

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MOLECULAR DE LA
UBIQUITINA LIGASA NFB1 DE *Neurospora crassa*”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACABIÓLOGO

PRESENTA:

CICERÓN AYALA OROZCO

ASESOR:

DR. CARLOS CORTÉS PENAGOS

COASESOR:

DR. CARLOS R. SOSA AGUIRRE

MORELIA, MICH.

NOVIEMBRE, 2006

Índice de Temas

RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 NEUROSPORA CRASSA UN HONGO FILAMENTOSO USADO COMO MODELO	7
1.2 RECAMBIO PROTEICO.....	11
1.3 EL SISTEMA DE UBIQUITINACIÓN	14
1.3.1 Enzima activadora de ubiquitina (E1).....	17
1.3.2 Enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2).....	18
1.3.3 Enzimas ligasas de Ubiquitina E3s.....	19
1.3.3.1 Señales y sitios de ubiquitinación.....	20
1.3.3.2 E3s con dominio HECT.....	22
1.3.3.3 E3 con dominio RING-finger	23
1.3.3.4 E3 ubiquitina ligasas con dominio RING-finger constituidas por múltiples subunidades	25
1.3.4 Proteínas F-box y su relación con las E3 ubiquitina ligasas tipo SCF	26
1.3.5 Mecanismos de regulación de la unión entre las E3 ubiquitina ligasa tipo SCF y el sustrado.....	27
1.4 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL, UNA ESTRATEGÍA PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	28
1.5 EL SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS.....	29
1.6 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS F-BOX	30
1.7 ANTECEDENTES	31
1.7.1 El sistema de ubiquitinación en <i>S. cerevisiae</i> mediado por SCF ^{Grr1}	36
1.7.2 El sistema de ubiquitinación en <i>Neurospora crassa</i>	39
II. JUSTIFICACIÓN	40
III. HIPÓTESIS	41
IV. OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GENERAL	41
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	41
4.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	42
V. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1 CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	42
5.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	44
5.3 GELES 2 DIMENSIONES	44
5.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	47
5.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE E. COLI-MÉTODO DE CALCIO.....	48
5.6 OBTENCIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE E. COLI.....	48
5.7 EXTRACCIÓN DE RNA	49
5.8 REMOCIÓN DEL DNA CONTAMINANTE EN EXTRACCIONES DE RNA	50
5.9 OBTENCIÓN DE CDNA POR RT-PCR	51
5.10 PCR.....	51
5.11 CLONACIONES Y SUBCLONACIONES	52
5.12 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	53
5.13 MINIPREP.....	53
5.14 MAXIPREP.....	54
5.15 LIMPIEZA DE PLÁSMIDOS PARA SECUENCIACIÓN.....	54
5.16 ENSAYOS DE EXPRESIÓN	55
5.17 GELES SDS-PAGE PARA ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE 6XHisNFB1	56

VI. RESULTADOS.....	57
6.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DE LA MUTACIÓN DE NFB1 POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	57
6.2 COMPARACIÓN FUNCIONAL ENTRE EL COMPLEJO SCF ^{GRR1} Y EL COMPLEJO HIPOTÉTICO SCF ^{NFB1}	60
6.3 ALINEAMIENTO DE PROTEÍNAS F-BOX Y MODELADO ESTRUCTURAL DE LOS LRRS DE NFB1	62
6.4 PREDICCIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL DOMINIO F-BOX DE NFB1	66
6.5 SUSTRATOS POTENCIALES PARA LA INTERACCIÓN CON NFB1	67
6.6 GENERACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE NFB1 Y LOS SUSTRATOS HIPOTÉTICOS	74
6.6.1 Clonación del gen <i>nfb1</i> en el vector de expresión <i>pTrc99a</i>	74
6.6.2 Clonación de <i>nfb1</i> en un vector de dos híbridos (<i>pAS2-1</i>).....	78
6.6.3 Clonación de <i>NCU02114.1/clnG1</i> en un vector de dos híbridos (<i>pACT2</i>)	78
6.6.4 Expresión de <i>HIS-NFB1</i>	80
VII. DISCUSIÓN.....	84
7.1 NFB1 PODRÍA PARTICIPAR EN LA REGULACIÓN DEL APAREAMIENTO, CICLO CELULAR Y MORFOGÉNESIS	84
7.2 CLONACIÓN DE GENES	88
7.3 EXPRESION DE LA PROTEÍNA NFB1	89
VIII. CONCLUSIÓN	91
IX PERSPECTIVAS	91
X. BIBLIOGRAFÍA	93

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de reacciones de ubiquitinación.....	16
Figura 3. Geles bidimensionales.....	59
Figura 4. Alineamiento del dominio F-box+LRRs.....	64
Figura 5. Modelado estructural del dominio LRR.....	65
Figura 6. Alineamiento de proteínas homologas a ASK1.....	67
Figura 7. Alineamiento de ciclinas-G1 hipotéticas.....	70
Figura 8. Alineamiento de homologos a Ime2p.....	71
Figura 9. Alineamiento de proteínas homologas a Hof1p.....	73
Figura 10. Digestiones con SalI de construcciones de nfb1 fusionado a pAS2-1 y nfb1 fusionado a pTrc99a.....	76 77
Figura 11. Esquema de clonación de nfb1his en el vector pCR4-TOPO.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Esquema de clonación de nfb1his en el vector pAS2-1.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Digestión con XhoI de construcciones pACT2-clnG1.....	79
Figura 15. Gel de agarosa al 0.8% de digestiones de construcciones pACT2-clnG1.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 16. Esquema del proceso de clonación de clnG1 a partir del cDNA obtenido por RT-PCR.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 17. Esquema del proceso de clonación de la ciclina de N. crassa clnG1 en el vector pACT2.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 18. Gel SDS-PAGE de extracto total de muestras de la cinética de expresión de 6HIS-NFB1.....	81
Figura 19. Geles SDS-PAGE acrilamida 8.0% para evaluar la expresión de la proteína NFB1.....	82
Figura 20. Gel SDS-PAGE de acrilamida al 8.0% para evaluar la de inducción de expresión en un control positivo.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 21a. Análisis por medio de RT-PCR de la transcripción de nfb1his durante la cinética de inducción (figura 18).....	83
Figura 21b. Análisis por medio de RT-PCR de la transcripción del gen nfb1his durante la cinética de expresión (ver figura 18).....	¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones y características de algunos complejos SCF. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 2. Se muestran un análisis de las proteínas homologas en <i>N. crassa</i> a las proteínas que componen el complejo SCF^{Grr1} y los respectivos sustratos.....	61
Tabla 3. Características de las cepas utilizadas en los ensayos.....	43
Tabla 4. Plásmidos utilizados.	43
Tabla 5. Oligonucleotidos utilizados.....	43

Resumen

Se estudió un complejo tipo ubiquitina ligasa SCF^{NFB1} en *Neurospora crassa*. Los complejos SCF (Skp1-Cullina-Fbox) participan en el marcado de proteínas uniendo el péptido llamado ubiquitina a las proteínas sustrato que posteriormente serán degradadas. La ubiquitinación y degradación de proteínas es una forma de regulación enzimática que resulta en la regulación del ciclo celular, regulación de la especificidad en la transducción de señales, desarrollo, regulación de la transcripción, y otros procesos biológicos. Se predijo que proteína F-box NFB1 forma parte del complejo SCF^{NFB1} y ésta es la responsable de hacer un reconocimiento molecular de los sustratos que serán ubiquitinados. El remplazo del gen *nfb1* en *N. crassa* por el cassette de higromicina ocasiona una reducción del crecimiento del micelio aéreo, reducción de la producción de biomasa y esterilidad durante el apareamiento. Con la finalidad de conocer la función molecular de la proteína NFB1 se realizó un estudio bioinformático para predecir los posibles sustratos blanco del complejo SCF^{NFB1} . Se encontraron tres sustratos potenciales (ClnG1, NIME y NHOF1) para la interacción con NFB1 en los cuales se describieron los posibles dominios importantes para la interacción. Los resultados muestran que estas tres proteínas podrían participar en la regulación del ciclo celular. Adicionalmente, se generaron las herramientas de biología molecular que permitirán probar experimentalmente la interacción entre la proteína NFB1 y las proteínas sustrato hipotéticas.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 *Neurospora crassa* un hongo filamentoso usado como modelo

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* han sido determinante en el progreso de la bioquímica, genética, y biología molecular. George W. Beadle and Edward L. Tatum definieron el papel de los genes en el metabolismo, y esto permitió un gran avance y revolución en la genética a mediados del siglo pasado (83). Su trabajo fue realizado en el ascomiceto filamentoso *N. crassa*, el cual fue inicialmente descrito en 1843 como el agente causal de la infestación por mohos naranjas en las panaderías francesas (84). Beadle and Tatum lo describieron como un organismo donde era posible estudiar genética mendeliana el cual podía crecer en medios de cultivo simples y mostraba necesidades de algún nutriente adicional causado por efecto de una mutación. El éxito de su experimento ocasionó que en bacterias, algas, y otros hongos se realizaran experimentos semejantes. Éste descubrimiento junto con la elucidación de la estructura de DNA en 1953, fueron decisivos para el nacimiento de la biología molecular.

Neurospora recientemente se ha convertido en un organismo modelo popular (85). Diversos programas de investigación se centran en el estudio de *N. crassa* en áreas como genética molecular, bioquímica, fisiología, y biología celular hasta estudios más recientes sobre el desarrollo, fotobiología, ritmos circadianos, silenciamiento de genes, ecología, y evolución.

Una de las características más atractivas de *N. crassa* como un organismo modelo es que su ciclo de vida es manipulable genéticamente y bioquímicamente (figura 1). *N. crassa* es un organismo multicelular y produce al menos 28 distintos tipos de células, muchas de las cuales se derivan de las hifas (86) . Las hifas de *N. crassa* presentan un crecimiento con ramificaciones regulares y además contienen múltiples núcleos. Estas hifas presentan septación incompleta lo que permite el movimiento de organelos entre los compartamentos. Frecuentemente la fusión de filamentos de hifas produce una red de hifas complejas (el micelio) y promueve la formación de heterocariones en los que múltiples genomas pueden contribuir al metabolismo de un solo micelio. Las hifas aéreas se diferencian a partir de hifas vegetativas en respuesta a una limitación de nutrientes, desecación, u otras formas de estrés, y estas forman cadenas de esporas

asexuales (las macroconidias con múltiples núcleos)(87). Los tiempos de macroconidiación son regulados por un ciclo circadiano, que es regulado por

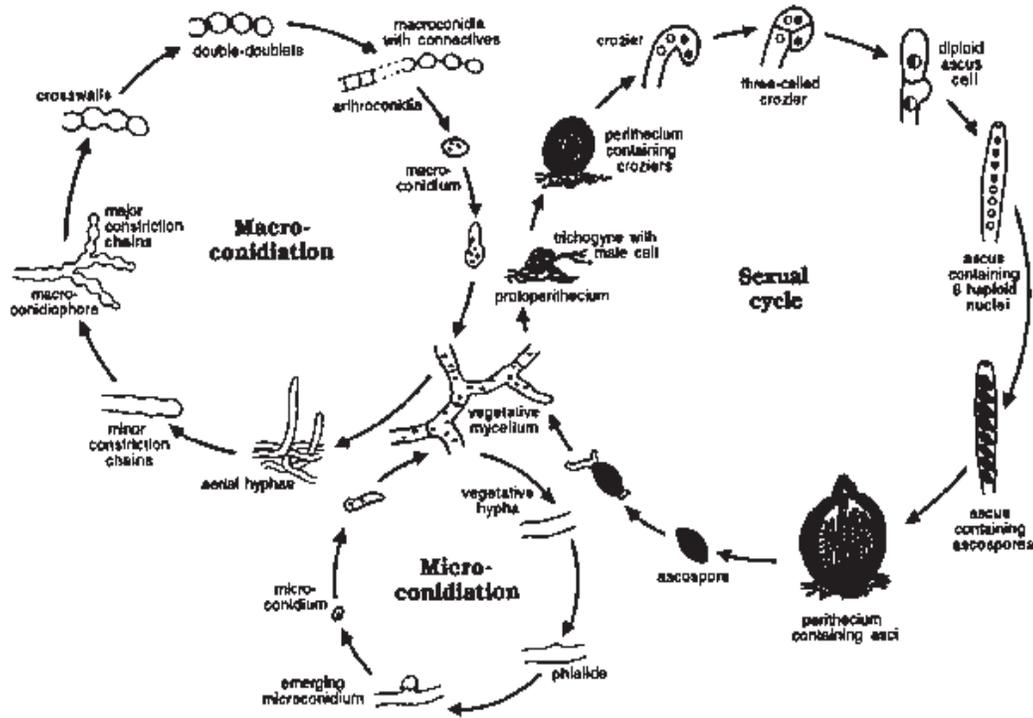


Figura 1. Ciclo de vida de *Neurospora*.

Dependiendo de las condiciones del medio, el micelio vegetativo puede sufrir esporulación por macroconidiación o microconidiación. Este puede entrar al ciclo sexual mediante la formación de protoperitecios; los cuales, después de la fertilización, pueden iniciar el desarrollo dirigido hacia la producción de ascosporas por meiosis. Tomado de referencia 43.

exposición de luz azul. Otro tipo de espora asexual, es la microconidia con un núcleo, se diferencia a partir del microconidióforo o directamente de la hifa vegetativa (86,106).

En *N. crassa* una cepa aislada puede producir estructuras de reproducción sexual femeninas y masculinas. Sin embargo, la reproducción sexual solo se puede llevar a cabo entre cepas de tipo de apareamiento opuesto, *matA* y *mata*. La formación de estructuras de reproducción femeninas (protoperitecios) es inducida por limitación de nitrógeno (104). Estas estructuras producen hifas especializadas (tricoginos) las cuales exhiben un crecimiento quimotrópico hacia las células masculinas (usualmente hifas o conidias) de apareamiento opuesto; esto a su vez se induce en respuesta a feromonas (105). El contacto entre el tricogino y la célula masculina ocasiona la entrada de la célula masculina al tricogino y su posterior transporte hacia la célula del ascogonio del protoperitecio. Poco después de la fertilización ocurren varias duplicaciones mitóticas de los núcleos tanto femenino como masculino para producir una masa de hifas ascógenas. Posteriormente los núcleos de tipo de apareamiento opuesto forman pares y comienzan a dividirse simultáneamente por mitosis generando varios tipos de células en las que puede haber células dinucleadas en las cuales ocurre la cariogamia (fusión de núcleos). Después de formada la célula diploide, ocurre un meiosis y posteriormente una mitosis para generar ocho ascosporas contenidas en una asca (75).

El genoma de *N. crassa* ha sido publicado recientemente (39). Un análisis del genoma de *N. crassa* planteó varias temas de discusión (43). En primer lugar, *N. crassa* posee una gran cantidad de genes sin homología con *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo que *Neurospora* debería ser un modelo mejor para

eucariotes superiores en muchos aspectos de la biología celular. En segundo lugar, *Neurospora* muestra un mecanismo de silenciamiento genético que actúa en la fase sexual o en el crecimiento vegetativo del ciclo celular. Uno de los mejores estudios son las mutaciones puntuales inducidas por duplicación (RIP: del Inglés repeat-induced point mutation), una defensa efectiva contra la duplicación de secuencias así como las generadas a partir de la multiplicación de transposones. Sin embargo, el fenómeno de RIP aparentemente impone una limitación sobre evolución del genoma, planteando la pregunta de como *N. crassa* puede utilizar la duplicación genética para la diversificación de genes.

1.2 Recambio proteico

En todas las células biológicas las proteínas están sujetas a una biosíntesis y degradación constante, en un proceso que se denomina **recambio proteico**.

El recambio proteico depende de el tiempo de vida metabólica de las proteínas.

Los tiempos de vida metabólica de las proteínas presentan una enorme variabilidad, éstos oscilan entre pocos minutos a muchos meses.

Siguiendo la cinética de degradación de una proteína por medio de marcaje isotópico es posible determinar su tiempo de vida media. El tiempo de vida media de una proteína está relacionado con la función realizada. Por ejemplo, las proteínas que se secretan a un medio extracelular, como las enzimas digestivas, las hormonas polipeptídicas y los anticuerpos, tienen un recambio metabólico

rápido, mientras que las proteínas estructurales , como el colágeno, son metabolizante mas estables (ver tabla 1).

Tabla 1. Hemividas y localizaciones intracelulares de la degradación en el recambio proteico.

Hemivida (horas)	Localización intracelular			
	Nucleo	Citosol	Mitocondrias	Retículo endoplásmico y membrana plasmática
<2	Productos de oncogenes	Ornitina descarboxilasa, tirosina aminotransferasa, quinasa C	Ácido aminolevulínico sintetasa	δ- MHG-CoA reductasa
2-8	-----	Triptófano oxigenasa, proteína quinasa dependiente de cAMP	-----	γ-Glutamil transferasa
9-40	Ubiquitina	Calmodulina, glucoquinasa	Acetil-CoA carboxilasa, alanina aminotransferasa	Receptor de LDL, citocromo P-450
41-200	Histona H1	Lactato aldolasa, reductasa, citocromo P-670	deshidrogenasa, dehidrofolato piruvato carboxilasa, citocromo c	Citocromo oxidasa, Citocromo <i>b₅</i> , cit <i>b₅</i> reductasa
>200	Histonas H2A, H2B, H3, H4	Hemoglobina, fosforilasa	glucógeno -----	Receptor de acetilcolina

Tomada de C. K. Mathews and K. E. Van Holde. Bioquímica 2ª edición. *McGraw-Hill-Interamericana*. (2000). Pag. 788. Fuente original: M. Rechsteiner, S. Rogers, y K. Rote, *Trends Biochem. Sci.* (1987) 12:390-394.

El recambio proteico pudiera parecer un fenómeno en contra del principio de máxima economía de la célula dado que las proteínas son degradadas sin importar que la síntesis de estas tuvo un costo energético alto. Esto se justifica dado que todos los constituyentes de la célula, entre éstos las proteínas, están sujetos a cambios químicos debidos a la acción de las influencias del medio,

principalmente especies reactivas de oxígeno, que pueden influir en la estructura, conformación y actividad biológica. Además la capacidad de las proteínas para reparar el daño causado es limitada. En este sentido el recambio proteico puede verse como un sistema de control de la calidad donde las proteínas dañadas deben ser sustituidas por nuevas proteínas. En éste caso los cambios químicos, principalmente reacciones de oxidación, sufridos por las proteínas son una marca para hacer que pasen a ser el objetivo de una enzima proteolítica que identifica específicamente el marcador y que se encargará de degradarla (2).

Por otro lado el recambio proteico constituye también un camino para la adaptación celular a los cambios del medio y conservar la homeostasis. Así por ejemplo, como se describirá mas adelante, en presencia de una determinada fuente nutricional, en el medio, la célula programa cambios que permitan metabolizar eficientemente dicho nutriente mediante degradación de proteínas específicas y síntesis de nuevas. En éste caso la degradación selectiva de proteínas puede incluir a aquellas que no son útiles en ese momento para el metabolismo de dicha fuente nutricional o bien aquellas que su degradación permite la expresión de proteínas necesarias para el metabolismo. En éste sentido la señal química necesaria para la degradación selectiva es la **ubiquitinación**. El objetivo final de la degradación de una proteína sustrato marcada por ubiquitinación es la regulación de la concentración y compartimentalización de las proteínas en el momento preciso que la célula lo requiera.

La ubiquitinación participa mediando la degradación selectiva de proteínas importantes en la regulación de varias funciones celulares. Algunos de estos procesos celulares son la regulación de los ciclos circadianos (49), progresión del

ciclo celular (9,10, 23, 24, 42, 57, 59), respuesta y transporte de nutrientes (27, 48, 49), apareamiento en levaduras (44), procesamiento de antígenos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad MHC clase I (60), respuesta inflamatoria (61), entre otras.

1.3 El sistema de ubiquitinación

El papel de la ubiquitina en la degradación de las proteínas fue descubierto en estudios bioquímicos en un sistema libre de células de reticulocitos en 1980 por Hershko, Ciechanover y Rose(1).

En este sistema las proteínas son marcadas para la degradación por la unión covalente de ubiquitina, una proteína de 76 residuos de aminoácidos. La ubiquitina ligada a la proteína es la señal que es reconocida por el proteosoma 26S, un complejo dependiente de ATP especializado en la degradación de las proteínas marcadas con ubiquitina (3). El reconocimiento y degradación por el proteosoma 26S requiere de la unión de al menos cuatro ubiquitinas a la proteína sustrato. La ligación de la ubiquitina-proteína requiere la acción secuencial de tres enzimas. El residuo de la glicina C-terminal de la ubiquitina es activado por una Enzima Activadora de Ubiquitina (**E1**) en un proceso dependiente de ATP. En este paso se forma un intermediario de ubiquitina adenilado, con liberación de pirofosfato (PP_i), seguido de la unión de la ubiquitina a un residuo de cisteína de la enzima E1 por medio de un enlace tioléster, con la liberación de AMP (figura 2-A, paso 1). La ubiquitina activada es transferida a un residuo de cisteína de una Enzima Conjugadora de Ubiquitina (**E2**) (figura 2-A, paso 2). La tercera enzima es

una Ligasa de Ubiquitina (**E3**), la cual une covalentemente a la ubiquitina con la proteína sustrato por un enlace amida isopeptídico, formado entre el carboxilo-terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína sustrato (figura 2-A, paso 3).

Normalmente en los organismos se puede encontrar una sola E1, pero hay muchos tipos de E2s y familias de E3s o complejos de multiproteínas E3. Las E3s son las responsables de la selectividad para la unión de ubiquitina-proteína y consecuentemente para la degradación. La selectividad de las E3s está determinado por la unión a proteínas sustrato que contienen señales específicas de reconocimiento. Se conocen dos mecanismos para la transferencia de la ubiquitina desde la enzima E2 a la proteína sustrato. 1) La ubiquitina de una apropiada E2 es transferida a un residuo de cisteína de la enzima E3. Posteriormente la ubiquitina unida por un enlace tioléster a la enzima E3 es ligada a un residuo de lisina de la proteína sustrato por un enlace amida. Este caso se presenta en la familia de enzimas E3s con **dominio Hect** (figura 2-B). 2) La ubiquitina es transferida directamente de E2 a la proteína sustrato; este mecanismo requiere de la interacción entre E2 y E3 que forman un complejo enzimático, además del reconocimiento y unión de la proteína sustrato a E3. Este segundo mecanismo se presenta en los complejos multienzimáticos **SCF** (figura 2, B). Después de la unión de la primera ubiquitina, usualmente se forma una cadena de poliubiquitina, en la que cada extremo C-terminal de cada unidad de ubiquitina es ligada al residuo de lisina 48 (Lys48) de la ubiquitina previa (4,5).

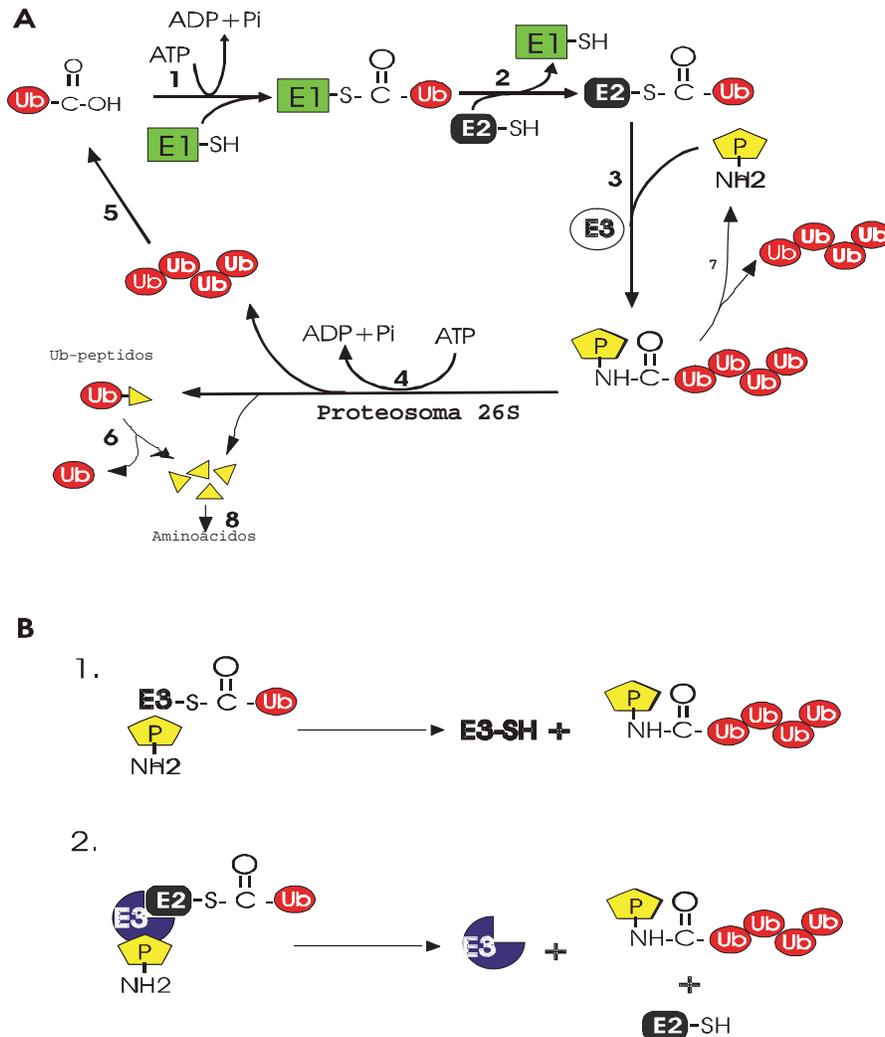


Figura 2. Modelo de reacciones de ubiquitinación.

A) Principales reacciones de la vía de la ubiquitinación: 1) Reacción dependiente de ATP, ligación de la ubiquitina a la enzima E1, activación de la ubiquitina. 2) Ligación de la ubiquitina a la enzima E2. 3) La enzima E3 ubiquitina ligasa se asocia a E2 y transfiere la ubiquitina al sustrato, el grupo NH₂ de la figura representa el grupo amino ε de lys. 4) El proteasoma reconoce y degrada proteínas marcadas, reacción dependiente de ATP. 5 y 7) Participación de las isopeptidasas. 6) Participación de las C-terminal hidrolasas. 8) Reacción catalizada por peptidasas citosólicas. **B)** 1) Modelo

de transferencia de la ubiquitina desde E3 al sustrato, nótese que requiere de la ligación directa de la ubiquitina a E3. Mecanismo de las proteínas E3 con dominio HECT. 2) Modelo de transferencia de ubiquitina desde E2 a la proteína sustrato; no hay ligación de la ubiquitina a E3. Tomado y modificado de (4).

El proteasoma 26S se forma por la unión dependiente de ATP de un proteasoma 20S, un complejo de forma cilíndrica que contiene las subunidades catalíticas de la proteasa, con el complejo de subunidades 19S las cuales actúan como tapas de la estructura cilíndrica del proteasoma 20S. Las tapas son importantes en el reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas. La acción del proteasoma 26S genera diferentes productos: péptidos libres, péptidos cortos aún unidos a ubiquitina y cadenas de poliubiquitina (figura 2-A, paso 4). Los últimos dos productos son convertidos a ubiquitina libre y reusable por la acción de C-terminal hidrolasas e isopeptidasas (figura 2-A, paso 5 y 6). Algunas isopeptidasas pueden romper enlaces entre conjugados proteína-ubiquitina (paso 7) y así impedir la proteólisis por el proteasoma 26S. Estas isopeptidasas tienen una función correctiva para salvar proteínas ubiquitinadas por error. Además, péptidos cortos son degradados a aminoácidos libres por peptidasas citosólicas (paso 8).

1.3.1 Enzima activadora de ubiquitina (E1)

La reacción de transferencia de la ubiquitina desde E1 a E2 es una reacción con alta eficiencia que presenta una tasa de recambio de $1-2 \text{ s}^{-1}$; mientras que se han reportado valores para la constante catalítica (K_{cat}) para la ubiquitinación del

sustrato de 10 a 100 veces menores (62, 63). La alta eficiencia de E1 permite la producción de suficiente ubiquitina activa para todas las reacciones siguientes de conjugación de la ubiquitina, mas aun la concentración de E1 es normalmente menor que la concentración total de E2 (64).

Se han obtenido varias líneas celulares de mamíferos que poseen una mutación sensible a temperatura en el gen E1. Estas líneas celulares permitieron la demostración original de que la ubiquitina es mediadora en la proteólisis de proteínas de vida corta. Estas líneas celulares siguen siendo de utilidad para investigar si un proceso es dependiente de ubiquitina (65,66,67).

1.3.2 Enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2)

Existen varios tipos de enzimas E2, se ha descrito que estas interaccionan con una o varios tipos de enzimas ligasa de ubiquitina E3 (5). Cada E3 reconoce uno o varios sustratos que muestran una o más señales de ubiquitinación, y cooperan con una o pocas E2s. Todas las E2 muestran un dominio conservado de ~150 aminoácidos. Ciertas familias presentan extensiones de su N o C-terminal que pueden facilitar interacciones específicas. Existen 11 diferentes E2s en *Saccharomyces cerevisiae* y aunque puedan ser muy similares éstas se asocian a diferentes funciones biológicas (5). La especificidad de la función es debida principalmente a la especificidad de interacción con E3s.

La familia de enzimas E2 han sido caracterizada estructuralmente. El dominio principal consiste de cuatro hélices α y cuatro laminillas β antiparalelas. Las laminillas β y $\alpha 2$ forman la región central que es rodeada por $\alpha 1$ en un extremo y

$\alpha 3/\alpha 4$ en el otro lado. La cisteína del sitio activo se ubica en el asa que se extiende desde S4 (laminilla β número 4) a $\alpha 2$. Algunos de los residuos del sitio activo de cisteína interaccionan con la ubiquitina. Además las E2s presentan dominios para la interacción con las enzimas E3s (5).

Las enzimas E3 pueden ser miembros de dos familias de proteínas: 1) E3s con dominio HECT o 2) RING E3s. Los módulos catalíticos de ambas familias son diferentes en estructura y en secuencia. Sin embargo, ciertas E2s interaccionan con ambas familias. Por ejemplo, UbcH7 se une eficientemente a la proteína con dominio HECT E6-AP (68, 69, 70) y a diferentes RING E3s (71, 72, 73).

1.3.3 Enzimas ligasas de Ubiquitina E3s

Las enzimas ligasas de ubiquitina tienen una función central en la determinación de la selectividad de la degradación de proteínas mediada por ubiquitinación. Las E3s descritas muestran carencia de homología en la secuencia entre diferentes tipos de E3s, excepto entre miembros de la misma familia. Además, varias E3s están conformadas por complejos de subunidades y más aun, se ha encontrado variabilidad en los mecanismos de interacción y ligación de la ubiquitina al sustrato en diferentes E3s. En algunos casos la proteína sustrato se une directamente a E3, mientras que otras lo hacen uniéndose a la ligasa a través de una proteína adaptadora.

El mecanismo de transferencia de la ubiquitina activada desde un intermediario tioréster al grupo ϵ -amino del residuo Lys de una proteína difiere en varias E3s. En algunos casos, E3 acepta la ubiquitina activada y la une como un intermediario

tioléster antes de transferirla al sustrato (E3 con dominio HECT), mientras que otras ligasas pueden transferir la ubiquitina directamente de E2 al sustrato (E3 con dominio RING).

Todas las características anteriores de las E3s han causado confusión para definir y clasificar a una enzima E3. Hershko y Ciechanover (4) definieron a una E3 como: “una enzima que une, directa o indirectamente, proteínas sustrato específicas y promueve la transferencia de la ubiquitina, directa o indirectamente, desde un intermediario tioléster a uniones amida con proteínas o cadenas de poliubiquitina” .

1.3.3.1 Señales y sitios de ubiquitinación

La unión de E3 a un sustrato debe involucrar forzosamente una señal de ubiquitinación y un sitio específico para unir la primer ubiquitina. Por ejemplo E3 α , la primer ubiquitina ligasa descubierta (también conocida como Ubr1), una RING E3 que reconoce ciertos sustratos por medio de las propiedades que poseen los aminoácidos de su N-terminal. Esta fue la primera señal de ubiquitinación descubierta para proteínas de vida corta y se conoce como la regla del N-terminal descrita por Varshavsky en 1986. Estudios en sustratos artificiales de Ubr1 mostraron que los requerimientos mínimos para este tipo de ubiquitinación, son un residuo en el extremo N-terminal que puede ser básico (tipo I; N,Q,K,H) o hidrofóbico voluminoso (Tipo II; L,F,Y,I,W) lo que se conoce como una señal de ubiquitinación y una Lys que sea accesible estéricamente (el sitio de ubiquitinación) (2,6,7,8).

Muchas proteínas destinadas a ser ubiquitinadas son reconocidas por interacciones electrostáticas después de haber sido fosforiladas (35, 9, 10). Consistente con esta observación la vía de las MAP cinasas y otras vías de transducción de señales que implican fosforilación de proteínas son importantes para definir los sustratos que serán degradados por ubiquitinación. Consistente con lo anterior, fue observado que proteínas de vida media corta contenían elementos PEST, regiones ricas en residuos de Pro, Glu, Ser, y Thr (32). Mas recientemente se encontró que los elementos PEST son ricos en secuencias SP o TP (S/TP), que son un consenso para sitios de fosforilación por cinasas dependientes de ciclina del ciclo celular (CDKs) y otras proteínas cinasas. Actualmente se ha observado que muchos, pero no todos, elementos PEST tienen dentro de su secuencia sitios de fosforilación (residuos de fosfoserina o fosfotreonina) necesarios para la degradación. Así en *S. cerevisiae* para la degradación de las ciclinas de fase G1 del ciclo celular (Cln1, Cln2 y Cln3) requieren de fosforilaciones múltiples dentro y en regiones cercanas al elemento PEST (74).

Otra señal importante de destrucción, caracterizada por ser una secuencia pequeña, es la llamada "caja de destrucción" (Destruction Box) encontrada en ciclinas mitóticas (17) y otros sustratos del complejo promotor de anafase (APC) (18,19,20); usualmente se encuentra localizada entre los residuos 40-50 a partir del extremo N-terminal de las ciclinas. En la caja de destrucción, RXALGXIXN, los residuos de arginina (R) y leucina (L) son los principales determinantes de la especificidad. Péptidos sintéticos con la misma secuencia pueden inhibir la ubiquitinación dependiente de la caja de destrucción.

1.3.3.2 E3s con dominio HECT

Las propiedades de este dominio fueron reveladas a través de estudios de la degradación del supresor de tumores p53. La pérdida de función de p53 conduce a la tumorigénesis, y una gran parte de los tumores humanos examinados presentan mutaciones de p53. p53 es una proteína de unión al DNA y desempeña su función regulando el ciclo celular, impidiendo el paso inadecuado de las células en fase G₁ a la fase S.

Cuando las células son infectadas por la forma oncogénica del virus del papiloma humano (HPV), p53 es degradado en forma dependiente de ubiquitina/proteasoma. La proteína E6 de origen viral y la proteína celular E6-AP (E6-associated protein) son las responsables del reconocimiento e inducción de la ubiquitinación de p53, en dicho complejo E6 interacciona directamente con p53 y E6-AP interacciona con E2. (76). La tercera parte hacia el C-terminal de la secuencia de E6-AP es 35-45% idéntica a numerosas proteínas de bases de datos. Dentro de esta región de ~350 residuos, llamada dominio HECT (**h**omologous to **E**6-AP **c**arboxy **t**erminus), se encuentra estrictamente conservado un residuo de cisteína en la posición ~35 a partir del C-terminal. Este residuo de cisteína de E6-AP es requerido para la ubiquitinación de p53 debido a que actúa como un sitio para la formación del enlace tioéster con la ubiquitina (77). Esto muestra que las proteínas con dominio HECT muestran un mecanismo de acción por catálisis covalente (ver figura 1). Las proteínas E3s con dominio HECT son modulares: el extremo N-terminal interacciona con el sustrato específico, y el

dominio HECT se une a E2 para mediar la ubiquitinación. Consistente con este modelo, la delección del dominio HECT no interfiere con la unión al sustrato, y un dominio HECT aislado interacciona fuertemente con la E2 (78, 79, 80).

Mientras que E6-AP desestabiliza a p53 en células infectadas con HPV, la degradación constitutiva en células normales de p53 depende de una E3 diferente, Mdm2, que interesadamente es una RING finger E3. La identificación de los sustratos de E6-AP en células no infectadas ha sido de interés debido a que mutaciones en el gen E6-AP causan el síndrome de Angelman, caracterizado por retraso mental severo (81, 82).

Existe una amplia variedad de procesos celulares regulados por E3s con dominio HECT. Por ejemplo, la regulación de la endocitosis en levaduras (86), regulación de la subunidad grande de la RNA polimerasa II de levadura (79), regulación de la translocación de factores de transcripción hacia el núcleo (88), regulación de canales de sodio en humano (89), entre otras. Éstos procesos no se describirán a detalle dado que el interés de este trabajo se centra en las E3s de múltiples subunidades con dominio RING-finger, las cuales se describen más adelante.

1.3.3.3 E3 con dominio RING-finger

La secuencia de numerosas proteínas eucarióticas presentan una serie de residuos de histidina y cisteína con un espaciamiento característico que permite la coordinación con dos iones de zinc en una estructura con uniones cruzadas llamada “Really Interesting New Gene finger” (RING-finger). Existen gran cantidad de proteínas con dominio RING finger en los bancos de datos de proteínas y se ha descrito que están implicadas en una gran variedad de funciones celulares (19,

90). Los iones de zinc y sus ligandos son inertes catalíticamente; además, el espaciamiento de los residuos ligandos de zinc es conservado en la familia de RING-fingers. Los dominios RING-fingers no presentan una función catalítica pero sí pueden ser sitios de ensamblaje que unen a otras proteínas (90). Uno de los hallazgos más recientes y novedosos ha sido la descripción de la interacción entre proteínas E2s y dominios RING-fingers. En este sentido, todas las E3s que no presentan un dominio HECT tiene una proteína con dominio RING como uno de sus constituyentes. No se sabe si todas las proteínas con dominio RING-finger son E3s, pero si es claro que existen una familia muy amplia de E3s con dominio RING-finger.

Las E3s con dominio RING-finger pueden presentarse en dos variedades (19). El tipo descubierto primero consiste en una proteína con dominio RING-finger que ha sido designada con el nombre de E3s con subunidad sencilla (monosubunidad). En éste caso la E3s contiene el elemento de reconocimiento del sustrato y el dominio RING-finger en un mismo polipéptido. En el otro tipo de E3, la proteína con dominio RING-finger es una subunidad que forma parte de un complejo de múltiples subunidades (ver figura 3). El dominio RING-finger y regiones próximas a éste, en colaboración con una proteína llamada cullina, facilitan la ubiquitinación del sustrato dependiente de E2s, mientras que otras subunidades de la E3s con dominio RING-finger (mostrada en amarillo en la figura 3), reconocen la señal de ubiquitinación en el sustrato. La cullina es una familia de proteínas con homología a Cul1 que se describió por primera vez en *Caenorhabditis elegans* como una proteína involucrada en las transiciones de fase del ciclo celular.

1.3.3.4 E3 ubiquitina ligasas con dominio RING-finger constituidas por múltiples subunidades

En las E3s con dominio RING-finger constituidas por múltiples subunidades, la proteína con dominio RING-finger es un componente esencial. Estas enzimas se nombran de acuerdo a las iniciales del nombre de sus componentes o bien por el nombre asignado inicialmente cuando fueran descubiertas. Se han descrito tres familias de enzimas RING E3 de múltiples subunidades: 1) SCF (**S**kp1-**C**ullin-**F**-box protein), 2) VCB-Cul2 (p**V**HL-Elongin **C**-Elongin **B**-**C**ullin), y el APC (**A**naphase **P**romoting **C**omplex) (ver figura 3)(19,91,20).

En los complejos mostrados en la figura 3, aproximadamente 100 residuos de la proteína RING finger conocida como Rbx1 (o Hrt1/Roc1) juegan un papel importante en la organización del complejo (92, 93). Rbx1 interacciona fuertemente con el dominio C-terminal (CTD) de la culina (Cul1/Cdc53 en SCF, Cul2 en VCB y Apc2 en el APC) (94, 95). Rbx1 también interacción con E2 permitiendo la unión de E2 que porta la ubiquitina. La proteína con dominio RING-finger del APC es la subunidad llamada Apc11. El reconocimiento del sustrato es una función delegada a una subunidad separada; para los complejos SCF lo son las proteínas F-box. Las proteínas F-box se unen a los complejos SCF por interacciones con la proteína adaptadora Skp1, la cual reconoce el motivo F-box a través de su dominio C-terminal (11, 12, 19, 25). La subunidad de reconocimiento del sustrato de VCB es pVHL, el producto del gen supresor de tumor Von Hippel-Lindau; pVHL se une al complejo VCB a través de interacciones con la proteína adaptadora Elongina B/C, la cual reconoce al motivo denominado “caja SOCs”.

Muchos cánceres están asociados con mutaciones que alteran la interacción entre pVHL y Elongina B/C.

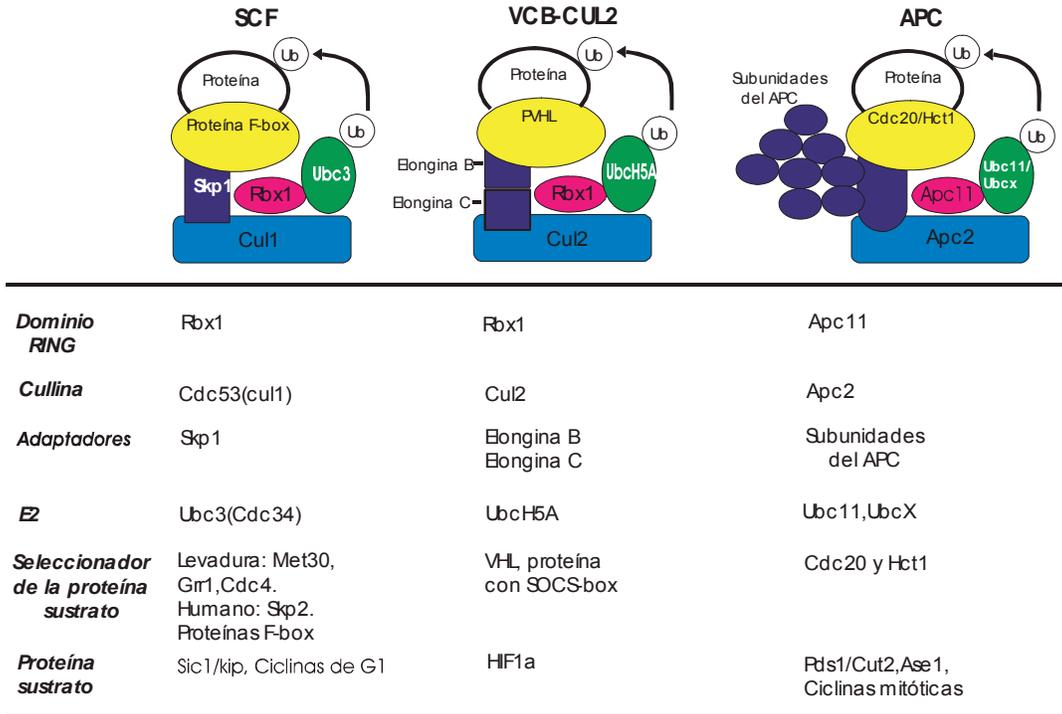


Figura 3. Modelos de los complejos E3 ubiquitin ligasa con dominio RINGfinger.

La proteína con dominio RING finger interacciona con E2 (mostrada en verde) y la cullina (mostrada en azul) de manera que mantiene a E2 unida al complejo. La proteína adaptadora (en morado) interacciona con las proteínas seleccionadoras del sustrato (en amarillo) y además con la cullina. Cuando se da la interacción de todos los componentes de un complejo E3 ubiquitina ligasa, como se muestra en el esquema, es posible que la ubiquitina (círculo blanco) sea transferida desde E2 hasta la proteína sustrato (óvalo blanco). Tomado y modificado de Weissman, A. M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. Nat. Rev. 2, 169-178.

1.3.4 Proteínas F-box y su relación con las E3 ubiquitina ligasas tipo SCF

Se han descrito una gran cantidad de proteínas de reconocimiento de sustrato con caja F-box (F-box). Todas las proteínas F-box descritas hasta la fecha se unen a

la parte constante de los complejos SCF que está formada por Cul1/Rbx1/Skp1/E2. Lo anterior, abre la posibilidad de que distintas F-box compitan por unirse a un mismo complejo SCF a través de un dominio ubicado hacia el extremo C-terminal de Skp1 (25, 95).

Normalmente los complejos SCF se nombran de acuerdo a la proteína F-box que se asocia al complejo. Por ejemplo, en *N. crassa*, el complejo en el que se une la proteína F-box FWD1, se designa como SCF^{FWD1} (49).

En mamíferos se predice que existen 47 proteínas F-box las cuales se han clasificado en tres grandes grupos dependiendo del dominio responsable de la interacción con el sustrato (107). Las dos clases mayores de los dominios de interacción incluyen los repetidos WD40 y los repetidos ricos en leucina (LRR). La tercera clase de proteínas F-box agrupa a varios dominios de interacción o dominios no reportados.

1.3.5 Mecanismos de regulación de la unión entre las E3 ubiquitina ligasa tipo SCF y el sustrato

La fosforilación del sustrato y la localización subcelular de las proteínas F-box permiten una regulación temporal y espacial de la degradación de proteínas. Prácticamente todos sustratos de complejos SCF necesitan de fosforilación para ser ubiquitinados (descrito anteriormente).

Por otro lado, la localización subcelular de las proteínas F-box es importante para delimitar su función y los sustratos potenciales con los que es posible que interaccione. Mientras que los componentes base de los complejos SCF se encuentran en núcleo y citoplasma, la localización de las proteínas F-box es

determinante en la regulación espacial de la degradación de proteínas. Por ejemplo, la proteína F-box Cdc4 se localiza en su forma activa sólo en el núcleo; esto asegura que Far1 citoplásmico sea estable durante el apareamiento de *S. cerevisiae* debido a la presencia de feromonas. Far 1 es un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (Cln-Cdc28) que se acumula en el citoplasma por efecto de la presencia de feromonas. En el caso contrario cuando no hay activación de transducción de señales mediada por feromona, Far1 es secuestrado en el núcleo por Cdc24 y rápidamente degradado(58,42). La proteína F-box Grr1 de levadura se encuentra en el núcleo y en el citoplasma. Adicionalmente, Grr1p se localiza en el anillo contráctil al final de la mitosis para cumplir con la ubiquitinación de la proteína Hof1p y permitir de este modo la citocinesis (58).

1.4 Electroforesis bidimensional, una estrategia para evaluar la expresión de proteínas

La separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional es una metodología de dos fases. La primera consiste en separar las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrico. Los primeros geles reportados se realizaron con un gradiente de pH generado con amortiguadores anfotéricos (CA-IEF, carrier ampholytes- isoelectric focusing) sobre un gel de acrilamida-urea. Los amortiguadores CA (anfollinas) son una clase de ácidos oligoamino-carboxílicos (53). La segunda etapa consiste en la separación de las proteínas por el peso molecular en un gel convencional SDS-PAGE.

La electroforesis bidimensional permite visualizar proteínas separadas de un extracto total sobre un gel donde hay separación por su pI hacia un sentido y hacia otro lado, en dirección perpendicular al primero, son separadas por su peso molecular.

1.5 El sistema de dos híbridos

El sistema de dos híbridos de levadura es una de las metodologías más utilizadas en el estudio de interacciones proteína-proteína. El potencial principal de esta técnica es que permite la identificación genética de proteínas desconocidas que interaccionen con una conocida denominada carnada. Esta técnica también puede ser usada para caracterizar interacciones binarias que involucren parejas de proteínas conocidas. El sistema de dos híbridos se basó en los estudios genéticos y bioquímicos relacionados a la función del producto del gen GAL4, un regulador transcripcional positivo de los genes requeridos para la utilización de galactosa en *S. cerevisiae* (101,102). El producto del gene GAL4 presenta independientemente un Dominio de Unión al DNA (BD) y otro de Activación Transcripcional (TA) los cuales mantienen su función cuando se expresan a partir de construcciones recombinantes en *trans*. El sistema fue desarrollado por Fields y Song (103) para expresar fusiones de proteínas en GAL4(BD) y GAL4(TA o AD) a partir de vectores de expresión independientes en células de levadura diseñadas por ingeniería genética. Estas cepas presentan marcadores de selección genéticos y bioquímicos integrados en el cromosoma bajo regulación *cis* por parte de las secuencias reguladoras ubicadas hacia el extremo 5' de GAL4. En estas cepas que expresan proteínas de fusión en BD y TA las cuales pueden

interaccionar. las propiedades funcionales de GAL4 son reconstituidas por un complejo cuaternario. La formación de este complejo de proteínas resulta en la expresión de genes marcadores como *HIS3*, que confiere resistencia al anti-metabolito 3-amino-1',2',4'-triazol (3-AT), o marcadores bioquímicos como *LacZ*. Actualmente existen comercialmente varios sistemas de plásmidos y cepas para realizar ensayos de dos híbridos.

1.6 Expresión heteróloga de proteínas F-box

La elección de un método de expresión para la producción de proteínas recombinantes depende de varios factores: características de crecimiento de la célula, nivel de expresión, expresión intracelular o extracelular, modificaciones posttraduccionales, y la actividad biológica de la proteína de interés.

Existen varios sistemas de expresión de proteínas recombinantes; estos incluyen el bacteriano, de levadura, de insecto y el de mamífero.

A pesar de que se han desarrollado varios sistemas de expresión, el uso de la bacteria *Escherichia coli* sigue siendo uno de los más atractivos debido a su crecimiento rápido y alta densidad de crecimiento en sustratos de bajo costo, así como la gran cantidad de vectores y cepas mutantes disponibles para este fin. La expresión en *E. coli* permite un alto nivel de producción de proteínas recombinantes, necesarias para estudios estructurales y otros ensayos bioquímicos (96).

Sim embargo, a pesar del conocimiento extenso sobre la genética y biología molecular de *E. coli*, no todos los genes pueden ser expresados eficientemente en este organismo. Esto puede ser debido a las características estructurales del

gen, a la estabilidad y eficiencia de traducción del mRNA, la facilidad del plegamiento de la proteína, la degradación de la proteína por proteasas de la célula huésped, diferencias del uso de codones entre el gen externo y los genes de *E. coli* y la toxicidad de la proteína heteróloga a *E. coli* (96).

Una de las principales desventajas de *E. coli* como sistema de expresión incluye la incapacidad para llevar a cabo muchas de las modificaciones postraduccionales encontradas en proteínas eucariontes y capacidad limitada para facilitar la formación de puentes disulfuro. Por otro lado, muchas proteínas eucariontes retienen completamente su actividad biológica en su forma no-glucosilada (97).

1.7 Antecedentes

Debido al interés por estudiar la función molecular de la proteína NFB1 (**N**eurospora **F**-**B**ox **1**) de *Neurospora crassa*, fue obtenida una mutante en el gen *nfb1* nombrada *nfb1*Δ.

La cepa *nfb1*Δ fue obtenida por el Dr. Carlos Cortés durante los estudios posdoctorales en la Universidad de Texas A&M en el laboratorio del profesor Dr. Daniel Ebbole (resultados aún no publicados). La mutación fue realizada por recombinación homologa. Primeramente se realizó una construcción reemplazando un segmento de ~ 500 pb del gen de *nfb1* por el cassette de higromicina sobre una clona genómica en un cósmido que contenía 3.5 Kb del DNA genómico de *N. crassa*. El cassette de higromicina (1.4 Kb) fue introducido en los sitios *SacI*

(posición 1012 pb) y *Sma*I (posición 1508 pb) del gen *nfb1*. Posteriormente la construcción fue linearizada e introducida por electroporación a las conidias de *Neurospora* con lo que se logró la mutación de *nfb1* dando como resultado final la interrupción del gen *nfb1* por el cassette de higromicina. La mutante fue realizada en año 2000, por lo que es importante hacer notar que en este entonces no había sido reportada la secuencia del genoma de *N. crassa*.

El fenotipo obtenido en la mutante *nfb1* Δ es: no forma hifas aéreas (figura 4), es estéril femenina, presenta conidiación y crecimiento reducido (resultados aún no publicados). La esterilidad femenina se refiere a que durante las cruces entre una cepa *matA* y *mata* no se observa cruzamiento cuando la cepa, la que es llamada femenina, participa como receptora.

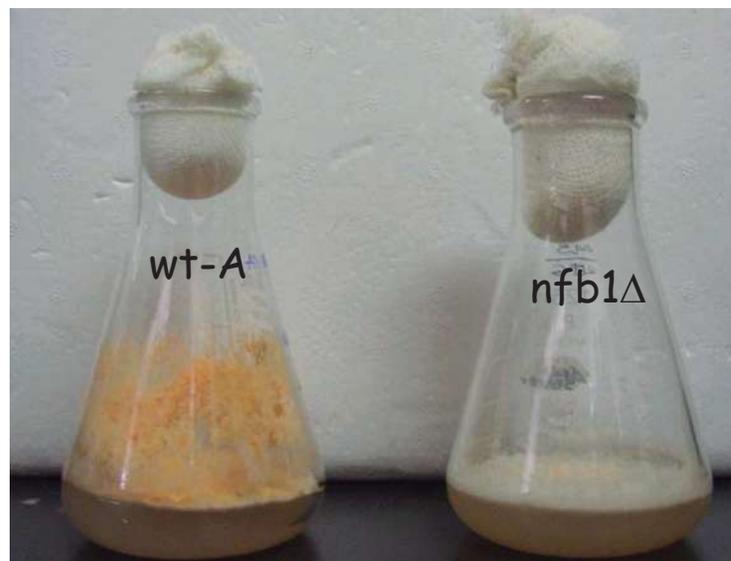


Figura 4. Fenotipo de la cepa mutante *nfb1* Δ comparado con la cepa silvestre *wt-A*

La comparación de la secuencia en bancos de genes en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sugirió que *nfb1* codifica para una proteína que presenta un dominio F-box y un dominio de repetidos ricos en leucina (LRR) y además actualmente se encuentra en las anotaciones del genoma de *Neurospora* definida como una proteína hipotética relacionada a Grr1p. Se sabe que la proteína Grr1 de *S. cerevisiae* es una proteína F-box que participa formando un complejo ubiquitina ligasa tipo SCF^{Grr1}.

El gen *nfb1* presenta un número de acceso NCU01216.3 en el banco de genes del sitio web <http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora> y el de CAD21405 en el reportado por el proyecto genoma alemán de *Neurospora* (<http://mips.gsf.de/proj/neurospora>). Ambas anotaciones de la secuencia son consistentes.

EL gen *nfb1* pertenece al cromosoma V, presenta tres intrones (102 pb, 55 pb y 62pb), cuatro exones (750 pb, 732pb, 112 pb y 758 pb), y tiene una longitud sin intrones de 2352 pb (ver figura 5).

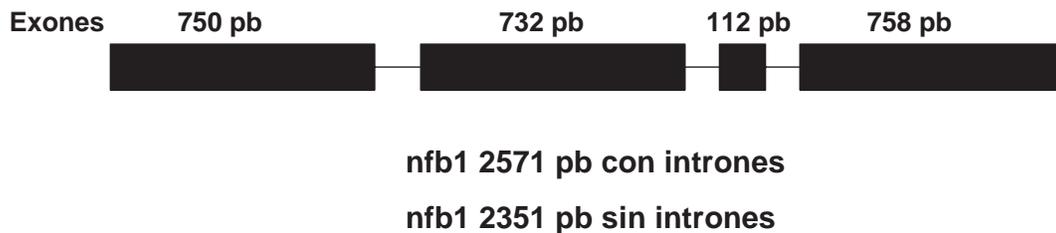


Figura 5. Esquema de las regiones codificantes del gen *nfb1* de *N. crassa*. Los exones se indican por los rectángulos. Las líneas entre los rectángulos representan los intrones. La figura fue construida a partir de los datos tomados de <http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora>

Tomando como antecedente lo que se conoce a cerca de los complejos SCF de *S. cerevisiae*, *Neurospora* y humano se procedió a integrar la información sobre los mecanismo biológicos regulados por complejos SCF, en especial el complejo SCF^{Grr1}, con la finalidad de extrapolar esta información hacia la predicción de la función de nfb1 (ver tabla 2 y 3).

Como se puede observar en la tabla 2 y 3, dependiendo de la función del sustrato que sea ubiquitinado por el complejo SCF, será la función regulada y relacionada a dicho complejo. Las vías de transducción de señales que implican fosforilación y activación de proteínas cinasas juegan un papel importante en la regulación de la interacción entre el sustrato y los complejo SCF, por lo que en la tabla 2 y3 se indica la cinasa responsable de la fosforilación del sustrato y la condición que activa a cada cinasa. El contenido de las tablas se describe más adelante.

Tabla 2. Funciones y características de algunos complejos SCF en los que la proteína reconocedora del sustrato es una F-box con dominio LRR

E3 ubiquitina ligasa	Sustrato	Función regulada por el sustrato	Cinasa	Condición de activación de la proteólisis	Sitio de fosforilación y señal de ubiquitinación
SCF ^{Grr1} <i>S. cerevisiae</i>	Cln1, Cln2 y Cln3 (35, 44 y 74)	Regulación del ciclo celular	Cln-cdc28	Respeuesta a feromonas, limitación de glucosa?	PEST y residuos S/T cercanos al PEST
	Ime 2 (27)	Ime2 es una proteína cinasa activadora de la esporulación. Su degradación inhibe la replicación meiótica del DNA	ND	Limitación de glucosa	PEST
	Mth1 (47)	Reprime la activación transcripcional de los transportadores de glucosa HXT1, HXT2, HXT3 y HXT4.	Caseínas cinasas tipo 1: Yck1p, Yck2p	Glucosa	PEST
	ND (48)	Inducción transcripcional de permeasas de	ND	Inducción con L-citrulina (48)	ND

		aminoácidos (AGP1, BAP2, BAP3, TAT1, DIP5, GNP1)			
	Gal 2 (29)	Permeasa de galactosa	ND	Glucosa	ND
	Mks1 (28)	Regulación de la señalización retrograda (RS)	No es necesaria la fosforilación	ND	Dominio de aminoácidos (AD)
	Gis4p (37)	Represor indirecto de SUC1 (invertasa de sacarosa y rafinosa)	ND	Limitación de glucosa	ND
	Hof1p (54)	Activación del anillo contráctil de actinmiosina durante la citocinesis	Cinasas activadas por MEN (Mitosis Exit Network)	Final de la mitosis	PEST
	Gic2p (55)	Polarización del citoesqueleto y después de su degradación comienza la gemación	Cdc42p-GTP	Cdc28-clnp	S254, S258
SCF ^{Skp2} <i>H. sapiens</i> (22,25)	p27 (Kip1)	Inhibidor de CDK durante la fase S	Ciclina E-Cdk2 (9, 10)	Transición de la fase G ₁ /S	T187
	FOXO (21)	Factor de transcripción implicado en la supresión de tumores y apoptosis	Fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K/Atk)	Activación de Atk	S256
	p130 (23)	Regulador negativo de la fase G ₀	Cdk4/6	Transición G ₀ /G ₁ temprana	S672
	p57(Kip2) (24)	Inhibidor CDK (CKI)	Ciclina E/Cdk2	Transición de G ₀ /G ₁	T310
	B-Myb (38)	Proteína de unión al DNA. Regulador transcripcional	CiclinaA/Cdk2?	Fase S	ND
	hOrc1p (40)	Subunidad de ORC (Complejo de Inicio de la Replicación)	CiclinaA/Cdk2	Inicio de la fase S	S258, S273 y T375 (S/T)PX(K/R)
SCF ^{NFB1?} <i>N. crassa</i>	ND	ND	ND	ND	ND

ND= no determinado.

Tabla 3. Funciones y características de algunos complejos SCF en los que la proteína reconocedora del sustrato es una F-box con dominio WD40

E3 ubiquitina ligasa	Sustrato	Función regulada por el sustrato	Cinasa	Condición de activación de la proteólisis	Sitio de fosforilación y señal de ubiquitinación
SCF ^{Cdc4} <i>S. cerevisiae</i>	Sic1	Inhibidor de CDK (Cbl-Cdc28) de fase S	Cln-cdc28		Residuos TP o SP
	Far1 (42)	CKI, inhibidor de la Cln-cdc28. Detiene a la célula en G ₁	Cln-cdc28	En ausencia de feromonas Far1 es secuestrado por cdc24 en el núcleo y rápidamente degradado	S87
	Gcn4 (41)	Activador transcripcional de genes de biosíntesis de aminoácidos y purinas	Pcl-Pho85	La limitación de nutrientes reprime Pcl-Pho85	T105 y T165 Motivo TPVL
	Tec1 (26)	Tec1 es un cofactor de Ste12, funciona como factor de transcripción responsable de la filamentación. La degradación de Tec1 permite la expresión de	Fus3	Señalización por MAP cinasas durante la respuesta a feromonas	T273, motivo LLTP

SCF ^{FWD1}	FRQ	genes de apareamiento. Ciclos circadianos	Caseína cinasa I	Ciclos obscuridad	luz-	ND
<i>N. crassa</i>	(49)		ND	ND		ND
SCF ^{SCON2}	ND	ND				
<i>N. crassa</i>	(50)					

Las cinasas especificadas en la tabla fosforila en las regiones señal de ubiquitinación sobre las proteínas sustrato. Por lo general la cinasa es activada por MAP cinasas o CDKs (56). La vía de MAP cinasas puede ser activada por varias condiciones (limitación de glucosa, feromonas, factores de crecimiento, etc.) ND= no determinado.

1.7.1 El sistema de ubiquitinación en *S. cerevisiae* mediado por SCF^{Grr1}

Uno de los sistemas biológicos donde se ha estudiado ampliamente el sistema de ubiquitinación es *S. cerevisiae*. El complejo SCF^{Grr1} participa en el reconocimiento molecular y ubiquitinación de una gran variedad de proteínas. La proteína F-box, Grr1, reconoce sustratos implicados en el ciclo celular (Cln1p, Cln2p, Cln3p)(35,44), meiosis (Ime2p)(27), morfogénesis (Gic2p y Hof1p)(55, 54), metabolismo de glucosa (Mth1p, Gal2p y Gis4)(47, 29, 37), señalización retrógrada (Mks1p)(28) y regulación de la expresión de transportadores de aminoácidos (48). La proteína Grr1 se ha descrito que su dominio de interacción con el sustrato consiste en 12 LRRs(35). Los LRRs presentan versatilidad funcional debido a que no sólo se presentan en las proteínas F-box. También participan en procesos de reconocimiento molecular diferentes a la ubiquitinación, como son la transducción de señales, la adhesión celular, el desarrollo celular, la reparación del DNA y el procesamiento del RNA (51, 52).

En *S. cerevisiae*, Grr1p, es un componente central en el mecanismo de transducción de señales responsables de la expresión de genes inducidos por

glucosa (57). En presencia de glucosa, la ubiquitinación y degradación de Mth1 dependiente de SCF^{Grr1} permiten la disociación de Rgt1 a los promotores de los genes HXT lo que permite la inducción transcripcional de los transportadores de glucosa HXT1, HXT2, HXT3 y HXT4 (47). Por otro lado, la glucosa es la fuente de carbono preferida y por lo tanto en presencia de ésta se reprime la expresión de otras proteínas necesarias para la oxidación y utilización de otras fuentes de carbono; por ejemplo, Gal2p (transportador de galactosa) es ubiquitinada de manera dependiente de SCF^{Grr1} (29).

Gis4p es un sustrato de la ubiquitina ligasa SCF^{Grr1} en el que la ubiquitinación no resulta en la degradación de Gis4p. En este caso la ubiquitinación sirve para alterar la actividad y/o la función. La ubiquitinación de Gis4p activa a la cinasa Snf1. Snf1 desreprime la transcripción de SUC2 (invertasa de sacarosa y rafinosa) y CYC1 (isoforma 1 del citocromo c) en condiciones de baja concentración de glucosa por un mecanismo de comunicación novedoso entre Grr1 y Snf1 mediado por Gis4 (37).

Además, SCF^{Grr1} está implicada en la inducción transcripcional de permeasas de aminoácidos (AGP1, BAP 2, BAP3, TAT1, DIP5, GNP1)(48). En este mecanismo de regulación no se conoce el sustrato que desencadena la expresión de estas permeasas. Sin embargo, debe ser un mecanismo similar al descrito anteriormente para la regulación de la expresión de transportadores de glucosa.

Por otro lado, se ha estudiado ampliamente la participación de Grr1 en la regulación del ciclo celular, donde se ha descrito que ubiquitina las ciclinas de fase G1 (Cln1, Cln2 y Cln3) y permite su degradación lo que ocasiona el bloqueo de la célula en fase G1, proceso mediado por una respuesta a feromonas. El

bloqueo en la fase G1 del ciclo celular permite la sincronización de células y su posterior fusión durante el apareamiento (44).

La proteína cinasa reguladora de la meiosis, Ime2, es degradada por ubiquitinación dependiente de SCF^{Grr1} en presencia de glucosa, lo que permite la replicación meiótica del ADN (27). Este mecanismo es un punto de regulación cuando *S. cerevisia*, después de aparearse, decide entrar a meiosis o mitosis en función de la concentración de glucosa en el medio.

SCF^{Grr1} también está implicado en la regulación de la morfogénesis. Después de la activación de MEN (Mitosis Exit Network) Grr1p se acumula en el anillo contráctil durante la citocinesis para cumplir con la degradación de Hof1p. La degradación de Hof1p permite la activación del anillo contráctil de actinmiosina durante la citocinesis (54). Además, la degradación de Gic2p dependiente de SCF^{Grr1} permite la correcta polarización del citoesqueleto en la gemación. Aparentemente Gic2 es fosforilado por Cdc42-GTP lo que permite su ubiquitinación (55).

Adicionalmente Grr1 está implicado en la regulación de la vía señalización retrograda (via RTG) participando en la degradación de la proteína Mks1.

En resumen, Grr1p participa regulando la inducción transcripcional de genes relacionados con el metabolismo de glucosa y aminoácidos; además participa en la regulación del ciclo celular, meiosis y morfogénesis aunque en estos eventos la regulación no es directamente transcripcional.

1.7.2 El sistema de ubiquitinación en *Neurospora crassa*

En el hongo filamentos *N. crassa* sólo se han caracterizado dos proteínas F-box; éstas presentan dominios de interacción con el sustrato tipo WD40: SCON2 y FWD1 (49, 50). SCON2 presenta seis repetidos WD40 mientras que FWD1 presenta siete repetidos WD40. A pesar de que ambas son proteínas semejantes respecto a sus dominios estructurales, participan en procesos fisiológicos muy diferentes.

SCON2, es homóloga de la proteína F-Box Met30p de *S. cerevisiae*, participa en la regulación del metabolismo de azufre. El sistema regulador del metabolismo de azufre consiste en un grupo de genes estructurales regulados por azufre y que están bajo el control del regulador positivo Cys3 y reguladores negativos (SCON2). Cuando *N. crassa* crece en condiciones limitantes de azufre se expresan los genes estructurales que codifican: arilsulfatasa, colina sulfatasa, colina sulfato permeasa, metionina permeasa, sulfato permeasa I y II, y una proteasa extracelular (50). El sistema regulador de azufre monitorea la concentración de azufre celular y expresa los genes estructurales cuando es necesario asegurar una fuente intracelular adecuada de azufre. SCON2 interacciona con SCON3 (homólogo de Skp1) por medio de su motivo F-box formando un complejo SCF^{SCON2} que podría ejercer su función de regulador negativo por medio de la ubiquitinación (50). Aún no se conocen los sustratos de este complejo (ver tabla 3).

El complejo SCF^{FWD1} media la degradación de la proteína FRQ (FREQUENCY) estableciendo un mecanismo para la regulación del ciclo circadiano. Se sabe que

los niveles de expresión de FRQ alcanzan su máximo en presencia de luz. En contraste, la expresión de FRQ es nula en oscuridad; de esta forma se mantienen oscilaciones en las concentraciones intracelulares de FRQ sincronizadas con los periodos de luz-oscuridad. Para asegurar la estricta oscilación de la concentración FRQ se requiere de la ubiquitinación. Se han identificado tres proteínas cinasas que fosforilan a FRQ para permitir la interacción con SCF^{FWD1}. Estas cinasas incluyen a la casein cinasa I (CKI), CKII y una cinasa dependiente de Calcio/Calmodulina (CAMK-1) (49).

II. JUSTIFICACIÓN

La era postgenómica ha dado lugar al nacimiento de una nueva área de investigación que se refiere a la mutación sistemática de la gran cantidad de genes hipotéticos de los genomas secuenciados y la caracterización bioquímica de las mutantes obtenidas (area llamada genómica funcional). En este sentido, al caracterizar la función molecular de la proteína NFB1 se contribuye a ampliar el conocimiento de la biología celular y molecular de *N. crassa* y a conocer la función de uno de los muchos genes que no se les ha asignado alguna función comprobada en las anotaciones de la secuencia del genoma de *N. crassa*. El conocer los mecanismos moleculares de acción de las proteínas de *N. crassa* es importante debido a que este ha sido un organismo modelo en el que muchos mecanismos biológicos son extrapolables hacia el entendimiento de procesos básicos de la biología molecular de otros organismos.

III. HIPÓTESIS

Es posible predecir la participación de la F-box NFB1 como una subunidad de la ubiquitina ligasa SCF^{NFB1} putativa de *Neurospora crassa* mediante un análisis de la expresión de proteínas y un análisis bioinformático.

IV. OBJETIVOS

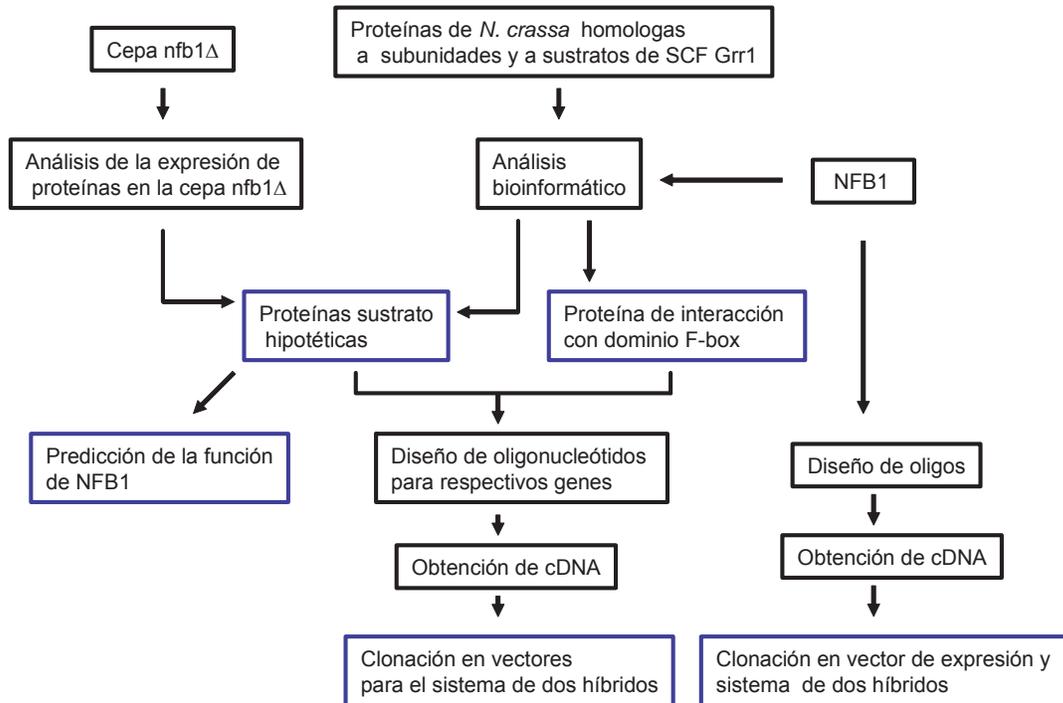
4.1 Objetivo General

Predecir la participación de la F-box NFB1 en la formación de una ubiquitina ligasa SCF^{NFB1} y su posible función.

4.2 Objetivos particulares

1. Analizar el efecto de la mutación del gen *nfb1* en la expresión de proteínas de la cepa *nfb1*Δ de *Neurospora crassa*.
2. Caracterizar los dominios de NFB1 importantes para la interacción con el complejo SCF y con los sustratos.
3. Predecir los sustratos potenciales de la ubiquitina ligasa SCF^{NFB1} putativa.
4. Generar un sistema para el estudio de la interacción entre el dominio F-box-Skp1/Ask1/SCON3 y la interacción entre NFB1-sustratos potenciales.

4.3 Estrategia experimental



V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Cepa	Organismo	Comentario/Genotipo	Referencia o fuente
74-OR23-1VA	<i>N. crassa</i>	Cepa tipo silvestre (wtA), mat A	FGSC#2489
74-ORS6a	<i>N. crassa</i>	Cepa tipo silvestre (wta), mat a	FGSC#4200
NFB1	<i>N. crassa</i>	$\Delta nfb1$, construida en 74-OR23-1VA	
DH5α	<i>E. coli</i>	Cepa para clonación. F ϕ 80/lacZ Δ M15 D(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r $_k^-$ m $_k^+$) deoR thi-1 phoA supE44 λ^- gyrA96 relA1	Invitrogen
TOP10	<i>E. coli</i>	Cepa para clonación. F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Δ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

JM109DE3	<i>E. coli</i>	Cepa para expresión. <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^qZ</i> Δ M15], IDE3
-----------------	----------------	---

Tabla 4. Características de las cepas utilizadas en los ensayos.

FGSC: Fungal Genetics Stock Center.

Plásmido	Organismo	Comentario
pCR [®] 2.1- TOPO [®]	<i>E. coli</i>	Plásmido para clonación
pCR [®] 4-TOPO [®]	<i>E. coli</i>	Plásmido para clonación
pTrc99a	<i>E. coli</i>	Plásmido de expresión. Promotor trc inducible con IPTG.
pACT2	<i>S. cerevisiae</i>	Plásmido para dos híbridos. Dominio de Activación
pAS2-1	<i>S. cerevisiae</i>	Plásmido para dos híbridos. Dominio de Unión aIDNA

Tabla 5. Plásmidos utilizados.

Oligo	Secuencia	Uso
NFB1-TRC-F sitio EcoRI	5'-GCTAG GAATTC CAC CAT CAC CAT CAC CAT GCCACACGGGGACGCGGCTCCCG-3'	Amplificación del gen nfb1 fusionado a seis histidinas, extremo 5'
NFB1-TRC-R sitio BamHI	5'-GCTAG GGATCC TATACAGACGCCCTCCACTGCC- 3'	Amplificación del gen nfb1, extremo 3'
FCLN ClnG1 sitio XhoI	5'-GCTAG CTCGAG TTACCTCACGTCACAACGACG-3'	Amplificación del gen ClnG1, extremo 5'
RCLN sitio NotI	5'-GCTAGG CGGCCG CTCAGTAAGTAACTTGAGACG-3'	Amplificación del gen ClnG1, extremo 3'

Tabla 6. Oligonucleotidos utilizados.

En rojo se muestra el sitio de restricción introducido al oligonucleótido. La secuencia mostrada en morado codifica para seis histidinas. La secuencia en negro ubicada hacia el lado derecho del sitio de restricción fue tomada a partir de la secuencia de los respectivos genes.

5.2 Medios de cultivo

Medio Vogel líquido. Sacarosa 1.5%, 1X sales de Vogel. (50 X sales de Vogel: citrato de sodio-5H₂O 150 g, KH₂PO₄ anhidro 250 g, NH₄NO₃ anhidro 100 g, MgSO₄-7 H₂O 10 g, CaCl₂-2H₂O 5g, solución de elementos traza 5 ml, solución de biotina (0.1 mg/ml) 2.5 ml. Lo anterior se afora a 1 L de H₂O. *Solución de elementos traza:* En 195 ml de agua destilada disolver: 5.0 g de ácido cítrico-1H₂O, 5.0 g ZnSO₄-7H₂O, 1.0 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂-6H₂O, 0.25 g CuSO₄,-5H₂O, 0.05 g MnSO₄-1H₂O, 0.05 g H₃BO₃ anhidro y 0.05 g Na₂MoO₄-2H₂O. (tomado del Fungal Genetic Stock Center – www.fgsc.net)

Medio LB. Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M. Si se requiere un medio sólido se adicionan 15 g/L de agar.

Medio M9ZB. Disolver 10 g triptona, 5 g NaCl en 889 ml de agua. Esterilizar, enfriar, y adicionar 100 ml de sales 10X M9, 1 ml de MgSO₄ 1M, y 10 ml de glucosa 40% (w/v). Conservar a temperatura ambiente ≤ 1 año. *Sales 10X M9:* 60 g Na₂HPO₄ (0.42M), 30 g KH₂PO₄ (0.24 M), 5 g NaCl (0.09M), 10 g NH₄Cl (0.19M), H₂O a 1 L. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH. Esterilizar y conservar a temperatura ambiente ≤ 6 meses.

5.3 Geles 2 dimensiones

Preparación de la muestra. En un matraz con medio Vogel líquido (75 ml) se inocularon conidias de *N. crassa* (silvestre wta y mutante nfb1Δ) a una concentración final de 1X10⁶ conidias/ml. El matraz se incubó a 28 °C, a 150 rpm durante 40 h. Se cosechó el micelio por filtración usando papel filtro. El micelio se

colocó en un frasco especial para homogeneizar, se adicionaron 10 ml de Tris-HCl 25 mM a un pH de 7.5, 100 μ l PMSF 200 mM, 100 μ l fenantrolina 200 mM y azida de sodio al 0.02% final. Se adicionó una tercera parte del volumen del frasco de perlas de vidrio y se dejó un espacio vacío de una tercera parte. La mezcla es sometida en el homogeneizador Braun a pulsos de homogeneizado de 50 segundos. El paso anterior es repetido hasta observar al microscopio la ruptura de la mayor parte del micelio. Fue rescatado el homogeneizado libre de perlas de vidrio. Se centrifugó a 3000 rpm, por 5 min. El sobrenadante fue colectado; este es el extracto total de proteínas. Se determinó la concentración de proteína en el extracto por el método Bradford. Antes de cargar el gel de la primera dimensión (Isoelectroenfoque) se mezclaron 50 μ l de muestra (1.6 mg de proteína total) con 50 μ l de amortiguador de lisis (2X: 2.4 g de urea, 120 μ l de anfolinas pH 3.5-10, 50 μ l de triton X100 20%, 50 μ l de β -mercaptoetanol, 1.7 ml de H₂O y 200 μ l de azul de bromofenol al 1%. Se mantiene a temperatura ambiente durante ~ 10 min.

Primera dimensión: gel de isoelectroenfoque (IEF).

Se preparó la siguiente solución: 5.5 g de urea, 1.33 ml de acrilamida:bis-acrilamida (30%:0.8%), 2 ml de triton X100, 1.95 ml de H₂O, 0.5 ml de anfolinas pH 3.5-10 ó pH 3-10, 7 μ l de TEMED, 10 μ l de persulfato de amonio 10%. La solución anterior se cargó en tubos de vidrio cerrados en un extremo con parafilm. Se llenaron hasta 1.7 cm debajo de su máxima capacidad. Se adicionó urea 9 M con la finalidad de emparejar el gel mientras polimeriza la acrilamida. Se retira la urea y el tubo se monta en la cámara para isoelectroenfoque (BIORAD). Se adicionó amortiguador de lisis al tubo y se realizó una "preelectroforesis" a 200 V

15 min, 300 V 30 min y 400 V 30 min. Se adicionó la muestra previamente preparada y se realiza la electroforesis a 350 V 16 h y 800 V 1 h. El compartimiento inferior de la cámara de IEF se llena con H_3PO_4 10 mM y el superior NaOH 20 mM como amortiguador.

Preparación del gel de IEF para la segunda dimensión. Se retiró el gel aplicando presión en un extremo del tubo. El gel fue colocado en 5 ml de amortiguador de equilibrio (3 ml de glicerol, 1.5 ml de β -mercaptoetanol, 6.9 ml de SDS 10%, 7.5 ml de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8. Lo anterior se afora a 30 ml y se conserva a 4 °C. Se tomó 5 ml de la solución y se adicionó 10 μl de azul de bromofenol 0.1%. El gel se mantuvo en esta solución durante 1 h.

Gel SDS-PAGE (segunda dimensión): Fueron preparados dos geles SDS-PAGE a una concentración de acrilamida de 10 % del gel separador (20 ml de acrilamida:bisacrilamida 30%:0.8%, 15 ml de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 6 ml de 1% SDS, 16 ml H_2O , 50 μl de TEMED, 3 ml de 0.75 % persulfato de amonio) y el gel concentrador a 4.5 % de acrilamida (3 ml de acrilamida:bisacrilamida 30%:0.8%, 5 ml de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 2 ml de 1% SDS, 9 ml de H_2O , 1 ml de 0.75% persulfato de amonio y 22 μl de TEMED).

El gel de IEF, después de ser equilibrado, fue colocado sobre el gel SDS-PAGE. Este es fijado con agarosa al 0.7 % (en 5 mM Tris-HCl pH 6.8). La electroforesis se corrió a 90 V. Los geles fueron teñidos con azul de commasie.

5.4 Análisis Bioinformático

Los alineamientos de secuencias de aminoácidos y descripción de dominios fueron realizados en una PC 3.2 GHz pentium 4/linux mandriva, 80 GB de memoria. Todas las secuencias de aminoácidos fueron utilizadas en el formato FASTA.

Las proteínas de interés (NFB1, Cln2p, Ime2p, SCON3) se sometieron a un BLAST en el Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI-www.ncbi.nlm.nih.gov/) contra PDB (Protein Data Bank). Las proteínas que presentan homología con NFB1 fueron seleccionadas y sometidas a un alineamiento en el programa CLUSTALX 1.82. Se eliminó la mayoría de las secuencias dejando solo las necesarias que permitieran observar definido el dominio F-box y el dominio LRR. Además se seleccionó solo las de estrecha relación con el presente trabajo.

Las proteínas Cln2p, Ime2p y Hof1p fueron sometidas primeramente a un BLAST contra el genoma de *N. crassa*. Las respectivas proteínas homologas fueron usadas para realizar un BLAST contra el PDB. Posteriormente las proteínas con homología fueron alineadas en CLUSTALX 1.82.

Edición de los alineamientos

El archivo en formato clus (formato de salida del alineamiento en CLUSTALX) fue transformado en formato blc. Este último fue introducido al programa Alscript 2.03 (34) para indicar los residuos conservados, estructura secundaria, dominio PEST y los sitios potenciales de fosforilación (33).

EL dominio PEST fue definido analizando las secuencias en el programa PESTfind (32) (<http://www.at.embnnet.org/embnnet/tools/bio/PESTfind/>).

Modelado estructural del dominio LRR de NFB1.

5.5 Obtención de células competentes de E.coli-Método de calcio

La cepa de *E. coli* se inoculó en un tubo con 3 ml de LB. Se incubó toda la noche a 37 °C a 150-200 rpm. Se tomaron 1.6 ml del cultivo anterior para inocular un matraz con 250 ml de medio LB . Fue incubado hasta que el cultivo alcanzó una absorbencia (A_{600}) entre 0.6-1.0, aproximadamente a las 5 horas. El cultivo fue enfriado en hielo. Se centrifugó a 3000 g, 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y resuspendió la pastilla en 25 ml de CaCl_2 0.1 M previamente enfriado en hielo. Centrifugar a 3000 g, 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y resuspendió en 4 ml de una solución de CaCl_2 0.1 M y 15 % (w/v). Se hicieron alicuotas de 100 μl . Fueron congeladas con N_2 líquido y almacenadas a -70 °C.

5.6 Obtención de células electrocompetentes de E. coli

La cepa de *E. coli* se inoculó un tubo con 3 ml de LB. Se tomaron los 3 ml para inocular en un matraz con 250 ml de medio LB. Se incubó a 37°C con agitación continúa hasta alcanzar una absorbencia A_{600} entre 0.6 y 1.0. Se incubó 15 a 30 min en hielo. Centrifugar a 4000 g por 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 500 ml de agua desionizada esteril de baja

conductividad. Se centrifugó a 4000g 15 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 250 ml de H₂O desionizada esteril de baja conductividad. Se centrifugó como se indica anteriormente. Fue desechado el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml de glicerol 15 % (w/v). Se centrifugó a 4000 g por 15 min a 4 °C. Se resuspendió en 2 ml de glicerol al 15 %. Se hicieron alícuotas de 100 µl, fueron congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -70 °C.

5.7 Extracción de RNA

RNA de micelio

Para la extracción de RNA se realizó un cultivo de *N. crassa* en medio vogel's. Se incubó toda la noche a 28 °C. Se recuperó el micelio por filtración y se pulverizó en un mortero usando Nitrógeno líquido. Se pesaron solo 100 mg. La extracción de RNA se realizó según las especificaciones del kit RNeasy® Mini – QIAGEN.

RNA de E. coli

Para la extracción de RNA se tomaron 2 ml de cultivo, de la cinética de expresión de 6HisNFB1 en TOP10 y JM109. Se centrifugaron las células del cultivo durante 1 minuto a 10000 rpm. Fue eliminado el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1 ml de amortiguador de "protoplasting" (15 mM Tris-HCl pH8.0, 0.45 M sacarosa, 8 mM EDTA), se adicionó 80 µl de lizozima (50 mg/ml) e incubó 15 min en hielo. Los protoplastos fueron centrifugados durante 1 min a 10000 rpm. Fue eliminado el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 µl de amortiguador de lisis (10 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM NaCl, 1 mM citrato de

sodio, 1.5 % (w/v) SDS), se adicionaron 6µl de DEPC, se mezcló y se incubó 5 minutos a 37 °C y posteriormente se pasó al hielo. Se adicionaron 100 µl de NaCl saturado, se mezcló en incubó durante 10 minutos en hielo. Se centrifugó 10 min a 14000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos. Fue adicionado a cada tubo 600 µl de etanol 100% a -20°C y se dejó precipitando 30 min a -20°C. Se centrifugó 15 min a 14000 rpm. Se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se centrifugó a 14000 rpm por 5min. Se secó la pastilla y se resuspendió en 50 µl de TE_{10/1} cuando fue necesario proceder con la remoción del DNA, en caso contrario se resuspendió en agua desionizada estéril tratada con DEPC. .

5.8 Remoción del DNA contaminante en extracciones de RNA

EL RNA es resuspendido en 50 µl TE_{10/1} pH 7.9. Adicionar 50 µl de la siguiente mezcla: 20 nM MgCl₂, 2 mM DTT, 8 U DNaseI libre de RNasa, 10 mM Tris-HCl pH7.9, 1mM EDTA. Incubar a 37 °C durante 30 minutos. Parar la reacción con 25 µl de una solución 50 mM EDTA, 1.5 M acetato de potasio, 1% (w/v) SDS. Realizar extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) seguido de una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Adicionar 325 µl de etanol 100 % y precipitar 15 minutos en hielo. Centrifugar 15 minutos a 14000 RPM. Resuspender en 50 µl de agua tratada con DEPC.

5.9 Obtención de cDNA por RT-PCR

Se mezcló 1 μ l de oligo reverso (2 μ M) específico, 3 μ g de RNA total, 1 μ l de dNTPs 10 mM cada uno, completar con agua desionizada estéril a un volumen final de 12 μ l. Calentar la mezcla a 65 °C durante 5 minutos y rápidamente poner en hielo. Adicionar 4 μ l 5X bufer de cadena sencilla, 2 μ l de 100 mM DTT, 1 μ l de inhibidor de RNasa (40 U/ μ l). Incubar a 37 °C durante 2 minutos. Adicionar 0.5 μ l de “M-MLVReverse Transcriptase” (200 U/ μ l) o “Expand Reverse Transcriptase” (50 U/ μ l). Incubar 50 minutos a 37 °C para M-MLVRT y 100 minutos a 37 °C para Expand RT. El cDNA obtenido se usa como templado para amplificación en PCR.

5.10 PCR

Fueron adicionados los siguientes componentes a un tubo de reacción de PCR a un volumen de reacción final de 50 μ l: 5 μ l 10X bufer de PCR (Invitrogene), 1.5 μ l de 50 mM MgCl₂, 1 μ l de 10 mM dNTPs, 1 μ l de primer directo (10 μ M), 1 μ l de primer reverso (10 μ M), 0.4-1 μ l de Taq DNA polimerasa, 2 μ l de cDNA de la reacción de RT-PCR o DNA genómico. Condiciones de amplificación: 2 min 94 °C (desnaturalización), 30 s 94 °C, 30 S 60 °C, 2.5 min 72 °C (30 ciclos) , 7 min 72 °C (extensión).

5.11 Clonaciones y subclonaciones

Los productos de amplificación del cDNA por PCR de los genes *nfb1his* y *clnG1* fueron ligados en el vector de clonación pCR[®]4.0-TOPO y pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogene) respectivamente. Las ligaciones fueron usadas para transformar células competentes de la cepa DH5 α . Se realizó extracción del plásmido de las células transformantes. Se verificó la presencia del gen insertado por medio de digestiones con EcoRI. La correcta amplificación y ligación del gen fue confirmada por secuenciación. La ligación de *nfb1-his* en TOPO 4.0 fue nombrada pCR4-*nfb1his*. La construcción pCR4-*nfb1his* fue digerida con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Invitrogen), el fragmento liberado fue ligado usando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen) en marco de lectura abierto en el vector pTrc99a en los sitios EcoRI y BamHI (figura 11). De igual forma el gen *nfb1his* fue ligado en el vector de dos híbridos pAS2-1 (dominio de unión al DNA) en los sitios EcoRI y BamHI (figura 10).

La plasmido pCR2-1-*clnG1* fue digerido con XhoI (NEBiolabs) para liberar el gen *clnG1*. Paralelamente pACT2 se cortó con XhoI (NEBiolabs). Ambos productos fueron purificados (ver sección de la purificación) y ligados usando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogene) (figuras 14a y 14 b).

5.12 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Método de filtración. Se coloca la banda de interés del gel de agarosa. Se tritura el fragmento de agarosa con un bisturí. Se depositan los fragmentos de agarosa en un cono de membrana HVPL 025 00 de Millipore, previamente humedecido con TE_{10/1}, montado sobre un tubo eppendorf de 1.5 ml cortado a la mitad y perforado en el fondo. Centrifugar por 2 min a 5000 RPM. Adicionar un volumen de TE_{10/1} con 0.1 % de SDS. Centrifugar nuevamente por 2 min a 5000 RPM. El filtrado colectado se precipita con 0.2 M de NaCl (concentración final) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Colectar el precipitado por centrifugación a 12000 RPM por 10 min. Lavar el precipitado con etanol 70 %, y resuspender en 20 µl de TE_{10/1}.

5.13 Miniprep

Crece las cepas transformantes de E. coli en 3 ml de LB adicionado con 100 µg/ml de carbenicilina a 37 °C durante toda la noche. Centrifugar por 1 min a 10000 RPM. Se resuspende la pastilla en 100 µl de solución Birnboim I. Reposar por 5 min y adicionar 200 µl de solución Birnboim II preparada al momento de usarse. Agitar suavemente por inversión. Reposar 5 minutos. Adicionar 150 µl de Birnboim III. Agitar fuertemente. Centrifugar a 12000 RPM durante 5 min. Recuperar el sobrenadante. Como paso opcional se puede aplicar una extracción con 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Agregar al sobrenadante 1 volumen de isopropanol o 2 volúmenes de etanol frío. Incubar por unos minutos a -

20 °C. Centrifugar a 12000 RPM por 10 min. Lavar la pastilla con etanol 70% frío. Centrifugar a 12000 RPM a temperatura por 5 min. Secar la pastilla y resuspender en 50 µl de TE_{10/1}.

5.14 Maxiprep

Se crece la cepa transformante de E. coli en 50 ml de LB (100 µg/ml de carbenicilina) a 37 °C durante toda la noche. Centrifugar por 10 min a 6000 rpm a 4 °C. Eliminar el sobrenadante. Se resuspende la pastilla en la solución Birnboim I. Reposar por 5 minutos. Se adiciona 10 ml de solución Birnboim II y se agita por inversión. Reposar 5 minutos. Adicionar 7.5 ml de solución Birnboim III. Agitar en vortex. Reposar 5 min. Centrifugar a 6000 rpm a 4 °C por 10 min. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo. Adicionar al sobrenadante un volumen de isopropanol. Incubar 20 min a -20 °C. Centrifugar a 6000 rpm a temperatura ambiente por 10 min. Eliminar el sobrenadante. Agregar un volumen de etanol al 70 % frío, agitar en vortex y centrifugar a 6000 rpm a temperatura ambiente por 5 min. Eliminar el sobrenadante y dejar secar la pastilla. Resuspender la pastilla en 200 µl de amortiguador TE_{10/0.1}.

5.15 Limpieza de plásmidos para secuenciación

Se adiciona 200 µl de H₂O_{dd} al plásmido obtenido por miniprep (100-200 µl). Se realiza una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8.0. Centrifugar 4 min. a 1000 rpm. Colectar fase acuosa y transferir a un tubo

ependorf nuevo. Realizar una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para eliminar el exceso de fenol. Se centrifuga a 4 min a 10000 rpm. La fase acuosa es colectada en un tubo ependorf nuevo. Se adiciona acetado de potasio a un concentración final de 0.3 M y 1 volumen de isopropanol frío. Permitir que precipite el DNA. Se centrifuga a 14 000 rpm durante 10 min. Se desecha el sobrenadante y se seca la pastilla. La pastilla fue resuspendida en 30 μ l de H₂O_{dd}. La muestra es dializada por 40 minutos usando membranas vs-0.25 μ m (MILLIPORE®).

Fue usado el programa Modeller 8v1 (<http://salilab.org/modeller/modeller.html>). Las cordenadas tridimensionales de referencia fueron tomadas del modelo estructural del dominio LRR de Grr1 (35).

5.16 Ensayos de expresión

Células químicocompetentes de TOP10 y JM109DE3 de *E. coli* fueron transformadas con la construcción pTrc99A-nfb1his (figura 13). La cepa con la construcción de expresión fue inoculada en 3 ml de medio *M9ZB-Amp* (100 μ g/ml) e incubada a 37 °C toda la noche con agitación constante a 125 rpm. De este cultivo fue transferido 1 ml a 100 ml de medio *M9ZB-Amp*(100 μ g/ml). Se incubó el cultivo de 100 ml a 37 °C y con una agitación constante de 125 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm (D.O. ₆₀₀) entre 0.6 a 1.0. En este punto se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM. A partir de entonces se colectó alícuotas de 15 ml a diferentes tiempos de inducción. Las muestras fueron

centrifugadas a 3000 g durante 8 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se conservó la pastilla de células a -70 °C. La pastilla de células fue descongelada y resuspendida en 2 ml de amortiguador MCAC-0 (20 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mM PMSF). Fueron adicionados 0.02 ml de 10% (v/v) Triton X-100 (final 0.1 %). Las muestras fueron sometidas a ciclos de congelamiento a -70 °C y descongelado a temperatura ambiente hasta que se observó la ruptura de las células, esto se detectó cuando la muestra tomaron una consistencia viscosa. Se adicionaron 1M MgCl₂ a una concentración final de 10 mM y 5 µl de DNasa I (Boehringer Mannheim). Se mezcló y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue colectado (fracción soluble) y conservado a -70 °C, para un posterior análisis por SDS-PAGE. Los restos celulares (fracción insoluble) fueron resuspendidos en 0.5 ml de amortiguador MCAC pH 7.9.

5.17 Geles SDS-PAGE para análisis de expresión de 6XHisNFB1

Gel separador 8.0%: 3.2 ml de acrilamida:bisacrilamida (30%;0.8%), 5.62 ml de H₂Odd, 3.0 ml de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 120 µl de 10% SDS, 60 µl de 10% persulfato de amonio, 6 µl de TEMED.

Gel concentrador 4.0%: 0.39 ml de acrilamida:bisacrilamida (30%;0.8%), 1.83 ml de H₂Odd, 0.75 ml de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 30 µl de 10% (w/v) SDS, 15 µl de 10 % persulfato de amonio y 3 µl de TEMED.

Preparación de la muestra: Las muestras de las fracciones solubles e insolubles

se mezclaron con el amortiguador de muestra (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoetanol y 0.025% (w/v) de azul de bromofenol) en una proporción 1:3 y 1:4 (muestra:muestra) respectivamente. Las muestras fueron calentadas en baño de agua a 95 °C por 5 min. De las muestras de fracciones soluble e insoluble se cargaron 25 μ l y 10 μ l respectivamente en el gel SDS-PAGE. La electroforesis fue corrida a 25 mA durante ~ 2.5 h. El gel fue teñido con azul de coomassie.

VI. RESULTADOS

6.1 Análisis de la expresión de proteínas dependiente de la mutación de *nfb1* por electroforesis bidimensional

Suponiendo que NFB1 participe en la ubiquitinación de algunos sustratos en *N. crassa*, en la mutante *nfb1* Δ se acumularán los sustratos que en condiciones normales interaccionan con NFB1. Siguiendo este supuesto, se procedió a realizar geles de acrilamida en doble dimensión para estudiar la expresión de proteínas en *nfb1* Δ .

En el análisis de los geles bidimensionales se observó que existe expresión de proteínas en *nfb1* Δ que no se expresan en la cepa silvestre (WT-A). Sólo la proteína 1a-1b (pM ~130 kDa) conserva su expresión diferencial en A como en B (figura 6). En el gel A se observan otras dos proteínas que se expresan en *nfb1* Δ ,

éstas son: 2a, 3a de un peso molecular aproximado a 40 y 30 kDa, respectivamente. En el gel B se observa la expresión de otras tres proteínas en *nfb1Δ*: 2b, 3b y 4b de un peso molecular aproximado de 50, 24 y 27 kDa, respectivamente.

Las bandas de las proteínas expresadas diferencialmente fueron cortadas para fines de secuenciación. No fue posible purificarlas a partir del gel.

En la tabla 7 se hace un análisis de las proteínas hipotéticas de *N. crassa* homologas a SCF^{Grr1}. Se estimó el pI y PM de las proteínas sustrato hipotéticas mediante el servidor expasy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Este análisis es de gran utilidad para hacer una correlación entre las proteínas observadas en los geles bidimensionales y las proteínas sustrato hipotéticas. Posiblemente la proteína de *N. crassa* NCU10905.2/Hof1p (pI:9.06/PM:127.42 kDa) corresponde a la proteína 1a-1b (~130 kDa). No es posible precisar el pI de 1a-1b, sin embargo, es claro que éste se encuentra hacia el extremo básico; por otro lado, el pM aparente es de 130 kDa. Estas características hacen a esta proteína un buen candidato como sustrato de SCF^{NFB1}. Otra proteína de interés es la 2b (PM: 50 kDa, pI en el pH ácido) debido a que la proteína de *N. crassa* NCU02114.2/CInG1 (pI:5.78/PM:46.25kDa) presenta coordenadas aproximadas a 2b.

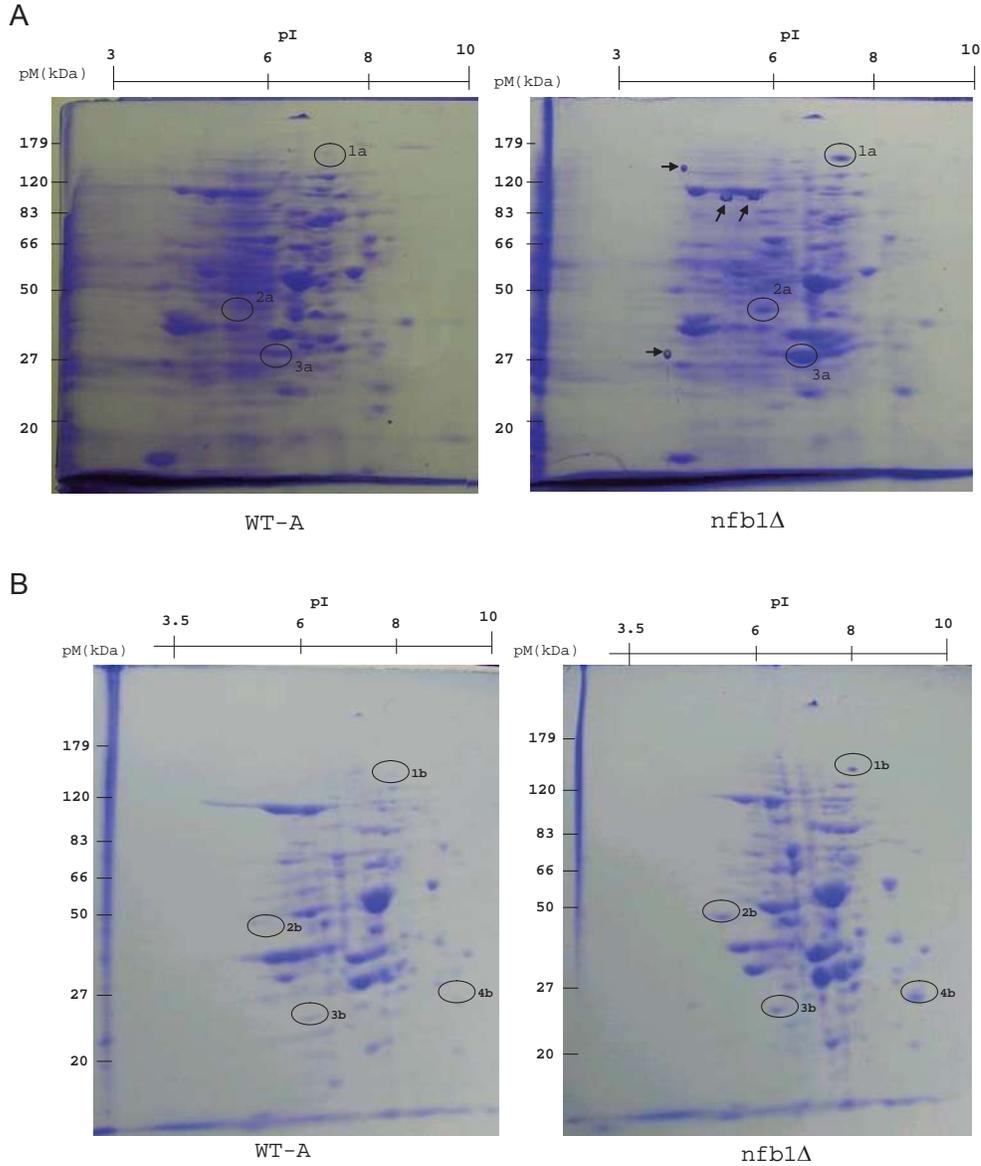


Figura 6. Análisis de la expresión de proteínas dependiente de *nfb1* por geles bidimensionales.

A) Se indican en óvalos las manchas de proteínas que solo se presentan en *nfb1* Δ pero no en WT-A. Las flechas indican la presencia de burbujas de aire en el gel *nfb1* Δ . Primera dimensión obtenida por CA-IEF (gradiente de pH 3-10) y segunda dimensión SDS-PAGE (acrilamida 10 %). **B)** Duplicado del experimento (gradiente de pH 3.5-10). La mancha 1a-1b se reproduce en ambos geles, presenta un pM aparente de 130 kDa. Marcador de peso molecular BenchMark preteñido (Invitrogene): el peso molecular (pM) aparente. El pI asignado en la parte superior no es el verdadero, sólo es una aproximación de como ésta distribuido el gradiente de pH. La metodología empleada no genera gradientes de pH lineales.

6.2 Comparación funcional entre el complejo SCF^{Grr1} y el complejo hipotético SCF^{NFB1}

Como se puede observar en la tabla 4, en el genoma de *N. crassa* existen todos los homólogos a la ubiquitina ligasa E3s SCF^{Grr1}. También se puede ver que en *N. crassa* no se encontraron homólogos de los sustratos de SCF^{Grr1} cuya degradación se induce por glucosa y sustratos que participan en la morfogénesis, por ejemplo Mth1p, Gis4p y Gic2p.

Las proteínas sustrato a SCF^{NFB1} hipotéticas encontradas en *N. crassa* (NCU02114.2, NCU01498.2 y NCU10905.2) presentan homología a Cln2p, Ime2p y Hof1p, respectivamente. Además se buscaron los homólogos de NCU02114.2, NCU01498.2 y NCU10905.2 en otros organismos y se encuentran genes con funciones redundantes a las encontradas en *S. cerevisiae* (ver tabla 7).

Tabla 7. Se muestra un análisis de las proteínas homologas de *N. crassa* a las proteínas que componen el complejo SCF^{Grr1} y los respectivos sustratos.

Genes de <i>S. cerevisiae</i>	Funcion	Homologo en <i>N. crassa</i> ¹	Valor e	pI/PM ²	Homologos de <i>N. crassa</i> (BLASTP ³)	Valor e
Componentes del complejo SCF^{Grr1}						
Skp1	Adaptador entre F-box y Cdc53 (Subunidad del complejo SCF).	NCU08991.2 (Scon3)	9.49e-16	4.38/14.31KDa	SkpA- <i>A.fumigatus</i> (XP_754026.1) Skp1-Humano	9e-35 2e-23
Cdc53(Cul1)	Componente SCF	NCU05204.2	0.0	7.61/88.46KDa	CulA- <i>A.fumigatus</i> (XP_752666.1) Subunidad de SCF Cul1-Humano (NP_003583.1) Subunidad de SCF	0.0 0.0
		NCU02498.2	0.0	6.78/96.20KDa	CulC- <i>A.fumigatus</i> (XP_750711.1) Cul3-Humano (NP_003581.1) Subunidad SPOP E3s ubiquitina-ligasa.	0.0 6e-132
Cdc34(E2)	Enzima Conjugadora de Ubiquitina	NCU01188.2	0.0	4.32/29.13KDa	Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 (UVC) (XP_753719.1)	2e-46
Rbx1(Hrtp)	Proteína con motivo RING finger	NCU06224.2	4.85e-37	8.45/13.16 KDa	HrtA- <i>A.fumigatus</i> (XP_754053.1) Rbx1-Humano (NP_055063.1)	2e-52 2e-50
Grr1	F-box	NFB1(NCU01216.2)	0.0	5.91/85.13 KDa	Grr1p- <i>S.cerevisiae</i> FBXL2-Humano(NP_036289.1)	1e-92 7e-31
Sustratos blanco del complejo SCF^{Grr1}						
Cln2	Activa la cinasa Cdc28p para promover la transición de G1 a S	NCU02114.2	1.46e-14	5.78/46.25KDa	Ciclina de G1- <i>A.fumigatus</i> (XP_749524.1) Ciclina de G1- <i>C.albicans</i> (XP_714756.1)	1e-107 5e-50
Ime2	Serina/Treonina proteína cinasa implicada en la activación de la meiosis	NCU01498.2	0.0	9.57/87.38KDa	(XP_755646)Serina/Treonina proteína cinasa reguladora de meiosis- <i>A.fumigatus</i> (NP_032268)Serina/Treonina cinasa implicada en la espermatogenesis. <i>Rattus norvegicus</i>	0.0 1e-64
Hof1	Citocinesis, contracción de anillo de actinmiosina	NCU10905.2	1.02e-12	9.06/127.42KDa	Fosfoproteina(XP_754594) Componente del anillo contractile, proteína de union al citoesqueleto, citocinesis. Cdc15(CAF06117.1)- <i>S.pombe</i> Reorganización de la F-actina durante la cotocinesis.	2e-53 2e-40
Gal2	Transportador de Galactosa	NCU01633.2	0.0	6.67/57.9	XP_755484.1 Transportador de Hexosa MFS (<i>A.fumigatus</i>)	5e-169
Gic2	Polarización del citoesqueleto al final de G1	No encontrado				
Mth1	Represor de genes HXT	No encontrado				

¹ Tomado de <http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>

² Análisis hecho en http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

³ Blast realizado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

6.3 Alineamiento de proteínas F-box y modelado estructural de los LRRs de NFB1

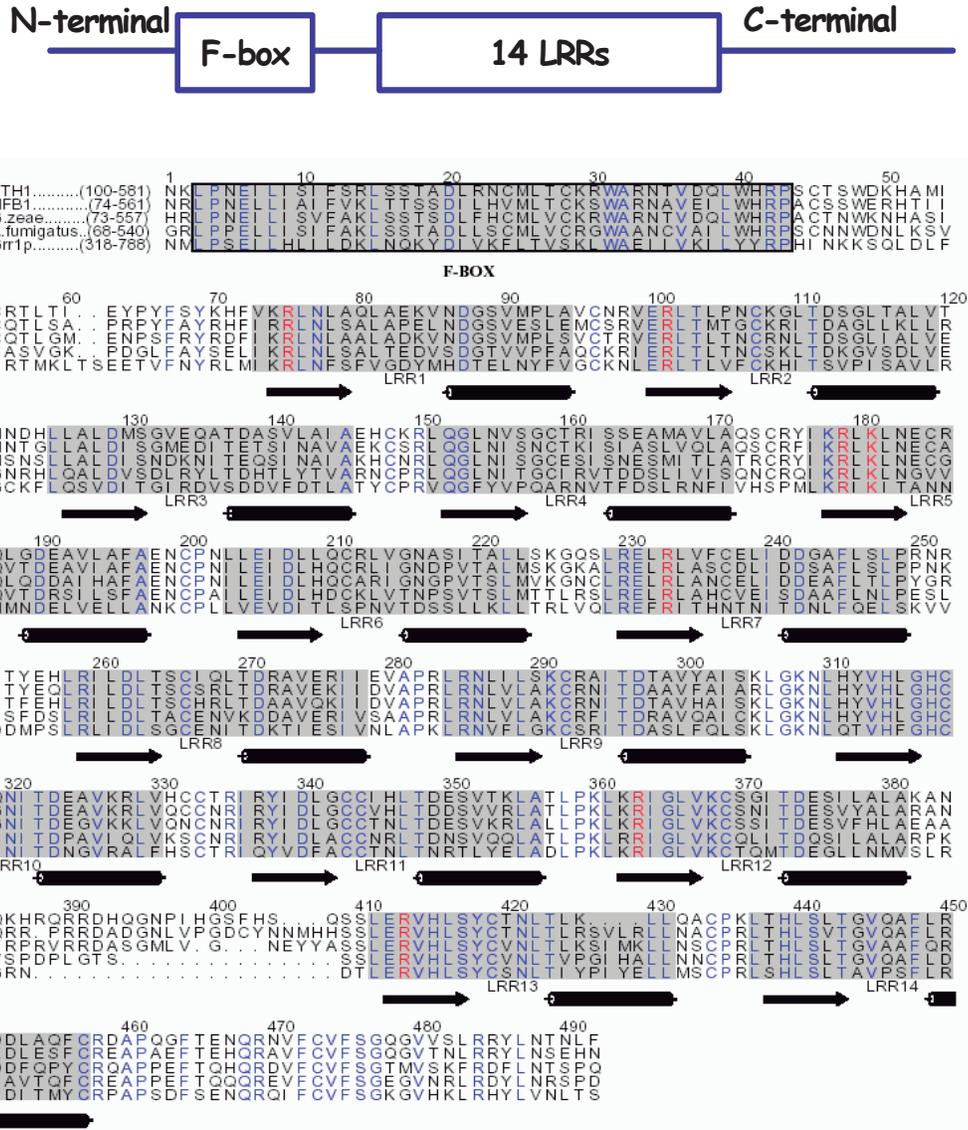
El alineamiento de la región central de la proteína NFB1 con sus homólogas revela la presencia del dominio F-box localizado en el residuo 76 al 117. Asimismo se describe la existencia de 14 LRR (figura 7).

El análisis estructural de NFB1 revela que cada LRR presenta una secuencia conservada repetitiva (figura 8-A). Estructuralmente cada LRR está formado por una laminilla β seguida de una hélice α . Entre una lámina β y una hélice α existen cinco residuos en promedio que forman una hebra. Todas las laminillas β se disponen hacia la superficie cóncava de la estructura, hacia la superficie convexa se ubican todas las hélices α formando una estructura de “herradura”. Debido a que las laminillas β de los LRR son ricas en residuos básicos (H, K y R) forman la superficie cóncava de carácter catiónico importante para la interacción con sustratos fosforilados (35) (ver figura 8).

El LRR 12 de NFB1 presenta una inserción de 22 residuos ausente en levaduras (proteína Grr1p y otras no mostradas en la figura 7). Esta inserción podría tener un efecto importante en la estructura lo cual pueda contribuir para la interacción con las proteínas blanco, ya que los sustratos potenciales considerados para la interacción con NFB1 muestran a la vez un dominio diferente de fosforilación. La proteína NFB1 puede ser dividida en cuatro regiones: 1) el extremo N-terminal (residuo 1-73), 2) el dominio F-box (residuo 76-117), 3) 14 LRRs (residuo 144-531) y 4) C-terminal (residuo ~557-783). Los extremos N-terminal y C-terminal de

NFB1 pueden ser importantes para la localización subcelular. Por ejemplo, en Grr1p hacia el N-terminal se encuentran dos señales de localización nuclear (NLS)(54). NFB1 no presenta esta NLS hacia el N-terminal; es importante mencionar que hacia el N-terminal y el C-terminal NFB1 no presenta homología con Grr1. Para realizar un análisis mas completo de la presencia de algún NLS en NFB1, la secuencia se analizó en los programas NucPred (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>) y LOctree (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/loctree/query>). El resultado mostró que no existe ninguna NLS en NFB1.

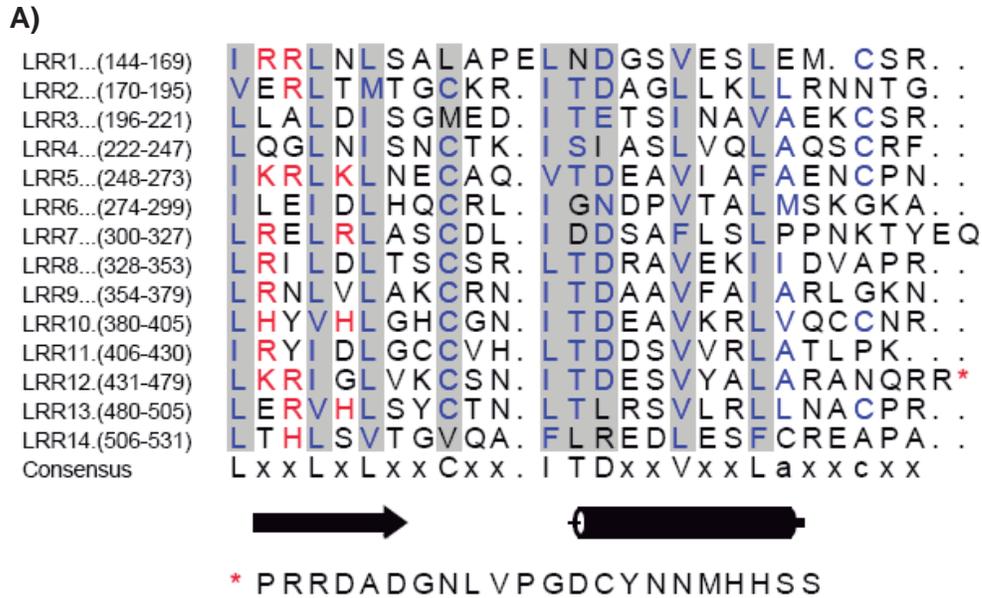
A)



B)

Figura 7. Alineamiento del dominio F-box+LRRs.

A) Esquema de la distribución de los dominios de NFB1. B) Se cortó el N-terminal y C-terminal a todas las secuencias. De azul se muestran los residuos que se conservan en un 100 %. Los residuos mostrados en rojo (residuos con carácter básicos) son esenciales para la interacción con los sustratos fosforilados (residuos con carácter aniónico). Se observa que después de LRR 12 las proteínas de hongos filamentosos presentan una inserción de aminoácidos ausente en *S. cerevisiae*. PTH1 (*M. grisea*), NFB1 (*N. crassa*) y Grr1 (*S. cerevisiae*). Los números de acceso son NFB1: NCU01216.2 en <http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>, Grr1 : NP_012623 (NCBI), *G. zeae*: EAA69726 (NCBI) y *A. fumigatus*: EAL88309 (NCBI). La flecha indica una lámina β y el cilindro indica una hélice. La figura fue realizada en Alscript 2.03 (34).



B)

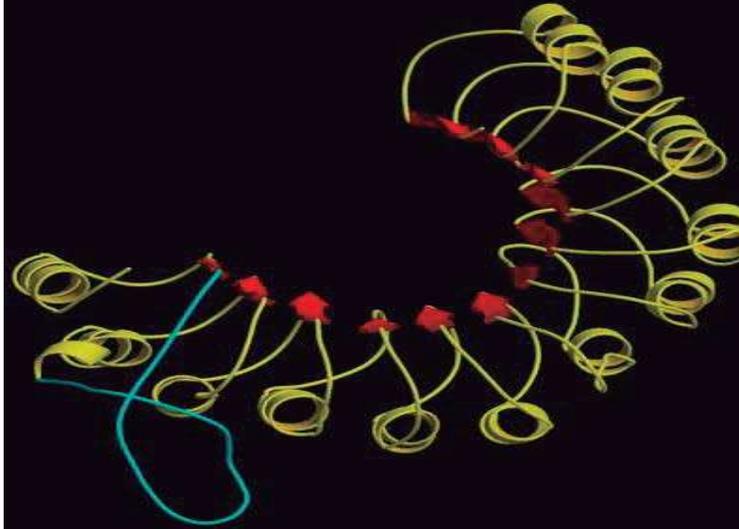


Figura 8. Análisis estructural del dominio LRR de NFB1.

A) Alineamiento de LRRs de NFB1 (LRR1-LRR14) Abajo de los LRRs se muestra la estructura secundaria. La flecha indica una lámina β y el cilindro indica una hélice. Cada LRR consta de la siguiente disposición: laminilla β -hebra-helice α -hebra. El LRR 12 presenta una hebra larga, la secuencia se indica por el asterisco rojo. Las laminillas β son segmentos ricos en residuos H, K y R (básicos). B) Modelado de LRR2 a LRR13 de NFB1. La longitud del

fragmento modelado es del residuo 170 a residuo 505. La estructura del dominio LRR presenta una forma de herradura de caballo. La superficie catiónica concava, formada por 12 laminillas β , es responsable de la interacción con los sustratos fosforilados (35). Las 12 helices α se disponen hacia la superficie convexa. En rojo: laminillas β , amarillo: helices α y hebras, cian: hebra larga del LRR 12.

6.4 Predicción de la interacción del dominio F-box de NFB1

Un ensayo determinante en la comprobación experimental de que NFB1 forma parte de un complejo ubiquitina ligasa SCF es probar la interacción entre la caja F-box y la proteína adaptadora de *N. crassa* llamada SCON3. En este sentido, uno de los objetivos del presente trabajo es generar un sistema para estudiar las interacciones entre la caja F-box de NFB1 y la proteína adaptadora al complejo SCF.

Debido a que antes de que se iniciara el análisis bioinformático no se tenía información sobre SCON3 y además a que en el Instituto de Biotecnología del IBT (UNAM) el Dr. Mario Rocha había clonado a un homólogo de Skp1 de *A. thaliana* llamado ASK1 en el vector para el sistema de dos híbridos pACTII AD (ver mas adelante en los resultados de clonación), se decidió usar a ASK1 para probar la interacción con NFB1 y no con SCON3 como era de esperarse. Ver mas adelante resultados de clonación de NFB1 en el vector de dos híbridos pAS2-1.

En la figura 9 se muestra un alineamiento de los homólogos de ASK1. Dentro de los homólogos se encuentra la proteína SCON3. Se puede observar que son proteínas muy conservadas. El dominio de SCON3/ASK1/Skp1 importante para la interacción con la caja F-box es el extremo C-terminal indicado por el rectángulo

en la figura 9 (25). Esto aumenta las posibilidades de interacción entre ASK1 y NFB1 usando la técnica de dos híbridos.

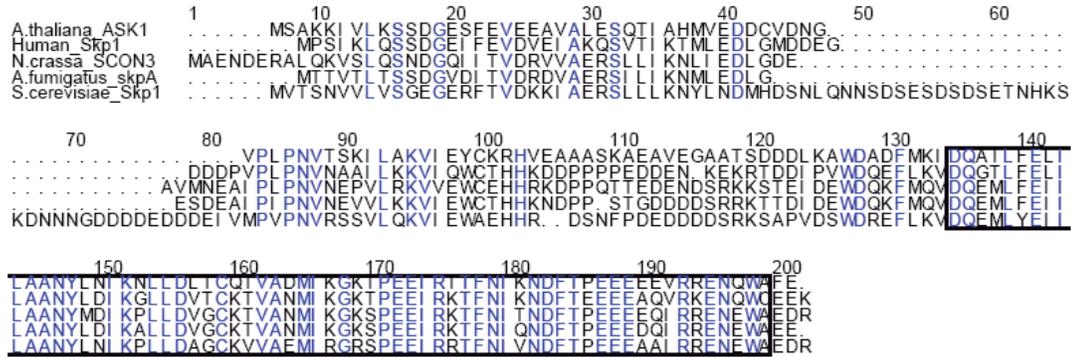


Figura 9. Alineamiento de proteínas homólogas a ASK1.

El alineamiento muestra una alta homología entre ASK1 (NP_565123/160aa) con SCON3 (NCU08991.2/172aa) y además con las otras proteínas. Los residuos dentro del rectángulo son los importantes para la interacción con la caja F-Box (25). El dominio N-terminal es el responsable de la interacción con la Cullina 1 (95). La figura fue realizada en Alscript 2.03 (34).

6.5 Sustratos potenciales para la interacción con NFB1

Para definir los sustratos potenciales de interacción con NFB1 se realizaron alineamientos de algunas proteínas de *N. crassa* descritas en la tabla 4; principalmente las homólogas de los sustratos de SCF^{Grr1} y aquellas que muestran correlación con los resultados del análisis de la expresión diferencial de proteínas en la mutante *nfb1Δ* (figura 6). Dentro de este grupo de proteínas se seleccionó a NCU02114.2/Cln2p (417 aa), NCU01498.2/Ime2p (795 aa) y NCU10905.2/Hof1p (1148 aa), las cuales en algunas figuras se les asignó el nombre CLNG1, IME2, y HOF1, respectivamente. Dado que estas aún son proteínas hipotéticas no les hemos asignado un nombre definitivo. En las anotaciones de la secuencia del

genoma de *N. crassa* los números de acceso basados en la nomenclatura NCUXXXXX.X es para referirse a los genes. Sin embargo, en el presente trabajo en algunas figuras la nomenclatura NCUXXXXX.X se utiliza para designar a las respectivas proteínas. Para obtener pruebas adicionales de que los sustratos seleccionados pueden ser susceptibles a ubiquitinación por el complejo ubiquitina ligasa hipotético SCF^{NFB1} se procedió a realizar una búsqueda de dominios y sitios importantes para la ubiquitinación en estas proteínas. En este sentido se buscaron secuencias PEST y sitios de fosforilación.

En la figura 10 se muestra el alineamiento de las proteínas homólogas a la ciclina hipotética de fase G1 del ciclo celular (NCU02114.2/Cln2p). Las proteínas analizadas presentan mayor homología en el dominio ciclina. Se encontraron dos secuencias PEST en la proteína NCU02114.2/Cln2p: una hacia el extremo N-terminal ubicada en los residuos 7-22 y otra cerca de los sitios de fosforilación ubicada en los residuos 197-220. Los sitios potenciales de fosforilación se encuentran en los residuos treonina 227, treonina 244, treonina 248 y treonina 271. Las cilcinas de levadura (Cln1p, Cln2p y otras no mostradas) presentan una disposición diferente del PEST y los sitios de fosforilación, los cuales se ha comprobado experimentalmente que son esenciales para la interacción con Grr1p(74). □

La proteína NCU01498.2/Ime2p fue alineada con algunas homologas (figura 11). No se incluyeron las secuencias de levaduras dado que al igual como sucede con el alineamiento de las cilcinas, la proteína Ime2 sólo presenta homología hacia el extremo N-terminal (dominio serina treonina cinasa) y también presenta una secuencia PEST diferente (27). NCU011498.2/Ime2p presenta dos secuencias

PEST: una posicionada en los residuos 382-393 y otra en los residuos 687-703. Los sitios potenciales susceptibles a ser fosforilados son: la treonina 734, serina 736 y treonina 772.

Por último la proteína NCU10905.2/Hof1p de *N. crassa* fue alineada con las respectivas homólogas (figura 12). Se encontró sólo una secuencia PEST en la proteína NCU10905.2/Hof1p ubicada en los residuos 349-362. Los sitios potenciales de fosforilación encontrados son: serina 357, treonina 387, serina 606, serina 661, treonina 800, serina 881, serina 890 y serina 916.

En las anotaciones del genoma de *N. crassa* (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) la región del extremo C-terminal de NCU10905.2/Hof1p esta definida como un dominio tipo SH3 (del Ingles Src homology 3) dicho dominio participa en la transducción de señales relacionadas con la organización del citoesqueleto. El dominio es definido en base al programa Pfam (108)

En todos los casos los sitios de fosforilación hipotéticos encontrados están definidos por motivos -X-T-P-X- o -X-S-P-X- . Estas regiones se encuentran conservadas en hongos filamentosos (figuras 10, 11 y 12). Se observó que las proteínas de levaduras solo presentan homología con las secuencias de hongos filamentosos en determinados dominios diferentes a las secuencias PEST y sitios de fosforilación por lo que las proteínas de levaduras no son mostradas en los alineamientos de IME2 y HOF1. Esto nos lleva a suponer que estas proteínas pueden tener una función bioquímica semejante a sus homologas en *S. cerevisiae* (Cln2p, Cln1p, Cln3p, Ime2p y Hof1p) pero estas muy probablemente son reguladas por cinasas no relacionadas en homología.

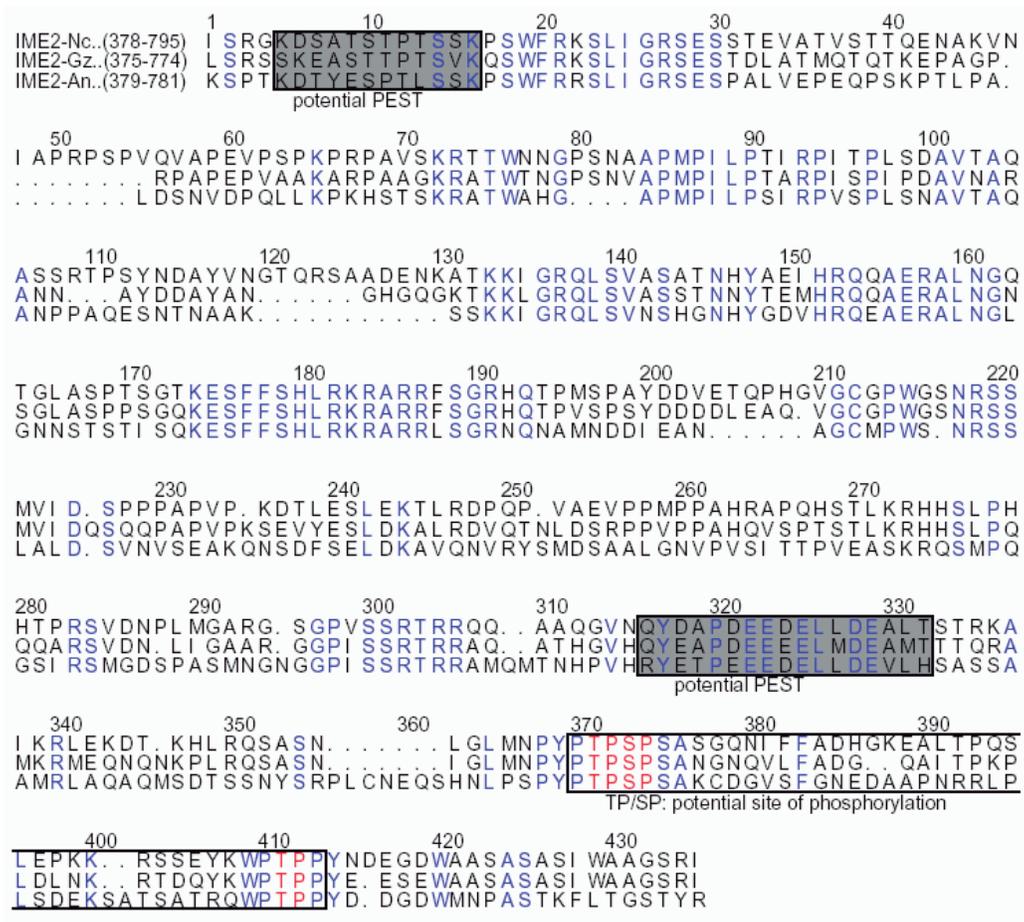


Figura 11. Alineamiento de homólogos a Ime2p.

Sólo se muestra el alineamiento de la región del extremo C-terminal dado que aquí es donde se encuentran las secuencias PEST (mostradas en rectángulos grises) y los sitios potenciales de fosforilación (residuos de color rojo). IME2-Nc=NCU01498.2, IME2-Gz= XP_384594.1, IME2-An=XP_663847.1. La figura fue construida en Alscript 2.03 (34). La figura fue construida en Alscript 2.03 (34).

```

      1          10          20          30          40
BAE57730.1/Ao  MPGT VADGPTVAMSFANNFWGKDDAGVGPMLERMHTAKVSCDELKT
AN4963.2/An    MPGT VSEGPTVALSFANNFWGKDDAGVAPMLERMQA AKLSCDELKT
NCU10905.2/Nc  ML AATSEAPAVALSFANNFWGKDDAGVQPLLERMSAAKTTCDELKS
EAQ84961.1/Cg  MPATI SDAPAVALSFANNFWGKDDAGVPPLLERMHN AKQT CDEL RN

      50          60          70          80          90          100
FYN-----|RAAI EEEYARKLLALCRKPLGSTE LGS
WYN-----|RAAI EEEYARKLLTL CRKPLGAHETGS
FYT GMPQEREDSTWNLGKGLGTNTLTTYTTA RAKI EEEFSRQLLNL SRKSLGSQETGT
FYG-----V RASI EEEYARKLMSL SRKALGSQETGT

      110          120          130          140          150          160
LRSSF DVV RGET EAI AKAHGAI AGQMKR ELEEPL VAFAGGSKERRKI I QTGI ERL LKT
LRESF DTVRAET EAI AKAHAAI AGQMKR ELEEPL IAFAGGNKERRKI I QNGI ERI HKT
LKL SFDTVRQEVE SMGKQHQA I AVQMRSELEEPL VAFAGAMKERRKI VQNTVEKLLKV
LKTSL DVMRGEVEL MAKQHQQV AAQMKSELEEPL AAFAGAMKERRKI VQNTVEKLLKT

      170          180          190          200          210          220
KMQQT QT VNKTRDRYE QDCLRI KGYLAQGHMVMGQEE RKNKAKLEKTQI QLASSSSEY
KMQQT HTVNK-----DCLRI KGYLAQGHMVMGQEE RKNKAKLEKTQI QLASSSSEY
KVQQT QAVNKTRDRYE QESLKI KGYLAQGHMVMGQEE RKNKAKLEKTQI SLASSNADY
KVQQT QQP-QTRDRYE QECLKI KGYLAQGHMVMGQEE RKNKAKLEKTQI SLATSNTEY

      230          240          250          260          270
EAAI KVL EETTGRWNK EWK SACDKF QDLE EERL DFTKSSLWAYANI ASTVCVSDDASC
DAAVKVLADTTERWNK EWK AACDKF QDLE EERI DFTKSSLWTYANI ASTVCVSDDASC
EAAVKAL EKT TARWNQ EWK AADKF QDLE EERL DFTKSSLWTFANI ASTVCVSDDASC
EAAVKAL EETTARWNR EWK AADKF QDLE EERL DFTSKSSLWTFANI ASTVCVSDDSSC

      280          290          300          310          320          330
EKI RLSLENCEVEKDI VYFI KERGTGQEI PDPPRFI NFCRGDI NDTSSSEVSEEE--DG
ERI RLSLENCEVEKDI I HFI KERGTGQEI PAAPKFI NFRGDVNDASSDVSEEE--EG
EKI RLSLEKMEVEKDI ATFI KEKGTGQEI PDPPKYI NFCRGDV-DAQSEI SVEPDSDA
EKI RLSLEKMEVEKDI YTFI KDKGTGQEI PDPPKYI NFCRGDI-DAQSEVSEED--DN

      340          350          360          370          380          390
FSVAQFQRTI NPAFRSSSPQPSIYESH HDPQSDLANQMAHNNPP-TPTSRETTVT P QK
YSVAQFQRTI NPAFRSSSPQPSIYESH HEAPP--VDLAQNGPS-TPSSREPTVPLQK
FSVAQFPRSI NPAFRSSSPQPSIYESH HDPNNALLKTLGHDI SVGVNGSRETTATPSK
YSVAQFPRSI NPAFRSSSPQPSIYESH HDPNSALARDLGHGDAP-AQQAREVAATPQK
potential PEST

      400          410          420          430          440          450
PTQ-----QPAPLDLRRGGQLP-----
PTQPPMQPPTQAPMQAPMQSPIQQQPPPLDFRRGGHLP-----
LPTI PAAALTMPPPQQQI EAPPPQQQQQQQQPAPPPQQQQQLVQQQRPQLQQRRTTQH
VPTI P-----QQNTQRSNAQN-----

      460          470          480          490          500          510
-----PNYDPSSEHGEI GSVPHNAYPTD-----
SLHEEQRRQQQVARAPQNTRAANNAEYDSTSTHI PHSPHPLDGMALLSRPPGPVSS
-----PNYDPSSEHGEI SAVPHNAYPTDGMTMFCRTGPPPSER

      520          530          540          550          560
SSGTTSGYRPSQDSSHSEVSNATSISSQEPSSARQSPKPI NGVAL-
DLDFNAAPSTSTNARPSRRGDKSSESTLEELQQQLLQSGPMSPVKQIQQQQPQTPQTP
-----PKGTSHHRP-----

      570          580          590          600          610          620
-----PGI GSGEVQPAQKKFFSNSPFRRKSRHDKDRNSGPSQLPSRRTW
LDLVPANGAQSDSASPEKKELPKRKS GFFANNSPFRRRSTKDLQQQATGSS-GSRQTW
-----AI PFRRKSTKEVAPTS-----RNTW

      630          640          650          660          670          680
DPSKQTTPI KAPTQPKPQQPQPPITKAADDI ARSASPEPVDPRANFQLNVGNVFDV
YGGQS GQSSSMGNRTPRTNASPTKENNTPLGI ERSVSPDPI AANASLALNI GGNVFAV
N-----PPAAHNNRPQLAAPPKESQNI I GPERSVSPDPI AANASLALNVGQNVFV

      690          700          710          720          730          740
ASPDKPKPTNGAEPANDGEDTDPI ARALADLKVAGKQS-----ATRVSS
DALDKRKGQQQQQQPAPDD-DPI ALAL AELKGVTSNTGNQSSTSRTEMNKQMSVRMS
ETPDRRK-----QDAGPATPED-DPI AMAL AELKGVTGKNGGS-----RMS

```

```

-----750-----760-----770-----780-----790-----800
ADRYHGI ATPVP-----APSSNYSSA-----S
ADHYHGI ATPAPPGAGGPPQOSGNVSPGGRNASSNSMHHSRNSNDL GL PPVI PGAGNGT S
ADHYHGI ATPAP-----GANPSRSMVPGNNNS-----VVAAG-----M

      810      820      830      840      850
VATPPPAYN-----DSSVKRLDAPQPAFTSAQMKTQKYTGQTHNMLR-----
VATPPPAYN-----DASVKRLDAPQPAFTSKQMKTQKYTGQTHNMLR-----
RATPPPSYDGMQGAMVPVSRRLGVPPPAVTSRAMKESQKFAQQTRSLFSNGGSASAGD
RGTPPPSYD-----QQTQIQRLGVPPPAVTSRAMKESQKFAQQTRSLFTASDRPNSGG

      860      870      880      890      900      910
--GSGNTSGLATRNRRAQS-DAPRARSP-TPRRSA$PQVN-----SPRVDTRMSQYSRG
--GKANPVSVSSRSRPRQSQEATRAP$PAAPRRSV$PQPQPQQPATRGESRMSQYSR-
QRSSSGSANYQSRSRGGSTEIPRAASPRPGSRAASPRPGSH--AAYGSSWSGNNA PD
-GGGGGYGSRPPTGRNSSSDIPRAV$P-AAQR$V$P$RPS$R--ASR-----HYPA

      920      930      940      950      960      970
PSRGP$PSPSTYQ-----SSSMRSRFSQSPTVSTP--PQRPADVAYS PHEYP R
--AASPNTSQYQ-----SSSVKSRHSQSPSVSTP--PQRPSDSPYSPHDFAK
DRGYR$ASPNPYGGSSN-----PGSMNSRHAHSQSMGPMGI PAQQQQPRRSDTQYTR
SPSHR$VSPAPYAGSQRGSVSQLSMSANKRGSDAAYYGGNSNSNNQSHNNSYNNSYNG

      980      990      1000      1010      1020      1030
RTSP-----
RSSASAAPSPTTTTAPRAPS$PKEFAKRSSQSSASRAASPQPQFKQQASVPRAVSPQPQ
HGSM DYRGSSSNMYQGGGGS-----
HRGSSSSAASPNE MARSTSP-----

      1040      1050      1060      1070      1080      1090
YRQQASAPRAVSPQPQYRQQASAPRAVSPQPQYRQQASAPRAVSPQPQYRQQTSI PRA
--GAVSPVDMARSVSPSPFTSGVNR-PGSSLDHTQNHMQLAHYGPGGGQGPDDGYTS
--APYSPRASAASPSPYGSTRGTAASP GPTGTYS PRGSMQDHSASGGGGPRPGSSMSM

      1100      1110      1120      1130      1140
-----NPMSRGVSPQPQFRQQARPSSAGGMELQLANQVDMYGG--DHGSP
VSPNDFAKRPSQNSMPRAVSPQPQFRQQARPSSAGGMELQLS-QPDMYGSSGDGYASP
GS-----SMRG--RYGTQSSRP--DRETMTGTRMSFYGD--GQMVP
GSRRGMDMAVQLAQVPSGGGGQGYGQQQRQQQQQEQQDDGYGGS MRGRHN--RSNTA

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
-RQAGKPGSFYDA-GSHRSR--SRSRTLAVADPGRQF SRDGRPI LHF-----A
QRESRRPMSYYDG-GSQRSR--SRSRMAVADPGRQF SRDGRPI LHF-----A
ASMMAGGGGT VHGRGRSRSVVDAARGGAPPGGGQGYTRDGRVI LHF DWANGHDETA
TSM$MRGMSLYEGA GPVQPVGSSRTRRSK$VAADPNRFT RDGRPI LHF-----A

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
RAMYSYTAAI PEEL GF TKGDVLSVI RL QDDGWWEAEVTTTTRGRTGLVPSNYLQI I
RALYSYTAAI PEEL GF QKGDVLSVI RL QDDGWWEAEVTTTTRLRTGLVPSNYLQI I
KAMYMYQAAI AEEL GF AKGDI LAVL RH QDDGWWEAEVHGGNGQVGLVPSNYLQVL
RALYMYQPAI PEEL GF AKGDVLSI LRHQDDGWWEAEVQGGAGQVGLVPSNYLQPC

```

Figura 12. Alineamiento de proteínas homologas a Hof1p.

La secuencia PEST se muestra en rectángulos grises el cual fue definido con el programa PESTfind. En rojo se muestran los residuos que son sitios potenciales de fosforilación definidos de acuerdo a un análisis en el programa NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Ao: *Aspergillus oryzae*, An: *Aspergillus nidulans*, Nc: *Neurospora crassa* y Cg: *Caetomium globosum*. La figura fue construida en Alscript 2.03 (34).

6.6 Generación de las herramientas moleculares para el estudio de la interacción entre NFB1 y los sustratos hipotéticos

El objetivo principal del presente trabajo es la predicción de la función molecular de la proteína NFB1 basado en el análisis bioinformático y el análisis de la expresión de proteínas en la cepa *nfb1Δ*. Una extensión del presente proyecto fue la generación de las herramientas para probar experimentalmente las interacciones entre NFB1 y los sustratos. Con este objetivo se decidió que una estrategia sería expresar la proteína NFB1 fusionada al péptido 6Xhis en un sistema heterólogo. Para posteriormente fijar la proteína a perlas de agarosa-niquel y mezclarlas con un extracto total de proteínas de *N. crassa*. Esto permitirá pescar las proteínas sustrato de NFB1 por interacción directa.

La segunda estrategia es usar el sistema de dos híbridos. Como se comentó anteriormente el gen ASK1/SCON3 clonado en el vector pACTII-AD fue donado por el Dr. Mario Rocha. Consecuentemente el gen NFB1 se clonó en el vector pAS2-1-BD. Además se decidió clonar el gen NCU02114.2/*clnG1* en el vector de dos híbridos pACTII-AD.

6.6.1 Clonación del gen *nfb1* en el vector de expresión pTrc99a

Primeramente se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el gen *nfb1*. En el oligonucleótido directo (extremo 5' del gen) se fusionó a la secuencia codificante de seis histidinas. La amplificación del gen se realizó a partir de ARN total por medio de RT-PCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados para insertar el cDNA en los sitios *EcoRI* y *BamHI* en el vector para expresión pTrc99A. No fue posible

clonar el cDNA de este modo. Por lo que se procedió a clonarlo usando el vector pCR4.0-TOPO generando la construcción pCR4.0-TOPO-nfb1his y posteriormente se subclonó en pTrc99A. El cDNA clonado en pCR4.0-TOPO fue secuenciado. La construcción resultante se nombró pTrc99A-nfb1his. Ésta fue analizada usando enzimas de restricción (figura 13-B, C). El gen nfb1 fusionado a la region codificante de seis histidinas (nfb1his) presenta un tamaño de 2.37 Kb y el vector pTrc99A de 4.2 Kb. La construcción pTrc99A-nfb1his (6.5 Kb) digerida con la enzima de restricción *SaI* genera un fragmento de 2.26 Kb (nfb1his) y otro de 4.23 Kb (plásmido)(carriles 11-19 de la figura 13-C). El gen nfb1his presenta un sitio de restricción *SaI* ubicado a ~100 Kb del extremo 5' y el segundo sitio *SaI* pertenece al vector pTrc99A ubicado en la región de clonación multiple. En la construcción quedó posicionado hacía el extremo 3'.

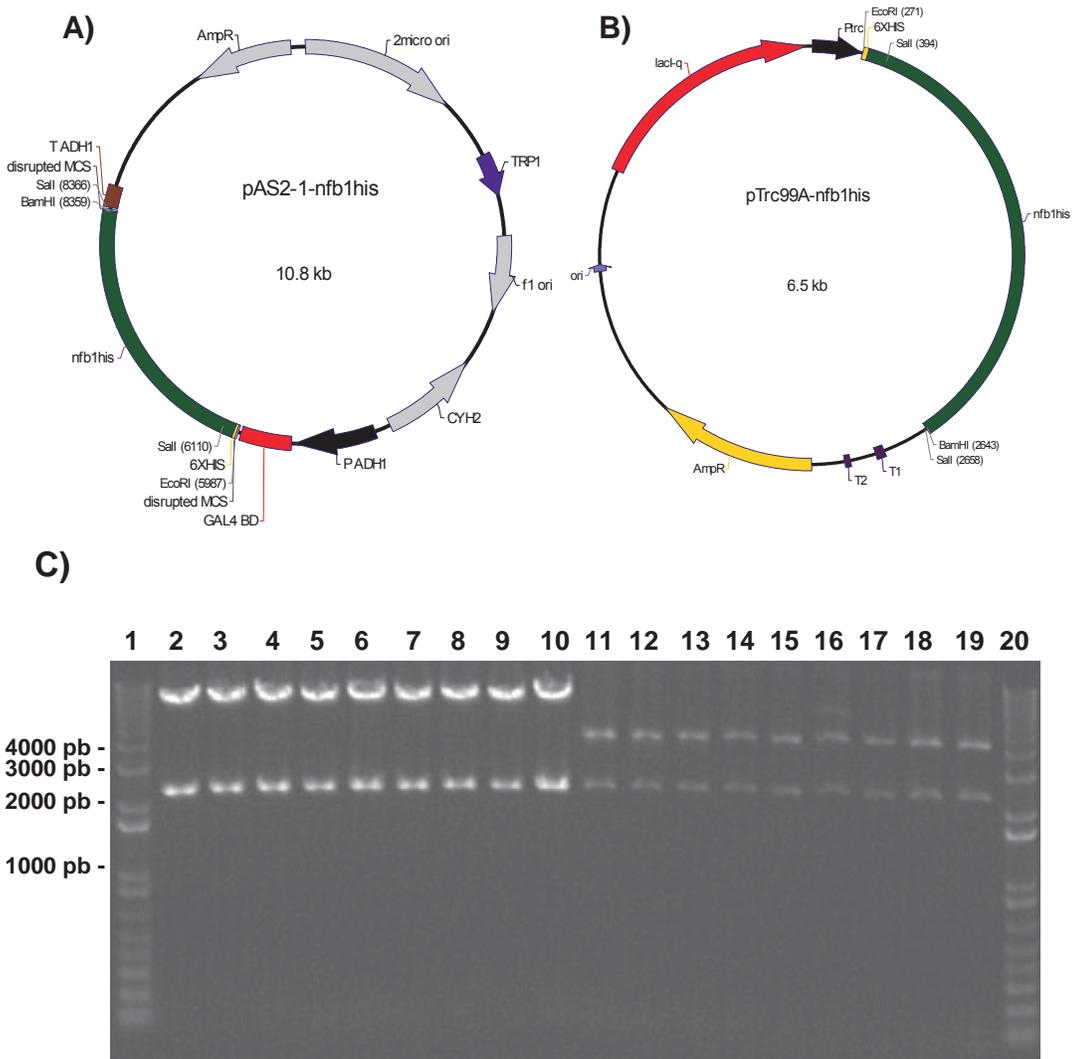


Figura 13. Descripción en la siguiente página.

Figura 13. Análisis de las construcciones pAS2-1-nfb1his y pTrc99A-nfb1his.

A) Construcción pAS2-1-nfb1his. El gen nfb1his tiene una longitud de 2.37 Kb. P ADH1: promotor de la enzima alcohol deshidrogenada 1, GAL4 BD : dominio de unión al DNA del regulador transcripcional GAL4, MCS: sitio de clonación múltiple, T ADH1: terminador transcripcional ADH1, AmpR: gen de resistencia a Ampicilina, 2 micro ori: origen de replicación de levadura llamado 2 micro, TRP1: gen de complementación de la auxotrofia a triptófano y f1 ori: origen de replicación bacteriano. B) Construcción pTrc99A-nfb1his. Ptrc: promotor trc, T1 y T2: terminadores transcripcionales, ori: origen de replicación bacteriano, lacI-q (*lacI^q*): gen que codifica para el operador *lac*. C) Digestiones con *Sa*I. En los carriles 2-10 se muestran las digestiones de las construcciones de pAS2-1-nfb1his y en los carriles 11-19 las digestiones de las construcciones de pTrc99a-nfb1his. Se usó Marcador de peso molecular 1 Kb plus y gel de agarosa al 0.8 %.

6.6.2 Clonación de *nfb1* en un vector de dos híbridos (pAS2-1)

Partiendo de la construcción pCR4.0-TOPO-*nfb1his*, se cortó el gen *nfb1his* con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. El gen fue ligado en el vector pAS2-1 usando los mismos sitios de restricción. La construcción obtenida fue nombrada pAS2-1-*nfb1his*. Se realizó un análisis de la construcción con la enzima *SaI* (figura 13 –A, C). *nfb1his* tiene un tamaño de 2.37 Kb. pAS2-1-*nfb1his* genera dos fragmentos(carriles 2-10 de la figura 13-C): uno de 2.26 pb (fragmento de *nfb1his*) y otro de 8.54 Kb (plásmido) . El gen *nfb1his* presenta un sitio de restricción *SaI* ubicado a 100 Kb del extremo 5´.

6.6.3 Clonación de NCU02114.1/*clnG1* en un vector de dos híbridos (pACT2)

Los oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia de NCU02114 reportada en las anotaciones del genoma de *N. crassa*. Se obtuvo el cDNA de NCU02114/*clnG1* por medio de RT-PCR a partir de RNA total de *N. crassa*. Primeramente se clonó en el vector pCR2.1-TOPO para tomar un sitio de restricción (*XhoI*) de la region de clonación multiple de este vector. LA construcción obtenida se nombró pCR2.1-TOPO-*clnG1*. Partiendo de ésta construcción *clnG1* fue subclonado en el vector pACT2 usando un único sitio de restricción (*XhoI*). Dando como resultado la construcción pACT2-*clnG1*. El gen NCU02114/*clnG1* clonado presenta una longitud de 1.3 Kb, el vector pACT2 tiene una longitud de 8.1 Kb y en total la construcción presenta una longitud de 9.4 Kb.

Las construcciones fueron analizadas usando enzimas de restricción (figura 14).

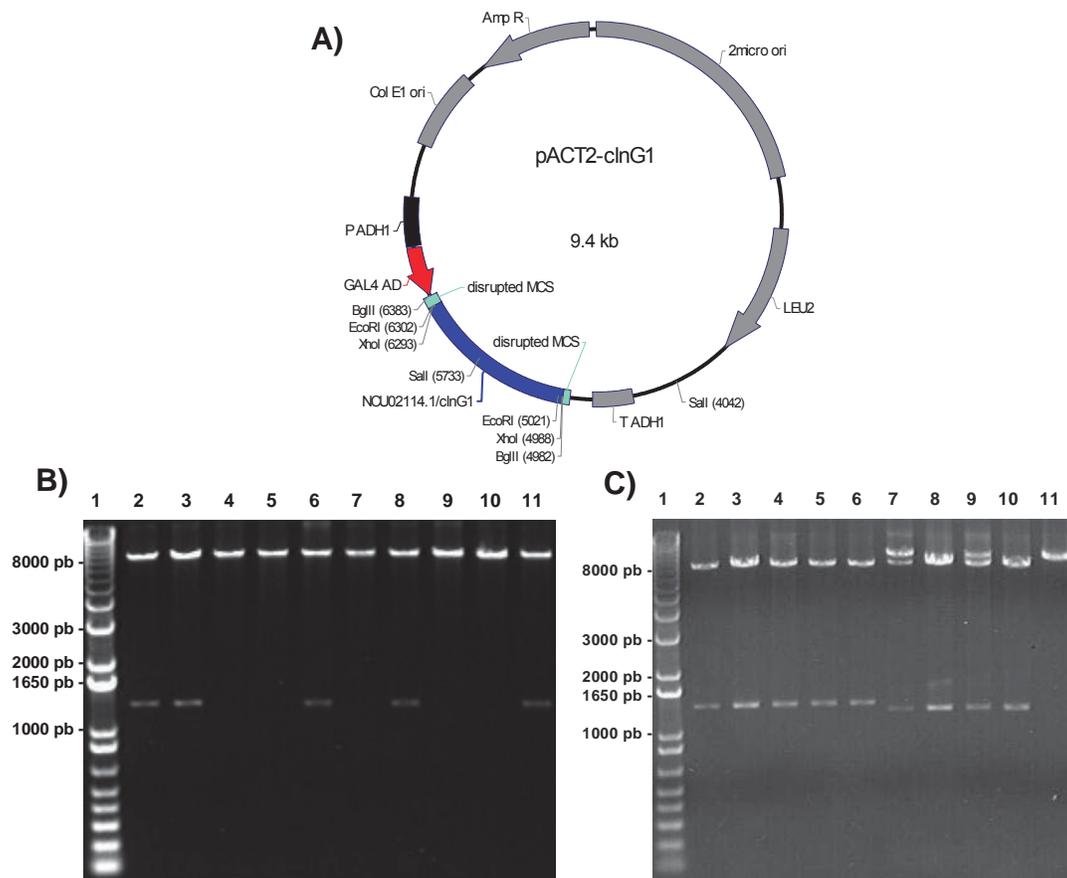


Figura 14. Análisis de la construcción pACT2-clnG1.

A) Construcción pACT2-clnG1. PADH1: promotor ADH1, GAL4 AD: activador transcripcional de GAL4, T ADH1: terminador transcripcional ADH1, LEU2: gen de complementación de la auxotrofia a leucina, Col E1 ori: origen de replicación bacteriano. B) Digestión de construcciones 2-11 de pACT2-clnG1 con XhoI. Se observa que sólo en los carriles 2, 3, 6, 8 y 11 existe liberación de un fragmento de 1.3 Kb. C) Digestión de las construcciones 2, 3, 6, 8 y 11 de pACT2-clnG1 con BglII (carriles 1-6 respectivamente) y EcoRI (carriles 7-11 respectivamente). Usando BglII se libera un fragmento de 1.4 Kb y usando EcoRI se libera uno de 1.3 Kb. Se usó gel de agarosa al 0.8 % y marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogene).

En la figura 14 se muestra que las construcciones 2, 6, 8 presentan un fragemento de DNA del correspondiente al tamaño de *clnG1*. Las construcciones obtenidas no han sido secuenciadas.

6.6.4 Expresión de HIS-NFB1

Los ensayos de expresión de NFB1 usando la construcción pTrc99A-nfb1his (ver materiales y métodos) mostraron que en los geles SDS-PAGE no existen diferencias en los patrones de expresión al nivel de donde se esperaba que migrara la proteína 6His-NFB1 (~84 kDa) (figura 15-A). Por otro lado para confirmar que las condiciones de inducción eran las adecuadas. El plasmido pTrcHis//*lacZ* (Invitrogene) se utilizó como control positivo. En el control positivo, se observó expresión de la β -galactosidasa (~120 kDa) al ser inducido con IPTG 1mM (ver figura 15-B). El plásmido control positivo es derivado del plásmido pTrc99A (manual de producto pTrcHis2- www.invitrogen.com).

Con la finalidad de saber si *nfb1his* se transcribe, se realizó un ensayo de RT-PCR (ver materiales y métodos) para detectar copias de RNAm durante la cinética de inducción de las mismas muestras analizadas en el gel de la figura 15. Se observa que en la condición, 7.5 h de inducción con IPTG, cepa TOP10 y plasmido pTrc99A-nfb1his-4, se detecta amplificación por RT-PCR del RNAm de *nfb1* (figuras 17, carril 5).

Debido a que se observó la transcripción del gen *nfb1* al tiempo 7.5 h de inducción, se repitió una cinética de inducción prolongando el tiempo de inducción

a 13 h (ver figura 16). No se observaron diferencias en los patrones de expresión que indiquen la presencia de 6His-NFB1.

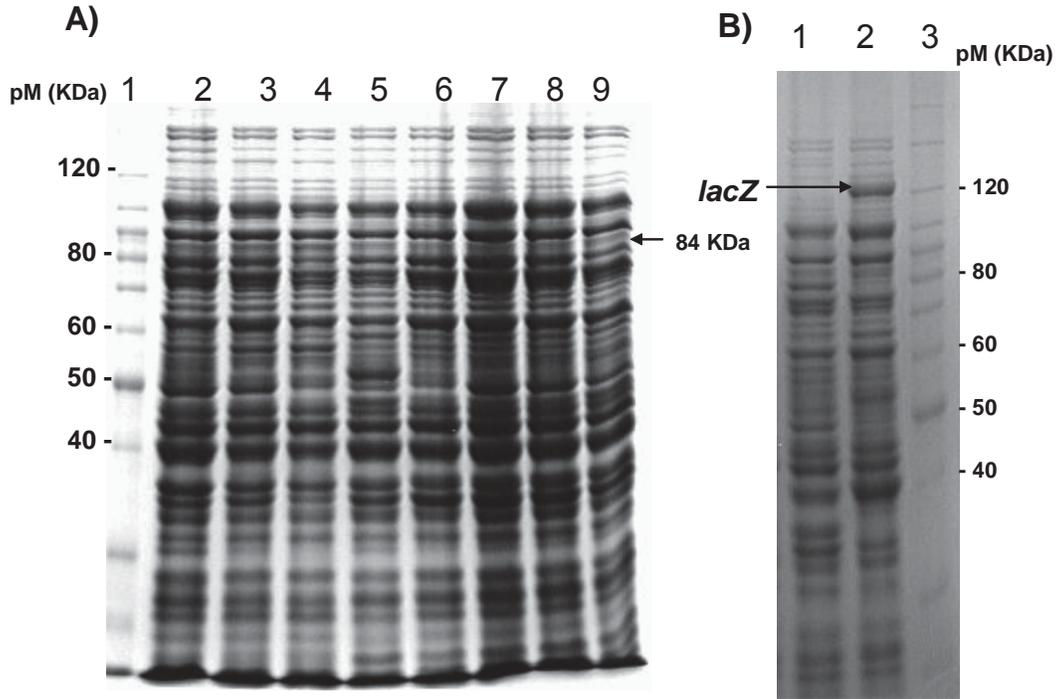


Figura 15. Cinética de expresión de 6HIS-NFB1.

A) Carril 2: control negativo (JM109DE3 transformada con pTrc99a- 6 horas de inducción), carriles 3 y 4: JM109DE3 transformada con pTrc99a-nfb1his-construcción 1 (3.5 y 6 horas de inducción respectivamente). Carril 5: control negativo (TOP10 transformada con pTrc99a - 7.5 horas de inducción). Carril 6 y 7 : TOP10 transformada con pTrc99a-nfb1his-construcción 1 (3.5 y 6 horas de inducción). Carril 8 y 9: TOP10 transformada con pTrc99a-nfb1his-construcción 4 (5 y 7.5 horas de inducción). La inducción en todos los casos se realizó con IPTG 1 mM. El marcador usado: Bench Mark protein ladder (Invitrogen). Acrilamida 8.0 %. Medio de cultivo M9ZB-Amp. No se observan bandas que indiquen la expresión de la proteína 6HIS-NFB1 (~84 kDa) B) Control positivo de expresión. Carril 1: TOP10 sin transformar crecida en medio M9ZB sin Amp, inducción con IPTG 1 mM durante 7 horas. Carril 2 : LacZ-pTrc (invitrogen) inducción con IPTG 1 mM durante 5.5 horas. Medio M9ZB-Amp. Se cargaron extractos totales. La β -galactosidasa es una proteína de un peso molecular aproximado de 120 kDa. Carril 3: marcador de peso molécula Bench Marck protein ladder (Invitrogen)

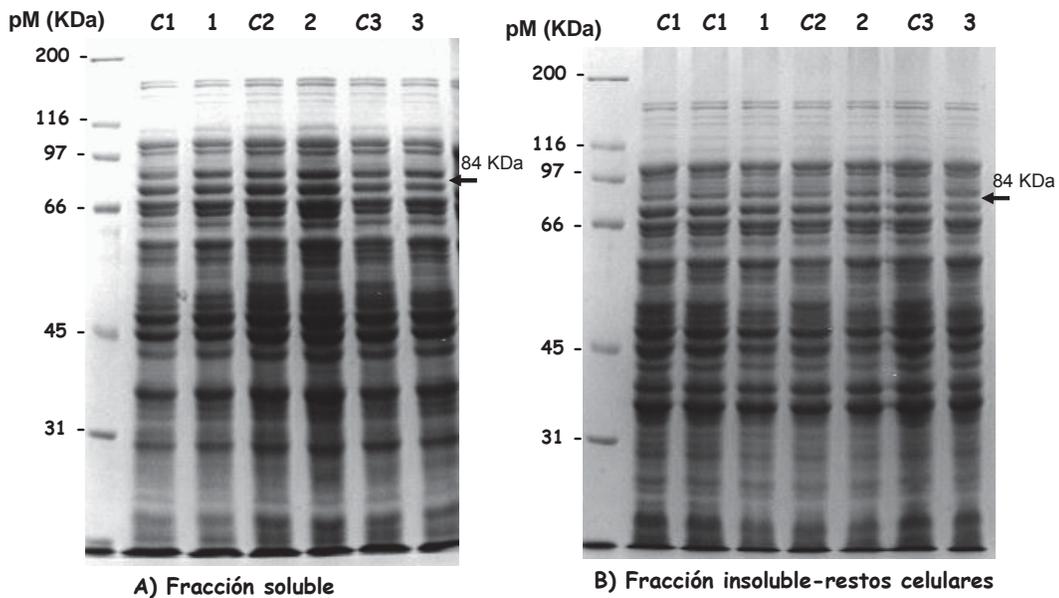


Figura 16. Geles SDS-PAGE acrilamida 8.0% para evaluar la expresión de la proteína NFB1.

A) Gel de muestras de fracción soluble. Carriles C1, C2 y C3: controles negativos (TOP10 transformada con pTrc99a) 6, 8 y 13 horas de inducción respectivamente. Carriles 1, 2 y 3 : TOP10 transformada con pTrc99a-nfb1his-construcción 4, 6, 8 y 13 horas de inducción. **B)** Gel de muestras de fracción insoluble. Carriles C1, C2 y C3: controles negativos (TOP10 transformada con pTrc99a) 6, 8 y 13 horas de inducción respectivamente. Carriles 1, 2 y 3: TOP10 transformada con pTrc99a-nfb1his-construcción 4. Marcador de peso molecular amplio rango (BIORAD). La inducción se realizó con IPTG 1 mM en todos los casos. Medio de cultivo M9ZB-Amp.

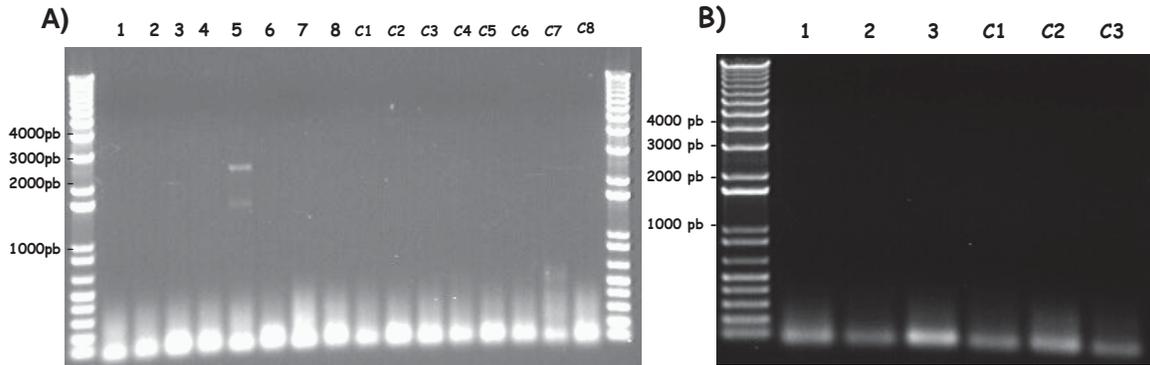


Figura 17. Análisis por medio de RT-PCR de la transcripción de *nfb1his* durante la cinética de inducción.

Se realizó extracción de RNA de cada uno de los tiempos de inducción (ver materiales y métodos). A) Carriles 1 y 2: TOP10 transformada con pTrc99a-*nfb1his*-construcción 1 (3.5 y 6 horas de inducción respectivamente). Carriles 3, 4 y 5: TOP10 transformada con pTrc99a-*nfb1his*-construcción 4 (2, 5 y 7.5 horas de inducción). Carriles 6, 7 y 8: TOP10 transformada con pTrc99a (2, 5 y 7.5 horas de inducción). Carriles C1 a C8 son los controles negativos correspondientes a cada uno de los carriles respectivamente. B) Carriles 1 y 2: JM109DE3 transformada con pTrc99a-*nfb1his*-construcción 1 (3.5 y 6 horas de inducción respectivamente). Carril 3: JM109DE3 transformada con pTrc99a (3.3 horas de inducción). Carriles C1 a C3 son los controles negativos de los respectivos carriles 1 a 3. El tratamiento de los controles negativos fue similar al de las reacciones de amplificación de interés, la única diferencia fue que en los controles no se adicionó Expand RT® (Bioheringer Manhein). Marcador de tamaño molecular: 1 kb plus DNA ladder (invitrogen). Gel agarosa 0.8 %.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Nfb1 podría participar en la regulación del apareamiento, ciclo celular y morfogénesis

Se ha utilizado la biología *in Sillico* para predecir la función molecular de una proteína F-box. Los resultados del análisis bioinformático son complementarios y consistentes con el análisis de la expresión de proteínas y la información bibliografía relacionada al complejo ubiquitina ligasa SCF^{Grr1}. Existe un reporte donde se ha predecido la interacción entre una F-box y un sustrato determinado mediante un análisis bioinformática semejante a lo que se realizó en el presente trabajo (49). Los resultados han permitido identificar a los sustratos potenciales de interacción con NFB1 y en base a esto es posible predecir su función molecular.

Las proteínas que se expresan diferencialmente en *nfb1*Δ (1a, 2a, 3a, 2b, 3b y 4b) podrían ser sustratos de SCF^{NFB1} que se acumulan en la célula por efecto de la mutación en *nfb1*. La otra posibilidad es que *nfb1* este ubiquitinando una proteína la cual reprime la transcripción de las proteínas expresadas. O bien, pueden ser proteínas en las que su expresión esta regulada por *nfb1* por un mecanismo diferente a la ubiquitinación. Las primeras dos suposiciones son mas consistentes con los resultados del análisis bioinformático. En la figura 7 y 8 se describió como

NFB1 presenta un dominio F-box y un dominio LRR presentes en una gran cantidad de complejos ubiquitina ligasa SCF. No se ha reportado ninguna proteína F-box que tenga una función diferente a la asociada con un complejo SCF.

La proteína designada como 1a de los geles bidimensionales, se expresa en los dos experimentos (figura 6). Además, se estima que tiene un peso molecular de de 130 kDa y un pI localizado hacia la región del pH básico. Ya habíamos comentado que esto coincide con las coordenadas de la proteína NCU10905/Hof1p (PM:127.4 kDa y pI: 9.06). Probablemente 1a sea NCU10905/Hof1p. En base a esto NCU10905/Hof1p puede ser considerada como un sustrato potencial de interacción con NFB1. Además el alineamiento de figura 12 y análisis del mismo, muestra que la proteína NCU10905/Hof1p presenta una secuencia PEST y dominio de fosforilación necesarios para la ubiquitinación. En la tabla 2 se puede observar, que sólo las proteínas sustrato reconocidas por dominios LRR presentan secuencias PEST. Consistente con esto, NFB1 presenta un dominio tipo LRR. Se describió que NCU10905 presenta un dominio SH3 hacia el extremo C-terminal, el cual esta relacionado con con la transducción de señales para la organización del citoesqueleto. En adición a esto, Hof1p de levadura participa permitiendo la formación del anillo contráctil al final de la citocinesis (54). Suponiendo que NCU10905/Hof1p participa en la organización del citoesqueleto y su función esta regulada por ubiquitinación dependiente de SCF^{NFB1} , entonces esto puede explicar por que la cepa mutante $nfb1\Delta$ no presenta hifas aereas.

Resultados complementarios a este trabajo muestran que la cepa mutante $nfb1$ es estéril cuando participa como femenina en los ensayos de apareamiento. En estos ensayos sólo se observa la formación de ascosporas cuando la mutante

nfb1 participa como donadora (célula masculina) sobre la cepa silvestre (femenina). Sin embargo, cuando actúa como receptora (femenina) no hay formación de ascosporas.

Haciendo una correlación de lo que ocurre en *S. cerevisiae* con lo anterior. En *S. cerevisiae* Grr1 participa regulando la respuesta a feromonas durante el apareamiento entre cepas A y α . SCFGrr1 ubiquitina las ciclinas de fase G1 (Cln1 y Cln2), lo que permite su degradación y que ambas células se detengan, en respuesta a las feromonas, en la fase G1 del ciclo celular y permitir la sincronización para la posterior fusión de las células (44). Existen otros factores que influyen en la respuesta a feromonas en *S. cerevisiae* para el bloqueo del ciclo celular en G1 como es la actividad de Far1p (CKI de Cdc28-Cln) (42,58) (tabla 3). En general se requiere de la inhibición de la actividad Cdc28-Cln, esto se puede dar en conjunto por la represión de la transcripción de CLN2 y CLN1, por la degradación de estas ciclinas y por la inhibición de Cdc28-Cln.

Según estas observaciones, puede ser que el complejo SCF^{NFB1} participe de la misma forma que SCF^{Grr1} en la degradación de ciclinas de G1 (NCU02114.2/clnG1). A su vez la degradación de NCU02114.2/clnG1 en *N. crassa* podría permitir la sensibilidad a la feromona de la cepa de apareamiento opuesto. Esto es consistente con el hecho de que la mutante nfb1 está afectada en los mecanismos de apareamiento. Sin embargo, esto implica que sí se podría llevar a cabo la formación de protoperitecios y tricóginos donde estos últimos podrían conservar su capacidad quimiotrópica para desplazarse hacia la célula masculina de apareamiento opuesto. Y finalmente el defecto en la mutante nfb1 sería en el

apareamiento entre células masculina y femenina por la falta de sincronización en la fase G1 del ciclo celular.

Estudios muestran que el receptor a feromona (pre-) en *Neurospora* es esencial para el crecimiento direccional en el apareamiento, la fusión de tricoginos y la fertilidad femenina de matA (45). Sin embargo, no se afecta el crecimiento vegetativo. pre-1 codifica para una proteína receptora asociada a proteínas G. También se ha demostrado que la subunidad $G\alpha$, GNA-1, y la proteína $G\beta$, GNB-1, son esenciales para el crecimiento direccional de tricoginos y fusión con la célula masculina en *N. crassa*. Es evidente que en la respuesta a feromonas se debe activar la vía de MAP cinasas (como ocurre en *S. cerevisiae*) para permitir que la señal llegue al núcleo y permitir la expresión de genes específicos de apareamiento (46). La activación de una vía específica (en respuesta al apareamiento) de las MAP cinasas implica la regulación por medio de complejos SCF (26). Consistente con la observación anterior, SCF^{NFB1} podría participar en la degradación de proteínas fosforiladas por la vía de MAP cinasas en respuesta a feromona en *N. crassa*.

Otra posibilidad, es que el complejo SCF^{NFB1} podría participar en la degradación de la proteína homóloga a Ime2p (NIME2/ NCU01498.2 en *N. crassa*). Ime2p es una proteína que se activa durante condiciones limitantes de glucosa. Ime2p es un regulador positivo de la meiosis que es degradado por el complejo SCF^{Grr1} en un proceso dependiente de glucosa (27) (tabla 3- Ime2p). En la figura 5 se muestra el alineamiento de la proteína IME2 de *N. crassa*. La presencia de motivos PEST y sitios de fosforilación la hacen un sustrato potencial para la interacción con SCF^{NFB1}.

En *S. cerevisiae* la degradación de Gic2p parece ser importante para el inicio de la gemación. Sin embargo; no se conoce la función exacta de Gic2p. En *N. crassa* no se encontraron homólogos a Gic2p a través del análisis del tipo blast-tp sobre su genoma (ver tabla 4). Resulta consistente con el hecho de que en *N. crassa* no existe división por gemación.

También NFB1 parece no estar implicada en los mecanismos de regulación de la expresión de los transportadores de glucosa como ocurre con Grr1. Esto debido a que no se encontraron homólogos en el genoma de *N. crassa* a la proteína Mth1. Además esto es apoyado por el hecho de que un análisis de la expresión del RNA de los transportadores de glucosa en *N. crassa* muestra que no se ve afectada en la mutante *nfb1* (Cortés-Penagos resultados no publicados). Parece ser que a diferencia de NFB1 la proteína Grr1 tiene un papel más activo en la regulación del metabolismo de glucosa. Todo parece indicar que NFB1 participa en los mecanismos de apareamiento, regulación del ciclo celular y morfogénesis. Estos resultados son consistentes con lo observado en los geles bidimensionales, donde las proteínas de expresión diferencial (acumulación) coinciden con las coordenadas esperadas para *clnG1* y *HOF1*.

7.2 Clonación de genes

Con la finalidad de generar un sistema que permita estudiar las interacciones hipotéticas propuestas por el estudio bioinformático, se generaron las siguientes construcciones: *pAS2-1-nfb1his*, *pACT2-clnG1*, *pTrc99A-nfb1his*. El análisis con enzimas de restricción muestra que se han clonado los genes correctos. Sin embargo, falta que las construcciones sean secuenciadas para comprobar que los

genes están correctamente clonados. Adicionalmente se cuenta con la construcción donada por el Dr. Mario Rocha (pACT2-ASK1).

En la construcción pAS2-1-nfb1his el gen nfb1 ha sido fusionado al dominio de unión al DNA perteneciente al factor transcripcional GAL4. Mientras que en la construcción pACT2-clnG1 el gen clnG1 se ha fusionado al dominio de activación de GAL4.

Dado que las interacciones entre NFB1 y sustrato son dependientes de fosforilación por cinasas de *N. crassa*, el sistema de dos híbridos no es una metodología confiable para estudios posteriores de la interacción NFB1-sustrato ya que el microorganismo usada para probar las construcciones es una levadura y lo mas probable es que no tenga las cinasas específicas para fosforilar nuestros proteínas en estudio. Pero si pudiera ser una metodología confiable para estudiar la interacción NFB1-ASK1/SCON3.

Debido a lo anterior, se consideró una alternativa para estudiar la interacción NFB1-sustrato basada en la purificación de 6xHIS-NFB1 por afinidad con perlas de agarosa-niquel. Como se comento anteriormente una parte de ésta estrategia consiste en la expresión de la proteína NFB1 fusionada a seis histidinas usando la construcción pTrc99A-nfb1his.

7.3 Expresion de la proteína NFB1

Se ha reportado la expresión de varias proteínas semejantes a NFB1 usando el sistema de expresión de *E. coli*. La proteína Internalina de *Listeria monocitogenes* fue expresada usando el vector pGEX-6P1 (Amersham) donde se expresa como una proteína citoplásmica fusionada a Glutación-S-Transferasa (GST). Este

plásmido usa el promotor *lac*(98). La proteína Internalina presenta 15 LRRs por lo que estructuralmente es parecida a NFB1 en el dominio LRR (52). La proteína Grr1-GST fue expresada en la cepa BL21(DE3) usando el vector pET24a (Novagen) (28).

La fusión GST-Skp2 de humano fue expresada en la cepa BL21(DE) usando el vector pGEX 4T1 (Pharmacia)(25). En este estudio fue determinada la estructura de la F-box Skp2 por cristalografía de rayos X.

Por otra parte muchos de las proteínas de los complejos SCF han sido expresadas en bacterias usando el sistema de regulación bajo el promotor T7 para estudios estructurales y otros ensayos bioquímicos (98, 99).

El promotor *trc* es una secuencia híbrida obtenido a partir de los promotores *lac* y *trp* (100). Este es inducible con IPTG y es altamente reprimible debido a que el vector pTrc99a expresa constitutivamente el represor *lacI^q* (100).

Un “Western blot” anti 6XHIS es la prueba definitiva y contundente que nos indica si la proteína 6His-NFB1 se esta expresando. La falta del anticuerpo ha impedido realizar este ensayo.

Es muy probable que 6His-NFB1 se transcribe pero no se traduce. Esto es consistente con el hecho de que se detecta el RNAm del gen *nfb1* por medio de RT-PCR. Es probable que no se exprese debido a que este sistema (pTrc99a) genera resultados de niveles de expresión visibles en los geles SDS-PAGE (100). Además en el control positivo se observa una clara inducción de la expresión de la β -galactosidasa.

VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados de los geles bidimensionales, los alineamientos, el modelado estructural y las características de *nfb1Δ* indican que la proteína NFB1 participa formando un complejo ubiquitina ligasa tipo SCF^{NFB1}. Sin embargo, la prueba contundente a esta afirmación se obtendrá hasta que se pruebe la interacción entre NFB1 y Ask1/SCON3 por medio del ensayo de dos híbridos. De igual forma, por medio de dos híbridos se debe probar la interacción con los sustratos potenciales. Uno de los sustratos ha sido clonado en el plásmido pACT2 (pACT2-clnG1).

Otra estrategia para probar lo anterior es la expresión y purificación por afinidad de la proteína 6HIS-NFB1 para estudios posteriores tipo de interacción de proteínas *in vitro*. Este método se ve mas retrasado y distante por los problemas que se han presentado con la expresión la proteína 6HISNFB1 en *E. coli*.

Es posible que en el sistema de dos híbridos no se detecte interacción entre NFB1 y los sustratos debido a que las cinasas que es necesario que fosforilen a CLNG1-Nc no se presenten en *S. cerevisia*. Por lo que se deben buscar alternativas de expresión y realizar los ensayos *in vitro*.

IX PERSPECTIVAS

1. Clonación de *scon3*, *ime2-Nc* y *hof1-Nc* en el vector pACT2.
2. Clonación de *nfb1* por fragmentos en pAS2-1, para probar experimentalmente la función de cada uno de los dominios de la estructura.

3. Expresión de 6HIS-NFB1 usando el vector de expresión pRSET6b en *E. coli*, este vector permite expresar bajo el control de un promotor fuerte (T7). O bien, usar el vector de expresión pGEX 5X-1 (fusión a GST) que se encuentra disponible en el laboratorio.
4. Clonar el gen *nfb1* en el vector para *N. crassa* en el que se controla la expresión con el promotor del ácido quínico e integrar el gen *nfb1* por recombinación homologa en el locus *his*. Esto puede permitir realizar ensayos novedosos que permitan inducir un fenotipo silvestre haciendo la inducción con ácido quínico y la inducción del fenotipo mutante en ausencia de ácido quínico. Además en esta misma metodología podría conservarse la fusión de NFB1 a 6HISX lo que permitirá hacer ensayos de coimmunoprecipitación o la expresión en *N. crassa*.
5. Realizar ensayos de apareamiento en la cepa *nfb1*Δ para observar al microscopio si existe la formación de protoperitecios y a la vez observar si se induce el crecimiento quimiotrópico de los tricóginos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Hershko, A; Ciechanover, A; Heller, H; Haas, A. L; and Rose, I. A. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polipeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 1783-1786 (1980).
- (2) Stadtman, E. R. (1992) Protein oxidation and the aging. *Science* 257:1220-1224.
3. Goldberg, A. L. (1995) Functions of the proteasome : the lysis at the end of the tunnel. *Science* 268,522-523.
4. Hershko, A. and Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479 (1998)
5. Pickart, M.C. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70,503-533 (2001)
6. Bachmair, A; Finley, D. and Varshavsky, A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino terminal residue. *Science* **234**, 179-186 (1986).
7. Varshavsky, A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**,12142-12149 (1996).
8. Suzuki, T. and Varshavsky, A. Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space. *Embo J.* 18, 6017-6026 (1999).
9. Sheaff, R. J; Groudine, M; Gordon, M; Roberts, J. M; and Clurman, B. E. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11, 1464-1478 (1997).

10. Vlach, J; Hennecke, S; and Amati, B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* 16, 5334-5344 (1997).
11. Skowyra, D; Graig, K. L; Tyers, M; Elledge, S. J; and Harper, J. W. F-Box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-219 (1997)
12. Feldman, R.M; Correl, C. C; Kaplan, K.B; and Deshaies R.J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/Cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-230 (1997).
13. Wang, W; Ungermannova, D; Chen, L; and Liu, X. Molecular and biochemical characterization of the Skp2-Cks1 binding interface. *J. Biol. Chem.* 279, 51362-51369 (2004).
14. Ganoth, D; Borstein, G; Ko, T.K; Larsen, B; Tyers, M; Pagano, M; and Hershko, A. The cell-cycle regulator protein Cks1 is required for SCF^{Skp2}-mediated ubiquitinylation of p27. *Nature Cell Biol.* 3,321-324 (2001).
15. Bai, C; Sen, P; Hofmann, K; Ma, Lei; Goebel, M; Harper, J.W; and Elledge, S.J. Skp1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-Box. *Cell*, 86,263-274 (1996).
16. Wei, W; Ayad, N.G; Wan, Y; Zhang, G; Kirschner, M.W; and Kaelin Jr, W.G. Degradation of the SCF component Skp2 in the cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*, 428,194-198 (2004).
17. Glotzer, M; Murray, A; and Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349. 132-138 (1991).
18. Koepp, D.M; Harper, J.W; Elledge, S.J. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97, 431-434 (1999).

19. Deshaies, R.J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**, 435-467 (1999).
20. Page, A.M; Hieter, P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.* **68**,583-609 (1999).
21. Huang, H; Regan, K.M; Wang, F; Wang, D; Smith, D.I; van Deursen, J.M.A; and Tindall, D.J. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 1649-1654 (2005).
22. Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A. & Pagano, M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* **1**, 193–199 (1999).
23. Tedesco, D., Lukas, J. & Reed, S. I. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF^{Skp2}. *Genes Dev.* **16**, 2946–2957 (2002).
24. Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K. & Nakayama, K. I. Degradation of p57Kip2 mediated by SCF^{Skp2}-dependent ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10231–10236 (2003)
25. Schulman, BA; Carrano, AC; Jeffrey, ZB; Kinnucan, ER; Finnin, MS; Elledge, SJ; Harper, JW; Pagano, M; Pavietich, NP. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* **408**, 381-386 (2000).
26. Chou, S; Huang, L; and Liu, H. Fus3-regulated Tec1 degradation through SCF^{Cdc4} determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell* **119**, 981-990 (2004).

27. Purnapatre, K; Gray, M; Piccirillo, S; and Honigberg, S. M. Glucose Inhibits Meiotic DNA Replication through SCF^{Grr1p}-Dependent Destruction of Ime2p Kinase. *Mol. Cell Biol.* **25**, 440-450 (2005).
28. Liu, Z; Spírek, M; Thornton, J; and Butow, R. A. A Novel Degron-mediated Degradation of the RTG Pathway Regulator, Mks1p, by SCF^{Grr1p}. *Mol. Biol. Of the Cell.* **16**, 4893-4904 (2005).
29. Horak, J; and Wolf, D. H. The ubiquitin ligase SCF^{Grr1} is required for Gal2p degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **335**, 1185-1190 (2005).
30. Sweigard JA, Carroll AM, Farrall L, Chumley FG, Valent B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol Plant-Microbe Interact.* **11**,404-412 (1998).
31. Asusubel, F.M; Rent, R; Kingstong, R. E; Moore, D. D; Seidman, J. G; Smith, J. A; and Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons Inc; New York. (1987).
32. Rechsteiner, M; and S. W. Rogers. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271 (1996).
33. Yeffe, M. B; and Elia, A. E. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Current Opinion in Cell Biology.* **13**,131-138 (2001).
34. Barton, G J. ALSCRIPT A tool to format multiple sequence alignments. *Protein Engineering.* **6**,37-40 (1993).
35. Hsiung, Y. G; Chang, H; Pellequer, J; La Valle, R; Lanke, S; and Wittenberg, C. F-Box Protein Grr1 Interacts with Phosphorylated Targets via the Cationic Surface of Its Leucine-Rich Repeat. *Mol. and Cell. Biol.* **21**, 2506-2520 (2001).

36. Valdez, J. J. Manual de Protocolos de Biología Molecular de Plantas y Microorganismos. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CEMED) (2001).
37. La Rue, J; Tokarz, S. and Lanker, S. SCF^{Grr1}-Mediated Ubiquitination of Gis4 Modulates Glucosa Response in Yeast. *J. Mol. Biol.* **349**, 685-698 (2005).
38. Charrasse, S; Carena, I; Brondani, V, Klempnauer, K-H, and Ferrari, S. Degradation of B-Myb by ubiquitin-mediated proteolysis: involvement of the Cdc34-SCFp45Skp2 pathway. *Oncogene* **19**, 2986 – 2995 (2000).
39. Galagan, J. E; *et. al.* The complete genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859-868 (2003).
40. Mendez, J; Zou-Yang, X.H; Kim, S-Y; Hidaka, M; Tansey, W.P; and Stillman, B. Human Origin Recognition Complex Large Subunit Is Degraded by Ubiquitin-Mediated Proteolysis after Initiation of DNA Replication. *Molecular Cell*, **9**, 481–491 (2002).
41. Meimoun, A; Holtzman, H; Weissman, Z; McBride, H. J; Stillman, D. J; Fink, G. R; and Kornitzer, D. Degradation of the Transcription Factor Gcn4 Requires the Kinase Pho85 and the SCFCDC4 Ubiquitin–Ligase Complex. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 915–927 (2000).
42. Henchoz, S; Chi, Y; Catarin, B; Herskowitz, I; Deshaies, R.J. and Peter, M. Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes & Dev.* **11**, 3046-3060 (1997).

43. Borkovich, K. A. y col. Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**, 1-108 (2004).
44. Schweitzer, K; Cocklin, R; Garrett, L; Desai, F; and Goebel, M. The ubiquitin ligase SCFGrr1 is necessary for pheromone sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **22**, 553-564 (2005).
45. Kin, H; and Borkovich, K. A. A pheromone receptor gene, *pre-1*, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, **52**, 1781-1798 (2004).
46. Xu, J-R. MAP Kinases in Fungal Pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 137-152 (2000).
47. Flick, K. M; Spielewoy, N; Kalashnikova, T. I; Guaderrama, M; Zhu, Q; Chang, H-C; and Witttenberg, C. Grr1-dependent Inactivation of Mth1 Mediates Glucose-induced Dissociation of Rgt1 from HXT Gene Promoters. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 3230-3241 (2003).
48. Eckert-Boulet, N; Regenber, B; and Nielsen, J. Grr1p is required for transcriptional induction of amino acid permease genes and proper transcriptional regulation of genes in carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **47**, 139-149 (2005).
49. He, Q; Cheng, P; Yang, Y; He, Q; Yu, H; and Liu, Y. FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *The EMBO journal*, **22**, 4421-4430 (2003).

50. Sizemore S. T. and Paietta J. V. Cloning and Characterization of *scon-3⁺*, a New Member of the *Neurospora crassa* Sulfur Regulatory System. *Eukaryotic Cell*, **1**, 875-883 (2002).
51. Kobe, B. and Deisenhofer, J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, **347**, 183-186 (1995).
52. Schubert, W-D; Urbanke, C; Ziehm, T; Beier, V; Machner, M. P; Domann, E; Wehland, J; Chakraborty, T. and Heinz, D. W. Structure of Internalin, a Major Invasive Protein of *Listeria monocytogenes*, in Complex with its Human Receptor E-Cadherin. *Cell*, **111**, 825-836 (2002).
53. Righetti, P. G; Gianazza, E; Gelfi, C; and Chiari, M. Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients. *Anal. Chem.* **61**, 1602-1612 (1989).
54. Blondel, M; Bach, S; Bamps, S; Dobbelaere, J; Wiget2, P; Longaretti, C; Barral, Y; Meijer, L. and Peter, M. Degradation of Hof1 by SCFGrr1 is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *The EMBO Journal*, **24**, 1440–1452 (2005).
55. Jaquenoud, M ; Gulli, M-P ; Peter, K. and Peter, M. The Cdc42p effector Gic2p is targeted for ubiquitin-dependent degradation by the SCFGrr1 complex. *The EMBO Journal*, **17**, 5360–5373 (1998).
56. Nigg,E.A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays*, **17**, 471–480 (1995).
57. Li, F. N. and Johnston, M. Grr1 of the *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *The EMBO journal*, **16**, 5629-5638 (1997).

58. Blondel M, Galan JM, Chi Y, Lafourcade C, Longaretti C, Deshaces RJ, Peter M. Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. *The EMBO Journal*, **19**, 6085–6097 (2000)
59. Gstaiger M, Marti A, Krek W. Association of human SCF(SKP2) subunit p19(SKP1) with interphase centrosomes and mitotic spindle poles. *Exp Cell Res*, **247**, 554–562 (1999).
60. Rock, KL; Goldberg, AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739-79, (1999).
61. Ghosh, S; May, MJ; Kopp, EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-60, (1998).
62. Haas, AL; Rose, IA. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J. Biol. Chem.* **257**, 10329-10337, (1982).
63. Mastrandrea, LD; You, J; Niles, EG; Pickart, CM. E2/E3-mediated assembly of lysine 29-linked polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* **274**, 27299-27306, (1999).
64. Hershko, A; Heller, H; Elias, S; Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **258**, 8206-8214, (1983).
65. Zacksenhaus, E; Sheinin, R. Molecular cloning, primary structure and expression of the human X linked A1S9 gene cDNA which complements the ts A1S9 mouse L cell defect in DNA replication. *EMBO J.* **9**, 2923-2929, (1990).
66. Ciechanover, A; Finley, D; Varshavsky, A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell.* **37**, 57-66, (1984).

67. Aviel, S; Winberg, G; Massucci, M, Ciechanover, A. Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.* **275**, 23491-23499, (2000).
68. Huang, L; Kinnucan, E; Wang, G; Beaudenon, S; Howley, PM, et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science.* **286**, 1321-1326, (1999).
69. Nuber, U; Schwarz, S; Kaiser, P; Schneider, R; Scheffner, M. Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *J. Biol. Chem.* **271**,2795-2800, (1996).
70. Kumar, S; Kao, WH; Howley, PM. Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J. Biol. Chem.* **272**, 13548-13554, (1997).
71. Zheng, N; Wang, P; Jeffrey, PD; Pavletich, NP. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102**, 533-539, (2000).
72. Moynihan, TP; Ardley, HC; Nuber, U; Rose, SA; Jones, PF; et al. The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-AP1. *J. Biol. Chem.* **274**, 30963-30968 (1999).
73. Yokouchi, M ; Kondo, T ; Houghton, A ; Bartkiewicz, M; Horne, WC; et. al. Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the

- interaction of the c-Cbl RING finger and Ubch7. *J. Biol. Chem.* **274**, 31707-31712 (1999).
74. Berset, C; Griac, P; Tempel, R; La Rue, J; Wittenberg, Curt; and Lanker, S. Transferable Domain in the G₁ Cyclin Cln2 Sufficient To Switch Degradation of Sic1 from the E3 Ubiquitin Ligase SCF^{Cdc4} to SCF^{Grr1}. *Mol. and Cell. Biol.* **22**, 4463-4476 (2002).
75. Raju, N. B. Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. *Mycol. Res.* **96**, 241-262 (1992).
76. Scheffner, J ; Huibregtse, JM ; Vierstra, RD ; Howley, PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505 (1993).
77. Scheffner, M ; Nuber, U ; Huibregtse, JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81-83 (1995).
78. Kumar, S ; Talis, A ; Howley, PM. Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **274**, 18785-18792 (1999).
79. Huibregtse, JM; Yang, JC; Beaudenon, SL. The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3656-3661 (1997).
80. Qui, L; Joazeiro, C; Fang, N; Wang, HY; Elly, C; et al. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **275**, 35734-35737 (2000).
81. Kishino, T; Lalande, M; Wagstaff, J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* **15**, 70-73 (1997).

82. Matsuura, T; Sutcliffe, JS; Fang, P; Galjaard, R; Jiang, Y; et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat. Genet.* **15**, 74-77 (1997).
83. Beadle, G. W; and Tatum, E. L. (1941) Genetic control of chemical reactions in *Neurospora* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**, 499-506.
84. Payen, A. (1843) Extrait d'un rapport adresse' a' M. Le Marechal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, President du Conseil, sur une alteration extraordinaire du pain du muniton. *Ann. Chim. Phys.* 3rd Ser. **9**, 5-21.
85. Davis, R. H; and Perkins, D. D. (2002) Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 397-403.
86. Bistis, G. N; Perkins, D. D. And Read N. D. (2003) Cell types of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl* **50**, 17-19.
87. Shear, C. L; and Dodge B. O. (1927) Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *J. Agric. Res.* **34**, 1019-1042.
88. Hoppe, T; Matuschewski, K; Rape, M; Schlenker, S; Ulrich, HD; Jentsch, S. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**, 577-586 (2000).
89. Beaudenon, SL; Huacani, MR; Wang, G; McDonnell, DP; Huibregtse, JM. Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6972-6979 (1999).
90. Borden, KL. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J. Mol. Biol.* **295**, 1103-1112 (2000).

91. Tyers, M ; Jorgensen, P. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 54-64 (2000).
92. Kamura, T; Koepp, DM; Conrad, MN; Skowyra, D; Moreland, RJ; et al. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* **284**, 657-661 (1999).
93. Skowyra, D; Koepp, DM; Kamura, T; Conrad, MN; Conaway, RC; et al. Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* **284**, 662-665 (1999).
94. Ohta, T ; Michel, JJ ; Schottelius, AJ ; Xiong, Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* **3**, 535-541 (1999).
95. Zheng, N; Schulman, BA; Song, L; Miller, JJ; Jeffrey, PD; Wang, P; Chu, C; Koepp, DM; Elledge, SJ; Pagano, M; Conoway, RC; Conoway, JW; Harper, JW; Pavietich, NP. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-Fbox^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*. **416**, 703-709 (2002).
96. Makrides, SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. **60**, 512-538 (1996).
97. Fuh, G; Mulkerrin, MG; Bass, S; McFarland, N; Brochier, M; Bourell, JH; Light, DR; Wells, JA. The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of extracellular binding domain. *J. Biol. Chem.* **265**, 3111-3115 (1990).
98. Orlicky, S; Tang, X; Willems, A; Tyers, M; Sicheri, F. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCF^{Cdc4} ubiquitin ligase. *Cell*. **112**, 243-256 (2003).

99. Iwai, K; Yamanaka, K; Kamura, T; Minato, N; Conoway, RC; Conoway, JW; Klausner, RD; Pause, A. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as a part of an active E3 ubiquitin ligase complex. Proc. Natl. Aca. Sci. USA. **96**, 12436-12441 (1999).
100. Amann, E; Ochs, B; Abel, K-J. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. Gene. **69**, 301-315 (1988).
101. Keegan, L; Gill, G; Ptashne, M. Separation of DNA binding from the transcriptional-activating function of a eukaryotic regulatory protein. Science **231**, 699-704 (1986).
102. Silver, PA; Keegan, LP; Ptashne, M. Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**, 5951-5955 (1984).
103. Fields, S; Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature. **340**, 245-246 (1989).
104. Nelson, M. A. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. Trends. Genet. **12**, 69-74 (1996).
105. Bitis, G. N. Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating-type in *Neurospora crassa*. Mycologia **73**, 959-975 (1981).
106. Maheshwari, R. Microconidia of *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. **26**, 1-18 (1999)
107. Jin, J; Cardozo, T; Lovering, R. C; Elledge, S. J; Pagano, M. and Harper, J. W. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. Genes Dev. **18**, 2573-2580.

108. Finn, R. D; Mistry, J; Schuster-Böckler, B; Griffiths-Jones, S; Hollich, V; Lassmann, T; Moxon, S; Marchall, M; Khanna, A; Durbin, R; Eddy, S. R; Sonnhammer, E. L. L. and Bateman, A. (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nuc. Acids Res.* 34, 247-251.