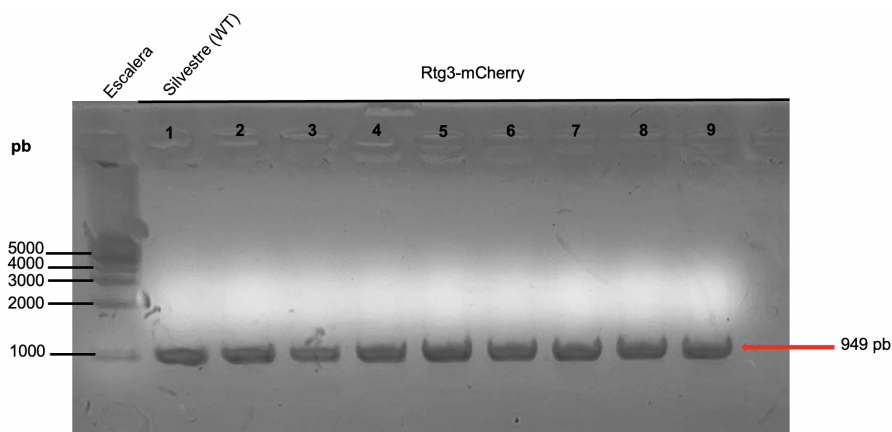


Figura 37: PCR de comprobación de cepas etiquetadas con Rtg3-mCherry.

Se transformó a la levadura como se describió en metodología con el fragmento final de Rtg3-mCherry. No se obtuvieron cepas etiquetadas positivas en ninguna de las 8 cepas seleccionadas (carril 2-9), donde todas presentaron la misma banda que el control negativo de 949 pb, dando lugar a un fenotipo silvestre (carril 1). Se utilizaron los oligos anidados FwAniRtg3mCherry y RvAniRtg3mCherry de la Cuadro 26. Se utilizó la escalera molecular 1kb plus Jena Bioscience y cada carril corresponde a una cepa independiente.

ADN genómico, *NRG1* +/- 1kb : Cromosoma IV

CACGAACCCTTGAGTAAAAGAAAATAAAATATACGAACTTCGCGGAAAATAAAAACTTTTC
CTTCAGTTGTTCCCTCGTTGAAACAGTAATCTACACGGACCGTTGCTTATTTTTAGCCAGATTCT
AGTTAAATAAAAAAAAAAAGAAATAAAATTAATAAAAAATTAACCTGTGGCAGATAAGCCTTTCTA
ATCGAGGCAGTGTGTTTCTTTGACTTCACCGTTTGTCTTCGCATAGTTCCCCTAAATATTCTAA
CTAGAAAAATCGCTAGTATTTTTCTACTTATAAGTTGATTTTCCGCATATTTGTCTTTGAAACGTT
TGAGACAGGGAAAACCTCTGTTTTCTAAAAGAGGAAAAGCAAAATGAAGTATTGGCTTGGTTGC
GGTCAACACCCTCAGGGAAAGCCAAGAAATGCTTTTTACTGTTTAGCAGTGAAAAGGCCGCAC
CGGAAAAGAAGGGAAAATTCATTGGGTCTAGATTTTTCTTATCGGTAAAAGACTATGGCCTCT
TGAGGACCCTTAAGCGTGAAACGAAACCGTTGAGCGCGCAGAGGGGCTTCGCCGCCGGTC
AGGGTGTGGGGTGTTTTTCTTTAATTATTCTCTTGGCAGTGTCTTTCTACAGTCTGGC
TGCAGGCTCCTTTTCCGTTATTCATATATAAGGAAGAGAACCTTCCAAACCCAAATTAATAAAAA
TTTGGTTCCCATCTCTTAACTAAAAGAAATTATATTACTCCACCTCGTTTACAGTTTTTTGATGCT
ATAAGGGAATTCTGCAGCTTTTAAAAGTAAAATCATATCGTATACGATTCTGCAAAGTATTATT
GTACTGTAATTCCTACCATTACGGCGCCTTTTTCTACCATTACCTTTCTGGATTGTTCTCTC
GACCAGCATATTACTACCCTTCGAAACTTTTCAGGCAATGTTTTACCCATATAACTATAGTAACC
TCAATGTTTCTACTATGCCCGCACTGCCGGGAATCTCCGCATTTGATGGAATGCAAGATGAAG
AAAACGTTGAAATAAGCCCGGAAAGAAAATATCAGACGCTACTACCAGTTCTAACTAATTCTCA
TGTGGTAGAGAATGAACTAAAACACAAATTAATAAGACTGCTTTTGATTTCCGATACCAAACCA
AATCAGAAAATGGCTCTGAAAAGTGGGAGCCAAAATACTTAATAACGCCTAATTTACAAACAAG
AAGCGTCTCTTTGACAATTCATCGGTACAATATAAATTCAGATTCATCCGAAAAAAGCTCGTAT
CACAATAACTTGTAATTCATCAATAATAACAACAGCCTGAGAACGGAATAGTTTCTAATGATGCA
TATAATAAGATGGCAAATAGTAGATACTCTGAAAACGCGGAAGCAAAGAACAGATCCAAGAA
ATACGTTATCAGATGAGGAAGACCTTGAACAAAGGCGCAAATACATTTGCAAAATTTGCGCAAG
AGGATTCACTACATCGGGTCATTTAGCAAGGCATAATAGAATTCATACGGGCGAAAAAATCAT
TGTTGTCCGTATAAGGGATGCACGCAGCGATTGAGTGCACATGATAATTGCTTGCAACACTATA
GAACACATTTGAAAAAGGGACAATAATTGACGGTATACCCGTGTTTTCTCATTAGCAGTACTA
CTATTCGCACTTTACATCATTTTTTATAAACTCATGCATACATACATTGACTTCAAAGATTTT
TTTTTTTTTTTGGCATCATAAATCACTTTCAGATCAGTTTCCTTTCAAACGCGCGGCATTAAGAA
AACTTTTAATGTCAAAAAACGGAAGCAAAAACCCCTCCCTTCCGCTTAAGATCATGTCTGGAC
ATTTAGTTGTAAGGCTGCGCCTCGGTAGCAAGTAGTGCTGCAACAAGGCTATTATGCCACCT
AAACAGACCCTTTTGCTTAATACGAGACTGTGACTACCTCCTGACTTCCTGTCCATAACAAAA
AACAGACGTCGTCATTAACATTTACAACCCCAACCTTCTTCATTCTTTTCTTTTGA
AACTGTGGCTTTTTGACATTTGCAGTTTGCATAGTTACTTTTTGATCACTAACAACGATATATTAT
CGTTGAACAATTTACTACGCAAAAACAGTTCACGTGATGTACGTCAGATAATTCAGTGAAGGTAC
TACCTTTGAGCATCTCTTACAGCAATGGTAACAGCTCATTGAAGAAGAAAAAATAAGACAAA
TTTTTTTAGAGCTGCAAGCGTTTTACTAGGCATCAGAACTGTCTCCGAACAATAGTATAGTTAAT
TATTATACTTCAACCCTAGAAGAAATACCCGAAGATGTAAGGATGTTTTTGTTCCTATAAGCTTT
TTTTTTTCAAAAATTTTTCATCCACTCTACGTCTTCCATACGGTCATATAAAAGGTGCCATATCC
TCGGCCAAGACAAAAGGCTTCAGCTCCATATCTTTTGAATCATGTAACGCATGGGGCTCAA
GTACTGAGCAAAGTAGGAGAAAGGATATTGAACATGTTGAGAAGAACGTGGTATCTTTTTCTT
ATTATACATTCTTTGGCGAGTGATCGAAAATATATATGATGATATCCTATAACAACAA

Figura 38: Secuencia +/- 1kb de *NRG1*.

Se obtuvo la secuencia de *NRG1* +/- 1kb de la base de datos de *Saccharomyces*. La secuencia en color anaranjado representa el marco de lectura (ORF) o la codificante de *NRG1*.

ADN genómico, RTG3 +/- 1kb : Cromosoma II

ACGCAAGAACAATAGTAGGGACCCATTGTCCATAGTAAACCAAACCTTTCTTGGTTTAGCGGC
TAGAACGGGAAAAGGAAAGTACAAAGAGTGAAACAGGCTGTTGCACCCAAAAGAAAACAGAC
AAAAAGTACCATTCTTCCGTTCTTGACAATTGGAACCACGACGGCTCCTGGTCTTGACCAAG
TCCTGTCTAGATACAGGCAACGTCTGATATATATCCTGGGCCCTGGTATTGAGAGAATCCGCC
CAGCTTGAGAACAATGTCTTCGCAGATTCATTA AACCCCTGCGAGTTCTGCTGCTTGTGTTGAT
TCCATCGATTCAATGAGTCACGGAGACTATTGACCTGGTCAGAAGGTGGTTCCTCGTCATATT
CTCCACACTTGTTCTTTTTTTTTACCAGCAAAAAAAAAAAGCAACTGCAGACAATACAGGTAA
TCTAAGTCTACTCTAACTACCGAACGCAATTAGAATGCAAATTTATTCAATCTTCTCTATT
CAGTATAGTACAAGTCTTGACCAATACTCCCTCTTACATTACAATCGCCTTTTGCCGGGTACGA
TTGCGGGCCGTTCCGCGGGATGTGACTCTTCGCAAGTTACTTTTTGAAATAATAAAGCCATGGT
GATTAGAAAAGCCTTCTTATGAGCAACAGAACTAACAATTGACTACTCGGTCGGGACAGTAG
GATCTCCAATATTACTGCAGGTTAGTACATTATTTTTACTCGCAGTTGCTATTTGGCTAGAGG
CTGCACGGAATCATCAAGGAATTTTTACAATCCGAATTTCTGTCTTACGTGAGCATATAAGA
TAACAAAACGACATTACTGCATTACATTACTTAGTTGACAAGTATCCTTTAATAGAATACTCTT
ATTTTTGTGACGGCGAACCTACTTCTAAATAAGTGAAGAATGATGAACAATAACGAAAGTGAG
GCTGAGAACCAACGTCTACTGGACGAATTAATGAACCAGACAAAAGTCTCCAGGAACTTTA
GATTTTTCGTTAGTGACACCCACTCCACACCACAATGATGATTACAAGATACACGGAAGTGCCT
ACCCAGGTGGTGAGACTCCTGCCAACAGCATGAAAACTCTCATACATCAATACGCACAACCT
CTAACGATAATAACTTAATGGGCAGTCAAGCGAGGTCCAATTCACAACTCCTACAGCTTC
GACCATATAGAGGAAGCAGAATCGCAATCGTCTTACCTGGATGATATGTTTAGAACAAGCCAA
GGCGGTAGACCTGCACTCAAATCCATATCTTCCATAGGGCAGGGTCCCTTGAGATCATCTT
ATTCTATGGCTTACGACTCACCTGTGGATAGAGCAATGAATACTCCATTACAGCAACAAGAAG
CTTAAAGCTGAGTTACCACATGACTTTTTATTTAGCATGGCACCGATGACACAATGTATAACT
TAACTGATGATTTGAGCTCCTTTATCTTCTAGCATCAATCTGATATGATGACACCAAACACA
TATTCATCATCATTTTTCTTATAATCCACAAAGCTTGGGCCAGCATCCGTATCTTCCACATATTC
CCCAAAGGTAAGATCACCATCATCGTCATTTCTGCAGGAAGTTTCTTTTATCTTTTAGG
CATGGTAGCATAAACACACCCAGAACACACACTTCAATAAGTAGCAATGACTGACTGAAAATA
TAGGACCTGGAAGTGTCCAAAGATTTAGGCGGGTTAACTTCTGATGAGAAAAGTGAAGCGCA
AAAGAGAGTTTCATAATGCCGTGCAAGGAGAAAGAGAAATTAATAAAGCAAAAGATAAAAGA
ACTCGGCCAGTTGGTCCACCATCTTATTGAATTACGATGACCTAGGTAACAAATCAAACCA
AATAAGGTATCATTGATAGAACGGTCAATATTTACAATACCTGGCCGAAATTTAGAAAT
ACAAGCACGAAAAAGAAGCGTTATTGGCGAAGATAAAAGAATTGGAAGAGAAGAAAAGTTC
TGTCGCAGCATTATCTCTTTTACCAATAACCACCATGCCAGTTCCGGGGCAAAATAATAGCGAG
AATAGTGAGGAAAAGAAATATAGATATTAGATCTGTCCAAATGCTTTGATGAATGAACAAAATAG
TAAGGCTGAATTGCACAATTGGGAGCCACCGTTATATGATTCCGGTCCGTAACCACAATCATGCT
GGCACTATGGAGAGTCATCCACATACAACATTCATGAAGAATTAAGGAGTTCTTATCAGGCG
ATTTGATTGAAGCCGAAGATAATGCAAAATTAATGTTTGGAGATGACAACCTCTAATCCAGCTGA
CTATCTTTTAGAATTTGGTTCGGGGTAGTTTATGGTCTTATTAGCGGGAAAAAATTAATTTGAA
AAAGTCAAGTAAGCAAAAGCAGTAAACTTCAATATCTATGTTTGTCTTCTATTGGGAGAA
CGTTAATCGCTTCCGTAAGATAATGTAATGAAAAAATTAGGAATTGCAACAAAATAAA
GCGGAATATTAGTAACGCTTACATGCAACGTTTTGAAAAGAGTGGAAGAGATAGGCAAGCAGA
ATTATATGTAACAAAATCTAAAATTTACTATTATTCTTGGTTATGTCTAATACTTTGGATATAT
TAATCTTTAGAATTTTATGTATTCTAAATGCAATATGTCAATAAAAACCCATGTAATTTCTTTCA
TGATATGATTTAAATGCATTAGTATTACAGGCATATTGTTATATATGAAGAAGGTTAGTTATAAG
TAGTGATAATATACATGTGCTGCCCGCAATGGGTATGATATGATTTTTAGTGCTTTATAAT
TTGGCGTCGCAAGAATGTAGATCACTTGTATCAATGAAAAGCTTACTTGGTAACCTATTATT
GAGAAAATCAATGGATGTGCAATTTATATAGAGTAGAGCCAACACTTCATGATTGGAAGCATA
TACCAAACGGTATACCACTGATAATATGAATGCAGAAGACTAATGCGCTACACATCATACTTTA
CGGCGATGATATTTCAAGATAGCATAAGCTCTATGGTTATTCTGATGTTACTGGTAGTCGTA
AGTGCAGTATCACGAACGTATAGAAGAATAAACATGGGTCTCATCAAAAAAGTGACCCATTGGT
CATATGATAATTTGATTGATTATCTTTCAGTGAACCTACAAGAGATGAAGTGACCCACTATAAA
GTGGATCCGAAAATGAATCTGATGAATCAATTATTAATTAACACTGTGAAAGACTTCGGCA
GTATCACCTGCTTAGACTATTGAGAAATCAGAAATGGTATGATTGGAGTTGGTAAAA

Figura 39: Secuencia +/- 1kb de *RTG3*.

Se obtuvo la secuencia de *RTG3* +/- 1kb de la base de datos de *Saccharomyces*. La secuencia en color azul representa el marco de lectura (ORF) o la codificante de *RTG3*.

