UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico Farmacobiología

Construcción de un vector de expresión para el dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* de *Mus musculus* para su expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*

Tesis

Que para obtener el título de

Químico-Farmacobiólogo

Presenta:

Mario Moreno Jiménez

Asesor:

DR. Víctor Meza Carmen

Coasesor:

DR. Rogelio Garcidueñas Piña

Agosto 2013

DEDICATORIA

A mis padres Modesta Jiménez Reyna y José Luis Moreno Rodríguez por su amor, comprensión y apoyo invaluable de toda la vida y darme la oportunidad de estudiar.

A todos mis hermanos por su cariño y apoyo moral que me han brindado desde niño.

AGRADECIMIENTOS

Otorgo mis más sinceros agradecimientos a mi asesor, el Dr. Víctor Meza Carmen por haberme brindado la oportunidad de trabajar y formar parte de su equipo de investigación y asimismo por la paciencia y recomendaciones hechas durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Rogelio Garcidueñas Piña por haberme acompañado en el laboratorio y compartir su experiencia y conocimientos tanto en el trabajo del laboratorio como también en la elaboración de la tesis.

Al Dr. Jesús Campos García, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y formar parte de mis sinodales.

A mis sinodales: la Dr. Martha Isela Ramírez Días, Irvin Eduardo Jácome Galarza y Carmen Rocío Montoya Pérez, por la confianza que en mi depositaron y por sus certeras observaciones y sugerencias hechas en el trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación : Wendy Robles Gutiérrez, Anai Zavala Franco, Jessica Ruiz García, Lizbeth Araceli Contreras Lara, Salvador Gallardo Alfonso y Cesar Emanuel Pintor Ortega por su amistad, su ayuda invaluable y el apoyo moral que siempre me han brindado, sobre todo en aquellos momentos en los que he sido presa de la incertidumbre.

A mis compañeros de laboratorio: Nancy, Marcos, Yaridiana, Lorena, Omar, Luis, Viridiana y Enrique por sus consejos y camaradería. De manera especial, agradezco a la Maestra en Ciencias Alma L. Díaz Pérez por compartir su experiencia y conocimientos conmigo y por el gran apoyo que me brindó durante la fase experimental de este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Instituto de investigaciones Química-Biológicas, al Laboratorio de Biotecnología Microbiana y al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán por haberme brindado el espacio para el desempeño del trabajo realizado.

ÍNDICE

RESUMEN……...1

INTRODUCCIÓN……..……..2

1 ANTECEDENTES……..……..…4

1.1 TRÁFICO VESICULAR……....4

1.1.1 EXOCITOSIS……..……...….8

1.1.2 ENDOCITOSIS……11

1.2 COMPONETES DEL TRÁFICO VESICULAR……14

1.2.1 GEMACIÓN……..14

1.2.2 PROTEÍNAS G EN EL TRÁFICO VESICULAR……..16

1.2.3 PROTEÍNAS ARF EN EL TRÁFICO VESICULAR……17

1.3 PROTEÍNAS ARF ATIPICAS EN EL TRÁFICO VESICULAR……..……..21

1.4 PROTEÍNAS ARF EN MAMIFEROS Y *Saccharomyces cerevisiae*…….....24

2. OBJETIVOS……..……...27

2.1 OBJETIVO GENERAL……..27

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS……...27

3. MATERIALES Y MÉTODOS…….27

3.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS……27

3.2 MEDIO DE CULTIVO……...27

3.2.1 MEDIO DE CULTIVO PARA BATERIAS……..……...…….....27

3.2.2 MEDIOS DE CULTIVOS DE LEVADURAS……..…..……..……..…..29

3.2.3 MEDIO MINÍMO……..…….....29

3.3 CONSTRUCCIÓN DEL GEN *ARF*-MS……..30

3.4 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO *ARF*-MS……30

3.5 CLONACIÓN DE *ARF*-MS EN VECTOR BACTERIANO……33

3.6 OBTENCIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES……..33

3.7 TRANSFOR MACIÓN CON pGEM-T Easy……..……34

3.8 SELECCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES BACTERIANAS……..…...34

3.9 AISLAMIENTO DE DNA PLÁSMIDICO BACTERIANOS……..…….34

3.10 REACCIÓN DE LIGACIÓN EN EL PLÁSMIDO pYES2/CT…….……...36

3.11 TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*……..…36

3.12 EXTRACCIÓN DE DNA TOTALDE LEVADURA……..……...37

3.13 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS……..……38

3.14 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA……..……..……...38

3.15 INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA *ARF*-MS…….……..39

4. RESULTADOS……40

4.1 FUSIÓN DEL DOMINIO ARF DE *ARD1/TRIM23* Y LA ALFA HÉLICE DE ARF1 DE *Saccharomyces cerevisiae*……40

4.2 CLONACIÓN DE *ARF*-MS EN EL VECTOR pGEM-T Easy……..……44

4.3 LIGACIÓN DE *ARF*-MS EN VECTOR DE EXPRESIÓN pYES2/CT……....44

4.4 TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* CON *ARF*-MS-pYES2/CT……....48

4.5 TRANFORMACIÓN DE *E. coli* CON DNA TOTAL AISLADO DE TRASNFORMANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* CON EL PLÁSMIDO *ARF*-MS-pYES2/CT……..……...48

4.6 INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *ARF*-MS…….52

5. DISCUSIÓN……54

6. PERSPECTIVAS……...55

7. CONCLUSIONES……...56

8. BIBLIOGRAFÍA……...57

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 1 Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo……..……..…….28

Cuadro 2 Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y fusión del domino ARF de *ARD1/TRIM23* de ratón con la alfa hélice de *ARF1* de *S. cerevisiae*……..……..…...31

Cuadro 3 Resumen de los dos programas utilizados para realizar PCR……..….32

Cuadro 4 Condiciones utilizadas para las reacciones de PCR…..……...…32

FIGURAS

Figura 1 Generación de vesículas……..……..……..6

Figura 2 Rutas principales de tráfico intracelular mediante vesículas….....7

Figura 3 Generación de vesículas a partir del Trans Golgi Network (TGN)…….10

Figura 4 Mecanismos moleculares de endocitosis……..……..….13

Figura 5 Mecanismo general de la formación de una vesícula de transporte…....15

Figura 6 Ciclo de activación e inactivación de las proteínas ARF……..…18

Figura 7 Regulación de la formación de vesículas por proteínas ARF……..…20

Figura 8 Dominios funcionales de ARD1/TRIM23……..…...23

Figura 9 Alineamiento de las proteínas ARF de *S. cerevisiae,* y el dominio ARF de las proteínas ARD1/TRIM23 de *Mus musculus* y *Homo sapiens*……..……...26

Figura 10 Plásmido pGENE-*TRIM23* utilizado para amplificar por PCR el dominio ARF de *ARD1/TRIM23*……..….41

Figura 11 Fusión traduccional de la alfa hélice de *ARF1 S. cerevisiae* al dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* ……42

Figura 12 Productos de PCR secuenciales para obtener la fusión traduccional de la alfa hélice del gen *ARF*1 de *S. cerevisiae* al dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23*…..……..……...43

Figura 13 Electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido recombinate *ARF*-MS-pGEM…….……..….45

Figura 14 Corrimiento electroforético de los fragmentos generados a partir de la digestión de las plásmidos *ARF*-MS-pGEM y pYES2/CT con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l…..……..……...46

Figura 15 Corrimiento electroforético de los fragmentos generados a partir de la digestión del plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l……..…….…..47

Figura 16 DNA total aislado de las cepas de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT……..…....49

Figura 17 Plásmidos aislados de transformantes de *E. coli*……..50

Figura 18 Digestión del DNA plasmídico de las transformantes de *E. coli*.....51

Figura 19 Inmunodetección de la proteína recombinante *ARF*-MS en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con el plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT……,,,…….....53

RESUMEN

Las proteínas G son una familia de proteínas que unen nucleótidos de guanina, estas proteínas participan en varios procesos celulares entre ellos el tráfico vesicular donde las proteínas G monoméricas ARF tienen una función clave en el reclutamiento de proteínas de cubierta, formación y gemación de las vesículas. De esta manera las proteínas ARF participan en el tráfico vesicular entre varios compartimentos celulares, como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, endosomas. La proteína ARD1/TRIM23 contiene varios dominios entre los que se encuentra el dominio ARF, el cual difiere con las proteínas tipo ARF en la presencia de una alfa hélice de 15 aminoácidos en la parte amino terminal, la cual participa en la interacción con las membranas en la formación de las vesículas. La expresión heteróloga de proteínas recombinantes a través de plásmidos de expresión ofrece una de las ventajas más grandes como herramienta en la biología molecular, ya que puede ser utilizada para determinar las propiedades de las proteínas y para identificar su función dentro de los organismos estudiados. En el presente trabajo se describe la amplificación y fusión del dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* de *Mus musculus* con la alfa hélice de la proteína ARF1 de *Saccharomyces cerevisiae* por medio de PCR para su posterior clonación en el vector de expresión de *Saccharomyces cerevisiae* pYES2/CT dando origen al plásmido recombinate *ARF*-MS-pYES2/CT. Con este plásmido se transformó a *S. cerevisiae* donde se realizó la expresión heteróloga, obteniendo como producto la proteína recombinante *ARF*-MS de 36 kDa. Esta proteína corresponde la fusión del dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* y la alfa hélice de *ARF1* más un péptido conformado por el epitope V5 y seis residuos de histidina en el extremo carboxilo. La expresión de la proteína recombinante *ARF*-MS representa el primer paso orientado hacia la caracterización del dominio ARF de la proteína ARD1/TRIM23.

INTRODUCCIÓN

En las células eucariotas muchas de sus funciones están compartamentalizadas y muchos de estos compartimientos están delimitados por membranas formando organelos. Cada organelo celular está especializado en una o varias funciones interrelacionadas con las funciones de los demás organelos. Por ejemplo, el retículo endoplasmático (RE) es un gran productor de proteínas, el aparato de Golgi es un sistema de modificación por glicosilción de las mismas y estas proteínas son enviadas a otros organelos, por otra parte los lisosomas son centros de degradación de casi cualquier biomolécula, las mitocondrias y los cloroplastos son grandes centrales energéticas.

La comunicación entre muchos de los organelos está mediada por vesículas membranosas que transportan moléculas en su interior. A esta forma de comunicación se le denomina en conjunto tráfico vesicular. Aunque existen organelos que muestran rutas de tráfico vesicular no convencionales como las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas, los cuales tienen mecanismos alternativos de formación de vesículas para comunicarse entre los mismos y con otros organelos (Braschi y *col*., 2010).

Por lo tanto, el tráfico vesicular es uno de los procesos más importantes que controlan el destino de las proteínas dentro de una célula eucariótica; es un mecanismo altamente regulado mediante el cual ciertas proteínas son específicamente endocitadas, exocitadas o transportadas a ciertos compartimientos intracelulares (Rothman y Wieland, 1996) en respuesta a estímulos externos. Lo cual finalmente conduce a las alteraciones apropiadas en el metabolismo, crecimiento o movimiento celular (Eden y *col*., 2009).

Múltiples proteínas participan en la regulación del tráfico vesicular, se ha sugerido que las proteínas ARF (ARF por sus siglas en inglés ADP-Ribosylation Factor) tienen un papel importante en varios eventos del tráfico de membranas, incluyendo el transporte exocítico (Retículo Endoplásmico-Golgi y tráfico intraGolgi), endocítico

y el ensamble de membrana nuclear (Boman y Kahn, 1995).

Entre estos procesos, la función mejor caracterizada de ARF es la de facilitar el transporte de vesículas de membranas de Golgi cubiertas de clatrina. Aunque se desconoce el mecanismo preciso que juega ARF en el reclutamiento de cubiertas AP1/Clatrina a la red trans Golgi (Stamnes y Rothman, 1993; Traub *y col.*,1993).

1. ANTECEDENTES

1.1 TRÁFICO VESICULAR

Todas las células están rodeadas por una membrana que sirve como una barrera entre el interior de la célula y su exterior, la membrana plasmática (MP) es necesaria para comunicarse con el mundo que la rodea. Las células eucariotas contienen compartimientos intracelulares delimitados por membranas que interactúan entre sí y con el medio que la rodea.

En las células eucariotas muchas de sus funciones están compartamentalizadas y muchos de estos compartimientos están delimitados por membranas formando organelos. Cada organelo celular está especializado en una o varias funciones interrelacionadas con las funciones de los demás organelos. Por ejemplo, el RE es un gran productor de moléculas, el aparato de Golgi modifica tales moléculas, sintetiza glúcidos y los envía a otros organelos, los lisosomas son centros de degradación de moléculas que están defectuosas o que necesitan ser degradadas para controlar un proceso biológico, las mitocondrias y los cloroplastos son grandes centrales energéticas.

La comunicación necesaria entre muchos de los compartimientos intracelulares está mediada en gran medida por vesículas que transportan moléculas en su interior o incluidas en sus membranas, a esta comunicación es a la que se denomina en conjunto, tráfico vesicular (Tokarev y *col*., 2000).

La mayoría de las vesículas se han especializado en funciones concretas las cuales dependen de los materiales que contienen. En general la función de las vesículas es almacenar, transportar o digerir productos y residuos celulares. Son una herramienta fundamental de la célula para la organización del metabolismo. Muchas vesículas se originan principalmente desde en el aparato de Golgi, sin embargo también pueden provenir del RE, o se forman a partir de partes de la membrana plasmática.

Las vesículas brotan continuamente de una membrana y se fusionan con otra, llevando componentes de la membrana y moléculas solubles conocidas como cargo, este tráfico altamente organizado fluye a lo largo de membrana, lo que permite a la célula secretar y nutrirse con compuestos del exterior (Figura 1).

Para llevar a cabo su función, cada vesícula que brota de un compartimiento debe ser selectiva, es decir debe tomar sólo las proteínas adecuadas y debe fundirse con la membrana diana apropiada. Por ejemplo, una vesícula cargo que se transporta desde el Golgi a la membrana plasmática, debe excluir las proteínas que son residentes en el aparato de Golgi, reclutar sólo las moléculas que van a la membrana plasmática y debe fusionarse sólo con la membrana plasmática y no con la membrana de otro organelo (Alberts *y col.,* 2002).

Las respuestas a estímulos externos, como el caso de la presencia de factores de crecimiento o variaciones en el medio extra e intracelular, son mediadas en gran parte por el tráfico vesicular, generando finalmente las alteraciones apropiadas en el metabolismo, crecimiento o movimiento celular (Eden y *col*., 2009).

Hay dos grandes rutas de comunicación entre los organelos. La primera se inicia en el RE y envía vesículas al aparato de Golgi, el cual envía también vesículas a la membrana plasmática en un proceso denominado exocitosis. Esta es la ruta exportadora, es decir, la que liberará moléculas producidas por la célula al exterior, aunque tiene también otras misiones. La otra gran ruta es la importadora y comienza en la membrana plasmática donde se forman vesículas por un proceso denominado endocitosis, dichas vesículas pueden fusionarse con los lisosomas u otros organelos (Figura 2). Aunque el tráfico vesicular implica tanto la internalización de moléculas mediada por vesículas como el transporte de moléculas desde Golgi hacia otros compartimientos celulares y la membrana plasmática.

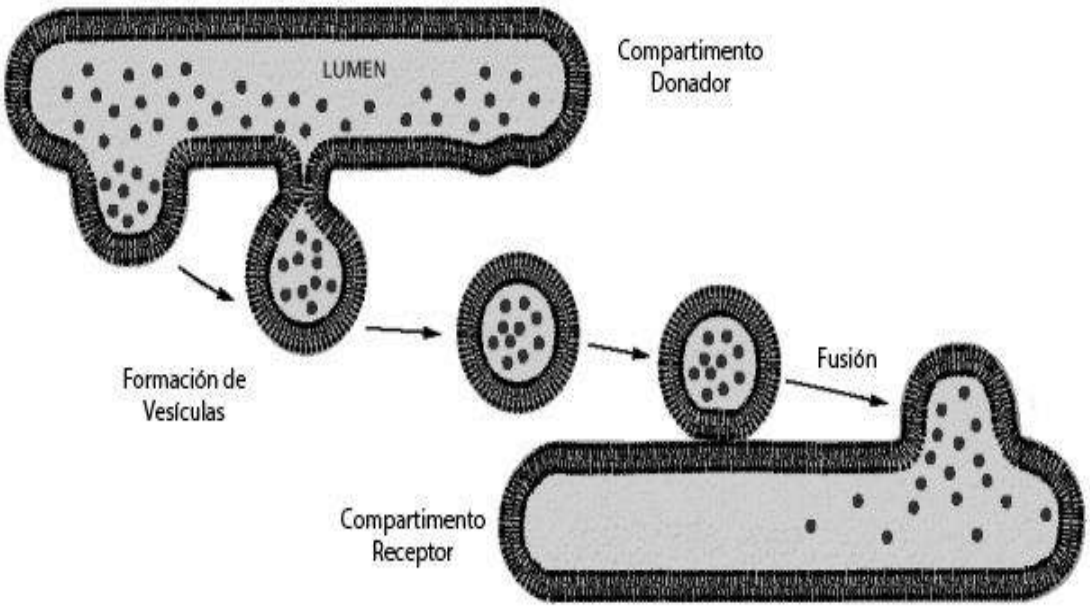


Figura 1. Generación de vesículas. Las vesículas brotan de un compartimiento donador y se fusionan con las membranas de otro compartimento receptor. Conforme lo hacen, transportan material del lumen y membrana del compartimiento donador hacia la membrana y el lumen del compartimento receptor (Adaptado de Alberts *y col.,* 2002).

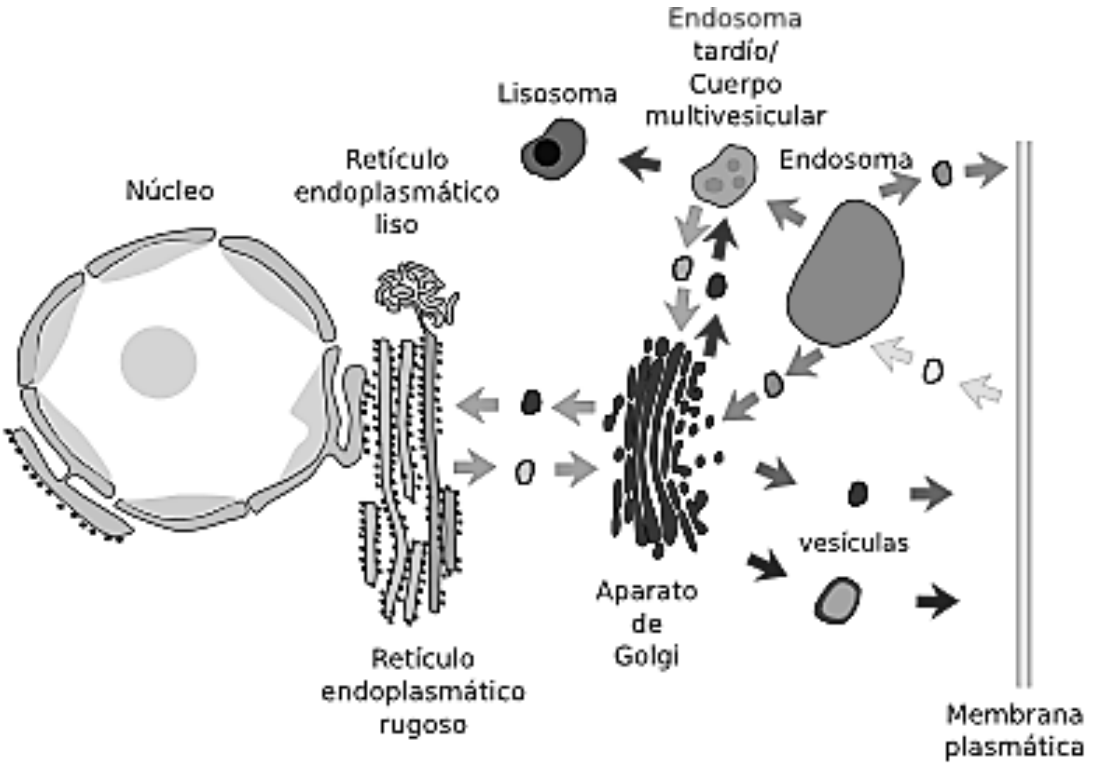


Figura 2. Rutas principales de tráfico intracelular mediante vesículas. Existe comunicación bidireccional entre la mayoría de los organelos que se comunican directamente. Las flechas muestran la dirección en que se mueven las vesículas de un compartimento celular a otro. El aparto de Golgi es un orgánelo polarizado conteniendo tres dominios, un lado cis (hacia el núcleo) uno trans (hacia la membrana) y entre ambos se encuentran el tercer dominio denominado, cisternas intermedias o medial (Molist, 2011)

1.1.1 EXOCITOSIS

El transporte de proteínas y lípidos desde su lugar de síntesis en el RE a la superficie celular está mediado por la vía secretora o exocitosis y es un proceso esencial en los organismos eucariotes. Esta vía incluye moléculas de señalización y componentes de la matriz extracelular que proporcionan la base para la construcción de tejidos y órganos. Además, esta vía desempeña un papel importante en la biogénesis de la membrana plasmática y su expansión antes de la división celular (Lodish , 2010).

Por lo tanto, sin la secreción no habría células, tejidos u órganos. La vía secretora mueve la carga desde el RE a través del aparato de Golgi a la membrana plasmática. En el RE y el aparato de Golgi, las proteínas son modificadas por la adición de azúcares y lípidos. Estas modificaciones están altamente ordenadas y ocurren sucesivamente en el RE y en las cisternas cis, medial y trans del aparato de Golgi (Figura 2). Una vez que las vesículas formadas en el trans-Golgi contienen a las moléculas cargo, estas se fusionan con la membrana plasmática para suministrarle proteínas residentes tales como receptores, canales iónicos , etc. (Hua y *col*., 2000).

El aparato de Golgi está formado por una serie de cisternas aplanadas que se disponen regularmente formando pilas. Entre las cisternas, dentro de cada pila, existen numerosas proteínas fibrosas en las que se encuentran embebidas las cisternas. Este entramado, denominado matriz, podría ayudar en el mantenimiento de la estructura del organelo. Sin embargo, se ha demostrado que la integridad del aparato de Golgi depende principalmente de la organización del sistema de microtúbulos, por ejemplo, durante la mitosis desaparece, lo mismo que si se detiene el tráfico vesicular desde el retículo endoplásmico. (Hua y *col*., 2000)

En el lado cis existe un proceso continuo de formación de cisternas con material procedente de la fusión de compartimientos túbulo-vesiculares denominados ERGIC (por sus siglas en inglés endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment), este compartimento se forma con material proveniente del retículo endoplasmático. El lado trans también posee una organización túbulo-vesicular denominada TGN (por sus siglas en inglés: Trans Golgi Network), donde las cisternas con las moléculas procesadas se deshacen en vesículas que se dirigen a otros compartimientos celulares (Figura 3). Por tanto se da un traslado constante de moléculas desde el lado cis al trans, pero también hay un flujo de reciclado en sentido contrario mediado por vesículas recubiertas con proteínas tipo COPI (por sus siglas en inglés **CO**at **P**rotein complex I) las cuales parten de las zonas laterales de las cisternas y se dirigen hacia otras cisternas más próximas al lado cis (Molist y *col*, 2011).

Desde el TGN salen vesículas con diferentes direcciones, hacia las cisternas previas del propio aparato de Golgi, hacia los endosomas y hacia la membrana plasmática. La fusión de las membranas intracelulares provenientes del aparato de Golgi con la membrana plasmática controla la composición de la superficie celular, influye en la morfología celular y permite la liberación de factores hacia el espacio extracelular, a esta liberación de moléculas a partir de vesículas se le denomina exocitosis (Gundelfinger y *col.*, 2003; Horton y Ehlers, 2003; Lippincott-Schwartz, 2004; Sudhof, 2004).

La exocitosis es la fusión de vesículas producidas principalmente por el aparato de Golgi con la membrana plasmática. Las vesículas se forman en el TGN del aparato de Golgi y viajan hasta la membrana plasmática con quien se fusionan.

Hay dos tipos de exocitosis: constitutiva y regulada (Figura 3). La exocitosis constitutiva se produce en todas las células y se encarga de liberar moléculas que van a formar parte de la matriz extracelular o bien sirven para regenerar la propia membrana celular. Es un proceso constante de producción, desplazamiento y fusión, con diferente intensidad de tráfico según el estado fisiológico de la célula.

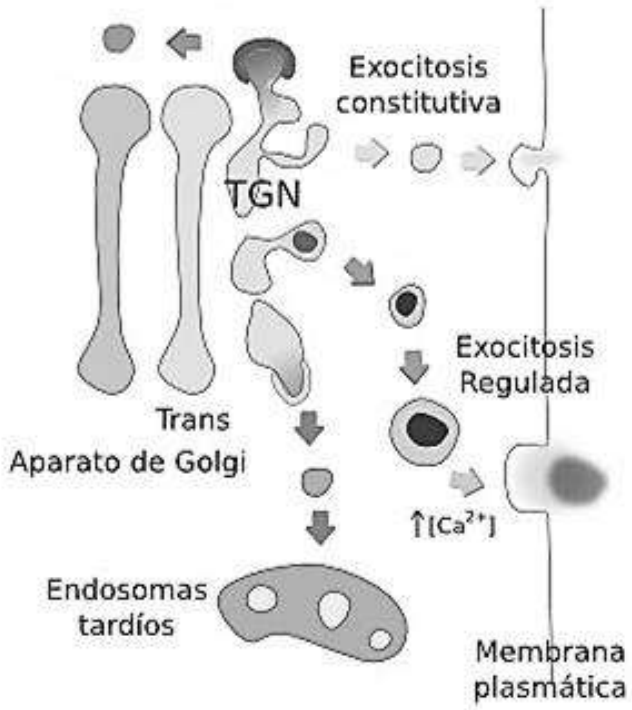


Figura 3. Generación de vesículas a partir del Trans Golgi Network (**TGN**) Desde el TGN del aparato de Golgi salen vesículas con diferentes destinos. Hacia la membrana plasmática parten dos rutas. Una denominada exocitosis constitutiva, que poseen todas las células, y otra, exocitosis regulada, que está presente en las células secretoras. Las otras dos rutas desde el TGN van hacia los endosomas, y hacia cisternas más próximas al lado cis del propio aparato de Golgi (Tomado de Molist y *col*., 2011)

La exocitosis regulada se produce sólo en aquellas células especializadas en la secreción, como por ejemplo las productoras regulada se produce sólo en aquellas células especializadas en la secreción, como por ejemplo las productoras de hormonas, las neuronas, las células del epitelio digestivo, las células glandulares (Sollner y *col*., 1993; Sudhof, 2004). En este tipo de exocitosis se liberan moléculas que realizan funciones para el organismo como la digestión o que afectan a la fisiología de otras células que están próximas o localizadas en regiones alejadas en el organismo, a las cuales llegan a través del sistema circulatorio, como es el caso de las hormonas. La forma más intensamente estudiada de una exocitosis regulada es la liberación de neurotransmisores disparada por una despolarización eléctrica de terminales presinápticas (Sollner y *col.*, 1993; Sudhof, 2004). Las vesículas de secreción regulada no se fusionan espontáneamente con la membrana plasmática sino que necesitan una señal, como el aumento de la concentración de calcio intracelular, ATP y GTP, etc. (Gil, 2010)

1.1.2 ENDOCITOSIS

Las células toman material extracelular por una variedad de mecanismos que colectivamente se denominan endocitosis. Los mecanismos endocíticos sirven para satisfacer muchas funciones celulares importantes, incluyendo el consumo de nutrientes, la regulación de la función de los receptores de membrana, el mantenimiento de la polaridad celular y la presentación de antígenos. Las rutas endocíticas son también utilizadas por virus, toxinas y organismos simbióticos para penetrar en la célula. Uno de los mecanismos mejor caracterizados es la endocitosis mediada por receptores vía vesículas cubiertas de clatrina, respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis. Hay que tener en cuenta que durante cualquier tipo de endocitosis también se incorporan lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que son las que forman la membrana de la propia vesícula (Mukherjee y *col,* 1997).

Este proceso consiste en la invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula cuyo contenido es transportado del exterior al interior de la célula. La endocitosis tiene un papel fundamental en diferentes procesos celulares como son: tanto celular, como del organismo completo. Hay varias vías endocíticas que utilizan distintos mecanismos para interiorizar porciones de la membrana plasmática, las cuales dependen en parte de las proteínas de cubierta de las vesículas. La morfología ultraestructural de los intermediarios endocíticos nacientes en la membrana plasmática proveen una manera simplista de definir las rutas endocíticas. Se reconocen cuatro diferentes tipos de estructuras vesiculares: vesículas cubiertas de clatrina, vesículas cubiertas de caveolina, invaginaciones membranales polimórficas y vesículas macropinocitócicas (Figura 4) (Hansen y Nichols, 2009).

Los receptores membranales, como el receptor de insulina, se internalizan a través de vesículas recubiertas de una proteína llamada clatrina, mientras que otras proteínas y los virus son internalizados por la ruta caveolar. Se han descrito unos 25 tipos de receptores que actúan en este tipo de endocitosis. Estas rutas de internalización dependen de la dinamina GTPasa (proteína que forma una espiral alrededor del cuello de la vesícula, una vez que la espiral está en su lugar, se extiende longitudinalmente y se constriñe a través de la hidrólisis de GTP a GDP. Este alargamiento y ajustamiento alrededor del cuello de la vesícula hace que se rompa y se libere de la membrana) para la fisión de la vesícula a la membrana plasmática (Kumari y *col.*, 2010). Cada una de estas rutas de internalización entrega su carga a un compartimiento interno, los endosomas, aunque la naturaleza de los compartimientos endosomales pueden diferir entre rutas (Tokarev y *col*., 2000). Los endosomas representan la mayor cantidad de compartimientos membranosos intracelulares y son la vía de tráfico vesicular hacia los lisosomas. Las moléculas endocitadas pueden seguir esta vía para su degradación en los lisosomas o pueden ser recicladas hacia la membrana plasmática. Muchas moléculas también son transportadas en endosomas desde la membrana plasmática y pueden dirigirse a los lisosomas o reciclarse en el aparato de Golgi (Mellman, 1996).

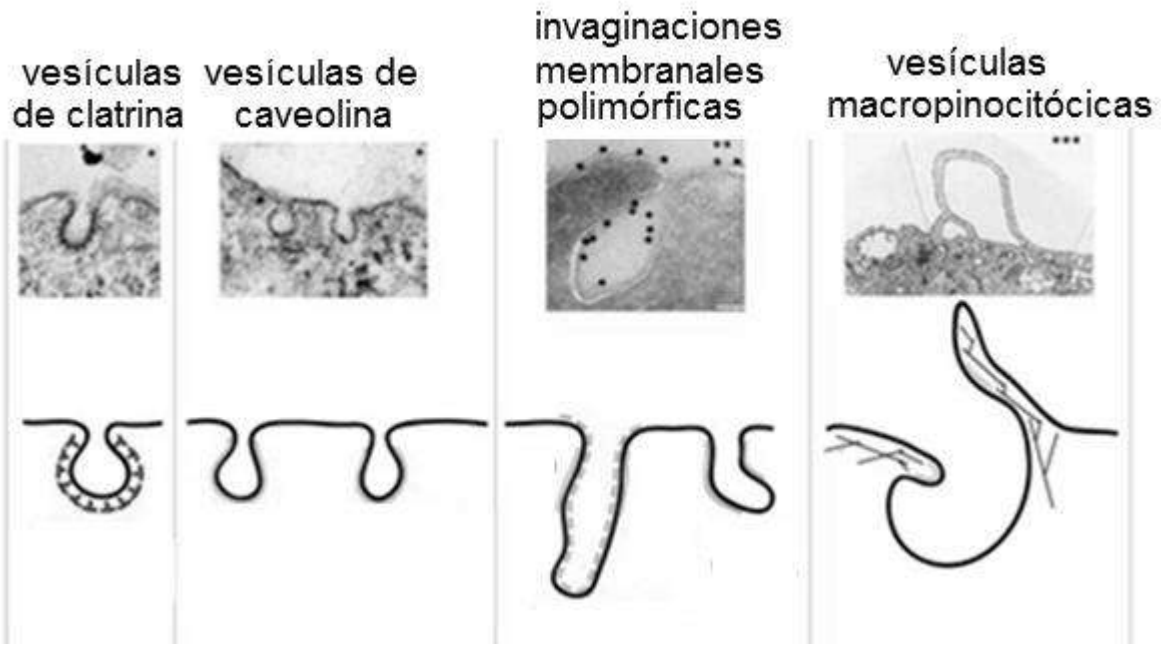


Figura 4. Mecanismos moleculares de endocitosis. Ultraestructura de los distintos intermediarios vesiculares más relevantes del transporte membranal, las distintas proteínas que recubren a las vesículas participan en la especificidad y tipo de vesícula (Tomado de Hansen y Nichols, 2009).

1.2 COMPONETES DEL TRÁFICO VESICULAR

1.2.1 GEMACIÓN

El transporte vesicular entre membranas adyacentes, es controlado al menos en cuatro puntos: 1) en la clasificación de la proteína, 2) en la formación y transporte de vesículas, 3) en la liberación de la proteína a la membrana donadora y 4) en el reciclado de la maquinaria de transporte hacia la membrana donadora. La formación de vesículas (gemación) es un proceso complejo que involucra múltiples etapas, que se tienen que cumplir con el fin de producir una vesícula funcional. En primer lugar, los diferentes procesos de transporte vesicular están mediados por diferentes complejos de proteína de cubierta, y por lo tanto una membrana donadora debe reclutar las proteínas citosólicas correctas que formarán parte de la cubierta de la vesícula. En segundo lugar, una vesícula de transporte necesita estar equipada con ciertas proteínas de membrana que tienen una función esencial en una etapa posterior. Las proteínas v-SNARE (v del inglés vesicle; SNARE, por sus siglas en inglés: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor), por ejemplo, son necesarias para la fusión con la membrana aceptora, estas última tienen una proteína denominada t-SNARE (t- del inglés target), la t-SNARE interactúa con la v-SNARE especifica; estas proteínas v-SNARE deben ser incluidas en las vesículas para generar una alta fidelidad con la membrana aceptora. En tercer lugar, las proteínas de carga tienen que ser reconocidas e incluidas en las vesículas de origen (Springer y *col.*, 1999).

Existen múltiples proteínas involucradas en la biogénesis de una vesícula de transporte (Figura 5). Como las denominadas proteínas G o GTPasas, las cuales están involucradas en el transporte y formación de vesículas. Un punto importante de control de transporte vesicular es la gemación. Para que se lleve a cabo la formación de una vesícula, se requiere de la participación de una serie de proteínas de recubrimiento (Figura 5). Estas cubiertas son utilizadas como un medio mecánico para que las vesiculas puedan gemar y dirigirse hacia su destino (Springer y *col.*, 1999).

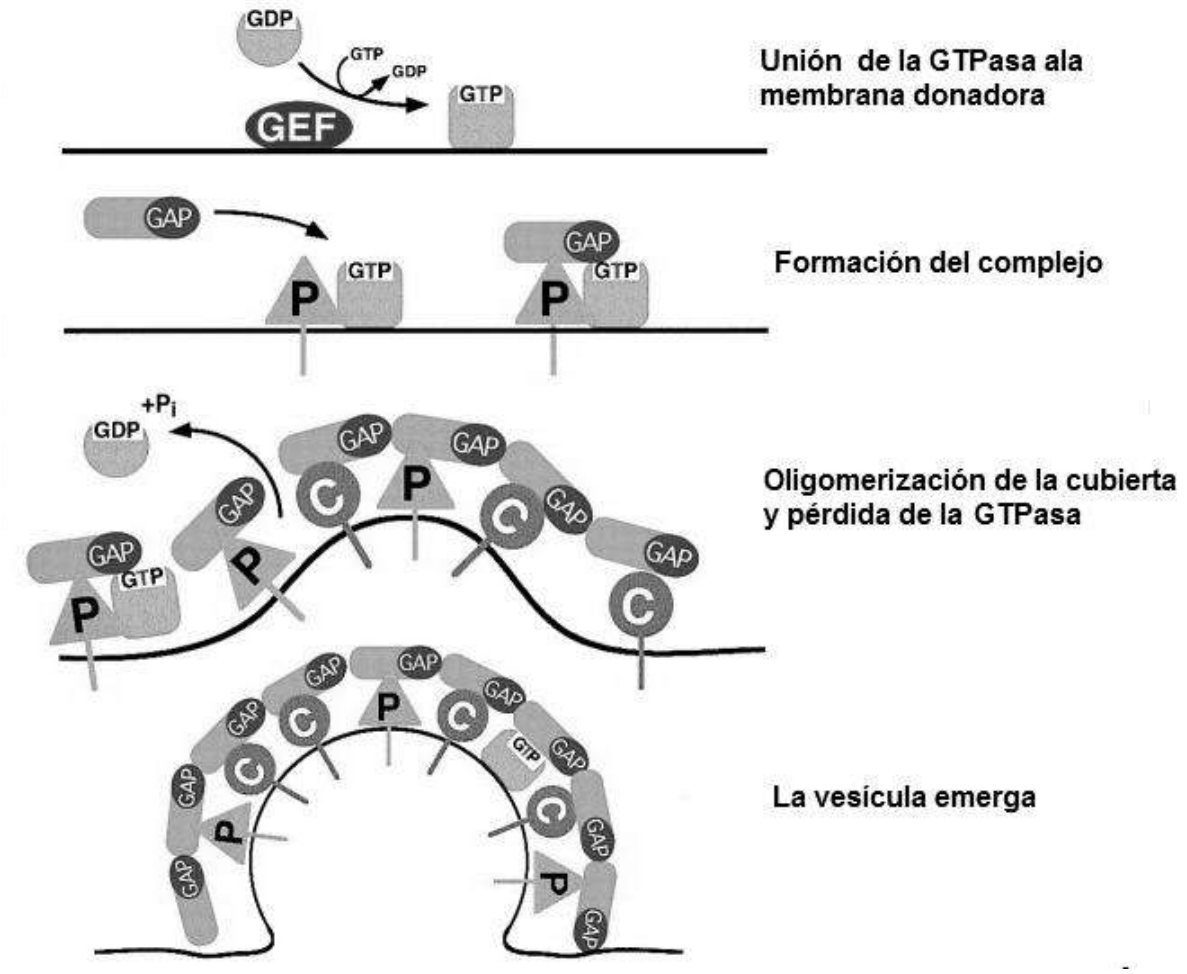


Figura 5. Mecanismo general de la formación de una vesícula de transporte. La pequeña GTPasa es reclutada a la membrana donadora por su factor de intercambio de nucleótidos guanina (GEF). La GTPasa se une a la membrana en su estado GTP (panel superior). A continuación, un componente de cubierta, un dímero que contiene una proteína activadora de GTPasa, GAP reconoce tanto a la GTPasa y a una proteína de membrana (por ejemplo, un v-SNARE) que actúa como un cebador (P) formando un complejo. Entonces, el complejo se asocia con más proteínas de la cubierta. La proteína cargo (C) también es reclutada . Proteínas GAP en la cubierta puede ser activada y estimular las GTPasas para hidrolizar GTP a GDP permitiendo la disociación de las GTPasas para comenzar otro ciclo. Por último la vesícula se deforma y emerge de la membrana donadora (Tomado de Springer, 1999).

Se han caracterizado principalmente dos tipos de proteínas de cubiertas una denominada clatrina, que participa en la endocitosis mediada por receptor y en el transporte de proteínas lisosomales y vacuolares en la red *trans*-Golgi, y las revestidas de coatómero (complejo proteíco formado por siete subunidades de revestimiento, COPl y COPll) las cuales están involucradas en el transporte entre el RE y el aparato de Golgi. Ambos tipos de complejos proteícos de cubierta interactúan con las colas citoplásmaticas de proteínas de membrana en secuencias aminoacidicas específicas (Jiménez, 2003).

La proteína clatrina, consta de tres cadenas pesadas, ordenadas en forma de trípode, denominado triesquelión. Los triesqueliones unidos a la membrana conforman una red poliédrica lo que permite la invaginación de la membrana, hasta que se produce la gemación de unas vesícula y ésta se desprende de su unión a la membrana con la ayuda de una proteína denominada dinamina, un tipo de GTPasa. Al poco tiempo de producirse la gemación de la vesícula el esqueleto de la clatrina se vuelve a separar dejando libre la vesícula ”desnuda” la cual se acopla a los endosomas, los precursores inmediatos de los lisosomas maduros. Las proteínas tipo COP disponen su red en una zona limitada de la bicapa lipídica, liberando a continuación una vesícula desde su zona de unión de membrana (Jiménez, 2003).

1.2.2 PROTEÍNAS G EN EL TRÁFICO VESICULAR

En la biogénesis vesicular actúan diversas proteínas, como las proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G). Existen dos claces de proteínas G dependiendo del peso molecular y estructura: las proteínas G monoméricas, son de bajo peso molecular y constan de una sola subunidad, mientras que las proteínas G heterotriméricas son de un peso molecular mas alto y formadas por tres subunidades (alfa, beta y gama) dicho heterotrimero funciona como un transductor de los receptores de la membrana plasmática.

Se han identificado alrededor de 100 proteínas G monoméricas en eucariotes, las cuales estan incluidas en la superfamilia de Ras. Los integrantes de esta superfamilia se han agrupado en 5 familias: RAS, RHO, RAB, ARF y RAN. Los miembros de RAS principalmente regulan eventos de transformacion celular y expresión génetica; los miembros de RHO regulan tanto la organización del citoesqueleto como la expresión genética; RAN regulan el transporte nucleocitoplásmico durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular (Barandier y *col*., 2003). Las proteínas ARF y RAB son las principales involucradas en la formación de vesículas. Las proteínas ARF y RAB junto con las proteínas de tipo SNARE y otras proteínas permiten la generación de las vesículas (Springer y *col*, 1999).

1.2.3 PROTEÍNAS ARF EN EL TRÁFICO VESICULAR

Las proteínas de la familia ARF tienen un peso molecular de alrededor de 20 kDa y han sido descritas en todas las células eucarióticas. Estos factores fueron inicialmente caracterizados bioquímicamente debido a su capacidad de estimular la actividad de ADP-ribosiltransferasa de la subunidad α de la toxina del cólera (Moss y Vaughan, 1995; Gillingham y Munro, 2007).

Las proteínas ARF tienen una función crucial en el metabolismo de las vesículas, incluyendo el reclutamiento de las proteínas que constituyen su cubierta para iniciar la formación y gemación de las mismas (Popoff y *col*., 2011). De esta manera, las proteínas ARF participan en el tráfico vesicular entre diversos compartimientos celulares, como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los endosomas, la envoltura nuclear, etc. (Moss y Vaughan, 1995).

Las proteínas ARF, al igual que otras GTPasas ciclan entre un estado activo en el cual mantienen unido al nucleótido GTP (ARF-GTP) y un estado inactivo uniendo al GDP (ARF-GDP) (Figura 6). Este ciclo es iniciado por proteínas intercambiadoras de nucleótidos denominadas GEP (GEP, del inglés Guanine Exchange Proteins) (Donaldson y Jackson, 2011).

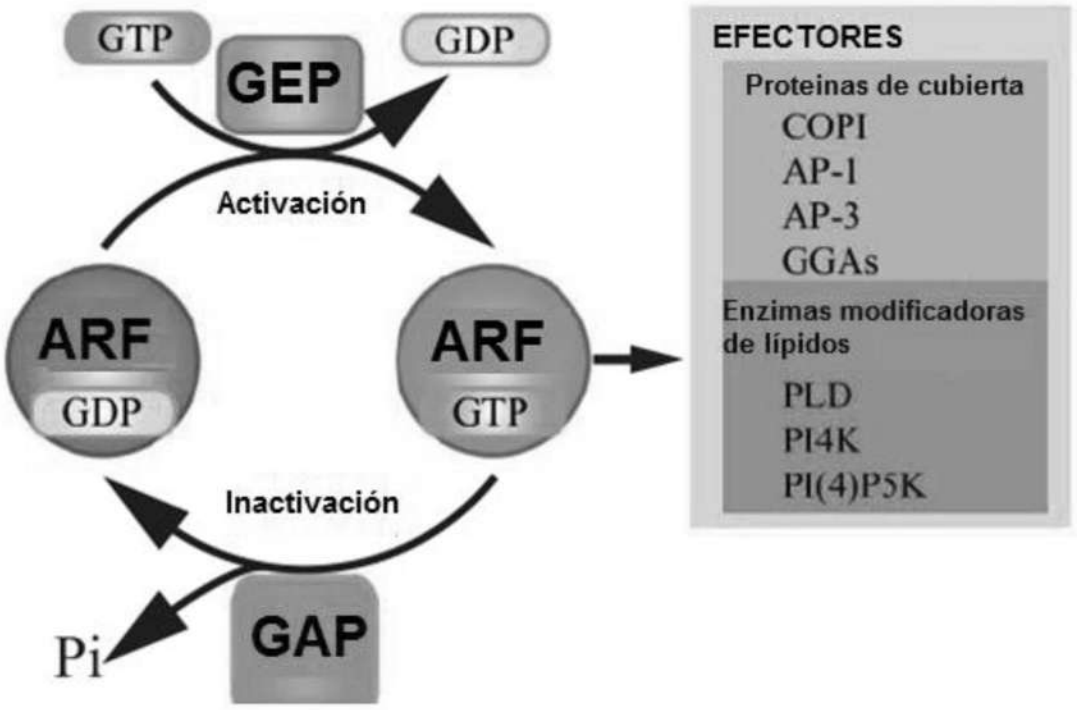


Figura 6. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas ARF. La proteína ARF unida a GDP mantiene un estado inactivo. El intercambio de GDP por GTP es catalizado por proteínas GEP. La proteína ARF unida a GTP es capaz de interactuar con varias proteínas. La molécula de GTP unida a la proteína ARF es posteriormente hidrolizada a GDP por medio de proteínas tipo GAP (Modificado de Shin y Nakayama, 2004).

Las proteínas GEP aceleran el intercambio del GDP a GTP permitiendo la activación de las proteínas ARF, este intercambio es un paso crítico para la regulación vesicular (Figura 6). Todos los complejos ARF-GEP identificadas hasta el momento poseen un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos denominado Sec7, responsable de la actividad de GEP (Cox y *col*., 2004). El dominio Sec7 es el blanco molecular del metabolito fúngico brefeldina A (BFA) (Misumi y *col*., 1986), lo cual ha permitido clasificar a las proteínas GEP en sensibles (Morinaga y *col*., 1997) y resistentes a la acción de BFA (Chardin y *col*., 1996).

El estado activado de las proteínas ARF finaliza cuando la actividad intrínseca de GTPasa es aumentada significativamente por las proteínas activadoras de GTPasa denominadas GAP (GTPase Activating Protein). Se han identificado más de 30 genes en humano que codifican proteínas con dominios catalíticos de ARF-GAP (Shin y *col*., 2008).

Las funciones biológicas de las proteínas ARF son el resultado de sus interacciones específicas con diversas proteínas efectoras (Donaldson y Jackson, 2011). Las proteínas ARF en su estado activado (ARF-GTP) se unen directamente con sus efectores. Algunos efectores pertenecen a los complejos de la cubierta vesicular como clatrina, COPI, las proteínas adaptadoras AP (Adaptor Protein) y GGA 1-3 (Golgi-associated, Gamma adaptin ear-containing ARF-binding proteins). Las proteínas ARF reclutan a las proteínas de cubierta y adaptadoras, conduciendo a la formación y al destino de vesículas junto con la proteína cargo contenida en el interior de éstas (Dell'Angelica y *col*., 2000; Donaldson y Jackson, 2011) (Figura 7). Además, las proteínas ARF en su estado activado tienen la capacidad de interactuar y activar ciertas enzimas modificadoras de lípidos como la fosfolipasa D1 (PLD), fosfatidilinositol-4,5-cinasa (PI(4)P5K) y la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K), las cuales se cree promueven la remodelación de las membranas (Donaldson y Jackson, 2011). Se ha sugerido, que algunos miembros de las proteínas ARF están involucrados en la biogénesis de ciertos organelos (Anthonio y *col*., 2009).

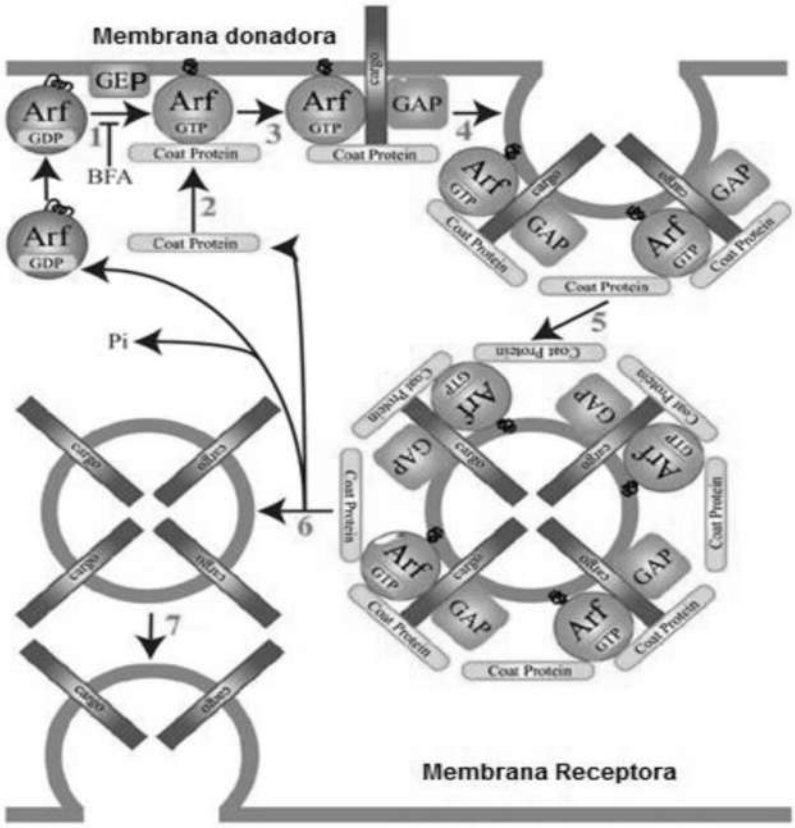


Figura 7. Regulación de la formación de vesículas por proteínas ARF (1) Intercambio de nucleótidos de guanina por parte de una proteína GEP a una proteína ARF unida a GDP (ARF-GDP), la cual se encuentra en el citosol o ligeramente asociada a la membrana, es convertida a una forma unida a GTP (ARF-GTP). La proteína ARF-GTP se asocia fuertemente con la membrana, y esta reacción es bloqueada por brefeldina A. (2) Las proteínas ARFs-GTP reclutan a proteínas de la cubierta desde el citosol. (3) Las proteínas ARFs y de cubierta atrapan a la proteína cargo en la membrana donadora. Una proteína GAP también es reclutada a la membrana, pero su actividad puede ser inhibida por la proteína cargo. (4) Inhibición de la actividad de GAP que permite la polimerización de las proteínas de cubierta y como consecuencia ocurre la deformación de la membrana. (5) La vesícula emerge por gemación de la membrana donadora. (6) A medida que la membrana se curva, se incrementa la actividad de GAP, generando la hidrólisis de GTP y la disociación de la proteína ARF-GDP, las proteínas de cubierta y la proteína GAP. (Bigay y *col*., 2003). (7) Las vesículas desprovistas de las proteínas de cubierta se fusionan a una membrana receptora adecuada (Shin y y Nakayama, 2004).

El mecanismo de ensamblado de los constituyentes de las proteínas COPI involucra a la proteína ARF con diversas proteínas (Figura 7). Las membranas donadoras, listas para la gemación de vesículas, poseen un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), que convierte el ARF-GDP inactivado en la forma activa cargada con GTP. A continuación el ARF-GTP se une a la membrana donadora. El ARF-GTP recluta una red de proteínas COPl que prepara la gemación de la vesícula, el recubrimiento de proteínas COPl no se separa tras la escisión de la vesícula de la membrana donadora, sino hasta que llega a la membrana receptora. El complejo ARF-GTP es en realidad un tipo de GTPasa de acción “lenta” y requiere la intervención de una proteína activadora de GTPasa (GAP) en la membrana aceptora, que aumenta considerablemente la velocidad de hidrolisis del GTP generando GDP y Pirofosfato (Pi). Posteriormente, la proteína ARF vuelve a adoptar su forma inactiva ARF-GDP. Preparando así el desmontaje del andamiaje de proteínas COPl y dejando lista la vesícula para que pueda fusionarse con la membrana receptora. El complejo ARF-GDP se suelta de la membrana receptora y se difunde de nuevo hacia la membrana donadora para estar listo para un nuevo ciclo de gemación de vesículas (Müller-Sterl, 2008)

1.3 PROTEÍNAS ARF ATÍPICAS EN EL TRÁFICO VESICULAR

Se han descrito dominios ARF en algunas proteínas, como es el caso de la proteína ARD1 (ADP-Ribosylation factor Domain protein 1) (Mishima y *col*., 1993). En este sentido, la proteína ARD1 es un miembro atípico de la familia ARF, asociada a lisosomas y al aparato de Golgi, estos organelos forman parte del sistema endomembranoso involucrados en la recepción y generación de vesículas, respectivamente (Mishima y *col*., 1993; Vitale y *col*., 1998).

La región amino terminal de ARD1 posee un dominio con actividad de GAP (residuos 101-333) capaz de activar la actividad de GTPasa del dominio ARF de ARD1, generando de esta manera ARD1 inactivado en el dominio ARF (ARD1-GDP) (Vitale y *col*., 1997a). Además, se ha reportadó una secuencia de 15

aminoácidos (residuos 387-402) precediendo al dominio ARF de ARD1 que actúa como un inhibidor de la disociación de GDP (GDI, del inglés GDP-Dissociation Inhibitor), promoviendo, por lo tanto, su unión de GDP (Vitale y *col*., 1997b) (Figura 8).

La proteína intercambiadora de nucleótidos (GEP) citohesina 1 interacciona físicamente con el dominio ARF de ARD1 y dicha interacción se ve favorecida significativamente con la forma ARD1-GDP. Por otra parte, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) conduce a la relocalización de citohesina 1 del citosol hacia la membrana plasmática (Venkateswarlu y *col*., 1999).

Además de ser un miembro de la familia ARF, ARD1 contiene tres dominios estructurales distintivos, que en conjunto se les denomina dominio RBCC (constituido por un dominio RING finger; uno o dos dominios B-BOX y un dominio Coiled-Coil). Esto ubica a ARD1 en la familia de proteínas TRIM (TRIM por sus sigas en inglés tripartite motif) recibiendo el nombre de TRIM23 (Ozato y col., 2008). El dominio “coiled-coil” está involucrado en la interacción proteína-proteína. El dominio RING (Really Interesting New Gene) finger posee actividad de E3 ubiquitina ligasa, involucrada en el proceso de ubiquitinación (Reymond y *col*., 2001).

La ubiquitinación es una modificación postraduccional que involucra la transferencia de una o varias moléculas de ubiquitina a una proteína blanco. La ubiquitinación es un proceso jerárquico que involucra la participación de tres enzimas, E1, E2 y E3. Se ha identificado una única E1, docenas de E2 y cientos de E3. El genoma humano muestra cerca de 800 genes que potencialmente codifican E3 ubiquitina ligasas y las mismas se consideran como un factor clave para la especificidad en la ubiquitinación de la proteína blanco (Deshaies y Joazeiro 2009; Kravtsova-Ivantsiv y Ciechanover, 2011).

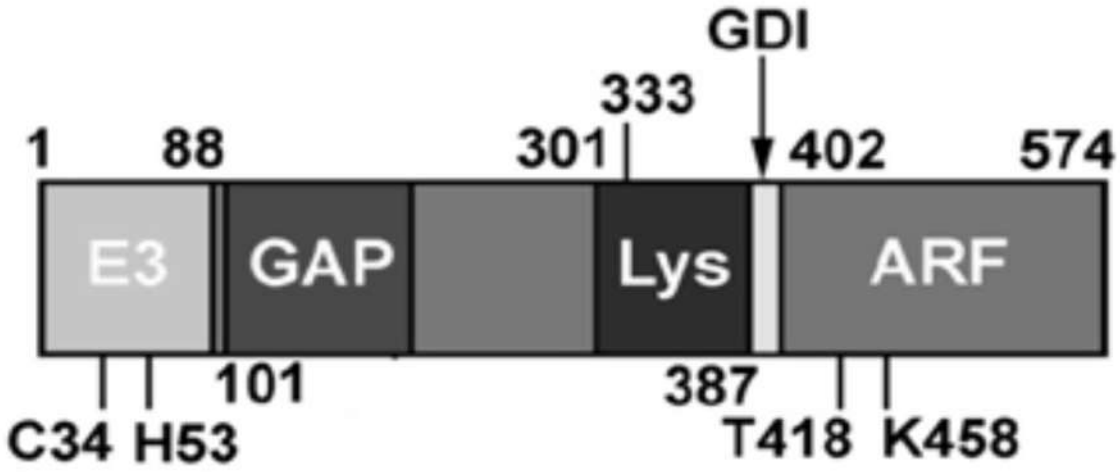


Figura 8. Dominios funcionales de ARD1/TRIM23. La proteína ARD1/TRIM23 tiene 574 residuos aminoacidicos. El dominio de E3 ubiquitina ligasa (residuos 31-75; E3) con los residuos C34 y H53 esenciales para esta actividad. Dominio GAP (residuos 101-333). Los residuos 301-402 (región "Lys") de ARD1 actúan como secuencia señal hacia lisosomas. La región 387-402 actúa como un inhibidor de la disociación de GDP (GDI). El dominio ARF (residuos 402-574). Las mutaciones en la región ARF T418N y K458I anulan la unión de GTP o actividad de GTPasa, respectivamente (Modificado de Meza-Carmen y *col*, 2011).

La ubiquitinación está involucrada en numerosos procesos celulares y por lo tanto es un área importante de investigación en varios aspectos de la biomedicina (Weissmanl y *col*., 2011; Kravtsova-Ivantsiv y Ciechanover, 2011). Además, de participar en la degradación de proteínas por el proteosoma, a la ubiquitinación también se le ha atribuido un papel en la transducción de señales (Chen, 2005). La desregulación en la ubiquitinación se ha relacionado con algunas enfermedades humanas como cáncer, desórdenes neurológicos (Parkinson, Alzheimer), infecciones, problemas inmunológicos, etc. (Reymond y *col*., 2001).

1.4 PROTEÍNAS ARF EN MAMIFEROS Y *Saccharomyces cerevisiae*

Las proteínas ARF son ubicuas y muy conservadas, se ha aprovechado de la alta identidad de estas proteínas para estudiar su función en *Saccharomyces cerevisiae*. (Stearns, 1990).

Basados en la secuencia primaria, estructura y análisis filogenético de las proteínas ARF, éstas están agrupadas en tres diferentes clases: clase I (ARF1, ARF2 y ARF3), clase II (ARF4 y ARF5) y clase III (ARF6) (Donaldson y Jackson, 2011). Se conocen tres genes ARF (*ARF1, ARF2 y ARF3*) en *S. cerevisiae ARF1* y *ARF2* participan en el tráfico vesicular (Lee, 1994). Las proteínas codificadas por estos dos genes son 96% idénticas entre si. La interrupción del gen *ARF1* causa un crecimiento lento, sensibilidad al frío y a las concentraciones normalmente subletales de ion fluoruro. La interrupción del gen *ARF2* no causa ningún fenotipo detectable, por lo contrario la interrupción de ambos genes (*ARF1, ARF2*) es letal, por lo que las proteinas ARF son esenciales para el crecimiento mitótico. Las proteínas codificadas por estos dos genes, *ARF1*, *ARF2* son funcionalmente homólogas y las diferencias fenotípicas entre las mutaciones en los dos genes puede ser explicada por el nivel de expresión; *ARF1* produce aproximadamente el 90% del total de las proteinas ARF. Pero la interrupción de alguno de los dos genes (*ARF1, ARF2*) puede ser reparado por su homólogo (Stearn, 1990).

Mientras que la proteína ARF3 muestra un 60% de identidad con las proteínas ARF de la clase III de mamífero, las ARF1 y ARF2 presentan 52-56% de similitud respectivamente con ARF3. La proteína ARF3 no es esencial para la viabilidad celular y no esta relacionada con el trasporte de proteínas del RE y el Golgi (Lee, 1994).

El dominio ARF de la proteína ARD1/TRIM23 carece de una secuencia correspondiente a un dominio de α-hélice en el extremo N-terminal que esta presente en todas las proteínas ARF; en esta alfa hélice se encuentra el sitio de miristoilación (adición postraduccional de un ácido graso saturado de 14 carbonos a través de una unión amida en un residuo de glicina en el N-terminal) dicha modificación postraduccional tiene un papel importante en su asociación a la membrana, sin embargo la similitud estructural, sugiere que ARD1 puede tener una función fisiológica comparable a la de las proteínas ARF (Zhang y *col.,* 1998).

El dominio ARF de la proteína ARD1/TRIM23 de *Mus musculus* presenta una identidad del 58% con ARF1 y ARF2 de *S. cerevisiae* respectivamente, sin embargo difieren en la presencia de una alfa hélice de 15 aminoácidos en la región amino terminal de las proteínas ARF1 y ARF2 de *S. cerevisiae* (Figura 9).

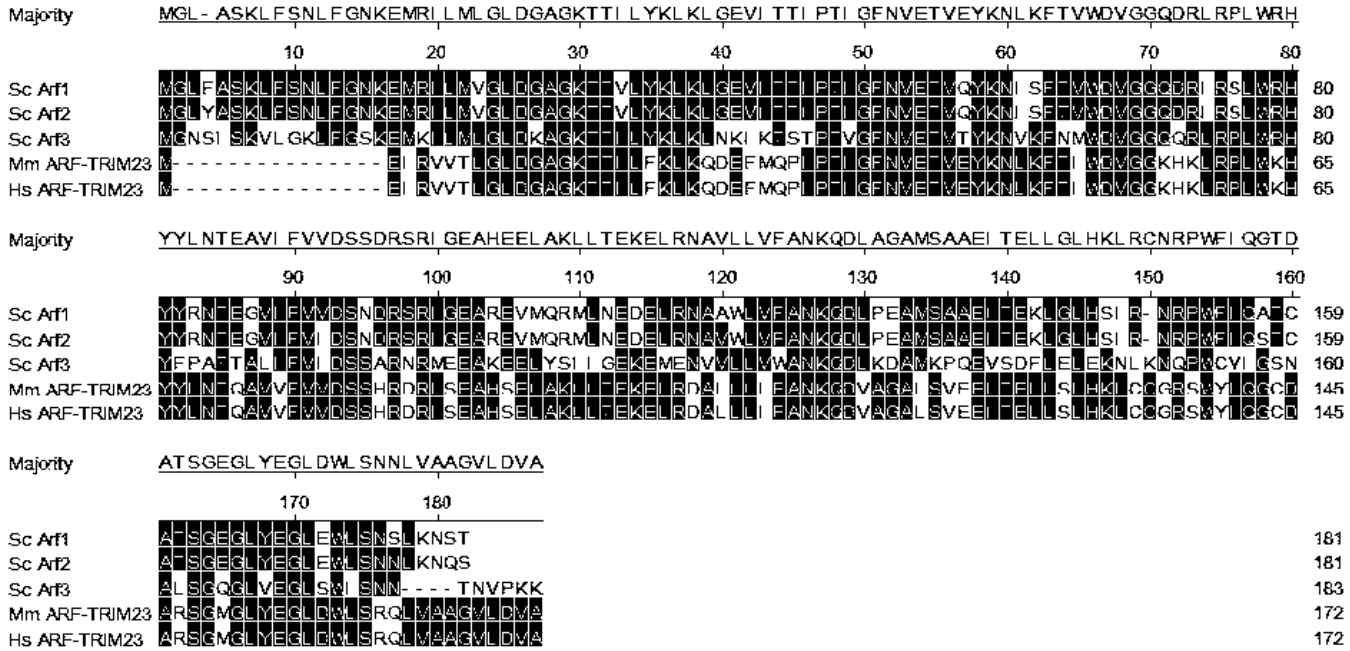


Figura 9. Alineamiento de las proteínas ARF de *S. cerevisiae* y el dominio ARF de las proteínas ARD1/TRIM23 de *Mus musculus y Homo sapiens*. En color negro se muestran los aminoácidos idénticos entre la secuencias del dominio ARF la proteína ARD1/TRIM23 de mamífero y las proteínas ARF (ARF1, ARF2 Y ARF3) de *S. cerevisiae* y los números representan la cantidad de aminoácidos que contiene cada dominio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la fusión traduccional del dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* de *Mus musculus* con el dominio de la alfa hélice del gen *ARF1* de *S. cerevisiae* y su correspondiente expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Construir una fusión del dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* de *Mus musculus* con la alfa hélice del gen *ARF*1 de *Saccharomyces cerevisiae* (*ARF*-MS)
2. Transferir el gen recombinante *ARF*-MS a cepas de referencia
3. La expresión de la proteína recombinante *ARF*-MS en *Saccharomyces cerevisiae*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas y plásmidos que se utilizaron en este trabajo se representan en el cuadro 3. 1.

3.2 MEDIO DE CULTIVO

3.2.1 MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS

MEDIO LB MODIFICADO

Peptona 10 g

Estracto de levadura 5 g

NaCl 5 g

Agua destilada 1 cbp L

Cuadro 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS	**CARACTERISTICAS**	**REFERENCIAS**
Levaduras		
Saccharomyces cerevisiae BY4741	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met 15Δ0; ura3Δ0	Colección de cepas Euroscarf
Saccharomyces cerevisiae BY4741 (*ARF*-MS-pYES2/CT)	BY4741 transformada con *ARF*-MS-pYES2/CT	Este trabajo
Bacterias		
Escherichia coli JM101	Cepa estándar de laboratorio; *supE, thi,* Δ(*lac- proAB*), [F´,*traD36, proAB, lacI*^{q} Z ΔM 15]	Yanish-Perron *et al*., 1985
E. coli JM101 (*ARF*-MS-pGEM)	JM101 Transformada con *ARF*-MS-pGEM-	Este trabajo
E. coli JM101 (*ARF*-MS-pYES2/CT)	JM101 Transformada con *ARF*-MS-pYES2/CT	Este trabajo
Plásmidos		
pGENE-TRIM23	Plásmido que contiene el gen de *ARD1/TRIM23* de *M. musculus*	Meza-Carmen y *col*., 2005
pGEM-T Easy	Plásmido usado para la clonación del producto de PCR	Promega
pYES2/CT	Vector para expresión de proteínas recombinates en *Saccharomyces cerevisiae*	Invitrogen
ARF-MS- pGEM	pGEM-T Easy con el fragmento *ARF*-MS de .6 kb	Este trabajo
ARF-MS-pYES2/CT	pYES2/CT con el fragmento *ARF*-MS de .6 kb de *ARF*-MS-pGEM	Este trabajo

Para la preparación de medio sólido se añade agar (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121ºC durante 15 min.

Para preparar agar LB con ampicilina (Xgal-IPTG), se agrega 100 μl de la solucion estock de ampicilina (100 mg/ml), 40 μl de Xgal (50 mg/ml) y 30 μl de IPTG (100 mg/ml) para 100 ml de agar.

3.2.2 MEDIOS DE CULTIVOS DE LEVADURAS

MEDIO YPD

Extracto de levadura 10 g

Peptona 20 g

Glucosa 20 g

Agua destilada cbp 1L

Para la preparación del medio sólido se añadió agar (20 g/L).

3.2.3 MEDIO MÍNIMO

YNB (sin aminóacidos) 6.7 g

Dropout (- uracilo) 2 g

galactosa 20 g

Agua destilada cbp1 L

Para la preparación de medio sólido se añadió agar (20 g/L).

3.3 CONSTRUCCIÓN DEL GEN *ARF*-MS

Se diseñaron oligonucleótidos especificos (Cuadro 2), lo cual permitió la amplificación por PCR de la alfa hélice del gen *ARF1* de *S. cerevisiae*. Ademas, se fusionó dicha alfa hélice al dominio ARF de *ARD1/TRIM23* para obtener un producto al que se le denominó *ARF*-MS. Se utilizó la enzima Taq platinum DNA polimerasa recombinante de Invitrogen para realizar las reacciones de PCR.

Para la clonación del fragmento de DNA en el plásmido de expresión se diseñaron oligonucleótidos modificados con sitios de restricción para las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l (Cuadro 2).

La confirmación de cada una de las amplificaciones en las reacciones de PCR se realizó mediante electroforesis de geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) (40 mM Tris-Acetato, 10 mM EDTA pH 8). Para cargar las muestras se utilizó buffer de carga para DNA 6X (0,25% Azul de bromofenol y 30% Glicerol). Las bandas de DNA se visualizaron mediante tinción en una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 a 10 min y la posterior exposición a luz ultravioleta. Para estimar el tamaño de las moléculas se utilizó el marcador de tamaño de DNA de 1kb DNA ladder (Fermentas), así como el cromosoma del fago lambda cortado con las enzimas *Hin*dIII y *Eco*RI.

3.4 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO *ARF*-MS

La purificación de la banda de DNA correspondiente a la amplificación de *ARF*-MS se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%, para lo cual se utilizó un sistema de purificacion de DNA basado en la adsorción a sílica de los ácidos nucléicos, c

on el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y fusión del domino ARF de *ARD1/TRIM23* de ratón con la alfa hélice de *ARF1* de *S. cerevisiae.*

Nombre	Secuencia
1FW. HelixARF-1	5’ TTT GGT AAC AAA GAA ATC CGA GTA GT 3’
2FW. HelixARF-2	5' CAG TAA CCT TT TGG TAA CAA AGA AAT 3’
3FW. HelixARF-3	5' CTA AGT TGT TCA GTA ACC TTT TTG GTA 3’
4FW. HelixARF-4	5' GTT TGT TTG CCT CTA AGT TGT TCA GTA 3’
5FW. HindIIIHelixARF	5' **AAG CTT**[a] ATG GGT TTG TTT GCC TCT AA 3’
VF. Xholtrim23	5'C**TC GAG**[b] AGC AAC ATC CAA CAC TCC AG 3’

[a]Sitio de reconocimiento de la enzima *Hin*dlll.

[b]Sitio de reconocimiento de la enzima *Xho*l .

Cuadro 3. Resumen de los dos programas utilizados para realizar PCR.

Etapa		Programa 1		Programa 2	
Desnaturalización inicial		TCº	Tiempo	TCº	Tiempo
		95	1 min	95	3 min
Desnaturalización	35 ciclos	95	30 seg	94	30 seg
Hibridación		50	30 seg	54	30 seg
Extensión		72	30 seg	72	1 min
Extensión final		72	7 min	72	7 min

Cuadro 4. Condiciones utilizadas para las reacciones de PCR

REACTIVOS	PCR 1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5
H2O	36 µl	36 µl	36 µl	36 µl	37.5 µl
MgCl2	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
BUFFER 10X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
DNTPs	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1.5 µl
OLIGO DIRECTO	(HelixARF-1) 1 µl	(HelixARF-2) 1 µl	(HelixARF-3) 1 µl	(HelixARF-4) 1 µl	(HindIIIHelixARF) 1 µl
OLIGO REVERSO	Xholtrim23 1µl	Xholtrim23 1µl	Xholtrim23 1µl	Xholtrim23 1µl	Xholtrim23 1µl
DNA molde	Plásmido pGENE-TRIM23 2µl	Producto PCR1 2µl	Producto PCR2 2 µl	Producto PCR3 2 µl	Producto PCR4 1 µl
DNA POLIMERASA	Taq platinum 1.5 µl	Taq platinum 1.5 µl	Taq platinum 1.5 µl	Taq platinum 1.5 µl	Taq platinum 1.5 µl
PROGRAMA	1	1	1	1	2

3.5 CLONACIÓN DE *ARF-MS* EN VECTOR BACTERIANO

Se usó el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega) para clonar el gen recombinante *ARF*-MS, este vector confiere resistencia a ampicilina y permite la selección de colonias por su tonalidad de blanco/azul, previamente adicionando al medio Xgal e IPTG. La ligación al vector se realizó mezclando buffer 10x T4 DNA ligasa (1 µl), agua desionizada (4.5 µl), producto de PCR purificado (2 µl), pGEM-T ligasa (0. 5 µl), T4 DNA ligasa (2 µl) y manteniéndola 3 h a temperatura ambiente.

3.6 OBTENCIÓN DE CELULAS ELECTROCOMPETENTES

Las células de *E. coli* JM101 competentes se prepararon mediante el siguiente procedimiento:

1. Se inoculó un tubo con 3 ml de medio CLB (medio LB liquido) con 20 µl de la cepa JM101 de *E. coli*, posteriormente se incubó por 12-18 h a 37ºC toda noche con agitación constante.
2. Se transfirió 3 ml de medio en un matraz de 1L con 250 ml de medio CLB.
3. Se incubó el matraz por 4 h a 37ºC con agitación constante hasta registrar una absorbancia de .6 a .8 a una longitud de onda de 600 nm. Se utilizó como blanco medio CLB sin cultivo.
4. Se transfirió el matraz con células a un recipiente con hielo por 15 min y se mezcló cada 5 min.
5. Se adicionó 40 ml del medio previamente enfriado a 6 tubos Falcon fríos y se centrifugó a 4 ºC, 5500 rpm por 10 min.
6. Se descartó el medio y posteriormente la pastilla se resuspendió en 5 ml de agua fría: se aforó a 40 ml y se centrifugó a 4 ºC, 5500 rpm por 10 min.
7. Se descartó el agua y la pastilla se resuspendió en 5 ml de glicerol al 10% frío.
8. Se mezcló la suspensión de tres tubos en un tubo, se aforó a 30 ml con glicerol al 10% y se centrifugó a 4ºC, 5500 rpm por 10 min.

9. Por ultimo las células se resuspendieron en 1.5 ml de glicerol al 10%.
10. Las células se dividieron en alícuotas de 100 µl y se almacenaron a -70ºC.

.

3.7 TRANSFORMACIÓN CON pGEM-T Easy

Se siguió el siguiente procedimiento de electroporación para la transformación de las células competentes.

1. A 100 µl de células competentes (*E. coli* JM101), se le adiconó 2 µl de la mezcla de ligación de DNA plasmídico, posteriormente la mezcla se colocó entre los electrodos de la celda y la celda en el electroporador, se dio un pulso de 2.4 kV durante 4 miliseg.
2. Inmediatamente las células fueron transferidas a un tubo con 1 ml de medio CLB y se incubaron a 37ºC durante 1 h con agitación constante.
3. Posteriormente se plaquearon en cajas de agar LB ampicilina Xgal IPTG.
4. Las cajas se incubaron a 37ºC toda la noche.

3.8 SELECCIÓN DE LAS TRANSFORMANTES BACTERIANAS

La selección de las colonias transformantes se llevó a cabo mediante el sistema de complementación al añadir ampicilina, X-Gal e IPTG al medio de cultivo sólido. La distinción de las colonias transformantes se hizo por el color.

3.9 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO BACTERIANO

De las colonias transformantes se realizó el aislamiento del DNA plasmidico de la siguente manera:

1. Se creció la colonia transformante en 3 ml de medio CLB con ampicilina (100 mg/ml) de 12-18 h.

2. El cultivo se centrifugó a 12000 rpm por 2 min.
3. El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 150 µl de la solucion STE (sacarosa 50 mM; Tris 25 mM; EDTA 10 mM; pH 8) se agregó 20 µl de lizozima (20 mg/ml); se mezcló e incubó a 37ºC durante 5 min.
4. Se agregó 200 µl de una solucion recién preparada de NaOH al 0.2 N y se mezcló e incubó 5 min en hielo.
5. Se agregó 150 µl de una solución de acetato de potasio o de sodio 3 M y un pH de 4.8 y se incubó 10 min en hielo.
6. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y se agregó 150 µl de fenol-cloroformo (1:1) se vortexeó por 1 min y se centrifugó 4 min a 12000 rpm.
7. Se trasfirió la fase superior en un tubo limpio y se agregaó 500 µl de etanol/isopropanol (60/40%) y se incubó 10-15 min en hielo.
8. Se centrifugó 4 min a 12000 rpm y se desechó el sobrenadante.
9. Se lavó la pastilla 1 o 2 veces con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó 3 min a 12000 rpm.
10. Se seco la pastilla y se resuspendió en 50 µl de H_2O esteril.
11. Se agregaó 3 µl de RNAsa y se incubó 30 min a 37ºC.

Despues del aislamiento se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar el tamaño del plásmido, mediante la comparación con un marcador de tamaño de DNA.

La presencia del fragmento (*ARF*-MS) en el plasmido pGEM-T Easy, se confirmó por restricción con las enzimas (*Hin*dlll *y Xho*l), con lo cual se liberó dicho fragmento del plásmido. La visualización de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, confirmando los tamaños de las bandas esperadas con el marcador de tamaño de DNA: la banda de DNA correspondiente al fragmento (*ARF*-MS) fue purificada a partir de dicho gel.

3.10 REACCIÓN DE LIGACIÓN EN EL PLÁSMIDO pYES2/CT

El fragmento *ARF*-MS purificado se obtuvó a partir de la digestion con las enzimas *Hind*III *y Xho*I, al igual el plásmido pYES2/CT fue cortado con las mismas enzimas, posteriormente se realizó una ligación del fragmento purificado y el vector linearizado con la enzima T4 DNA ligasa en un volumen final de 10 µl.

Finalmente se realizó la tranformación de *E. coli* con la mezcla de ligación y se aisló el DNA plasmídico. Se realizó digestión con las enzimas de restricción (*Hin*dlll y *Xho*l) de los presuntos plásmidos recombinates. El producto de la digestión enzimática fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% junto con el marcador de tamaño de DNA para confirmar el tamaño de las bandas.

3.11 TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae.*

Se realizó la transormación de la levadura *S. cerevisiae* (cepa BY4741) con el plásmido pYES2/CT que tiene el fragmento (*ARF*-MS). La selección se realizó con URACILO adicionado al medio.

Las células competentes de *S. cerevisiae* (cepa BY4741) fueron obtenidas de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se incubó un preinóculo de *S. cerevisiae* toda la noche a 30ºC con agitación constante.
2. Se inoculó 5 ml de medio YPD liquido y se dejó crecer a 30ºC hasta la fase logarítmica media, con una lectura de 0.8 a 1 a una densidad óptica de 600 nm.
3. Se centrifugó 1 ml del medio a 5000 rpm 4 min a una temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante.
4. Se resuspendió la pastilla en 1 ml de la solución EZ1 del kit para lavar la pastilla.

5. Se centrifugó a 5000 rpm por 4 minutos y se desechó el sobrenadante.
6. Se agregó 100 µl de la solución EZ2 del kit.

Se mezcló 50 µl de las células competentes con el DNA del plásmido (0.2-1 µg) en un volumen de 3 µl. Se adicionó 500 µl de la solución EZ3 a la suspensión célular y se mezcló vigorosamente. Posteriormente se incubó la solución a 30ºC por 60-90 min y se mezcló 2 o 3 veces por inversión durate este tiempo. Finalmente, se plaqueo con 275 µl de la mezcla en cada caja de Petri.

3.12 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE LEVADURA

Se obtuvo DNA total de la levadura mediante el siguiente el protocolo:

1. Se creció las levadura en 3 ml de medio YPD 2% glucosa toda la noche a 30ºC con agitación constante.
2. Se centrifugó el cultivo a 13000 rpm por 1 minuto.
3. Se resuspendieron las células en 200 µl de buffer de lisis (Tritón 2%; SDS 1%; NaCl 100 nM; Tris-HCl pH 8 10 mM; EDTA pH 8 1mM).
4. Se agregó 0.3 g de perlas de vidrio estériles y 200 µl de fenol-cloroformo (1:1).
5. Se mezcló en agitador tipo vortex a alta velocidad por 3 minutos.
6. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio .
7. Se agregó 500 µl de la mezcla etanol-isopropanol (60/40%) se mezcló por inmersión e incubó en hielo por 15 min.
8. Se centrifugó 13000 rpm por 3 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70% 3 veces.
9. Se resuspendió la pastilla en 50 µl de H_2O con 3 µl de RNAsa y se incubó 30 minutos a 37ºC.

3.13 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS

La síntesis de la proteína *ARF*-MS se verificó mediante la extracción de la proteína total de las células de *S. cerevisiae* de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se crecieron las levaduras en 5 ml de YPD toda la noche a 30ºC con agitación constante.
2. Se centrifugó las células de levadura a 13000 rpm por 4 min.
3. Se resuspendió en 500 µl de de H_2O destilada estéril y se agregó 500 µl de una solución de NaOH 0.2 M.
4. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min.
5. Se centrifugó a 12000 rpm por 3 min.
6. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 250 µl del buffer SDS-PAGE.
7. La mezcla se calentó a 95ºC por 5 min y se centrifugó a 12000 rpm por 3 min.
8. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentracion de proteína total.

3.14 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo el método Bradford para cuantificar la proteína: reactivo Bradford (BioRad) fue diluido en una relación 1:5. Se obtuvó la recta patrón: a partir de BSA, del reactivo de Bradford y el NaCl. Se prepararon las concentraciones indicadas en la tabla siguiente:

TUBOS	REACTIVO DE FRADFORD	VOLUMEN DE NaCl 0.15 M	VOLUMEN DE BSA	CONCENTRACION DE BSA
1	900 µl	98 µl	2 µl	1 µg
2	900 µl	96 µl	4 µl	2 µg
3	900 µl	92 µl	8 µl	4µg
4	900 µl	84 µl	16 µl	8 µg
5	900 µl	68 µl	32 µl	16 µg
6	900 µl	36 µl	64µl	32 µg

1. Se incubaron los tubos durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Se transfirió el contenido del tubo en una celda de lectura y se mezcló.
3. Se realizó la lectura a 595nm, utilizando el auto cero con la mezcla sin proteína.
4. Se anotó la absorbancia y se obtuvo la ecuación de la recta de regresión.

Para la visualizacion de las proteínas se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 13%: las muestras se mezclaron con el buffer de carga para proteína 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8) en una proporción de 1:1 y fueron calentadas a 94ºC de por 10 min.

3.15 INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA *ARF*-MS

Con el fin de detectar la proteína de interés se realizaron ensayos tipo Western blot, de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Se incubó la membrana de nitrocelulosa con solución de bloqueo durante 2 h en agitación constante. Se diluyó el primer anticuerpo en solución de bloqueo a una dilución de 1:5000, la cual se añadió a la membrana de nitrocelulosa. Se incubó toda la noche con agitación constante.
2. Se lavó la membrana de nitrocelulosa tres veces por 10 min con solución de lavado TBS (Tris-HCl; 20 mM; NaCl 137 mM; Ajustar el pH a 7.6).
3. Se diluyó el segundo anticuerpo en una relación 4:10000 y se añadió a la membrana de nitrocelulosa y se incubó de 4 a 6 h.
4. Posteriormente se lavó tres veces por 10 min con solución de lavado.
5. Despues se agregó la solución de imunodetección hasta el desarrollo de las bandas y se paró la reacción con las soluciones de revelado.

4. RESULTADOS

4.1 FUSIÓN DEL DOMINIO ARF DE *ARD1/TRIM23* Y LA ALFA HÉLICE DE *ARF1* DE *Saccharomyces cerevisiae*

Para realizar la fusión traduccional de la región nucleotídica correspondiente a la alfa hélice de *ARF1* de *S. cerevisiae* con el dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23*: Primero se obtuvó mediante PCR la secuencia nucleótidica del dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23*, para lo cual se utilizó la pareja de oligonucleótidos HelixARF-1 directo y Xholtrim23 reverso, usando como DNA molde el plásmido pGENE-TRIM23 (previamente construido Meza-Carmen y *col*., 2005) (Figura 10).

Posteriormente, se llevaron a cabo cuatro reacciones secuenciales de PCR con cada uno de los oligonucleótidos directos (HelixARF-2, HelixARF-3, HelixARF-4, HindIIIHelixARF) y el oligonucleótido reverso (Xholtrim23) para fusionar la alfa helice de la protína ARF1 de *S. cerevisiae* al dominio ARF de la proteína ARD1/TRIM23 (Figura 11).

Para amplificar por PCR el dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23* de ratón se utilizó el plásmido pGENE-*TRIM23*, para lo cual se empleó el par de oligonucleótidos HelixARF-1 directo y Xholtrim23 reverso, en la segunda reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos HelixARF-2 directo y Xholtrim23 reverso y como DNA molde el producto de la primera reacción de PCR, así secuencialmente se realizaron las 5 reacciones hasta obtener la fusión.

Los productos predichos de las reacciones de PCR tienen una longitud de 525 pb y de 570 pb, para el dominio ARF de *ARD1/TRIM23* y para la alfa hélice fusionada al dominio ARF de *ARD1/TRIM23*. A esta fusión se le denominó *ARF*-MS. Las bandas obtenidas por las reacciones secuenciales de PCR fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa, las cuales concuerdan al tamaño esperado; Como se muestra en la (Figura 12) se observó un incremento en el tamaño de las bandas de amplificación después de cada reacción de PCR.

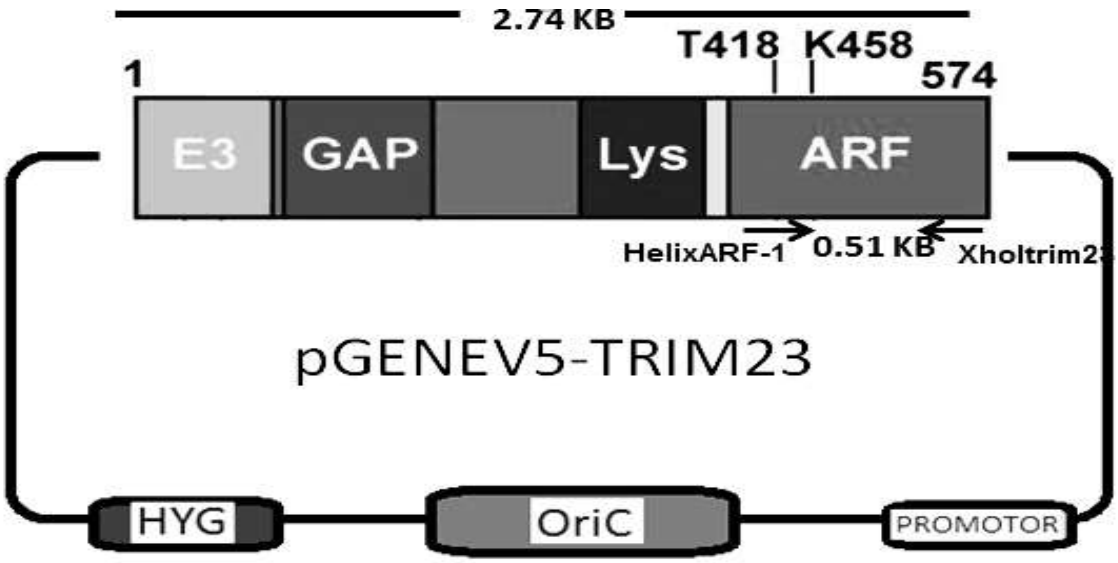


Figura 10. Plásmido pGENE-*TRIM23* utilizado para amplificar por PCR el dominio ARF de *ARD1/TRIM23.* Se muestra el dominio ARF de *ARD1/TRIM23*. Los oligonucleótidos HelixARF-1 directo y Xholtrim23 reverso delimitan mediante PCR la amplificación del dominio ARF de de *ARD1/TRIM23*.

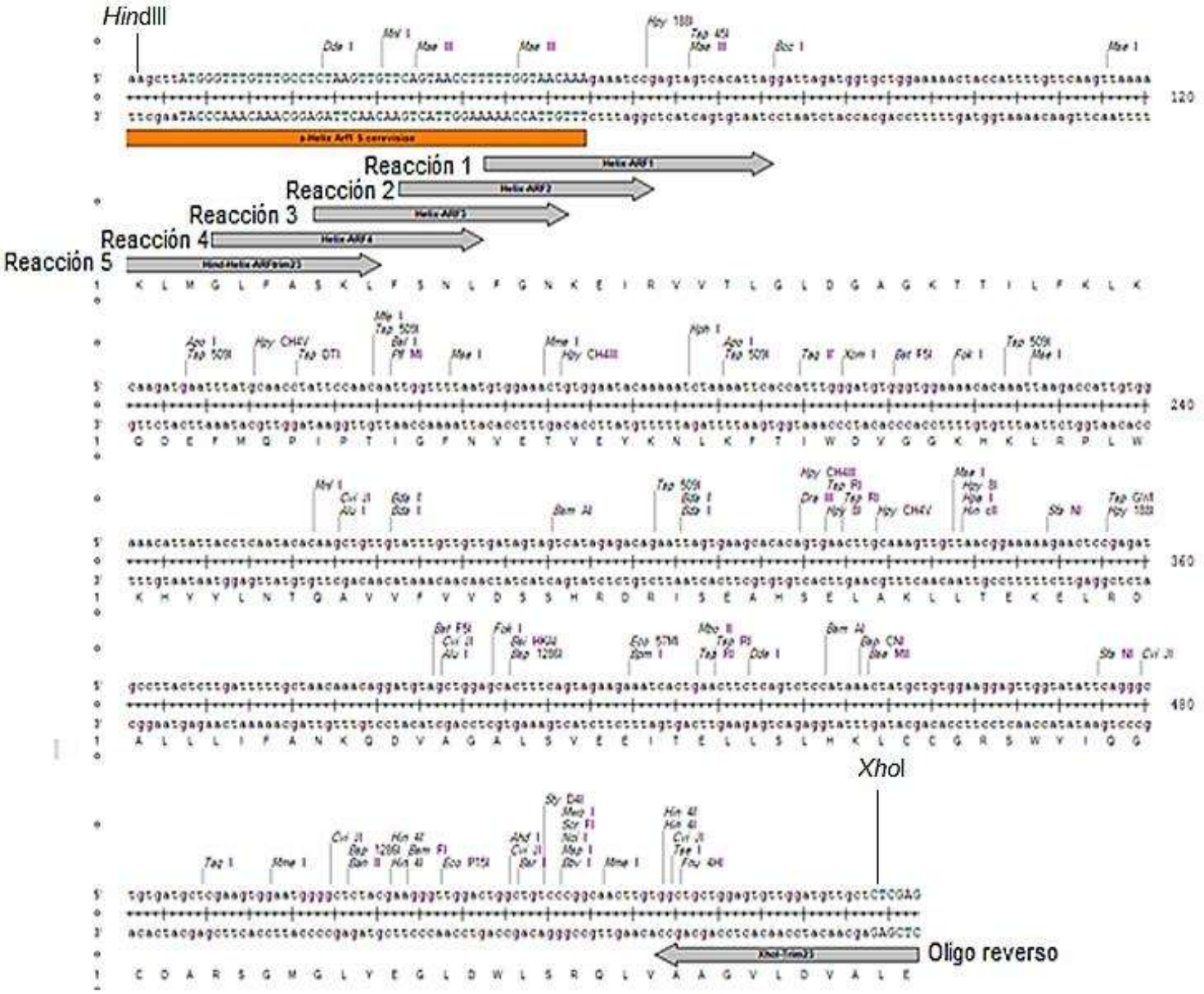


Figura 11. Fusión traduccional de la alfa hélice de *ARF1 S. cerevisiae* al dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23*. Las flechas (color gris) muestran la localización de los oligonucleótidos directos y reverso que se utilizaron en las reacciones de PCR para realizar la fusión de la alfa hélice de *ARF1* de *S. cerevisiae* (en naranja) el dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23,* en los extremos del fragmento generado se muestran los sitios de restricción de las enzimas *Hindlll* y *Xho*l.

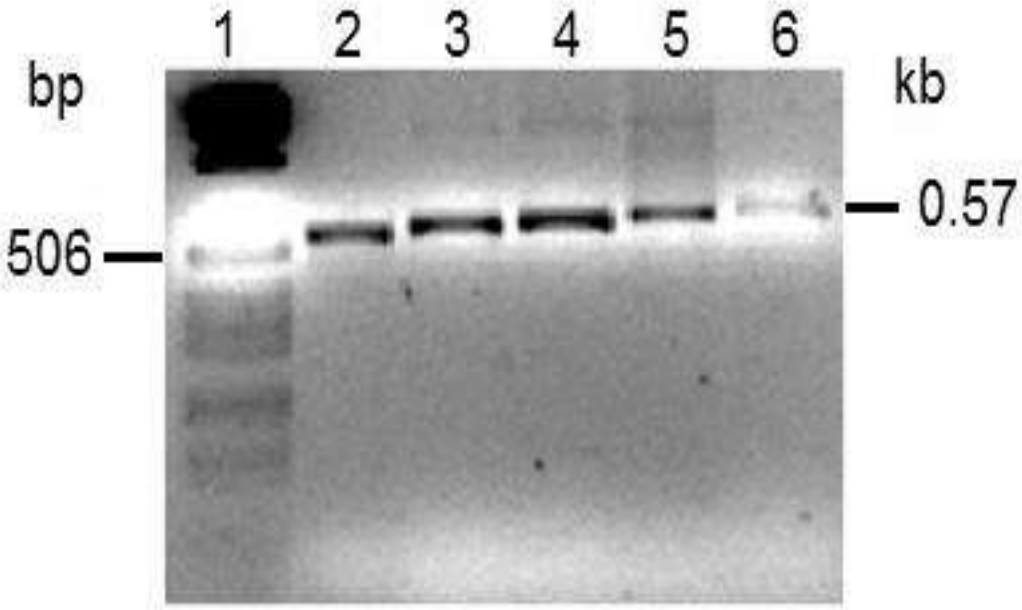


Figura 12. Productos de PCR para obtener la fusión traduccional de la alfa hélice del gen *ARF*1 de *S. cerevisiae* al dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23.* **Carril 1**: marcador de tamaño de DNA. **Carril 2** : producto de PCR utilizando los oligonucleótidos HelixARF-1 directo y Xholtrim23 reverso y utilizando como DNA molde del plásmido pGENE-TRIM23. **Carril 3**: producto de PCR utilizando el oligonucleótidos HelixARF-2 directo y Xholtrim23 reverso y utilizando como DNA molde el producto de la reacción anterior (carril 2). **Carril 4**: producto de PCR utilizando los oligonucleótidos HelixARF-3 y Xholtrim23 reverso y utilizando como DNA molde el producto de la reacción anterior (carril 3). **Carril 5**: producto de PCR utilizando los oligonucleótidos HelixARF4-directo y Xholtrim23 y utilizando como DNA molde el producto de la reacción anterior (carril 4). **Carril 6**: producto de PCR, *ARF*-MS, utilizando los oligonucleótidos HindIIIHelixARF directo y Xholtrim23 reverso y utilizando como DNA molde el producto de la reacción anterior (carril 5).

4.2 CLONACIÓN DE *ARF*-MS EN EL VECTOR pGEM-T Easy

Posteriormente, el fragmento *ARF*-MS amplificado por PCR fue purificado apartir de un gel de agarosa al 1% se ligó en el plásmido pGEM-T Easy generando el vector *ARF*-MS-pGEM. La ligación *ARF*-MS-pGEM se utilizó para transformar *E. coli* (JM101) por electroporación y la selección de las células transformantes se llevó a cabo por la capacidad de crecer en ampicilina.

El DNA plasmídico se aisló y se corrió en electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el cual se observó una diferencia en el tamaño de la construcción *ARF*-MS-pGEM respecto al plásmido pGEM-T Easy (Figura 13).

El vector *ARF*-MS-pGEM se digirió con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l para liberar el fragmento *ARF*-MS el cual se purifiocó a partir de un gel de agarosa al 1% (Figura 14). Al mismo tiempo se llevó a cabo la misma reacción de restricción en el plásmido de expresión de *S. cerevisiae* pYES2/CT con las enzimas *Hin*dlll *y Xho*l (Figura 14). Tambíen se confirmo la presencia del fragmento *ARF*-MS mediante secuenciación confirmando la fusión de la alfa hélice al dominio *ARD1/TRIM23.*

4.3 LIGACIÓN DE *ARF*-MS EN VECTOR DE EXPRESIÓN pYES2/CT

Los fragmentos de DNA correspondientes al plásmido pYES2/CT y al fragmento *ARF*-MS cortados con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l se sometieron a una reacción de ligación para generar el vector *ARF*-MS-pYES2/CT el cual se utilizó para la transformción por electroporación de células competentes de *E.coli.*

Para confirmar la presencia del fragmento *ARF*-MS en el vector *ARF*-MS-pYES2/CT, este se digirió con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l la cual libera el fragmento *ARF*-MS (Figura 15).

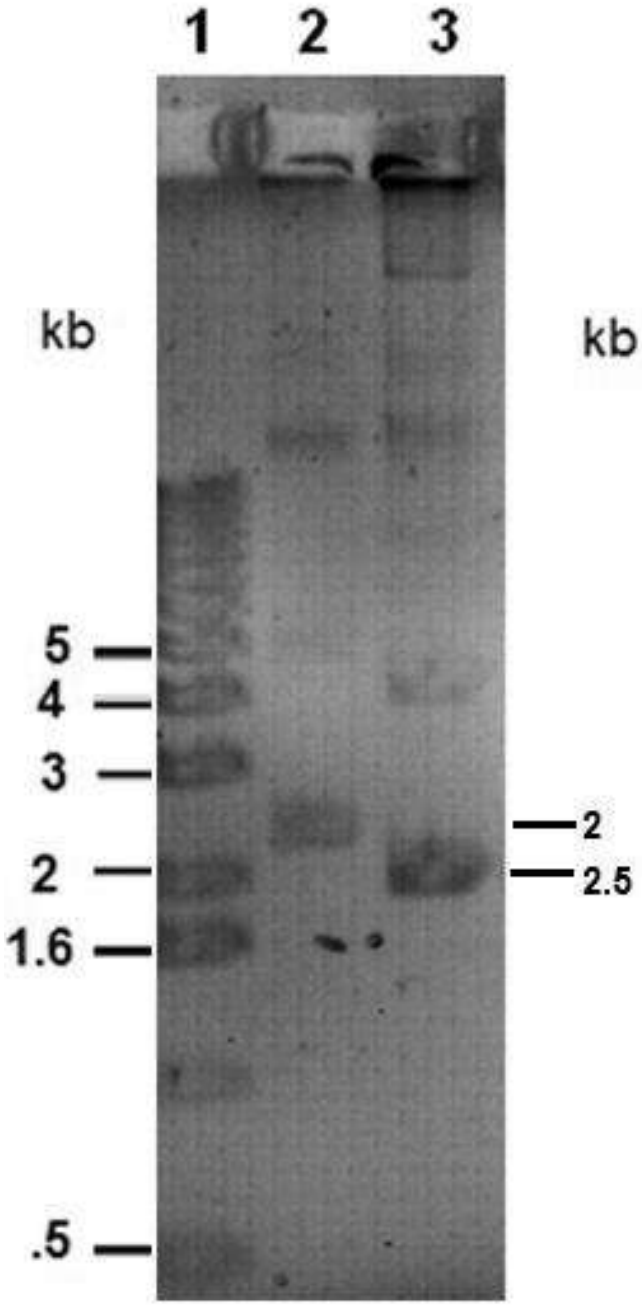


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido recombinate *ARF*-MS-pGEM. **Caril 1:** marcador de tamaño de DNA **Caril 2**: plásmido *ARF*-MS-pGEM. **Caril 3**: plásmido pGEM-T Easy.

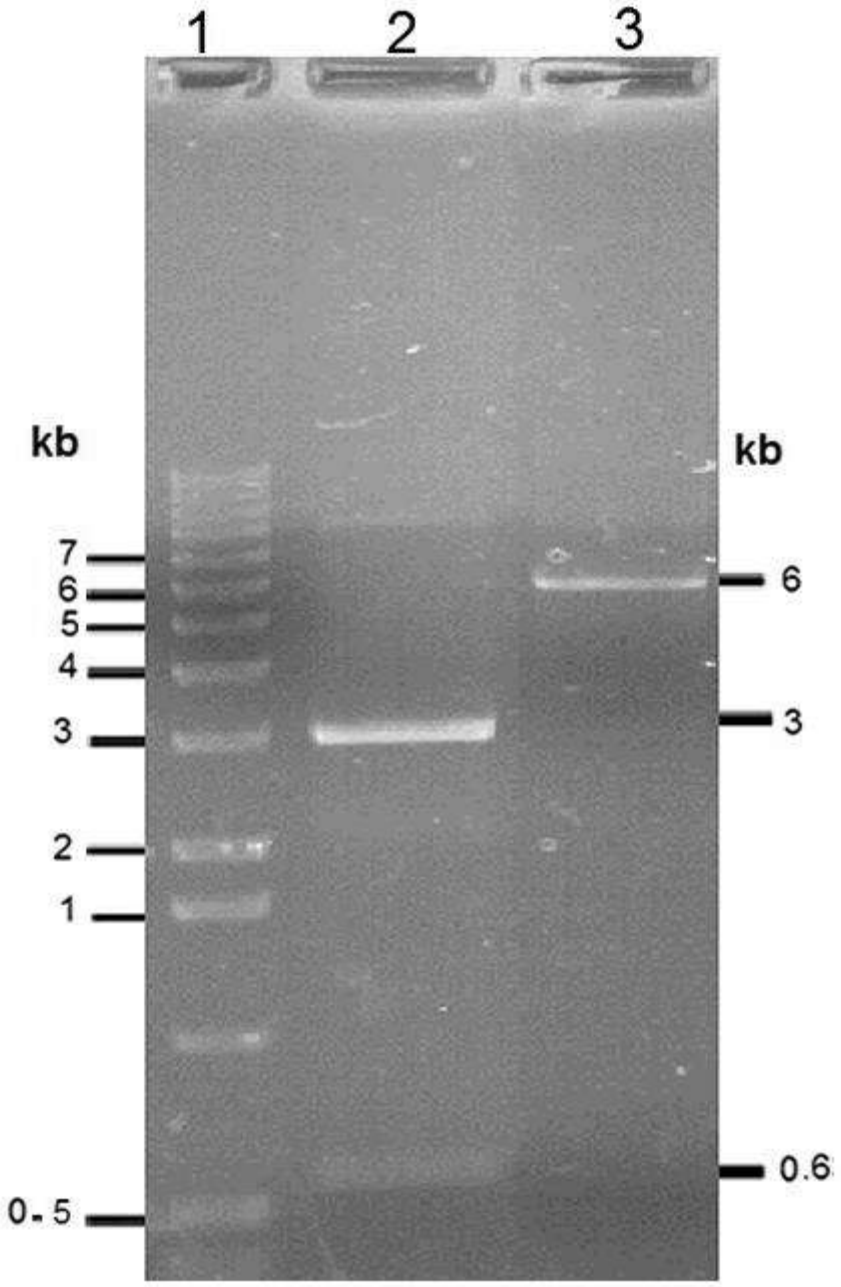


Figura 14. Corrimiento electroforético de los fragmentos generados a partir de la digestión de las plásmidos *ARF*-MS-pGEM y pYES2/CT con las enzimas *Hin*dIII y *Xho*I. **Carril 1**: marcador de tamaño de DNA. **Carril 2**: digestión del plásmido *ARF*-MS-pGEM con las enzimas *Hin*dIII y *Xho*I, banda superior correspondiente al plásmido pGEM; banda inferior *ARF*-MS. **Carril 3**: digestión del plásmido de expresión pYES2/CT con las enzimas *Hin*dIII y *Xho*I.

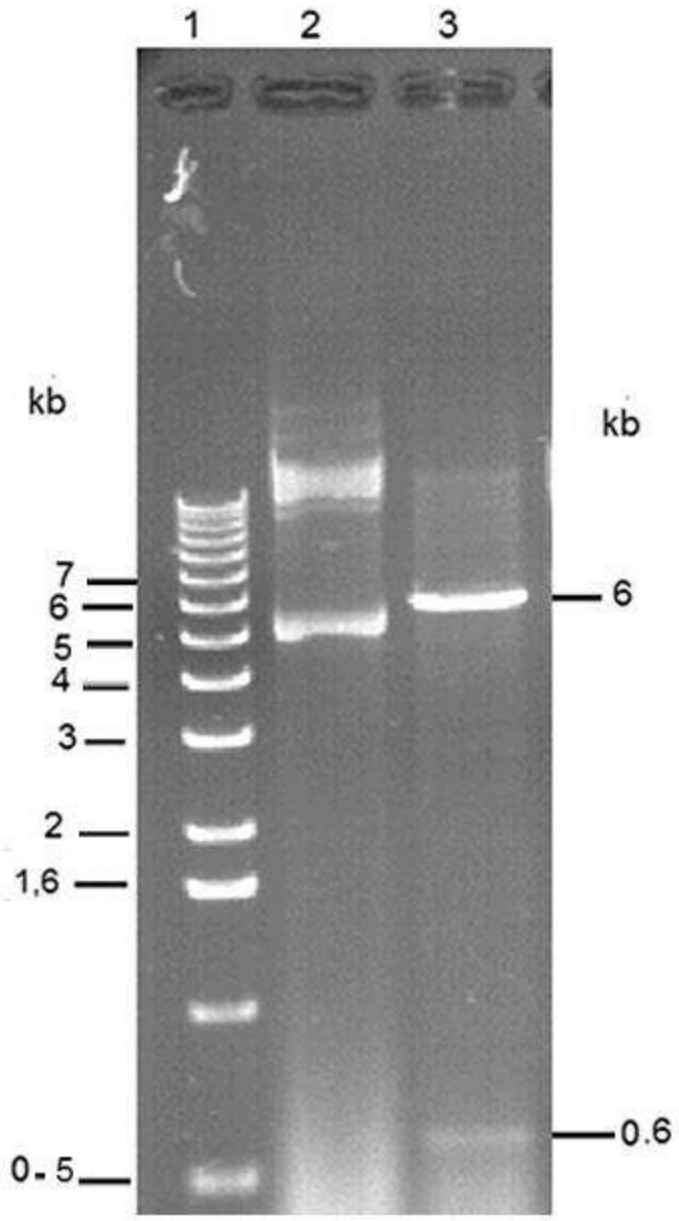


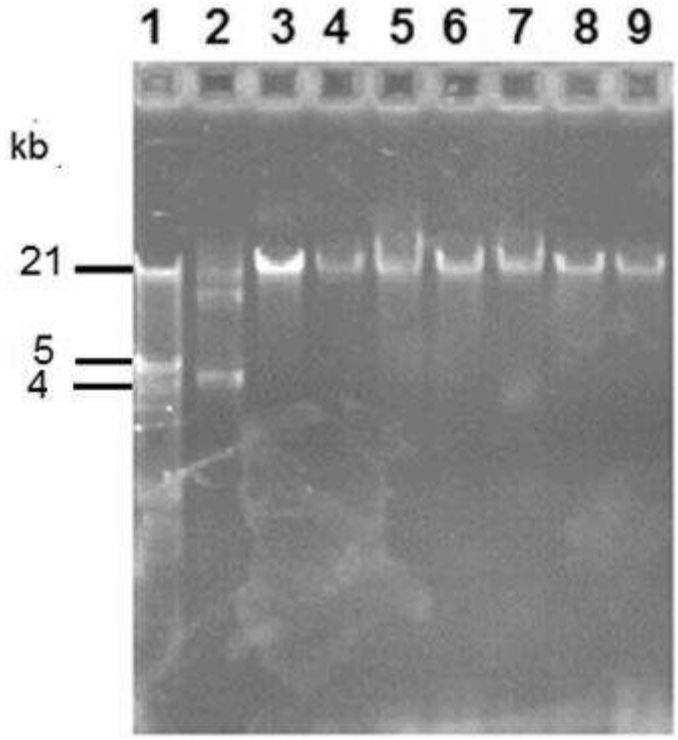
Figura 15. Corrimiento electroforetico de los fragmentos generados a partir de la digestión del plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l. **Carril 1**: marcador de tamaño de DNA. **Carril 2**: plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT. **Carril 3**: digestión de *ARF*-MS-pYES2/CT con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l, banda superior correspondiente al plásmido pYES2/CT, banda inferior *ARF*-MS.

4.4. TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* CON EL PLÁSMIDO *ARF*-MS-pYES2/CT

Se usó la construcción *ARF*-MS-pYES2/CT para la transformación de *S. cerevisiae* (cepa BY4741) en la cual se utilizó como mecanismo de selección la complementacion de la uxotrofía a uracilo ya que el plásmido contiene el gen *URA3* que restaura la prototrofia. Se aisló el DNA de un total de 7 colonias de levaduras transformadas. El DNA total se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Sin embargo, no se pudo comprobar su presencia puesto que la cantidad de DNA cromosomal es muy superior a el DNA plasmídico (Figura 16)

4.5 TRANFORMACIÓN DE *E. coli* CON DNA TOTAL AISLADO DE TRASNFORMANTES DE *S. cerevisiae* CON EL PLÁSMIDO *ARF*-MS-pYES2/CT

Con la finalidad de comprobar la presencia del plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT en las células de levadura se procedió a transformar *E. coli* con el DNA total de levadura. Se realizó la selección de DNA de 5 colonias al azar de *S. cerevisiae* transformadas, el cual se usó para electroporar células competentes de *E. coli*. Se aisló el DNA plasmídico de las bacterias transformantes el cual se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Mediante este procedimiento fue posible observar diferentes patrones de corrimiento electroforético de los plásmidos aislados a partir de *E. coli* incluyendo plásmidos similares al *ARF*-MS-pYES2/CT (Figura 17) con lo cual se puede demostrar que *S. cerevisiae* se transformó por los plásmidos. Se demostró la presencia del plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT en transformantes de *E. coli*. El análisis de restricción de los plásmidos aislados mostro un patrón similar al plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT digerido con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l (Figura 18).



FUGURA 16. DNA total aislado de las cepas de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT. Carril 1: marcador de tamaño de DNA. **Carril 2:** plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT. **Carriles 2-9:** DNA total aislado de las cepas de *S. cerevisiae* transformadas.

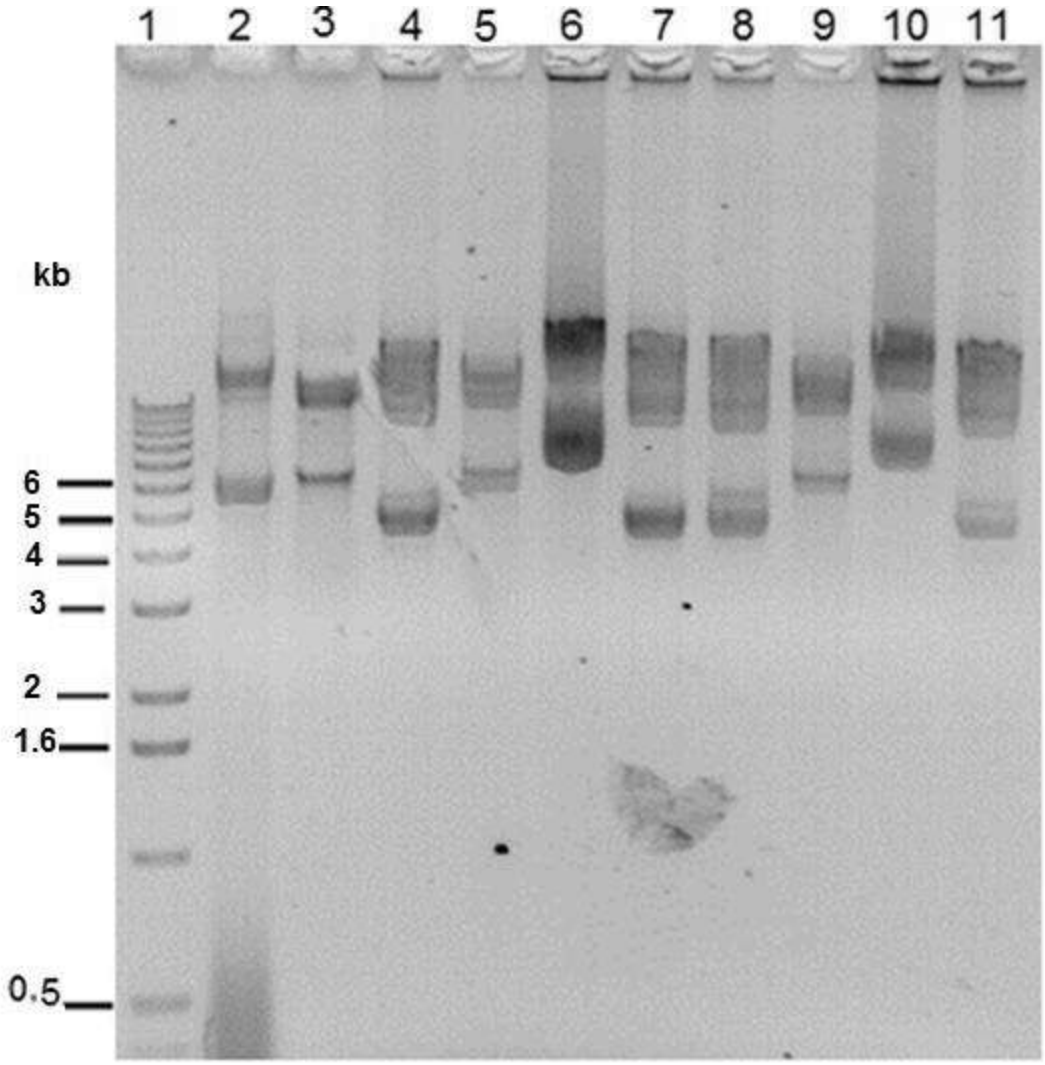


FIGURA 17. **Plásmidos aislados de transformantes de *E. coli*. Carril 1:** marcador de tamaño de DNA. **Carril 2:** plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT. **Carril 3.** Plásmido aislado de *E. coli* transformada con DNA total de *S. cerevisiae* cepa 1. **Carriles 4-11:** plásmidos aislados de *E.coli* transformada con DNA total de *S. cerevisiae* cepa 2.

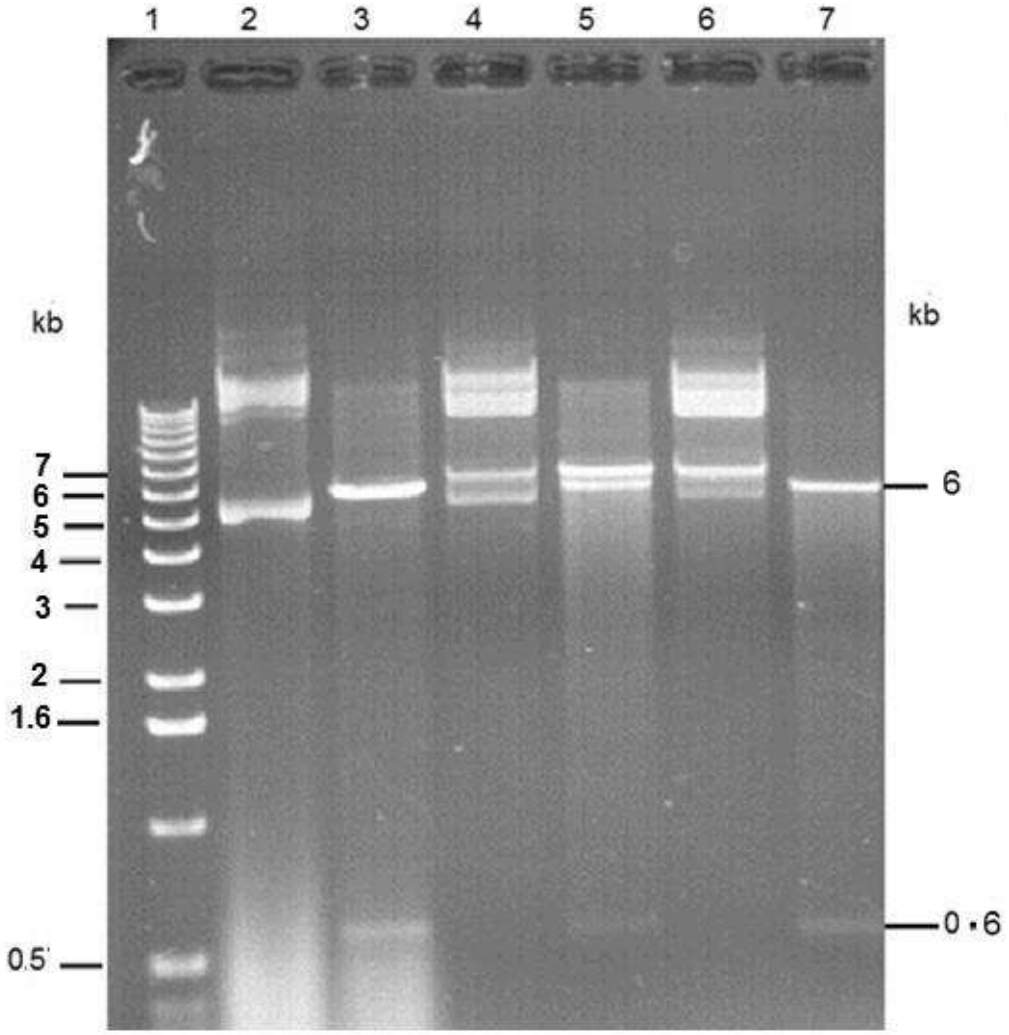


Figura 18. Digestión del DNA plasmídico de las transformantes de *E. coli*. **Carril 1**: marcador de tamaño de DNA. **Carril 2**: plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT. **Carril 3**: digestión del plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT con las enzimas *Hin*dIII y *Xho*I, banda superior plásmido pYES2/CT, banda inferior fragmento *ARF*-MS: **Carril 4**: plásmido aislado de *E. coli* transformada con DNA total de *S. cerevisiae* cepa 1. **Carril 5**: digestión del plásmido aislado de *E. coli* transformada con DNA total de *S. cerevisiae* cepa 1 con las enzimas *Hin*dIII y *Xho*I, banda superior plásmido pYES2/CT, banda inferior fragmento *ARF*-MS.**Carril 6:** plásmido aislado de *E. coli* transformada con DNA total de *S. cerevisiae* cepa 2. **Carril 7**: digestión del plásmido aislado de *E. coli* transformada con DNA total de *S. cerevisiae* cepa 2 con las enzimas *Hin*dIII y *Xho*I, banda superior plásmido pYES2/CT, banda inferior fragmento *ARF*-MS.

4.6 INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *ARF*-MS

Al comprobar la presencia del plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT en las cepas de *E.coli* transformadas a partir del DNA total de *S. cerevisiae* se procedió a identificar la expresión de la proteína recombinante.

Se realizó la extracción de proteína total de tres cepas de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida. Debido a que no fue visible la expresión de la proteína recombinante en geles de proteína, se realizaron ensayos de tipo Western para la inmunodetección de la proteína *ARF*-MS. El análisis mostro la expresión de la proteína recombinante *ARF*-MS en las cepas seleccionadas presentando un peso molecular similar de 36 kDa (Figura 19), lo cual es ligeramente mayor a lo predicho de alrededor de 20 kDa.

La expresión de la proteína recombinante *ARF*-MS es regulada por la la fuente de carrbono adicionada al medio, se observo expresión en el medio que contenia galactosa, por otro lado el medio que contenia glucosa la expresión de la proteína fue reprimida (Figura 19).

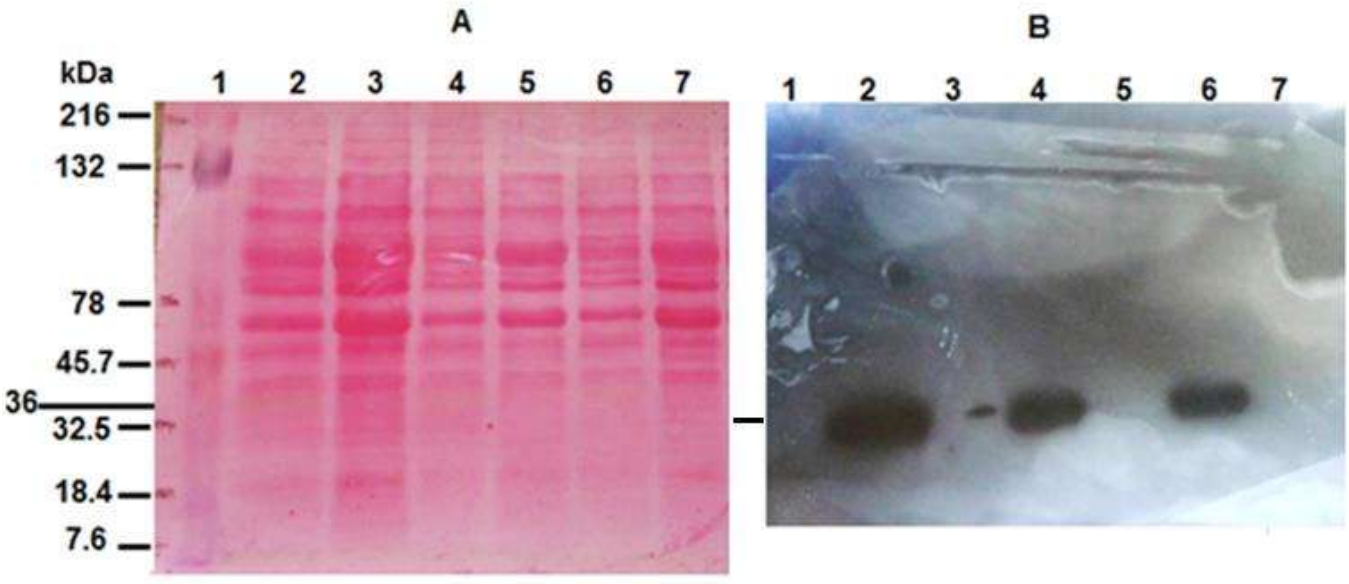


FIGURA 19. Inmunodetección de la proteína recombinante *ARF*-MS en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con el plásmido *ARF*-MS-pYES2/CT. **Panel A** Tinción con rojo de punzó de la membrana de nitrocelulosa utilizada para inmunodetección de la proteína recombinante, se observa la presencia de las proteínas y el tamaño de la proteína recombinante *ARF*-MS 36 kDa. **Panel B.** Inmunodetección de la proteína recombinante. **Carril 1:** marcador de peso molecular para proteínas. **Carriles 2 y 3:** extracto celular de la cepa 1 crecida en galactosa y glucosa respectivamente. **Carriles 4 y 5:** extracto celular de la cepa 2 crecida en galactosa y glucosa respectivamente. **Carriles 6 y 7:** extracto celular de la cepa 3 crecida en galactosa y glucosa respectivamente.

5. DISCUSIÓN

Las proteínas ARF son reguladores claves de biogénesis y transporte de proteínas a través vesículas hacia lugares específicos dentro de la célula (Popoff y *col*., 2011). ARD1/TRIM23 forma parte de la familia de proteínas ARF y TRIM. Es una proteína de 64 kDa (574 residuos aminoacídicos), la cual contiene un dominio ARF de alrededor de 18 kDa en su extremo carboxilo terminal. Este dominio ARF de ARD1/TRIM23 presenta una identidad del 58% con ARF1 y ARF2 de *S. cerevisiae*, sin embargo difieren en la presencia de una alfa hélice de 15 aminoácidos (aa) en la región amino terminal de las proteínas ARF, en la cual se localiza el sitio de miristoilación en el residuo de glicina, dicha modificación postraduccional permite la interacción con las membranas biológicas (Zhang y *col.,* 1998).

En este trabajo se realizó la amplificación y fusión del dominio ARF de *ARD1/TRIM23* de *Mus Musculus* con la alfa hélice de *ARF1* de *S. cerevisiae* por medio de PCR para su posterior clonación en el vector de expresión pYES2/CT y sobreexpresión en cepas de *S. cerevisiae* mediante la inducción con galactosa. La proteína recombinante fue detectada mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen la etiqueta V5, la cual está presente en el extremo carboxilo terminal de dicha proteína, esta proteína mostro un peso molecular de 36 kDa, superior al predicho para el dominio ARF de 18 kDa, la diferencia en el peso se puede deber a que en el extremo amino se adicionaron 15 aa y en el extremo carboxilo un péptido conformado por el epitope V5 (de 14 aa) y seis aa de histidina. La proteína recombinante se nombró *ARF*-MS. El cambio de peso en proteínas recombinantes se ha descrito en proteínas con etiquetas de histidinas sugiriendo que estos residuos cambian la movilidad electroforética de manera no proporcional al peso correspondiente de seis aminoácidos (Cheung y *col.*, 2010)

La sobreexpresión del gen *ARF*-MS confirma que el gen fue amplificado, clonado y subclonado en la orientación correcta y en fase con el vector de expresión, como lo muestra el análisis de restricción con las enzimas *Hin*dlll y *Xho*l.

Se logró expresar una proteína recombinante en cepas de *S. cerevisiae* que contiene la fusión del dominio ARF de la proteína ARD1/TRIM23 de *Mus musculus* con la alfa hélice de la proteína ARF1 de *S. cerevisiae* dicha expresión es regulada de manera diferencial mediante la fuente de carbono adiciona al medio, observando expresión de la proteína recombinante *ARF*-MS en el medio que se utilizó galactosa y una represión de la proteína en el medio con glucosa.

La expresión heteróloga de proteínas recombinantes a través de plásmidos de expresión ofrece una de las ventajas más grandes como herramienta en biología molecular, ya que puede ser utilizadas para determinar las propiedades de las proteínas y para identificar su función dentro de los organismos estudiados (Zavala, 2005).

Cabe hacer mención que es posible que las proteínas que participan en el intercambio de nucleótidos de guanina, la proteína intercambiadora de nucleótidos (GEP) y la proteína activadora de GTPasa (GAP) presentes en la levadura no reconozcan a la proteína recombinante, esto no generaría una proteína activada, es decir manteniendo unido al GTP, con lo cual no sería posible describir la función biológica de dicha proteína recombinante.

6. PERSPECTIVAS

1) Transformar a las cepas mutantes en *ARF1* y *ARF2* de *S. cerevisiae*, con la finalidad de llevar a cabo ensayos de complementación.

2) Realizar una mutación que permita la obtención de la proteína recombinante *ARF*-MS constitutivamente activada y su correspondiente clonación en un vector de expresión de levadura.

7. CONCLUSIONES

1. Mediante técnicas de secuenciación se logró demostrar la construcción correcta de *ARF*-MS correspondiente a la fusión del dominio ARF del gen de *ARD1/TRIM23* de *Mus musculus* con la alfa hélice de *ARF1* de *Saccharomyces cerevisiae*, dicha fusión finalmente fue subclonada en el vector pYES2/CT.

2. Se logró demostrar la presencia de transformantes de *S. cerevisiae* conteniendo el inserto *ARF*-MS en el vector de expresión pYES2/CT (*ARF*-MS-pYES2/CT).

3. Mediante técnicas de Wester blot se logró demostrar la expresión de la proteína recombinante en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* observando que la expresión es regulada de manera diferencial influenciada por la fuente de carbono adicionada al medio.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Johnson A, Lewis J. 2002. Molecular Biology of the Cell. Chapter 13, Intracellular Vesicular Traffic. Garland Science. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2105/.

Anthonio E. A, Brees C, Baumgart-Vogt E, Hongu T, Huybrechts S. J, Van Dijck P, Mannaerts G. P, Kanaho Y, Van Veldhoven P. P y Fransen M. 2009. Small G proteins in peroxisome biogenesis: the potential involvement of ADP-ribosylation factor 6. BMC Cell Biol. 17:10-58.

Barandier C, Ming X. F, Rusconi S y Yang Z. 2003. PKC is required for activation of ROCK by RhoA in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 304:714-719.

Boman, A.L, y Kahn R.A. 1995. ARF proteins: the membrane traffic police? Trends Biochem. Sci. 20: 147–150.

Braschi E, Goyon V, Zunino R, Mohanty A, Xu L y McBride HM.2010. Vps35 mediates vesicle transport between the mitochondria and peroxisomes. Curr Biol. 20:1310-1315.

Chardin P, Paris S, Antonny B, Robineau S, Béraud-Dufour S, Jackson C. L y Chabre M. 1997. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. Nature. 384:481-484.

Chen Z. J. 2005. Ubiquitin Signaling in the NF-κB Pathway. Nat Cell Biol. 7:758–765.

Cheung K. L. Y, Huen J, Kakihara, Houry W. A, Ortega J. 2010. Alternative Oligomeric States of the Yeast Rvb1/Rvb2 Complex Induced by Histidine Tags. J Mol Biol. 3: 478–492.

Cox R, Mason-Gamer R. J, Jackson C. L y Segev N. 2004. Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers. Mol Biol Cell. 15:1487–1505.

Deshaies R. J y Joazeiro C. A. P. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. Annu Rev Biochem. 78:399-434.

Dell'Angelica E. C, Puertollano R, Mullins C, Aguilar R. C, Vargas J. D, Hartnell L. M y Bonifacino J. S. 2000. GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding

proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. J Cell Biol. 149:81-94.

Donaldson J. G y Jackson C. L. 2011. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 12:362-375.

Eden E. R, White I. J y Futter C. E. 2009. Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. Biochem Soc Trans. 37:173-177.

Gil A. 2010. Tratado de Nutrición. Cap. 5 Síntesis, degradación y recambio de las proteínas. (PP. 137) EDITORIAL MÉDICA PARAMERICACA.S.A. España. Madrid.

Gillingham A. K y Munro S. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. Annu Rev Cell Dev Biol. 23:579-611.

Gundelfinger E. D, Kessels M. M y Qualmann B.2003. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosi. Nat Rev Mol Cell Biol. 4 :127-139.

Hansen C. G y Nichols B. J. 2009. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. J Cell Sci. 122: 1713–1721.

Horton A. C y Ehlers M. D. 2003. Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. J Neurosci. 23:6188-6199.

Hua Z y Graham T. R. 2000. Madame Curie Bioscience Database. The Golgi Apparatu. Landes Bioscience. Available from. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6268/.

Jiménez L.F y Merchant H. 2003. Biología celular y molecular. Cap. 15 el aparato de Golgi (PP 451-453). Pearson educación, México. Edo de México.

Zavala C. J. 2005. Manual de técnicas básicas de biología molecular. Cap. vectores de clonación (PP. 72) DR. Universidad Autónoma de Yucatán.

Kahn R. A, Bruford E, Inoue H, Logsdon J. M, Nie Z, Premont R. T, Randazzo P. A, Satake M, Theibert A. B, Zapp M. L y Cassel D. 2008. Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. J Cell Biol.182:1039-1044.

Kravtsova-Ivantsiv Y y Ciechanover A. 2011. Ubiquitination and degradation of proteins. Methods Mol Biol. 753:335-357.

Kumari S, Swetha M. G y Satyajit M. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. Cell Research. 20:256–275.

Lee F. J, Stevens L. A, Kao Y. L, Moss J y Vaughan M. 1994. Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 269:20931-20937.

Lippincott-Schwartz J. 2004. Dynamics of secretory membrane trafficking. Ann N Y Acad Sci. 1038:115-124.

Lodish H, Berk A, Zipursky S. L. 2000. Biología Celular Molecular. Sección 17.3. Descripción de la ruta secretora. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21471.

Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. Ann Rev Cell Dev Biol. 12:575–625.

Meza-Carmen V, G Pacheco-Rodriguez, Kang G. S, Kato J, Donati C, Zhang C. Y, Vichi A, Payne D. M, El-Chemaly S, Stylianou M, Moss J y Vaughan M. 2011. Regulation of growth factor receptor degradation by ADP-ribosylation factor domain protein (ARD) 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:10454-10459.

Mishima K, Tsuchiya M, Nightingale M. S, Moss J. N y Vaughan M. 1993. ARD1, a 64-kDa guanine nucleotide-binding protein with a carboxyl-terminal ADP-ribosylation factor domain. J Biol Chem. 268:8801-8807.

Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G y Ikehara Y. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 261:11398–11403.

Morinaga N, Moss J. N y Vaughan M. 1997. Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:12926-12931.

Moss J y Vaughan M. 1995. Structure and function of ARF proteins:activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. J Biol Chem. 270:12327-12330.

Müller-Sterl W. 2008. Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Cap. 19.11. Las pequeñas proteínas G regulan el transporte vesicular (PP 263). Reverté.Barcelona.

Mukherjee S, Ghosh R. N y Maxfield F. R. 1997. Endocytosis. Physiol Rev. 77:759-803.

Ozato K, Shin D. M, Chang T. H y Morse H. C. 2008. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. Nat Rev Immunol. 8:849-860.

Pacheco-Rodriguez G, Meacci E, Vitale N, Moss J y Vaughan M. 1998. Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain. J Biol Chem. 273:26543-26548.

Popoff V, Langer J. D, Reckmann I, Hellwig A, Kahn R. A, Bruegger B y Wieland F. T. 2011. Several Arf isoforms support COPI vesicle formation. J Biol Chem. Aug 15.

Rothman J. E y Wieland F. T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. Science. 12:227-234.

Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci P. G y Ballabio A. 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. EMBO J. 20:2140-2151.

Shin H. W y Nakayama K. 2004. Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. J Biochem. 136:761-767.

Siegel G. J, Agranoff B. W, Albers R. 1999. Neuroquímica Básica: Aspectos moleculares, celulares y Médica. Heterotrimeric proteínas G. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28116/.

Söllner T , Bennett M. K , Whiteheart S. W , Scheller R. H y Rothman J. E .1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell. 75:409-418.

Springer S, Spang A y Schekman R. 1999. A primer on vesicle budding. Cell. 97: 145-148.

Stamnes M. A, y Rothman J. E. 1993. The binding ofAP-I clathrin adap- tor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. Cell. 73:999-1005.

Stearns T, Kahn R. A, Botsein D y Hoyt M. A. 1990. ADP ribosylation factor is an essential protein in Saccharomyces cerevisiae and is encoded by two genes. Mol Cell Biol. 10: 6690-6699.

Sudhof T. C. 2004. The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci. 27:509-547.

Tokarev A. A, Alfonso A y Segev N. 2000. Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways. In: Madame Curie Bioscience Database Austin: Landes Bioscience. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7286/.

Traub L. M, Ostrom J.A y Kornfeld S. 1993. Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. J Cell Biol.123:561-573.

Venkateswarlu K, Gunn-Moore F, Tavare J. M y Cullen P. J. 1999. EGF-and NGF-stimulated translocation of cytohesin-1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain. J Cell Sci. 112:1957–1965.

Vitale N, Horiba K, Ferrans V. J, Moss J y Vaughan M. 1998. Localization of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1) in lysosomes and Golgi apparatus. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:8613-8618.

Vitale N, Moss J y Vaughan M. 1997. Characterization of a GDP dissociation inhibitory region of ADP-ribosylation factor domain protein ARD1. J Biol Chem. 272:25077-25082.

Vitale N, Moss J y Vaughan M. 1996. ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 93:1941-1944.

Weissman A. M, Shabek N y Ciechanover A. 2011.The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. Nat Rev Mol Cell Biol. 12:605-620.

Zhang C. J, Cavenagh M. M y Kahn R. A. 1998. A family of Arf effectors defined as suppressors of the loss of Arf function in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 31:19792-19796.