



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Estudio de la expresión de genes de ciclo celular y mitosis
que se modifican al mutar el gen de la leucin
aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*
y producción de anticuerpos anti-LAPyspII**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Presenta:

Q.F.B. Laura Alfaro Hernández

Directores de Tesis

Dra. Irma Herrera Camacho. ICUAP

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta. ICUAP

Diciembre 2020



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres, Dr. Alberto Ramírez Mata, Dr. Víctor Manuel Luna Pineda y la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Estudio de la expresión de genes de ciclo celular y mitosis que se modifican al mutar el gen de la leucin aminopeptidasa yspII de Schizosaccharomyces pombe y producción de anticuerpos anti-LAPyspII”**, que presenta la alumna **Laura Alfaro Hernández** para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los cinco días del mes de noviembre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres

Dr. Alberto Ramírez Mata

Dr. Víctor Manuel Luna Pineda

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho y la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta.

La microscopía de fluorescencia del estudio de “Fenotipo de la cepa mutante y cepa control” se realizó en el Laboratorio de Interacción Bacteria Planta, del Centro de Ciencias Microbiológicas del ICUAP BUAP, México, con el asesoramiento del Dr. Alberto Ramírez Mata.

La clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante LAPypII en modelo de *Escherichia coli* BL21-Codon Plus (DE3) se realizó en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con el apoyo del Dr. Víctor Manuel Luna Pineda.

La producción de anticuerpos monoclonales anti LAPypII se realizó en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) con el apoyo de la QFB. Olga Mata Ruiz y la M.C. Yolanda Medina Flores.

Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, apoyado financieramente por el ICUAP y Proyectos de Investigación VIEP-BUAP proyectos (HECI-NAT 2018 y HECI-NAT 2019). También se contó con apoyo económico para viáticos a congreso por parte de la VIEP-BUAP.

Para la realización de este trabajo se contó con BECA de CONACYT, de enero 2018 a diciembre 2019, con el número de registro CVU 762243 y número de apoyo 702295.



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud



Índice

Lista de figuras.....	1
Lista de tablas	3
Resumen.....	4
1. Introducción	5
1.1. El proceso de proteostasis.....	5
1.2. Leucin aminopeptidasas: efectoras de diversas funciones.	5
1.3. La función de leucin aminopeptidasas de diferentes organismos.	6
1.3.1. Leucín aminopeptidasa (PfM17). <i>Plasmodium falciparum</i>	6
1.3.2. Leucín aminopeptidasa (MtLAP). <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.3.3. Leucín aminopeptidasa-1 (TbLAP1). <i>Trypanosoma brucei</i>	7
1.3.4. Leucín aminopeptidasa A. <i>Lycopersicum esculentum</i>	8
1.3.5. Leucín aminopeptidasa 3 (LAP3) en humano: biomarcador de cáncer.	9
2. Antecedentes.....	11
2.1. Caracterización bioquímica de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>S. pombe</i>	11
2.2. Función biológica de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
2.3. Estudios masivos en la levadura <i>S. pombe</i> para el análisis de la leucin aminopeptidasa yspII.	14
2.3.1. Leucín aminopeptidasa yspII y su papel en la producción de proteínas recombinantes. ..	14
2.3.2. Leucín aminopeptidasa yspII y modificaciones en el aprovechamiento de una fuente de carbono en <i>S. pombe</i> (resistencia a desoxiglucosa).....	16
2.3.3. Leucín aminopeptidasa yspII en quiescencia, proliferación y esperanza de vida en <i>S. pombe</i>	17
2.4. Dinámica de cohesinas y su implicación en la segregación del material genético.	19
2.4.1. Conformación del anillo de cohesinas.	19
2.4.2. Dinámica de cohesinas durante el ciclo celular.....	19
2.4.3. Establecimiento de la carga del anillo a estructura de la cromatina en la fase G1 y S.	20
2.4.4. Avance a la fase G2 del ciclo celular.	21
2.4.5. Inicio de la mitosis y progreso a la división celular.	22
2.4.6. Eventos alternos en el control de la cohesión durante la meiosis.	25
2.4.7. Participación de <i>cdc5</i> en la progresión del ciclo celular y splicing de ARN.	28
3. Justificación	30
4. Hipótesis.....	32

5. Objetivos	33
Objetivos generales.....	33
Objetivos particulares	33
Esquema de trabajo	34
6. Metodología.....	35
6.1. Materiales biológicos y reactivos.....	35
6.2. Cinética de crecimiento para las cepas 4X-Control y mutante 4X Δ ape2.....	36
6.2.1. Sincronización celular en fase G1 mediante inanición de nitrógeno.....	36
6.2.2. Cinética de crecimiento.	36
6.2.3. Obtención del modelo logístico integrado. Modelo de Monod.....	37
6.3. Fenotipo de la cepa mutante 4X- Δ ape2 y cepa control 4X.	37
6.3.1. Determinación de viabilidad celular.....	37
6.3.2. Obtención de muestras para microscopía de fluorescencia.	38
6.3.3. Microscopía de fluorescencia.	38
6.3.4. Obtención del extracto celular soluble.	38
6.3.5. Determinación de proteínas totales.	39
6.3.6. Determinación de la actividad enzimática	39
6.4. Determinación del nivel de expresión de genes mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	41
6.4.1. Diseño de oligonucleótidos.	41
6.4.2. Extracción de ARN total.....	42
6.4.3. Síntesis de ADNc mediante retrotranscripción (RT-PCR).	42
6.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa de punto final.....	44
6.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. PCR en tiempo real.	44
6.4.6. Determinación del rango dinámico lineal para el ensayo de qRT-PCR para los genes <i>mis4</i> , <i>mis14</i> , <i>cnp20</i> , <i>sgo2</i> , <i>rec8</i> , <i>cdc5</i>	45
6.4.7. Determinación de nivel de expresión a través del método comparativo $\Delta\Delta$ Ct de genes involucrados en mitosis y ciclo celular en la cepa mutante 4x Δ ape2.....	47
6.5. Producción de la leucin aminopeptidasa yspII recombinante (rLAPyspII) de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en <i>Escherichia coli</i>	48
6.5.1. Análisis bioinformático para la generación de la rLAPyspII.....	48
6.5.2. Extracción y purificación de ADN cromosómico de levaduras.	48
6.5.3. Producción de la proteína LAPyspII recombinante en el sistema de <i>Escherichia coli</i>	48
6.5.4. Generación del inserto del gen <i>ape2</i> de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	49
6.5.5. Clonación del inserto en el plásmido de expresión pLATE51.....	50

6.5.6. Transformación de bacterias BL21-CodonPlus(DE3) con el plásmido pLATE51-LAPypII.	50
6.5.7. Verificación de colonias resistentes a antibióticos con PCR en colonia.	51
6.5.8. Purificación de la proteína LAPypII en <i>Escherichia coli</i> .	51
6.5.9. Purificación de la LAPypII recombinante por cromatografía de afinidad por inmovilización de iones (IMAC) con resina de agarosa-NTA-Ni.	52
6.5.10. Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) y eliminación de impurezas derivadas de la purificación.	53
6.6. Generación de anticuerpos monoclonales anti-leucin aminopeptidasa yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	54
6.6.1. Preparación del inmunógeno.	54
6.6.2. Inmunización y fusión mediante polietilenglicol.	54
6.6.3. Optimización del proceso de ELISA y determinación de la densidad óptima de carga del antígeno.	54
6.6.4. Estandarización de ELISA indirecto.	55
6.6.5. Fusión mediante polietilenglicol.	56
6.6.6. Subclonación y expansión de hibridomas productores de anticuerpos.	56
6.6.7. Criopreservación y almacenamiento de los hibridomas productores de anticuerpos.	57
6.7. Análisis de datos.	58
7. Resultados y discusión	59
7.1. Cinética de crecimiento y características fenotípicas de las cepas 4X Δ ape2 mutante y 4X control.	59
7.1.1. Curva de crecimiento.	59
7.1.2. Viabilidad celular con tinción de azul de tripano.	60
7.1.3. Microscopía de fluorescencia.	62
7.1.4. Actividad enzimática de la cepa 4X-Control de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	65
7.2. Determinación del nivel de expresión de genes del ciclo celular mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) en cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	66
7.2.1. Validación experimental de los oligonucleótidos por RT-PCR tiempo real (qRT-PCR) para determinación del nivel de expresión.	66
7.2.2. Determinación de la eficiencia de reacción por el método de curva estándar relativa.	66
7.2.3. Validación para la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.	69
7.3. Niveles de expresión de los genes relacionados con mitosis y ciclo celular en la cepa mutante 4X Δ ape2.	71
7.3.1. Modificaciones del ciclo celular en la mutante de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	73
7.4. Producción de la proteína leucin aminopeptidasa yspII (LAPypII) recombinante en el sistema de <i>Escherichia coli</i> .	77

7.4.1. Clonación de la LAPypII mediante la técnica de Clonación independiente de Ligación.	77
7.4.2. Verificación de colonias resistentes a antibióticos con PCR en colonia.	81
7.4.3. Purificación de la proteína LAPypII en <i>Escherichia coli</i>	82
Prueba de inducción y solubilidad.	82
7.4.4. Purificación de la LAPypII recombinante por Cromatografía de Afinidad por inmovilización de iones (IMAC- NTA-Ni).	84
7.4.5. Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) y eliminación de impurezas derivadas de la purificación.	85
7.5. Producción de anticuerpos monoclonales contra la leucin aminopeptidasa yspII recombinante de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	88
7.5.1. Análisis bioinformático para la generación de la rLAPypII.	88
7.5.2. Producción de anticuerpos monoclonales contra la leucin aminopeptidasa de yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> a partir del método de hibridomas.	91
7.5.2.1. Inmunización y fusión mediante polietilenglicol.	91
7.5.2.2. Subclonación y expansión de hibridomas productores de anticuerpos.	97
7.5.2.3. Determinación de la eficiencia de los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas para el reconocimiento de la LAPypII recombinante de <i>S. pombe</i>	101
8. Conclusiones.	104
9. Perspectivas.	106
10. Referencias bibliográficas.	107
11. Anexos.	112
A) Preparación de soluciones y medios.	112
B) Producto de difusión.	118

Lista de figuras

Número de figura	Nombre	Página
Figura 1.	Modelo para la interacción de la leucin aminopeptidasa-1 de <i>Trypanosoma brucei</i> con el cuerpo basal, el complejo de unión tripartita y el kDNA, para la segregación del material genético mitocondrial.	8
Figura 2.	Función de leucin aminopeptidasa LAP3 en cáncer de mama.	10
Figura 3.	Estructura del sitio activo y modelo <i>in silico</i> de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	11
Figura 4.	Fenotipo de la mutante 4XΔape2. Comparación de la cepa control 4x y la cepa mutante para la LAPypII.	12
Figura 5.	Determinación de la tasa de crecimiento de las cepas deficientes de proteasas y producción de la hormona de crecimiento humano (hGH) en <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	15
Figura 6.	Crecimiento de cepas que sobreexpresan de odr1 y ysp2 en presencia y ausencia de tiamina en medio mínimo mineral (MM).	17
Figura 7.	Estructura del anillo de cohesinas en <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	20
Figura 8.	Función de la proteína Mis14 en la división celular de <i>S. pombe</i> .	23
Figura 9.	Rol de las proteínas Cnp20 y Mis14 en la organización de la cromatina en la división celular.	24
Figura 10.	Mecanismo de acción de la proteína shugoshina 2 (Sgo2) en la levadura <i>S. pombe</i> .	26
Figura 11.	Ensamblaje de proteínas de centrómero durante la meiosis.	27
Figura 12.	Verificación de bacterias transformantes por PCR en colonia.	51
Figura 13.	Estrategia de purificación mediante FPLC, para mejoramiento de la pureza de la proteína LAPypII.	53
Figura 14.	Reproducción de la cinética de crecimiento de las cepas 4X y 4XΔape2.	60
Figura 15.	Número de células viables y células totales de la cepa 4XΔape2 durante la cinética de crecimiento.	61
Figura 16.	Porcentaje de viabilidad a diferentes horas de crecimiento de la cepa mutante 4XΔape2 con respecto al 4X Control.	62
Figura 17.	Microscopía de fluorescencia para la cepa 4X-Control y 4XΔape2.	64
Figura 18.	Actividad enzimática de la cepa 4X-Control en diferentes etapas de crecimiento.	65
Figura 19.	Generación de curvas estándar para la determinación del rango dinámico de amplificación para cada uno de los genes de interés.	68
Figura 20.	Curva de validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.	70
Figura 21.	Análisis de qRT-PCR de los genes relacionados con establecimiento del anillo de cohesinas y reclutamiento de microtúbulos para la formación del huso mitótico.	72
Figura 22.	Avance del ciclo celular y mitosis con respecto a los principales componentes del huso mitótico y su interacción con el material genético.	74
Figura 23.	Defectos de la segregación cromosómica, que derivan en diferentes manifestaciones de la repartición del material genético	75
Figura 24.	Establecimiento de la cohesión en la meiosis y su interacción con proteínas del cinetocoro.	76
Figura 25.	Generación del producto de PCR con el marco abierto de lectura (ORF) para el gen <i>ape2</i> de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	79
Figura 26.	Sistema de expresión de proteínas recombinantes aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System.	80
Figura 27.	Reacción de alineamiento del vector pLATE51 con el inserto del ORF del gen <i>ape2</i> de la LAPypII.	81

Número de figura	Nombre	Página
Figura 28.	PCR en colonia de las posibles transformantes del plásmido pLATE1-LAPyspII.	82
Figura 29.	Prueba de solubilidad y de inducción para la cepa productora de LAPyspII.	83
Figura 30.	Western blot de la producción de la LAPyspII recombinante en <i>Escherichia coli</i> BL21-pLATE51 LAPyspII DE3, marcando con anticuerpo anti-6xHis.	84
Figura 31.	Etapas del perfil de elución de la purificación de la LAPyspII recombinante con agarosa-NTA-Ni (IMAC).	85
Figura 32.	Purificación por FPLC de la proteína LAPyspII	87
Figura 33.	Representación gráfica de las regiones con predisposición antigénica, bajo el método de Bepipred-1.0 del IEDB (umbral de 0.350).	90
Figura 34.	Títulos de anticuerpos específicos después de la inmunización de ratones BALB/c con el antígeno LAPyspII recombinante.	92
Figura 35.	Primera evaluación de respuesta de anticuerpos IgG policlonales en ratones inmunizados con la proteína LAPyspII.	93
Figura 36.	Análisis de la producción de anticuerpos en ratones Lomo y Cabeza en una partida de inmunización.	94
Figura 37.	Fusión de células de bazo de ratones inmunizados con LAPyspII recombinante y línea celular de mieloma X63-Ag8.653 en medio de selección HAT.	96
Figura 38.	Seguimiento de la eficiencia de fusión del hibridoma productor de anticuerpos monoclonales.	97
Figura 39.	Ensayo de ELISA para la detección de hibridomas productores de anticuerpos anti-LAPyspII recombinante.	98
Figura 40.	Ejemplo de reconocimiento morfológico de los hibridomas para clonación.	99
Figura 41.	Ejemplo de evaluación de subclonas productoras de anticuerpos monoclonales.	100
Figura 42.	Expansión de las clonas positivas productoras de anticuerpos monoclonales anti-LAPyspII recombinante de <i>S. pombe</i> .	101
Figura 43.	Titulación de anticuerpos monoclonales y policlonales anti- LAPyspII recombinante.	102

Lista de tablas

Número de tabla	Nombre	Página
Tabla 1.	Función de proteínas involucradas en la segregación del material genético examinadas en la mutante Δ ape2 con los valores correspondientes de Z-score obtenidos del microarreglo.	14
Tabla 2.	Mutantes de <i>S. pombe</i> de proliferación lenta en condiciones de inanición de nitrógeno.	19
Tabla 3.	Subunidades del anillo de cohesinas y sus reguladores.	21
Tabla 4.	Diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR.	42
Tabla 5.	Condiciones de trabajo de los iniciadores utilizados para la qRT-PCR.	47
Tabla 6.	Oligonucleótidos para la generación del inserto para la clonación de la Leucin aminopeptidasa yspII de <i>S. pombe</i> en <i>Escherichia coli</i> .	50
Tabla 7.	Parámetros cinéticos del crecimiento de la cepa mutante 4X Δ ape2 con respecto a la 4X-Control.	61
Tabla 8.	Parámetros de los genes blanco y de referencia para la generación de la curva estándar a diferentes concentraciones de ADNc.	70
Tabla 9.	Valor de pendiente de la curva de validación del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.	72
Tabla 10.	Diseño de oligonucleótidos para la clonación independiente de ligación de la Leucin aminopeptidasa yspII de <i>S. pombe</i> en <i>Escherichia coli</i> .	78
Tabla 11.	Análisis de BLAST para el reconocimiento de proteínas homólogas de la LAPyspII de <i>S. pombe</i> .	89
Tabla 12.	Región comparativa para epítomos de la LAPyspII, involucrados en la producción de anticuerpos.	89
Tabla 13.	Validación de la predisposición antigénica de las secuencias de aminoácidos de la leucin aminopeptidasa yspII de <i>S. pombe</i> .	91
Tabla 14.	Validación de la predisposición antigénica de las secuencias de aminoácidos de la LAPyspII de <i>S. pombe</i> .	91

Resumen

La exoproteasa denominada leucin aminopeptidasa yspII (LAPypII) de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* pertenece a la familia de proteasas M17, que se encuentran ampliamente distribuidas en varios organismos, desde bacterias, parásitos, plantas, hasta en el ser humano. Estas enzimas poseen una estructura homohexamérica, y utilizan metales como cofactor para la acción hidrolítica en péptidos liberando principalmente leucina. La función de estas metaloproteasas es diversa, desde regulación del metabolismo de productos nitrogenados, hasta chaperonas moleculares en procesos de estrés. En 2007, se describió bioquímicamente la LAPypII, para luego generar una mutante del gen *ape2*, y conocer la función de la enzima en el entorno biológico. Se encontró que la levadura *S. pombe* en ausencia de la peptidasa, presentaba una disminución tanto de la tasa de crecimiento como de la viabilidad celular. Igualmente, presentaba fenotipos aberrantes en la repartición del material genético, y células anucleadas. Mediante análisis de microarreglos se seleccionaron genes con modificaciones en su expresión involucrados en procesos de mitosis y ciclo celular. El objetivo general de este trabajo fue determinar la relación funcional de la LAPypII para comparar los niveles de expresión de genes involucrados en procesos del ciclo celular y mitosis, así como la producción de anticuerpos monoclonales anti-LAPypII.

Los genes *mis4*, *mis14*, *cdc5*, *rec8*, *sgo2* y *cnp20* involucrados en procesos de la segregación del material genético, están modificados en la cepa mutante 4XΔ*ape2*. Se encontró mediante análisis de qRT-PCR, que la expresión de los genes de las proteínas formadoras de complejos del centrómero y cinetocoro (*mis14*, *cnp20*, *sgo2*) presentaron una disminución paulatina posterior a 20 y hasta 32 h de crecimiento. Así también, el elemento regulador *mis4* de carga de cohesinas, presentó disminución en la cepa mutante, por lo que la disminución de la expresión de transcrito (mARN) puede afectar la segregación de las cromátidas hermanas a nivel de acoplamiento de microtúbulos y establecimiento de la cohesión. Por otro lado, los genes involucrados en la meiosis, como la cohesina *rec8*, presentaron un incremento en el nivel de expresión a las 24 h, sugiriendo la inducción de procesos de supervivencia celular. La desregulación de tales procesos en ausencia de esta peptidasa sugiere su papel regulador de procesos involucrados en la mitosis y ciclo celular, enfocados principalmente en el acoplamiento de microtúbulos y establecimiento de cohesinas. La LAPypII parece estar involucrada en la regulación citoplasmática del ensamblaje de microtúbulos, que a su vez participa en la regulación del cambio de fase en la mitosis, la segregación de las cromátidas hermanas y posiblemente en la modulación de la expresión de genes que intervienen en estos mismos procesos.

Por otro lado, se produjo la enzima LAPypII en el sistema de *Escherichia coli*, para usarla en la generación de anticuerpos monoclonales en modelo de ratón. Se utilizó el método de clonación independiente de ligación, el cual es un método que hizo posible la producción con gran eficiencia de transformación de la LAPypII. El diseño del plásmido, así como la estrategia de clonación hicieron posible la obtención de una cepa de *E. coli* BL21 (DE)-*ape2*, estable productora de la peptidasa a baja escala. Así mismo, este modelo de producción fue aplicado a la purificación de la enzima con alto rendimiento por cromatografía de afinidad a NTA-Ni usando un equipo automatizado de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), lo que permitió mejorar la pureza de la proteína. Se administraron con la proteína recombinante purificada a ratones BALB/c para generar anticuerpos monoclonales a través de la técnica de hibridoma. Se han obtenido cuatro clones estables, las cuales son capaces de reconocer a la LAPypII recombinante. Estos anticuerpos serán utilizados en un futuro para ubicar a la enzima en procesos clave de la mitosis y cinética de crecimiento de la levadura, así como su identificación bajo la aplicación de diferentes inmunoensayos.

1. Introducción

1.1. El proceso de proteostasis.

Nuestra visión del universo proteolítico se ha expandido considerablemente en los últimos años. Inicialmente, las proteasas se caracterizaron como enzimas hidrolíticas inespecíficas asociadas al catabolismo proteico. Actualmente, se ha reconocido que la proteólisis está involucrada en diferentes mecanismos para lograr un control celular preciso de los procesos biológicos en todos los organismos vivos, por un lado, a través de la hidrólisis altamente específica de los enlaces peptídicos, y por otro llevando a cabo funciones diversas (moonlight) que les proveen funciones adicionales a las canónicas. Sin estos procesos, la maquinaria celular no sería capaz de lograr el equilibrio de las funciones, y sería imposible mantener la homeostasis celular (1).

Debido a las funciones en expansión de las enzimas proteolíticas, existe un interés creciente en la identificación y caracterización funcional de muchas proteasas que están presentes en varios organismos, desde las bacterias hasta el hombre. Los microorganismos transmisores de enfermedades infecciosas, virus y parásitos usan proteasas como factores de virulencia; toxinas presentes en diferentes animales comúnmente contienen proteasas para efectuar la destrucción del tejido o evadir las respuestas del huésped. En consecuencia, muchas proteasas o sus sustratos son un objetivo importante para la industria farmacéutica como posibles blancos farmacológicos (2).

La evidencia de la complejidad e importancia de los sistemas proteolíticos que funcionan en todos los organismos, y la capacidad de analizar sistemas en su totalidad en escalas de genoma y proteoma, requiere la introducción de nuevos términos para aclarar las situaciones emergentes y conceptos innovadores en este campo (3-5).

1.2. Leucin aminopeptidasas: efectoras de diversas funciones.

La diversa familia de enzimas leucin aminopeptidasas M17 (clan MF, familia M17) son un grupo de proteasas que hidrolizan el enlace peptídico amino terminal en un sustrato que libera un solo aminoácido (leucina). Aunque de alguna manera esto puede verse como una alteración relativamente menor de una proteína, ahora es más evidente que tal modificación puede tener un efecto importante en la estructura y función de la proteína (6).

Las aminopeptidasas M17 se encuentran ampliamente distribuidas en varios organismos, en donde poseen una estructura cuaternaria homohexamérica. La subunidad monomérica está compuesta por un

dominio N-terminal variable del y una región catalítica C-terminal conservada entre esta familia. Se ha postulado que los sustratos altamente específicos para este tipo de enzimas pueden acceder al sitio activo a través de canales formados entre los dominios N-terminales de los monómeros vecinos. Los canales están flanqueados por asas flexibles, cuya longitud y naturaleza difieren entre proteínas homólogas de la familia M17-LAP. La conformación de estas asas juega un papel importante en la modulación de la entrada del sustrato a la cavidad del sitio activo, y por lo tanto, en la especificidad del sustrato (7, 8).

El centro de unión al metal es binuclear y también participa en la especificidad del sustrato y la actividad catalítica. Este utiliza dos iones metálicos divalentes, (un ion regulador de la estructura, generalmente zinc; otro presente en el sitio activo magnesio, manganeso o hasta iones sodio) los cuales pueden variar entre diferentes proteasas) como cofactores para catalizar la eliminación de aminoácidos N-terminales seleccionados de péptidos o proteínas (8).

Generalmente, la acción proteolítica contribuye al recambio de proteínas intracelulares, convirtiendo al catabolismo proteico en un proceso fundamental en todos los organismos vivos. Sin embargo, una amplia gama de funciones adicionales más allá de la actividad aminopeptidasa también se han atribuido a las leucin aminopeptidasas M17. Los mecanismos por los cuales realizan estos procesos tan diversos, a pesar de su estructura tan conservada, aún no están claros.

1.3. La función de leucin aminopeptidasas de diferentes organismos.

A continuación, se muestran algunos ejemplos de leucin aminopeptidasas distribuidas en la naturaleza, que desarrollan diferentes funciones:

1.3.1. Leucín aminopeptidasa (PfM17). *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum, el parásito responsable de la malaria, lleva a cabo reacciones digestivas de la molécula de hemoglobina dentro de los eritrocitos. La leucin aminopeptidasa de *P.falciparum* (PfM17) realiza la tarea adicional de liberación de aminoácidos de péptidos enviados al citosol desde las vacuolas digestivas donde tiene lugar la rápida degradación de la hemoglobina del huésped. Este proceso libera péptidos para la producción de proteínas del parásito, pero también para mantener el correcto equilibrio osmótico dentro del eritrocito del huésped (9, 10).

La confirmación de la localización citosólica para la PfLAP se obtuvo usando una proteína de fusión PfLAP-GFP que demostró que la intensidad de la tinción fue mayor en etapas del trofozoíto temprano

y tardío, en las cuales se lleva a cabo el desarrollo del parásito en el eritrocito, por lo tanto, la leucin aminopeptidasa PfM17 es crítica para la supervivencia del parásito dentro del huésped en la etapa sanguínea en humano (11).

1.3.2. Leucín aminopeptidasa (MtLAP). *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es una de las bacterias más peligrosas capaces de infectar al humano y causar daño grave que puede derivar en muerte. Es necesario el desarrollo de nuevas alternativas para su tratamiento debido a que presenta alta resistencia a antibióticos.

Se ha realizado la caracterización de una LAP perteneciente a la familia M17 en *M. tuberculosis*, la cual es inhibida de manera eficiente por bestatina. El tratamiento con bestatina de macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis*, mostró una reducción significativa dependiente de la dosis en las unidades formadoras de colonias. Así mismo, el tratamiento con el inhibidor de la MtLAP reduce las lesiones en pulmones infectados de ratón, comparado con el tratamiento de elección, la isoniazida. Estos estudios han posicionado a la MtLAP como un elemento importante en la patogénesis de la bacteria, por lo tanto, como un blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos antibióticos (12).

1.3.3. Leucín aminopeptidasa-1 (TbLAP1). *Trypanosoma brucei*

La leucin aminopeptidasa-1 presente en *Trypanosoma brucei* es una enzima relacionada con la división del material genético en la mitocondria, denominado cinetoplasto (kDNA), así como con proteínas del complejo de unión tripartita (TAC) encargadas de la formación de filamentos del cuerpo basal para llevar a cabo la citocinesis. La distribución de TbLAP1 dentro del kDNA experimenta cambios durante la división celular, ya que en la fase G1, TbLAP1 se localiza conjuntamente con el kDNA, pero conforme avanza la fase se modifica su interacción con TAC102, un componente del TAC, una estructura filamentosa que conecta el kDNA con el cuerpo basal y el flagelo. La desregulación de TbLAP1 resulta en un defecto del crecimiento, así como en la acumulación de dobletes nucleares (**Figura 1**). El análisis con tinción de DAPI de las células en ausencia de la TbLAP1 (silenciamiento) sugieren citocinesis tardía. Por otro lado, la expresión ectópica de TbLAP1-HA causa la pérdida de kDNA y defectos del crecimiento. Dado que el proceso de segregación de kDNA termina con el inicio de la citocinesis, el efecto de la regulación negativa provocada por la expresión ectópica de TbLAP1 indica su clara participación en la segregación de kDNA. Ya que la localización de la TbLAP1 cambia dinámicamente durante el ciclo celular, y su movimiento se conjuga con el de los cuerpos basales, se

vio que el estrés experimentado por los tripanosomas que tienen sobreexpresión de TbLAP1 se refleja aún más por el reclutamiento de chaperonas como mtHsp70 y su colocación con TbLAP1 (13).

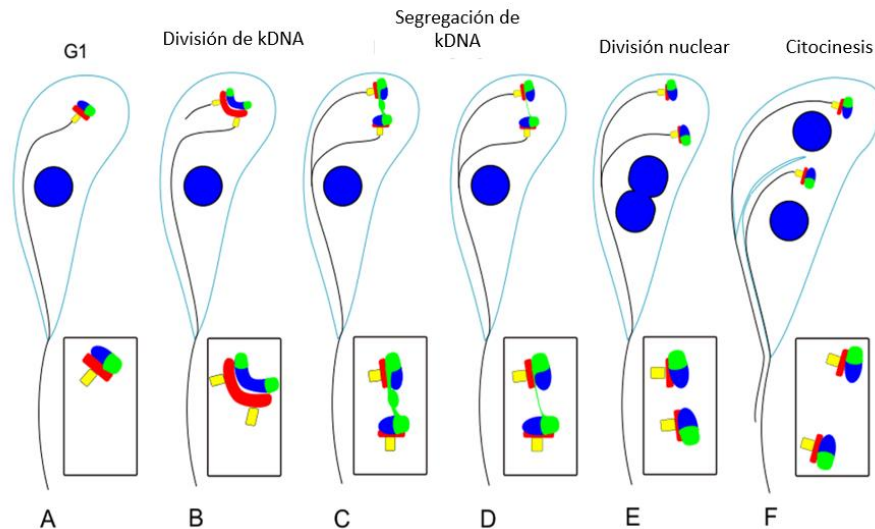


Figura 1. Modelo para la interacción de la leucin aminopeptidasa-1 de *Trypanosoma brucei* con el cuerpo basal, el complejo de unión tripartita y el kDNA, para la segregación del material genético mitocondrial. El cuerpo basal (■ amarillo), el flagelo (línea negra), el complejo de unión tripartita (TAC) (■ rojo), el kDNA y el núcleo (■ azul) y el TbLAP1 (■ verde) se representan durante el ciclo celular de *T. brucei*. (A) Células de interfase (1Nuclear1kDNA), con un cuerpo basal, un flagelo y un solo TAC conectado con kDNA y TbLAP1. (B) Células en las primeras etapas de división, con cuerpos basales y TAC divididos; el crecimiento del nuevo flagelo se hace evidente; el cinetoplasto (kDNA) muestra una forma alargada de "mancuerna", que refleja su replicación; TbLAP1 co-localiza con kDNA. (C) Etapa posterior en la que se completa la replicación de kDNA y las redes del kDNA hijo se han dividido y aparecen en una posición perpendicular entre sí; TbLAP1 está presente en los kDNA de la progenie y en el puente de unión del material segregado (nabelschnur); Los cuerpos basales y probasales proceden con su segregación. (D) La segregación de los kDNA recién divididos continúa, junto con los respectivos TAC y cuerpos basales; el nabelschnur comienza a desvanecerse. (E) Después de la replicación y segregación de ADN nuclear, aparecen núcleos recién divididos, a medida que continúa la segregación de kDNA. (F) células con núcleos completamente divididos con ADNc y estructuras asociadas alineadas, (2Nuclear2kDNA), están listas justo antes de la citocinesis, para la próxima división celular. Figura tomada de Peña-Díaz P. y col. 2017 (13).

1.3.4. Leucin aminopeptidasa A. *Lycopersicon esculentum*

La leucin aminopeptidasa A (LAP-A) del tomate (*Lycopersicon esculentum*) se expresa cuando hay agresiones ambientales en diferentes momentos de crecimiento del fruto (14). Después de la resolución de su estructura cristalográfica, así como la introducción de diferentes mutaciones al sitio activo, se vio la reducción de la actividad de peptidasa y la disociación de la estructura hexamérica. Recientemente, se ha demostrado que LAP-A protege otras proteínas de desnaturalización térmica y agregación, así mismo ayuda al plegamiento de proteínas desnaturalizadas en una forma activa usando un mecanismo independiente de ATP. Esta actividad también se presenta en proteínas de choque térmico pequeñas (sHSP) que aplican un mecanismo de "holdasa" para actuar sobre sustratos. Se ha planteado que en los

sitios activos se encuentran superficies hidrofóbicas que están expuestas al romperse la estructura hexamérica, formando oligómeros de orden inferior. Se ha demostrado que éstos tienen una mayor exposición a la superficie y exhiben una mayor actividad de chaperona en comparación con la LAP-A silvestre (15).

1.3.5. Leucín aminopeptidasa 3 (LAP3) en humano: biomarcador de cáncer.

La leucín aminopeptidasa-3 (LAP3) presente en humano ha sido estudiada en procesos como cáncer y generación de tumores. En la búsqueda de moléculas prometedoras que funcionen como biomarcadores de mal pronóstico para cáncer, metástasis y formación de tumores, la LAP3 ya ha sido estudiada en procesos como cáncer de colon (16), glioma (17), carcinoma hepatocelular (18), cáncer de células escamosas de esófago (19), cáncer de mama (20, 21) y carcinoma endometrial (22).

Uno de los estudios más recientes es el realizado en cáncer de mamá, donde se mostró una alta expresión de la proteasa LAP3 en carcinoma ductal infiltrativo de mama cuando se comparó con los tejidos adyacentes al carcinoma. El nivel de expresión de la LAP3 también aumentó en presencia de metástasis ganglionar y evolución tumoral (**Figura 2A**). Por lo tanto, la LAP3 puede estar estrechamente relacionada con aparición de metástasis en cáncer de mama.

Igualmente se estudió la sobreexpresión de LAP3 en las líneas celulares MDA-MB-231 (**Figura 2B, 2C**) y MCF7 (**Figura 2D, 2F**), donde promovió la migración y la invasión de células. El silenciamiento de la LAP3 en la línea celular MDA-MB-231 inhibió notablemente la migración y la invasión de las células. Por análisis de western blot se vio que la sobreexpresión o silenciamiento de LAP3 puede promover o inhibir respectivamente la expresión de proteínas como fascina y metaloproteasas de matriz 2-9 (MMP2/9) en ambas líneas celulares (**Figura 2G**). La presencia de estas proteínas puede estar relacionada con el grado de infiltración de las células de cáncer de mama (21).

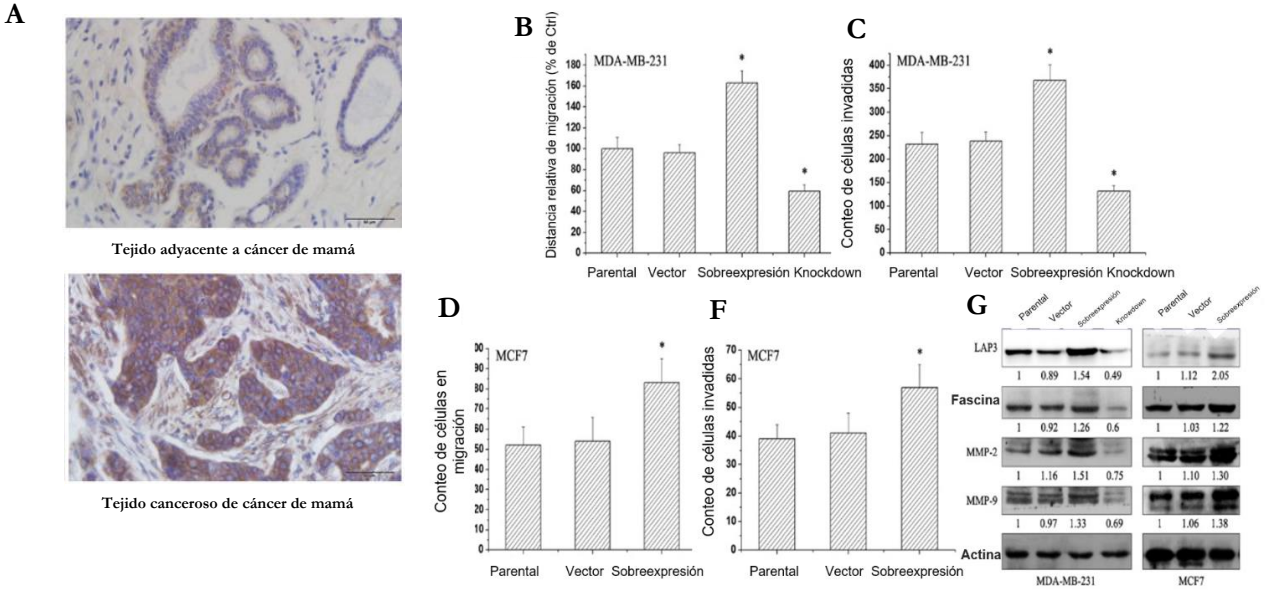


Figura 2. Función de leucin aminopeptidasa LAP3 en cáncer de mama.

A) Inmunohistoquímica marcando la LAP3 en tejido tumoral y circundante de cáncer de mamá. B) Estudio de la sobreexpresión y el knockdown de la LAP3 en la línea celular MDA-MB-231, donde la distancia relativa de migración celular. C) Estudio de la sobreexpresión y el knockdown de la LAP3 en la línea celular MDA-MB-231, donde se estudió el grado de invasión y la migración relativa de las células. D, F) Estudio de la sobreexpresión de la LAP3 en la línea celular MCF7. G) Expresión de proteínas como la fascina y metaloproteasas MMP-2/9 en presencia y ausencia de la LAP3. Figura tomada de Fang y col. 2019 (18).

Aunque aún no se conoce el mecanismo por el cual LAP3 esté realizando este efecto en cáncer de mama, ya se han realizado otros estudios que la relacionan con el control del ciclo celular en la proliferación y división celular. Algunos estudios determinaron que LAP3 promueve la transición de las fases G1/S y la motilidad de carcinoma de células escamosas de esófago (19), se sugiere un posible comportamiento de unión al ADN para llevar a cabo estos procesos.

2. Antecedentes

2.1. Caracterización bioquímica de la leucin aminopeptidasa yspII de *S. pombe*.

En nuestro grupo de trabajo se identificó una leucin aminopeptidasa en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. La proteasa denominada leucin aminopeptidasa yspII (LAPyspII) tiene una masa molecular como complejo hexamérico de 320 kDa y 54 kDa como monómero. La enzima tiene su actividad proteolítica en aminoácidos N-terminales como leucina y metionina preferentemente, a un pH óptimo de actividad de 8.5 con dependencia de Mn^{+2} y es inhibida por bestatina. Los residuos catalíticos corresponden a los aminoácidos Lys292 y Arg366 (**Figura 3A**), así como aquellos involucrados en la coordinación de los iones metálicos catalíticos Lys280, Asp285, Asp303, Asp362 y Glu364. Los aminoácidos que forman la bolsa hidrofóbica para la unión del sustrato Met300, Asn360, Ala363, Thr390, Leu391, Ala483 y Met486 se encuentran conservados entre todas las aminopeptidasas conocidas (**Figura 3B**). El monómero de la LAPyspII fue modelado *in silico*, donde se muestra la estructura de silla de montar en el extremo C-terminal donde se encuentra el sitio activo de la peptidasa (**Figura 3C**) (23).

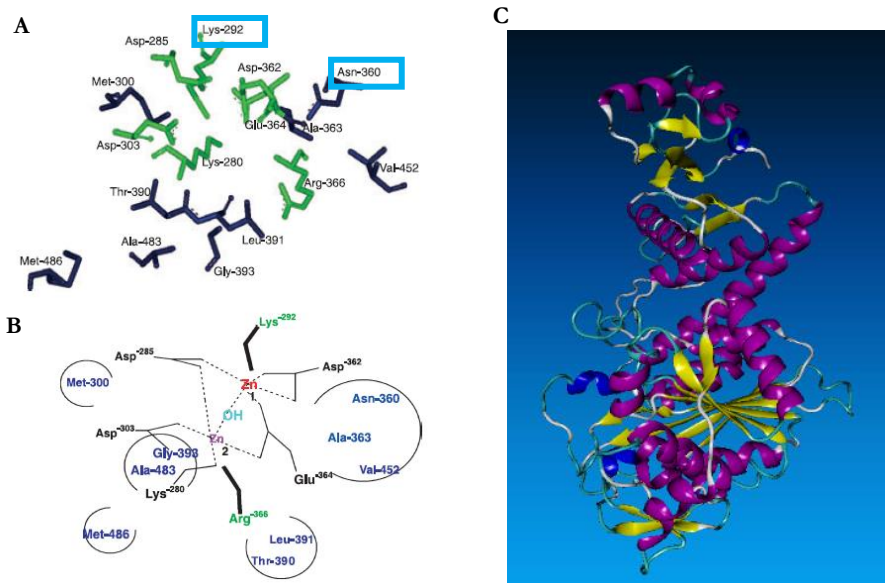


Figura 3. Estructura del sitio activo y modelo *in silico* de la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*.

A) Disposición de los aminoácidos que forman el sitio activo, en cuadro azul los residuos catalíticos. B) Disposición de los aminoácidos que forman el sitio activo con el arreglo espacial para un centro bimetalico de Zn^{+2} , los aminoácidos en azul corresponden a la bolsa hidrofóbica y en verde los de la actividad catalítica, remarcando en azul a Lys292 y Arg366 indispensables para la actividad enzimática. C) Modelado *in silico* del monómero de la LAPyspII y su estructura tridimensional. Figura tomada de Herrera-Camacho y col., 2007 (23) y Rivera-Juárez, 2009 (24).

2.2. Función biológica de la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*.

En la búsqueda de la actividad biológica de esta peptidasa en el organismo modelo *S. pombe*, se han realizado diferentes trabajos para establecer la función y su participación en la levadura. La determinación del nivel de expresión de la enzima en diferentes condiciones de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno no revelaron un efecto en su nivel de ARNm, por lo que es posible que no esté involucrada en el metabolismo de carbono ni de nitrógeno ni en la obtención de energía (25).

En nuestro laboratorio se obtuvo una mutante del gen *ape2*, a partir de la cepa auxotrófica *S. pombe* 201399 haploide (h+ ura4-D18, leu132, ade6-M210, his7-3669) (cepa control denominada 4X) mediante una construcción interruptora ABura4CD que sustituye al gen *ape2* por el gen *ura4* mediante el flanqueado de regiones homólogas en el *locus* del gen. Así se obtuvieron células haploides con el genotipo 4X Δ *ape2*, las cuales presentan un fenotipo característico, mostrando una tasa de crecimiento menor con respecto a la cepa control 4X (3.46 versus 2.59 horas por generación) (Figura 4A), observando por microscopía en contraste de fases una disminución de la viabilidad celular de la cepa mutante 4X Δ *ape2* al final de la fase logarítmica, así como por microscopía de fluorescencia cambios importantes en la morfología celular, como células anucleadas, compactación amorfa de cromosomas, sugiriendo que la LAP ψ pII puede estar implicada en ciclo celular y/o mitosis (Figura 4B)(26).

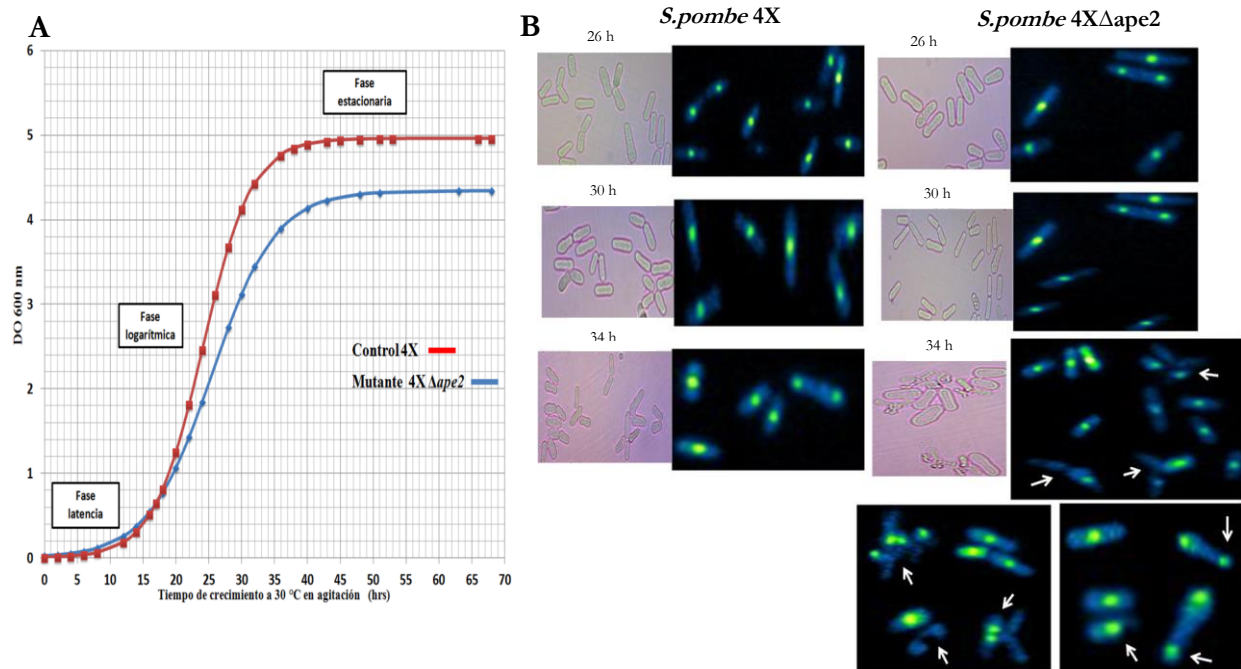


Figura 4. Fenotipo de la mutante 4X Δ *ape2*. Comparación de la cepa control 4x y la cepa mutante para la LAP ψ pII. A) A partir de cultivos sincronizados G1, siguiendo el crecimiento a diferentes horas. B) Microscopía en contraste de fases y de fluorescencia (63x) de células crecidas en medio EMM2 teñidas con DAPI a diferentes horas de crecimiento Figura tomada de Gutiérrez, 2014 (26).

Considerando estos resultados, y debido a la naturaleza proteolítica de la enzima, es necesario relacionar estas características fenotípicas con alguna vía metabólica, proceso celular o vía de señalización modificada en la ausencia de la LAPyspII. Por ello se realizó un análisis con una plantilla de microarreglos de 4000 genes de *Schizosaccharomyces pombe* con el ARN total, comparando la condición control 4X contra la mutante 4X Δ ape2. De forma muy interesante se encontraron genes que disminuyeron su expresión y que codifican proteínas que están relacionadas con la condensación y segregación de las cromátidas (*mis14*, *mis4*, *sgo2*, *cdc5*, *rec8* y *cnp20*). Por otro lado, *rnp5* y β 5 (*pts1*) aumentaron su expresión; estas forman parte del proteosoma 26S, el cual está involucrado en el anclaje del uso cromático a los centrómeros (27).

Estos genes fueron determinados a partir de los datos con un valor de Z-score de -1.5 tomando en cuenta las proteínas que se encuentran involucradas en procesos de regulación y procesamiento en el ciclo celular, específicamente en la segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis (Tabla 1). Teniendo estas evidencias con respecto a la función de esta proteasa, es posible que esté relacionada en la regulación de la progresión del ciclo celular y en la segregación del material genético (27).

Tabla 1. Función de proteínas involucradas en la segregación del material genético examinadas en la mutante Δ ape2 con los valores correspondientes de Z-score obtenidos del microarreglo. Modificado de Flores-Tlalpa, 2018 (27).

GEN	Función	ID	Z-score
<i>mis4</i>	Adherina, factor del complejo de carga de cohesinas	SPAC31A2.05c	-1.660
<i>mis14</i>	Subunidad del complejo NMS (Ndc80-MIND-Spc7), mantenimiento de unión de cinetocoros a cromosomas condensados	SPAC688.02c	-2.799
<i>cnp20</i>	Variante de H4, plataforma estructural del ensamblaje del cinetocoro	SPBC800.13	-1.842
<i>sgo2</i>	Proteína de unión al cinetocoro interno	SPAC15A10.15	-1.610
<i>rec8</i>	Subunidad del complejo de cohesinas presente en la meiosis	SPBC29A10.14	-0.196
<i>cdc5</i>	Subunidad de complejo Prp19, regulación de espliceosoma	SPAC644.12	0.840

2.3. Estudios masivos en la levadura *S. pombe* para el análisis de la leucin aminopeptidasa yspII.

Debido al impacto que han tenido las investigaciones realizadas en *S. pombe* durante muchas décadas, las aplicaciones de la levadura se han tornado a los estudios de alto rendimiento para obtener un panorama más amplio de las funciones celulares. Gracias a estos estudios, se han obtenido datos acerca de la modificación de ciertas proteínas en procesos muy específicos de interés biológico. Este es el caso de la leucin aminopeptidasa yspII, de la cual se han reconocido ciertos fenómenos relacionados con su función, aquí se mencionan algunas perspectivas.

2.3.1. Leucin aminopeptidasa yspII y su papel en la producción de proteínas recombinantes.

La levadura de fisión *S. pombe* comparte muchas características genéticas y bioquímicas con eucariotas superiores como el empalme de ARNm, la modificación postraduccional, la división celular y el control del ciclo celular. Además, posee una enzima galactosiltransferasa que no se encuentra en otras células de levadura que se utilizan para la producción de proteínas, lo cual la convierte en huésped ideal para la producción de proteínas eucariotas de alto nivel. Sin embargo, uno de los principales problemas que dificulta la producción y purificación efectiva de proteínas heterólogas de *S. pombe* es la degradación proteolítica de los productos recombinantes por proteasas específicas. Aún se desconoce a detalle el sistema proteolítico de esta levadura, por lo que Idiris y col. en el 2006, generaron una cepa deficiente de proteasas, alterando 52 genes específicos para estas proteínas, de las cuales se excluyeron las relacionadas con el sistema proteosoma-ubiquitina (28).

Entre estos genes se encuentran enzimas indispensables para la viabilidad celular y ciclo celular (*kpr1*, *gpi8* y *cut1*), así como metaloproteasas específicas para serina, cisteína, ácido aspártico y otros. Perteneciente a esta selección se encuentra la leucin aminopeptidasa yspII (*ppp18*).

Del estudio de la tasa de crecimiento en cepas que presentan deleciones para estas proteasas, se obtuvieron dos poblaciones: las que aumentaban y las que disminuían su velocidad de generación en comparación a la cepa control *S. pombe* ARC001. Para el caso concreto de la LAPyspII, se observó una disminución en la velocidad de generación en medio rico de extracto de levadura, lo cual concuerda con los estudios realizados en nuestro laboratorio (**Figura 5A**) (26, 27). Sin embargo, la afectación en el crecimiento presentó un efecto menor en la proliferación y generación de la biomasa, comparado con el que presentaban cepas con deficiencias en proteasas mitocondriales. Aunque se desconoce la razón por la cual existe este comportamiento, la ausencia de la proteasa LAPyspII podría afectar la producción

de biomasa, una característica deseable en la producción de proteínas recombinantes. Igualmente, al analizar la línea de tiempo para la producción de la proteína heteróloga de la hormona de crecimiento humano (hGH), se observó que, en la etapa inicial de crecimiento aproximadamente a las 24 horas, la hGH es generada por la cepa deficiente de LAPypII, sin embargo, a las 48 horas, tiempo que corresponde al pico de producción de la proteína en la cepa control AC001, ya no se produce en la cepa deficiente (**Figura 5B**). Sin la aminopeptidasa LAPypII, no es posible generar la producción de proteínas heterólogas. La LAPypII no tiene una actividad importante en la degradación de proteínas recombinantes que se producen en este sistema, sin embargo, su ausencia repercute en la tasa de generación y en la producción en etapas tardías de crecimiento de la levadura.

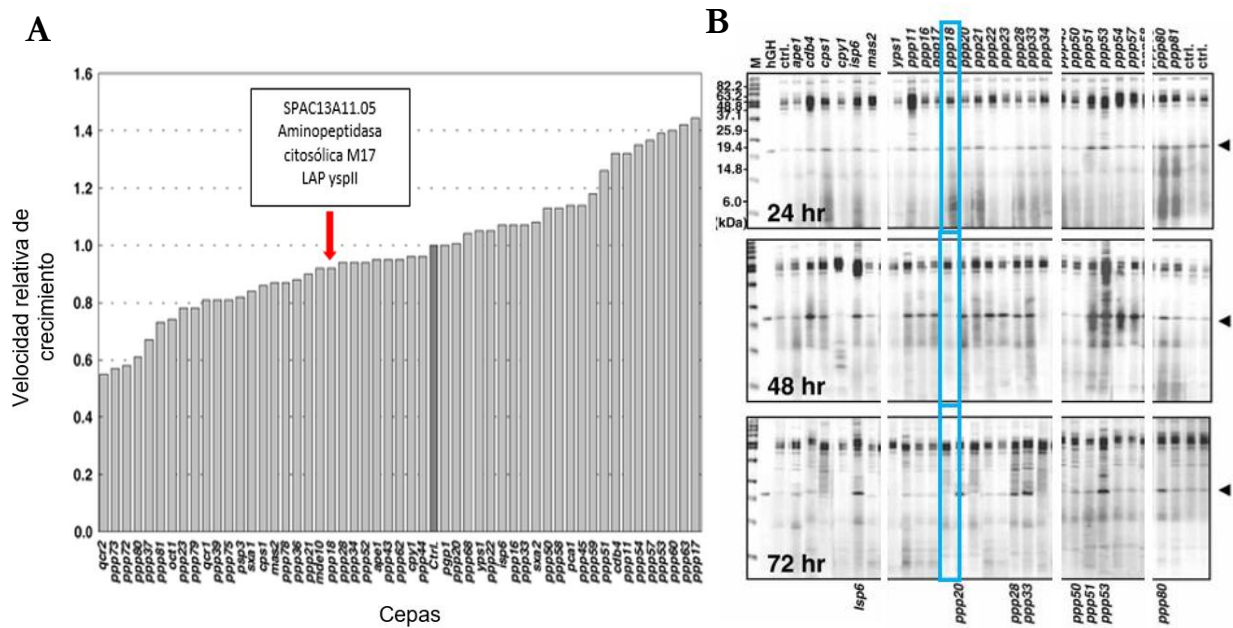


Figura 5. Determinación de la tasa de crecimiento de las cepas deficientes de proteasas y producción de la hormona de crecimiento humano (hGH) en *Schizosaccharomyces pombe*.

A) Tasa de crecimiento relativa de la cepa pp18 correspondiente a la leucin aminopeptidasa yspII, B) Producción de la proteína heteróloga hGH en diferentes momentos de crecimiento de la levadura, la banda marcada con (◄) representa a la proteína producida en las diferentes cepas con deficiencia de proteasas específicas. Figuras tomadas de Idiris y col., 2006 (28).

2.3.2. Leucin aminopeptidasa yspII y modificaciones en el aprovechamiento de una fuente de carbono en *S. pombe* (resistencia a desoxiglucosa).

La 2-desoxiglucosa (2-DG), es un carbohidrato modificado análogo de la glucosa, que ha sido postulado como un inhibidor de desarrollo de tumores y de la división celular en modelos humanos. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* afecta la síntesis de la pared celular y genera cambios morfológicos llevando a la lisis celular. En *Schizosaccharomyces pombe*, la 2-DG produce células deformes y defectos en el aprovechamiento de la glucosa. Considerando la analogía entre la levadura de fisión y las células humanas, Vishwanatha y col. en 2016, estudiaron la resistencia a 2-DG en *S. pombe*, para identificar genes involucrados en la asimilación de este compuesto y su acción en un entorno biológico.

Después de la selección de las cepas resistentes, se identificaron dos cepas: odr1 (sobreexpresión que causa resistencia a la desoxiglucosa) y ysp2 (leucin aminopeptidasa yspII), las cuales fueron estudiadas bajo el promotor dependiente de tiamina en diferentes concentraciones de glucosa (2% y 0.5%). Bajo la sobreexpresión del gen de la leucin aminopeptidasa yspII (pYSP2), se mostró una resistencia débil a la 2-DG, en condiciones permisivas y no permisivas de glucosa (**Figura 6**). La enzima LAPyspII parece tener un efecto protector en presencia de 2-DG, que no es dependiente de la cantidad de glucosa que se encuentra en el medio, a diferencia con lo que sucede con *Saccharomyces cerevisiae*. Esto puede implicar que la leucin aminopeptidasa yspII podría estar involucrada en el control de la asimilación de glucosa en vías como la Git/Proteína cinasa A, donde se censa el nivel de glucosa en el medio y activa diferentes mecanismos de supervivencia, que podrían estar afectando directamente la velocidad de crecimiento y aprovechamiento de nutrientes en diferentes etapas de crecimiento. Sorprendentemente, el gen en estudio denominado odr1, es una hidrolasa perteneciente a la familia HAD, presente en núcleo y citosol, relacionada principalmente a procesos de quiescencia en la levadura. Las enzimas hidrolíticas como la LAPyspII podrían estar procesando otros componentes de sistemas metabólicos en presencia de agentes tóxicos.

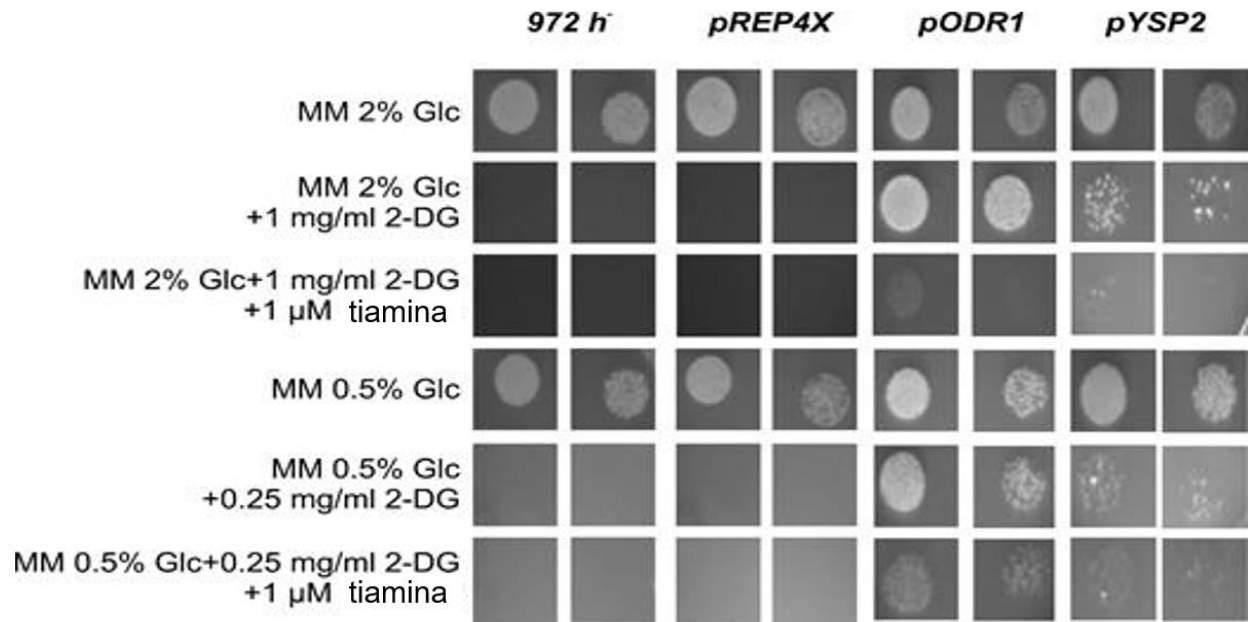


Figura 6. Crecimiento de cepas que sobreexpresan de *odr1* y *ysp2* en presencia y ausencia de tiamina en medio mínimo mineral (MM).

Las células que contienen los plásmidos pODR1 y pYSP2 bajo el control del promotor *nmt1* dependiente de tiamina, junto con las células control que contienen los plásmidos pREP4X y las células WT 972 h⁻, bajo dos condiciones de contenido de glucosa al 2% y 0.5% (Glc). Las placas contienen tiamina y 2-DG como se indica. Se analizó el crecimiento resultante en la posición 1 a alta densidad celular, y en la posición 2 a baja densidad celular. Figura tomada de Vishwanatha y col., 2016 (29).

2.3.3. Leucin aminopeptidasa *yspII* en quiescencia, proliferación y esperanza de vida en *S. pombe*.

La esperanza de vida (CLS), definida como el tiempo en que las células sobreviven en un estado sin dividirse, ha sido útil para estudiar el envejecimiento celular en organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se lleva a cabo evaluando la supervivencia durante la fase estacionaria después del agotamiento de la fuente de carbono, en este caso, la glucosa. La levadura *Schizosaccharomyces pombe*, proporciona un modelo emergente y completo para el estudio del envejecimiento celular. Cuando las células de *S. pombe* se ven privadas de nitrógeno sin la posibilidad de apareamiento, arrestan de manera reversible en una etapa similar a G1, llamada quiescencia, adaptándose fisiológicamente para la supervivencia a largo plazo.

En un estudio a gran escala, se aplicó la secuenciación masiva por “código de barras” (Bar-seq) para analizar la esperanza de vida de 2847 protótrofos haploides mutantes por delección genética en *S. pombe* (deleciones no esenciales), las cuales son sometidas a envejecimiento en un estado de inanición, sin

nitrógeno. En el estudio de quiescencia, las mutantes que presentaron mayor tasa de supervivencia o periodos más largos de vida corresponden a proteínas asociadas a la formación de membranas. Por otro lado, para la leucin aminopeptidasa yspII, la clasificación se realizó a partir de su perfil de crecimiento. Se reconocieron al 10% de genes que presentaron el menor crecimiento y proliferación. A pesar de que la LAPypII no se vio involucrada en la extensión o reducción de la esperanza de vida, la LAPypII si está relacionada con el grado de proliferación celular. Las mutantes de crecimiento más lento están enriquecidas en las siguientes categorías: genes altamente conservados, genes regulados negativamente en respuesta central al estrés ambiental (CESR) y genes de proteínas ribosomales, entre otros (**Tabla 2**). Procesos como el denominado “metabolismo de macromoléculas” son considerados como importantes en el crecimiento celular. En el caso de algunas mutantes, la producción de metabolitos por parte de la masa celular determina en gran parte la disponibilidad de nutrientes en ambientes de privación de fuentes de carbono y nitrógeno.

Tabla 2. Mutantes de *S. pombe* de proliferación lenta en condiciones de inanición de nitrógeno. Modificado de Sideri y col., 2014 (30).

Nombre del gen	Nombre sistemático	Descripción	Score de crecimiento
SPCC1235.12c	mug146	Gen meiótico sobre regulado Mug46	0.095843822
SPAC24C9.12c	SPAC24C9.12c	Hidroximetiltransferasa de glicina (putativa)	0.106607311
SPBC27B12.10c	tom7	Subunidad Tom7 del complejo TOM mitochondrial	0.118297554
SPAC13A11.05	SPAC13A11.05	Peptidasa de la familia M17 yspII	0.393334573
SPBC1734.12c	alg12	Alfa-1,6-manosiltransferasa Alg12 (putativa)	0.432532293
SPBC20F10.07	SPBC20F10.07	Proteína de dominio GRAM	0.4325731
SPBP4H10.13	rps2302	Proteína s23 de ribosoma 40S (putativa)	0.433431075

Existen evidencias de que el crecimiento y la esperanza de vida están inversamente relacionados. Por ejemplo, la disminución en la tasa de crecimiento antes de la entrada en la fase estacionaria se asocia con aumento en la longevidad durante la fase estacionaria en la levadura de fisión. Sin embargo, en el caso de la LAPypII no se ve aumento de la esperanza de vida a pesar de la disminución de la proliferación, esto es concordante con los hallazgos reportados en nuestro equipo de trabajo, ya que se ha detectado una disminución de la viabilidad celular, traducido en la pérdida de longevidad en las células (30).

2.4. Dinámica de cohesinas y su implicación en la segregación del material genético.

Las cohesinas forman un complejo de proteínas en forma de anillo, que organiza el genoma, permitiendo su condensación, expresión, reparación y transcripción. Son mejor conocidas por su papel en la segregación cromosómica, donde proporcionan la cohesión entre las cromátidas hermanas recién duplicadas durante la fase S. Esta cohesión permite la correcta fijación de cromátidas hermanas a estructuras de los microtúbulos del huso mitótico al resistir las fuerzas de tracción opuestas. Una vez que todos los cromosomas están unidos y direccionados correctamente el anillo de cohesinas se destruye abruptamente, desencadenando la segregación equitativa de las cromátidas hermanas a polos opuestos en el final del anafase (31).

2.4.1. Conformación del anillo de cohesinas.

El complejo de cohesinas es miembro de la antigua familia de complejos proteicos pertenecientes a los organizadores estructurales de cromosomas SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), presentes desde bacterias hasta humanos (**Tabla 3**). Las proteínas son altamente conservadas entre especies, para la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, los componentes del complejo son Psm1, Psm3, y una subunidad kleisina Rad21, que juntos forman un anillo (32, 33).

Tres subunidades accesorias, Psc3, Pds5 y Wpl1, asociadas con la subunidad kleisina regulan tanto la asociación como la disociación del anillo con la cromatina. Así mismo, la regulación del posicionamiento y de la estabilidad del anillo de cohesinas en derivados de la cromatina está determinado por el complejo de carga de cohesinas formado por las proteínas Mis4/Ssl3 (**Figura 7**) (29).

2.4.2. Dinámica de cohesinas durante el ciclo celular.

Un ciclo complejo de asociación y disociación de cohesinas en los cromosomas tiene lugar durante cada ciclo celular. El anillo de cohesinas se posiciona en los cromosomas no replicados en G1, seguido de establecimiento de cohesión durante la fase S de replicación del ADN y se mantiene en G2. En la fase M, se resuelve la cohesión de las cromátidas hermanas, y los cromosomas se segregan. El acoplamiento de estas proteínas se encuentra altamente controlado y está relacionado con la formación de estructuras como el huso mitótico, la septa y otros señalizadores para llevar a cabo la citocinesis.

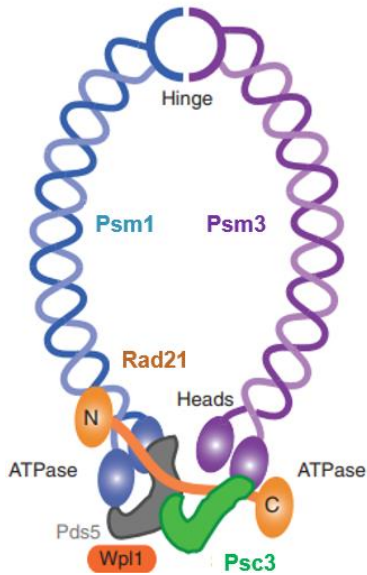


Tabla 3. Subunidades del anillo de cohesinas y sus reguladores.
Tomada de Makrantoní y col. 2018 (33).

Función	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>
Formadoras del anillo	Smc1 Smc3 Mcd1/Sccl, Rec8	<i>psm1</i> <i>psm3</i> <i>rad21</i> , rec8	Smc1 Smc3 Rad21, C(2)M	Smc1 α , Smc1 β Smc3 Rad21, Rad21L, Rec8
Accesorias	Sccl Pds5 Rad61/Wpl1	<i>psc3</i> , rec11 <i>pds5</i> <i>wpl1</i>	SA Pds5 Wapl Dmt	SA1, SA2, STAG3 Pds5a, Pds5b Wapl Sororina
Complejo de carga	Sccl Sccl	<i>mis4</i> <i>ssl3</i>	Nipped-B Sccl	Nipbl Mau2

Figura 7. Estructura del anillo de cohesinas en *Schizosaccharomyces pombe*.

Dos subunidades del anillo SMC (Psm1, Psm3) están unidas entre sí en la cola en el dominio de la bisagra y en sus cabezas tienen actividad de ATPasa. Con la subunidad kleisina de Rad21 forman un anillo tripartito. Tres subunidades accesorias adicionales Psc3, Pds5 y Wpl1 pueden interactuar con la subunidad kleisina. Figura modificada de Makrantoní y col. 2018 (33).

2.4.3. Establecimiento de la carga del anillo a estructura de la cromatina en la fase G1 y S.

Para proporcionar cohesión, las cohesinas deben interactuar con la cromatina antes de iniciar la replicación de ADN en fase S. Ya se ha demostrado la interacción topológica con diferentes conformaciones del ADN en diferentes formas del ciclo celular, por lo que diferentes estados de transición del ADN con proteínas de la cromatina en la división celular funcionan como intermediarios para el complejo de cohesinas (32).

La carga depende de un elemento esencial: el complejo de carga de cohesinas, un dímero altamente conservado en *Schizosaccharomyces pombe* denominado Mis4/Ssl3 (**Tabla 3**). Estas subunidades están íntimamente relacionadas para llevar a cabo el atrapamiento de moléculas de ADN. La subunidad Mis4 es la responsable de la mayor parte de las funciones como mediador de la carga de las proteínas cohesinas en sustratos de ADN, aunque se sugiere que la proteína Ssl3 pudiera intervenir en la estabilidad de los complejos en procesos *in vivo* a través del ciclo celular, tanto en la permanencia en la fase G1 y G2 (32, 34, 35).

Primero, Mis4 se une, a través de su dominio como una especie de anzuelo, posteriormente promueve la actividad ATPasa del anillo de cohesinas, que impulsa las cabezas desencadenando un cambio conformacional, que permite la apertura del anillo para permitir la entrada de ADN (34).

El establecimiento de la cohesión ocurre durante la fase S subsiguiente, y varias observaciones señalan que el establecimiento de la cohesión se combina con la replicación del ADN. Componentes dentro del proceso, como la proteína de unión a ADN polimerasa alfa (Ctf4) y componentes del complejo del factor de replicación C alternativo (Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p). Así mismo, se ha postulado que la subunidad Ssl3, componente del complejo de carga de cohesinas, dirige la cohesión en regiones de 125 a 140 pb del centrómero, donde puede encontrar elementos del cinetocoro interno, como el Ctf19 (33, 36). Este mecanismo tiene como finalidad de enriquecer de cohesinas en una región de ~20 kb del pericentrómero circundante y, por lo tanto, facilita interacciones cinetocoro-microtúbulos para promover la segregación precisa de los cromosomas. El cambio de estado de fosforilación de las cabezas de cohesinas, permite su translocación, y por lo tanto el reclutamiento de los anillos en diferentes zonas del centrómero (37).

Por otro lado, la cohesión que se realiza independiente del ciclo celular, y que es llevada a cabo, por ejemplo, en los procesos de transcripción de genes o en reparación del ADN, proponen que los sitios de carga se dirigen al centrómero, sin cubrir grandes zonas, y que dependen de secuencias específicas presentes en la eucromatina. Los promotores de genes altamente transcritos, como los ARNt y los genes de ribosomas son sitios potenciales de carga de cohesinas(38).

2.4.4. Avance a la fase G2 del ciclo celular.

El número de proteínas implicadas para el establecimiento y mantenimiento del anillo de cohesinas es grande, sin embargo, nos centraremos en las que se relacionan con la segregación del material genético en la mitosis. Durante la progresión del ciclo celular, la eliminación de anillos de cohesinas afecta ciertas regiones del cromosoma más que otras, lo cual se debe a que la estructura de los cromosomas se encuentra en constante cambio en un proceso tan importante como la replicación. Se ha estudiado que el patrón de cohesinas se mantiene prácticamente sin cambios a lo largo de G2, metafase y anafase. Esto sugiere que los anillos no se eliminan de sus sitios de unión durante la mitosis, y que su distribución varía con respecto a su posicionamiento en los cromosomas durante la fase G2 (32, 39).

Las cohesinas permanecen asociadas a los cromosomas desde la fase G2, hasta la fase final de la mitosis. En esta etapa del ciclo celular, el anclaje inicial a regiones centroméricas externas asegura el enriquecimiento continuo de los anillos alrededor del centrómero, lo que forma la base para la orientación de las cromátidas hermanas en el huso mitótico (36). El anillo de cohesinas se concentra alrededor de los centrómeros donde las fuerzas de tracción del huso alcanzan su máximo. Por lo tanto, la estabilización del anillo, su mantenimiento, su asociación y su disociación esté relacionada directamente con orquestadores de la formación de microtúbulos (40, 41).

En ese sentido, el reclutamiento de proteínas protectoras de la disolución de los anillos de cohesinas, como la proteína Shugosina Sgo2 presente en *S. pombe* tiene un papel muy importante en el efecto de corrección de los errores de anclaje de microtúbulos del complejo pasajero de cromosomas (CPC). La proteína sgo2, además de promover la localización de estos complejos en los centrómeros y fomentar la correcta asociación de microtúbulos, también se localiza en regiones subteloméricas, principalmente durante la fase G2 y que avanza hasta la mitosis, lo que podría mostrar otro efecto regulador de esta proteína en diferentes estados del ciclo celular (42).

2.4.5. Inicio de la mitosis y progreso a la división celular.

La preparación de la célula para llevar a cabo la mitosis es un proceso complejo desde la replicación del material genético, hasta la formación de estructuras como el huso mitótico. La cohesión se mantiene hasta la metafase cuando los cinetocoros hermanos se unen a los microtúbulos que salen de los polos opuestos del huso (fijación bipolar). Varios complejos proteicos se asocian al cinetocoro desde la fase tardía G2, y siguen hasta la profase, o se mantienen hasta la metafase hasta que los microtúbulos se encuentren acoplados para avanzar a la anafase y finalizar la mitosis (43)

Se han reportado estructuras de complejos del cinetocoro de *S. pombe*, similares a las de *S. cerevisiae* y humanos. El cinetocoro de *S. pombe* contiene el complejo Ndc80, que está altamente conservado en muchos organismos. Los genes de *S. pombe* mis12, mis13, mis14, nnf1 y spc7 exhiben interacciones genéticas y las proteínas han sido copurificadas con el complejo Ndc80. De todas ellas, el complejo Mis12 (formado por Mis12, Mis13, Mis14, y Nnf1) junto a Ndc80 y Spc7 reciben el nombre de complejo NMS (44). Para comprender la importancia de Mis14 en la estructura del cinetocoro y su asociación con todas estas proteínas, se ha establecido que está involucrada en el mantenimiento del estado relajado de la cromatina en zonas específicas del centrómero, lo cual sucede principalmente en la fase de división celular (45). Así mismo, la localización de la proteína Mis14 muestra que está presente

desde la interfase hasta la salida del ciclo celular en la levadura, en zonas del centrómero central (*cnt1*) y en las repeticiones internas (*imr*). Esto es importante ya que permite la estructura especializada de la cromatina en momentos precisos de la división celular, mediante diferentes mecanismos, ya sea por localización temporal de los complejos, por interacción física o por interacciones genéticas (**Figura 8**) (45, 46).

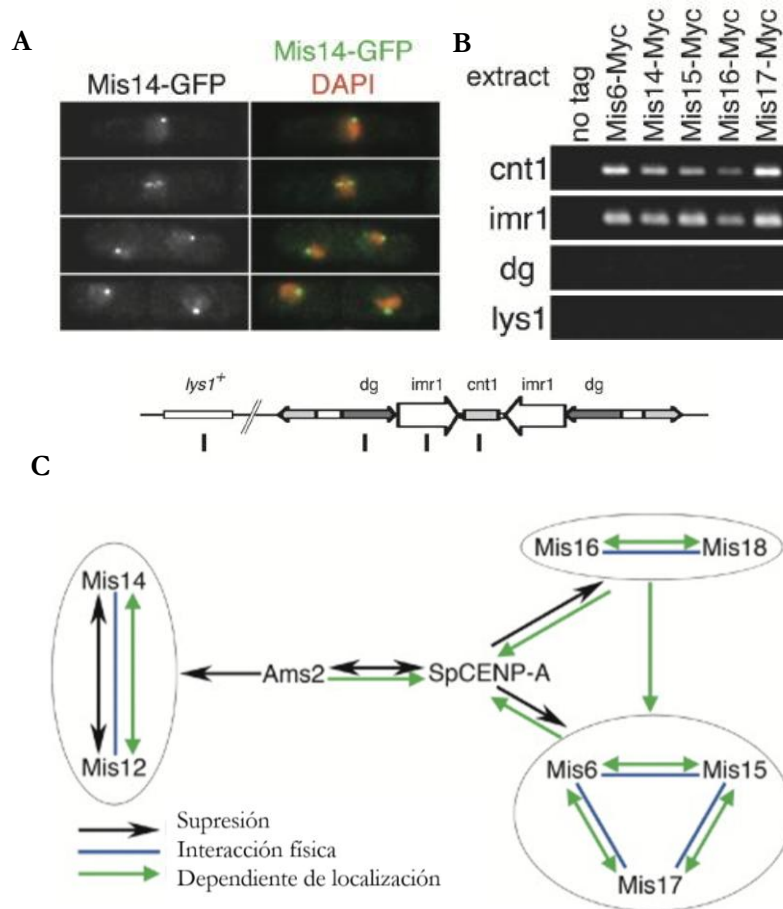


Figura 8. Función de la proteína Mis14 en la división celular de *S. pombe*.

A) Localización de la proteína Mis14 en la división celular desde la interfase hasta la anafase, cuando se forman las dos células hijas. B) Inmunoprecipitación de proteínas pertenecientes al complejo NMS en diferentes regiones del centrómero. C) Representación gráfica de las interacciones de la proteína centromérica (CENP-A/cnp1), factores de transcripción como Ams2, remodeladores de la cromatina, y proteínas formadoras de complejos NMS, reclutadores de microtúbulos. Figura tomada de Hayashi y col. 2004 (44).

Parte de la asociación de proteínas del cinetocoro como Mis14 a estructuras de la cromatina, se debe también a la conformación del centrómero en el proceso de división celular. Estos sitios para el ensamblaje de múltiples proteínas del cinetocoro, permite que se unan a los microtúbulos y la organización de los movimientos cromosómicos. El cinetocoro se divide conceptualmente en el

cinetocoro externo que une los microtúbulos y el cinetocoro interno compuesto de proteínas que se unen al ADN o la cromatina centromérica, también conocida como la Red Asociada al Centrómero Constitutivo (CCAN). Es ahí donde se forman los puentes entre las estructuras de la cromatina y el acoplamiento de microtúbulos para la formación del huso mitótico. Entre estas proteínas se encuentra Cnp1 en *S. pombe* (CENP-A en humanos) una de las más importantes en la división celular, ya que, entre otras cosas, es capaz de generar dominios especializados para el correcto ensamble de los microtúbulos (**Figura 9**). Existen diferentes proteínas que participan en este proceso, para fines de este trabajo, abordaremos a la proteína Cnp20 (CENP-T en humanos), la cual genera superestructuras a nivel del ADN que forman conexiones con el cinetocoro externo. Esto se debe a la interacción con grupos de nucleosomas centroméricos en diferentes rangos de dominio, para lograr la estabilidad del material genético en procesos de tensión y de disociación de histonas (43).

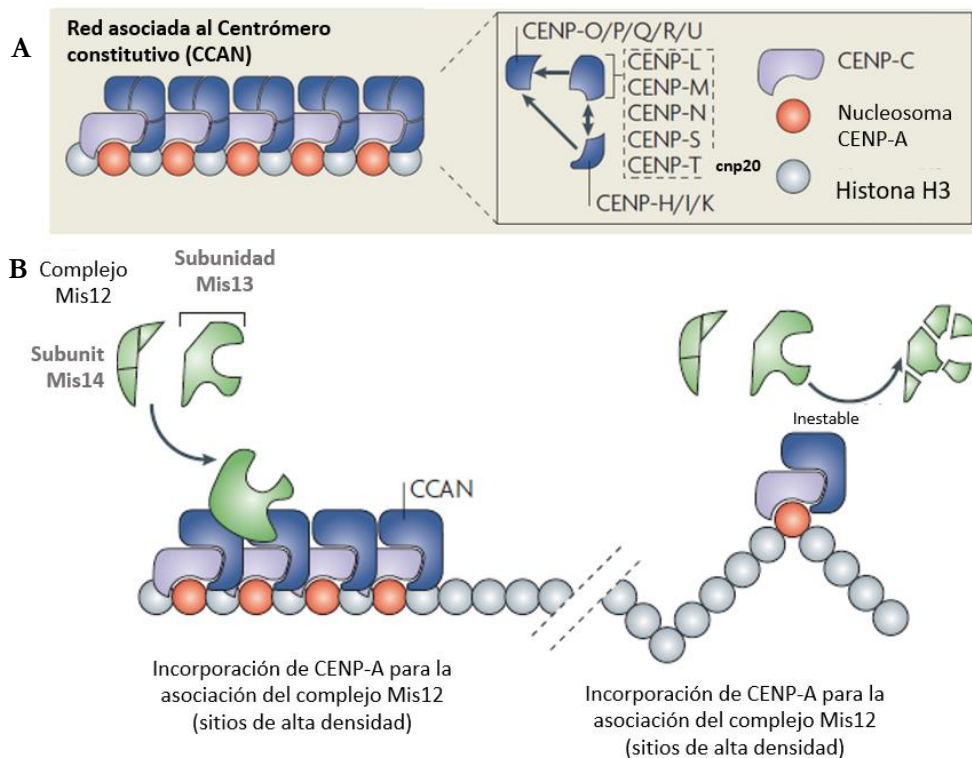


Figura 9. Rol de las proteínas Cnp20 y Mis14 en la organización de la cromatina en la división celular.

A) La presencia de proteínas del centrómero está orquestada por Cnp1 (CENP-A), en asociación con Cnp3 (CENP-C) y la red asociada al centrómero constitutivo (CCAN) en el cual se encuentran diferentes subunidades entre ellas Cnp20 (CENP-T). Esto depende de la estructura de la cromatina y la formación de subdominios en el centrómero, que posteriormente servirán de andamio para el ensamble de los microtúbulos. B) Complejos asociados a NMS, como el Mis12 (en el cual se encuentra Mis14) permiten la estabilización de la estructura de la cromatina y el acoplamiento de proteínas del cinetocoro interno. Modificado de Cheeseman y col. 2008 (43).

Las proteínas del cinetocoro, así como las proteínas de carga de cohesinas enriquecen el posicionamiento de los anillos en todo el pericentrómero circundante, en una extensión de aproximadamente 20 Kb, lo que permite las interacciones con los microtúbulos para la correcta segregación cromosómica al final de la anafase. Estos procesos mediados por la formación del huso mitótico tienen que ver también con la formación de la septa y el anillo contráctil de la levadura *S. pombe*. Así mismo, hay estudios que demuestran que la distribución y arquitectura del material genético (39, 47) así como los poros nucleares (44, 48) conectan el núcleo con el citosol y llevan a cabo correcciones de anclaje de microtúbulos, ejecutadas por cinasas como Aurora (40). Todos estos procesos influyen directamente en la segregación del material genético.

Por otro lado, además de la protección que Sgo2 provee desde la fase G2 en regiones centroméricas y teloméricas para evitar la disociación prematura de las cohesinas, es necesario su mantenimiento para que las cromátidas hermanas no se separen a destiempo, y logren el correcto acoplamiento de los microtúbulos. Este efecto se extiende durante la división celular, hasta llegar a la anafase, donde Sgo2 ubica a la cinasa Aurora B para generar intermediarios que guían la segregación cromosómica (40).

Sgo2 se expresa de forma ubicua durante el ciclo celular mitótico y meiótico, y juega un papel importante en el reclutamiento de CPC a los centrómeros para una apropiada segregación cromosómica en la fase M. Curiosamente, durante la interfase, la acumulación de Sgo2 en los centrómeros disminuye y una fracción sustancial aparece en la vecindad de los telómeros (**Figura 10**) (42).

2.4.6. Eventos alternos en el control de la cohesión durante la meiosis.

En ausencia de nutrientes, especialmente nitrógeno, las células de *S. pombe* pueden realizar meiosis a través de apareamiento opuesto, b^+ y b^- , se detienen transitoriamente en G1, se aparean para formar cigotos diploides y sufren meiosis para formar cuatro esporas haploides. La falta de nitrógeno induce la detención de G1 después de dos divisiones celulares aceleradas. Esta diferenciación en el desarrollo de la levadura está condicionada principalmente por condiciones ambientales y metabólicas, ya sea por estrés o por la privación de nutrientes (49).

En este cambio dentro del funcionamiento de la levadura y la inducción de la mitosis, se mantienen procesos como la cohesión para llevar a cabo la correcta segregación cromosómica. Una de las proteínas perteneciente al anillo de cohesinas es Rec8 (**Tabla 3**), de la cual se ha encontrado un papel regulador de la dinámica de segregación de los cromosomas en la meiosis de *S. pombe*.

El establecimiento del centrómero en la meiosis I requiere específicamente de la cohesina de meiosis Rec8, y la unión del huso está basada en la estructura del quiasma formada entre los cromosomas homólogos. Durante la profase meiótica, Rec8 mantiene las cromátidas hermanas juntas a lo largo de

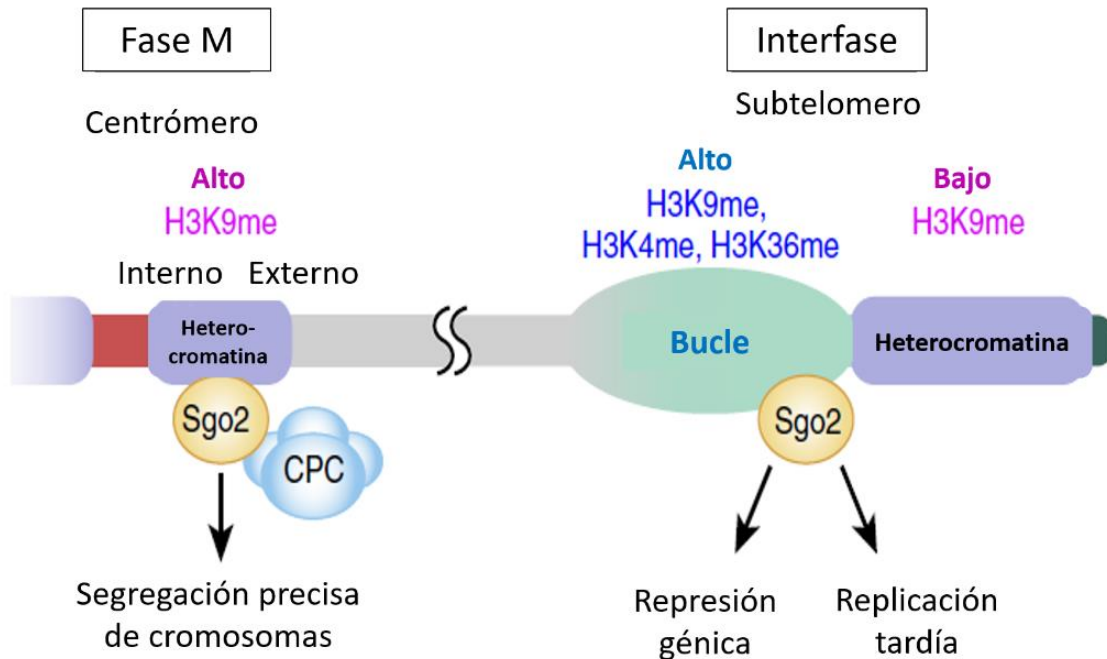
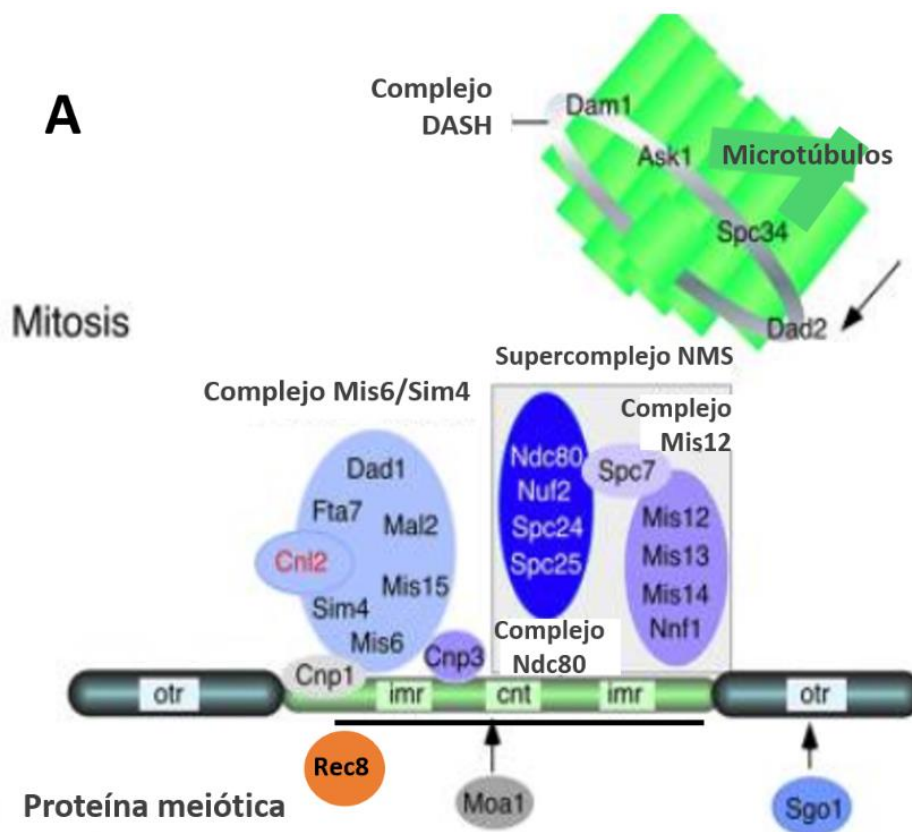


Figura 10. Mecanismo de acción de la proteína shugoshina 2 (Sgo2) en la levadura *S. pombe*. Durante el ciclo celular, Sgo2 es capaz de proteger la disociación de las cohesinas acopladas a estructuras de ADN, dependiendo de la metilación de histonas y la progresión del ciclo, esta interacción la lleva a cabo a través del cinetocoro externo e interno. Ya que su producción es de manera ubicua, en procesos como expresión génica y la replicación del ADN durante la fase S, es posible ubicarla en regiones subteloméricas, donde la metilación de histonas también interviene para la formación de una horquilla que provoca un cambio conformacional en la estructura de la cromatina. Modificado de Kawashima y col. 2007 (40).

los brazos cromosómicos y las regiones centroméricas. La recombinación homóloga de los cromosomas se inicia por rupturas meióticas programadas en el ADN de doble cadena (DSB), para conectar físicamente los cromosomas homólogos. En cooperación con la proteína del centrómero específica de meiosis Moa1, Rec8 orienta a los centrómeros hermanos. La fuerza de tracción que ejerce el huso sobre los centrómeros hermanos orientados se estabiliza por la tensión generada a través de la formación de quiasmas entre los homólogos (48, 50).

Una vez que se detecta la tensión, se pierde la cohesión de los brazos cromosómicos debido a la escisión de la separasa de Rec8, que permite la separación cromosómica homóloga. Es en este proceso que Sgo1 protege a Rec8 de la escisión, lo que mantiene a las cromátidas hermanas juntas en la anafase I. En mutantes de Rec8 y mutantes de recombinación, la frecuencia de segregación prematura de cromátidas

hermanas en la meiosis I aumenta. Cuando se pierde la tensión en los centrómeros, se activa el punto de control del ensamblaje del huso (SAC), que detiene las células en la metafase I. Los componentes del SAC se localizan en los centrómeros durante la metafase y funcionan como un sistema de vigilancia para garantizar que los centrómeros se unan a los microtúbulos bajo la tensión adecuada. La activación del SAC inhibe la actividad del complejo promotor de la anafase (APC) para evitar que continúe la anafase hasta que se genere la tensión en los centrómeros. Así mismo, el complejo DASH se localiza en el cinetocoro y el huso en la fase mitótica y funciona con complejos del cinetocoro externos e internos para capturar al cinetocoro, lo que indica que desempeña un papel en la unión del huso durante la segregación cromosómica (**Figura 11**) (44).



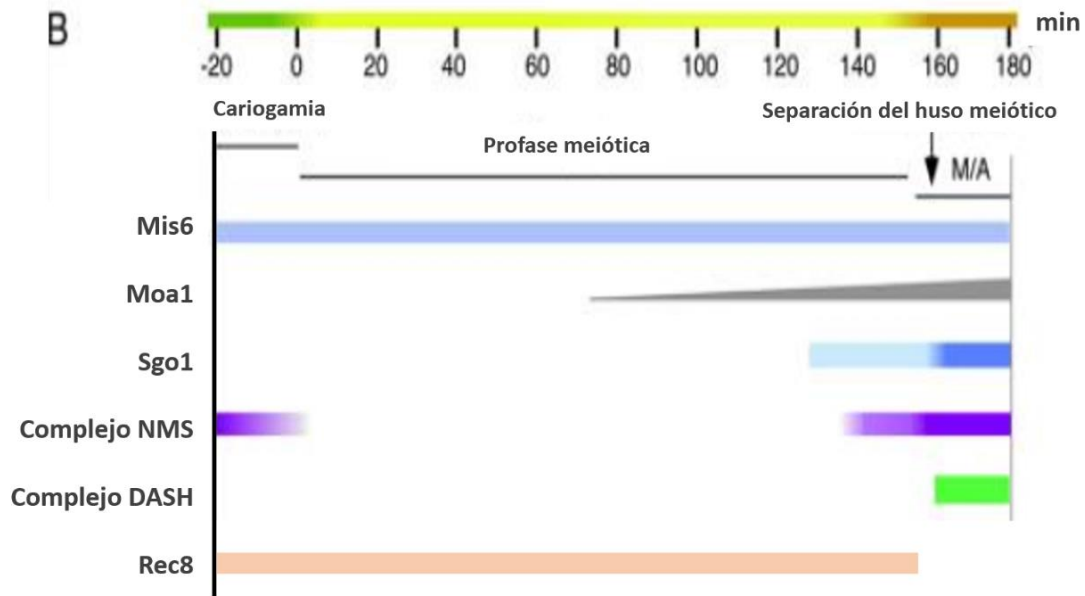


Figura 11. Ensamblaje de proteínas del centrómero durante la meiosis.

A) Los complejos del centrómero (Mis6 y NMS) se localizan en la región interna (imr y cnt), el complejo DASH aparece en la fase M y se ubica en la punta del huso para capturar al cinetocoro. Durante la meiosis, Moa1 se localiza en la región interna del centrómero, y Sgo1 se localiza en la región externa del centrómero, donde protege a Rec8, para evitar la disociación de las cohesinas. (B) Proteínas del cinetocoro durante la meiosis. La presencia de diferentes complejos del cinetocoro varía dependiendo la etapa en la que se encuentre, y su interacción controla la progresión en el ciclo. La barra de tiempo en la parte superior del diagrama muestra la progresión de la meiosis en minutos después del final de la cariogamia. La escala en la parte inferior indica el tiempo en minutos en que se presentan diferentes proteínas para la transición metafase-anafase de la meiosis I. Modificado de Hayashi y col. 2006 (44) .

El establecimiento del anillo de cohesinas está regulado por Mis4, como en el caso de la mitosis, donde persiste un vínculo entre la cohesión y la regulación de los microtúbulos (36) y está íntimamente relacionada con la activación de genes de apareamiento (mating) señalizados por feromonas (51).

2.4.7. Participación de *cdc5* en la progresión del ciclo celular y splicing de ARN.

El gen *cdc5* de *S. pombe* se identificó como regulador de la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular. Dentro del análisis de varias mutantes para diferentes proteínas, la ausencia de *cdc5* comprometía a la levadura *S. pombe* a la fase G2, impidiendo la división celular (52). Al examinar la estructura de esta proteína, se identificó la presencia de dos repeticiones de Myb, que le confieren afinidad de unión por el ADN. Así mismo, esta proteína se ha copurificado con proteínas pertenecientes a complejos del espliceosoma para el procesamiento de pre-ARNm. Además de su función esencial en

el empalme previo al ARNm, las proteínas Cdc5 en varios organismos también se han implicado en la transcripción, respuesta al daño del ADN, ensamblaje del huso, y biogénesis de microARN (miARN), aunque no se ha determinado completamente si estas actividades celulares diversas son dependientes o independientes del splicing (53-55).

El cambio de expresión de estas proteínas en ausencia de la LAPypII, podría marcar un mecanismo por el cual esta enzima participa en el control del material genético en la mitosis. Debido a la localización citosólica de la proteasa LAPypII, la regulación de todos estos procesos dependerá directamente de la localización de la proteína bajo diferentes circunstancias del ciclo celular. Es por ello que es necesario ubicarla mediante anticuerpos dirigidos contra la LAPypII.

3. Justificación

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* ha sido utilizada para describir diferentes mecanismos que se extienden hasta eucariotes superiores como el ciclo celular, organización del genoma y regulación de genes relacionados con procesos cancerosos en humanos. Adicionalmente, el modelo ha adquirido nuevo impacto para estudiar procesos como la variación genética entre individuos, estudios masivos de ARN (ARN-seq), procesos metabólicos de asimilación de diversos compuestos, fenotipo de mutantes para genes en humanos, mejoramiento de alimentos, estudio de enfermedades degenerativas y vías de señalización (56-59).

Para entender cómo la LAPypII influye en el entorno biológico de la levadura *S. pombe*, es necesario profundizar en la función de la peptidasa en la segregación del material genético. Debido a la íntima relación que mantiene esta levadura con genes presentes en humanos, los cuales han sido de gran utilidad para entender diferentes procesos en eucariotes superiores, el estudio de este tipo de enzimas tiene como finalidad complementar el conocimiento de proteínas como la leucin-aminopeptidasa humana (LAP3), la cual se han relacionado con la progresión, migración e invasión de células malignas de varios tipos de cáncer (17), carcinoma hepatocelular (18), carcinoma de células escamosas de esófago (19).

Los estudios precedentes de la LAPypII nos muestran un fenotipo aberrante en la cepa mutante de la enzima (cepa 4X Δ ape2), mostrando una tasa de crecimiento menor con respecto a la cepa control (4X), una disminución importante (50%) de la viabilidad celular, células anucleadas y compactación amorfa de cromosomas, sugiriendo que la LAPypII puede estar implicada en el ciclo celular y/o la mitosis (26). En el análisis de expresión de genes realizado por microarreglos, observamos genes relacionados con procesos de control de la segregación del material genético, como *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, que aumentaron y/o disminuyeron su expresión en la mutante (27).

Debido a los estudios previos y al papel descrito de otras proteasas involucradas en el control del ciclo celular, es necesario establecer la relación entre la ausencia de la LAPypII y su efecto en ciertos factores reguladores de la segregación de la información genética. La enzima LAPypII presenta un efecto en diferentes etapas de su desarrollo, así como una localización temporal y espacial que es dependiente de las etapas del ciclo celular en la cual se encuentre, y que la asocian con un papel regulatorio de estos procesos.

Así mismo, la obtención de la proteína recombinante LAPypII en el modelo biológico de *Escherichia coli*, nos permitirá llevar a cabo la inmunización en ratones BALB/c, esto para obtener anticuerpos monoclonales que posean mayor homogeneidad, capaces de reconocer epítomos específicos de la LAPypII, evitando reacciones cruzadas en su uso y que nos brindarán mayor reproducibilidad en los ensayos posteriores.

Por lo tanto, es nuestro interés estudiar a la LAPypII en determinados momentos de la cinética de crecimiento de la levadura para reconocer su intervención a diferentes niveles del avance del ciclo celular y/o mitosis, a través de anticuerpos que reconozcan específicamente a la proteína en el contexto de desarrollo y crecimiento de la levadura.

4. Hipótesis

- La leucin aminopeptidasa yspII está involucrada en los procesos de control del ciclo celular, con un papel regulatorio de diversos mecanismos, como la segregación del material genético. Los genes *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8* y *cdc5* involucrados en la segregación del material genético de *S. pombe* tienen una expresión desregulada al mutar el gen LAPyspII. La evaluación por qRT-PCR del nivel de expresión de cada uno de ellos y la determinación de las características fenotípicas en la mutante 4X Δ ape confirmará su función en este proceso del ciclo celular y mitosis. Los genes que se encuentran modificados en la fase logarítmica tardía del desarrollo de la levadura son los pertenecientes a procesos implicados en el establecimiento de anillos de cohesinas para la correcta segregación del material genético, así como su asociación con reclutadores de microtúbulos a nivel del centrómero.
- Es posible generar anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína completa de la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*, que sean capaces de reconocer a la peptidasa en diferentes momentos de la cinética de crecimiento.

5. Objetivos

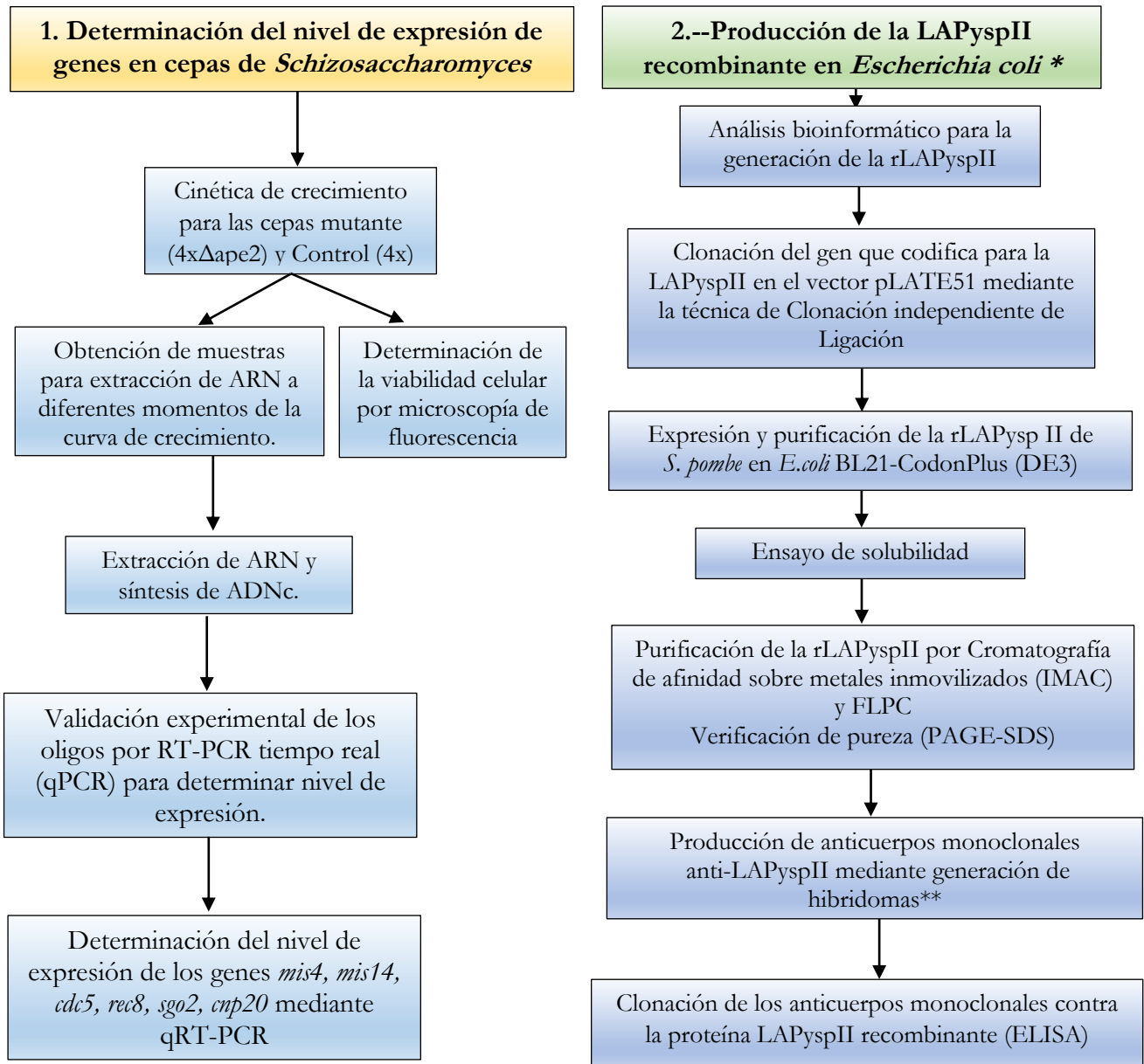
Objetivos generales

- Determinar la relación funcional de la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe* mediante la comparación de los niveles de expresión de genes involucrados en procesos del ciclo celular y mitosis, así como la producción de anticuerpos anti-LAPyspII.

Objetivos particulares

- Reproducir las condiciones de cinética de crecimiento y fenotípicas de la cepa mutante 4X Δ ape2 con respecto a su control 4x.
- Determinar los niveles de expresión en diferentes fases de crecimiento de los genes *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8* y *cdc5* en la cepa control 4x y la mutante 4X Δ ape2.
- Producir la LAPyspII recombinante en la bacteria *E.coli* y purificarla a homogeneidad.
- Obtener anticuerpos monoclonales anti-LAPyspII que permitan en un futuro la localización de la enzima en la célula durante los procesos de mitosis y ciclo celular.

Esquema de trabajo



*La parte del proyecto ‘Producción de la proteína recombinante LAPySpII en *Escherichia coli*’ se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la asesoría y colaboración del Dr. Víctor Manuel Luna Pineda.

**La parte del proyecto “Producción de anticuerpos monoclonales anti LAPySpII mediante generación de hibridomas” se llevó a cabo en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE) bajo la asesoría de la QFB. Olga Mata Ruiz y la M.C. Yolanda Medina Flores.

6. Metodología

6.1. Materiales biológicos y reactivos.

Los reactivos que se utilizaron en este trabajo provienen de las casas comerciales: Thermo Fisher, Thermo Scientific, Promega, Biolabs, Difco, Jena BioScience y Sigma Aldrich. La preparación de los materiales y reactivos se encuentra detallada en la sección de Anexos de este trabajo.

Cepas de levaduras de *Schizosaccharomyces pombe*.

En el presente trabajo, se utilizaron diferentes organismos que se enlistan en la siguiente tabla:

Nombre	Características
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (ATCC 201399) 4x Control	<i>b⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M210 his7-366</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 4x Δ <i>ape2</i>	<i>b⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M210 his7-366, Δape2 :: ura4⁺</i> Deleción para el gen <i>ape2</i> que codifica para la leucin aminopeptidasa yspII, el cual ha sido reemplazado con el gen <i>ura4⁺</i> .
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h- <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)	Cepa haploide <i>b</i> - <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (_{RB} ⁻ _{MB} ⁻) <i>dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA</i> <i>Hte argU proL Cam^r argU ileY leuW Strep/Spec^r</i>

Las cepas que presentan marcadores auxotróficos fueron crecidas de acuerdo con sus requerimientos. Los medios de cultivo para el desarrollo del proyecto fueron medio rico de extracto de levadura (YE), medio mínimo mineral de Edinburgh con nitrógeno (EMM2), medio mínimo mineral sin nitrógeno (EMM2-N) y medio de base de nitrógeno para levadura (YNB) (ver anexo). Cada uno de ellos fue utilizado de acuerdo con los protocolos de mantenimiento y crecimiento.

El fluoróforo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se usó en una mezcla lista para su uso “VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI” de la casa comercial Vector Laboratories, con una concentración de 1.5 μ g/mL. La sonda FM 4-64 Dye (N-(3-Trietilaminopropil)-4-(6-(4-(Dietilamino) Fenil) Hexatrienil) Piridin Dibromida) de la casa comercial Invitrogen con una concentración de 1 μ g/ μ L.

6.2. Cinética de crecimiento para las cepas 4X-Control y mutante 4X Δ ape2.

6.2.1. Sincronización celular en fase G1 mediante inanición de nitrógeno.

Fue necesario la obtención de cultivos de *S. pombe* sincronizados en la fase G1 del ciclo celular llevando a cabo arresto por inanición de nitrógeno, de acuerdo a la metodología descrita por Kazuki (1995) con algunas modificaciones (27). La temperatura de incubación de 30 °C y la velocidad de agitación de 250 rpm fueron las mismas en todas las etapas del establecimiento de la curva de crecimiento.

Las células correspondientes a la cepa 4X-Control y la cepa mutante 4X- Δ ape2 se inocularon en un precultivo de 3 mL de medio rico YE hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 3 Unidades de absorbancia (UA) en una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, se inoculó un cultivo de 10 mL de medio EMM2, con D.O.₆₀₀ inicial de 0.2. hasta llegar a una D.O.₆₀₀ \approx 2.4 UA, entre las 18 y 24 h. Se realizaron tres lavados con agua estéril, centrifugando a 8000 rpm por 10 min a 4 °C y eliminando el sobrenadante. Cuando se ha eliminado el medio residual, las células se resuspendieron en 20 mL de medio EMM2-N partiendo de una D.O.₆₀₀ = 0.2 UA, incubando por 36 horas. Se observan las células al microscopio para verificar la morfología, ya que las células sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular, reducen su tamaño.

6.2.2. Cinética de crecimiento.

Después del periodo de sincronización se realiza la curva de crecimiento en medio mínimo EMM2. De acuerdo con las condiciones del ensayo, se pueden establecer cultivos en crecimiento desfasado (con 4 ó 12 horas de diferencia). En 40 mL de medio EMM2, con una D.O.₆₀₀ inicial = 0.2 UA, se monitorea el crecimiento celular midiendo la D.O. de los cultivos de la cepa 4X-Control y de la cepa 4X- Δ ape2, cada 4 horas durante 12 h continuas por 3 días seguidos. De acuerdo con los periodos de incubación, se consideran las 20, 24, 28 y 32 horas como los momentos para la toma de muestras para microscopía de fluorescencia, extracción de ARN, determinación de viabilidad y actividad enzimática. La densidad óptica es usada para graficar las unidades de absorbancia y la construcción de la curva de crecimiento utilizando el modelo de crecimiento microbiano de Monod, con una modelación logística integrada.

6.2.3. Obtención del modelo logístico integrado. Modelo de Monod.

Esta curva se plantea para representar el comportamiento del crecimiento de la cepa control (4X-Control) vs. la cepa mutante (4X- Δ ape2) a través del tiempo. Con base en ella, se determina cuando se produce la cantidad de masa y otros parámetros cinéticos (1).

$$x = \frac{x_0 * e^{\mu_{max} * t}}{1 + \frac{x_0}{x_{max}} (e^{\mu_{max}} - 1)} \quad (1)$$

Donde:

μ_{max} = velocidad específica de crecimiento celular

x = concentración del cultivo

t = tiempo de generación

Una vez que se obtienen los parámetros cinéticos, se calcula el tiempo de duplicación con la siguiente fórmula (2):

$$t = \frac{\ln \frac{2x_0}{x_0}}{\mu_{max}} = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (2)$$

6.3. Fenotipo de la cepa mutante 4X- Δ ape2 y cepa control 4X.

De acuerdo con los períodos de incubación de estudio, se tomaron diferentes muestras para su posterior análisis, de la siguiente manera:

6.3.1. Determinación de viabilidad celular.

Considerando la densidad celular, se tomó un volumen de cada cultivo para diluirlo con PBS 1X. Se montaron las muestras en la cámara de Neubauer con un máximo de 100 células por cada cuadrante. Posteriormente, las células se tiñeron con el colorante vital azul de tripano, realizando el conteo de las células azules (muertas) y a las birrefringentes o blancas (vivas) que fueron observadas. Las determinaciones se realizaron considerando 200 células totales.

6.3.2. Obtención de muestras para microscopía de fluorescencia.

Se prepararon diluciones del cultivo celular con agua inyectable estéril 1:1 para un volumen final de 267.5 μL dependiendo la densidad celular. Las células se fijan con formaldehído al 37%, adicionando 32.5 μL de la solución para alcanzar una concentración final de 3.7%. Mezclando por inversión y manteniendo la muestra en hielo, se homogeneiza cada 15 minutos durante una hora. Se recuperan las células por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 30-60 μL de PBS-1X. Las células fijadas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

6.3.3. Microscopía de fluorescencia.

Para la tinción de núcleos se utilizó DAPI y para membranas lipídicas la sonda FM4-64 Dye. El fluoróforo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se usó en una mezcla lista para su uso "VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI" (Vector Laboratories), con una concentración de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiene una excitación máxima a 350 nm y emisión a 470 nm.

La sonda FM 4-64 Dye (N-(3-Trietilaminopropil)-4-(6-(4-(Diethylamino) Fenil) Hexatrienil) Piridin Dibromida) (Invitrogen) con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tiene una excitación máxima a 515 nm y emite a 640 nm.

El montaje se realizó en cubreobjetos de 22x50 mm, procurando proteger la preparación de la exposición a la luz directa. Las células fijadas en PBS-1X (10 μL) se mezclan con la solución de DAPI (0.015 μg) (10 μL) y 5 μL de una dilución 1:100 de FM 4-64 (0.02 μg), homogeneizando con pipeta al menos 5 veces, sin formar burbujas. La gota formada en el cubreobjetos se cubre con una película fina de agarosa al 2%, procurando que la película genere una superficie uniforme para llevar a cabo la observación.

Las imágenes fueron obtenidas con un Microscopio Invertido de Contraste de Fases (Nikon modelo ECLIPSE TE2000-U) del Laboratorio de Interacción Bacteria Planta, del Centro de Ciencias Microbiológicas del ICUAP-BUAP, bajo la asesoría del Dr. Alberto Ramírez Mata.

6.3.4. Obtención del extracto celular soluble.

Las muestras se mantienen en hielo en cada paso de la obtención del extracto. Para cada condición en estudio, se recupera 5 mL de cultivo celular (con una D.O.₆₀₀=2). Se lavan las células por centrifugación con agua estéril fría en dos ocasiones, 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C, conservando la pastilla celular y eliminando el sobrenadante. Las células se resuspenden en 60 μL de buffer de zimoliasa con 0.1 mg de enzima, posteriormente se incubó a 37°C por 30 minutos. Se recupera la pastilla celular

y se resuspende en 100 μL de buffer de Tris/HCl 5 mM pH = 8.5 con el mismo volumen de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro). Para generar la lisis celular, se agita vigorosamente con la ayuda del vórtex durante 30 minutos, alternando 30 segundos de agitación y 30 segundos en hielo.

Se agrega 200 μL más de buffer de Tris /HCl 5mM a pH = 8.5 y se agita vigorosamente, en el vórtex. La recuperación de la fase soluble se lleva a cabo por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, tomando el sobrenadante y pasándolo a un tubo nuevo. Al precipitado de células y perlas de vidrio se le agrega 200 μL más de buffer de Tris /HCl 5 mM a pH = 8.5 y se agita vigorosamente. Se obtiene nuevamente la fracción soluble y se mezcla con lo obtenido anteriormente en el tubo nuevo. Esta mezcla de sobrenadantes se vuelve a centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y se separa el sobrenadante o extracto celular soluble, éste se conserva a -20 °C.

6.3.5. Determinación de proteínas totales.

El protocolo está basado en la metodología descrita por Sedmak y Grossberg en 1977 (60). El azul de Coomassie G-250 al 0.06% se preparó en una solución de ácido perclórico al 3 %. Para la curva de calibración se utilizaron diferentes concentraciones de BSA (albúmina sérica bovina).

Para las muestras problema, la mezcla de reacción se realiza con 10 μL de extracto enzimático soluble, 490 μL de agua destilada y 500 μL de la solución de azul de Coomasie, se mezcla bien, y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. La lectura se realiza a 620 nm, obteniendo los datos de la curva de calibración y de las muestras a analizar. Mediante la corrección por mínimos cuadrados de la curva, se obtiene el valor de la R^2 , la cual no debe ser menor a 0.9.

6.3.6. Determinación de la actividad enzimática

El protocolo está basado en el método descrito por Frey y Röhm y modificado por Herrera-Camacho et al., 2007. La determinación de la actividad enzimática de la LAPyspII en extracto enzimático soluble usa como sustrato sintético el cromóforo leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA), el cual está unido por un enlace peptídico a la leucina. La escisión de la p-nitroanilida por la hidrólisis del enlace peptídico genera una coloración amarilla. La mezcla de reacción se prepara en un volumen final de 500 μL compuesta de una solución de Tris/HCl 50mM a pH = 8.5, 1 mM MnCl_2 , Leu-pNA 1 mM y 100 μL de extracto enzimático. La enzima en la muestra de reacción (sin sustrato) se preincuba a 37 °C por 10 minutos, posteriormente se agrega el sustrato Leu-pNA y se incuba a 37 °C por 1 hora o hasta la aparición de una coloración amarilla. Al finalizar la incubación se adicionaron 500 μL de una mezcla de

paro compuesta por EDTA 40 mM (pH = 8) y cloroquina 20 mM, se agita vigorosamente en el vórtex. La lectura de la liberación de la para-nitroanilida (pNA) se lee en un espectrofotómetro a 405 nm. Una miliunidad de actividad enzimática (mU) se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de un nanomol de p-nitroanilida en un minuto bajo las condiciones antes citadas (Ecuación 3):

$$mU \text{ (nmol/min)} = \frac{Abs}{(t)(\epsilon)(l)} (0.001)(10^9) \quad (3)$$

Donde:

Abs= absorbancia a 405 nm.

t= tiempo de reacción en min.

ϵ = coeficiente de extinción molar de la p-NA (9900 M⁻¹ cm⁻¹).

l= longitud de la celda en cm (1).

0.001= volumen final en el que se mide la absorbancia en litros.

10⁹ = factor de conversión de moles a nanomoles.

La actividad específica es el cociente de las miliunidades (mU) por miligramo (mg) de proteína de la muestra utilizada en la reacción (Ecuación 4):

$$\text{Actividad específica [nmol/min)/mg]} = \frac{mU}{mg} \quad (4)$$

Donde:

mU= miliunidades enzimáticas.

mg= mg de proteína total en la reacción.

6.4. Determinación del nivel de expresión de genes mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Los genes seleccionados en el presente estudio fueron los siguientes: *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8* y *cdc5*. Como gen endógeno de referencia para la determinación de los niveles de expresión se eligió al gen *htb1* de la histona 2B-alpha.

6.4.1. Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar regiones pequeñas (100-150 pb) de los genes seleccionados correspondientes a *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8* y *cdc5* y como gen endógeno el *htb1* de la histona 2B-alpha. Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer3 (61) y el análisis de sus características fisicoquímicas se realizó con Oligo Analyzer (IDT) y Perl Primer (SourceForge) como se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR

Blanco	Nombre	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC (%)	Secuencia
<i>mis4</i>	mis4-S	25	59.8	52	5'- CGG AGC CTT GAA TCT GTG TTA CTG C -3'
	mis4-AS	24	58.8	54.2	5'- CTG AGT GTC GTG CCT CCT CTA AAG -3'
<i>mis14</i>	mis14-S	19	57.9	57.9	5'- GAT GGA GCA ACA GAC CGC A -3'
	mis14-AS	23	57.3	52.2	5'- GCA ATA GTC TGC TCG TAT CGG TC -3'
<i>cnp20</i>	cnp20-S	21	56.3	52.4	5'- GCA AGG AGA AGG AGC AAT GTG -3'
	cnp20-AS	24	58.8	50	5'- AGT TTG TGG AGT ATG TCG TCG CTC -3'
<i>sgo2</i>	sgo2-S	24	58.5	50	5'- AGG AAT CCG TCG TGA AAG ATA CCG -3'
	sgo-AS	20	58	55	5'- CTG AGG TGC TGA TTG CGT GT -3'
<i>rec8</i>	rec8-S	22	55.9	50	5'- AGT ATG TTC GTC GTA GAG GAG C -3'
	rec8-AS	20	53.6	50	5'- CCG TCC AAC TTC AAC TTC AG -3'
<i>cdc5</i>	cdc5-S	19	55.9	57.9	5'- GAT GAG CAA GAG GCG GAA G -3'
	cdc5-AS	21	54.8	52.4	5'- GAC TGA TAC GAC TCC AGA TGC -3'
<i>htb1</i>	H2B-F2	19	54.9	52.6	5'- TGA GCG TAT TGC CAC TGA G -3'
	H2B-R2	20	54.7	50	5'- TGA CGG ATT TGG TAC CTT CG -3'

6.4.2. Extracción de ARN total.

Las muestras se mantienen en hielo, a no ser que se especifique lo contrario. Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a 4 °C.

De acuerdo con las condiciones requeridas para la obtención de las muestras, se toman de cultivos frescos de 1-2 mL de cultivo celular de medio líquido D.O.₆₀₀ = 2. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min 4 °C, la pastilla celular se lava con agua estéril fría dos ocasiones. El precipitado de células se resuspende en 30 µL de buffer de zimoliasa con 0.1 mg de zimoliasa, incubando a 37 °C durante 30 minutos, para posteriormente recuperar la pastilla a 3000 rpm 5 min 4 °C, eliminando el sobrenadante.

Con reactivo Trizol Reagent (Invitrogen), se resuspende el botón celular en 500 µL, homogeneizando perfectamente por pipeteo, hasta obtener una suspensión homogénea sin restos celulares. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Si es necesario, se realiza un paso adicional de centrifugación para eliminar la mayor cantidad de residuos remanentes de la lisis celular.

Se agregan 100 µL de cloroformo a la suspensión con Trizol, posteriormente se agita vigorosamente en vórtex por 30 segundos hasta homogeneizar completamente. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo. A esta fase se le adiciona 250 µL de isopropanol, mezclando suavemente hasta homogeneizar. Se mantienen las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se recupera la pastilla de ARN total mediante centrifugación a 12000 rpm por 10 minutos, para luego eliminar el sobrenadante. La pastilla se lava con 1 mL de etanol al 75% frío, se centrifuga 12000 rpm por 5 minutos y se elimina sobrenadante, el precipitado se seca a temperatura ambiente con el tubo invertido por aproximadamente 5 minutos. La pastilla se resuspende en 100 µL de agua inyectable, después se calienta en un baño de 55 a 60 °C durante 10 minutos.

Se realiza la cuantificación de ARN total mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm, y se verifica la integridad por electroforesis en gel de agarosa. El ARN total se conserva a -70°C.

6.4.3. Síntesis de ADNc mediante retrotranscripción (RT-PCR).

Un total de 1 µg de ARN total es sometido a un tratamiento previo con DNasa I, (RQ1 ARNse-Free DNase, Promega), de acuerdo al siguiente procedimiento.

Componente	Volumen (μL)
Muestra de ARN	De acuerdo a la cuantificación (1 μg)
10x DNasa I Buffer de reacción	1.0
RQ1 DNasa (1U/ μL)	1.0
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 10
Incubar 30 minutos a 37 °C	
Buffer EDTA 25 mM	1.0
Incubar 10 minutos 65 °C	

A partir del ARN tratado con DNasa I (1 μg /10 μL = 100 ng/ μL), llevar a cabo la transcripción inversa (Revert Aid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific). Se preparan los siguientes reactivos en un tubo estéril de PCR libre de nucleasas, mantenerlo en hielo.

Reactivo	Concentración	Volumen para 10 μL
Oligo(dT)18	0.5 μg (100 pmol)	0.5
5X Reaction Buffer	5x	2
Mix de dNTP's	10 mM	1
RevertAid Reverse Transcriptase	200 U	0.5
Thermo Scientific™ RiboLock ARNse Inhibitor	20 U	0.25
ARN plantilla (ARN con DNasa I)	200 ng	6.5
Agua DEPC 0.1%	c.b.p	---
	Volumen final	10

Se preparan las reacciones necesarias, mezclar y centrifugar brevemente. El programa del termociclador para la retrotranscripción es el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Consideraciones
42 °C	60 min	1	Uso de Oligo dT
70 °C	10 min	1	

La reacción se puede mantener a -20 °C ó -70 °C, se realizan los procedimientos posteriores en no más de una semana.

6.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa de punto final.

Se hizo el montaje de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante de la GoTaq® Green Master Mix (Promega), en un volumen de reacción final de 10 µL.

Reactivos	Volumen (µL)
GoTaq® Green Master Mix, 2X	5.0
Primer sentido (0.1-1 µM)	1.0
Primer antisentido (0.1-1 µM)	1.0
ADN o ADNc (40-100 ng)	2.0
Agua libre de nucleasas	1.0

La amplificación del fragmento de ADN se lleva a cabo con las condiciones establecidas por las características de cada uno de los oligonucleótidos diseñados y las condiciones de amplificación se determinaron con base a la estandarización de las reacciones. Se realizaron 35 ciclos de amplificación. Las reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

6.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. PCR en tiempo real.

La detección se llevó a cabo en un equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), el cual utiliza reactivos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basados en fluorescencia que proporciona detección cuantitativa de las secuencias de ácidos nucleicos blanco mediante análisis en tiempo real. Mediante esta tecnología es posible obtener datos de amplificación para la obtención de curvas de cuantificación relativa o absoluta, así como la comparación de niveles de ADN blanco en diferentes muestras.

En el sistema StepOne, se pueden utilizar los reactivos denominados intercaladores inespecíficos de ADN, los reactivos SYBR Green funcionan con iniciadores específicos para la secuencia blanco y mezclas de reacción que contienen el fluorocromo SYBR® Green.

En el presente trabajo se han utilizado los reactivos SYBR Green para los experimentos de cuantificación, en los experimentos de validación, determinación de rango dinámico y comparación de los niveles de expresión fue Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), de acuerdo con las condiciones del fabricante, en un volumen de reacción de 10 µL .

Reactivo	Vol (10 µL)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5.0
Primer Sentido	1.0
Primer Anti-sentido	1.0

ADNc ó DNA	2.0
Agua libre de nucleasas	c.b.p.

En la qPCR la fluorescencia es cuantificada en cada ciclo; la intensidad de señal del fluorocromo refleja el aumento de la fluorescencia por encima del nivel de un umbral detectable (determinado por el Software de análisis del detector), y corresponde proporcionalmente al número inicial de moléculas de plantillas de ADN en la muestra. El punto denominado ciclo de cuantificación (Ct) es reportado por el detector. De igual manera, debido a que estamos utilizando un intercalador no específico del ADN (SYBR Green) es necesario acoplar a la corrida una etapa de Curva de disociación o “Melting Curve”, en inglés. Esta curva nos permite evaluar la especificidad de los iniciadores, al señalar una temperatura de disociación única para cada amplicón generado. El programa de amplificación utilizado para la detección en tiempo real es el siguiente:

Etapa AMPLIFICACIÓN	Temperatura (°C)	Tiempo	Observaciones
Pre-desnaturalización	95	10 minutos	-
Desnaturalización	95	30 s	40 ciclos
Hibridación	60	30 s	
Extensión (adquisición)	72	30 s	
Etapa CURVA DE DISOCIACIÓN	Temperatura (°C)	Tiempo	Observaciones
Segmento 1	95	15 segundos	1 ciclo
Segmento 2	60	1 minuto	
Segmento 3	+3 hasta 95	---	
Segmento 4	95	15 s	

6.4.6. Determinación del rango dinámico lineal para el ensayo de qRT-PCR para los genes *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8*, *cdc5*.

Es importante verificar que en el estudio de cuantificación de ADNc se produzcan resultados de PCR en tiempo real dentro de un rango dinámico lineal. Para obtener parámetros como la eficiencia de reacción, coeficiente de variación, precisión, reproducibilidad, especificidad de primers y el rango dinámico lineal, se produjo una curva estándar relativa para cada uno de los genes problemas, así como para el gen endógeno de referencia.

Se realizó la comprobación del tamaño de amplicón para cada uno de los genes problema, concentración de iniciadores (sentido y antisentido), determinación de la temperatura de alineamiento (T_m) y especificidad para cada uno de ellos mediante PCR punto final, posteriormente se realizaron las mismas determinaciones en el detector Tiempo Real. Una vez determinadas las condiciones adecuadas para la

amplificación de cada uno de los genes problema, se prosiguió a realizar las curvas estándar de la siguiente manera:

- ☞ Se utilizó ARN total de la cepa 4x-Control, obtenida de un cultivo en medio mínimo EMM2 durante 24 horas o hasta la etapa logarítmica de crecimiento.
- ☞ Se realizaron la “Extracción de ARN total, “Síntesis de ADNc mediante retro-transcripción (RT-PCR) y Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa “PCR en tiempo real” de acuerdo con los apartados anteriores. La temperatura de hibridación fue 60 °C para todos los genes, así mismo se determinaron las concentraciones de trabajo para cada uno de los iniciadores usados en el experimento (**Tabla 5**).
- ☞ A partir del ARN cuantificado, se establecieron las concentraciones para la obtención del rango dinámico de amplificación (**Tabla 5**).

Tabla 5. Condiciones de trabajo de los iniciadores utilizados para la qRT-PCR

Blanco	Rango dinámico (ng)	Tm (°C)	Primers (S) (pmol/μL)	Primers (AS) (pmol/μL)
<i>htb1</i>	100-0.8	60	1.5	1.5
<i>mis4</i>	100-4	60	1.5	1.5
<i>rec8</i>	100-4	60	1.5	1.5
<i>sgo2</i>	100-4	60	1.5	1.5
<i>cnp20</i>	100-4	60	2.5	1.5
<i>cdc5</i>	50-0.8	60	1.5	1.5
<i>mis14</i>	50-0.8	60	2.5	2.5

- ☞ Para cada una de las curvas relativas de amplificación, se usaron muestras por duplicado para cada concentración de ADNc por cada uno de los blancos, así como dos muestras sin plantilla de ADNc (NTC) como controles negativos en cada una de las corridas.
- ☞ Se obtuvieron los valores de Ct para cada una de las muestras, con su respectiva curva de disociación.
- ☞ La curva estándar de PCR en tiempo real se representó gráficamente como un gráfico regresión lineal del valor de Ct frente al logaritmo (log) de la concentración de ADN establecida en el rango dinámico. En la curva de disociación se analizan los datos de la temperatura del pico de fluorescencia para cada uno de los genes en estudio.
- ☞ A través de estas gráficas se determina la eficiencia de reacción, coeficiente de variación, precisión, reproducibilidad, especificidad de iniciadores y el rango dinámico lineal.
- ☞ Los valores de Ct generados a partir de puntos de la curva estándar para cada gen blanco y el gen de referencia endógeno se usan en el cálculo de ΔCt ($Ct_{\text{Blanco}} - Ct_{\text{Referencia}}$). Estos valores de ΔCt se representan gráficamente contra el logaritmo de la concentración de ADN para crear una gráfica de regresión lineal. La pendiente de la línea de regresión resultante se usa como criterio general para pasar un experimento

de validación, en donde el valor absoluto de la pendiente de ΔCT vs. Logaritmo de la concentración es <0.1 .

A partir de los valores obtenidos es posible determinar el método de cuantificación y comparación de los niveles de expresión. Si las eficiencias de la reacción de PCR entre los blancos y el control endógeno de referencia son relativamente equivalentes, y el cálculo de la curva de validación cumple con los valores de pendiente <0.1 , es factible usar el método comparativo $\Delta\Delta Ct$ para la cuantificación relativa.

6.4.7. Determinación de nivel de expresión a través del método comparativo $\Delta\Delta Ct$ de genes involucrados en mitosis y ciclo celular en la cepa mutante $4x\Delta ape2$.

Una vez establecidas las eficiencias de reacción y la validación para uno de los genes problema y el gen de referencia, se determinó para el nivel de expresión.

Para ello se consideraron las muestras de ARN total de diferentes momentos de la cinética de crecimiento tanto de la cepa mutante como de la cepa control a 20, 24, 28 y 32 horas. Se realizaron cinco experimentos independientes, de los cuales se hicieron duplicados para cada condición y para cada uno de los genes blanco y de referencia. Una concentración de 40 ng de ARN total por reacción de qPCR fue usada para cada duplicado. Mediante el software del detector Tiempo Real se obtuvieron los valores de Ct para cada una de las reacciones, así como la curva de disociación.

Los valores obtenidos de cada uno de los experimentos se sometieron al análisis mediante la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, la cual indica las veces de diferencia del transcrito del grupo de interés (grupo mutante $4x\Delta ape2$) respecto al grupo control ($4x$ -Control) en la condición determinada ($T_0 = 20, 24, 28$ y 32 horas de crecimiento), éste último es estimado como la unidad, ya que de acuerdo con el cálculo $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{4x-Control} - \Delta Ct_{4x-Control}) = 0$, y por la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct \pm S}$, $2^0 = 1$. Para los valores de los genes blanco y el gen de referencia se aplica el cálculo de $-\Delta\Delta Ct$, tanto para la condición control y la mutante:

$$\Delta Ct_{T_0} = Ct_{(Gen\ blanco)} - Ct_{(Gen\ de\ referencia)}$$

$$\Delta\Delta Ct_{T_0} = \Delta Ct_{(Grupo\ mutante\ 4x\Delta ape2)} - \Delta Ct_{(Grupo\ 4x-Control)}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{unidades de cambio del transcrito en la condición de tiempo determinada.}$$

Con los valores de expresión relativa para la cepa mutante $4x\Delta ape2$, se expresan los valores para cada condición.

6.5. Producción de la leucin aminopeptidasa yspII recombinante (rLAPyspII) de *Schizosaccharomyces pombe* en *Escherichia coli*.

6.5.1. Análisis bioinformático para la generación de la rLAPyspII.

Se obtuvo la secuencia aminoacídica de la leucin aminopeptidasa yspII en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la predicción de la respuesta inmune para la producción de anticuerpos, se utilizó la base de datos Immune Epitope Database (IEDB) (<http://tools.iedb.org/main/>).

6.5.2. Extracción y purificación de ADN cromosómico de levaduras.

Se inocula un cultivo de la cepa nativa de *S. pombe 972h-* de 10 mL en medio YE y se incuba a 30 °C en agitación hasta obtener una D.O._{600nm} entre 2 y 3 UA. Se centrifuga el cultivo celular a 8000 rpm por 2 min a 4 °C y se retira el sobrenadante. El paquete celular se lava dos ocasiones con agua estéril. Se adicionan 200 µL de solución de lisis para levaduras y 200 µL de fenol: cloroformo (5:1) (Sigma Aldrich) para posteriormente añadir un volumen de 200 µL de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y se mezcla en vórtex durante 10 min hasta romper las células. Se centrifuga a 12000 rpm por 5 min a 4 °C, de donde se recupera la fase acuosa en un tubo nuevo y se digiere con ARNsa 20 µg/mL, a 37 °C durante 30 min. La fase acuosa se precipitó con acetato de sodio 3 M a pH 5.2 en una relación 1:10 del volumen total y etanol absoluto frío hasta llenar el tubo. Se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C y se retira el sobrenadante sin tocar el precipitado formado. Éste se lavó con 500 µL de etanol frío al 70 % y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4 °C. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se seca a temperatura ambiente con el tubo invertido, no más de 10 min. El precipitado se suspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ADN se estimaron mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm. La muestra se conserva a -20 °C.

6.5.3. Producción de la proteína LAPyspII recombinante en el sistema de *Escherichia coli*.

La parte correspondiente del proyecto 'Producción de la proteína recombinante LAPyspII en *Escherichia coli* se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la asesoría y colaboración del Dr. Víctor Manuel Luna Pineda.

6.5.4. Generación del inserto del gen *ape2* de la leucin aminopeptidasa *yspII* de *Schizosaccharomyces pombe*.

Se utilizó la estrategia de clonación independiente de ligación (aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System, Thermo Scientific) dado que permite la expresión con alto rendimiento y la posterior purificación a través de Cromatografía de Afinidad por inmovilización de iones (IMAC, NTA-Ni). Los oligonucleótidos que se diseñaron y sintetizaron, contienen el marco abierto de lectura para la LAP_{yspII} (1539pb), así como las secuencias de unión al plásmido pLATE51.

Tabla 6. Oligonucleótidos para la generación del inserto para la clonación de la Leucin aminopeptidasa *yspII* de *S. pombe* en *Escherichia coli*.

Primer	Secuencia	T _m	Longitud
LAP _{yspII} -F	5'-GGTGATGATGATGACAAG ATGAAGGGTTTAGGTCTAAGTACGAGAACC-3'	65.1 °C	48 pb
LAP _{yspII} -R	5'-GGAGATGGGAAGTCATTA ATACTTGCGAGCGACTTCAATAATAGTGC-3'	66.2 °C	47 pb

Con estos oligonucleótidos LAP_{yspII} F y R, se realizó la amplificación del gen con extremos 5' y 3' de unión al plásmido pLATE51. Para ello, se extrajo ADN genómico de la cepa nativa de *S. pombe 972b*-se verificó su integridad y concentración, para después realizar PCR con una polimerasa de alta fidelidad Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La concentración de ADN utilizada fue de 100 ng y primers 0.2 μM final.

Reactivos	Volumen (50 μL)
5X Phusion HF Buffer	5.0
Primer sentido (0.2 μM)	2.5
Primer antisentido (0.2 μM)	2.5
ADN genómico (100 ng)	5.0
DMSO (3%)	1.5
Phusion DNA Polymerasa	0.5
Agua libre de nucleasas	c.b.p.

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Condiciones	Ciclos
Predesnaturalización	98°C, 30 s	30 ciclos
Desnaturalización	98°C 10 s	
Alineamiento	61°C 30 s	
Extensión	72°C 15 s	
Extensión final	72°C 5 min	

Posteriormente se verificó el tamaño del fragmento generado (1575 pb) y la aparición de productos inespecíficos. La purificación del producto de amplificación de aproximadamente de 1575 pb obtenida mediante la columna DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) se cuantificó mediante espectrofotometría.

6.5.5. Clonación del inserto en el plásmido de expresión pLATE51.

Para realizar la clonación en el plásmido pLATE51 (His Tag N-terminal), independiente de ligación, se generan extremos cohesivos en el inserto mediante una reacción LIC mediante una T4 polimerasa, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, usando 65 ng de plantilla de ADN inserto. Posteriormente se realizó la reacción de alineamiento con el vector pLATE51 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta reacción es usada directamente para la transformación de bacterias *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3) (Agilent).

Reacción LIC

Componente	Volumen
5X LIC Buffer	2 μ L
Inserto Purificado LAPyspII (50 ng)	1.5 μ L
Agua libre de nucleasas	9 μ L
T4 DNA Polymerase	1 μ L
Incubación a TA 5 minutos	
0.5 M EDTA	0.6 μ L

Alineamiento con el vector pLATE51

Componente	Volumen
pLATE, LIC-ready vector	1 μ L
Volumen de reacción de T4 DNA polimerasa	10 μ L
Incubación a TA 30 minutos	

6.5.6. Transformación de bacterias BL21-CodonPlus(DE3) con el plásmido pLATE51-LAPyspII.

La preparación de las bacterias competentes se hizo a partir de un precultivo en caldo LB a 37 °C durante toda la noche, posteriormente se hizo una dilución del cultivo 1:100 en 20 mL de LB. Se dejó crecer hasta un D.O.₆₀₀=0.5-0.6. Se lavaron las células con agua estéril tres veces (4000 rpm por 15 min), para resuspenderlas en 500 μ L de glicerol al 10%.

Un volumen de 100 μ L de células se mezcló con 10 μ L de la reacción de alineamiento preparada previamente, para llevar a cabo la transformación por electroporación (con un Electroporador BTX

Harvard) con una intensidad de 1,800 V. Las células se llevaron a recuperación en 1 mL de medio LB sin antibióticos durante una hora a 37°C. Se recuperó la pastilla celular por centrifugación y se sembró en placas de agar LB con ampicilina 100 µg/mL durante toda la noche. Se verificaron las clonas resistentes.

6.5.7. Verificación de colonias resistentes a antibióticos con PCR en colonia.

El crecimiento de las colonias en agar con ampicilina nos permite seleccionar cuales de ellas han sido transformadas satisfactoriamente. Gracias al método de clonación utilizado, es posible que solo los productos transformados sean resultado del alineamiento del vector con el inserto. Para realizar la verificación mediante PCR en colonia (PCR Master Mix Promega) se ocuparon los iniciadores específicos del kit aLICator (**Figura 12**). Las colonias evaluadas son positivas para la presencia del plásmido pLATE51 con el inserto de la LAPyspII, si se obtiene un amplicón específico de aproximadamente 1,800 pb.

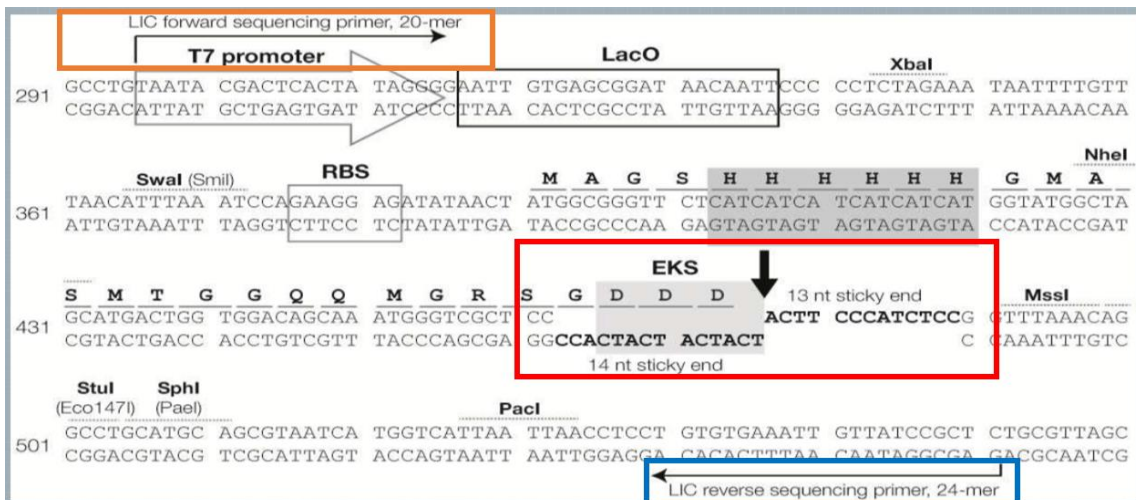


Figura 12. Verificación de bacterias transformantes por PCR en colonia. En naranja: sitio de hibridación de los iniciadores LIC Forward Sequencing primer, 10 µM; en azul: sitio de hibridación del iniciador LIC Reverse Sequencing primer, 10µM; en rojo: Sitio de inserción del ORF de la Leucin aminopeptidasa yspII.

6.5.8. Purificación de la proteína LAPyspII en *Escherichia coli*.

Prueba de inducción y solubilidad.

Las pruebas de solubilidad y de inducción se realizaron de acuerdo con las especificaciones del protocolo The QIAexpressionist, Qiagen.

Se obtuvo un cultivo de 1,500 mL de *Escherichia coli*, el cual se dejó crecer por 3 horas aproximadamente (Cultivo sin inducir). Al término de este tiempo, se agregó IPTG a una concentración de 1 mM durante

5 horas a 37 °C, tiempo en el cual se indujo la expresión de la proteína. Al finalizar este tiempo, se tomó una muestra del cultivo, se centrifugo y lavo con PBS. La pastilla fue resuspendida en PBS para su sonicación con una amplitud de 70% y pulsos de 10 segundo en frío durante 10 minutos. Posteriormente, la suspensión bacteriana sonicada se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante, el cual fue definido como fracción soluble. La pastilla fue resuspendida en PBS y este fue definido como fracción insoluble, todas las muestras, fueron sometidas a análisis en geles de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) y se revelaron con azul de Coomassie (Sigma Aldrich). La búsqueda tiene como objetivo identificar la proteína LAPypII a un peso molecular de 50 kDa aproximadamente.

Para verificar el nivel de expresión y la localización predominante de la proteína se realizó un ensayo de western blot con anticuerpos monoclonales Anti-6X His tag® de ratón (Abcam) como anticuerpo primario y un Rabbit anti-IgG de ratón acoplado a HRP (Abcam). El revelado se realizó con el sustrato TMB Pierce (Thermo Scientific) y visto en un fotodocumentador Fusion FX y un Rabilir. Se identificaron las bandas correspondientes a 50 kDa, tanto en la fracción soluble e insoluble después de la inducción con IPTG.

6.5.9. Purificación de la LAPypII recombinante por cromatografía de afinidad por inmovilización de iones (IMAC) con resina de agarosa-NTA-Ni.

La cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) se lleva a cabo mediante una matriz de agarosa NTA-Ni (Qiagen) con alta capacidad de unión a la etiqueta de histidinas, presente en la LAPypII recombinante.

Posterior a la verificación de la solubilidad, las bacterias fueron crecidas en 500 mL de medio LB suplementado con 1 mM de IPTG durante 5 horas a 37 °C para la inducción y purificación de proteínas recombinantes. El paquete celular fue obtenido por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, para posteriormente realizar una digestión con lisozima (1mg/mL) durante una hora en frío. Se resuspendió en el Buffer 1 (K₂HPO₄ 10 mM, pH 7.4, NaCl 150mM y 1mM EDTA) con fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, Sigma Aldrich) para seguir con la sonicación con pulsos de 10 segundos a una amplitud del 70% en frío. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 4 °C, para obtener el extracto soluble que se usará posteriormente para realizar la purificación. El extracto crudo insoluble se conservó a -80 °C.

El solubilizado fue incubado con 3 mL de agarosa-NTA-Ni (Qiagen) durante 1 hora en agitación constante a 4 °C. Posteriormente se empaquetó la columna para sus lavados y elución. Los lavados se

realizaron con 100 mL de Buffer 2 (Tris pH 7.5 20 mM, NaCl 160 mM e imidazol 20 mM) y eluída con 5 mL de Buffer 3 (Na_2HPO_4 50 mM pH8, NaCl 100 mM e imidazol 500 mM). Posterior a su elución, la proteína purificada se mantuvo a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

La proteína fue cuantificada con el kit 2D-Quant de acuerdo con el protocolo establecido (GE Healthcare Bio-Sciences AB) y visualizadas en geles de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) revelando con tinción de azul de Coomassie.

6.5.10. Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) y eliminación de impurezas derivadas de la purificación.

Se procesan los extractos solubles obtenidos después de la inducción con IPTG y permite la purificación en paralelo bajo condiciones desnaturizantes o nativas. La purificación se puede realizar en 3 pasos cromatográficos (captura, purificación intermedia y alta purificación) mediante un equipo FPLC Acta Start (General Electric) y en paralelo se dio seguimiento mediante PAGE-SDS. Se comenzó con la captura de la proteína mediante el método de inmovilización por afinidad a metales (IMAC), ya que la etiqueta de Histidinas presente en la proteína permite la purificación mediante una columna de afinidad a Ni^{2+} (HisTRap FF crud, General Electric) y posteriormente se eluyó mediante un gradiente continuo o escalonado de Imidazol. La proteína es purificada en dos pasos concertados y a través de un gradiente de imidazol, a diferentes concentraciones, asegurando el aislamiento de la proteína blanco. Se verificó la estabilidad y rendimiento de la proteína de interés mediante PAGE-SDS (**Figura 13**).

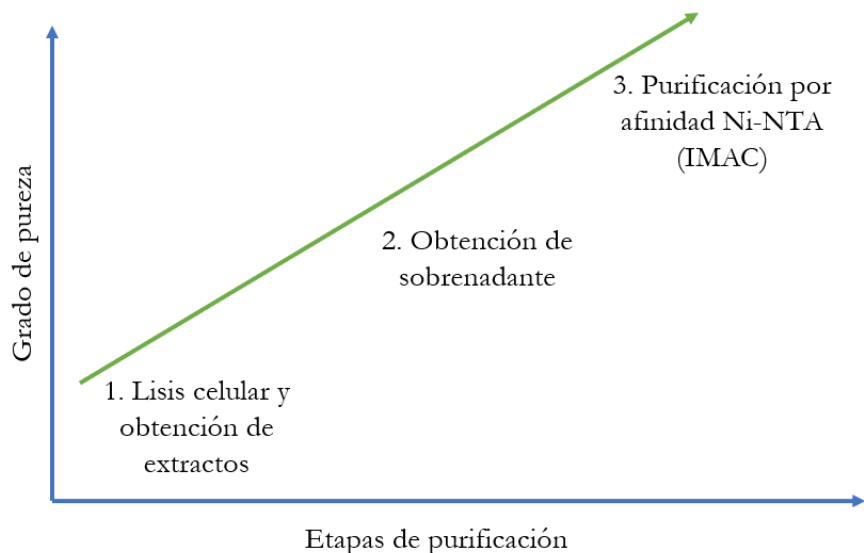


Figura 13. Estrategia de purificación mediante FPLC, para mejoramiento de la pureza de la proteína LAPyspII.

6.6. Generación de anticuerpos monoclonales anti-leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE) bajo la asesoría de la QFB. Olga Mata Ruiz y la M.C. Yolanda Medina Flores. El manejo de animales de laboratorio se realizó de acuerdo con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y por el Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL-InDRE). La producción de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo con el protocolo de obtención de hibridomas de Kohler y Milstein, 1975 (62).

6.6.1. Preparación del inmunógeno.

La obtención de la proteína recombinante LAPyspII se llevó a cabo en el modelo biológico *Escherichia coli* como se describió anteriormente. Para realizar las inmunizaciones en ratones BALB/c se consideraron 100 µg de antígeno, con adyuvante de Freud completo e incompleto dependiendo del día de inmunización.

6.6.2. Inmunización y fusión mediante polietilenglicol.

Se consideraron tres ratones hembra de 4 a 6 semanas de edad, por cada partida de inmunización, los cuales fueron sometidos a la estimulación de la respuesta inmune con la LAPyspII recombinante. Inicialmente, se obtuvo la sangre del animal vía retro orbital, esto para tener el suero de estado preinmune de los ratones. Para iniciar la inmunización, los animales fueron administrados vía intraperitoneal con la proteína recombinante rLAPyspII suplementada con adyuvante de Freud completo (día 0; 100 µg) y con adyuvante de Freud incompleto (día 7, 14, 21, 28 y 35 días; 100 µg) en PBS-1X. A cada uno de los ratones inmunizados se evaluó la respuesta inmune humoral posterior al día 14 usando el método de ELISA. El título positivo fue aquel que superó la absorbancia (D.O._{492nm}) de 1. Los ratones que tuvieron títulos superiores en una dilución 1:1000 fueron sacrificados y se obtuvo el bazo en condiciones estériles.

6.6.3. Optimización del proceso de ELISA y determinación de la densidad óptima de carga del antígeno.

Para identificar si los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados reconocen a la proteína recombinante LAPyspII y para optimizar la cantidad de antígeno necesario para llevar a cabo

las cuantificaciones (ELISA) de los sobrenadantes de los hibridomas que se obtendrán posteriormente, se realizó una titulación con diferentes concentraciones de la proteína recombinante LAPypII. Para ello se consideraron tres concentraciones 100, 500 y 1000 ng en solución de recubrimiento, con las cuales se incubaron placas de ELISA de 96 pocillos de alta adherencia (Corning™ 3361), se realizó el análisis de acuerdo al apartado “Estandarización de ELISA indirecto”, utilizando el suero de los ratones que habían sido sometidos al esquema de inmunización. El título de anticuerpos de los sueros positivos de los ratones se determina cuando la absorbancia a 492 nm supera la unidad. Así mismo, se determinó la diferencia entre los estados preinmune y postinmune en las diferentes concentraciones del antígeno, para identificar reacción cruzada en los individuos estimulados.

6.6.4. Estandarización de ELISA indirecto.

Para dar seguimiento a la inmunización, la respuesta de los ratones inmunizados a la estimulación con el antígeno, y la posterior formación de los hibridomas y producción de anticuerpos, se realiza un análisis mediante el inmunoensayo de ELISA, donde se pone en interacción el antígeno contra el suero de los ratones inmunizados o sobrenadante del cultivo celular que esté produciendo anticuerpos contra el antígeno. Para ello se realizaron diluciones de la proteína rLAPypII con solución de recubrimiento de acuerdo con los requerimientos del análisis. Posteriormente se agregan 100 µL del antígeno diluido a cada pozo de una placa de ELISA de 96 pocillos de alta adherencia (Corning™ 3361), y se cubrió con parafilm para incubar toda la noche a 4 °C o a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado el tiempo de incubación, se elimina el líquido y se lava la placa dos veces con solución de lavado. Se agregó 200 µL de solución de bloqueo a cada pozo, para incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, nuevamente se eliminó el líquido y se lavó dos veces con solución de lavado. Procurando eliminar todo el residuo de solución de lavado, se agregan 100 µL de anticuerpo primario diluido a cada pozo, según sea el caso se utiliza el suero de los ratones estimulados o el sobrenadante de los cultivos celulares del hibridoma, si es necesario se preparan diluciones dependiendo el objetivo de la cuantificación. Estos se mantienen en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se repite el lavado de dos a tres veces, con 300 µL de solución de lavado, para posteriormente eliminar todo el líquido residual. Se agregó 50 µL de anticuerpo secundario diluido anti-ratón-HRP (1:4000) (cabra anti-IgG/A/M de ratón conjugado con peroxidasa de rábano, ABCAM). La placa se incubó mínimo una hora, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se elimina el líquido de las placas y se lavó nuevamente con solución de lavado tres veces. A cada pozo se le agregó 150 µL de solución de sustrato OPD, protegido de la luz, se incubó hasta el desarrollo de color, de 15 a 30

minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 μ L de solución de paro. La lectura de las placas se hizo en un lector de ELISA a 492nm.

6.6.5. Fusión mediante polietilenglicol.

Después del análisis de los ratones inmunizados, se identificaron los individuos que estaban listos para la fusión, de acuerdo con el título de anticuerpos en el estado postinmune. Para ello, al ratón candidato donador de células de bazo se le aplicó un refuerzo del antígeno con adyuvante incompleto de Freund una semana después de su última inmunización. A la siguiente semana se sangró a blanco por vía retro-orbital para obtener el suero como control positivo y se sacrificó para obtener el bazo. El bazo fue extraído en condiciones de esterilidad. Se maceró con ayuda de una malla estéril y tratada con ácido clorhídrico hasta lograr una suspensión homogénea de células en medio DMEM (ATCC ® 30-2002) sin suero fetal bovino (SFB). Las células se transfirieron a un tubo con 20 mL de medio con células de mieloma (P3X63Ag8.653, ATCC® CRL-1580™), previamente evaluadas a confluencia del 70 al 80%. La mezcla celular de células de bazo y mieloma se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, lavando y mezclando dos ocasiones con medio DMEM sin suero. Para realizar la fusión, el botón obtenido se disgregó suavemente y fue colocado en un baño a 37°C, donde se le agregó gota a gota 1 mL de polietilenglicol (Sigma) en el lapso de un minuto. Posteriormente, se agregó primero 5 mL de medio sin suero gota a gota, en un lapso de tres minutos. hasta alcanzar 15 mL totales. Después se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. La selección se realizó utilizando medio DMEM con suero fetal bovino (Gibco) suplementado con medio HAT (50X, hipoxantina, aminopterina y timidina; ATCC® 69-X™). Las células se distribuyeron a una densidad de 1×10^5 células de bazo/pozo (en 200 μ L) en placas de 96 pozos, y se incubó a 37 °C en atmosfera al 0.5 % de CO₂, dejando transcurrir tres días, revisando que no hubiera contaminación, verificando el crecimiento e identificando los pozos con híbridos viables.

6.6.6. Subclonación y expansión de hibridomas productores de anticuerpos.

Posterior a 10 o 12 días de fusión, los hibridomas fueron evaluados mediante ELISA indirecto, utilizando el antígeno (rLAPyspII) en una concentración de 100 ng por pozo, para determinar los hibridomas productores de anticuerpos en 100 μ L de volumen de los sobrenadantes. Posteriormente, los hibridomas positivos fueron transferidos a otras placas de cultivo, para proseguir con la clonación mediante diluciones seriadas. Su seguimiento en la producción de anticuerpos se realizó también por

ELISA. Este procedimiento de clonación se realizó tres veces, siguiendo el procedimiento previamente descrito y las clonas obtenidas se consideran productoras de anticuerpos monoclonales (AcMo).

Las células de los pozos que dieron positivo en ELISA se expandieron en medio HAT, a partir de placas de 96 pocillos, placas de 48 pocillos y finalmente placas de 6 pocillos. Las células fueron clonadas mediante el método de dilución limitante, cuando habían alcanzado más del 50% de confluencia (63). Para ello, se preparó una suspensión celular (en medio DMEM) de los híbridos seleccionados de la siguiente manera. De los pozos A1 al A12 de una placa de cultivo de 96 pozos se agregaron 100 μ L de medio, posteriormente en el pozo A1 se adicionó 100 μ L de las células de las clonas positivas verificadas por ELISA (se utilizó una placa por clona), se hacen diluciones seriadas, pasando 100 μ L del pozo A1 al A2 y después del A2 al A3, así sucesivamente hasta llegar al A12. Con ayuda del microscopio invertido, se buscó en cuál de los 12 pozos se observaban aproximadamente 30 células, se tomaron 100 μ L de este pozo y se incorporaron a 18 mL de medio DMEM. De esta suspensión celular se colocaron 200 μ L/pozo en el resto de la placa de B1 hasta H12, para hacer un monitoreo de toda la placa e identificar en que pozos había una sola célula, se prosiguió con el mantenimiento del cultivo celular con medio DMEM con SFB a 37°C/5% CO₂ para su proliferación.

Dependiendo el estado de las células, se hizo el recambio de medio después de 7 días, 100 μ L de HTA fresco se añadió, de acuerdo con la confluencia y el estado del medio. La detección de pozos positivos se realizó utilizando ELISA usando el sobrenadante del pozo para el reconocimiento de anticuerpos. Solo las células que resultaron positivas se expandieron, y mantenidas en medio DMEM con SFB (10%) y aminoácidos no-esenciales (1%).

6.6.7. Criopreservación y almacenamiento de los hibridomas productores de anticuerpos.

Desde los primeros seguimientos, se tomaron células con más de 70% de confluencia para realizar cultivos permanentes. Las células se obtuvieron por centrifugación a 2.000 r.p.m. Los pellets fueron resuspendidos en medio fresco DMEM con una solución al 10% de DMSO (dimetil sulfóxido, Sigma Aldrich), y dividido en alícuotas en tres crioviales. Se pusieron en hielo para enfriar gradualmente las células, y posteriormente a -80°C. Luego se sumergieron en nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. Todas las clonas positivas, se conservaron desde el proceso de subclonación y expansión.

6.7. Análisis de datos.

Las diferencias significativas de los valores medios fueron analizadas con la prueba t de Student. Los análisis y gráficos fueron elaborados con GraphPad Prism software (versión 6, CA, USA) o con Excel Office para Microsoft. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

7. Resultados y discusión

7.1. Cinética de crecimiento y características fenotípicas de las cepas 4X Δ ape2 mutante y 4X control.

La cepa 4X Δ ape2 tiene una disrupción de una parte del gen *ape2*, por lo cual no produce la enzima leucin aminopeptidasa II (LAP_{yspII}). El objetivo de este experimento fue identificar las características fenotípicas más importantes con respecto a la repartición del material genético.

7.1.1. Curva de crecimiento.

A partir de cultivos sincronizados en fase G1, se generó la cinética de crecimiento para la cepa 4X Δ ape2 mutante y la cepa 4X control. En la **Figura 14A** se muestra que la cepa mutante 4X Δ ape2 disminuye su crecimiento entrando a la fase logarítmica media, avanzando así hasta la fase logarítmica tardía y manteniéndose hasta la fase estacionaria. Mediante el ajuste a un modelo de crecimiento biológico (Monod) (**Figura 14B**), se calcularon los parámetros cinéticos correspondientes a ambas cepas, a partir de la cual se determinó que el tiempo de duplicación para la cepa mutante es menor con respecto a la cepa control (5.17 vs 4.80 h) (**Tabla 7**).

Estos datos concuerdan con los obtenidos en nuestro grupo de trabajo por Gutiérrez, 2014 y Flores (26, 27), 2018, donde la tasa de generación de la cepa mutante 4X Δ ape2 es menor con respecto a la cepa control 4X. Así mismo, son consistentes con los resultados obtenidos en estudios de producción de proteínas recombinantes (29) y de quiescencia (30) realizados en la levadura *S. pombe*. A lo largo del periodo de estudio, se ha establecido que la fase logarítmica y estacionaria es la más importante para el efecto de la leucin aminopeptidasa *yspII*, la cual comprende desde las 20 hasta las 36 horas de crecimiento, es en este periodo de tiempo donde podemos identificar las modificaciones fenotípicas como la disminución de la viabilidad y cambios en la morfología celular (27). La ausencia de esta proteasa condiciona la velocidad de crecimiento (4X-Control=0.1442 vs. 4X Δ ape2=0.1340) aunque la levadura sigue el proceso de división, éste se ve mermado probablemente por la mala repartición del material genético y muerte celular.

Las condiciones del medio de cultivo, la privación de nutrientes y la generación de compuestos tóxicos derivados del metabolismo podrían estar relacionados con esta disminución de la velocidad de duplicación. Los factores de estrés también podrían estar condicionando que la levadura tenga deficiencias en la división, mismas que se extienden hasta la fase logarítmica tardía (64, 65)

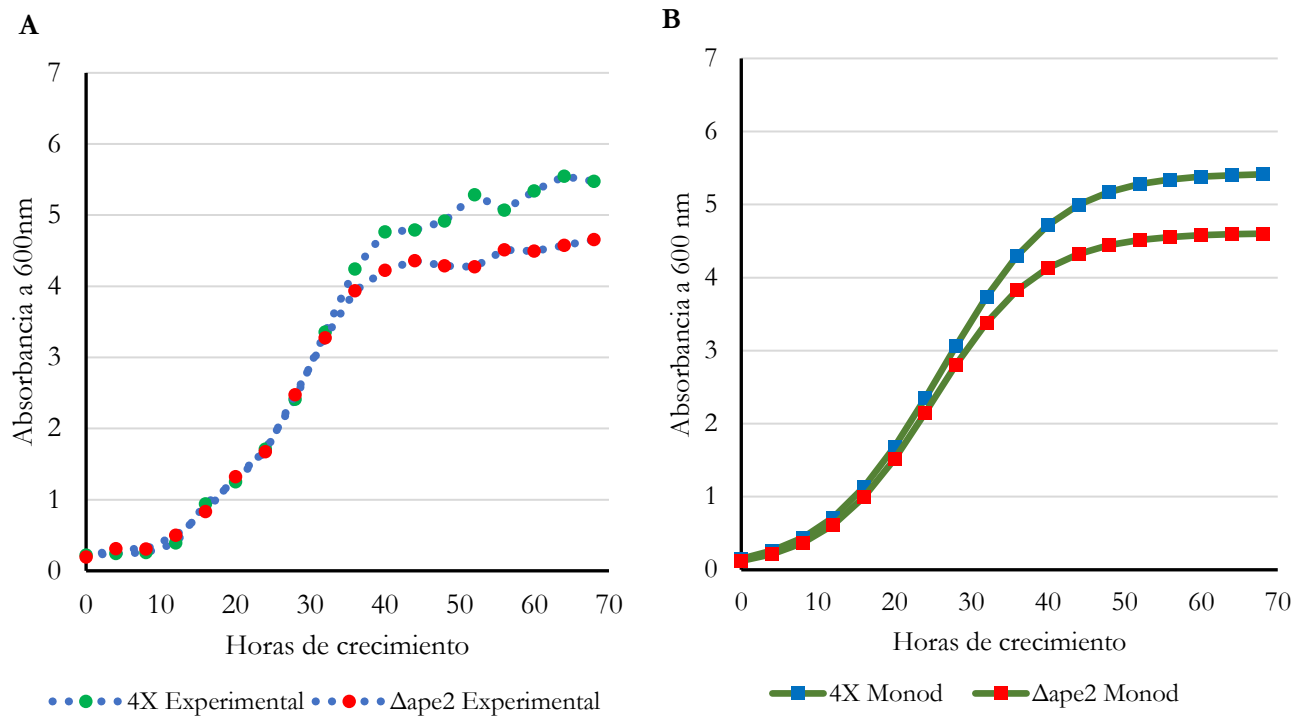


Figura 14. Reproducción de la cinética de crecimiento de las cepas control 4X y 4X Δ ape2, a partir de cultivos sincronizados en fase G1. A) Cinética de crecimiento con respecto al tiempo de incubación de ambas cepas. B) Modelo de crecimiento de Monod teórico.

Tabla 7. Parámetros cinéticos del crecimiento de la cepa mutante 4X Δ ape2 con respecto a la 4X-Control.

Parámetro cinético	4x-Control	4X Δ ape2
X0	0.1604	0.1230
Xmax	5.4402	4.6061
μ max	0.1442	0.1340
tD	5.1712	4.8069

7.1.2. Viabilidad celular con tinción de azul de tripano.

Por otro lado, se verificó la viabilidad celular con azul de tripano de la cepa mutante con respecto a la cepa control a diferentes momentos de la cinética de crecimiento de la levadura. La observación de las células nos permitió obtener el número de células totales viables y no viables a partir del inicio de la etapa logarítmica para ambas cepas (4X y 4X Δ ape2) que es a las 20 horas aproximadamente.

Se observa en la **Figura 15** un decaimiento del número total de células de la cepa mutante $4X\Delta\text{ape2}$, a partir de las 20 h, con respecto al control (4X). De forma interesante se observa también que el número de células viables va disminuyendo significativamente en la mutante a partir de las 24 hrs.

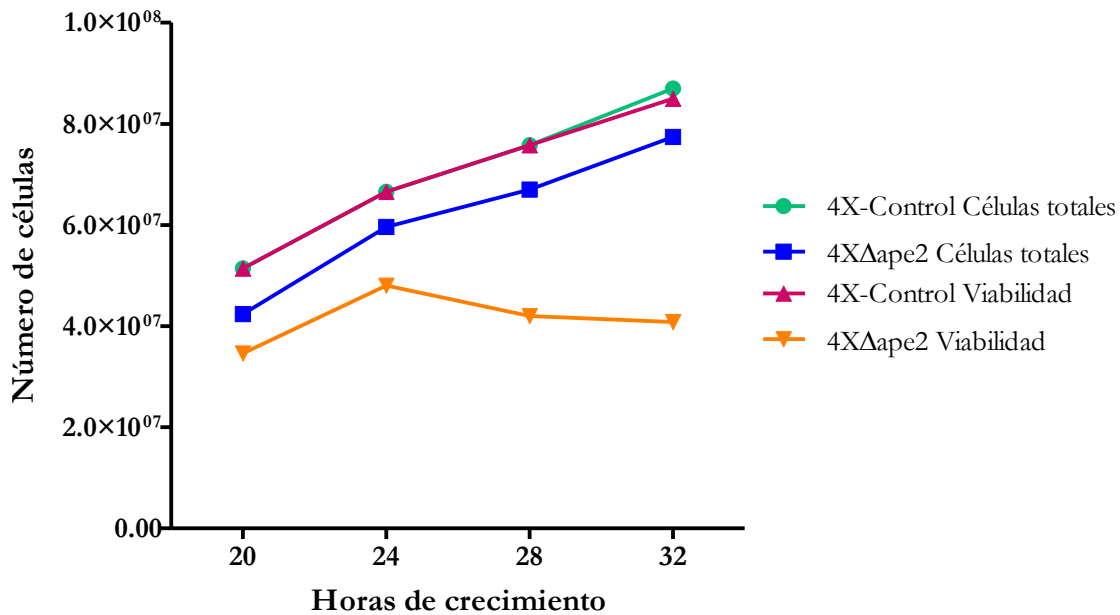


Figura 15. Número de células viables y células totales de la cepa $4X\Delta\text{ape2}$ respecto a la cepa control 4X durante la cinética de crecimiento.

El porcentaje de células viables de la cepa mutante $4X\Delta\text{ape2}$ disminuye, cerca del 50% a las 36 horas de crecimiento, indicando que, a la salida de la fase logarítmica, la ausencia de la enzima LAPySPII afecta significativamente a la supervivencia de la levadura (**Figura 16**).

La disminución de la viabilidad demuestra que existe un daño en las células $4X\Delta\text{ape2}$, que probablemente estén ocasionando una modificación en la morfología, tal vez alteraciones metabólicas, daño en la membrana o pared celular de la levadura, que podrían inhabilitar a la levadura para mantener las funciones básicas de supervivencia. La llegada a la fase logarítmica tardía compromete la viabilidad de la levadura hasta en un 50%. Esto nos muestra que, en su desarrollo y en el proceso de aumento de biomasa durante la curva de crecimiento, la función de la LAPySPII es importante para mantener la viabilidad de la célula.

Estos datos indican una posible modificación en la morfología celular, por este motivo se decidió confirmar este efecto por microscopía de fluorescencia.

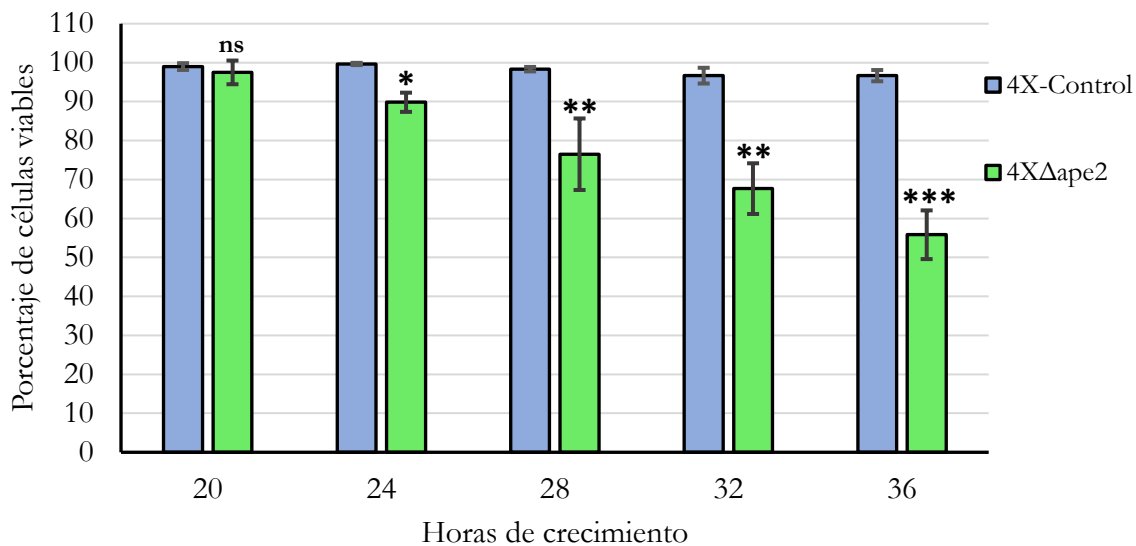


Figura 16. Porcentaje de viabilidad a diferentes horas de crecimiento de la cepa mutante 4XΔape2 con respecto al 4X Control. Viabilidad de las células con tinción de azul de tripano. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Análisis por *t* de Student comparando la cepa control (4X-Control) con la cepa mutante(4XΔape2). n=4; P <0.001 → ***, P <0.01 → **, P < 0.05 → *, ns → no significativo.

7.1.3. Microscopía de fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia permite identificar al núcleo y las membranas lipídicas de la levadura y observar así con más detalle la morfología celular. Mediante la tinción con fluorocromos, es posible identificar estas estructuras mediante la emisión de fluorescencia captada por un microscopio de fluorescencia.

Las muestras estudiadas fueron en la etapa logarítmica de 24 a 36 h donde se observó la disminución de viabilidad por azul de tripano.

A lo largo del crecimiento desde las 24 hasta las 36 h, en la cepa 4X-Control se observó el núcleo celular bien definido, en localización central, sin modificaciones visibles (tinción azul), así mismo, las membranas teñidas se identificaron completas, uniformes, sin deformaciones o extensiones de la forma celular normal (65) (tinción roja) (**Figura 17 A, B, C, D**). Esta morfología normal también se observó en las células mutantes 4XΔape2 al tiempo de crecimiento de 24 h, las cuales no presentaron modificaciones visibles a la forma celular ni a la distribución del material genético (**Figura 17E**).

A partir de las 28 horas de incubación de la cepa mutante 4XΔape2, fue posible identificar las primeras manifestaciones de reparto no equitativo de ADN con grupos de células aglomeradas que perdían la

forma cilíndrica normal (**Figura 17F**). A las 36 horas de cultivo, además de la aparición de aglomeraciones celulares y células deformes, se observaron células carentes de núcleo o con núcleos amorfos, polarizados, con distribución desigual del material nuclear, sugiriendo una mala repartición y segregación del ADN (**Figura 17 F, G, H**).

En el avance del ciclo de división celular a partir de las 28 horas de crecimiento de las células que presentan la delección del gen *ape2* de la LAPyspII, se ven comprometidas en la división exacta del material nuclear, se reconocen las células que han perdido la forma cilíndrica regular que caracteriza a la levadura *S. pombe* y se observan células que carecen de núcleo (**Figura 17 I, J, K**). Estos efectos podrían estar relacionados con la disminución de la viabilidad de las células mutantes 4X Δ *ape2*.

A partir de estos resultados de la desregulación de la segregación del material genético, el compromiso celular a la disminución de la viabilidad y la proliferación celular, podrían estar relacionados con alguna vía metabólica donde esté involucrada la LAPyspII, en el procesamiento de factores como la repartición del material genético. Al ser una enzima citosólica, se plantea que la intervención que esté realizando ocurre desde esta localización, teniendo contacto con proteínas reguladoras de la formación del huso mitótico.

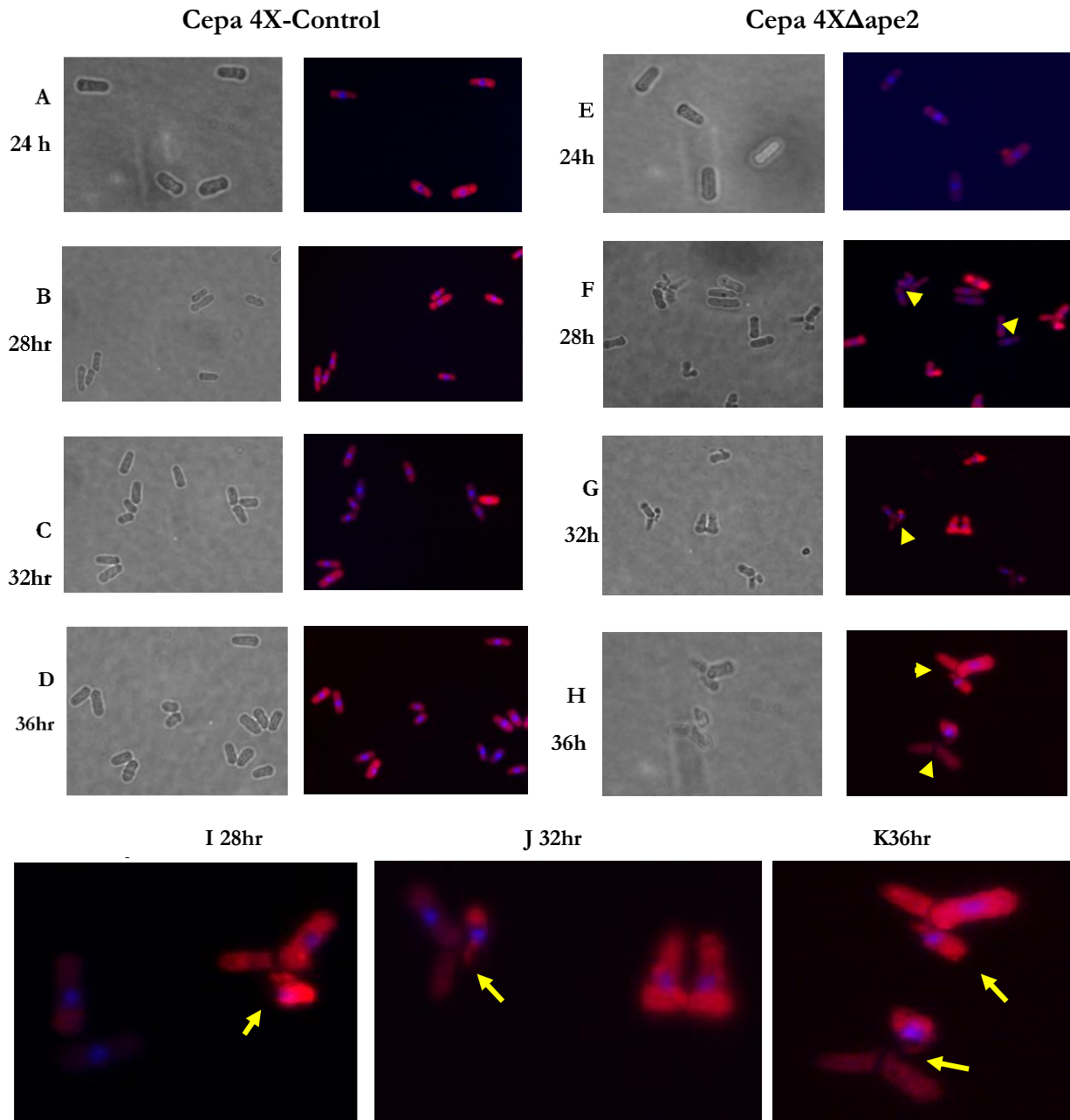


Figura 17. Microscopía de fluorescencia para la cepa 4X-Control y 4X Δ ape2. Se realizó la tinción de las células recuperadas a diferentes horas de crecimiento (24, 28, 32, 36 horas) con los fluorocromos DAPI (azul) y FM-464(rojo). Las fotos I, J y K son aumentos de la cepa mutante. Las imágenes grises corresponden a las tomadas en contraste de fases. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio invertido de contraste de fases del Laboratorio de Interacción Bacteria Planta, del Centro de Ciencias Microbiológicas del ICUAP-BUAP con asesoría y colaboración del Dr. Alberto Ramírez Mata.

7.1.4. Actividad enzimática de la cepa 4X-Control de *Schizosaccharomyces pombe*.

La determinación de la actividad de una enzima tan específica como es la leucin aminopeptidasa yspII en *S. pombe* ha sido determinada durante su estudio en nuestro grupo de trabajo. Esta estimación brinda una medida de la activación de la enzima en un determinado momento de la cinética de crecimiento. Como muchas de las proteasas, su producción puede cambiar debido a las condiciones de la célula y los nutrientes disponibles. En este trabajo, se realizó un acercamiento al periodo de crecimiento que abarca el inicio de la etapa logarítmica (20 horas) hasta la llegada a la fase logarítmica tardía (32 horas). Debido a que la cepa 4X Δ ape2 carece de la proteína, la actividad enzimática residual generada por otras proteasas inespecíficas no fue considerada para esta determinación. Se evaluaron las cepas nativa *S.pombe* 972 h- (a las 24 horas de crecimiento) y 4X-Control a las 20, 24, 28 y 32 horas de la curva de crecimiento.

En la **Figura 18** se observa que la actividad específica aumenta principalmente en las 24 y 28 horas, y posteriormente disminuye su actividad llegando a las 32 horas. De 24 a 28 horas fue el tiempo en el cual se encontró la transición del fenotipo aberrante en la cepa mutante 4X Δ ape2: se identifican células con desregulación en la segregación cromosómica y a las 28 horas la viabilidad comienza a disminuir considerablemente. La enzima puede estar actuando al final de la fase logarítmica, cuando la célula se encuentra en división activa, y se mantiene así hasta que presenta modificaciones en el control del ciclo celular, correspondiente al tiempo de 28 horas (**Figura 18**).

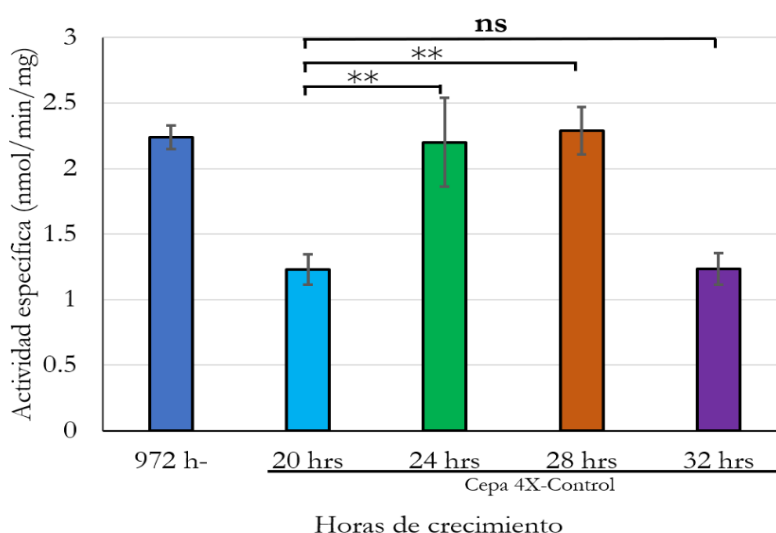


Figura 18. Actividad enzimática de la cepa 4X-Control en diferentes etapas de crecimiento.

Los extractos solubles obtenidos a partir de muestras recolectadas durante la cinética de crecimiento de la cepa 4X control a las 20, 24, 28 y 32 horas se les determinó la actividad enzimática. Se muestra la media y desviación estándar. Análisis 't' de Student: n=3; p<0.05→**; ns→no significativo.

7.2. Determinación del nivel de expresión de genes del ciclo celular mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) en cepas de *Schizosaccharomyces pombe*.

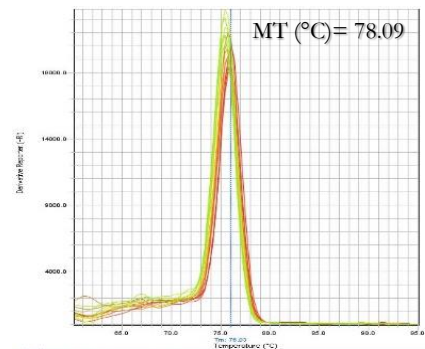
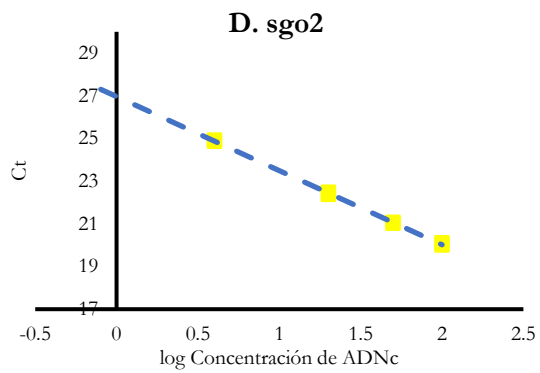
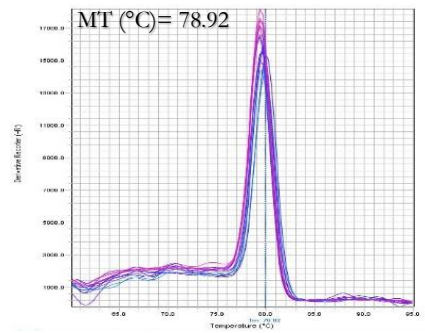
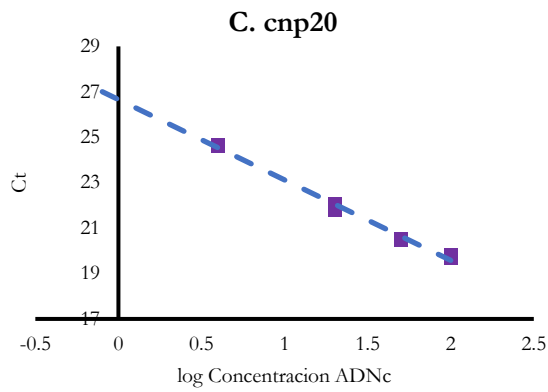
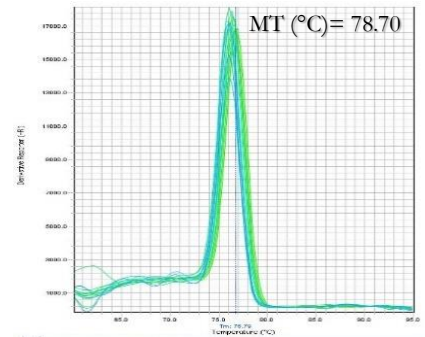
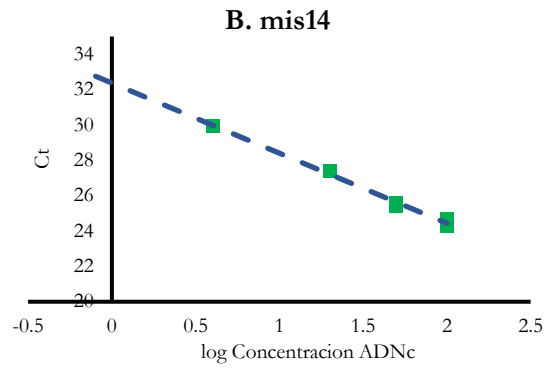
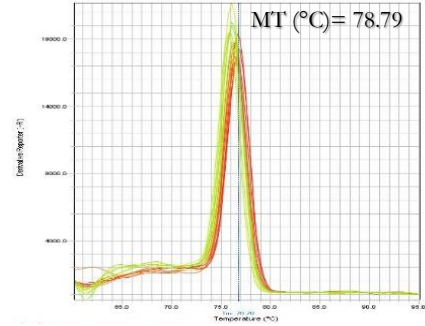
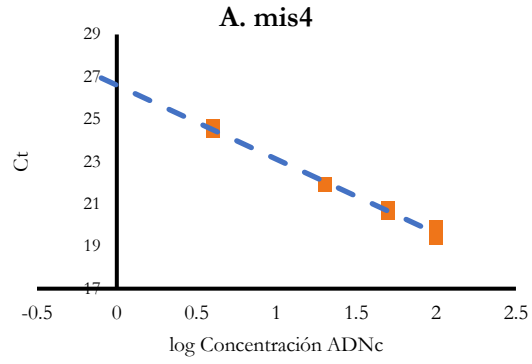
En el trabajo realizado en nuestro grupo de investigación por Flores,2018 (27) , se realizó un ensayo de microarreglos para el estudio de la cepa mutante 4xΔape2. Se obtuvo un panorama general de los patrones de expresión de una serie de 4000 genes. Para la selección de los genes que cambiaron su expresión de forma significativa, se tomaron en cuenta los elementos con un Z-score > 2 de los cuales se realizó un análisis en la plataforma DAVID (Data Base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Gracias a la integración de la información obtenida, se analizó información acerca de los sistemas biológicos y procesos celulares que se encuentran modificados en el caso de la cepa mutante 4xΔape2, con respecto a la cepa control 4x-Control. Con base en los resultados de viabilidad y microscopía de fluorescencia se decidió evaluar genes relacionados con los cambios morfológicos y fenotípicos presentes en la cepa mutante de la levadura (4xΔape2), como son los genes de procesos de mitosis y ciclo celular. De esta manera se seleccionaron genes con mayor y menor expresión en la mutante como: *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8* y *cdc5*. En la cinética de crecimiento de las células de *S. pombe* se examinó el nivel de expresión de estos genes mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) para establecer una conexión entre la modificación de estos procesos y la aparición de los cambios fenotípicos y la disminución de la viabilidad.

7.2.1. Validación experimental de los oligonucleótidos por RT-PCR tiempo real (qRT-PCR) para determinación del nivel de expresión.

Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de genes involucrados en el ciclo celular y rearreglos de microtúbulos en la mutante 4XΔape2, fue necesario realizar la validación de diferentes factores del método para asegurar el correcto análisis de los datos.

7.2.2. Determinación de la eficiencia de reacción por el método de curva estándar relativa.

Se llevó a cabo el procedimiento antes descrito en el apartado de determinación del rango dinámico lineal para la qRT-PCR para los genes *mis4*, *mis14*, *cnp20*, *sgo2*, *rec8*, *cdc5*. Se realizó el análisis de datos para realizar la construcción de las curvas estándar con Ct vs. log de la concentración para obtener los valores de pendiente, eficiencia y coeficiente de variación para cada gen. Con el Software StepOne v2.3 se recuperan las curvas de disociación, que denotan la formación de un solo pico, reflejando la formación de un solo amplicón específico en la reacción de qPCR (**Figura 19**).



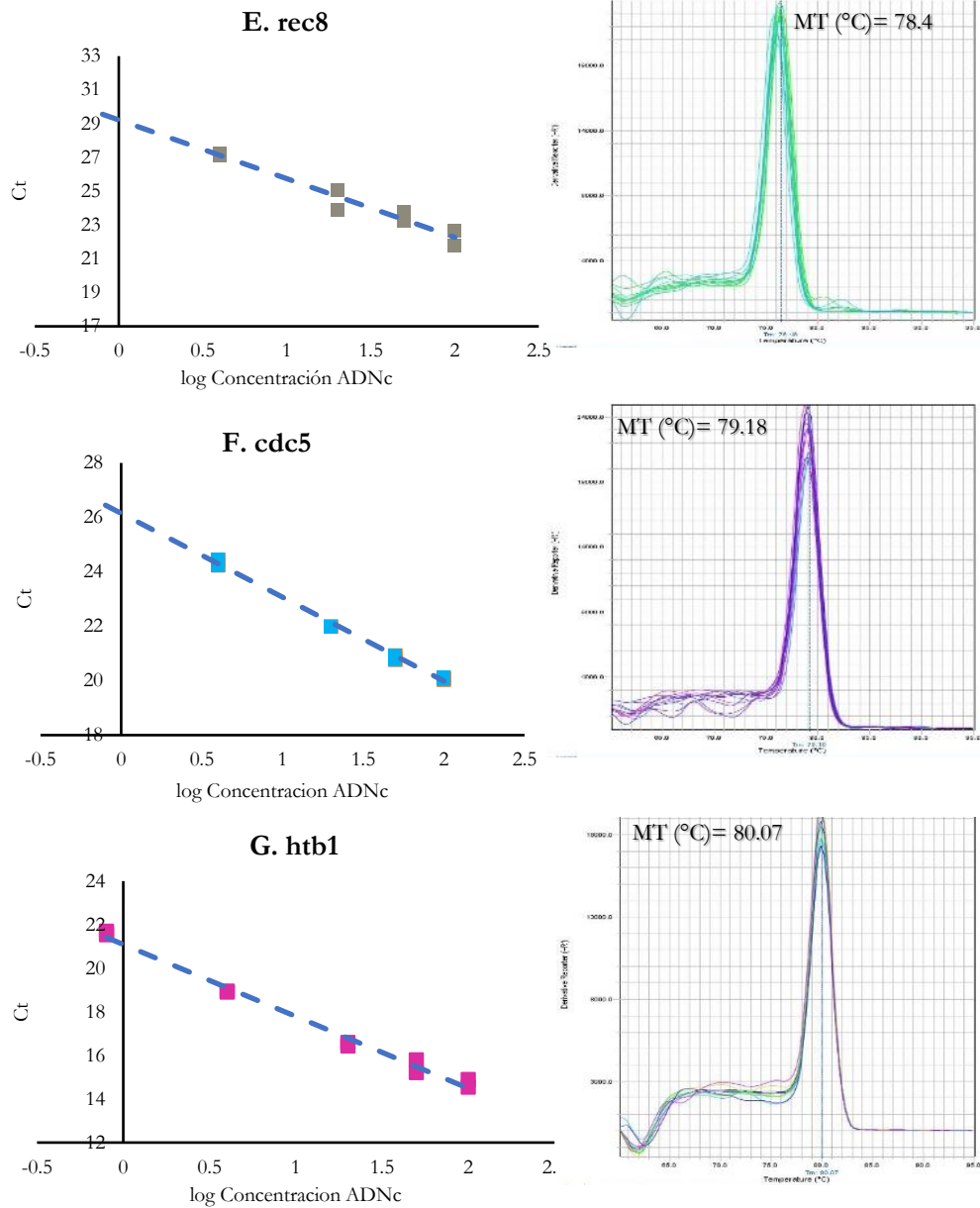


Figura 19. Generación de curvas estándar para la determinación del rango dinámico de amplificación para cada uno de los genes de interés. Del lado izquierdo se muestra la curva estándar construida con los valores de Ct a diferentes concentraciones de ADNc; en la columna derecha se muestran las curvas de disociación para cada uno de los oligonucleótidos usados.

Idealmente, el valor de pendiente para cada curva estándar debe ser de -3.32, el cual indica el 100% de eficiencia, para cada uno de nuestros genes, la eficiencia ronda de 91 a 99%, menos de 10 unidades de diferencia, todos a una temperatura de hibridación de 60 °C (Tabla 8). En estas condiciones no se genera ningún producto inespecífico. Así mismo fue necesario llevar a cabo la validación del método $\Delta\Delta C_t$.

Tabla 8. Parámetros de los genes blanco y de referencia para la generación de la curva estándar a diferentes concentraciones de ADNc.

ID	Blanco	Temperatura de hibridación (°C)	Pendiente	Eficiencia (%)	R ²
A	<i>mis4</i>	60	-3.4969	93%	R ² = 0.9908
B	<i>mis14</i>	60	-3.5653	91%	R ² = 0.9962
C	<i>cnp20</i>	60	-3.5405	92%	R ² = 0.9926
D	<i>sgo2</i>	60	-3.4724	94%	R ² = 0.9993
E	<i>rec8</i>	60	-3.4756	94%	R ² = 0.9504
F	<i>cdc5</i>	60	-3.3477	99%	R ² = 0.9977
G	<i>htb1</i>	60	-3.4587	95%	R ² = 0.9955

7.2.3. Validación para la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para que la aplicación del método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sea válido, las eficiencias de amplificación del gen blanco (GOI) y del gen de referencia (*htb1*) deben ser aproximadamente iguales. Un método sensible para saber si ambos amplicones tienen la misma eficiencia es determinar la diferencia de Ct (ΔCt) del gen blanco y el de referencia, a diferentes concentraciones de ADNc. Así como se aplicó en la curva estándar, en el rango dinámico de amplificación se calculan mediante regresión lineal, los valores para cada dilución. Si el valor absoluto de la pendiente se acerca a cero, las eficiencias son similares y podemos usar como método de análisis $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (66, 67). Se presentan las gráficas para cada blanco comparado con su referencia, así como la pendiente de cada una de ellas (**Figura 20**). Los valores de cada uno de ellos son menores a cero (**Tabla 9**).

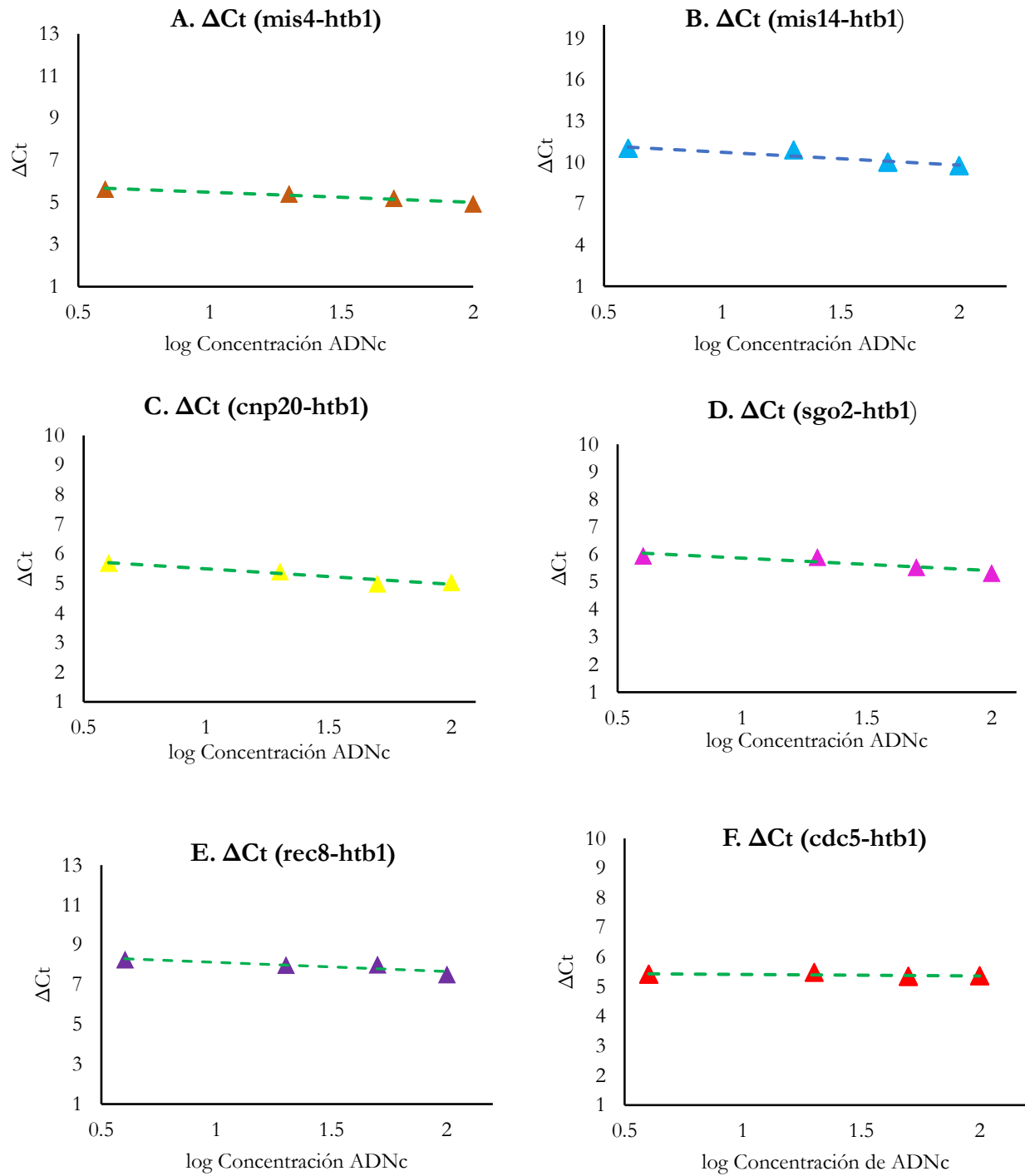


Figura 20. Curva de validación del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para cada uno de los genes blancos se hizo la determinación de la diferencia de Ct con el gen de referencia (htb1). Los resultados nos permiten usar el método para la cuantificación del nivel de expresión.

Tabla 9. Valor de pendiente de la curva de validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ID	Blanco	Valor absoluto de la pendiente	Eficiencia (%)
A	<i>mis4</i>	0.4789	93%
B	<i>mis14</i>	0.7296	91%
C	<i>cnp20</i>	0.5225	92%
D	<i>sgo2</i>	0.4544	94%
E	<i>rec8</i>	0.4576	94%
F	<i>cdc5</i>	0.0508	99%

7.3. Niveles de expresión de los genes relacionados con mitosis y ciclo celular en la cepa mutante 4X Δ ape2.

Los transcritos tanto de la cepa mutante 4X Δ ape2 como de la cepa control (4X-Control) fueron cuantificados mediante qPCR, de acuerdo con el procedimiento previamente descrito. El valor de cada gen de interés (GOI) fue normalizado con el gen constitutivo histona 2B (*htb1*) correspondiente para cada una de las muestras, y posteriormente con el valor de la muestra control a 20, 24, 28 y 32 horas de incubación de la cinética de crecimiento (**Figura 21**).

Se encontró que proteínas como *mis4* y *mis14* presentan una desregulación en el periodo de crecimiento. La subunidad *mis4*, perteneciente al complejo de carga de cohesinas disminuye en el tiempo 32 h a su nivel más bajo, por lo que la localización y acoplamiento de anillos de cohesinas podría estar modificado. Acompañado de esta deficiencia en la localización, reclutadores de microtúbulos como la subunidad *mis14* decrece; sin embargo, los cambios son menores y discretos en todo el tiempo de estudio. La proteína del cinetocoro interno *cnp20* a partir de las 20 horas y que llega a su nivel menor hasta las 32 horas, la disminución del transcrito de esta proteína produce la disminución de sitios de contacto para el ensamble de los microtúbulos y el anclaje de otras proteínas que establecen la unión entre el cinetocoro interno y externo. La conjunción de estas tres proteínas podría impactar en la disminución de proteínas que señalizan a otros componentes del proceso y proteínas reclutadoras.

Tanto *cdc5*, *sgo2* y *rec8* presentan un aumento en su nivel de expresión a las 24 horas. El momento comprendido entre las 20 y 24 horas de crecimiento de la levadura mutante 4X Δ ape2 es crucial para la función de la LAPyspII, ya que es la puerta de entrada para el efecto de las aberraciones fenotípicas, por lo que estos genes podrían estar influenciando en este momento de crecimiento de la levadura.

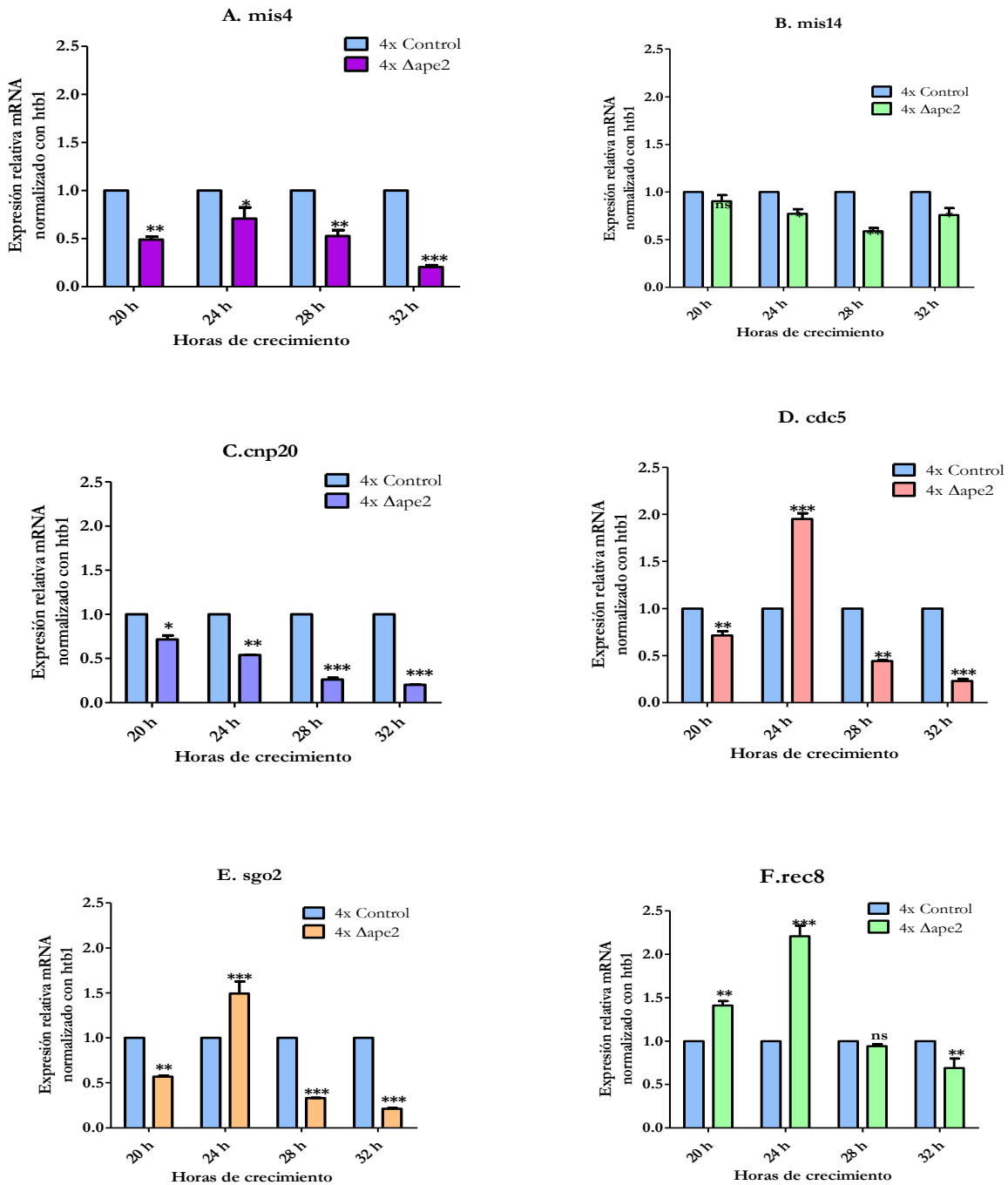


Figura 21. Análisis de qRT-PCR de los genes relacionados con el establecimiento del anillo de cohesinas y el reclutamiento de microtúbulos para la formación del huso mitótico. Se determinaron los niveles de transcripción de la cepa control (4X-Control) y de la cepa mutante para la LAPyspII (4XΔape2) (normalizado a niveles de transcripción de htb1). n =5. Las barras de error representan el SEM. Análisis por t´ de Student comparando la cepa control (4X-Control) con la cepa mutante(4XΔape2): P<0.001 → ***, P<0.01 → **, P < 0.05 → *, ns → no significativo.

La hipótesis es que los cambios trascendentales para los daños posteriores que sufre la célula se dan en este período (de 20 a 32 horas), y podrían volverse irreversibles para la recuperación de la función. La proteína rec8, la cual se encuentra involucrada en la meiosis formando el anillo de cohesinas, presenta un aumento de los niveles de ARNm a las 24 horas. Esto podría sugerir que la ausencia de la LAPyspII requiere la activación de estos genes de meiosis, como parte de una estrategia para compensar la ausencia de otras unidades del complejo en la progresión del ciclo. Para el caso de cdc5, el aumento a las 24 horas podría relacionarse con estímulos nutricionales en esa etapa del crecimiento principalmente relacionados con la vía TOR, seguido de la disminución progresiva del nivel de transcrito llegando hasta las 32 horas, donde la cinética de crecimiento de la levadura mutante se acerca al fin de la fase logarítmica. Proteínas controladoras de la formación de la cromatina como sgo2, podrían actuar a las 24 horas aumentando la formación de subdominios en regiones como los telómeros, y retrasando la transición a la fase G2 del ciclo celular. Estas observaciones sugieren un papel regulador de la LAPyspII en el nivel de expresión de proteínas del complejo de carga de cohesinas y reclutadores de microtúbulos. Ya que estas proteínas son de bajo nivel de expresión, la dinámica de activación de la transcripción de estas puede estar finamente controlado en presencia de la LAPyspII.

7.3.1. Modificaciones del ciclo celular en la mutante de la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*

Los procesos relacionados con la repartición apropiada del material genético estudiados en este trabajo, involucran a proteínas clave en la formación del huso mitótico y reguladores de proteínas del centrómero en la levadura. La localización de anillos de cohesinas a través de las diferentes estructuras de ADN, desde la fase S hasta la anafase, propone la relación estrecha entre los procesos de cohesión y de formación de microtúbulos. La progresión del ciclo celular está determinada por las funciones de las diferentes proteínas antes mencionadas en diferentes etapas de la división celular (**Figura 22**). Elementos formadores del centrómero, así como los grandes complejos estructurales de los cromosomas, se presentan a lo largo del ciclo, atrayendo así más componentes, como los microtúbulos, para controlar estrictamente la repartición de los cromosomas. La ausencia de alguno de ellos, deriva en efectos ampliamente estudiados, como las aberraciones cromosómicas, aneuploidías, arresto del ciclo celular, entre otras (68). Sin embargo, estos procesos ocurren esencialmente en el núcleo, ubicación celular donde la enzima citosólica hidrolítica leucin aminopeptidasa yspII no podría tener

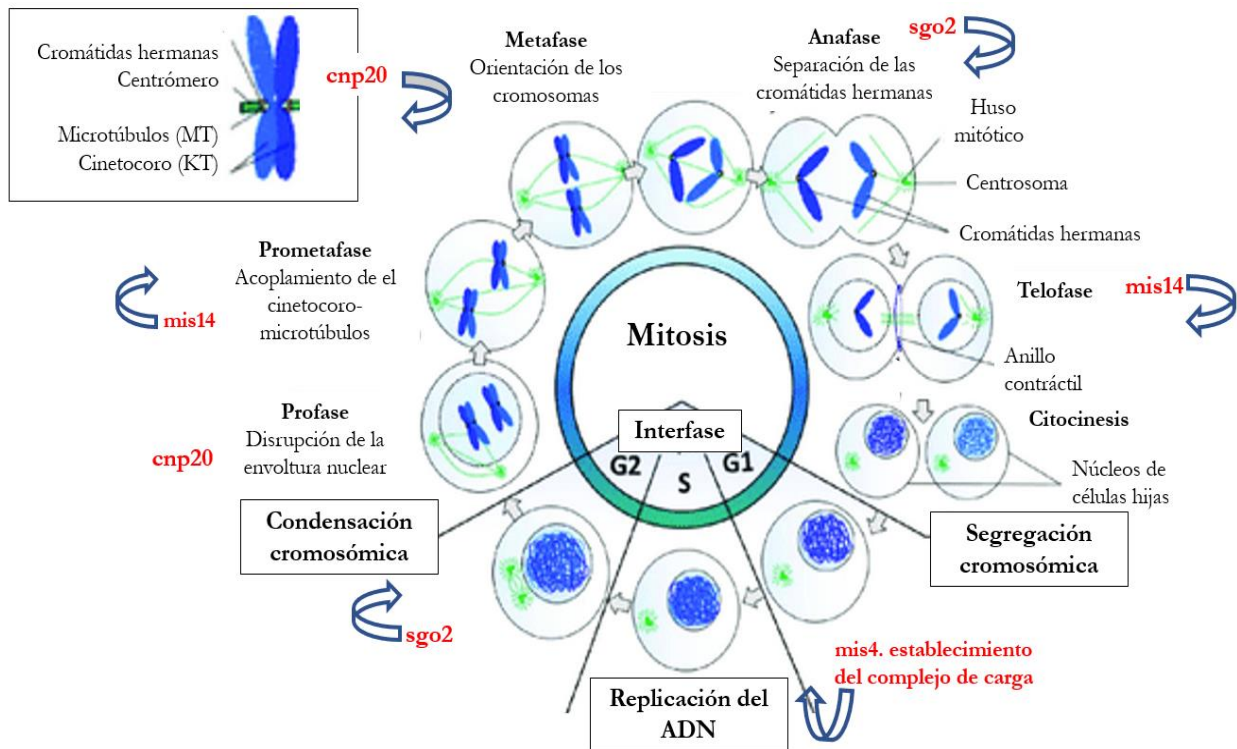


Figura 22. Avance del ciclo celular y mitosis con respecto a los principales componentes del huso mitótico y su interacción con el material genético. En rojo, se encuentran los genes que se analizaron en este trabajo. Modificado de Encyclopædia Britannica, Inc.

influencia, debido a su localización celular. Al afectar tanto la proliferación, la viabilidad y la división celular de la levadura la función de la enzima podría estar relacionada con modificaciones metabólicas de alguna de estas proteínas (69).

Sin embargo, existen eventos que podrían estar conectados y que concretan varios componentes del citoesqueleto que ocurren a nivel de citosol. Se han observado arreglos trascendentales en la distribución del material genético que genera conexiones con porinas nucleares que envían señales al exterior del núcleo y son puentes de comunicación entre el núcleo y otras proteínas. Estas señales (cambios conformacionales, exposición de sitios de unión a nucleosomas, metilación y acetilación) promueven el acoplamiento de microtúbulos y la formación de la septa y del anillo contráctil de la levadura (39, 70). La disrupción de estos eventos podría implicar modificaciones en la repartición de los cromosomas, mayormente relacionados con la falla en la presencia de microtúbulos y la disociación tardía o temprana, o por otro lado, las modificaciones en la fuerza de tensión y establecimiento de la polaridad celular,

llevadas a cabo por los microtúbulos(44, 50) (**Figura 23**). En este caso, la LAPyspII podría encontrarse procesando algún componente clave en estos procesos.

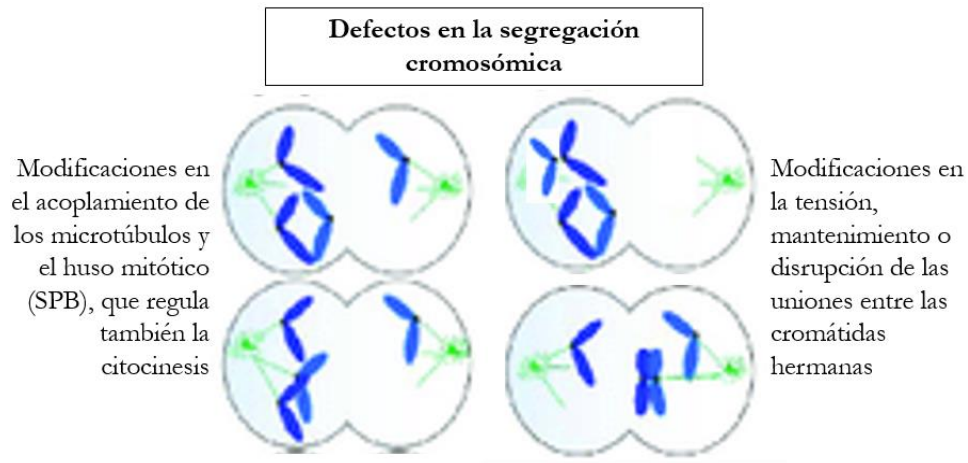


Figura 23. Defectos de la segregación cromosómica, que derivan en diferentes manifestaciones de la repartición del material genético. La falla en la acción de los microtúbulos, así como los defectos en la cohesión generan la repartición desigual de los cromosomas. Modificado de Encyclopædia Britannica, Inc.

Por otro lado, la activación de proteínas de meiosis, uno de los procesos de rescate de la levadura cuando se encuentra en situaciones de estrés y compromiso de la supervivencia, podría implicar la desregulación de diferentes sistemas de desarrollo de la levadura. La entrada a la división sexual, y a la formación de células diploides, involucra no solo proteínas del núcleo, sino toda la maquinaria celular para conservar lo más que sea posible la viabilidad. Uno de los factores de mayor impacto en el material genético, son las rupturas de ADN que suceden para la formación del quiasma (51, 71). Si la LAPyspII interacciona con alguno de los reguladores en presencia de estrés u hormonas sexuales, podría tener un papel estabilizador de estos procesos, y en presencia de agresores celulares, conservar la supervivencia (**Figura 24**).

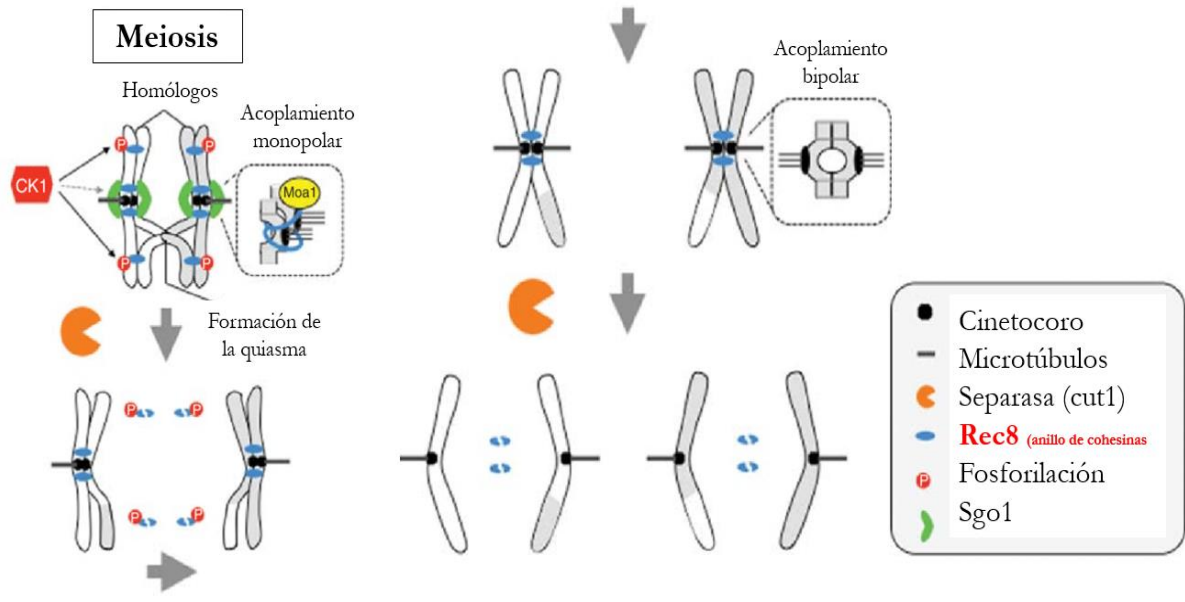


Figura 24. Establecimiento de la cohesión en la meiosis y su interacción con proteínas del cinetocoro. La fosforilación de las cohesinas define la ruptura de los complejos y la liberación de los cromosomas homólogos (72).

7.4. Producción de la proteína leucin aminopeptidasa yspII (LAPyspII) recombinante en el sistema de *Escherichia coli*.

Esta etapa del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la asesoría y colaboración del Dr. Víctor Manuel Luna Pineda.

Para la producción de la proteína heteróloga de *Schizosaccharomyces pombe*, se realizó un análisis “*in silico*” antes de la generación de la proteína recombinante para conocer su potencial antigénico para la producción de anticuerpos. Este análisis se encuentra detallado en la sección “Análisis bioinformático para la generación de la rLAPyspII”.

Debido a la implicación de esta enzima en las modificaciones fenotípicas referentes al ciclo celular presentes en la mutante, se ha propuesto la búsqueda de la LAPyspII mediante anticuerpos específicos anti-LAPyspII. Para ello se realizó la producción de la proteína recombinante en un modelo bacteriano de expresión *Escherichia coli*. Para ello, se utilizó la estrategia de clonación independiente de ligación (aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System, Thermo Scientific) para la posterior expresión y purificación. Este tipo de metodología permite la clonación de proteínas en un sistema de expresión de alto rendimiento, aumentando la eficiencia de la clonación. Esto se realiza bajo un proceso relativamente rápido, evitando los pasos de ligación tradicionales, y debido al diseño de los plásmidos pLATE, es posible generar proteínas con diferentes etiquetas para su posterior aplicación.

7.4.1. Clonación de la LAPyspII mediante la técnica de Clonación independiente de Ligación.

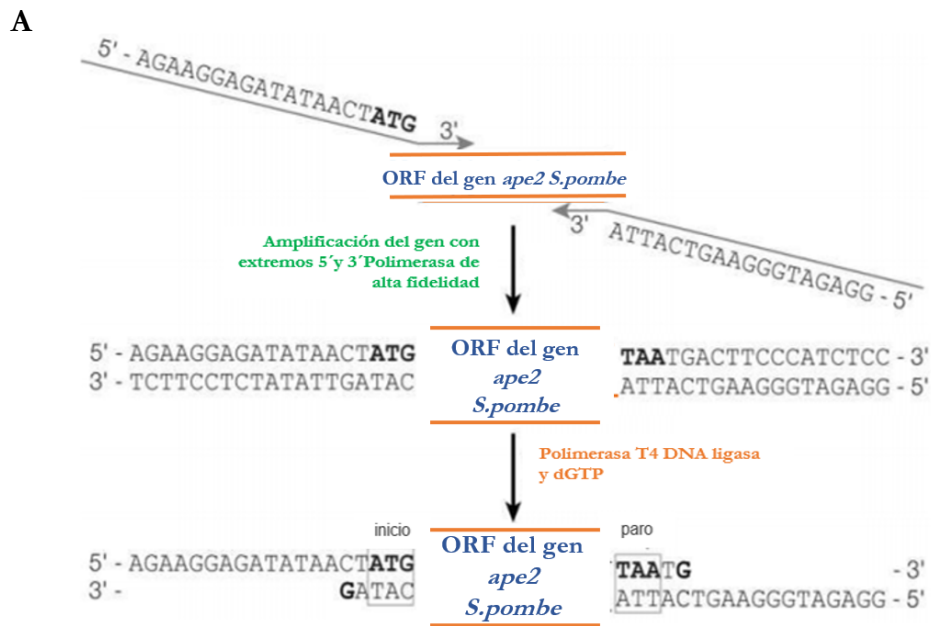
El fundamento para la generación del ORF del gen *ape2* de la LAPyspII con extremos para inserción al plásmido pLATE51 para la clonación se encuentra resumido en la **Figura 25A**. Para la primera etapa, se obtuvo el ORF para la LAPyspII con número de acceso >SPAC13A11.05 a través de la base de datos de NCBI, para el organismo *Schizosaccharomyces pombe*. A partir de la secuencia obtenida se generaron los oligonucleótidos de acuerdo a las especificaciones siguientes (**Tabla 10**): para incorporar la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína se toma en cuenta un extremo saliente de 18 pb (cursivas) incluido en el oligonucleótido sentido, complementado con 30 pb del extremo 5' del ORF del gen *ape2*, además de un sitio de corte para la enzima enterocinasa (subrayado) para remoción posterior de la etiqueta de histidinas después de la purificación; en el diseño del oligonucleótido antisentido se eliminó el codón de paro del ORF del gen *ape2* y se adicionaron 18

pb para generar los extremos salientes, los cuales ya incluyen la secuencia de paro (en negritas), se complementa con 29 pb correspondientes al extremo 3' del ORF de la LAPypII.

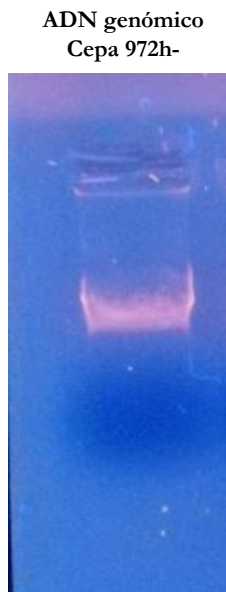
Tabla 10. Diseño de oligonucleótidos para la clonación independiente de ligación de la Leucin aminopeptidasa yspII de *S. pombe* en *Escherichia coli*.

SENTIDO			
5'-GGTGATGATGATGACAAGATGAAGGGTTTAGGTCTAAGTACGAGAACC-3'		T _m	Longitud
Extremo saliente Etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal Sitio de corte para la enzima enterocinasa	18 pb	65.1 °C	48 pb
Extremo 5' del ORF del gen <i>ape2</i>	30 pb		
ANTISENTIDO			
5'-GGAGATGGGAAGTCATTAATACTTGCGAGCGACTTCAATAATAGTGC-3'		T _m	Longitud
Extremo saliente Con codón de paro TTA	18 pb	66.2 °C	47 pb
Extremo 3' del ORF de la LAPypII	29 pb		

A partir de este diseño se llevó a cabo la amplificación del gen con extremos 5' y 3' de unión al plásmido denominado pLATE51. Para ello, se extrajo ADN genómico de la cepa nativa de *S. pombe* 972h- (**Figura 25B**), para posteriormente realizar la PCR con una polimerasa de alta fidelidad. Posteriormente se verificó el tamaño de fragmento generado y la aparición de productos inespecíficos. En la **Figura 25C** se observa el corrimiento electroforético de la amplificación del producto de PCR, donde se obtiene un solo amplicón de 1575 pb que corresponde al ORF del gen *ape2* (1539 pb) con la inserción de extremos 5' y 3' (36 pb) sin la formación de productos inespecíficos.



B



C

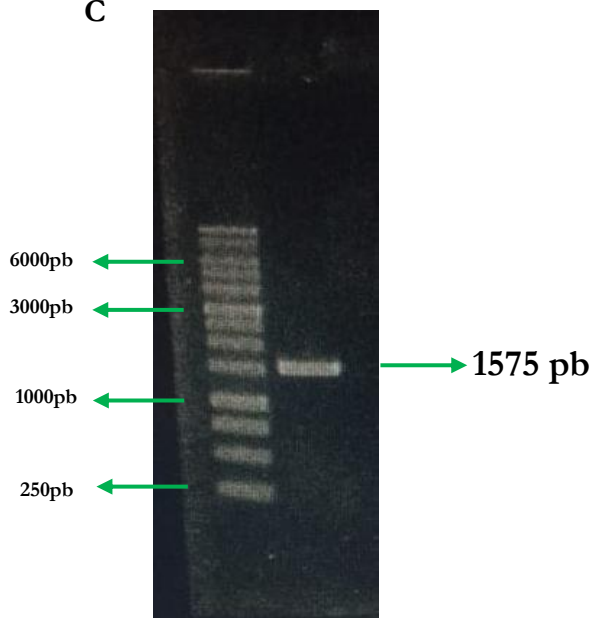


Figura 25. Generación del producto de PCR con el marco abierto de lectura (ORF) para el gen *ape2* de la leucín aminopeptidasa *yspII* de *Schizosaccharomyces pombe*. A) Esquema general del primer paso para la Clonación del gen *ape2* en el plásmido pLATE51, mediante la técnica de clonación independiente de ligación. B) Corrimiento electroforético del ADN genómico extraído de la cepa de *S. pombe* 972h. C) Corrimiento electroforético de la amplificación del ORF del gen *ape2* para la generación de extremos 5' y 3' de unión al plásmido.

Después de la verificación del fragmento de amplificación del inserto con la inserción de los extremos salientes para unión al plásmido, se prosiguió con la clonación en el plásmido denominado pLATE51,

este sistema permite la producción de proteínas con una etiqueta de histidinas (6xHis-Tag) en el extremo N-terminal y un sitio de corte para enterocinasas, el cual permite la remoción posterior de la cola de histidinas. La expresión bacteriana de la proteína se encuentra controlada por el promotor T7 del bacteriófago, así como operadores *lac* río abajo y arriba de dicho promotor, después de la inducción con el análogo de la lactosa IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), se comienza la transcripción de los genes bajo el promotor T7. Las características generales del plásmido se representan en la **Figura 26**.

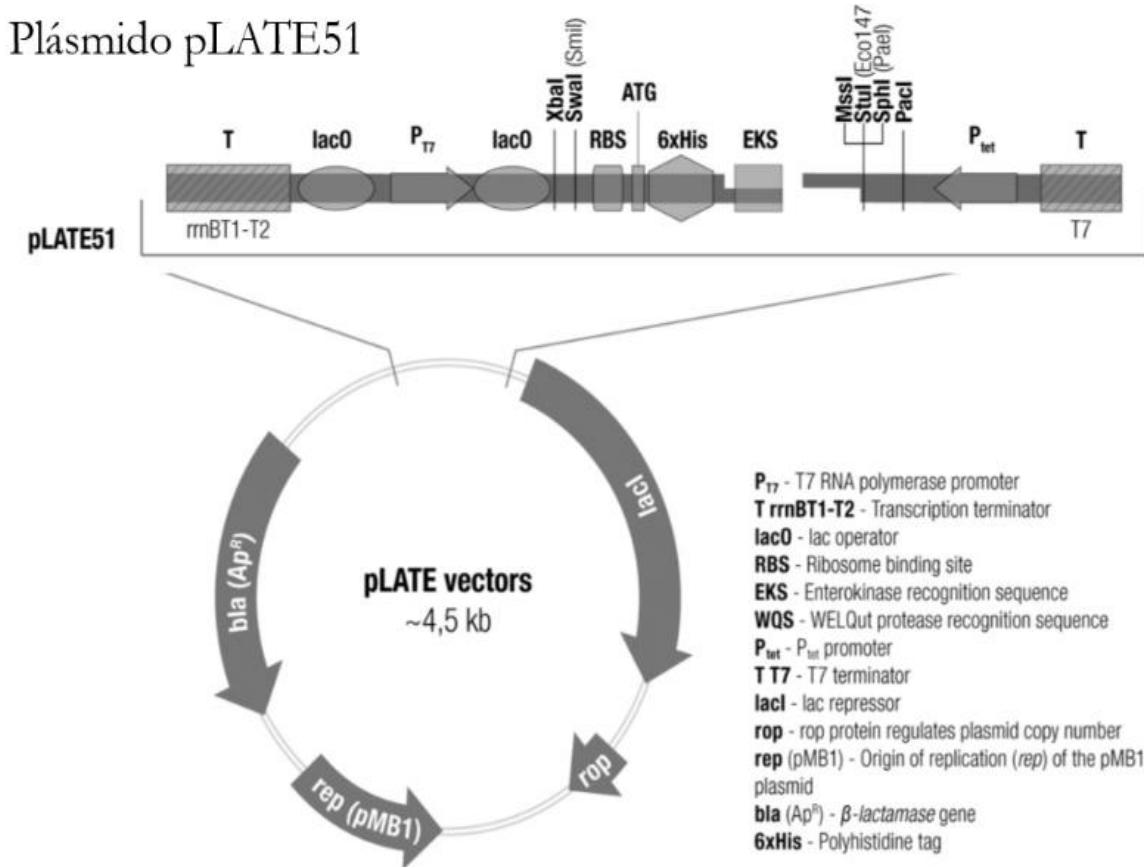


Figura 26. Sistema de expresión de proteínas recombinantes por Clonación Independiente de Ligación (aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System). Vector pLATE51 linealizado para la inserción de la cola de histidinas en el extremo N-terminal, con un sitio de corte para enterocinasas (EKS) con un promotor T7 bajo el control de un promotor *lacUV5* inducible por IPTG, y resistencia a ampicilina. En la reacción de alineamiento del vector pLATE51 con el inserto del ORF del gen *ape2* de la LAPyspII, se generan extremos cohesivos mediante una reacción LIC, que permite la circularización del plásmido, en la dirección deseada.

Para realizar la clonación en el plásmido pLATE, independiente de ligación, se generaron extremos cohesivos en el inserto mediante una reacción LIC de acuerdo con las especificaciones del fabricante (**Figura 27**).

Posteriormente se realizó la reacción de alineamiento con el vector pLATE51, esta reacción es usada directamente para la transformación de bacterias *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3).

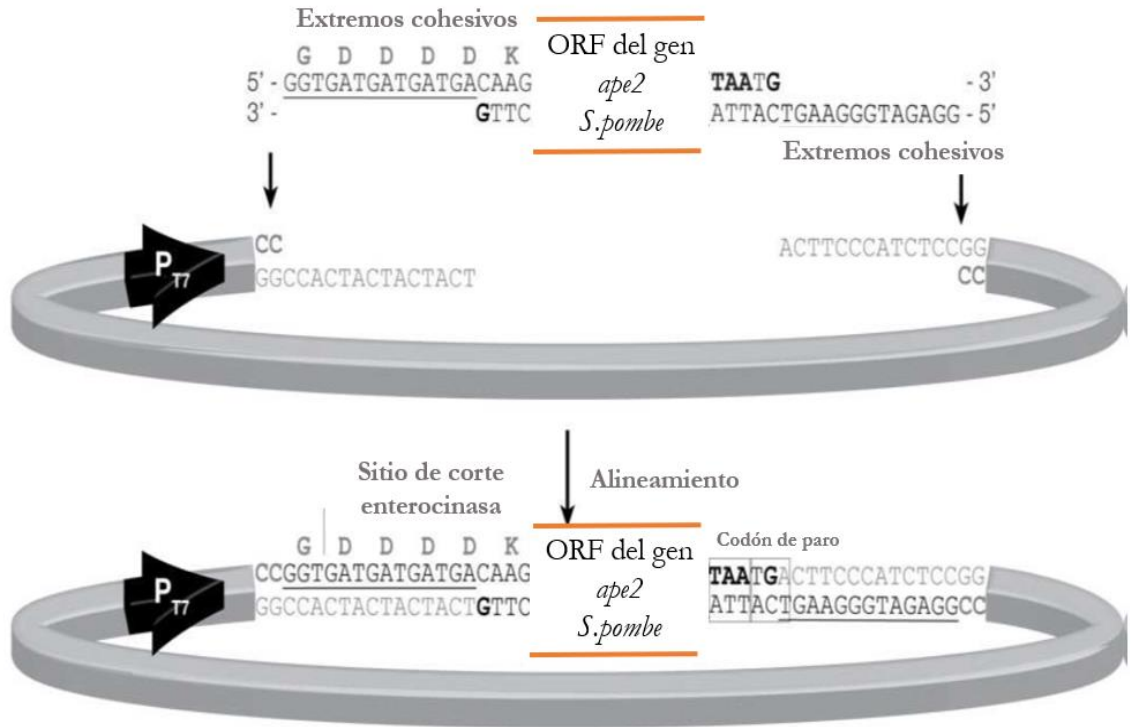


Figura 27. Reacción de alineamiento del vector pLATE51 con el inserto del ORF del gen *ape2* de la LAPyspII. Se generan extremos cohesivos mediante una reacción LIC.

7.4.2. Verificación de colonias resistentes a antibióticos con PCR en colonia.

Después de la transformación, se obtuvo crecimiento en dos placas, para hacer un total de 11 colonias con resistencia a ampicilina, de las cuales se consideraron 7 para realizar la verificación mediante PCR en colonia con iniciadores específicos del vector pLATE51 (~± 100 pb del inserto). En la **Figura 28** observamos que, de las colonias evaluadas, fue posible obtener dos cepas que fueron positivas para la presencia del plásmido pLATE51 con el inserto del ORF del gen *ape2* de la LAPyspII, con un amplicón de aproximadamente 1800 pb.

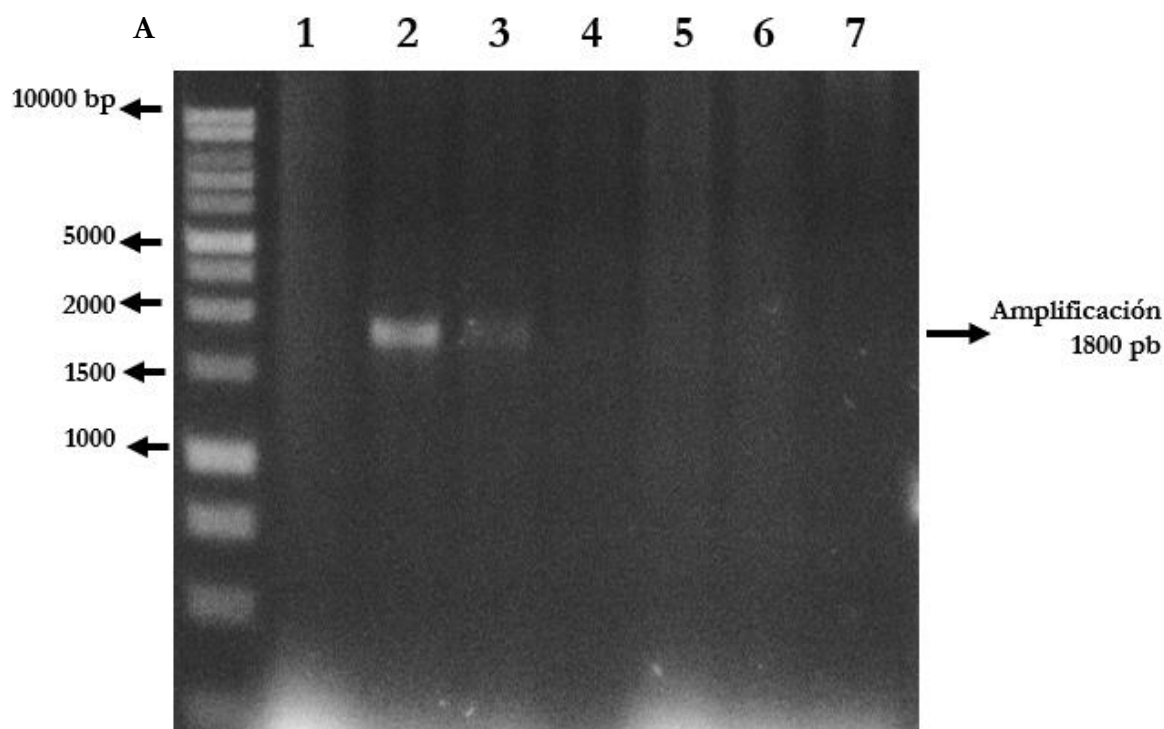


Figura 28. PCR en colonia de las posibles transformantes del plásmido pLATE1-LAPyspII. Un total de siete colonias fueron verificadas para la presencia del plásmido pLATE con el inserto correspondiente del ORF del gen *ape2* de la LAPyspII. En las clonas 2 y 3 se obtuvo un producto de amplificación de 1800 pb aproximadamente.

7.4.3. Purificación de la proteína LAPyspII en *Escherichia coli*.

Prueba de inducción y solubilidad.

Se llevaron a cabo pruebas para expresión a pequeña escala y así determinar las condiciones de crecimiento que influyen en los niveles de expresión y la solubilidad de la proteína de interés. La solubilidad de las proteínas marcadas con la etiqueta de histidinas-6X en el medio intracelular o extracelular influye en la cantidad de proteína obtenida y en las condiciones de purificación posteriores. La prueba de inducción y de solubilidad se realizaron de acuerdo con las especificaciones del protocolo The QIAexpressionist, Qiagen. La proteína de interés fue identificada tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble, posterior a la incubación con 1 mM de IPTG. Se obtiene una banda a la altura de 50 kDa aproximadamente en las muestras sometidas a inducción (**Figura 29**). Como control negativo, en las muestras no-inducidas no se observan bandas a la altura de 50 kDa.

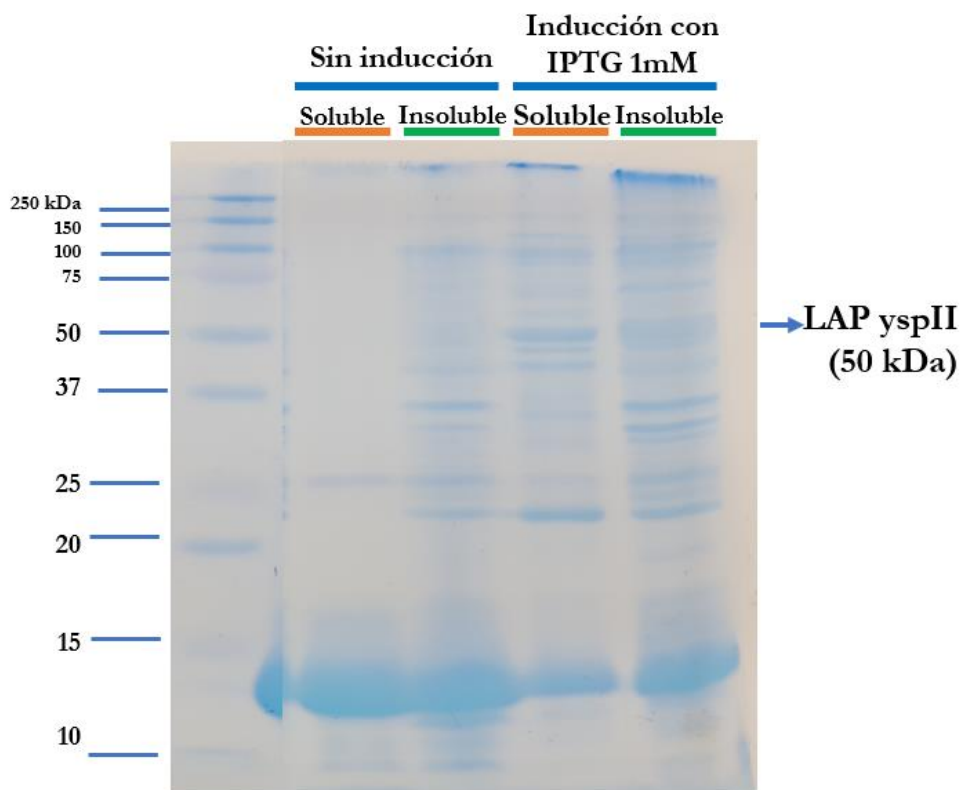


Figura 29. Pruebas de inducción y solubilidad para la cepa productora de LAP_{yspII}. Se obtuvo la fracción soluble e insoluble del cultivo de *Escherichia coli* BL21-pLATE51 LAP_{yspII} DE3 sin inducir e inducida con IPTG a 1 mM durante 5 horas. Los extractos proteicos fueron sometidos a análisis en PAGE-SDS, gel de poliacrilamida al 14% con tinción de azul de Coomassie.

Para verificar el nivel de expresión y la localización predominante de la proteína se realizó un ensayo de western blot con anticuerpos monoclonales anti-6X His tag como anticuerpo primario (**Figura 30**). Se identificó una banda tanto en la fracción soluble como en la insoluble después de la inducción con IPTG, lo que nos indica que la proteína se encuentra tanto en cuerpos de inclusión como en el sobrenadante. Debido a las características que mantiene la proteína, así como la cantidad presente en la fracción soluble, y evitando las condiciones desnaturizantes para el manejo de la proteína, se eligió ésta última fracción para continuar con la purificación.

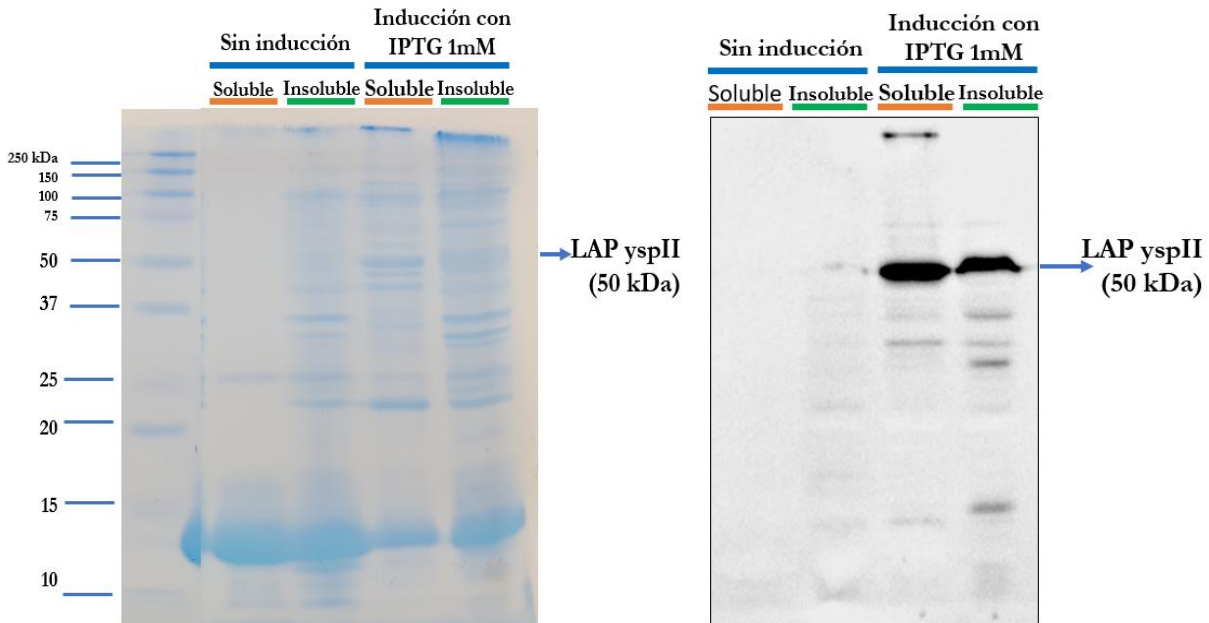


Figura 30. Western blot de la producción de la LAP yspII recombinante en *Escherichia coli* BL21-pLATE51 LAP yspII DE3, marcando con anticuerpo anti-6xHis. La proteína de interés se encuentra en la fracción soluble e insoluble.

7.4.4. Purificación de la LAP yspII recombinante por Cromatografía de Afinidad por inmovilización de iones (IMAC- NTA-Ni).

La cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) se lleva a cabo mediante una matriz de agarosa NTA-Ni (ácido nitrilotriacético, níquel) con alta capacidad de unión a la etiqueta de histidinas, presente en la proteína de interés. El ácido nitrilotriacético (NTA), es un quelante tetradentado el cual ocupa cuatro de los seis sitios de unión de ligandos en la esfera de coordinación del ion níquel, dejando dos sitios libres para interactuar con la etiqueta 6xHis-Tag presente en las proteínas recombinantes.

Se realizó un primer ensayo de purificación por IMAC a partir del extracto soluble de la lisis de las células inducidas. El solubilizado fue incubado con la resina de agarosa NTA-Ni para posteriormente llevar a cabo la purificación de acuerdo con el protocolo descrito en la metodología. Las proteínas fueron visualizadas en geles de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) revelando con tinción de azul de Coomassie (**Figura 31**).

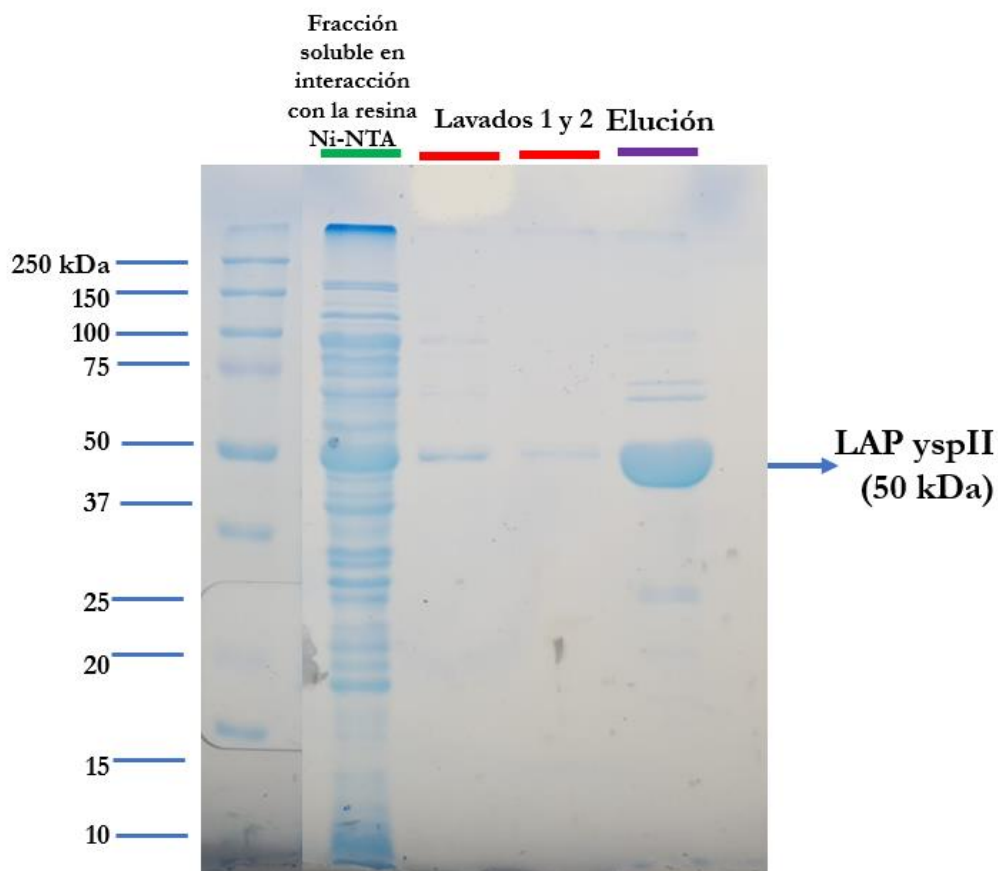


Figura 31. Etapas del perfil de elución de la purificación de la LAP_{yspII} recombinante con agarosa-NTA-Ni (IMAC). Análisis en PAGE-SDS, geles de poliacrilamida al 14% con tinción de azul de Coomassie. Se muestra una banda definida a 50 kDa en el carril de elución, correspondiente al monómero de la LAP_{yspII}.

7.4.5. Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) y eliminación de impurezas derivadas de la purificación.

El procedimiento ha sido desarrollado para aplicaciones de alto rendimiento donde se obtienen grandes cantidades de la proteína recombinante altamente pura, los cuales son aspectos deseables para aplicaciones como la cristalización de proteínas e inducción de producción de anticuerpos monoclonales. Este tipo de cromatografía automatizada nos permite eliminar proteínas contaminantes obtenidas en la purificación.

La aplicación de esta tecnología nos permitió la purificación, detección y análisis de nuestra proteína, la LAP_{yspII} recombinante, obtenida del cultivo celular de *E. coli* después de la inducción con IPTG. Generalmente, la elección de la columna pertinente se hace mediante alguna de sus propiedades

físicoquímicas, que permitan la separación de otras proteínas contaminantes. En este caso, se aprovechó la etiqueta de histidinas (6xHis-Tag) incluida en el diseño de la clonación, y que provee al proceso de ventajas significativas para la aplicación del FPLC: obtención de la proteína bajo condiciones nativas, baja posibilidad de modificación de la función o estructura de la proteína, bajo potencial inmunogénico de la etiqueta 6xHis-Tag en ratón y obtención de la proteína compatible con procesos posteriores a la purificación.

De acuerdo con las condiciones obtenidas en el punto 6.4.4., se siguió la estrategia separando los componentes del cultivo para trabajar con la fracción soluble. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación en paralelo bajo condiciones nativas, aplicando la cromatografía de afinidad por inmovilización de iones con columnas de Ni-NTA de superflujo. Se sometió a FLPC bajo diferentes concentraciones de imidazol, con la finalidad de mejorar las condiciones de elución y evitar la contaminación con otras proteínas afines a la resina.

La proteína fue purificada en dos pasos (5 y 250 mM de imidazol), los cuales sirvieron para determinar los límites externos de las condiciones para la purificación. Después de varios ensayos de purificación, se establecieron las concentraciones del gradiente de imidazol (0-200 mM). El seguimiento del proceso se llevó a cabo mediante la detección de las proteínas por medio de la cuantificación UV a 280 nm, los cuales arrojaron el cromatograma bajo el gradiente de imidazol, en un flujo de 0.5 mL/min (**Figura 32A**) y también el seguimiento mediante electroforesis de las purificaciones resultantes (**Figura 32B**). La pureza mediante ambos procedimientos -escalonado o en gradiente- es similar, aunque el rendimiento es algo mayor mediante la purificación por el gradiente de imidazol. Se observó que a 250 mM de imidazol se eliminan la mayoría de las proteínas no deseadas, por lo que es esta fracción la que se recupera para ser usada posteriormente en los ensayos de la producción de anticuerpos monoclonales. Debido a que la estabilidad y el rendimiento (6.2 mg/mL) no se comprometen por el método de gradiente de imidazol, se decidió conservar este método, y no utilizar otro paso cromatográfico de purificación intermedia.

Finalmente, la purificación mediante FLPC se estableció en cromatografía de afinidad por inmovilización de iones (IMAC-Ni-NTA) debido al diseño de la proteína, en un volumen inicial de medio de cultivo clarificado de 1 mL, la proteína se obtiene bajo concentraciones de imidazol de 250 mM, en un flujo de 0.5 mL/min.

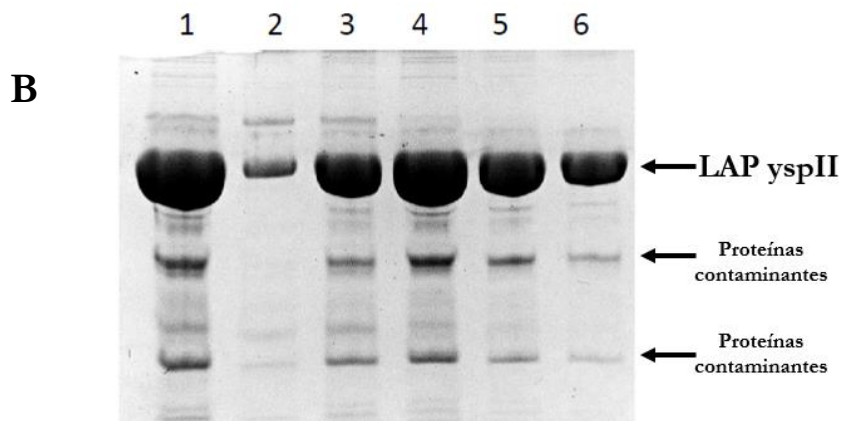
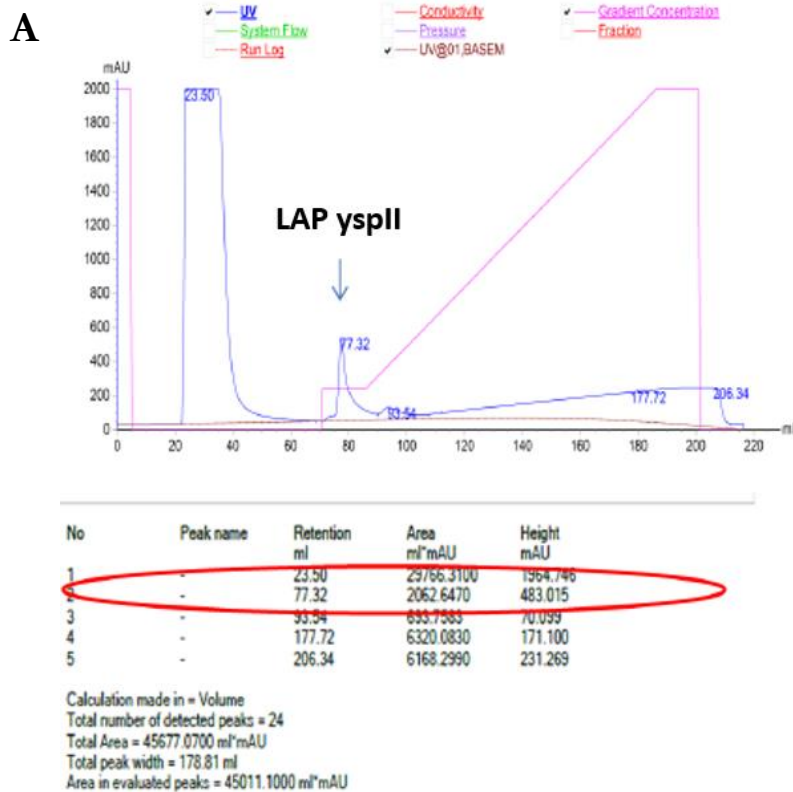


Figura 32. Purificación de la proteína LAP_{yspII} por FPLC . Columnas de agarosa-NTA-Ni de superflujó. A) Cromatograma obtenido mediante FPLC utilizando un detector UV-visible a longitud de onda de 280 nm. El flujo fue de 0.5 mL/min. B) PAGE-SDS con tinción de azul de Coomassie de las fracciones obtenidas en el flujo escalonado y continuo de imidazol: carril 1 y 2, purificación a 5 y 250 mM de imidazol respectivamente; carril 3 al 6: muestras de fracciones en gradiente de imidazol (0-200mM).

7.5. Producción de anticuerpos monoclonales contra la leucin aminopeptidasa yspII recombinante de *Schizosaccharomyces pombe*.

La obtención de anticuerpos que reconozcan específicamente a la proteína en cuestión es de gran importancia para determinar la localización celular en diferentes procesos de la levadura. Se ha decidido la producción de anticuerpos monoclonales a través del protocolo de obtención de hibridomas (Kohler y Milstein,1997) (62).

7.5.1. Análisis bioinformático para la generación de la rLAPyspII.

Uno de los aspectos más importantes para la generación de anticuerpos contra una proteína específica, es conocer la respuesta que se podría producir en el modelo animal para llevar a cabo la estimulación del sistema inmune. Por ello, se realizó un análisis “*in silico*” de la LAPyspII heteróloga de *Schizosaccharomyces pombe*, para conocer las predicciones de antigenicidad de la proteína recombinante para la producción de anticuerpos. Así mismo, debido a la naturaleza proteolítica de la LAPyspII, queríamos conocer las regiones más inmunogénicas de la estructura y si de acuerdo con estas características era necesario conservar toda la estructura de la proteína recombinante, o si podíamos tomar en cuenta alguna región en particular, esto con la finalidad de beneficiar la producción de anticuerpos ya sea policlonales o monoclonales. Igualmente, era importante considerar primordialmente la estructura del sitio catalítico.

La predicción comienza con el análisis de la secuencia de la proteína para determinar los epítomos disponibles. El producto génico de la LAPyspII con el código de acceso NP_592993.1, se examinó mediante la herramienta de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para identificar otras proteínas que por su secuencia podría presentar homología con la LAPyspII, en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. En las regiones del extremo N-terminal (1-210 a.a.), la parte central de la proteína (210-420 a.a.), el extremo C-terminal (350-513 a.a.) y la proteína completa (513 a.a), se obtuvo el reconocimiento de acuerdo a su secuencia aminoacídica, encontrándose en la región N-terminal una proteína putativa denominada PH2 PH, que compartía 11 aminoácidos con la LAPyspII (E-value 4.9) (**Tabla 11**). Debido a que esta coincidencia no se encuentra localizada en el sitio catalítico de la proteína, y su valor de E-value es alto, no se tomó como una proteína de importancia que interfiriera con el reconocimiento de los anticuerpos ya sea policlonales o monoclonales teóricos.

Tabla 11. Análisis de BLAST para el reconocimiento de proteínas homólogas de la LAPyspII de *S. pombe*.

Organismo: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Región	Longitud (a.a.)	Dominios conservados de la secuencia	Notas
Proteína completa	-	513	Peptidase M17 superfamily	-
Extremo N-terminal	N-terminal	210	Peptidase M17 superfamily	PH2 PH fungal
Entre N-terminal y C-terminal	Central	210-420	Peptidase M17 superfamily	-
Extremo C-terminal	C-terminal	350-513	Peptidase M17 superfamily	-

De esta manera, se procedió a realizar la predicción de la respuesta inmune para la producción de anticuerpos, tomando en cuenta la secuencia aminoacídica completa de la LAPyspII. Mediante la base de datos Immune Epitope Database (IEDB) (<http://tools.iedb.org/main/>) se hizo el análisis de la proteína, el cual arrojó péptidos inmunogénicos bajo diferentes parámetros: predicción de giros beta (73), accesibilidad superficial (74), escala de antigenicidad (75) y la predicción de regiones hidrofílicas (76).

En la **Tabla 12** se muestran los detalles de las regiones con predisposición antigénica y en la **Figura 33** se observa una representación de los sitios lineales antigénicos distribuidos en toda la proteína, los cuales se encuentran homogéneos en toda la secuencia.

Tabla 12. Resumen de las regiones con predisposición antigénica, bajo el método de Bepipred-1.0 del IEDB (umbral de 0.350)

Bepipred Linear Epitope Prediction Results			
Inicio	Término	Secuencia	Longitud
282	299	VTFDSGGISIKPSQNMKE	18
333	345	TENLPSGSAAKPG	13
86	97	NVSEKSVRSAAA	12
171	182	TSEKKTATAEEN	12
154	162	LFTSPAPER	9
265	273	GKEKSKDDG	9

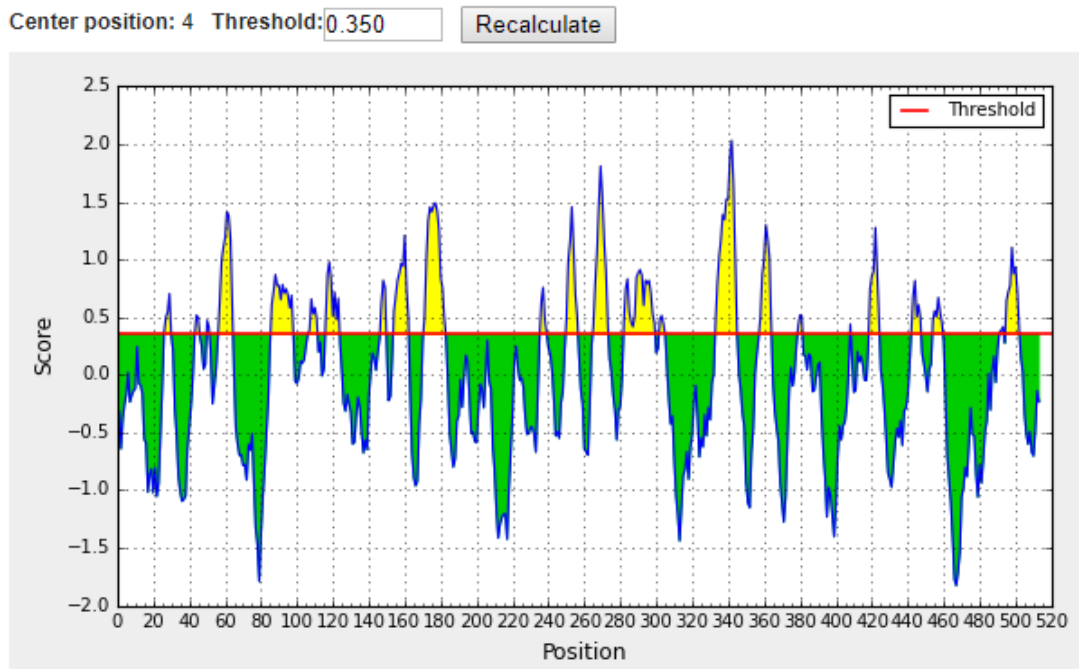


Figura 33. Representación gráfica de las regiones con predisposición antigénica, bajo el método de Bepipred-1.0 del IEDB (umbral de 0.350)

En el análisis para la determinación de giros beta, se obtuvo un péptido determinando una ventana de 10 aminoácidos de la posición 285 a 294 correspondiente a la secuencia DSGGISIKPS, el cual coincide con la secuencia de la predicción de epítomos lineales VTFDSGGISIKPSQNMKE de 18 aminoácidos de longitud. En el análisis de accesibilidad se encontró un péptido, mediante una ventana de 10 aminoácidos, YIGKEKSKDD entre las posiciones 263 y 272, que presenta consistencia en la generación de epítomos lineales.

Al reconocer las secuencias que presentaba la secuencia aminoacídica en los principales parámetros de la base de datos IEDB, se tomaron en cuenta los siguientes péptidos para realizar la validación, y que en conjunto presentan una predicción de los determinantes antigénicos que pudieran intervenir en la producción de anticuerpos. Se organizaron de acuerdo con la región donde se encuentran los péptidos a lo largo de la estructura de la proteína (**Tabla 13**), subrayados se muestran los aminoácidos importantes en la actividad inmunogénica. Así mismo, se muestran los resultados de la validación de los péptidos con valores cercanos o mayores a uno (**Tabla 14**).

Tabla 13. Región comparativa para epítomos de la LAPyspII, involucrados en la producción de anticuerpos.

ID-longitud	Aminoácidos 265-273 264-272 264-270	Aminoácidos 282-299	Aminoácidos 333-345
LAPyspII mAbs-18		VTFDSSGGISIKP <u>S</u> QNMKE	
LAPyspII mAbs-8	KEK <u>S</u> KDDG		
LAPyspII mAbs-10	YIGK <u>E</u> KSKDD		
LAPyspII mAbs-7	IGK <u>E</u> KSK		
LAPyspII mAbs-13			TENLPSG <u>S</u> AAKPG

Tabla 14. Validación de la predisposición antigénica de las secuencias de aminoácidos de la LAPyspII de *S. pombe*.

	Chou & Fasman Giros beta	Emini Accesibilidad superficial	Karplus & Schulz Flexibilidad	Kolaskar & Tongaonkar Antigenicidad	Parker Hidrofobicidad
VTFDSSGGISIKP <u>S</u> QNMKE	1.153	0.407	1.052	1.001	2.886
KEK <u>S</u> KDDG	1.16	1.297	1.101	0.912	7.343
YIGK <u>E</u> KSKDD	1.051	0.422	1.055	0.987	3.071
IGK <u>E</u> KSK	1.033	0.519	0.02	0.954	4.157
TENLPSG <u>S</u> AAKPG	1.194	1.7	1.055	0.962	3.586

7.5.2. Producción de anticuerpos monoclonales contra la leucin aminopeptidasa de yspII de *Schizosaccharomyces pombe* a partir del método de hibridomas.

Esta etapa del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE) bajo la asesoría de la QFB. Olga Mata Ruiz y la M.C. Yolanda Medina Flores.

7.5.2.1. Inmunización y fusión mediante polietilenglicol.

Los ratones fueron inmunizados inicialmente con un panel conjugado de antígeno preparado en adyuvante completo de Freund para potenciar el efecto inmunogénico de la administración. Mediante el método de inmunoensayo de ELISA anteriormente descrito, se evaluaron en grupos de tres ratones para medir la producción de anticuerpos policlonales presentes en el suero de cada animal, lo cual es un indicativo de la inducción de las células B para el reconocimiento de diferentes epítomos

del antígeno. Así, diferentes clonas de estas células producen una mezcla de inmunoglobulinas contra la LAPyspII recombinante.

Las diluciones de suero de ratón utilizadas fueron 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 y 1:32000., usando el suero del estado preinmunizado como control, para el reconocimiento del aumento del título de anticuerpos policlonales presentes en el suero. El título se describió como la dilución de suero inmunizado que da una respuesta mayor que el control a partir de 1:1000. Para este caso los títulos para los animales fueron Cabeza dilución 1:4000 y Lomo dilución 1:8000. La especificidad de la respuesta de los anticuerpos en los ratones que reciben la inyección del antígeno LAPyspII recombinante, muestran un marcado aumento en el título en comparación con los estados preinmunes (Figura 34).

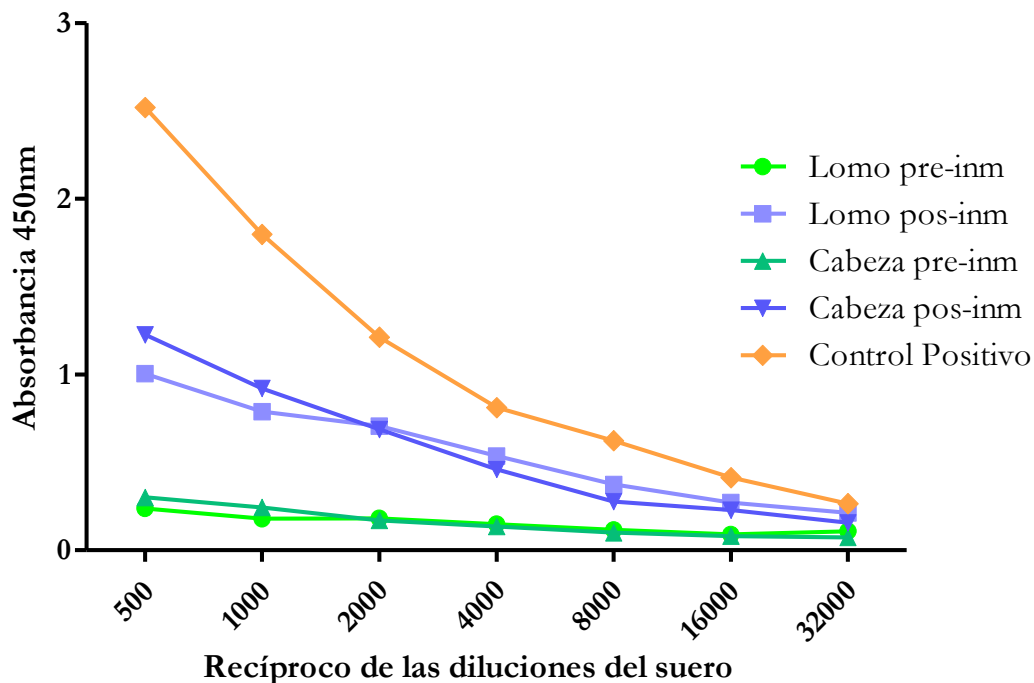


Figura 34. Títulos de anticuerpos específicos después de la inmunización de ratones BALB/c con el antígeno LAPyspII recombinante. Los individuos fueron evaluados para conocer el aumento en el título, con respecto al estado pre-inmune control (estado no estimulado con la inyección del antígeno). El control positivo es una dilución de anticuerpos anti-ratón (cabra anti-IgG/A/M de ratón).

Los sueros de los animales con títulos mayores a 1:1000 fueron conservados para su posterior uso en el desarrollo de inmunoensayos para posterior estandarización del ensayo de ELISA, el seguimiento de la fusión de los hibridomas y la subclonación.

En la selección de los ratones inmunizados y optimización de las determinaciones realizadas por ELISA, se consideraron los sueros obtenidos de la inmunización a los entre los 14 y 28 días de la estimulación por el antígeno LAP-ypII recombinante. Se realizó una comparación entre las densidades ópticas de los estados preinmune donde los ratones aún no han sido retados, y el estado postinmune donde se espera que presenten una respuesta a la inducción (**Figura 35**). En este tipo de análisis, fue posible identificar a los ratones que podrían presentar una reacción cruzada en el momento del ensayo de ELISA. Esto es de gran importancia, ya que impacta directamente a las estimulaciones posteriores a la disminución de falsos positivos en los análisis de ELISA. Se aprecia que el ratón Lomo de esta partida de inmunización, rebasa la absorbancia de una unidad en el estado preinmune, lo cual podría representar una sobreestimulación basal, con reacción cruzada. Por otro lado, tenemos al ratón Cabeza, el cual no supera el umbral de $D.O.492=1$, por lo que se considera que este ratón carece de anticuerpos inespecíficos, que podrían reconocer a la LAPypII en el estado previo a la inmunización.

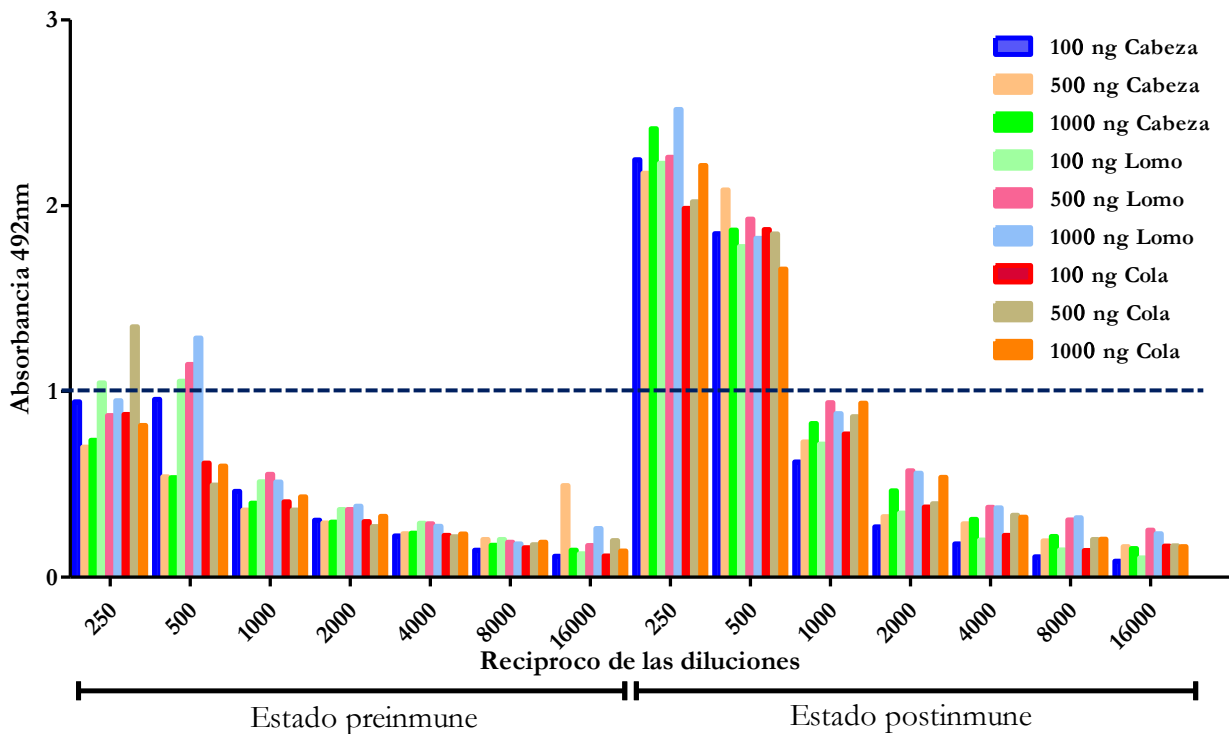


Figura 35. Primera evaluación de respuesta de anticuerpos IgG policlonales en ratones inmunizados con la proteína LAPypII. Tres ratones BALB/c fueron inmunizados vía intraperitoneal, de los cuales se obtuvieron los sueros entre los 14 y 28 días de la inmunización. Se realizaron diluciones tanto de los sueros preinmune como de los sueros postinmune y se probaron diferentes concentraciones de proteína recombinante LAPypII. Los datos muestran los valores de IgG evaluados por ELISA indirecto y expresados en densidad óptica a 492nm.

Esta determinación se realiza a diferentes concentraciones del antígeno, esto para conocer la eficiencia de reconocimiento de ELISA, y si existe diferencia entre la cantidad utilizada para los ensayos posteriores. Se observa que, a 100 ng de concentración de antígeno, existe el reconocimiento por los sueros policlonales extraídos de los individuos estimulados (**Figura 36**). En el caso del ratón que presentaba señal de fondo en el estado preinmune (Lomo), las diferencias en las diluciones de anticuerpos (1:250 y 1:500) no son significativas en el estado postinmune. Esto implica que la reacción tiene una probabilidad alta de saturación del ensayo de ELISA, debida a la inespecificidad de reconocimiento, la señal generada no es representativa de la interacción con el antígeno de interés. Debido a esta respuesta, este individuo quedo descartado para seguir con los procedimientos posteriores.

Por otro lado, bajo las mismas condiciones, el ratón Cabeza, presentó una absorbancia baja (<1 UA) en el estado preinmune, aumentando así después de la inmunización. Cuando se evaluaron las dos diluciones de anticuerpos, se observan diferencias entre ellas, indicando que las reacciones con 100 ng de antígeno, no se saturan ni se bloquean, por lo que ofrecen un rango dinámico de cuantificación a esta concentración, en presencia de los anticuerpos policlonales y para la subsecuente evaluación de las clonas producidas por el método de hibridoma.

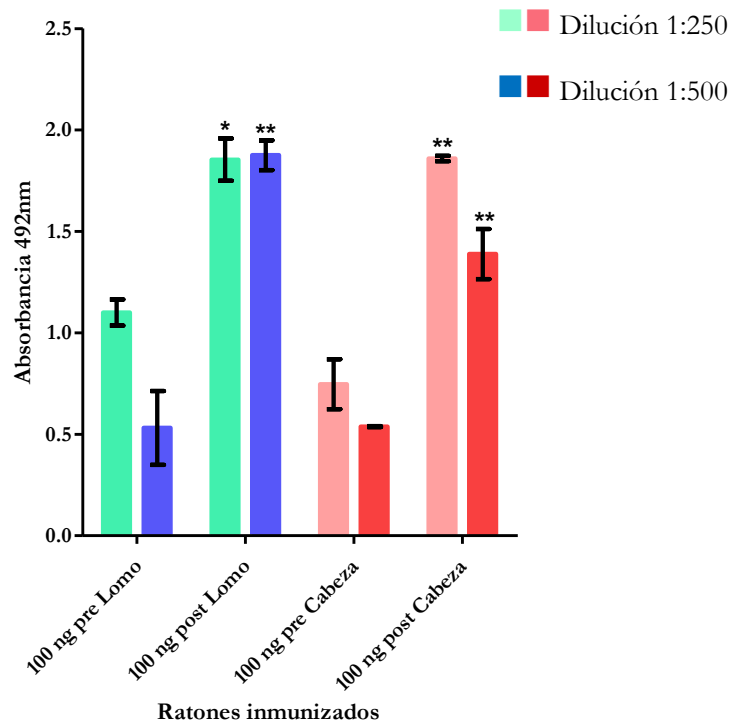


Figura 36. Análisis de la producción de anticuerpos en ratones Lomo y Cabeza en una partida de inmunización. Se realizó la cuantificación de las diluciones de suero (ejemplo 1:250 y 1:500) de los ratones

inmunizados en interacción con 100 ng de la proteína recombinante LAPyspII. el ratón. Se hizo la comparación entre el estado preinmune y postinmune. Las barras de error representan el SEM. Análisis por t de Student comparando el estado preinmune con el postinmune para cada dilución: $P < 0.01 \rightarrow **$, $P < 0.05 \rightarrow *$, $ns \rightarrow$ no significativo.

A pesar de que las inmunizaciones se realizan en condiciones controladas y los ratones utilizados comparten características para realizar el ensayo de manera reproducible, es inevitable no tomar en cuenta la variabilidad biológica inherente de cada proceso. El hecho de que los sujetos inmunizados presenten reacciones cruzadas o inespecíficas puede deberse a un fondo genético que condicione la respuesta o la inducción indirecta de tolerancia inmunológica (77).

Debido a que el monitoreo continuo de la inmunización, la fusión y el mantenimiento del hibridoma son procesos de varios pasos, los cuales consumen grandes cantidades de recursos y de tiempo, es necesario la optimización y seguimiento estricto de la inducción de la respuesta inmune.

De acuerdo con esta evidencia, fue posible elegir a los candidatos para la esplenectomía y la posterior generación del hibridoma. La asociación de las células del bazo con las líneas celulares de mieloma, darán como resultado clonas estables que producen anticuerpos monoclonales, capaces de reconocer un solo epítipo del antígeno (LAPyspII recombinante) haciendo esta interacción altamente específica, y que nos permitirá localizar a la leucin aminopeptidasa yspII en el contexto biológico de la levadura de *Schizosaccharomyces pombe*.

Después de la determinación de la respuesta al antígeno en los animales, se sacrificaron para obtener el bazo y llevar a cabo la fusión utilizando polietilenglicol. La línea celular de mieloma X63-Ag8.653 fue mantenida bajo condiciones de cultivo en medio DMEM, hasta que alcanzó la confluencia del 70%, para la fusión adecuada con las células de bazo de ratón. La técnica introducida por Kohler y Milstein, empleó el sistema de selección HAT descrito por Littlefield (1964) (62). Las células de mieloma que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforil transferasa (HGPRT) son incapaces de proliferar en presencia de medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). La aminopterina bloquea la biosíntesis de *novio* de las purinas y pirimidinas requeridas para la síntesis de ADN, y por lo tanto, las líneas celulares son incapaces de utilizar las vías de recuperación para la síntesis de ADN, ya que no poseen los sistemas enzimáticos necesarios(78).

Por otro lado, los esplenocitos contienen la enzima funcional HGPRT, pero son incapaces de proliferar en condiciones de cultivo y naturalmente mueren. En este contexto, el medio HAT funciona como un medio "semiselectivo", solo sobrevivirán las células que posean ambos atributos: la estabilidad de la

línea celular y el dote enzimático HGPRT, para llevar a cabo los procesos biosintéticos vitales de producción de ADN. Para ello, es necesario lograr la fusión entre ambas células. Los productos de fusión de esplenocitos y mieloma (hibridomas) que llevan la enzima funcional HGPRT, son capaces de proliferar en el medio HAT. Uno de los principales agentes formadores de fusiones es el polietilenglicol, una cera polivinílica que promueve la fusión celular y la transferencia de núcleos (79). Es así, que después de la recuperación del bazo del animal evaluado después de la estimulación con el antígeno LAPyspII recombinante, se realizó la fusión con las células de mieloma X63-Ag8.653, las cuales se monitorearon durante 12 días para observar la morfología celular y el posible establecimiento de la fusión.

En la **Figura 37** se muestra la morfología de las células, observando la evolución de las probables fusiones. Hay que recordar que la eficiencia de fusión, la cual se refiere al número de fusiones que se pueden obtener después de la hibridación, debe ser superior al 70% ya que solo un bajo porcentaje de esas fusiones serán dirigidas a la producción de anticuerpos para nuestra LAPyspII recombinante.

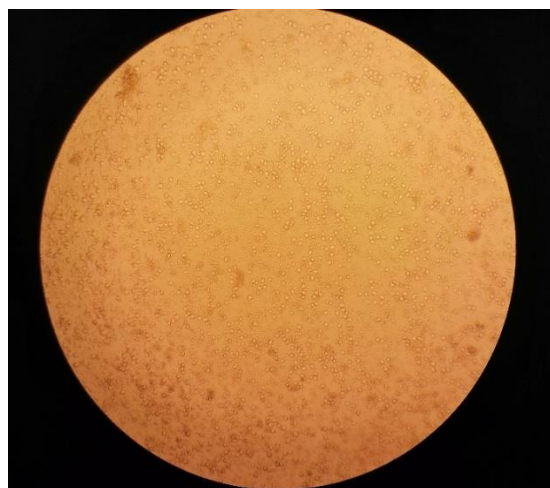


Figura 37. Fusión de células de bazo de ratones inmunizados con LAPyspII recombinante y línea celular de mieloma X63-Ag8.653 en medio de selección HAT. En el día uno se realizó el cultivo de las células resultantes de la fusión entre esplenocitos y células inmortalizadas de mieloma. El seguimiento de la morfología celular y el mantenimiento se realizó durante 12 días, cambiando el medio de cultivo cada 3 días. Visualizado en microscopio óptico invertido, 10X.

Observando la presencia de pequeñas agrupaciones celulares, concentradas en diferentes puntos del campo de observación, es posible determinar la eficiencia de fusión en diferentes momentos del crecimiento celular. En la **Figura 38** observamos que a partir del día 10 hasta el día 12, es posible establecer una eficiencia mayor al 70%, que es un parámetro deseable para proseguir con la clonación y subclonación.

Generalmente, el proceso de fusión se realiza hasta dos ocasiones con diferentes animales inmunizados que hayan respondido positivamente en la generación de anticuerpos. Esto para aumentar la posibilidad de obtención de clonas productoras tanto para epítomos lineales y conformacionales, lo cual será evaluado posteriormente en la caracterización de los anticuerpos. En nuestro caso, se realizaron dos partidas de fusión, debido a que en el primer evento las células no prosperaron, ni proliferaron, además de que las absorbancias a 492 nm se mantenían menores a uno. En el segundo evento se continuó con el mantenimiento de los cultivos, ya que paralelamente, se revisan continuamente para identificar posibles contaminaciones (por bacterias como *Mycoplasma sp.*) y la selección mediante el medio HAT de los posibles hibridomas.

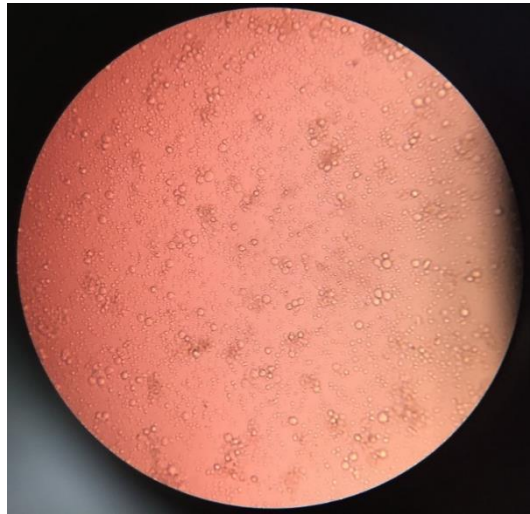


Figura 38. Seguimiento de la eficiencia de fusión del hibridoma productor de anticuerpos monoclonales. Entre el día 10 y 12 ya se observan pequeñas agrupaciones de las posibles fusiones productoras de anticuerpos. El reconocimiento de pequeños grupos celulares es indicativo de la formación de un híbrido de células de esplenocitos y de mieloma. Visualizado en microscopio óptico invertido, 20X.

7.5.2.2. Subclonación y expansión de hibridomas productores de anticuerpos.

Entre el día 12 y 15, después de establecer una eficiencia de fusión de por lo menos el 70%, las células que han sobrevivido a la selección son utilizadas para el siguiente proceso de clonación mediante diluciones seriadas. Los sobrenadantes de cada uno de los pozos de la placa del cultivo celular son sometidos a un inmunoensayo por ELISA (descrito en la metodología), contra la proteína recombinante, junto con sus controles positivos y negativos, esto con el objetivo de identificar la presencia de células productoras de anticuerpos anti-LAPyspII recombinante. Las absorbancias más elevadas detectadas por el inmunoensayo se toman en cuenta para llevar a cabo la clonación.

En la **Figura 39**, se muestra un concentrado de algunos de los valores de absorbancia obtenidos al evaluar los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma al día 15 (primera evaluación), donde la densidad óptica en este momento del crecimiento aún se considera baja; y después de 10 días de mantenimiento (segunda evaluación) donde ya se observa un incremento en los valores de absorbancia. Aquellos pozos que presentaron la mayor densidad óptica (>0.15) fueron los candidatos para realizar la clonación mediante el método de diluciones seriadas.

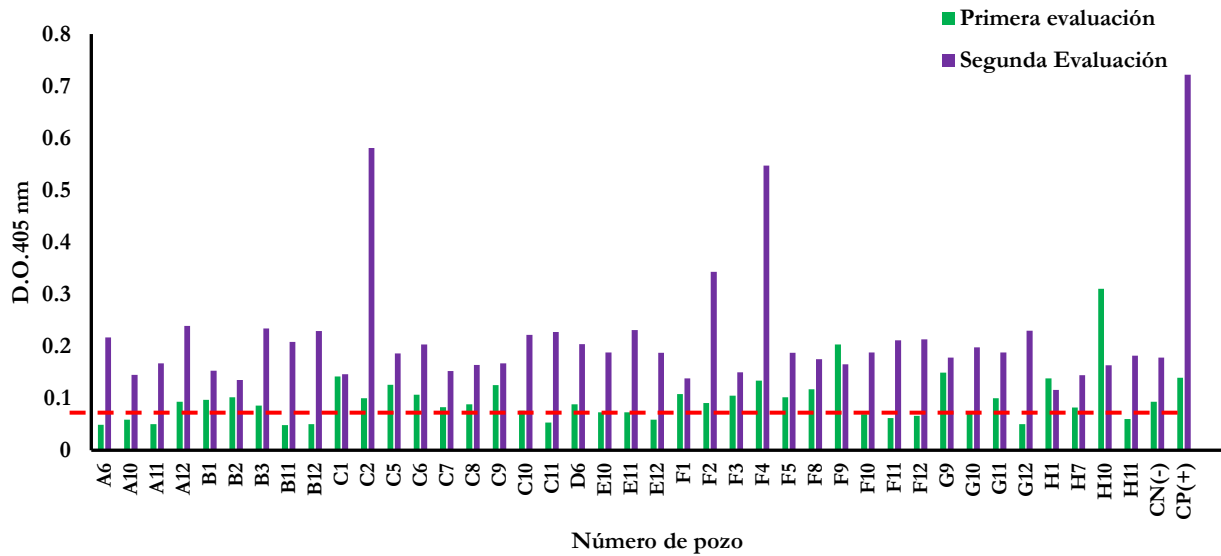


Figura 39. Ensayo de ELISA para la detección de hibridomas productores de anticuerpos anti-LAPspII recombinante. Se presentan algunos valores de absorbancia de los pozos con posible presencia de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales CN(-): control negativo, CP(+) control positivo.

Igualmente, cada uno de los pozos fue evaluado morfológicamente, identificando la formación de pequeñas colonias de fusiones, bien definidas, aisladas, con células pequeñas, que representan a poblaciones homogéneas de clonas productoras de anticuerpos monoclonales. En la **Figura 40** se muestra la evolución morfológica de uno de los pozos.

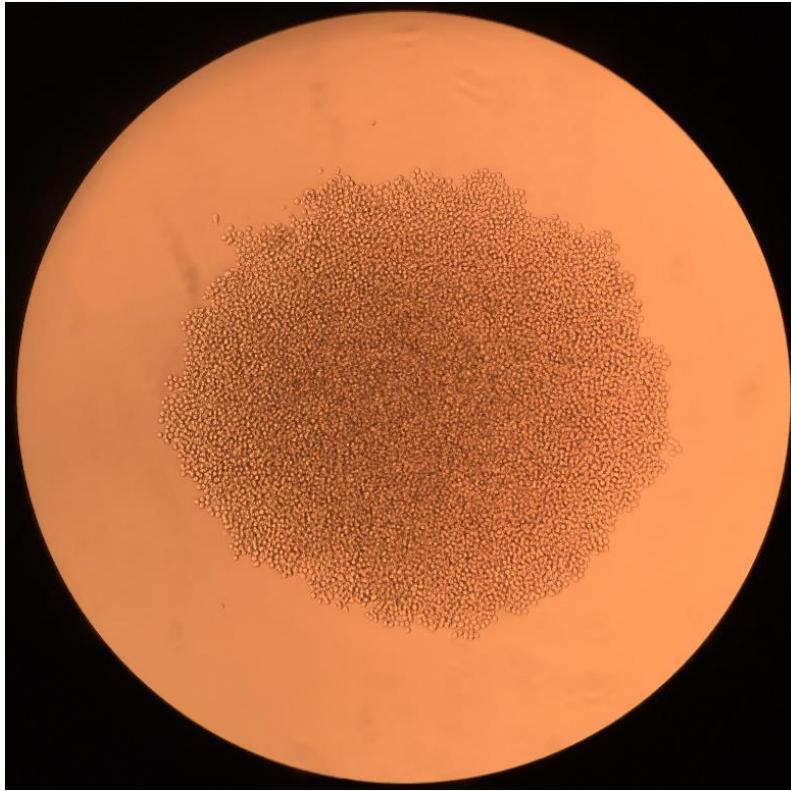


Figura 40. Ejemplo de reconocimiento morfológico de los hibridomas para clonación. Las células de hibridoma producidas en placas de cultivo de 96 pozos son evaluadas para la formación de agrupaciones numerosas de células, las cuales representan un hibridoma que mantiene relativa estabilidad. Estas son evaluadas mediante técnicas de inmunoensayo y son capaces de sobrevivir a la selección mediante medio HAT, en el periodo determinado de clonación y subclonación. Visualizado en microscopio óptico invertido, 10X.

Las diluciones del cultivo de células de cada candidato productor de anticuerpos monoclonales se evaluaron nuevamente por ELISA, dos ocasiones más. En la **Figura 41** se muestra que en la segunda evaluación vemos un aumento en la absorbancia en algunas de las clonas seleccionadas (5C10, 4C10, 5D10), estas se convierten en potenciales hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. En otras vemos disminución (1H8, 2A5, 3B5), indicando que no ha permanecido la interacción entre el antígeno y los posibles anticuerpos. Esta reacción implica que los hibridomas no poseían la estabilidad suficiente, y por lo tanto su capacidad secretora de inmunoglobulinas es mínima. Sin embargo, con fines de conservación, estas células son resguardadas en caso de baja tasa de producción de híbridos positivos.

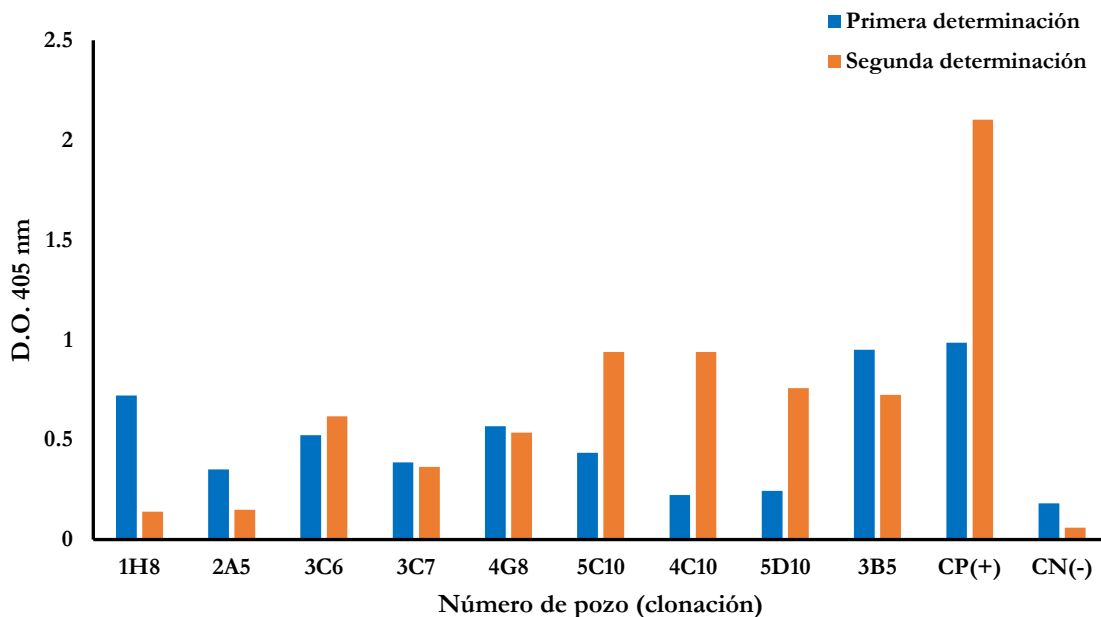


Figura 41. Ejemplo de evaluación de subclonas productoras de anticuerpos monoclonales.

Inmunoensayo de ELISA. La selección de los híbridos en medio HAT continuó, con lo cual fue posible seleccionar solo aquellos que fueron estables y que continuaron produciendo anticuerpos que reconocen a la LAPypII recombinante. Esquematización del primer proceso de subclonación.

La subclonación se realizó tres veces más, en las mismas condiciones bajo el método de diluciones limitantes para obtener una densidad celular de 0.9 células/pozo. En estas clonas, se consideró el aumento de densidad óptica y la formación de una sola colonia de células, lo más homogénea posible.

Después de realizar el seguimiento de la densidad óptica en la resiembra de diferentes clonas positivas detectadas ELISA, se determinó la presencia de hibridomas estables, eligiéndolos de acuerdo con el crecimiento en placas de cultivo de 6 pozos, donde fue posible la apreciación de una sola clona. El porcentaje de crecimiento mayor al 30% se registró en cuatro de las clonas elegidas para la expansión, las cuales fueron evaluadas nuevamente mediante inmunoensayo de ELISA. El escaneo de las clonas aportó las siguientes cuatro 3C6C7D4, 3C7F11, 4C10F9, 5C10G8 las cuales presentaron mayor absorbancia, y fueron sembradas y expandidas (**Figura 42**).

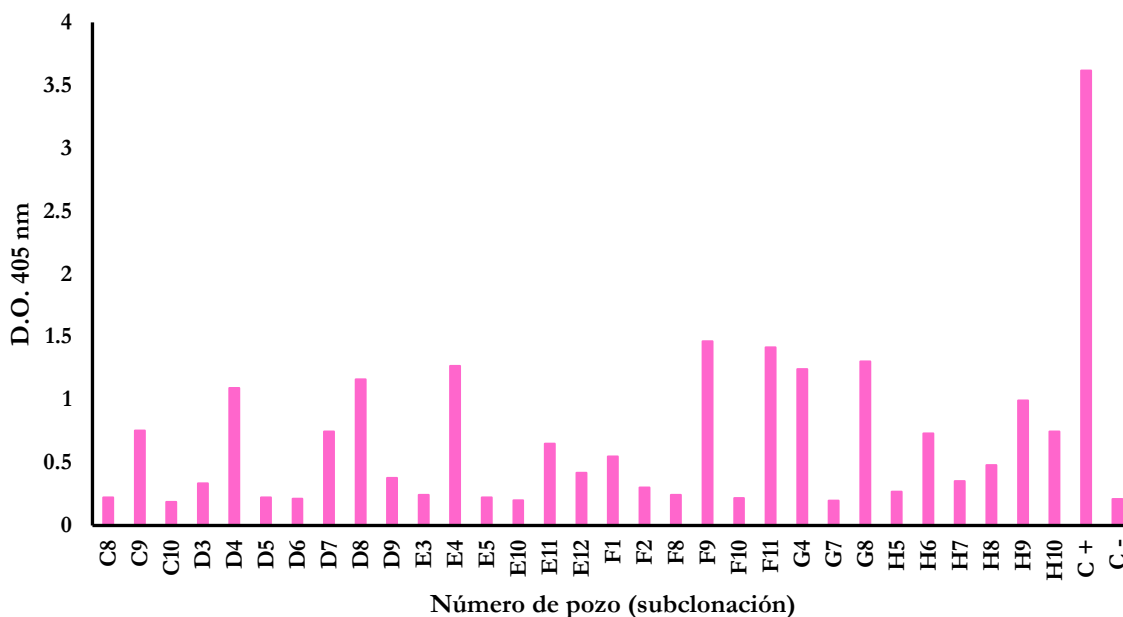


Figura 42. Expansión de las clonas positivas productoras de anticuerpos monoclonales anti-LAPyspII recombinante de *S. pombe*. Inmunoensayo de ELISA. La respuesta de anticuerpos más intensa se presentó en los pozos E4, F9, F11 y G8.

7.5.2.3. Determinación de la eficiencia de los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas para el reconocimiento de la LAPyspII recombinante de *S. pombe*.

La generación de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de hibridoma requiere un análisis extenso y detallado de las clonas obtenidas directamente de esplenocitos de animales estimulados. Es necesario determinar la eficiencia de la clona en la producción de estos anticuerpos, ya que, en ciertas ocasiones, estas clonas necesitan estímulos metabólicos para tener un mayor rendimiento en la producción de los anticuerpos. Esto es especialmente importante con respecto a la aplicación final, cuando el anticuerpo debe reconocer el objetivo satisfactoriamente, la caracterización de las inmunoglobulinas, reconocimiento de epítopos lineales o conformacionales, y la técnica de aplicación *a priori* del anticuerpo. Si el rendimiento de producción de la clona es bajo, podría perder su potencial productor. Esta comparación se realizó en clonas producidas de diferentes individuos, dependiendo del éxito de su selección.

A continuación, se muestran dos ejemplos de inmunización en animales y las clonas obtenidas a través de los diferentes procesos de subclonación, hasta lograr el hibridoma estable productor de anticuerpos. En **Figura 43** vemos las curvas de titulación para los ratones BALB/c 'Cabeza' y 'Cola' estimulados para la inducción de la respuesta inmune contra la LAPyspII en diferentes momentos de la

inmunización, la curva de titulación del hibridoma obtenido de los procesos de clonación y subclonación, y la titulación de esos anticuerpos por ELISA.

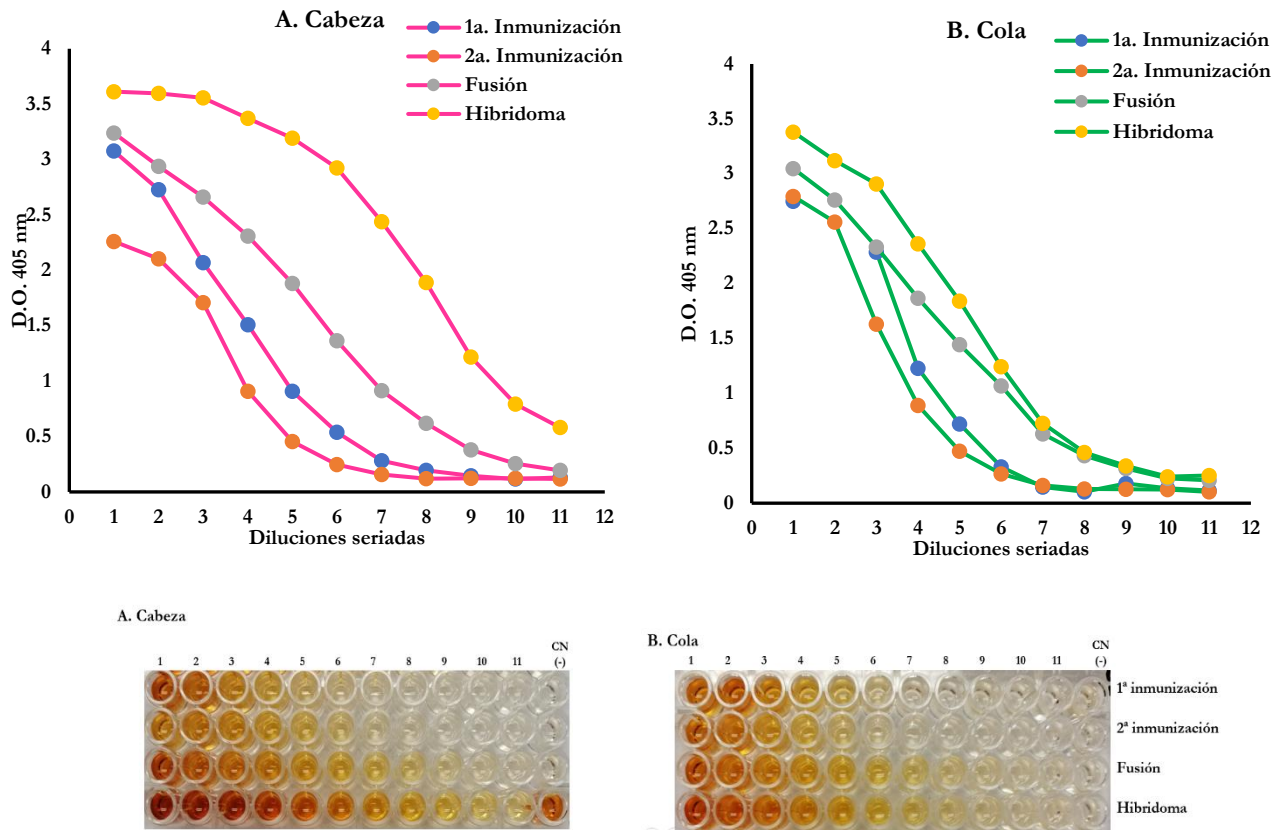


Figura 43. Titulación de anticuerpos monoclonales y policlonales anti- LAPypII recombinante. La primera inmunización a los 14 días después de la aplicación del antígeno, segunda inmunización a los 21 ó 28 días, justo antes del sacrificio de los animales y extracción del bazo (Fusión), y el establecimiento del hibridoma después del proceso de clonación y expansión (hibridoma). Los sueros policlonales (1ª y 2ª inmunización) obtenidos del sangrado de los animales, así como los sobrenadantes de los cultivos celulares donde encontramos los anticuerpos monoclonales (fusión e hibridoma) fueron diluidos a diferentes concentraciones seriadas (Dilución 1 al 11) que corresponden a las diluciones 1:250 hasta 1:256000. Cada uno fue cuantificado con la interacción de 100 ng/pozo de antígeno LAPypII recombinante. Panel inferior resultados de la placa de ELISA aplicada a la titulación de estos anticuerpos.

En el caso del inciso A) Cabeza, observamos una alta eficiencia de producción de anticuerpos monoclonales en el hibridoma 3C7F11.12 ya que el título para el reconocimiento de 100 ng de antígeno se encuentra en la dilución 1:256000, aún podemos identificar la generación de color hasta esa dilución, por lo que, a muy bajas concentraciones del sobrenadante, ya sea completo o purificado, encontraremos la interacción y reconocimiento de la LAPypII recombinante.

En cambio, con el individuo B) Cola, el hibridoma 5A6H7.32 presenta una respuesta a la producción de los anticuerpos baja, la dilución 8 (1:32000) es la última dilución en la que se observa reacción con el antígeno, de acuerdo con los valores de absorbancia obtenidos. En conclusión, la producción de anticuerpos en las mismas condiciones de crecimiento de ambas clonas, es mayor en el caso de la clona A (3C7F11.12) comparando con la clona B (5A6H7.32). Esto puede deberse a varias razones, el estado metabólico de las clonas es un aspecto muy importante en su mantenimiento, y la suplementación del medio de cultivo puede impactar en el grado de estrés de las células, provocando la inhibición de la producción de los anticuerpos de interés. El comportamiento de los títulos de anticuerpos de la clona B, podría significar también baja estabilidad del hibridoma, ya que podría ser más susceptible a modificaciones en el contenido de cromosomas, que deriven en la pérdida de los genes productores de las inmunoglobulinas. Este tipo de hibridomas son cultivados en volúmenes mayores, para aumentar el rendimiento y hacer viable la purificación de los anticuerpos mediante cromatografía. A pesar de estas desventajas, las determinaciones mediante ELISA y el seguimiento de la clona desde su fusión fueron consistentes, es decir, es probable que el hibridoma se encuentre produciendo anticuerpos específicos para la LAPyspII recombinante, a pesar de su baja eficiencia.

Por otro lado, la producción de anticuerpos policlonales encontrados en el suero de los animales mantuvo un comportamiento semejante en los sujetos inmunizados, esto nos sugiere que la producción de este tipo de anticuerpos también es viable en este tipo de modelo. La ventaja de estas inmunoglobulinas, debido a la diversidad de sitios antigénicos que podría reconocer, es aumentar los sitios de unión al antígeno en cuestión, abarcando tanto epítomos lineales como conformacionales, lo cual es deseable para aplicaciones posteriores como localización mediante inmunohistoquímica o western blot. Aunque los volúmenes y los rendimientos son menores, debido a que estos anticuerpos se obtienen de cantidades muy pequeñas de sangre total de animales como el ratón, nos brindan una alternativa útil y eficaz para el reconocimiento del antígeno.

Adicionalmente, el seguimiento de los títulos a través del sistema *in vivo*, ha permitido establecer una estrategia para el uso del antígeno a una concentración de 20 µg/mL para la generación de anticuerpos policlonales en ratón, y probablemente en otros organismos como la gallina o la rata. Así mismo, el antígeno purificado mediante cromatografía IMAC o FPLC-IMAC, aunque no se encuentra formando la estructura homohexamérica natural presente en la levadura *S. pombe*, es posible utilizarlo como recubrimiento para el reconocimiento por ELISA. El rango óptimo de detección del antígeno fue de 100 ng.

8. Conclusiones

- La ausencia de la leucin aminopeptidasa yspII en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* provoca modificaciones en la proliferación y la supervivencia de la levadura. Con respecto a la cepa 4X-Control, la cepa mutante 4X Δ ape2 presenta una tasa de generación menor (5.17 vs 4.80), así como compromiso de la viabilidad a partir de las 28 horas, hasta las 32 horas donde disminuye aproximadamente un 50%. La fase de crecimiento crítica, donde la cepa mutante 4X Δ ape2 presenta los cambios más importantes en cuanto a su tasa de crecimiento y viabilidad es el periodo comprendido entre las 20 y las 32 horas, en este rango se presenta la fase logarítmica de crecimiento, extendiéndose a la fase final de la etapa exponencial.
- Se observan modificaciones en la segregación del material genético en la cepa mutante 4X Δ ape2 a partir de las 28 horas de crecimiento. Es posible reconocer células carentes de núcleo, contenido nuclear polarizado, aglomeraciones celulares y falla en la división del contenido nuclear. Aunado a la disminución en la proliferación, que la viabilidad se encuentre comprometida en este punto de crecimiento puede deberse a las anomalías de segregación en el material genético.
- Al realizar un acercamiento mediante qRT-PCR a los genes emitidos por el estudio de microarreglos de ADN de la mutante 4X Δ ape2, observamos una disminución de la expresión de los genes *mis14*, *cnp20* y *sgo2* involucrados en la formación del cinetocoro y la interacción con el centrómero, elementos clave para la progresión del ciclo celular a través de la mitosis. Además, los posicionadores de cohesinas, subunidad *mis4* del complejo de carga, también se encuentran disminuidos desde el inicio de la fase logarítmica. Es posible que procesos relacionados a la reproducción sexual también están activos como una respuesta alternativa a procesos de estrés celular, la cohesina *rec8* presenta un aumento en el nivel de expresión a las 24 horas de crecimiento. El factor *cdc5*, identificado como parte del espliceosoma y regulador de la transición de la fase G2/S también presenta un aumento a las 24 horas. El aumento de la transcripción de estos componentes sugiere la regulación a este nivel de la leucin aminopeptidasa yspII, que podría explicarse por interacciones con proteínas nucleares, interacción con los microtúbulos y el huso mitótico a nivel citosólico, o el procesamiento de estos componentes en su metabolismo o modificación.

- Se estableció un modelo de expresión de la proteína recombinante LAPySpII en la cepa *Escherichia coli* BL21-Codon Plus (DE3) bajo la inducción de IPTG; con una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y un sitio de corte para la enterocinasa.
- Mediante la purificación con la técnica de cromatografía de afinidad (IMAC-NTA-Ni) fue posible purificar la proteína recombinante LAPySpII en estado soluble y estable para la producción de anticuerpos monoclonales contra esta.
- La leucin aminopeptidasa yspII recombinante de *S. pombe* fue purificada a través del método de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), eligiendo columnas de afinidad IMAC de un mililitro para aumentar la pureza y el rendimiento de la proteína. Extendiendo el gradiente de imidazol para la purificación, se obtuvo la proteína sin afectar su estabilidad ni su concentración.
- Se generaron anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos a la leucin aminopeptidasa yspII recombinante mediante el método de hibridoma. Hasta el momento se han establecido cuatro clonas productoras de anticuerpos 3C6C7D4, 3C7F11, 4C10F9 y 5C10G8. Así mismo, se recuperaron anticuerpos policlonales de sueros de los ratones BALB/c, que también reconocen a la LAPySpII. Hasta el momento se han realizado 2 clonación para la selección del probable epítipo inmunodominante contra esta proteína recombinante.

9. Perspectivas.

1. Realizar una titulación de los anticuerpos monoclonales producidos con el antígeno LAPyspII por el método de ELISA y western-Blot, para cada una de las clonas.
2. Determinar el isotipo de los anticuerpos producidos: IgG, IgA, IgM.
3. Establecer la especificidad de los anticuerpos obtenidos mediante inmunoensayos (ELISA, western blot, inmunofluorescencia) usando extractos protéicos de la levadura.
4. Localizar con el anticuerpo monoclonal producido a la LAPyspII en las células a través de inmunofluorescencia durante las fases de crecimiento celular. Co-localizar con las proteínas relacionadas antes mencionadas.
5. Evaluar procesos como la mitosis, en diferentes estados de arresto celular para determinar los cambios en los genes relacionados con el ciclo celular y mitosis.

10. Referencias bibliográficas

1. Jeffery CJ. Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999;24(1):8-11.
2. Drinkwater N, Malcolm TR, McGowan S. M17 aminopeptidases diversify function by moderating their macromolecular assemblies and active site environment. *Biochimie*. 2019;166:38-51.
3. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of Cell Biology*. 2017.
4. López-Otín C, Overall CM. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(7):509-19.
5. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *Journal of Cell Biology*. 2017;217(1):51-63.
6. Nigel M. Hooper UL. *Aminopeptidases in Biology and Disease*: Springer US; 2004.
7. Drinkwater N, Malcolm TR, McGowan S. M17 aminopeptidases diversify function by moderating their macromolecular assemblies and active site environment. *Biochimie*. 2019.
8. Zhu X, Barman A, Ozbil M, Zhang T, Li S, Prabhakar R. Mechanism of peptide hydrolysis by co-catalytic metal centers containing leucine aminopeptidase enzyme: a DFT approach. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2012;17(2):209-22.
9. Skinner-Adams TS, Stack CM, Trenholme KR, Brown CL, Grembecka J, Lowther J, et al. Plasmodium falciparum neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010;35(1):53-61..
10. McGowan S, Oellig CA, Birru WA, Caradoc-Davies TT, Stack CM, Lowther J, et al. Structure of the Plasmodium falciparum M17 aminopeptidase and significance for the design of drugs targeting the neutral exopeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(6):2449-54.
11. Stack CM, Lowther J, Cunningham E, Donnelly S, Gardiner DL, Trenholme KR, et al. Characterization of the Plasmodium falciparum M17 Leucyl Aminopeptidase: a protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(3):2069-80.
12. Correa AF, Bastos IMD, Neves D, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, de Santana JM. The Activity of a Hexameric M17 Metallo-Aminopeptidase Is Associated With Survival of Mycobacterium tuberculosis. *Front Microbiol*. 2017;8:504-510.
13. Peña-Díaz P, Vancová M, Resl C, Field MC, Lukeš J. A leucine aminopeptidase is involved in kinetoplast DNA segregation in Trypanosoma brucei. *PLOS Pathogens*. 2017;13(4):e1006310.
14. Melissa A. Scranton AY, Sang-Youl Park, Linda L. Walling. Plant Leucine Aminopeptidases Moonlight as Molecular Chaperones to Alleviate Stress-induced Damage. *J Biol Chem*. 2012;VOL. 287(NO. 22):18408 –17.
15. DuPrez KT, Scranton MA, Walling LL, Fan L. Structural insights into chaperone-activity enhancement by a K354E mutation in tomato acidic leucine aminopeptidase. *Acta Crystallographica Section D*. 2016;72(5):694-702.
16. Yang Q, Roehrl MH, Wang JY. Proteomic profiling of antibody-inducing immunogens in tumor tissue identifies PSMA1, LAP3, ANXA3, and maspin as colon cancer markers. *Oncotarget*. 2017;9(3):3996-4019.
17. He X, Huang Q, Qiu X, Liu X, Sun G, Guo J, et al. LAP3 promotes glioma progression by regulating proliferation, migration and invasion of glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;72:1081-9.

18. Tian S-Y, Chen S-H, Shao B-F, Cai H-Y, Zhou Y, Zhou Y-L, et al. Expression of leucine aminopeptidase 3 (LAP3) correlates with prognosis and malignant development of human hepatocellular carcinoma (HCC). *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):3752-62.
19. Zhang S, Yang X, Shi H, et al. . Overexpression of leucine aminopeptidase 3 contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Hist* 45: 283. 2014;45(3):283–92.
20. Yang H, Dai G, Wang S, Zhao Y, Wang X, Zhao X, et al. Inhibition of the proliferation, migration, and invasion of human breast cancer cells by leucine aminopeptidase 3 inhibitors derived from natural marine products. *Anti-Cancer Drugs*. 2020;31(1):60-6.
21. Fang C, Zhang J, Yang H, Peng L, Wang K, Wang Y, et al. Leucine aminopeptidase 3 promotes migration and invasion of breast cancer cells through upregulation of fascin and matrix metalloproteinases-2/9 expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(3):3611-20.
22. DeSouza LV, Grigull J, Ghanny S, Dubé V, Romaschin AD, Colgan TJ, et al. Endometrial Carcinoma Biomarker Discovery and Verification Using Differentially Tagged Clinical Samples with Multidimensional Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007;6(7):1170.
23. Herrera-Camacho I, Rosas-Murrieta NH, Rojo-Domínguez A, Millán L, Reyes-Leyva J, Santos-López G, et al. Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe*. *The FEBS Journal*. 2007;274(23):6228-40.
24. M. R. Leucin Aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*. Sobreproducción, purificación, estudio cinético de competición de iones y modelado del dominio N-terminal: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2009.
25. Márquez L. Expresión del gen y la actividad enzimática de las aminopeptidasas yspI y yspII y las dipeptidilaminopeptidasas yspC y yspK bajo limitantes nutricionales en *Schizosaccharomyces pombe*. Posgrado en Ciencias Químicas. : Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2005.
26. Gutierrez-Díaz N. Leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*:obtención de mutantes por delección del gen *ape2* y caracterización de su fenotipo. Posgrado en Ciencias Químicas Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2014.
27. Flores-Tlapa G. Revertante de la cepa mutante de la leucin aminopeptidasa yspII y análisis bioinformático del microarreglo de *Schizosaccharomyces pombe* Posgrado en Ciencias Químicas: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018.
28. Idiris A, Bi K, Tohda H, Kumagai H, Giga-Hama Y. Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast*. 2006;23(2):83-99.
29. Vishwanatha A, Rallis C, Bevkal Subramanyaswamy S, D'Souza CJM, Bähler J, Schweingruber ME. Identification of nuclear genes affecting 2-Deoxyglucose resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(6):fow061. Epub 2016/07/31.
30. Sideri T, Rallis C, Bitton DA, Lages BM, Suo F, Rodríguez-López M, et al. Parallel profiling of fission yeast deletion mutants for proliferation and for lifespan during long-term quiescence. *G3 (Bethesda)*. 2014;5(1):145-55.
31. Harvey Lodish AB, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Matthew P. Scott. *Biología Celular y Molecular*. 7a., editor: Editorial Médica Panamericana; 2016.
32. Schmidt CK, Brookes N, Uhlmann F. Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes. *Genome Biol*. 2009;10(5):R52-R. Epub 2009/05/19.
33. Makrantonis V, Marston AL. Cohesin and chromosome segregation. *Current Biology*. 2018;28(12):R688-R93.

34. Murayama Y, Uhlmann F. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*. 2014;505(7483):367-71.
35. Bernard P, Drogat J, Maure J-F, Dheur S, Vaur S, Genier S, et al. A Screen for Cohesion Mutants Uncovers Ssl3, the Fission Yeast Counterpart of the Cohesin Loading Factor Scc4. *Current Biology*. 2006;16(9):875-81.
36. Bernard P, Schmidt CK, Vaur S, Dheur S, Drogat J, Genier S, et al. Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *EMBO J*. 2008;27(1):111-21.
37. Eckert CA, Gravidahl DJ, Megee PC. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. *Genes & Development*. 2007;21(3):278-91.
38. Bhardwaj S, Schlackow M, Rabajdova M, Gullerova M. Transcription facilitates sister chromatid cohesion on chromosomal arms. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6676-92.
39. Tanizawa H, Kim K-D, Iwasaki O, Noma K-I. Architectural alterations of the fission yeast genome during the cell cycle. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(11):965-76.
40. Kawashima SA, Tsukahara T, Langegger M, Hauf S, Kitajima TS, Watanabe Y. Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes & Development*. 2007;21(4):420-35.
41. Thakur J, Talbert PB, Henikoff S. Inner Kinetochore Protein Interactions with Regional Centromeres of Fission Yeast. *Genetics*. 2015;201(2):543-61.
42. Tashiro S, Handa T, Matsuda A, Ban T, Takigawa T, Miyasato K, et al. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Communications*. 2016;7:10393.
43. Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(1):33-46.
44. Hayashi A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Reconstruction of the Kinetochore during Meiosis in Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*. 2006;17(12):5173-84.
45. Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. Mis16 and Mis18 Are Required for CENP-A Loading and Histone Deacetylation at Centromeres. *Cell*. 2004;118(6):715-29.
46. Tomonaga T, Nagao K, Kawasaki Y, Furuya K, Murakami A, Morishita J, et al. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes & Development*. 2000;14(21):2757-70.
47. Grand RS, Pichugina T, Gehlen LR, Jones MB, Tsai P, Allison JR, et al. Chromosome conformation maps in fission yeast reveal cell cycle dependent sub nuclear structure. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(20):12585-99.
48. Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly. *The Journal of Cell Biology*. 2015;211(2):295-308.
49. Forsburg SL, Rhind N. Basic methods for fission yeast. *Yeast (Chichester, England)*. 2006;23(3):173-83.
50. Krawchuk MD, DeVeaux LC, Wahls WP. Meiotic chromosome dynamics dependent upon the *rec8(+)*, *rec10(+)* and *rec11(+)* genes of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 1999;153(1):57.
51. Bholá T, Kapuy O, Vinod PK. Computational modelling of meiotic entry and commitment. *Scientific Reports*. 2018;8(1):180.
52. Nurse P; Thuriaux P; Nasmyth K . Genetic-Control Of Cell-Division Cycle In Fission Yeast *Schizosaccharomyces-Pombe*. *Molecular & General Genetics*. 1976;146(2):167-78.

53. Collier SE, Voehler M, Peng D, Ohi R, Gould KL, Reiter NJ, et al. Structural and Functional Insights into the N-Terminus of *Schizosaccharomyces pombe* Cdc5. *Biochemistry*. 2014;53(41):6439-51.
54. Ohi R, McCollum D, Hirani B, Den Haese GJ, Zhang X, Burke JD, et al. The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *EMBO J*. 1994;13(2):471-83.
55. McDonald WH, Ohi R, Smelkova N, Friendewey D, Gould KL. Myb-Related Fission Yeast cdc5p Is a Component of a 40S snRNP-Containing Complex and Is Essential for Pre-mRNA Splicing. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(8):5352.
56. Wang Z. Big data mining powers fungal research: recent advances in fission yeast systems biology approaches. *Current Genetics*. 2017;63(3):427-33.
57. Hoffman CS, Wood V, Fantes PA. An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe*; Model System. *Genetics*. 2015;201(2):403.
58. Seynnaeve D, Vecchio DM, Fruhmann G, Verelst J, Cools M, Beckers J, et al. Recent Insights on Alzheimer's Disease Originating from Yeast Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(7).
59. Muers M. Fission yeast compared and contrasted. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12:381.
60. Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*. 1977;79(1):544-52.
61. Untergasser A, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012;40(15):e115.
62. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
63. Fuller SA, Takahashi M, Hurrell JGR. Cloning of Hybridoma Cell Lines by Limiting Dilution. *Current Protocols in Molecular Biology*. 1988;1(1):11.8.1-8.2.
64. Petersen J, Russell P. Growth and the Environment of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor protocols*. 2016;2016:pdb.top079764.
65. Yanagida M, Ikai N, Shimanuki M, Sajiki K. Nutrient limitations alter cell division control and chromosome segregation through growth-related kinases and phosphatases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;366(1584):3508-20.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
67. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;3:9-16.
68. Brooker AS, Berkowitz KM. The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2014;1170:229-66.
69. Nakashima A, Maruki Y, Imamura Y, Kondo C, Kawamata T, Kawanishi I, et al. The Yeast Tor Signaling Pathway Is Involved in G2/M Transition via Polo-Kinase. *PLOS ONE*. 2008;3(5):e2223.
70. Escorcía W, Shen K-F, Yuan J-P, Forsburg SL. Examination of Mitotic and Meiotic Fission Yeast Nuclear Dynamics by Fluorescence Live-cell Microscopy. *J Vis Exp*. 2019(148):10.3791/59822.
71. Yamashita A, Sakuno T, Watanabe Y, Yamamoto M. Synchronous Induction of Meiosis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor protocols*. 2017;2017.
72. Yoon S-W, Lee M-S, Xaver M, Zhang L, Hong S-G, Kong Y-J, et al. Meiotic prophase roles of Rec8 in crossover recombination and chromosome structure. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(19):9296-314.

73. Chou PY, Fasman GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1978;47:45-148.
74. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol.* 1985;55(3):836-9.
75. Kolaskar AS. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS.* 1990; 276 (1-2). 172-74.
76. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.* 1986;25(19):5425-32.
77. Peterson NC. *Advances in Monoclonal Antibody Technology: Genetic Engineering of Mice, Cells, and Immunoglobulins.* ILAR Journal. 2005;46(3):314-9.
78. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010;2(5):480-99.
79. Holzlöhner P, Hanack K. Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *J Vis Exp.* 2017(119):54832.

11. Anexos

A) Preparación de soluciones y medios

☞ Medio LB (Luria Bertani)

Peptona de caseína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L

(Si se requiere medio sólido, agregar 2 % de agar). Esterilizar en autoclave a 15 psi durante 15 min.

☞ Medio YE

Extracto de levadura	5 g/L
3 % glucosa	3%

Si se requiere medio sólido, agregar 3 % de agar.

Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

☞ Suplementos 225 mg/L

Cada uno	0.0225%
L-adenina	
L-histidina	
L-leucina	
Uracilo	
L-lisina	

Esterilizar en autoclave a 15ps/15 minutos.

☞ Medio YNB

YNB DIFCO	6.7 g/L
Acetato de sodio	1 g/L
Cloruro de potasio	0.9 g/L

Glucosa 2 %

Si se requiere medio sólido, agregar 3 % de agar.

Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Adicionar suplementos

☞ Medio mínimo mineral EMM2

Ácido ftálico 3 g/L

Na₂HPO₄ 2.24 g/L

NH₄Cl 5 g/L

Esterilizar por filtración y adicionar en la siguiente proporción.

Sales 50X 2%

Glucosa 10X 10%

Vitaminas 1000X 0.1%

Minerales 10'000X 0.01%

Aminoácidos y bases 50X 2%

(Si se requiere medio sólido, agregar 2% de agar)

Esterilizar en autoclave a 15psi/15 minutos.

☞ EMM2 N-

Ácido ftálico 3 g/L

Na₂HPO₄ 2.24 g/L

(Si se requiere medio sólido, agregar 2% de agar)

Esterilizar en autoclave a 15 psi/15 minutos.

Esterilizar por filtración y adicionar en la siguiente proporción.

Sales 50X 2%

Glucosa 10X 10%

Vitaminas 1000X	0.1%
Minerales 10'000X	0.01%
Aminoácidos y bases 50X	2%

☞ SALES 50X

MgCl ₂ *6H ₂ O	5.35%
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.075%
KCl	5%
Na ₂ SO ₄	0.2%

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar. Esterilizar en autoclave a 15ps/15 minutos. Guardar a 4 °C.

☞ VITAMINAS 1000X

Ácido pantoténico	0.1%
Ácido nicotínico	1%
Inositol	1%
Biotina	0.01%

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar. Esterilizar por filtración. Guardar a 4 °C.

☞ MINERALES 10000X

Ácido bórico	0.5%
MnSO ₄ *H ₂ O	0.45%
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.72%
FeCl ₂ *4H ₂ O	0.17%

Ácido molíbdico	0.16%
KI (yoduro de potasio)	0.1%
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.04%
Ácido cítrico	1.1%

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar. Esterilizar por filtración. Guardar a 4 °C.

☞ **GLUCOSA 30%**

Glucosa 60 g

Aforar a 200 mL con H₂O mili-Q estéril.

Esterilizar en autoclave a 15ps/15 minutos.

☞ **PBS 1X pH 7.4**

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

Na₂HPO 410 mM

KH₂PO₄ 2 mM

Esterilizar en autoclave a 15 psi /15 min y almacenar a 4 °C.

☞ **PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO DE LEVADURAS**

Solución de lisis

Para 100 mL: Reactivo	Cantidad	Concentración final
SDS	1 g	1 %
NaCl	0.584 g	100 mM
Tris-base	0.121 g	10 mM
EDTA	16 mg	0.38 mM
Tritón X-100	2 mL	2 %

☞ Buffer de zimoliasa

Ácido cítrico	50 mM a pH 5.6
Na ₂ HPO	450 mM a pH 5.6
EDTA	40 mM a pH 8
Sorbitol	1.2 M

Esterilizar en autoclave a 15 psi /15 min y almacenar a 4 °C.

☞ Purificación de proteínas por IMAC

Buffer 1 (10 mM K₂HPO₄, pH 7.4, 150mM NaCl y 1mM EDTA)

Buffer 2 (20mM de Tris pH 7.5, 160 mM NaCl y 20 mM de imidazol)

Buffer 3 (50 mM Na₂HPO₄ pH8, 100mM NaCl y 500 mM de imidazol)

☞ Inmunoensayo de ELISA.

Solución de lavado

PBS- Tween

Na ₂ HPO ₄ (10 mM)	1.42 g
NaH ₂ PO ₄ (1.8 mM)	0.22 g
NaCl (140 mM)	8.19 g
Tween 20 (0.2 %)	2 mL

Ajustar el pH a 7.4

Adicionar agua destilada a 1000 mL

Solución de recubrimiento

Na₂CO₃ 0,159 g

NaHCO₃ 0,293 g

Agua destilada 100 mL

Ajustar pH a 9.6

Solución de bloqueo

5% de leche en polvo sin grasa 5 g

Añadir solución PBS-Tween a 100 mL

Solución de sustrato OPD

Orto-fenilendiamina (OPD) 4mg

Buffer de citratos 0.1M 10mL

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30%

Solución de paro

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2.5 N

B) Trabajo presentado en XIII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos

