

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudo sobre recombinación homóloga e o Complexo do Poro Nuclear

Estudio sobre recombinación homóloga y el Complejo del Poro Nuclear

Study on homologous recombination and the Nuclear Pore Complex

M^a Isabel Diez Grandío

Curso: 2019-2020. Convocatoria: setembro

Departamento de Biología



M^a ANGELES FREIRE PICOS, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EN LA
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMA

QUE EL PRESENTE TRABAJO FIN DE GRADO PRESENTADO POR LA ALUMNA MARÍA ISABEL
DÍEZ GRANDÍO TITULADO:

ESTUDIO SOBRE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y EL COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR

ESTUDO SOBRE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA E O COMPLEXO DO PORO NUCLEAR

STUDY ON HOMOLOGOUS RECOMBINATION AND THE NUCLEAR PORE COMPLEX

Ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación para que pueda ser
juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 14 de septiembre del 2020

FREIRE PICOS
MARÍA
ANGELES -
32760558W

Traxectoria digitalizada por FREIRE PICOS
MARÍA ANGELES - 32760558W
Servizo de documentación CIBG - UDC
www.biblioteca.udc.es/cibg
prof@ma-angeles.udc.es
mafreire@udc.es
MARÍA ANGELES - 32760558W
Firma: 2020.09.14 14:04:00

Fdo: M^a Angeles Freire Picos

ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato.

DO: densidad óptica.

FG: fenilalanina-glicina.

GFP: *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente).

Kb: kilobases.

MDa: megadalton.

mRNA: RNA mensajero.

mRNP: ribonucleopartículas.

NPC: complejo del poro nuclear.

Nup: nucleoporina.

ORF: región codificadora.

Pb: pares de bases.

PCR: *polymerase chain reaction*.

RNA: ácido ribonucleico.

RPA190: subunidad mayor de la RNA polimerasa 1 de *S. cerevisiae*.

Tm: temperatura de melting.

UTR: *untranslate region* (región no traducida).

U3: snRNA17 de *S. cerevisiae*.

INDICE

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT	1
INTRODUCCION	2-4
1. COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR	2
2. SUBCOMPLEJO NUP84 Y SU PAPEL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA	3-4
3. PROCESAMIENTO 3' RNAs	4
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y MÉTODOS	5-11
1. LINEAS CELULARES	5-6
1.1. Cepas de levaduras	5
1.2. Medios de cultivo para levaduras	5-6
2. PLASMIDOS	6-7
3. CULTIVOS CELULARES	7-8
4. OBTENCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS	8-9
4.1. Extracción de DNA (plasmídico y genómico)	8-9
4.1.1. Protocolo de extracción de DNA genómico (método 1)	8-9
4.1.2. Protocolo de extracción de DNA genómico (método 2)	9
4.1.3. Protocolo de extracción por Kit	9
5. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE ACIDOS NUCLEICOS	9-10
6. TECNICAS DE AMPLIFICACION DE DNA	10
6.1. Reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction)	10
7. TECNICAS DE ELECTROFORESIS	11
7.1. Gel de agarosa (no desnaturalizante)	11
RESULTADOS Y DISCUSION	11-21
1. EXTRACCION CONJUNTA DE DNA GENOMICO Y PLASMIDICO	11-13
1.1. Comparativa de método de extracción de DNA	11-12
1.2. Medida de la concentración de ácidos nucleicos	12-13
2. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACION DE DNA	13-18
2.1. Condiciones de una amplificación genérica	13
2.2. Efecto de la temperatura en la amplificación de GFP y RPA	14-17
2.3. Estudio de la recombinación RPA-GFP	17-18
3. COMPARATIVA DE LOS NIVELES RELATIVOS DE RPA Y GFP EN CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES ΔNUP84	19-21
3.1. Niveles de RPA y GFP dependiendo de la mutación Nup84 y la región 3'-UTR	20
3.2. Cálculo de los ratios RPA/GFP	21

CONCLUSION21-22

BIBLIOGRAFIA22-23

RESUMEN

Además de su papel en el tráfico de moléculas núcleo-citoplasma, el Complejo del Poro Nuclear (NPC), desempeña un papel fundamental en procesos nucleolares como la elongación transcripcional y la recombinación, viéndose afectada por el sub-complejo Nup84 (complejo Y). Estudios previos de nuestro laboratorio en *S. cerevisiae*, han analizado el papel que desempeñan las regiones 3'-UTR en el proceso de recombinación entre dos secuencias de GFP: el expresado en un plásmido y con localización citosólica y el genómico, por la fusión RPA190-GFP, que permite obtener un GFP de localización nucleolar. En el presente trabajo se ha puesto a punto la metodología para el estudio, mediante técnicas de PCR, de cambios en la abundancia relativa de GFP y RPA190-GFP en una cepa silvestre y otra mutante para el factor Nup84. Nuestros datos indican que esta recombinación varía en ambas cepas y también depende de la región 3'-UTR del GFP plasmídico.

Palabras clave: complejo del poro nuclear, levadura, NUP84, 3'-UTR.

RESUMO

Ademáis do seu papel no tráfico de moléculas núcleo-citoplasma, o Complexo do Poro Nuclear (NPC), desenvolve un papel fundamental en procesos nucleolares como a elongación transcripcional e a recombinación, véndose afectada polo sub-complexo Nup84 (complexo Y). Estudos previos do noso laboratorio en *S. cerevisiae*, analizaron o papel que desenvolve as rexións 3'-UTR no proceso de recombinación entre dúas secuencias de GFP: o expresado nun plásmido e con localización citosólica e o xenómico, pola fusión RPA190-GFP, que permite obter un GFP de localización nucleolar. No presente traballo se puxeron a punto a metodoloxía para o estudo, mediante técnicas de PCR, de cambios na abundancia relativa de GFP e RPA19-GFP0 nunha cepa silvestre e noutra mutante para o factor Nup84. Os nosos datos indican que esta recombinación varía en ambas cepas e tamén depende da rexión 3'-UTR do GFP plasmídico.

Palabras clave: complexo do poro nuclear, levadura, NUP84, 3'-UTR.

ABSTRACT

In addition to its role in the molecular trafficking between nucleus and cytoplasm, the Nuclear Pore Complex (NPC) plays an essential role in nuclear processes such as transcriptional elongation and recombination, being affected by the Nup84 sub-complex (Y complex). Previous studies in our laboratory in *S. cerevisiae*, analyzed the role of the 3'-UTR regions in the recombination process between two sequences: the one expressed from a plasmid, with cytosolic localization, and the genomic one, the RPA190-GFP fusion, producing a nucleolar localization of GFP. In the present work, we have adapted the methodology to study changes in the relative abundance of GFP and RPA190-GFP, using PCR techniques, in a wild strain and another mutant for the NUp84 factor. Our data indicate that this recombination changes in both strains and also depends on the 3'-UTR region of the plasmid.

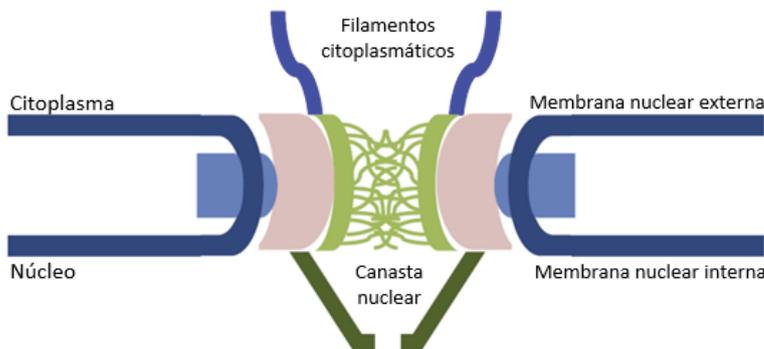
Keywords: nuclear pore complex, yeast, NUP84, 3'-UTR.

INTRODUCCION

1. COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR.

En eucariotas, la compartimentalización en el núcleo y citoplasma hace que sea necesario el intercambio de moléculas entre ambos. Este intercambio o transporte es regulado por una serie de aperturas que se encuentran localizadas en la membrana nuclear y que reciben el nombre de complejos del poro nuclear (NPCs) (Kiseleva et. al, 2004). En levaduras, éste alcanza una masa de 60MDa llegando hasta 125MDa en vertebrados (Bonnet & Palancade, 2014). Los NPCs son conjuntos multiproteicos constituidos por múltiples copias de al menos 30 nucleoporinas (Nups) diferentes (Alber et al., 2007), asociadas entre sí y desempeñando funciones nucleares, tales como: la transcripción de genes o el mantenimiento de la estructura de la cromatina (Ptak et al., 2014). Estos complejos se agrupan en subcomplejos que se muestran en la figura 1.

La estructura del NPC está compuesta principalmente por dos regiones funcionales: la región central embebida en la envuelta nuclear y una región periférica. La región central consta de un cilindro simétrico octogonal de 100nm de diámetro y 40nm de alto y está formada por una serie de anillos: dos anillos externos (nuclear y citoplasmático), dos anillos internos y dos anillos transmembrana (figura 2A). Esta región regula el transporte bidireccional de macromoléculas y pequeños metabolitos (Aitchison & Rout, 2012). La región periférica consta de ocho extensiones filamentosas asimétricas en la cara nucleoplásmica forman una estructura que se conoce como “canasta nuclear” (Kiseleva et. al, 2004) (figura 1), que conecta al NPC con procesos en el control de la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional. Por otro lado en la cara citoplasmática, estos filamentos participan en el control de la síntesis de proteínas (Strambio-De-Castillia et al., 2010).



Complejos del NPC y sus nucleoporinas en levaduras.

Membrana del poro	Andamio central (core scaffold)		Conexión	Canal central	Filamentos citoplasmáticos	Canasta nuclear
Pom152	Nup84	Nup170	Nic96	Nup116	Nup159	Nup1
Pom34	Subcomplej	Subcomplej	Nup82	Nup100	Nup42	Nup2
Ndc1	Nup84	Nup170		Nup145N	Gle2	Nup60
	Nup133	Nup157		Nup57		Mlp1
	Nup145C	Nup188		Nup49		Mlp2
	Sec13	Nup192		Nsp1		
	Nup120			Nup53		
	Nup85			Nup59		
	Seh1					

Figura 1. Estructura del complejo nuclear y Nups que lo conforman en levaduras (Modificado de (Ptak et al., 2014).

2. SUBCOMPLEJO NUP84 Y SU PAPEL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA.

El andamio central (*core scaffold*) del NPC está integrado por dos subcomplejos: el complejo Nup84 (complejo Y), localizado simétricamente en los anillos internos del lado citosólico y nuclear, y el subcomplejo Nup170. Esta estructura permite el transporte de moléculas y contiene las llamadas FG-Nups (dominios de fenilalanina-glicina, FG desplegados), importantes en la función de transporte (Ptak et al., 2014).

El complejo Y se asocia al NPC formando una estructura en Y, dos brazos cortos y un brazo largo, retorcido sobre sí mismo, conectado a un eje central. Se localiza simétricamente en la cara citoplasmática y nucleoplasmática (Brohawn et al., 2009). En levaduras este complejo está formado por 8 subunidades (Gaillard et al., 2019). En humanos el complejo Y se denomina Nup107 y está formado por 10 subunidades (revisado por Bui et al., 2013) en ambos casos en los anillos internos y externos se incluyen un total de 32 complejos Y, 16 en cada anillo ordenados en modo cabeza-cola (figura 2B).

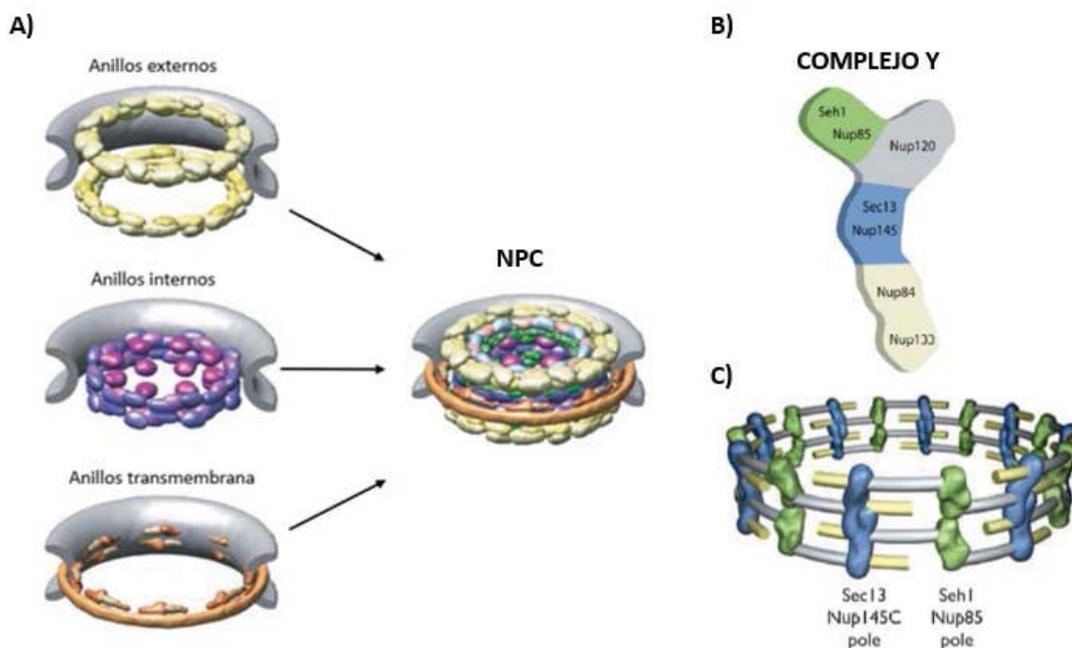


Figura 2. A) Anillos que conforman el complejo del poro nuclear (Modificado de Alber et al., 2007). B) Composición del complejo Y. C) Disposición del complejo Y en el NPC.

El subcomplejo Nup84 interacciona con la maquinaria que une el complejo de elongación RNA polimerasa II (RNAPII) con el NPC (Ptak et al., 2014), jugando un papel importante en la elongación transcripcional. Los datos de (Tous et al., 2011) sugieren que dicho complejo tiene un papel positivo en la elongación de la transcripción, acorde con el acoplamiento entre la transcripción y la exportación de mRNA. Se ha visto que, la inactivación de alguna de las Nups, que conforman este complejo, da lugar a defectos en la exportación del mRNA.

Durante la transcripción, el mRNA se ensambla en ribonucleopartículas mensajeras (mRNP) que abarcan múltiples proteínas transferidas al proceso de transcripción, *splicing* y procesamiento del extremo 3'. Se ha estudiado el papel que desarrollan estos NPCs en la clasificación de los mRNP para el ingreso en la ruta de exportación nuclear (Bonnet & Palancade, 2014).

Además, se ha estudiado el papel del NPC en la replicación y la reparación de DNA, concretamente el papel que desarrolla el complejo Nup84. La proximidad a la periferia nuclear favorece la reparación de roturas de doble cadena, por lo que, posibles mutaciones en dicho complejo, hacen que se acumule DNA no reparado y que se pueda producir un aumento en las frecuencias de recombinación. En la replicación se requiere de Nup84 para la regulación apropiada de la recombinación homóloga (Gaillard et al., 2019).

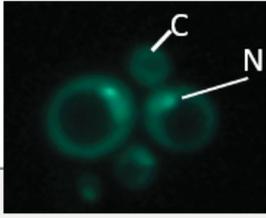
3. PROCESAMIENTO 3' RNAs.

Las regiones 3' de los mRNAs contienen secuencias no traducidas (3'-UTR) de longitud que puede variar entre 100 y más de 1000pb dependiendo del gen, que ejercen un papel esencial en la biogénesis, destino y vida media de los mRNAs (revisado por Lamas-Maceiras et al. 2011). Estas regiones contienen secuencias reconocidas por factores específicos que se asocian a ellas. La contribución de las secuencias presentes en las señales 3'-UTR para la asociación gen-NPC varía de un gen a otro. Además, las diferentes secuencias 3'-UTR afectan diferencialmente la retención de genes en el NPC tras la represión transcripcional. Algunas secuencias 3'-UTR dirigen eventos de procesamiento del extremo 3' cinéticamente más lentos, retrasando la poliadenilación y la liberación de mRNP, en un proceso dependiente del exosoma (Diepinois & Stutz, 2010).

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Varela, 2013 y 2014) se comprobó que al expresar GFP en plásmidos con diferentes regiones 3'-UTR (de expresión citosólica) en una cepa que expresaba además una proteína de localización nucleolar (RPA190) fusionada a GFP (en adelante RPA-GFP), se producían cambios en la localización de la fluorescencia.

También se perdía el transcrito de la fusión RPA-GFP en el mutante $\Delta nup84$ sugiriendo un evento de recombinación del GFP genómico (fusionado a RPA) y el citosólico expresado en el plásmido.

En la tabla 1 se muestran los datos de las variaciones de localización de GFP encontradas por análisis de microscopía de fluorescencia.



	pΔGFP		pGFPKIPD		pGFP-N-FUS	
	BY-RPGFP	$\Delta nup84$	BY-RPGFP	$\Delta nup84$	BY-RPGFP	$\Delta nup84$
Localización exclusivamente citosólica	1%	0%	4%	10%	0%	3%
Localización nucleolar y citosólica	2%	15,20%	81,33%	77,12%	100%	97%

Tabla 1. Variaciones en la localización subcelular de GFP dependiendo de la 3'-UTR expresada y de la mutación $\Delta nup84$ (Varela, 2014). N: Nucleolo, C: citoplasma.

OBJETIVOS.

A fin de realizar nuevas comprobaciones sobre el papel de las regiones 3'-UTR en los cambios del patrón de recombinación dependientes de la mutación $\Delta nup84$, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Comparar tres métodos de extracción de DNA para el posterior estudio de recombinación entre DNA plasmídico y genómico.
2. Optimizar las condiciones de las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) para identificar GFP y RPA190-GFP.
3. Analizar los patrones de bandas RPA190 y GFP en cepas silvestres y mutantes para el factor *NUP84*. Comparando las variaciones en los ratios RPA/GFP en función de la región 3'-UTR desde la que se expresa GFP plasmídico.

MATERIAL Y METODOS.

1. LINEAS CELULARES.

1.1. Cepas de levaduras.

Línea celular	Genotipo	Fuente
BY-RPGFP ^a	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ50 ura3Δ0 RPA190-GFP</i>	Freire <i>et al.</i> (2013)
$\Delta nup84$ ^b	<i>MATa ura3-52 trp163 leu2-1 Nup84::Kanmx4</i>	Alvarez Felgar, T. (2013)

Tabla 2. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio.

BY-RPGFP^a: cepa de partida que contiene la fusión RPA190-GFP y por tanto expresa la proteína de fusión nucleolar RPA190-GFP (Freire *et al.*, 2013).

$\Delta nup84$ ^b: mutante nulo de *NUP84* que se obtuvo a partir de la cepa BY-RPGFP de *Saccharomyces cerevisiae* y que además contiene la fusión nucleolar RPA190-GFP (Alvarez Felgar, T., 2013).

1.2. Medios de cultivo para levaduras.

El medio empleado para el cultivo de levaduras permite que las diferentes cepas mantengan los plásmidos con el marcador *URA3*. Se describe a continuación.

Se trata de un medio sintético de crecimiento de levaduras sin uracilo (CM-Ura) (tabla 3).

CM-Ura (Medio completo sin uracilo)

*Mezcla de aminoácidos 200X	5 ml
Adenina, histidina, leucina, tirosina	40 mg/l
Triptófano	30 mg/l
Dextrosa	2%

Tabla 3. Composición del medio sintético (CM-Ura).

*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	12g/l

Las soluciones se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera, durante 20 minutos y para la preparación de las placas de cultivo (medio sólido) se utilizó Bacto-Agar al 1,5%.

2. PLASMIDOS

Los plásmidos utilizados (Varela, B., 2013) para transformar las cepas detalladas en la tabla 2, se muestran en la siguiente figura (figura 3).

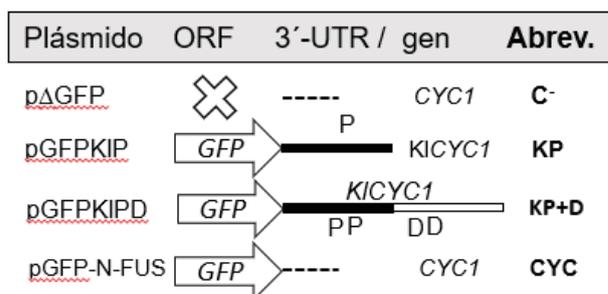


Figura 3. Plásmidos empleados y regiones 3'-UTR expresadas.

. pΔGFP

Plásmido obtenido a partir de la digestión de pGFP-C-FUS con la enzima de restricción Sal I. Posteriormente fue ligado para la eliminación del gen *GFP* del plásmido (Varela, 2013).

. pGFPKIP

Plásmido basado en el vector pGFP-N-FUS que expresa GFP fusionado a la región 3'UTR proximal de *KICYC1*.

. pGFPKIPD

Este plásmido está basado en el vector pGFP-N-FUS que expresa GFP fusionado a la región 3'UTR completa (proximal y distal) de *KICYC1* en vez de *CYC1*.

. pGFP-N-FUS

Este vector deriva del plásmido *p416MET2.5*; permite la fusión del gen *GFP* con el extremo N-terminal de una ORF. La transcripción está regulada por el promotor *MET25* y termina con *CYC1* (Niedenthal et al., 1996) (figura 4).

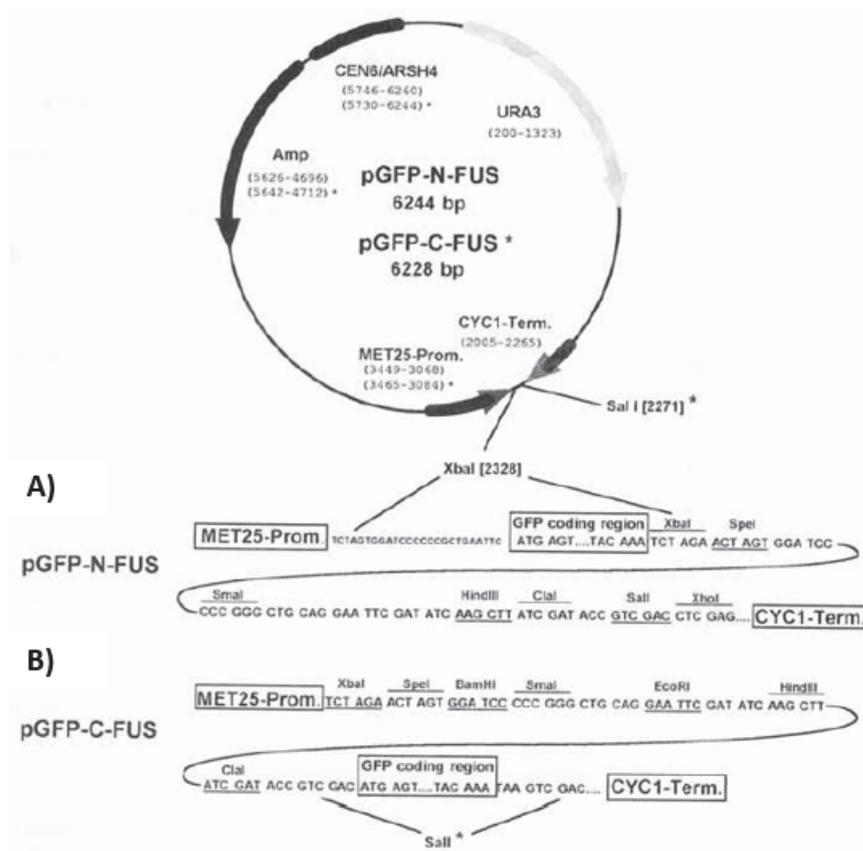


Figura 4. Esquema del vector de fusión de GFP: (A) pGFP-N-FUS y (B) pGFP-C-FUS (Niedenthal et al., 1996).

3. CULTIVOS CELULARES

A fin de obtener células de las diferentes cepas para la posterior extracción de DNA y partiendo de una placa sembrada con las levaduras de interés. Se inocularon células en tubos de cultivo de 20ml con 10ml de medio sin uracilo (CM-Ura).

Tras incubar en agitación toda la noche a una temperatura de 30°C, las células se precipitaron 5 minutos a 5000 r.p.m.; se retiró el sobrenadante y se lavó con 1,5ml de agua destilada estéril. El pellet celular se pasó a los 1,5ml en un eppendorf y se centrifugó aproximadamente 30 segundos a 13000 r.p.m. Tras retirar el sobrenadante, la masa celular se congeló a -80°C para su conservación hasta las posteriores extracciones de DNA.

4. OBTENCION DE ACIDOS NUCLEICOS.

4.1. Extracción de DNA (plasmídico y genómico).

A fin de analizar los posibles eventos de recombinación entre GFP plasmídico y genómico, se necesitaba un protocolo de extracción que fuera efectivo para las moléculas de alto y bajo peso molecular (genómico y plasmídico respectivamente). Por ello, se testaron tres protocolos para poder comprobar con cual se obtenían mejores resultados.

4.1.1. Protocolo de extracción de DNA genómico (método 1; Harju et al., 2004).

Se descongeló la masa celular (obtenida según se describió anteriormente) y se resuspendió en 400µl de solución tampón (tabla 4). Posteriormente se repartieron en dos tubos eppendorf, 200µl en cada uno.

Solución tampón	10 ml
2% (V/V) Tritón x-100	200 µl
1% (V/V) SDS	500 µl SDS 20%
100 mM NaCl	200 µl NaCl 5M
10 mM Tris-HCl pH 8.0	100 µl Tris 1M pH 8.0
1 mM EDTA pH 8.0	20 µl EDTA 0,5 M
H2O	8,7 ml

Tabla 4. Composición de la solución tampón.

En cada tubo se añadieron 0,3g de perlas de vidrio (*glass-beads*) y 400µl de PCIA*. La rotura celular se realizó con ayuda del vortex durante 3 minutos (aproximadamente 20 Hertz). Posteriormente se añadieron 200µl de *buffer* 1XTE y se centrifugó 5 minutos a 13000 r.p.m. Tras este paso se recogió la fase superior acuosa para repetir el proceso nuevamente, esta vez se añadió el mismo volumen de PCIA que de muestra.

PCIA*: Fenol-Cloroformo 1:1, 1/25 volumen de isoamyl-alcohol y 2 volúmenes de 1XTE para equilibrarlo.

Para precipitar los ácidos nucleicos se echó 1ml de etanol 95% por cada 500ml de fase acuosa, se mezcló por inversión y se llevó al congelador a -80°C por al menos 10 minutos, de este modo se favorece la rápida precipitación de todos los ácidos nucleicos.

Posteriormente se retiró del congelador y se centrifugó 5 minutos a 13000 r.p.m., obteniendo una pequeña cantidad de *pellet* que contiene los ácidos nucleicos. Se descartó el sobrenadante y se eliminaron las sales añadiendo 600µl de etanol al 70%, se repite este paso de lavado tres veces. A continuación, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en aproximadamente 100µl de 0,5XTE y se conservó en el congelador a -20°C.

4.1.2. Protocolo de extracción de DNA genómico (método 2; Hoffman and Winston, 1987).

La masa celular descongelada se resuspendió en 200µl de solución tampón (2,5M LiCl₂; 50mM Tris HCl pH 8.0; 4% Tritón X-100 y 62,5mM EDTA) y se repartió en dos tubos eppendorf, 100µl en cada uno.

En cada tubo se añadió 0,2g de perlas de vidrio (*glass-beads*) y el mismo volumen de PCIA que de muestra. Se mezclaron con ayuda de un vortex durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 13000 r.p.m. Tras recoger el sobrenadante se repite el proceso nuevamente.

A continuación, los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante se mezclaron con el mismo volumen de isopropanol que de sobrenadante recuperado y se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m.

Tras obtener un *Pellet* con los ácidos nucleicos, se retiró el sobrenadante y se efectuaron tres lavados con 300µl de etanol al 70%.

Finalmente, se resuspendió la muestra en 20µl de 1XTE y 10µl de agua esterilizada y se conservó en el congelador a -20°C.

4.1.3. Protocolo de extracción por KIT (GeneJet plasmid Minipret Kit).

Se descongeló la masa celular y se añadió al eppendorf el mismo volumen de *glass-beads* que de muestra, aproximadamente 0,5mm, y se resuspendió en 250µl de "resol. solution", se mezcló todo con la ayuda del vortex durante 1 minuto. Posteriormente, se añadió la misma cantidad de dicha solución y se repartió en dos tubos eppendorf, aproximadamente 200µl en cada tubo, se retiraron las *glass-beads*. A partir de este paso se siguieron las indicaciones del protocolo Kit.

La elución del DNA de las columnas se realizó con 50µl de buffer de elución, las muestras se congelaron hasta su posterior uso.

5. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

Para medir la concentración de DNA se tomaron de 2µl ó 4µl de las distintas extracciones de DNA. Se midió la DO₂₆₀ (densidad óptica a 260nm) en un espectrofotómetro UV/Vis de cuantificación de DNA (Implen Nanophotometer®). Posteriormente se calculó la concentración real sabiendo que, DO₂₆₀=1 equivale a una concentración de 50µg/ml de DNA.

De modo alternativo se comparó la señal del gel de agarosa con la concentración conocida de las bandas del marcador (figura 5).

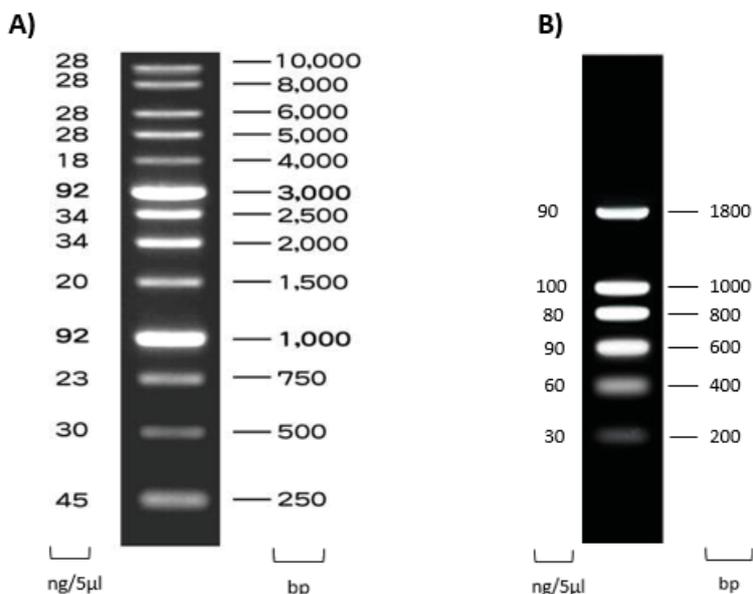


Figura 5: Marcadores. A la derecha se indica el tamaño de los fragmentos de pares de bases (pb) y a la izquierda la concentración que se corresponde a cada banda. **A)** Marcador GeneRuler™ 1Kb. **B)** Marcador NZytec.

6. TECNICAS DE AMPLIFICACION DEL DNA.

6.1. Reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Para la amplificación de genes presentes bien en el genoma o bien en el DNA plasmídico. Se llevaron a cabo reacciones de PCR con diferentes variaciones y una puesta a punto que se detalla en los resultados. Las condiciones generales para la amplificación se pueden resumir del siguiente modo.

Se prepararon reacciones con un volumen final de 50µl: 1µl de dNTPs 2.5mM, 0.8 unidades de Exo *Taq* DNA polimerasa, 5µl del tampón 10X correspondiente a la enzima, distintos volúmenes de DNA molde (1µl a 4µl según el experimento) y de oligonucleótidos (normalmente 1ml de concentración 20mM) en función de la PCR que se iba a realizar, el volumen final se ajustó con agua bidestilada estéril. Las condiciones programadas en el termociclador se muestran en la tabla 5. La temperatura de anillamiento y los tiempos de extensión también se variaron durante el proceso de optimización.

Activación Inicial de la PCR	2 minutos	95°C	
Desnaturalización	30 segundos	95°C	32 ciclos
Anillamiento	45 segundos	50°C	
Extensión	1 minuto	72°C	
Elongación final	5 minutos	72°C	

Tabla 5: Condiciones de una amplificación genérica.

7. TECNICAS DE ELECTROFORESIS.

7.1. Gel de agarosa (no desnaturalizante).

En función del rango de separación de bandas deseado, se prepararon geles con un porcentaje del 0.8% y 1% de agarosa. Para ello empleamos el tampón de electroforesis 1XTAE. Para la carga en el gel y posterior visualización de las muestras de ácidos nucleicos se mezclaron con buffer GelGreen (Biotum) en una dilución 5X.

Tampón de electroforesis 1XTAE contiene: Tris-EDTA-Acetato (Tris 40mM; EDTA 1mM; acetato sódico 20mM y acetato acético 30mM a pH 8.0).

RESULTADOS Y DISCUSION.

Para poder estudiar las variaciones en los patrones de recombinación de GFP dependientes, tanto de la mutación nup84 como de la variación en las regiones 3'-UTR de GFP, se necesitaba verificar que las muestras contenían DNA genómico y plasmídico.

1. EXTRACCIÓN CONJUNTA DE DNA GENOMICO Y PLASMIDICO.

1.1. Comparativa de métodos de extracción de DNA.

Dado que, para los análisis de PCR, era necesario la obtención de DNA genómico y DNA plasmídico. Una etapa preliminar para llevar a cabo los objetivos propuestos fue la comparación de métodos de extracción de DNA. Por ello, se compararon las tres metodologías que se describen en el apartado de material y métodos.

Con el fin de obtener mejores resultados, se optimizó uno de los pasos del protocolo de extracción por Kit. Antes del paso de la solución por la columna se centrifuga la muestra. Por lo que, se decidió hacer el protocolo por duplicado y añadir un paso para ver el efecto de la velocidad de centrifugación: uno de los tubos se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 5 minutos y el otro tubo a 6000 r.p.m. durante 6 minutos. Los resultados se muestran a continuación (figura 6).

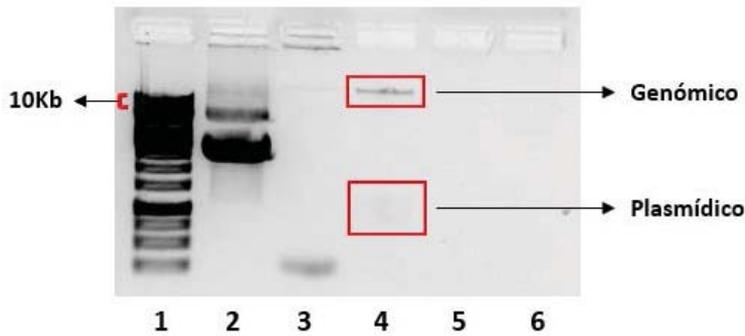


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa comparando los métodos de extracción de DNA.
1. Marcador 1Kb. **2.** Muestra control de DNA con el plásmido CYC1. **3.** DNA extraído por el método 1.
4. DNA extraído por el método 2. **5-6.** DNA extraído por el método 3 con dos velocidades de centrifugación (**5.** 8000 r.p.m. **6.** 6000 r.p.m.).

Como muestra la figura 6, el protocolo con el que se obtuvieron mejores resultados fue el que se observa en el pocillo número 4 (protocolo de extracción por el segundo método) en el que, se obtiene una banda más diferenciada y de mayor peso molecular que corresponde al DNA genómico y una banda más suave y de menor peso molecular que corresponde al DNA plasmídico.

Por lo que, el método que se usó para extraer el DNA de todas las muestras fue el protocolo de extracción de DNA genómico por el segundo método.

1.2. Medida de la concentración de ácidos nucleicos.

Dado que, con las muestras de DNA se pretende analizar por PCR las variaciones relativas a las bandas de GFP y RPA-GFP, resulta necesario partir de concentraciones similares de DNA molde.

A fin de conseguir la concentración de ácidos nucleicos en las diferentes extracciones, inicialmente se empleó el espectrofotómetro para medir la absorbancia a 260nm. Sin embargo, se observó que se obtenían datos negativos en las medidas de absorbancia. Esto puede deberse a una baja concentración de DNA o a la presencia de impurezas como restos de etanol en las muestras. Por este motivo se decidió realizar una electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia y la calidad del DNA en las muestras.

En relación con los datos obtenidos en la figura 6. Se extrajo el DNA de todas las muestras (silvestres y mutantes para Nup84) transformadas con los diferentes plásmidos de GFP, con el protocolo de extracción de DNA genómico por el segundo método. Finalmente se realizó una electroforesis para verificar que las extracciones habían sido realizadas con éxito para avanzar en el estudio. Los datos se muestran en la figura 7.

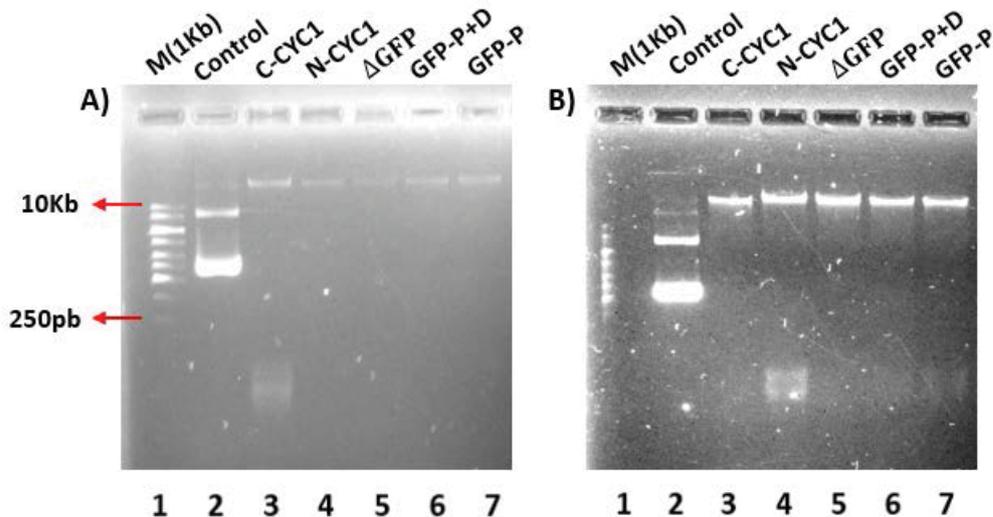


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% comparando los genómicos de la cepa silvestre (A) y los mutantes $\Delta nup84$ (B), expresando plásmidos con diferentes 3'UTRs. 1. Marcador 1Kb. 2. Muestra control de DNA plasmídico. 3-7. Muestras con los plásmidos que se indican en la parte superior de cada carril.

Como se aprecia en la figura (figura 7), se obtuvieron muestras de genómico con una banda de alto peso molecular y en general, homogéneas dentro de cada cepa. Empleando la estimación de la intensidad de bandas del marcador (figura 5), la concentración de la muestra C-CYC1 se aproxima a los 40ng/5 μ l de la banda de 10Kb del marcador y algo menor en el resto de muestras (figura 7A). En el caso de los genómicos de $\Delta nup84$ esta concentración es mayor y más igualada.

Por lo tanto, a partir de estos resultados, las muestras se consideraron adecuadas para iniciar el análisis por PCR.

2. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE DNA.

Para identificar el gen GFP y la fusión RPA190-GFP, fue necesario optimizar las condiciones de las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) como se comentan en este apartado.

El tamaño de las bandas que se deben de obtener son los que se detallan en la tabla 6.

Ampicilina	> 1Kb
GFP	700 pb
RPA194(interno)	442 pb
RPA-GFP (recombinante)	5 Kb
URA	1300pb
U3	> 1Kb

Tabla 6. Tamaño de las bandas de interés.

2.1. Condiciones de una amplificación genérica.

Se procedió a optimizar las condiciones de PCR que nos permitiesen diferenciar las amplificaciones de: GFP, RPA y RPA-GFP. Se compararon temperaturas haciendo PCR en gradiente y se analizó el efecto de la temperatura de anillamiento y concentración de DNA molde.

Bajo las condiciones que se muestran en la tabla 5; con una temperatura de extensión de 72°C durante 1 minuto se realizó una reacción de PCR con las cantidades que se expresan en la siguiente figura (figura 8).

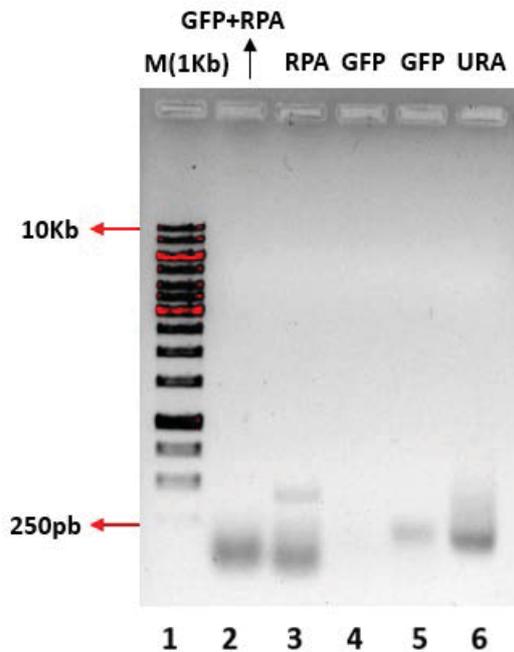


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa para comprobar condiciones de PCR. 1. Marcador 1Kb. 2-6. Muestras con DNA molde expresando el plásmido BYGFP-P+D. (Las variaciones en los reactivos fueron las siguientes: 2. 1µl de DNA molde, *primer* RPA (1µl RPAF + 1µl RPAR) y *primer* GFP (1µl GFPF + 1µl GFPR). 3. 1µl de DNA molde y *primer* RPA (1µl RPAF + 1µl RPAR). 4. 1µl de DNA molde y *primer* GFP (1µl GFPF + 1µl GFPR). 5. 2µl de DNA molde y GFP (1µl GFPF + 1µl GFPR). 6. 2µl de DNA molde y *primer* URA (1µl URAF + 1µl URAR).

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones no fueron los esperados. Como se observa en la imagen (figura 8) en la mayoría de los casos, no aparecen las bandas esperadas pero si la banda de 442pb de RPA (figura 8, carril 3).

2.2. Efecto de la temperatura en la amplificación de GFP y RPA.

En relación a los resultados dados en la anterior amplificación (figura 8), se decidió llevar a cabo una nueva amplificación, bajo las mismas condiciones que la anterior pero a distintas temperaturas. Para ello, se empleó un termociclador en gradiente seleccionando un rango de temperaturas entre 50°C y 60°C. Los resultados se muestran en la figura 9.

En este caso, se probó además nuevo primer de RPA190 que anilla en la región interna (RPA190 int.) en la siguiente tabla (tabla 7), se muestran las secuencias de los *primers* utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia (5' ->3')
Ampicilina F	TTACAGACAAGCTGTGACCGT
Ampicilina R	GCGATCTGTCTATTTTCGTTCA
GFP F	AGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAG
GFP R	TCATCCATGCCATGTGTAATCC
RPA F	AGGCGAAACCAGCAAGAAGA
RPA R	ACCGCCCTTCAAAAACCTTGAC
RPA190int F	TGTACTGACGACGAAGCT
RPA198int R	GCATATCTGGAGGGGTGACA
URA F	TGTGGTTTCAGGGTCCATAA
URA R	TGCGTCCATCTTTACAGTCCT
U3 F	CGACGTAATTCAGTATGTAA
U3 R	ATTTGTACCCACCCATAGAG

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en las ampliaciones de los genes de interés que se detallan en los resultados.

De esta forma, se pudieron comparar resultados en función a la región amplificada de RPA y a las temperaturas.

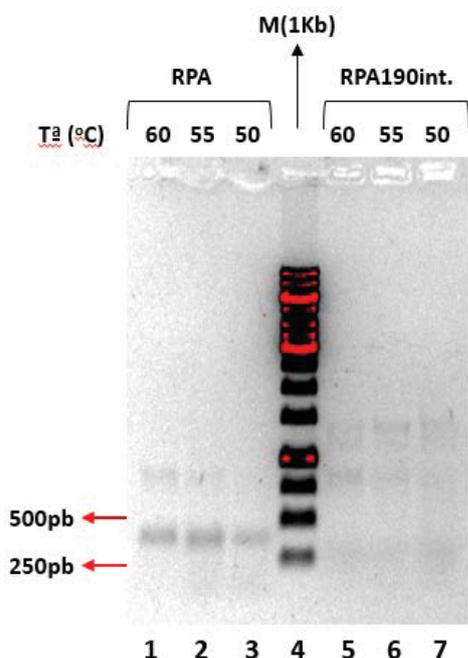


Figura 9. Comparación de primers RPA y temperaturas. Muestras con DNA molde expresando el plásmido BYGFP-P+D. Las variaciones en los reactivos fueron las siguientes: **1.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA (1µl RPAF + 1µl RPAR) a 60°C. **2.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA (1µl RPAF + 1µl RPAR) a 55°C. **3.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA (1µl RPAF + 1µl RPAR) a 50°C. **4.** Marcador 1Kb. **5.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA190int. (1µl RPA190int.F + 1µl RPA190int.R) a 60°C. **6.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA190int. (1µl RPA190int.F + 1µl RPA190int.R) a 55°C. **7.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA190int. (1µl RPA190int.F + 1µl RPA190int.R) a 50°C.

La figura 9 muestra que, a pesar de haber utilizado un nuevo *primer* de la región interna de RPA (RPA190int.), se observaron mejores resultados con el *primer* de RPA utilizado previamente. Se

observó una banda de un tamaño próximo a 500pb y además se verificó que la temperatura que mejor funcionaba era a 55°C.

De modo que, se optó por utilizar el primer par de *primers* y una temperatura de 55°C en todas las amplificaciones posteriores.

De modo similar, comprobó a que temperatura funcionada mejor la amplificación de GFP.

Por otro lado, con el fin de minimizar las pequeñas diferencias de concentración entre las muestras, se quiso introducir una amplificación del gen de resistencia a la ampilicina de *E. coli*, incluida en todos los plásmidos y por tanto funcionaría como control de la cantidad de DNA plasmídico, y de *U3*, como control de genómico.

Además, teniendo en cuenta que se necesitaba también una señal de la fusión RPA-GFP, se introdujo una reacción donde se combinó *primer* RPA más *primer* GFP esperando obtener una banda de aproximadamente 5Kb. Los resultados se muestran en la siguiente figura (figura 10).

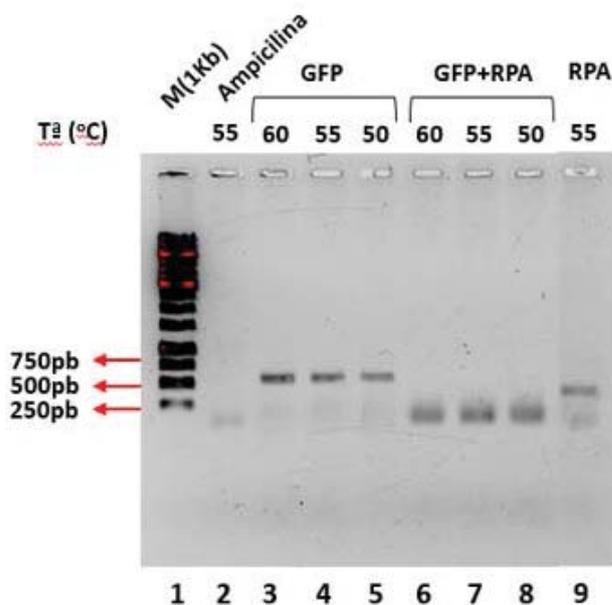


Figura 10. Comparación de *primers* (RPA y GFP) y temperaturas. Muestras con DNA molde expresando el plásmido BYGFP-P+D. Las variaciones en los reactivos fueron las siguientes: **1.** Marcador 1Kb. **2.** 1µl de DNA molde y *primer* ampilicina (1µl AmpicilinaF + 1µl AmpicilinaR), muestra control. **3-5.** 2µl de DNA molde y *primer* GFP (1µl GFPF + 1µl GFPR) a distintas temperaturas: 60°C, 55°C y 50°C, respectivamente. **6-8.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA-GFP (1µl RPA-GFP F + 1µl RPA-GFP R) a distintas temperaturas: 60°C, 55°C y 50°C, respectivamente. **9.** 1µl de DNA molde y *primer* RPA (2µl RPAF + 2µl RPAR) a 55°C.

La figura 10 muestra que, la ampilicina (carril 2), que había sido utilizada como control, no amplificó la banda deseada. Respecto a las amplificaciones de GFP, se pudo comprobar que funcionaba bien a 60°C y a 55°C. Sin embargo, funciona mejor a 55°C como en el caso de la amplificación de RPA (figura 7) ya que, se obtuvo una banda próxima a 750pb.

A pesar de que, independientemente las amplificaciones de GFP y RPA se obtuvieron con éxito, no fue así en el caso de la fusión RPA-GFP, como muestra la figura (figura 10) no se consiguió la banda de 5Kb esperada.

En esta reacción de PCR, se pudo concluir que, las bandas mejor diferenciadas se obtenían en una reacción de PCR con: 2µl de DNA molde, 2µl de primer, bajo una temperatura de 55°C.

2.3. Estudio de la recombinación RPA-GFP.

Tras observar los resultados obtenidos en la electroforesis de la figura 10, se optó por bajar las temperaturas de reacción para la amplificación de ampilicina, ya que, la T_m de los *primers* es más baja.

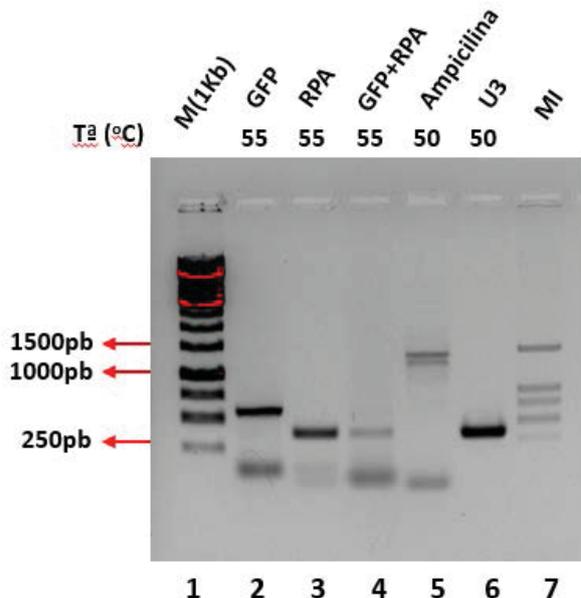


Figura 11. Amplificaciones optimizadas y posibles controles. Muestras con DNA molde expresando el plásmido BYGFP-P+D. Las variaciones en los reactivos fueron las siguientes: **1.** Marcador 1Kb. **2.** 2µl de DNA molde y *primer* GFP (2µl GFPF + 2µl GFPR) a 55°C. **3.** 2µl de DNA molde y *primer* RPA (2µl RPAF + 2µl RPAR) a 55°C. **4.** 2µl de DNA molde, *primer* GFP (2µl GFPF + 2µl GFPR) y *primer* RPA (2µl RPAF + 2µl RPAR) a 55°C. **5.** 3µl de DNA molde y *primer* Ampicilina (2µl AmpicilinaF + 2µl AmpicilinaR) a 50°C. **6.** 3µl de DNA molde y *primer* U3 (3µl U3F + 3µl U3R) a 50°C. **7.** Marcador NZytec.

La electroforesis (figura 11) mostró que efectivamente a 55°C se obtuvieron bandas bien diferenciadas de GFP y de RPA independientemente pero no se obtuvo la banda que nos indicaría recombinación entre GFP y RPA que nos permite detectar la fusión nuclear. Solo se obtuvo una banda que corresponde al tamaño de RPA aunque en menor densidad, dato que nos pudo indicar que posiblemente al detectar pérdida de volumen en la banda correspondiente a RPA, se deba a que haya habido recombinación y por eso la banda se muestra con una intensidad menor.

Por tanto, tras la electroforesis de la figura anterior, las amplificaciones de los genes *Ampicilina* y *U3* tienen dos inconvenientes. Por un lado, la ampilicina solo amplificó a 50°C, se realizaron pruebas a mayor temperatura pero no se obtuvieron resultados y por otro lado, U3 (figura 11, carril 6)

amplifica perfectamente pero la banda tiene un tamaño similar a RPA (figura 11, carril 3). Por tanto, se decidió no emplear ninguno de ellos en las posteriores reacciones de PCR.

Tras analizar los resultados obtenidos en las anteriores amplificaciones, se optó por optimizar las condiciones de amplificaciones. Se aumentó el tiempo de extensión a 2 minutos y el número de ciclos a 34, con el fin de aumentar el tiempo de extensión. Los resultados se observan en la siguiente electroforesis (figura 12).

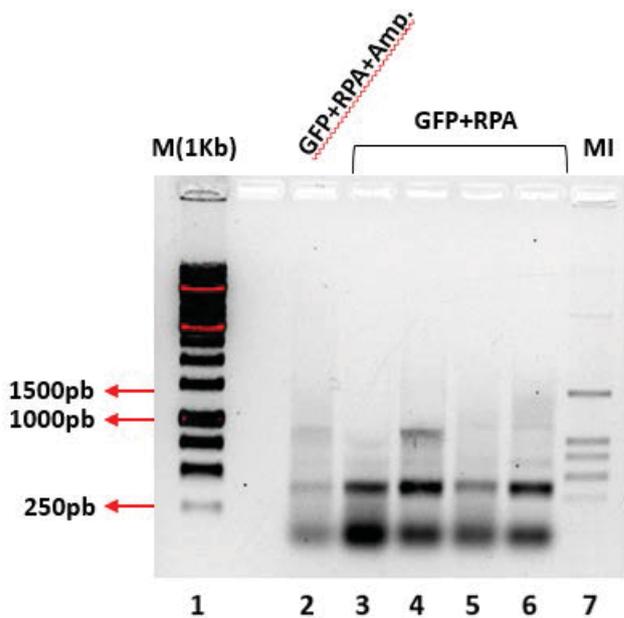


Figura 12. Amplificaciones optimizadas. Muestras con DNA molde expresando el plásmido BYGFP-P+D. Las variaciones en los reactivos fueron las siguientes: **1.** Marcador 1Kb. **2.** 3 μ l de DNA molde, *primer* RPA (2 μ l RPAF + 2 μ l RPAR), *primer* GFP (2 μ l GFPF + 2 μ l GFPR) y *primer* Ampicilina (2 μ l AmpicilinaF + 2 μ l AmpicilinaR). **3.** 3 μ l de DNA molde, *primer* RPA (2,5 μ l RPAF + 2,5 μ l RPAR), *primer* GFP (2,5 μ l GFPF + 2,5 μ l GFPR) y 1 μ l de MgCl₂. **4.** 2 μ l de DNA molde, *primer* RPA (2,5 μ l RPAF + 2,5 μ l RPAR) y *primer* GFP (2,5 μ l GFPF + 2,5 μ l GFPR). **5.** 2 μ l de DNA molde, *primer* RPA (2 μ l RPAF + 2 μ l RPAR), *primer* GFP (2 μ l GFPF + 2 μ l GFPR) y 1 μ l de MgCl₂. **6.** 2 μ l de DNA molde, *primer* RPA (2 μ l RPAF + 2 μ l RPAR) y *primer* GFP (2 μ l GFPF + 2 μ l GFPR). **7.** Marcador NZyMarker.

Nuevamente, como muestra la figura 12, a pesar de haber aumentado el tiempo de extensión los resultados que se obtuvieron no fueron óptimos. Al combinar ambos *primers* se obtiene una única banda y en algunos de ellos se intuyen bandas superiores pero no se obtiene la banda de 5Kb deseada. Se optó por aumentar el tiempo de extensión a 7 minutos pero los resultados no mejoraron.

3. COMPARACION DE LOS NIVELES RELATIVOS DE RPA Y GFP EN CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES Δ nup84.

Dados los inconvenientes encontrados especialmente en la amplificación de la banda RPA-GFP, se decidió realizar, de forma independiente para cada muestra, una reacción de PCR con RPA y GFP y posteriormente calcular el ratio, es decir, la relación de la señal RPA/GFP. La idea es que, este cálculo elimina el problema de carga entre muestras diferentes y por otro lado, si se da una recombinación que lleve a la pérdida de GFP plasmídico, el valor de este ratio aumentaría respecto a la cepa control.

En nuestro caso tomaremos el plásmido pGFP-P+D como control para comparar con el resto de variantes de GFP.

Para eliminar el mayor número de variables se prepararon mezclas de reacción por PCR en este caso una mezcla para GFP (tabla 8) y otra para RPA (tabla 9). Estas mezclas contenían todo lo necesario para la reacción de PCR, excepto el DNA molde que se añadió una cantidad de 1µl a cada tubo.

MIX-GFP X11	
GFP F	1µl
GFP R	1µl
dNTPs	1,25µl
H ₂ O	18,35µl
Buffer 10X	2,5µl
Ezima Taq	0,5µl

MIX-RPA X11	
RPA F	1µl
RPA R	1µl
dNTPs	1,25µl
H ₂ O	18,35µl
Buffer 10X	2,5µl
Ezima Taq	0,5µl

Tabla 8. Mix para amplificación de GFP.

Tabla 9. Mix para amplificación de RPA.

Posteriormente, se observaron los resultados mediante electroforesis en un gel al 1:5 de agarosa (figuras 13 y 14) y finalmente, la cuantificación de las bandas se obtuvo a partir del programa Image lab (Biorad).

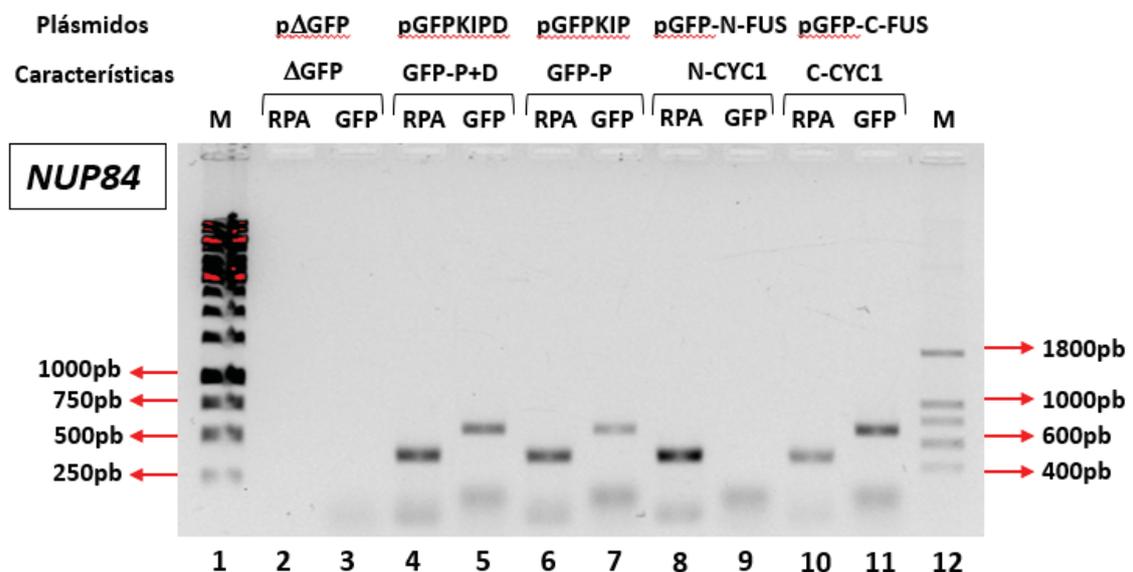


Figura 13. Amplificación de GFP y RPA en la cepa salvaje NUP84. 1. Marcador 1Kb. 2-11. Muestras de las cepas salvajes NUP84, expresando las distintas regiones 3'-UTR que se observan en la parte superior de cada carril. 12. Marcador NZytec.

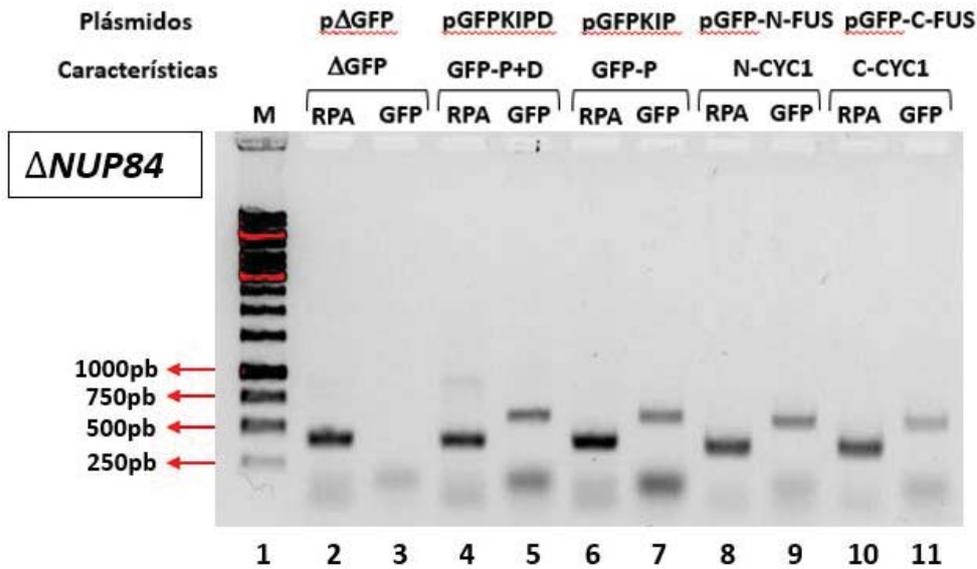


Figura 14. Amplificación de *GFP* y *RPA* en la cepa mutante para $\Delta nup84$. 1. Marcador 1Kb. 2-11. Muestras de las cepas mutantes $\Delta nup84$, expresando las distintas regiones 3'-UTR que se observan en la parte superior de cada carril.

Como se aprecia en los carriles 2 y 3 de la figura 13, no aparece la amplificación de la banda GFP genómica, que se esperaba obtener al no tener GFP en el plásmido. Este hecho nos permite considerar que todo el GFP que se amplificó es citosólico.

3.1. Niveles de RPA y GFP dependiendo de la mutación *Nup84* y la región 3'-UTR.

Tras cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas por PCR los resultados se muestran en la figura 15.

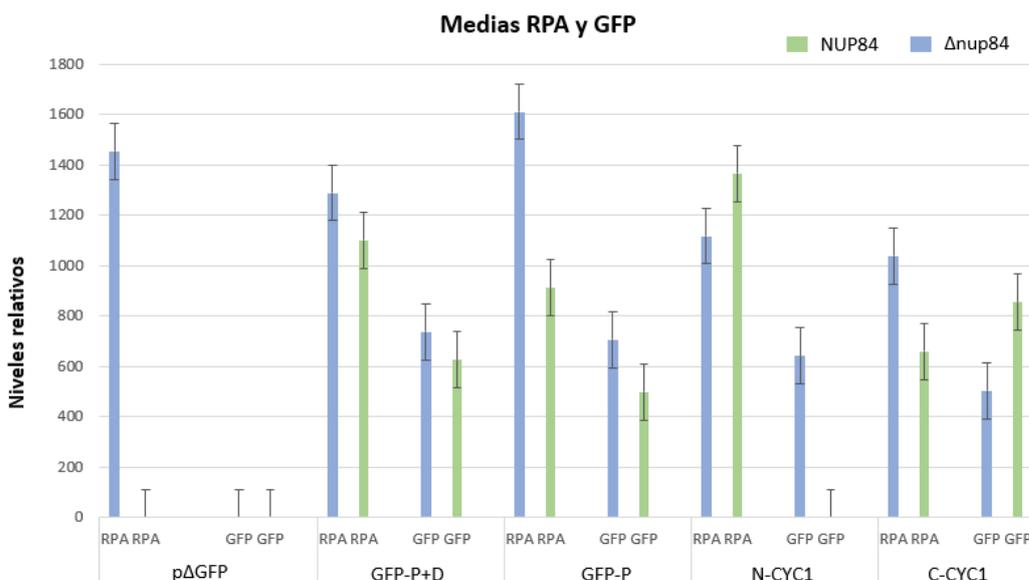


Figura 15. Datos combinados de las medias con sus desviaciones estándar (barras negras) en las cepas salvaje y mutante para *NUP84*. Datos obtenidos con la hoja de cálculo Excel.

3.2. Cálculo de los ratios RPA/GFP.

RATIOS	Δ GFP	GFP-P+D	GFP-P	N-CYC1	C-CYC1
<i>NUP84</i>	N/A	1,76	1,82	N/A	0,77
Δ <i>nup84</i>	4,78	1,75	2,28	1,74	2,06

Tabla 10. Ratios RPA/GFP empleando las medias de los valores de tres cuantificaciones independientes.

En relación a los datos de la figura 15, se calcularon los ratios RPA/GFP que se muestran en la tabla 10.

La situación especial de este curso 2019/2020 ha impedido poder efectuar nuevas PCRs de comprobación, que incluyan además la banda genómica RPA-GFP. Cabe destacar que el ratio RPA/GFP del mutante Δ *nup84* con la región 3'-UTR sale tan alto porque, como se observó en la figura 14, no se amplificó la banda correspondiente a GFP por ello este valor no se tiene en cuenta en la discusión.

Pese a lo expuesto en el párrafo anterior, tomando como referencia los valores de la cepa silvestre expresando la 3'-UTR, GFP-P+D, los resultados obtenidos nos permitieron observar que:

Por un lado, en el mutante Δ *nup84* hay pequeñas variaciones del ratio dependiendo de las regiones 3'-UTR expresadas. Como se puede apreciar en la tabla (tabla 10), al expresar GFP con los elementos proximal y distal (GFP-P+D), no se encontraron variaciones entre la cepa salvaje y el mutante Δ *nup84*. Este último, experimenta un ligero incremento del ratio al expresar GFP-P y C-CYC1, que sugeriría una ligera pérdida de GFP citosólico por recombinación. Estos datos apoyan los datos de microscopia del trabajo de B. Varela que muestra la disminución de fluorescencia citosólica (Varela, 2013).

Por otro lado, en el caso de expresar las regiones 3'-UTRs de N-CYC1 y C-CYC1, llama la atención la disminución del ratio a la mitad en la cepa silvestre. Al comparar estos datos con GFP-P+D, esta diferencia, no se debe a la mutación Δ *nup84* ni a la 3'-UTR, ya que en ambos casos la región 3'-UTR expresada es la de *CYC1*. Por tanto, la causa debe encontrarse en la secuencia de DNA del sitio de clonaje múltiple, presente antes de la región 3'-UTR en el caso de C-CYC1. Por tanto, siguiendo nuestro modelo, sugiere que esta secuencia afecta a la recombinación por tanto, causa la pérdida de GFP.

CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo de optimización de reacciones de PCRs, para posteriores estudios de recombinación dependiente del factor *Nup84*, se puede concluir lo siguiente:

- El método de extracción que permite extraer con éxito el material genético, tanto DNA genómico como DNA plasmídico, de la levadura, *S. cerevisiae*, fue el método descrito por Hoffman y Winston, 1987 (método2).
- En la optimización de reacciones de PCRs, para el posterior estudio de variaciones por recombinación, se consiguieron las condiciones para obtener bandas bien diferenciadas de GFP y RPA (de 700pb y 400pb, respectivamente) únicamente en PCRs independientes. Sin embargo, no se obtuvo la banda correspondiente RPA190-GFP (5000pb) genómico, siendo necesarias optimizaciones posteriores a este estudio.
- Tras amplificar RPA y GFP en células silvestres y mutantes para el factor *Nup84* del NPC, se abordó el estudio del ratio RPA/GFP. El incremento de éste ratio sugiere la pérdida de GFP de origen plasmídico y su reducción, la recombinación en sentido contrario. En cualquier caso, estos cambios son indicativos de cambios en la recombinación entre las dos secuencias GFP.
- El valor de los ratios varía en función de la cepa, salvaje y mutante para *Nup84*, y en ambos casos de la región 3'-UTR expresada y las secuencias adyacentes a la 3'-UTR, como sucede en el caso N-CYC1 y C-CYC1 en las que se encuentra una disminución mayor del ratio.

BIBLIOGRAFIA

- . Aitchison, J. D., & Rout, M. P. (2012). The yeast Nuclear Pore Complex and transport through it. *Genetics*, 190(3), 855–883. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127803>.
- . Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., Sali, A., & Rout, M. P. (2007). The molecular architecture of the Nuclear Pore Complex. *Nature*, 450(7170), 695–701. <https://doi.org/10.1038/nature06405>.
- . Álvarez Felgar, T. (2014). Estudio del efecto del mutante del Complejo del Poro Nuclear Δ seh1 en la activación transcripcional de genes de levaduras. Tesis de licenciatura defendida en la Universidad de A Coruña.
- . Bonnet, A., & Palancade, B. (2014). Regulation of mRNA trafficking by Nuclear Pore Complexes. *Genes*, 5(3), 767–791. <https://doi.org/10.3390/genes5030767>.
- . Brohawn, S. G., & Schwartz, T. U. (2009). Molecular architecture of the Nup84-Nup145C-Sec13 edge element in the nuclear pore complex lattice. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(11), 1173–1177. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1713>.
- . Bui, K. H., von Appen, A., DiGuilio, A. L., Ori, A., Sparks, L., Mackmull, M. T., Bock, T., Hagen, W., Andrés-Pons, A., Glavy, J. S., & Beck, M. (2013). Integrated structural analysis of the human Nuclear Pore Complex scaffold. *Cell*, 155(6), 1233–1243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.055>.
- . Dieppo, G., & Stutz, F. (2010). Connecting the transcription site to the Nuclear Pore: a multi-tether process that regulates gene expression. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 12), 1989–1999. <https://doi.org/10.1242/jcs.053694>.
- . Freire-Picos, M. A., Landeira-Ameijeiras, V., & Mayán, M. D. (2013). Stalled RNAP-II molecules bound to non-coding rDNA spacers are required for normal nucleolus architecture. *Yeast*, 30(7), 267–277.
- . Gaillard, H., Santos-Pereira, J. M., & Aguilera, A. (2019). The Nup84 complex coordinates the DNA damage response to warrant genome integrity. *Nucleic Acids Research*, 47(8), 4054–4067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz066>.
- . Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-8>.
- . Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4).
- . Kiseleva, E., Allen, T. D., Rutherford, S., Bucci, M., Wentz, S. R., & Goldberg, M. W. (2004). Yeast Nuclear Pore Complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *Journal of Structural Biology*, 145(3), 272–288. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.010>.
- . Lamas-Maceiras, M., Seoane, S., & Freire-Picos, M. A. (2011). Alternative Polyadenylation in Yeast: 3'-UTR Elements and Processing Factors Acting at a Distance. *RNA Processing*, 119.

- . Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., & Hegemann, J. H. (1996). Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12(8), 773–786. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19960630\)12:8%3C773::AID-YEA972%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960630)12:8%3C773::AID-YEA972%3E3.0.CO;2-L).
- . Ptak, C., Aitchison, J. D., & Wozniak, R. W. (2014). The multifunctional Nuclear Pore Complex: a platform for controlling gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 28, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.02.001>.
- . Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., & Rout, M. P. (2010). The Nuclear Pore Complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 11(7), 490–501. <https://doi.org/10.1038/nrm2928>.
- . 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 Nup84 complex and RNA processing factors. *The EMBO Journal*, 30(10), 1953–1964. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.109>.
- . 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 Universidad de A Coruña.
- . Varela Rodríguez, B. (2014). Expresión en levaduras de genes GFP recombinantes en el mutante *Dnup84* del complejo del poro nuclear. Trabajo de fin de máster defendido en la Universidad de A Coruña.