



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



# ***Expresión en levaduras de genes GFP recombinantes en el mutante nup84 del Complejo del Poro Nuclear***

Trabajo de Fin de Máster

**BÁRBARA MARÍA VARELA RODRÍGUEZ**

Dirigido por las Dras. M<sup>a</sup> De los Ángeles Freire Picos y Ana M<sup>a</sup> Rodríguez Torres

Junio, 2014

**INDICE**

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. El Complejo del Poro Nuclear y la regulación de la expresión génica</b>	<b>2</b>
1.1 Visión general del Complejo del Poro Nuclear	2
1.2 El complejo Nup84 y su papel en la regulación de la expresión génica	5
1.3 El complejo Nup84 y la poliadenilación alternativa	5
1.3.1 El gen <i>GFP</i>	6
<b>II. Objetivos</b>	<b>8</b>
<b>III. Material y Métodos</b>	<b>10</b>
<b>1. Líneas celulares</b>	<b>11</b>
1.1 Líneas celulares de levaduras	11
<b>2. Plásmidos</b>	<b>11</b>
2.1 Plásmidos para levaduras	11
<b>3. Medios de cultivo</b>	<b>13</b>
3.1 Composición de los medios de cultivo para levaduras	14
3.2 Composición de los medios de cultivo para bacterias	15
<b>4. Obtención de muestras celulares</b>	<b>15</b>
4.1 Obtención de muestras celulares para <i>Northern blot</i>	15
4.2 Obtención de extractos proteicos para <i>Western Blot</i>	15
<b>5. Obtención de ácidos nucleicos</b>	<b>16</b>
5.1 Obtención de DNA plasmídico de bacterias de alta calidad	16
5.2 Obtención de RNA total de levaduras	16
<b>6. Medida de la concentración de ácidos nucleicos</b>	<b>17</b>
6.1 Medida de la concentración de DNA	17
6.2 Medida de la concentración de RNA	17
<b>7. Técnicas de modificación del DNA</b>	<b>17</b>
7.1 Digestión con endonucleasas	17
<b>8. Métodos de transformación</b>	<b>17</b>
8.1 Transformación de levaduras	17

<b>9. Técnicas de electroforesis</b>	<b>18</b>
9.1 Geles de agarosa no desnaturalizantes	<b>18</b>
9.2 Geles de acrilamida	<b>18</b>
9.3 Tinción de geles de agarosa	<b>19</b>
9.4 Tinción de geles de acrilamida	<b>19</b>
<b>10. Técnicas de marcaje e hibridación de ácidos nucleicos</b>	<b>19</b>
10.1 <i>Northern blot</i>	<b>19</b>
<b>11. Análisis de proteínas</b>	<b>20</b>
11.1 Análisis de la abundancia y tamaño mediante <i>Western blot</i>	<b>20</b>
<b>12. Técnicas de fluorescencia</b>	<b>21</b>
12.1 Microscopía de fluorescencia	<b>21</b>
12.2 Espectroscopía de fluorescencia	<b>22</b>
<b>IV. Resultados y discusión</b>	<b>23</b>
<b>V. Conclusiones</b>	<b>32</b>
<b>VI. Anexo I (Abreviaturas)</b>	<b>34</b>
<b>VII. Bibliografía</b>	<b>37</b>

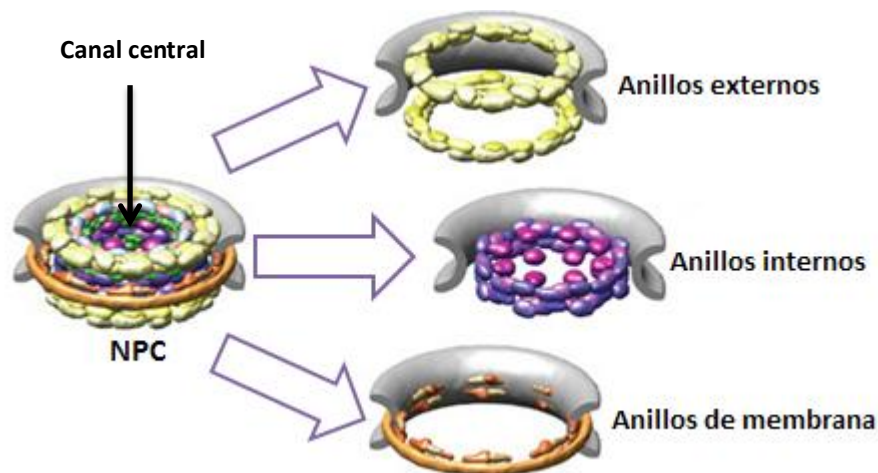
## **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. El Complejo del Poro Nuclear y la regulación de la expresión génica

### 1.1 Visión general del Complejo del Poro Nuclear

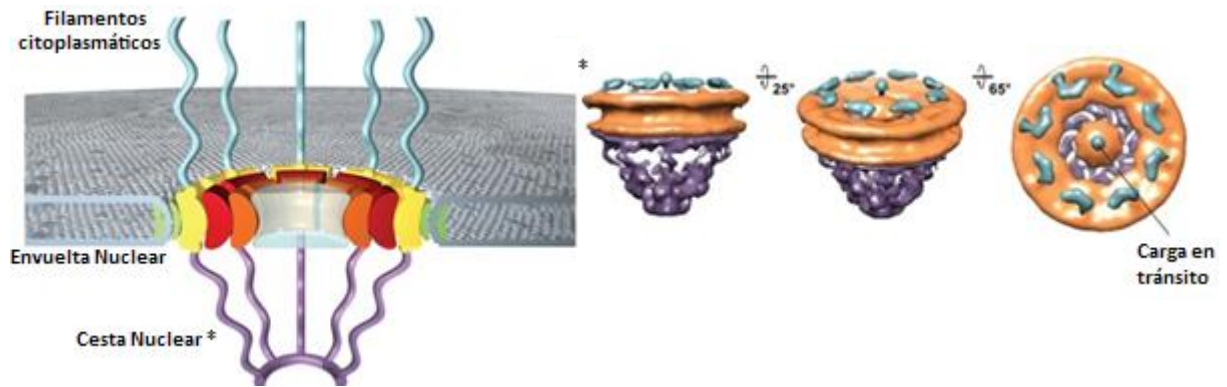
Los poros nucleares, son complejos proteicos que forman canales que atraviesan las membranas externa e interna de la envuelta nuclear, permitiendo gestionar selectivamente el transporte de iones, metabolitos, proteínas y RNAs entre el núcleo y citoplasma de las células. La suma de los complejos proteicos que lo forman, se conoce como Complejo del Poro Nuclear (NPC) (Aitchison and Rout, 2012).

El NPC consta de varias estructuras constituyendo un cilindro citoplasmático, los anillos externos (nuclear y citoplasmático), dos internos y dos anillos de membrana que se sitúan en torno a un canal central que presenta un diámetro de 40 nm (Figura 1).



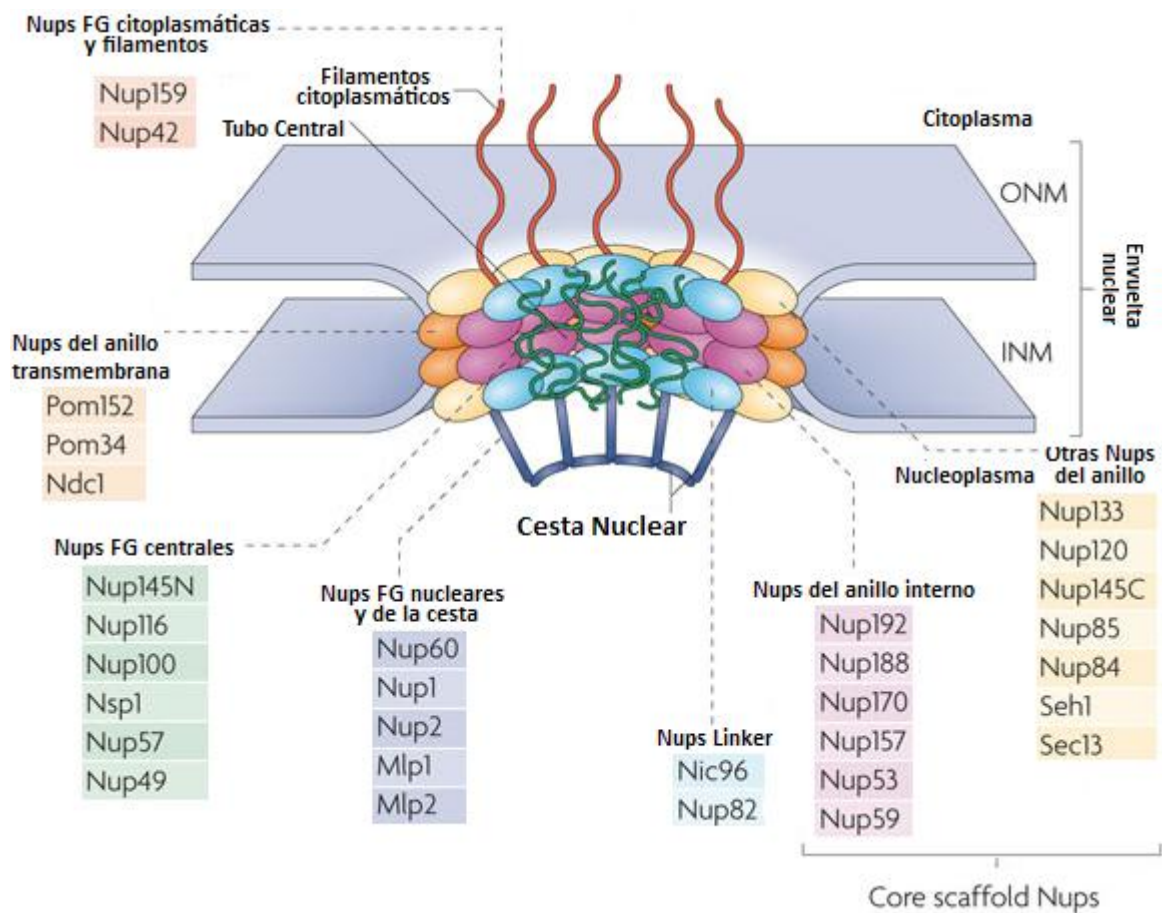
**Figura 1.** Anillos que conforman el NPC (modificado de Aitchison and Rout, 2012)

Los anillos internos se unen al canal central y a los anillos de membrana por 8 radios. Desde el núcleo hacia el citoplasma se proyectan 8 filamentos cortos, y otros 8 unidos en su extremo distal a un anillo terminal, que se proyectan hacia el núcleo, formando la cesta nuclear (Figura 2) (Alber *et al.*, 2007 and Aitchison y Rout, 2012).



**Figura 2.** Cesta nuclear. Imagen tomada y modificada de la Web del laboratorio Hoelz ([http://ahweb.caltech.edu/AH\\_Web/Research.html](http://ahweb.caltech.edu/AH_Web/Research.html))

Las proteínas que conforman el Complejo del Poro Nuclear en levaduras (nucleoporinas o nups), se clasifican en 3 grupos según su estructura (Devos *et al.*, 2006) (Figura 3): Nups transmembrana, FG-Nucleoporinas y Nups de la estructura central (constituidas por múltiples factores incluido **Nup84**).

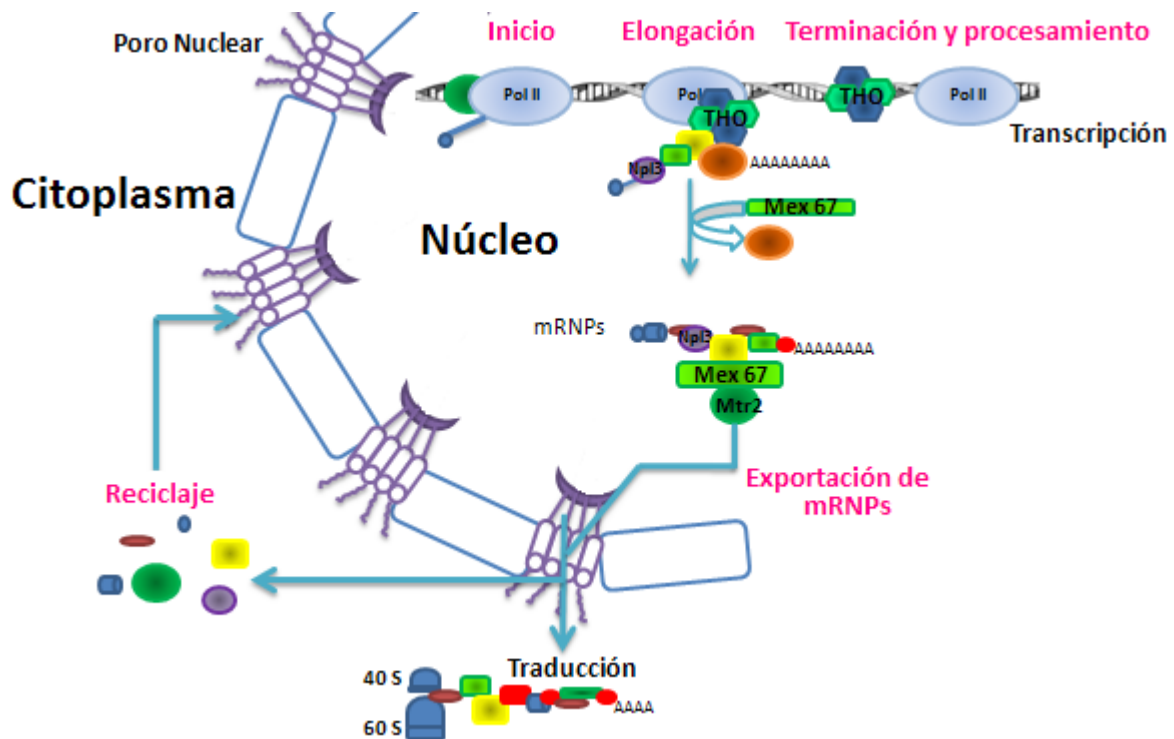


**Figura 3.** Proteínas que conforman el NPC (modificado de Strambio De Castilla *et al.*, 2010)

El transporte a través del Complejo del Poro Nuclear está limitado por el tamaño; el agua, iones, metabolitos y proteínas con tamaño inferior a 60 KDa difunden pasivamente mientras que las proteínas y mRNPs con tamaño superior a 60 KDa son transportados de forma selectiva (Singer and Grünwald, 2012).

Los NPCs, también actúan como sitio de anclaje de factores implicados en el control de la expresión génica (Hetzer and Wente, 2009). Además, existe una estrecha relación entre los factores implicados en la transcripción, los componentes del NPC y la maquinaria implicada en el transporte del *mRNA* desde el núcleo al citoplasma a través de dicho complejo (Rodríguez Navarro *et al.*, 2004) (Figura 4).

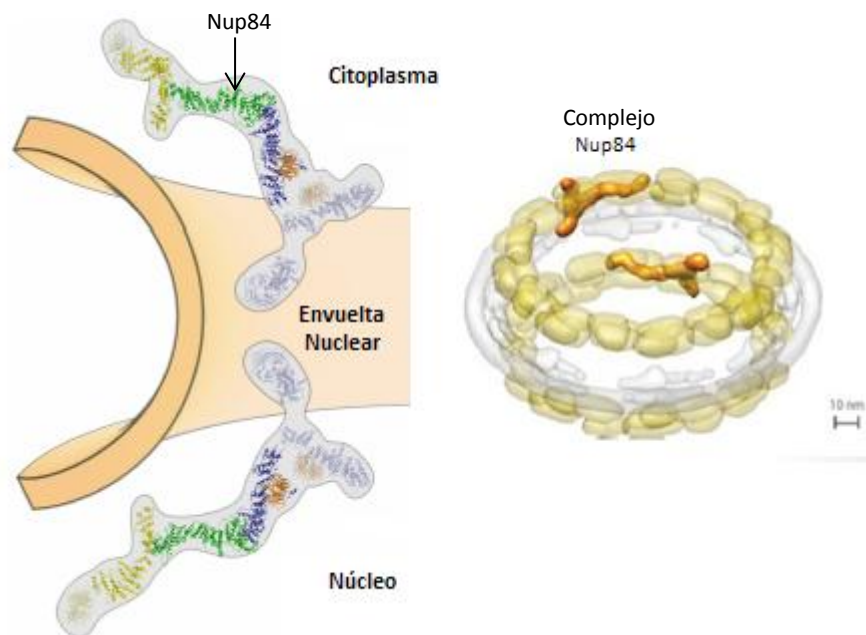
Los NPCs contribuyen de forma directa o indirecta a la regulación transcripcional (Rodríguez *et al.*, 2004 y Müller and Neugebauer, 2013). El transporte del *mRNA* desde el núcleo al citoplasma, es un paso clave para la expresión génica, en el que están implicados receptores de exportación, proteínas adaptadoras de unión al *mRNA* y RNA helicasas ATP-dependientes además de los componentes del NPC (Björk and Wieslander, 2011). Además, varios factores del NPC pueden facilitar una elongación eficiente de la transcripción y el procesamiento del *mRNA*, así como la coordinación de ambos (Akhtar and Gasser, 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Conexión entre las maquinarias de transcripción, procesamiento 3' del mRNA con el ensamblaje de los mRNPs para su exportación a través de los NPCs y el ensamblaje de mRNPs (Modificado de Tutucci and Stutz, 2011)

## 1.2 El complejo Nup84 y su papel en la regulación de la expresión génica

Nup84, es un factor proteico que forma parte del sub-complejo que lleva su mismo nombre o “Complejo Y” del NPC (Brohawn and Schwartz, 2009) (Figura 5). Éste consta de 7 subunidades proteicas, entre las cuales se encuentra Nup84. Su disposición simétrica en la cara citoplasmática y nuclear formando los anillos externos del NPC le posibilita la interacción de sus componentes con la maquinaria transcripcional y otros factores proteicos implicados en el transporte de mRNA (Figura 5).



**Figura 5.** Localización de Nup84 en el Complejo Y del NPC (Modificado de Brohawn and Schwartz, 2009)

Respecto a su papel transcripcional, Nup84 tiene un efecto positivo en elongación transcripcional (Tous *et al.*, 2011); además, se ha observado la interacción entre Nup84 y receptores de transporte nucleares necesarios para una elongación eficiente (Yao *et al.*, 2008). Pero también existen evidencias de que complejo Y presenta un papel importante en activación transcripcional (Menon *et al.*; 2005).

## 1.3 El complejo Nup84 y la poliadenilación alternativa

El gen *KICYC1* está sometido a poliadenilación alternativa (APA), y se procesa dando lugar a dos transcritos con diferente longitud de su región 3'-UTR (Freire Picos *et al.*, 2001).

Las experiencias previas con *TRP1*, permitieron comprobar que la inclusión de la región 3'-UTR de *KICYC1* en un gen heterólogo lleva a un procesamiento alternativo del RNA. *TRP1* en



presencia de la región 3'-UTR propia y la de *CYC1*, da lugar a un solo transcrito, pero con distintos niveles de expresión, mientras que con la región 3'-UTR completa de *K1CYC1*, da lugar a dos transcritos (Vilariño, R., 2010). Pese a las diferencias transcripcionales y de procesamiento 3' encontradas, las cepas expresando *TRP1* con diferentes UTRs no mostraban ningún defecto de crecimiento en medios sin triptófano. Buscando sistemas más sensibles para estudiar la transcripción y procesamiento se inició una línea de trabajo con *GFP*, efectuándose construcciones con variantes de UTRs fusionadas a *GFP* (Figura 6).

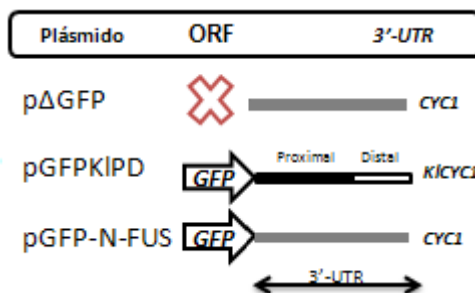


Figura 6. Plásmidos utilizados y regiones 3'-UTR expresadas

### 1.3.1 El gen *GFP*

El gen *GFP* (del inglés *Green Fluorescent Protein*), codifica para la proteína fluorescente verde producida por la medusa *Aequorea victoria*, con 238 aminoácidos. Su estructura terciaria, tiene forma de barril  $\beta$  de 40 Å, y sujeto a la hélice de dicho barril presenta un cromóforo (p-hidroxibenzilideneimidazolinona) que es el responsable de la emisión de luz verde (Figura 7). Absorbe la luz azul con un máximo de longitud de onda de 395 nm, emitiendo bioluminiscencia en la zona verde del espectro con un máximo de 508 nm si es excitada a 395 nm y por el contrario si es excitada a 475 nm la emisión ocurrirá a 503 nm, sin la adición de ningún cofactor o sustrato (Franco and Longart, 2009). *GFP* se ha empleado con éxito como gen reportero en estudios de promotores y de función y localización, a nivel celular, de proteínas recombinantes (Chalfie, M., 1995).

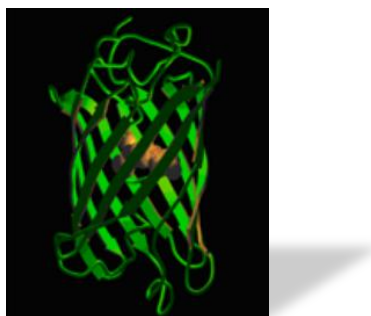
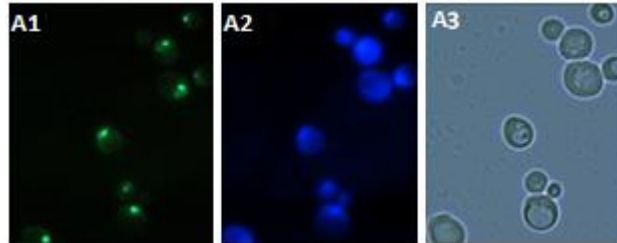


Figura 7: Estructura terciaria de la proteína *GFP*. En verde, hojas  $\beta$  y en amarillo, el cromóforo.

Esquema tomado de la página web del laboratorio del Dr. Tsien, (<http://www.tsienlab.ucsd.edu/Default.htm>)

Esto nos permitió llevar a cabo estudios del papel de Nup84 en la transcripción y procesamiento alternativo (Varela Rodríguez, B., 2013 y Álvarez Felgar, T., 2013). Partimos de la cepa BY-RPGFP de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa la proteína de fusión RPA190-GFP de localización nucleolar (Freire Picos *et al.*, 2013) (Figura 8) y a partir de ella se construyó el alelo nulo de Nup84 (mutante  $\Delta nup84$ ) (Varela Rodríguez, B., 2013 y Álvarez Felgar, T., 2013).



**Figura 8. A1)** Visualización de RPA190-GFP en el nucléolo celular, **A2)** tinción DAPI y **A3)** visualización de las células sin filtro (Varela Rodríguez, B., 2013)

Además de las dos cepas anteriores, se empleó también la cepa FY23 de *S. cerevisiae* para analizar la expresión de *GFP* con formas alternativas de la región 3'-UTR.

Esto nos permitió comprobar que las formas de *GFP* con diferentes 3'-UTRs no se procesan de la misma forma en las cepas mencionadas, siendo por tanto un procesamiento cepa-dependiente y que los niveles de mRNA de las formas recombinantes son altamente dependientes de la región 3'-UTR expresada. Este último dato se vio reflejado tanto a nivel de proteína como de fluorescencia detectada (Varela Rodríguez, B., 2013).

## II. OBJETIVOS

## OBJETIVOS

Basándonos en los resultados previos de nuestro laboratorio y dada la importancia de conocer la función del NPC en la expresión génica y transporte de RNAs dependiente de las regiones 3'-UTRs, consideramos necesario ampliar el estudio acerca de la expresión de genes *GFP* recombinantes en el mutante *nup84* y nos planteamos los objetivos que se detallan a continuación:

1. Estudiar la localización sub-celular de GFP dependiendo de la región 3'-UTR expresada. Estudio en una cepa silvestre y en el mutante  $\Delta nup84$  del NPC.
2. Analizar, en las mismas condiciones del objetivo 1, los niveles totales de GFP por fluorimetría.
3. Estudiar el efecto post-transcripcional de la expresión de *GFP* con distintas 3'-UTRs en *Saccharomyces cerevisiae*.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. LÍNEAS CELULARES

#### 1.1 Líneas celulares de levaduras

Línea celular	Genotipo	Fuente
BY-RPGFP <sup>a</sup>	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Freire et al. (2013)
$\Delta$ <i>Nup84</i> <sup>b</sup>	<i>MATa ura3-52 trp163 leu 2-1 Nup84::Kanmx4</i>	Álvarez Felgar, T. (2013)

**Tabla 1.** Cepas de levaduras empleadas en el presente estudio.

<sup>a</sup> Cepa que expresa una proteína de fusión nucleolar RPA190-GFP (Freire et al., 2013).

<sup>b</sup> Mutante nulo de *NUP84*, obtenido a partir de la cepa BY-RPGFP de *Saccharomyces cerevisiae* (Álvarez Felgar, T., 2013).

Las cepas de levaduras se conservaron a 4°C y además se resembraron en placas con medio rico (YPD) de forma periódica.

## 2. PLÁSMIDOS

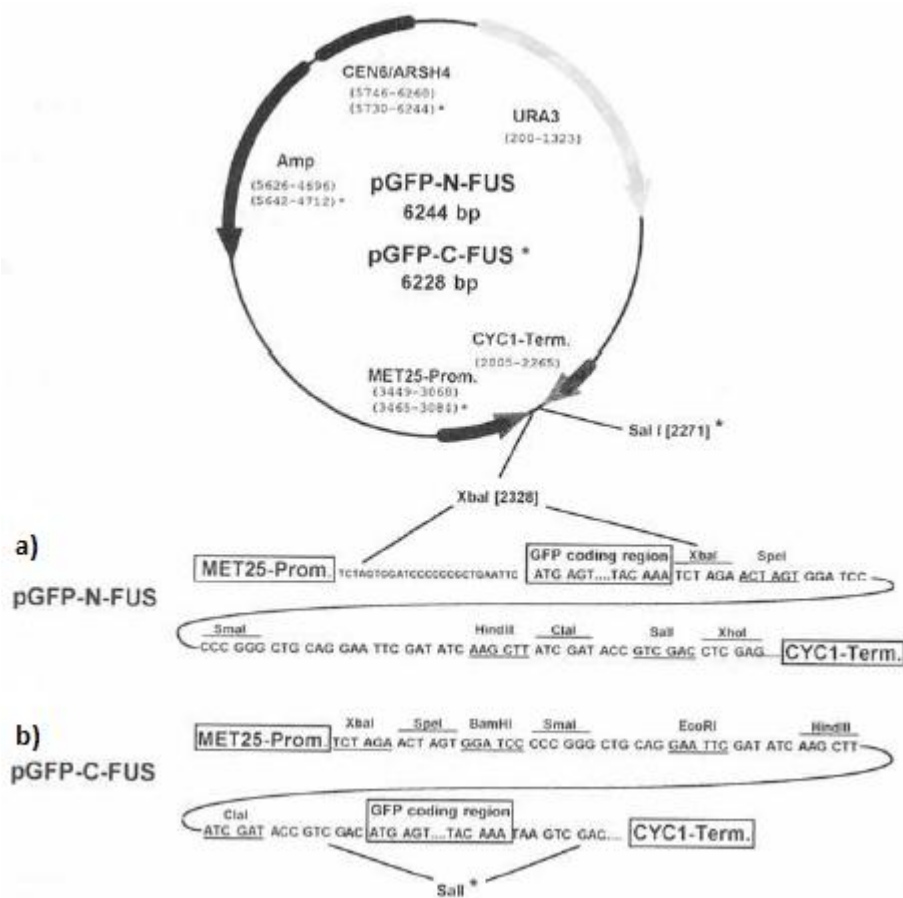
### 2.1 Plásmidos para levaduras

Para la realización de este estudio, se emplearon los plásmidos detallados a continuación:

- **pGFP-N-FUS y pGFP-C-FUS**

El vector de expresión pGFP-N-FUS permite la fusión del gen *GFP* al extremo N-terminal de una ORF; la transcripción de las construcciones de fusión está regulada por el promotor MET25 y por el terminador de *CYC1*. El vector de expresión pGFP-C-FUS, permite la fusión del gen *GFP* al extremo C-terminal de una ORF; al igual que el anterior, deriva del plásmido p416MET25, ambos

llevan un DNA centromérico, un origen de replicación y el marcador *URA3* (Niedenthal et al., 1996) (Figura 9).



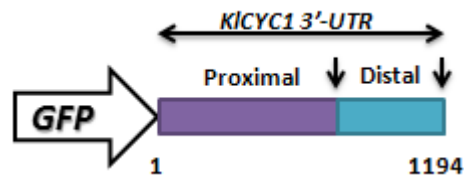
**Figura 9.** Representación de los vectores de fusión de GFP pGFP-N-FUS(a) y pGFP-C-FUS(b) (Niedenthal et al., 1996)

- **pΔGFP**

Obtenido por digestión del plásmido pGFP-C-FUS con *Sal I* y posteriormente fue autoligado para eliminar el gen *GFP* del propio plásmido (Rodríguez-Torres et al., pendiente de publicación). Se utilizó como control negativo.

- **pGFPKIPD**

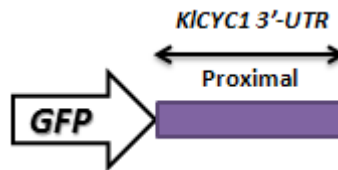
Plásmido basado en el vector pGFP-N-FUS que expresa *GFP* con la región 3'-UTR completa de *KICY1* en sustitución de *CYC1* (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema del plásmido pGFPKIPD en el que se indica de color violeta el dominio proximal y en azul el dominio distal de la región 3'-UTR de *KICYC1*. Las flechas indican los puntos de corte y poliadenilación y los números las posiciones relativas al codón de terminación.

- **pGFPKIP**

Plásmido basado en el vector pGFP-N-FUS que expresa *GFP* con la región 3'-UTR proximal de *KICYC1* (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema del plásmido pGFPKIPD en el que se indica de color violeta el dominio proximal de la región 3'-UTR de *KICYC1*.

### 3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios que hemos empleado para cultivos tanto de bacterias como de levaduras son descritos a continuación.

Para la preparación de placas de cultivo (medios sólidos) se adicionó Bacto-Agar al 1,5%.

Además, las soluciones se esterizaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión.



### 3.1 Composición de los medios de cultivo para levaduras

- **YPD (Yeast Peptone Dextrose)**

Bacto - Peptona (GibcoBRL)	2%
Bacto – Yeast Extract (GibcoBRL)	1%
Dextrosa	2%

Es un medio general de crecimiento de levaduras

- **CM (Medio completo)**

*Mezcla de aminoácidos 200 X	5 mL
Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina y Tirosina	40 mg/L
Triptófano	30 mg/L
Dextrosa	2%
YNB (Yeast Nitrogen Base)	0,67%

- \* **Mezcla de aminoácidos 200X:**

Arginina	2 g/l
Isoleucina	2 g/l
Lisina	8 g/l
Metionina	2 g/l
Treonina	2 g/l
Fenil – Alanina	12 g/l

<b>YNB</b>		<b>Sales traza 150 X</b>	
Vitaminas 300X	50 ml/l	Ácido bórico	75 mg/l
Sales traza 150 X	100 ml/l	Sulfato cúprico	6 mg/l
Fosfato de potasio	15 g/l	Ioduro potásico	15 mg/l
Sulfato de magnesio	7,5 g/l	Cloruro férrico	30 mg/l
Cloruro sódico	1,5 g/l	Molibdato sódico	30 mg/l
Cloruro cálcico	1,5 g/l	Sulfato de zinc	60 mg/l
Sulfato amónico	75 g/l		

#### **Vitaminas 300 X**

Biotina	0,6 mg/l
Pantotenato cálcico	120 mg/l
Ácido fólico	0,6 mg/l
Inositol	600 mg/l
Niacina	120 mg/l
p-Aminobenzoico	60 mg/l
Piridoxina	120 mg/l
Riboflavina	60 mg/l

Para la selección de los transformantes de levaduras que se describen en este trabajo, se empleó el medio **CM<sup>-</sup>Ura** (sin uracilo), puesto que todos los plásmidos tienen el marcador *URA3*.

### 3.2 Composición de los medios de cultivo para bacterias

#### • LBA (Medio Luria-Bertani con Ampicilina)

El medio LBA (medio general de crecimiento de bacterias) es medio LB (Luria-Bertani) con Ampicilina a una concentración final de 70 µg/mL (a partir de una solución stock de 70 mg/mL en agua estéril).

#### Medio LB:

Bacto-Triptona (GibcoBRL)	1%
Bacto-Yeast Extrac (GibcoBRL)	0,5%
NaCl	0,5%
Dextrosa	0,1%

## 4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS CELULARES

### 4.1 Obtención de muestras celulares para *Northern blot*

A fin de realizar un análisis de los cambios en los niveles de mRNA de *GFP* se inocularon tubos con 20 mL de medio CM<sup>+</sup>Ura de cada una de las levaduras transformadas y se dejaron crecer toda la noche en agitación a una temperatura de 30°C (precultivos). Posteriormente, se midió la DO<sub>600</sub> de cada uno de los precultivos y se inocularon nuevos cultivos con una DO<sub>600</sub> de 0,2; éstos se cultivaron a 30°C en agitación hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0,6-0,8 (fase logarítmica de crecimiento). Posteriormente, se precipitaron las células en una centrifuga refrigerada durante 5 minutos a 5000 r.p.m, se lavaron con agua destilada estéril y se congeló la masa celular a -80°C para las posteriores extracciones de RNA.

### 4.2 Obtención de extractos proteicos para *Western Blot*

Se efectuó una extracción post-alcálica de proteínas, según Vitaly, K. (2000) de una masa celular correspondiente a una DO<sub>600</sub> = 2,5 de los cultivos de levaduras por centrifugación y se lavó con agua bidestilada estéril eliminando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100µL de agua bidestilada y 100 µL de NaOH 0,2 N y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras 2 minutos de centrifugación a 5000 r.p.m. se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo el precipitado en 50 µL 1 X SDS “*sample buffer*” o buffer de muestra. Por último las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 3-5 minutos y se centrifugó para precipitar los restos celulares; del sobrenadante, se cargaron 10 µL de cada muestra, en los geles de acrilamida.

4 X SDS “sample buffer” o buffer de muestra: 1 mL de buffer TRIS-HCl 1 M pH 6,8, 3,5 mL de SDS al 20%, 0,04 g de azul de bromofenol, 4 mL de glicerol, 1,5 mL de agua bidestilada.

Por cada 100  $\mu$ L de buffer 4X, se le añaden 14  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol en el momento de uso.

## **5. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **5.1 Obtención de DNA plasmídico de bacterias de alta calidad**

Para la obtención de DNA plasmídico de alta calidad y sin RNA, se utilizó el Kit Gene Jet™ Miniprep de Fermentas®, siguiendo las recomendaciones del fabricante; el DNA purificado fue resuspendido en 50  $\mu$ L de agua destilada estéril y empleado para obtener la sonda de GFP.

### **5.2 Obtención de RNA total de levaduras**

La extracción de RNA de levaduras, se llevó a cabo siguiendo el método de Schmitt y colaboradores (1990). Tras obtener células crecidas en las condiciones deseadas (como se describió anteriormente) se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua destilada estéril. Tras una nueva centrifugación se eliminó el sobrenadante, y las células se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de RNA. Para llevar a cabo la extracción de RNA, las células se resuspendieron en 400  $\mu$ L de buffer AE y se le añadieron 40  $\mu$ L de SDS al 10%, tras mezclar con el vórtex añadimos un volumen igual de Fenol-Buffer AE y tras mezclar con el vórtex nuevamente incubamos a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos. Enfriamos las muestras rápidamente en nitrógeno líquido unos segundos y centrifugamos 2 minutos a 13.000rpm; transferimos la fase acuosa superior a un tubo nuevo y realizamos una nueva extracción con Fenol-Cloroformo a temperatura ambiente durante 5 minutos. La fase acuosa extraída nuevamente, se precipitó con 40  $\mu$ L de acetato sódico pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y tras lavar con etanol al 70%, se secó el pellet en un desecador de vacío, resuspendiendo por último cada muestra en 20-40  $\mu$ L de agua tratada estéril y conservándose las mismas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Buffer AE: 50 mM acetato sódico (2,05 g para 500 mL) y 10 mM EDTA (1,861 g para 500 mL)

## 6. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 6.1 Medida de la concentración de DNA

Para realizar la medida de la concentración de DNA se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la preparación de DNA y se midió la  $\text{DO}_{260}$  en un espectrofotómetro (BioSpectrometer kinetic) por duplicado; para calcular la concentración real se tuvo en cuenta que  $\text{DO}_{260}= 1$ , equivale a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA.

### 6.2 Medida de la concentración de RNA

Para realizar la medida de la concentración de RNA se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la preparación de DNA y se midió la  $\text{DO}_{260}$  en un espectrofotómetro (BioSpectrometer kinetic) por duplicado empleando cubetas de cuarzo; para calcular la concentración real se tuvo en cuenta que  $\text{DO}_{260}= 1$ , equivale a una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNA.

## 7. TÉCNICAS MODIFICACIÓN DEL DNA

### 7.1 Digestión con endonucleasas

El DNA plasmídico de pGFP-N-FUS fue digerido con la endonucleasa *XbaI* de restricción del proveedor Takara. La digestión se realizó por espacio de 2-3 h a 37°C, para obtener la sonda de hibridación para GFP.

## 8. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

### 8.1 Transformación de levaduras

Se realizaron mediante el método en fase estacionaria “*One Step*” (Chen, J. and Moore, C. L., 1992). Se preparó un cultivo de células hasta la fase estacionaria en YPD (aproximadamente  $2 \times 10^8$  células). Se precipitaron las células y se resuspendieron mezclando con vórtex en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de “*One Step*” *buffer* (acetato de litio 0,2 M, 40% PEG 3350 y ditiotretitol 100 mM) para cada transformación; además se utilizaron de 50 ng a 1  $\mu\text{g}$  de plásmido y 5 $\mu\text{g}$  de DNA de esperma de salmón monohebra. Se incubó durante 30 minutos a 45 °C y se sembró en medio selectivo incubando durante 2-3 días a 30°C.

## 9. TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

### 9.1 Geles de agarosa no desnaturalizantes

Se prepararon geles con un porcentaje del 0,7%, empleando el tampón de electroforesis 1 X TAE. Las muestras de ácidos nucleicos se mezclaron con tampón de carga 10X antes de su carga en el gel.

Tampón de electroforesis 1 X TAE: Tris-EDTA-Acetato (Tris 40 mM; EDTA 1 mM; acetato sódico 20 mM y acetato acético 30 mM a pH 8,0).

Tampón de carga 10X: solución acuosa de glicerol al 50%, azul de bromofenol al 25% y xilen-cianol al 25%.

Estos mismos geles también se emplearon para *Southern blot*; las muestras de DNA genómico fueron digeridas previamente con endonucleasas de restricción (Ver apartado Técnicas de modificación del DNA) y se mezclaron con tampón de carga 10 X antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis en este caso se llevó a cabo sin agente intercalante.

### 9.2 Geles de acrilamida

Se realizaron mezclando las siguientes soluciones stock ya preparadas:

<b>Gel separador (Gel acrilamida al 13%)</b>	<b>Gel espaciador (Gel acrilamida al 5%)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,9 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida (Stock al 45%)</li> <li>• 5,4 mL de agua bidestilada autoclavada</li> <li>• 1,7 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</li> <li>• 50 µL de SDS al 20%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,1 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida (Stock al 45%)</li> <li>• 6,4 mL de agua bidestilada autoclavada</li> <li>• 2,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8</li> <li>• 50 µL de SDS al 20%</li> </ul>

Inmediatamente antes de verter el gel, se añadieron 100 µL de Persulfato Amónico (AP) al 10% y 10µL de TEMED, dejándose polimerizar durante unos 30 minutos.

### **9.3 Tinción de geles de agarosa**

Para visualizar los ácidos nucleicos en los geles de agarosa, se añadió 1  $\mu$ L de Gel Green (10000X) por cada 10 mL de gel antes de su solidificación.

La visualización de las muestras se realizó en un transiluminador Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> – XR+ con el programa de análisis Image Lab<sup>TM</sup> 3.0.1 de la casa comercial BioRAD.

### **9.4 Tinción de geles de acrilamida**

Antes de realizar la tinción de los geles de acrilamida, se retiraron los restos de SDS lavando el gel 3 veces durante 5 minutos con agua.

Posteriormente se añadió la solución Ready To Use (EZBlue Gel Staining Reagent) durante 1h a temperatura ambiente con agitación o a 4°C sin agitación durante toda la noche.

Por último se decoloró el gel con agua destilada hasta que se obtuvo la resolución deseada en la visualización de las bandas.

Para su conservación, se plastificaron en papel “celofán”.

## **10. TÉCNICAS DE MARCAJE E HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **10.1 Northern blot**

Después de la electroforesis, mediante el aparato VacuGene de Pharmacia a 60 mBa se transfirió el RNA a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) durante 1h y 30 minutos, utilizando el tampón 10 X SCC como tampón transferencia. A continuación el RNA se fijó con luz ultravioleta por exposición durante 3-5 minutos. Y se guardaron las membranas a 4° C selladas hasta su hibridación.

Tampón 10X SCC: NaCl 1,5 M y citrato sódico 0,15 M

#### **Marcaje de sondas para Northern blot**

Las sondas se prepararon con el Kit Prime a Gene Labelling System (Promega). Se marcaron 1-2  $\mu$ g de DNA que se desnaturalizó durante 3 minutos a 95°C y se añadieron 7  $\mu$ L de la mezcla de marcaje que contiene el kit (dNTPs y hexanucleótidos), además se añadieron 30 $\mu$ Ci de

isótopo  $\alpha$ -ATP-P<sup>32</sup> y 1  $\mu$ L de Klenow para un volumen final de 25  $\mu$ L, incubándose la mezcla durante 1h a 37°C.

La sonda marcada se separó del isótopo no incorporado a través de cromatografía en columnas de Sephadex-G50 hidratado con tampón STE. Aplicándose la mezcla de reacción en la parte superior de la columna y se añadieron 200  $\mu$ L de tampón STE y se deshechó el volumen saliente. Posteriormente se añadieron otros 200  $\mu$ L de tampón y se recogió el volumen eluido en un tubo *ependorf* (este último paso se repitió 10 veces). La medida de la radioactividad incorporada en las diferentes fracciones eluidas fue medida mediante un contador de partículas de centelleo, correspondiendo el primer pico de aumento de radioactividad con las fracciones de muestra que contenían la sonda marcada.

Tampón STE: Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM.

## **11. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **11.1 Análisis de la abundancia y tamaño mediante *Western blot***

Los extractos proteicos se migran por electroforesis; el gel se separó de los cristales y se preparó el *blot*, utilizando el sistema de transferencia de la casa comercial BioRad. A continuación para llevar a cabo la transferencia durante 1h a 100 V se preparó la unidad de transferencia, con *buffer* de transferencia y un recipiente con hielo.

1 X *Buffer* de transferencia: 100 mL de la solución stock 10 X *running buffer* (144 g de glicerina, 30 g de TRIS y 10 g de SDS para 1 L en agua estéril), 700 mL de agua autoclavada y 200 mL de metanol.

Para llevar a cabo la detección de las proteínas se utilizó el Kit de Quimioluminiscencia *BM Chemiluminescence Western Blotting Kit* de Roche. Lavamos el blot con 1X TBS y se añadió el "Blocking Reagent" (BR) al 1% para disminuir las uniones inespecíficas del anticuerpo, e incubamos sin agitación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se mantuvo en agitación fuera de la nevera 1h para atemperarlo y se lavó con TBST durante 3 minutos. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario, Anti\_GFP (Goat polyclonal IgG\_200  $\mu$ g/1 mL TBS, Santa Cruz Biotechnology), y se dejó en agitación durante 1h y 30 minutos. Tras lavar con TBST durante 13 minutos, y durante 1 minuto con BR 0,5%, se procedió a la incubación con el anticuerpo

secundario, Donkey anti-goat IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP (200 µg/0.5 mL TBS) por espacio de 1h y en agitación. Finalmente, la membrana se lavó con TBST durante 9 minutos.

Como control de carga proteica se utilizó el anticuerpo primario Anti\_Rap1 (Goat Polyclonal IgG\_200 µg/1 mL TBS, Santa Cruz Biotechnology) y el mismo anticuerpo secundario que para GFP. En este caso, también se siguió el protocolo antes mencionado, pero previa eliminación del anticuerpo primario Anti-GFP mediante una técnica de *Stripping*, recomendada por el Kit.

Para llevar a cabo la técnica de *Stripping*, incubamos la membrana a 50 °C durante 30 minutos con 1X TBS, 2-mercaptoetanol 100 mM y SDS al 2%. A continuación lavamos dos veces la membrana durante 15 minutos con TBST a temperatura ambiente y por último bloqueamos la membrana mediante incubación con BR al 1% durante 1 hora.

La detección de la señal se llevó a cabo siguiendo las instrucciones y soluciones del Kit mediante una reacción de quimioluminiscencia, utilizando *films* de autoradiografía. Los resultados se cuantificaron empleando el sistema Molecular Imager Gel Doc™ –XR+ con el programa de análisis Image Lab 3.0.1 de la casa comercial BioRAD. Para normalizar las señales de cada muestra del *Western Blot* se dividieron los valores de la densidad de la banda estudiada entre el valor correspondiente de la señal de control de carga Rap1.

BR 1%: 10 mL BR (del Stock al 10%) y 90 mL TBS

BR 5%: 5 ml BR (del Stock al 10%) y 95 mL de TBS

10X TBS: 60,5 g de TRIS base y 87,6 g de Na Cl para 1 litro de agua destilada estéril. (pH: 7,5 ajustado con HCl).

TBST: 100 mL TBS y 85 µL de Tween 20

## **12. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA**

### **12.1 Microscopía de fluorescencia**

Para estudiar el efecto de la expresión de formas recombinantes de *GFP* en las diferentes cepas, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 50i con un sistema de fluorescencia.

Se tomaron 2 µL de las células procedentes de cultivos en fase logarítmica y se observaron al microscopio de fluorescencia; de esta forma, tomamos fotografías representativas de la población celular.



## 12.2 Espectroscopía de fluorescencia

La medida de la fluorescencia en células se ha llevado a cabo utilizando un espectrofluorímetro VersaFluor de la casa comercial BioRad, donde se empleó un filtro de excitación EX490/10 en conjunción con un filtro de emisión EM510/10.

Las células de levadura transformadas con los distintos plásmidos se obtuvieron de cultivos inoculados en medio completo selectivo con una  $DO_{600}$  de 0,1-0,2 hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0,6-0,7. Un volumen determinado del cultivo se centrifugó y se lavó dos veces con PBS (*“Phosphate Buffered Saline”*) resuspendiéndose posteriormente en el mismo *buffer* a una concentración de  $3,16 \times 10^7$  células/mL (valor correspondiente al logaritmo de la concentración de  $1,5 \times 100.000$  células/mL).

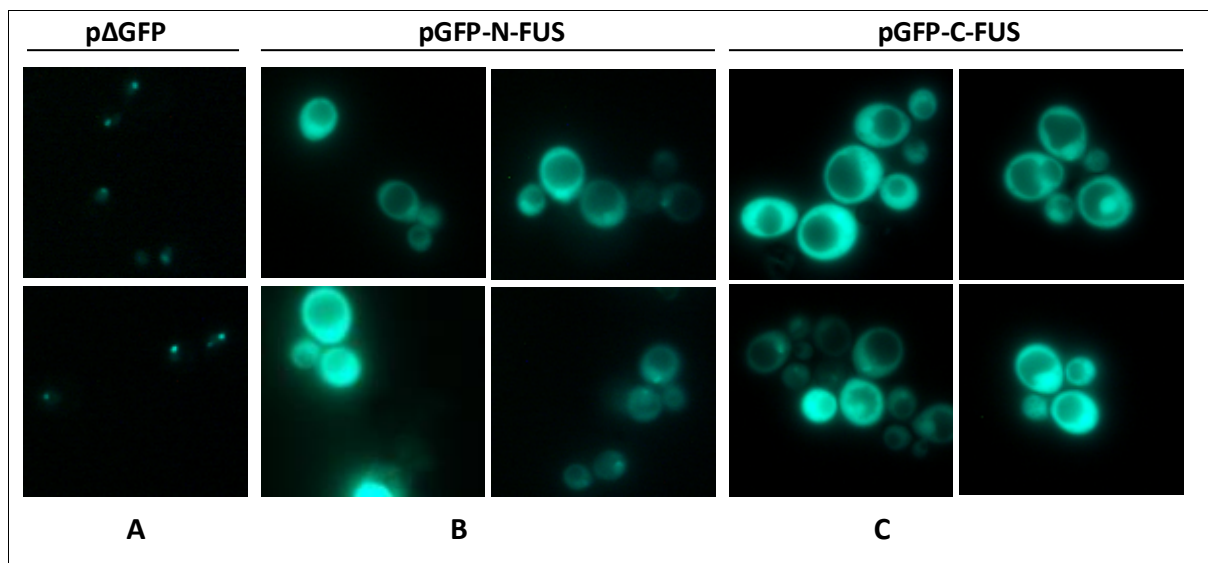
Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia se utilizaron 200  $\mu$ L de los extractos celulares. Los valores se indican como unidades relativas de fluorescencia (RFU). La ganancia *“gain”* fue situada en *“medium”* y se usaron microcubetas de 250  $\mu$ L. El *“zero”* del instrumento se obtuvo con una muestra de 200  $\mu$ L del mismo *buffer* PBS. Todas las medidas se realizaron por sextuplicado y a partir de 4 cultivos diferentes e independientes.

Por otro lado, cabe destacar que para decidir las concentraciones más adecuadas en las que realizar la medida, se hicieron pruebas con distintas diluciones de células/mL. Para determinar cuál era el control negativo más adecuado, se realizaron diferentes pruebas decidiéndose utilizar como control negativo las células transformadas con el vector que no expresa GFP plasmídico.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

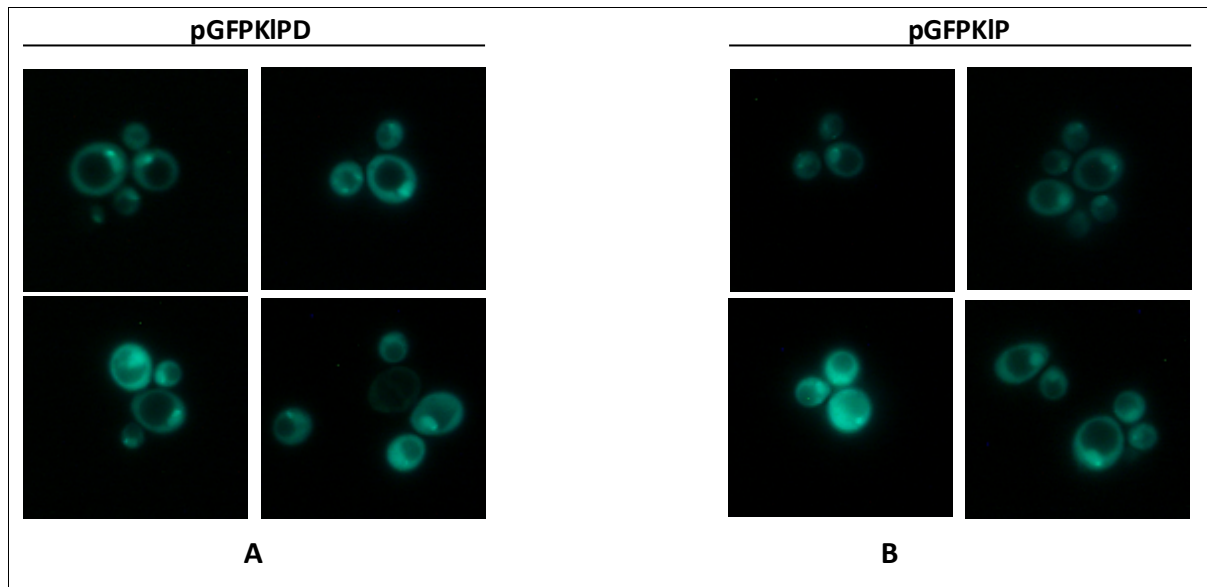
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****1. VARIACIONES EN LA FLUORESCENCIA EMITIDA AL EXPRESAR GFP CON DIFERENTES REGIONES 3'-UTR EN *S. cerevisiae*****1.1 Expresión y localización sub-celular de GFP en la cepa BY-RPGFP**

A fin de visualizar las diferencias en la expresión de *GFP* con diferentes regiones 3'-UTR se llevó a cabo el análisis de microscopía de fluorescencia a partir de células de la cepa BY-RPGFP expresando las diferentes formas recombinantes. Los resultados del análisis nos muestran diferentes efectos en función del plásmido expresado. Como se mencionó en la introducción, esta cepa contiene una fusión genómica de GFP con RPA190, que determina la aparición de una proteína fluorescente nucleolar.



**Figura 12.** Expresión de RPA190-GFP y GFP en la cepa silvestre BY-RPGFP

Al expresarse un vector que presenta la región 3'-UTR de *CYC1* (Figura 1 B y C), se observa la localización de GFP en el citosol, sin embargo, debido a los altos niveles de fluorescencia general, resulta difícil diferenciar la presencia de GFP nucleolar.



**Figura 13.** Expresión de GFP y RPA190-GFP en la cepa silvestre BY-RPGFP

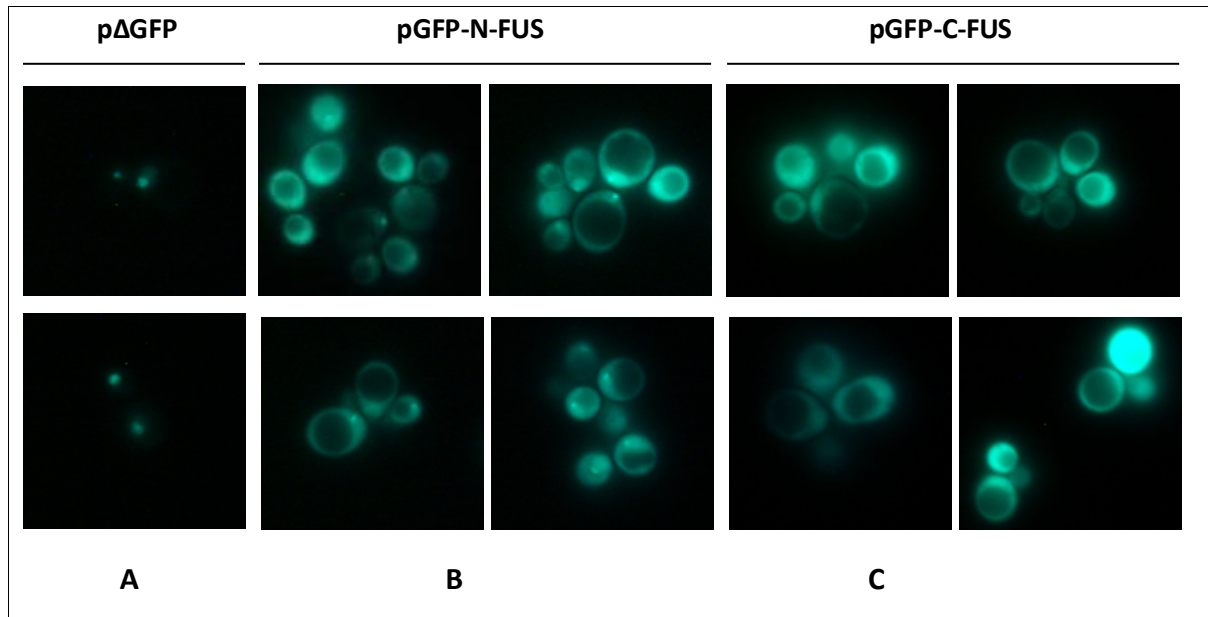
Al expresarse GFP fusionado bien a la región 3'-UTR completa (pGFPKIPD) o sólo la proximal (pGFPKIP) de *KICYC1*, se aprecia un descenso general de los niveles de fluorescencia citosólica en ambos casos, gracias a ello, se puede observar la presencia de fluorescencia con localización nucleolar (Figura 13 A y B). Con el plásmido sin GFP (pΔGFP, Figura 13A) y como era de esperar, se observa la fluorescencia exclusivamente nucleolar.

Por tanto, la expresión de *GFP* con distintas UTRs causa variaciones en los niveles de expresión de GFP citosólico y son claramente detectables con esta metodología.

### 1.2 Expresión y localización sub-celular de GFP en la cepa mutante *Δnup84*

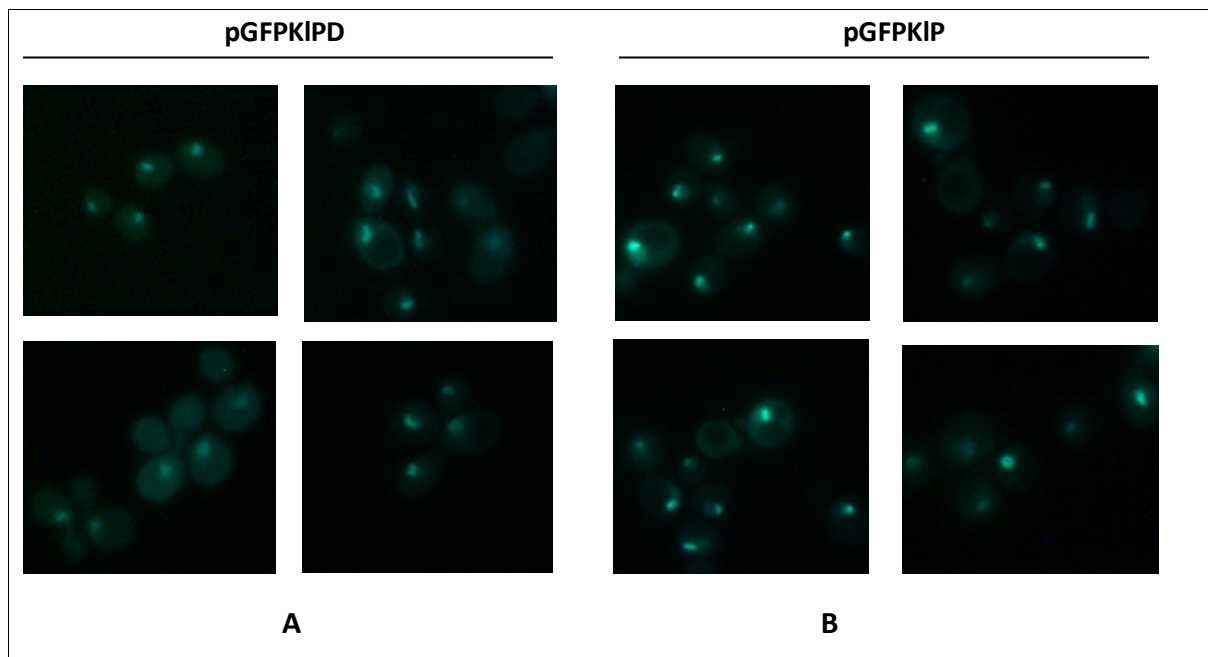
Estudios previos de nuestro laboratorio, nos permitieron comprobar que la mutación *Δnup84* del factor Nup84 del NPC afectan a la expresión de GFP (Varela Rodríguez, B., 2013). Observamos también diferentes efectos en función de la UTR expresada y diferencias respecto a la cepa silvestre que nos llevaron a extender el análisis con nuevas variantes de *GFP* identificando dos efectos dependientes de la UTR:

- i) En las células que expresan *GFP* con la región 3'-UTR del gen *CYC1* de *S. cerevisiae* (Figura 14 B y C), se observa una menor intensidad de GFP citosólico que en la cepa salvaje expresando los mismos plásmidos (figura 14 B y C). Esta menor expresión del GFP citosólico permite además apreciar fluorescencia nucleolar. De nuevo en el control negativo (Figura 14 A) solo se observa fluorescencia con localización nucleolar.



**Figura 14.** Expresión de GFP y RPA190-GFP en la cepa mutante  $\Delta nup84$

- ii) Al expresar un plásmido con la región 3'-UTR completa o proximal de *KICYC1* (pGFPKIPD ó pGFPKIP respectivamente), el efecto observado es un descenso mucho más pronunciado de los niveles de fluorescencia citosólica (en ambos casos) con respecto a los anteriores (Figura 15 A y B), siendo el descenso mucho mayor en comparación con los resultados obtenidos en la cepa silvestre al expresar *GFP* en las mismas condiciones (Figura 13 A y B).



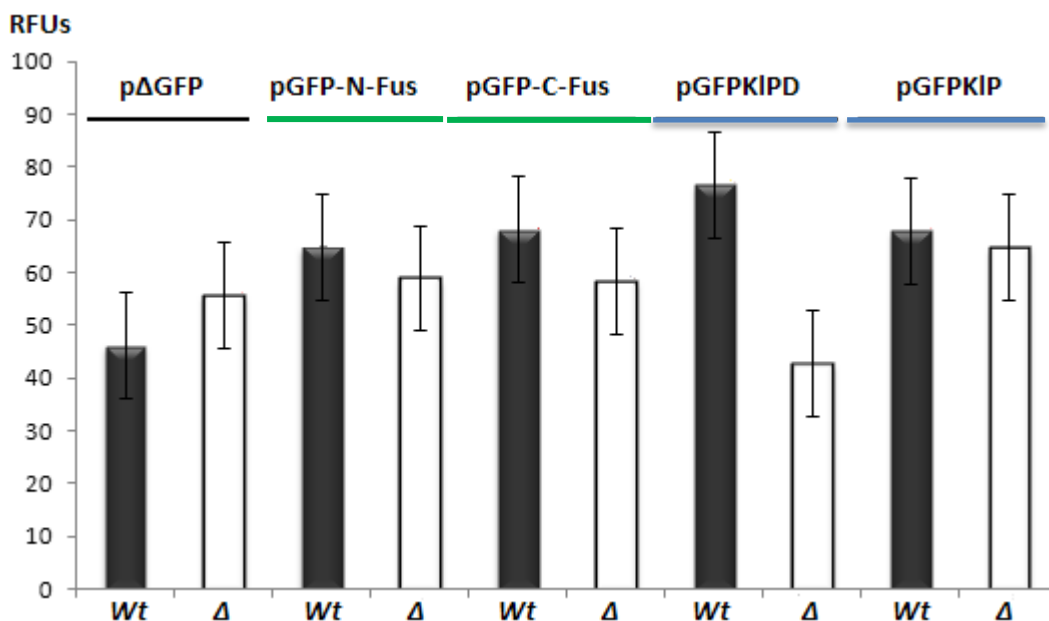
**Figura 15.** Expresión de GFP y RPA190-GFP en la cepa mutante  $\Delta nup84$

Cabe destacar la acusada variación en la intensidad de la señal nucleolar y su morfología.

Los nucleolos son regiones que contiene el RNA ribosomal (rRNA). La transcripción del rDNA por la RNA polimerasa I (Pol I), es determinante de la concentración ribosómica celular, que a su vez está correlacionada positivamente con la biosíntesis de proteínas; numerosos estudios, han demostrado que el tamaño del nucleolo refleja la tasa de transcripción del rDNA. Sin embargo, durante la transcripción, hay otros factores que pueden afectar a la morfología y tamaño del nucleólo, como la velocidad de crecimiento celular. Esto ha permitido comprobar que el incremento de la transcripción de genes que regulan el crecimiento ha sido suficiente por la Polimerasa II (Neumüller *et al.*, 2013). Por tanto, consideramos que las diferencias de tamaño y morfología nucleolar detectables en las imágenes de fluorimetría anteriores y dependientes de la UTR, podría estar relacionadas con la tasa de transcripción de rRNA. Este resultado no había sido descrito previamente y sólo es posible gracias a la metodología empleada.

### 1.3 Análisis mediante fluorimetría

Decidimos comprobar si los cambios detectados anteriormente en la expresión de *GFP* y dependientes de la 3'-UTR eran cuantificables por espectrofluorimetría. Gracias a ello pudimos apreciar diferencias en la expresión de GFP total en la cepa silvestre y en la mutante y su dependencia del plásmido expresado por la fluorescencia detectada (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de la mutación de *Nup84* y de la 3'-UTR en los niveles de fluorescencia en *S. cerevisiae*. Verde: 3'-UTR de *CYC1*. Azul: 3'-UTRs de *K1CYC1*. *Wt*: cepa salvaje BY-RPGFPy  $\Delta$ : mutante  $\Delta nup84$ . Las barras de error representan la desviación típica estándar.

Como se muestra en la Figura 16 apenas hay diferencias en la emisión de fluorescencia entre las células de la cepa silvestre y la mutante transformadas con el plásmido p $\Delta$ GFP (en adelante nos referimos a él como control negativo); esta fluorescencia es debida a la proteína de fusión RPA190-GFP presente también en las células.

Por otro lado, no hay diferencias entre la cepa silvestre y la mutante al expresar plásmidos con la región 3'-UTR de *CYC1* (Figuras 16). El aumento de fluorescencia respecto al control negativo en ambos casos, es debido al aumento de GFP citosólica y por tanto podría considerarse como el valor de la fluorescencia citosólica en la cepa.

Cabe destacar las diferencias apreciables entre ambas cepas cuando expresan la región 3'-UTR de *KICYC1*. Así, la cepa silvestre, expresa niveles de GFP similares con las dos UTRs analizadas (Figura 16). Sin embargo, resulta notable el descenso de los niveles de fluorescencia del mutante  $\Delta$ *nup84* cuando GFP es expresado con la UTR de *KICYC1*, llegando a ser inferiores a los apreciados en el control negativo al expresar GFP con la región UTR completa de *KICYC1*. En la construcción con la 3'-UTR proximal de *KICYC1* expresada en el mutante  $\Delta$ *nup84* no se da este descenso marcado.

Por tanto, nuestros resultados indican que la delección de Nup84 tiene consecuencias diferentes en la expresión de GFP dependiendo de la región 3'-UTR. Más concretamente, con la de *CYC1* se expresa de modo similar a la cepa silvestre mientras que con la UTR completa de *KICYC1* se acusa un cambio importante en la expresión de GFP en el mutante  $\Delta$ *nup84*. Este resultado sugiere una especialización del complejo Nup84 en la expresión de genes dependiendo de la UTR.

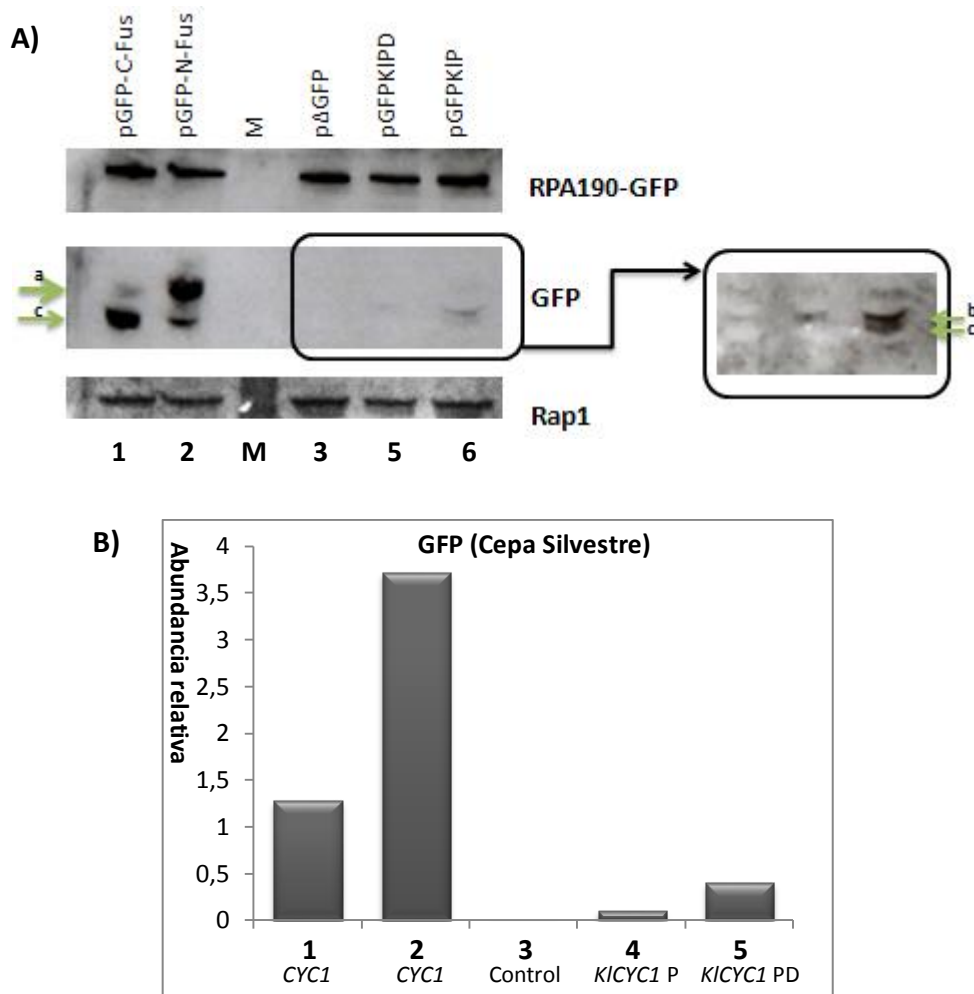
## **2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA GFP EN CÉLULAS GFP RECOMBINANTES MEDIANTE INMUNOBLOT**

Los resultados del *Western blot* en la Figura 17 permiten apreciar una banda superior de 110 KDa correspondiente a la proteína RPA190-GFP así como bandas de 28,18 KDa (carriles 1 y 2) 31,6 KDa (carriles 1, 4 y 5) y 35,23 KDa (carril 2) correspondientes a la proteína citosólica GFP.

Al comparar la señal de GFP en las diferentes muestras (una vez normalizada respecto a Rap1) apreciamos diferencias en los niveles de GFP. Como podemos comprobar en los carriles 1 y 2 la mayor expresión de GFP se da con la región 3'-UTR de *CYC1*, mientras que con las 3'-UTR de *KICYC1* (completa ó proximal) es mucho menor y su vez con la UTR completa de *KICYC1* se da menor expresión que con la proximal.

Caben destacar también las diferencias de tamaño entre estas proteínas GFP. Estas dependen fundamentalmente de las UTRs de *KICYC1* (completa o proximal), que contenga el plásmido.

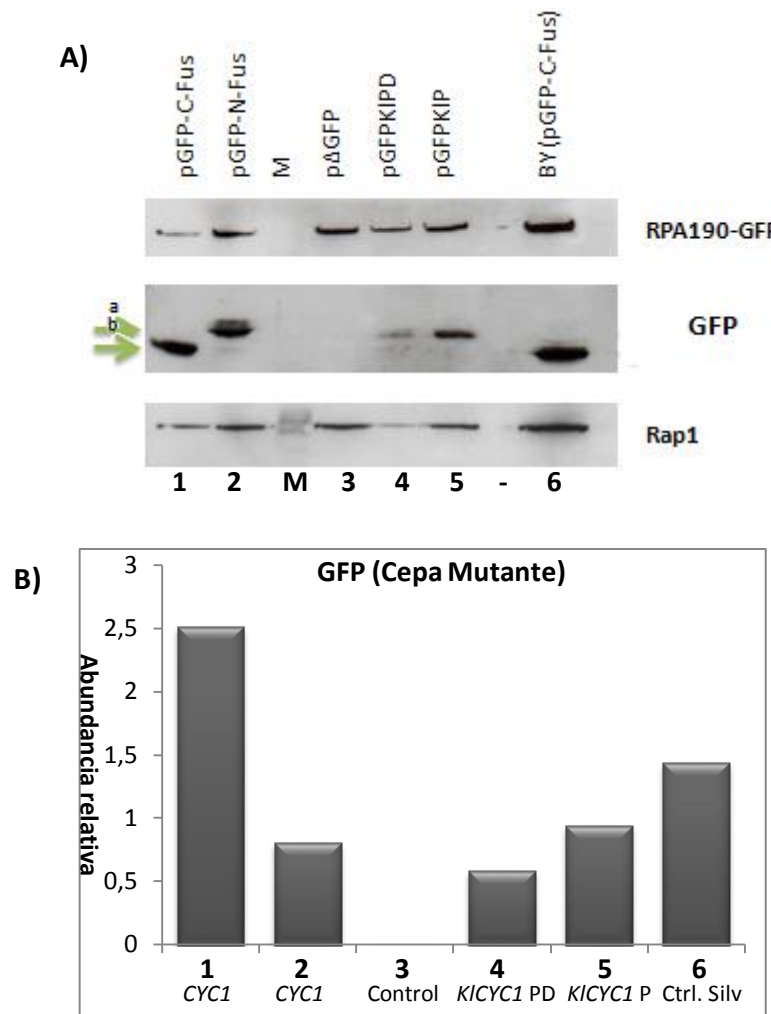
Por otro lado, la aparición de bandas dobles de GFP en los pocillos 1 y 2, se puede explicar por diferencias en los plásmidos pGFP-N-Fus y pGFP-C-Fus puesto que en el segundo caso existe una secuencia de varios tripletes en el sitio de clonaje múltiple del vector que podría afectar a su movilidad o causar modificaciones post-transcripcionales que causen el retraso de la banda.



**Figura 17. A)** Análisis mediante *Immunoblot* de las formas *GFP* recombinantes en la cepa silvestre BY-RPGFP.  
**B)** Datos de *GFP* normalizados respecto a la señal de *Rap1*

En el mutante (Figura 18) también se aprecia una banda superior simple de 110 KDa correspondiente con la proteína RPA190-GFP. Las bandas correspondientes con la proteína GFP citosólica tienen en este caso tamaños de 23,96 KDa (carriles 1 y 6), 27,20 KDa (carriles 2, 4 y 5) y 28,38 KDa (carril 2).





**Figura 18. A)** Análisis mediante *Inmunoblot* de las formas *GFP* recombinantes en la cepa mutante  $\Delta nup84$ .

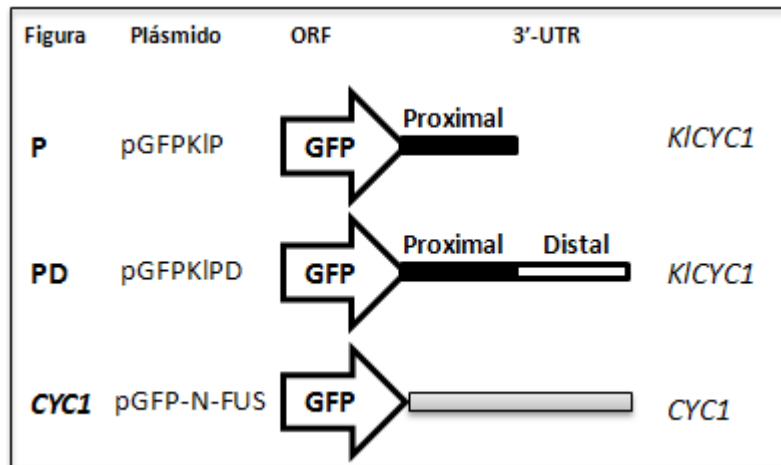
**B)** Los datos representados están normalizados respecto a la señal de Rap1

En este mutante, también se aprecian diferencias en los niveles de GFP según el plásmido expresado; sin embargo, a diferencia de la cepa silvestre, la mayor expresión de la proteína se da con la región 3'-UTR de *CYC1* con el plásmido pGFP-C-FUS.

En un estudio anterior (Varela Rodríguez, B., 2013), pudimos comprobar que en el mutante  $\Delta nup84$  disminuía el mRNA de RPA-190GFP y aparecía una banda doble que se correspondía con transcritos de GFP citosólico, posiblemente causado por recombinación entre las secuencias GFP presentes en el mutante. Las diferencias en el tamaño de proteína que encontramos pueden estar relacionadas con este efecto. Hay que tener en cuenta además, que cada cultivo es una mezcla de células, por lo que es posible que en algunas de ellas se produzca recombinación mitótica, esto se podría traducir en cambios genómicos afectando a la fusión RPA190-GFP y éstos explicarían las diferencias en morfología del nucleolo que se aprecian en la Figura 15.

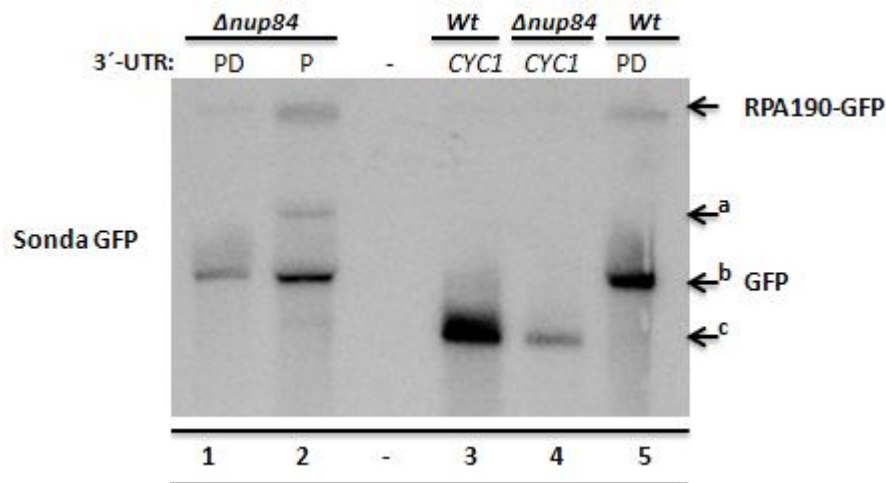
### 3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE mRNA de GFP EN EL MUTANTE $\Delta nup84$

Decidimos ampliar el estudio de la transcripción de GFP en estas cepas incluyendo nuevas construcciones (Figura 19):



**Figura 19:** Construcciones empleadas para el análisis mediante *Northern blot*

Los resultados de este nuevo análisis se muestran a continuación (Figura 20):



**Figura 20:** *Northern blot* de GFP de las cepas BY-RPGFP y  $\Delta nup84$

Si bien al no tener el control de otro transcrito no regulado (como *U3*) no podemos comparar los niveles de mRNA entre las muestras, sí podemos comentar varios resultados. Al analizar los transcritos de GFP expresado en la cepa mutante  $\Delta nup84$  encontramos varios efectos:

Por un lado, expresando GFP con la región 3'-UTR de *CYC1* y de *KICYC1* (carriles 4 y 1 respectivamente) observamos un único transcrito pero de diferente tamaño, esto es debido a la diferencia de tamaño de la región 3'-UTR. Sin embargo, cuando se expresa GFP con la región 3'-UTR proximal de *KICYC1* (carril 2) se observan dos transcritos.

Al expresar *GFP* con la 3'-UTR de *CYC1* en la cepa silvestre la expresión es mayor que en el mutante  $\Delta nup84$  (véase carriles 3 y 4).

Por otro lado, *GFP* con la UTR de *K1CYC1* se aprecia un transcrito con mayor nivel de expresión (pendiente de confirmar con otros controles) y del mismo tamaño que el observado en la cepa mutante (carriles 1 y 5).

Otro dato interesante es la aparición del transcrito de RPA190-GFP que está ligado a la región 3'-UTR de *K1CYC1* (carriles 1, 2 y 5).

## **V. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones referentes al componente del poro nuclear Nup84 de *S. cerevisiae*:

- Tanto en la cepa mutante  $\Delta nup84$  como en la silvestre BY-RPGFP la expresión de GFP citosólica varía con las diferentes regiones 3'-UTRs analizadas. Los niveles más altos de fluorescencia se detectan con la región 3'-UTR de *CYC1* disminuyendo ésta al expresar la 3'-UTR de *KICYC1*. Este descenso, más acusado en el mutante indica que el papel de Nup84 está condicionado por la UTR expresada.

- El descenso de los niveles de fluorescencia citosólica al expresar la región 3'-UTR de *KICYC1*, nos permiten observar en el mutante  $\Delta nup84$  la localización de la proteína GFP nucleolar (RPA190-GFP) así como los cambios drásticos en la morfología e intensidad de la señal nucleolar dependiendo de nuevo de la UTR, información que no había sido descrita previamente. Esto concuerda con las diferencias en los niveles de fluorescencia detectados mediante fluorimetría con la región 3'-UTR completa de *KICYC1*, que también son inferiores en la cepa mutante.

- Los resultados del *Western* permitieron identificar la proteína RPA190-GFP y GFP de diferentes tamaños en la cepa mutante. Y se confirman los datos de microscopía (que mostraban una menor expresión de GFP citosólica dependiente de la región 3'-UTR), en particular en el mutante *nup84*.

- Analizando los niveles de mRNA observamos nuevamente que la expresión de las formas recombinantes de *GFP* son altamente dependientes de la región 3'-UTR. Las cepas analizadas, con la región 3'-UTR de *CYC1* o la de *KICYC1* procesan el RNA de *GFP* plasmídico dando lugar a un único transcrito. Sin embargo, con la región 3'-UTR proximal de *KICYC1* en la cepa mutante, aparecen al menos dos transcritos. Y finalmente, se comprueba que la detección del transcrito de RPA190-GFP está ligado a la región 3'-UTR de *KICYC1*. Este último aspecto será objeto de futuros estudios.

En resumen hemos identificado, utilizando diferentes metodologías, efectos específicos del factor Nup84 del NPC en la morfología del nucleolo y en la expresión de genes *GFP* recombinantes dependientes de la región 3'-UTR.



**Abreviaturas:**

**Å:** Ångström

**AP:** Persulfato amónico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BR:** *Blocking Reagent*

**CM:** Medio completo

**DAPI:** Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato

**DO:** Densidad óptica

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético

**GFP:** *Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)

**KDa:** KiloDalton

**LB:** *Luria-Bertani*

**MOPS:** 4-morfolin ácido propaosulfónico

**mRNA:** RNA mensajero

**mRNPs:** Proteínas asociadas al mRNA

**NPC:** Complejos del Poro Nuclear

**nm:** Nanómetros

**Nups:** Nucleoporinas

**ORF:** Región codificadora

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*

**PEG:** Polietilenglicol

**RFU:** Unidad Relativa de Fluorescencia

**RNA:** Ácido ribonucleico

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**TE:** Tampón Tris/EDTA

**TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametil etilen-diamina

**UTR:** *Untranslate Region* (Región no traducida)

**YNB:** *Yeast Nitrogen Base*



## VII. BIBLIOGRAFÍA

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aitchison, J. D. and Rout, M. P. (2012) The Yeast Nuclear Pore Complex and Transport Through It. *Genetics* **190**:855-883
- Akhtar, A. and Gasser, S. M. (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* **8**:508-517
- Alber, F.; Dokudovskaya, S.; Veenhoff, L. M.; Zhang, W.; Kiper, J.; Devos, D.; Supapto, A.; Karni Schmidt, O.; Williams, R.; Chait, B. T.; Sali, A. and Rout, M. P. (2007) The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**:695-701
- Álvarez-Felgar, T. (2013) Estudio del papel de los componentes Nup84 y Seh1 del complejo del poro nuclear en transcripción y procesamiento de RNA. Tesis de licenciatura defendida en la Universidade de A Coruña
- Björk, P. and Wieslander, L. (2011) Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma* **120**:23-38
- Chalfie, M. (1995) Green Fluorescent Protein. *Photochemistry and Photobiology* **4**:651-656
- Devos, D.; Dokudovskaya, S.; Williams, R.; Alber, F.; Eswar, N.; Chait, B. T.; Rout, M. P. and Sali, A. (2006) Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *PNAS* **103**:2172-2177
- Franco, A.Y. and Longart, M. (2009) Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *RET* **2**:84-96
- Freire-Picos, M.A.; Lombardía-Ferreira, L.J.; Ramil, E.; González-Domínguez, M. and Cerdán-Villanueva, E. (2001) The *KICYC1* gene, a downstream región for two differentially regulated transcripts. *Yeast* **18**:1347-1355
- Freire-Picos, M. A.; Landeira-Ameijeiras, V. and Mayán, M. D. (2013) Stalled RNAP-II molecules bound to non-coding rDNA spacers are required for normal nucleolus architecture. *Yeast* **30**:267-277

- Hetzer, M. W. and Wente, S. R. (2009) Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev. Cell* **17**:606-616
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1987) A ten-minute preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267-272
- Menon, B. B.; Sarma, N. J.; Pasula, S.; Deminoff, S. J.; Willis, K. A.; Barbara, K. E.; Andrews, B. & Santangelo, G. M. (2005) Reverse recruitment: The Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *PNAS* **102**:5749-5754
- Müller, M. and Neugebauer, K. M. (2013) How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet* **14**:275-287
- Neumüller, R. A.; Gross, T.; Samsonova, A. A.; Vinayagam R.; Buckner, M.; Founk, K.; Hu, Y.; Sharifpoor, S.; Rosebrock, A. P.; Andrews, B.; Winston, F. & Perrimon, N. (2013) Conserved regulators of nucleolar size revealed by global phenotypic analyses. *Sci. Signal* **6**(289):ra70
- Niedenthal, R.K.; Riles, L.; Johnston, M. and Hegemann, J.H. (1996) Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression and Subcellular Localization in Budding Yeast. *Yeast* **12**:773-786
- Rodríguez-Navarro, S.; Fisher, T.; Luo, M. J.; Ntunez, O.; Brettschneider, S.; Lechner, J.; Perez Ortiz, J. E.; Reed, R. and Hurt, E. (2004) Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore associated mRNA export machinery. *Cell* **116**:75-86
- Schmitt, M. E.; Brown, T. A. and Trumpower, B. L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**:3091-3092
- Singer, R. H. and Grünwald, D. (2012) Multiscale dynamics in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Cell Biol* **24**:100-106

- Strambio De Castilla, C.; Niepel, M and Rout, M. P. (2010) The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev* **11**:490-501
- Tous, C.; Rondón A. G.; García-Rubio, M.; González-Aguilera, C.; Luna, R & Aguilera, A. (2011) A novel assay identifies transcript elongation roles for the Nu84 complex and RNA processing factors. *The Embo Journal* **30**:1953-1964
- Tutucci, E. & Stutz, F. (2011) Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**:377-384
- Varela Rodríguez, B. (2013) Expresión de formas recombinantes de GFP en levaduras: efecto de la cepa y componentes del poro nuclear. Tesis de licenciatura defendida en la Univerdidade de A Coruña
- Vilariño de la Rosa, R. (2010) Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A.) Universidade de A Coruña
- Vitaly, K. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**(9):857-860
- Yao W., Lutzmann M. and Hurt, E. (2008) A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *EMBO J* **27**: 6–16