

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ESTRUCTURAL**

**Análisis *in vivo* de las interacciones oligoméricas de  
Eno1 y Eno2 en *Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**PRESENTA:**

**MARIANA DUHNE RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>3</b>
Importancia de las interacciones entre proteínas.....	3
Interacciones entre proteínas parálogas.....	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio .....	9
Eno1 y Eno2 un caso específico.....	11
Metodologías para el análisis de interacción proteína-proteína.....	15
El uso de la proteína verde fluorescente en los estudios de interacción proteína-proteína .....	16
<b>Objetivo General .....</b>	<b>19</b>
Objetivos Particulares .....	19
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>19</b>
Cepas .....	19
Condiciones de cultivo .....	19
Generación de plásmidos para BiFC y Multicolor BiFC .....	20
Transformación de acetato de Litio.....	24
Cepas y cruzas para ensayos de BiFC.....	27
Microscopía .....	29
Citometría de Flujo.....	29
Análisis de Datos .....	29

<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
Generación de la colección de plásmidos para análisis de BiFC y multicolor	
BiFC.....	30
pCN155C .....	30
pCC155C .....	31
pYN155C.....	31
pYC155C.....	32
Localización y expresión de las enolasas .....	34
Expresión de las enolasas en diferentes fuentes de carbono.....	34
Oligomerización de las enolasas .....	36
Fluctuaciones en los estados oligoméricos de las enolasas dependiendo la fuente de carbono.....	38
<b>Discusión.....</b>	<b>41</b>
Colección de plásmidos para BiFC.....	41
Enolasas .....	42
<b>Conclusiones .....</b>	<b>45</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>46</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>47</b>



## Resumen

En las células una parte importante de las proteínas se encuentran interactuando consigo mismas y formando complejos con otras proteínas. La trascendencia de estas interacciones está asociada con la función, estabilidad y mecanismos de regulación que presentan los distintos complejos proteínicos. Estos complejos, determinan la función de las proteínas. Un ejemplo útil para el estudio de interacciones proteína-proteína son los productos de genes parálogos, estos son, genes que provienen de un evento de duplicación y que se encuentran dentro de la misma especie. Las proteínas parálogas, permiten estudiar la transición entre la homo y la hetero-oligomerización.

Un modelo ideal para el estudio de genes duplicados es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ya que presenta un 30% de estos genes. Existen pocos reportes sobre interacciones entre proteínas parálogas, un ejemplo interesante de ello lo ilustran Eno1 y Eno2.

Eno1 y Eno2 son enzimas diméricas que comparten un 95% de identidad a nivel de aminoácidos y catalizan la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis. La expresión y prevalencia de estas enzimas depende de la naturaleza de la fuente de carbono. Se ha reportado que en condiciones respiratorias Eno2 es la isoforma predominante, pero en fuentes de carbono no fermentables como etanol, glicerol y/o lactato, ambas isoformas se encuentran en concentraciones similares. Esta diferencia de expresión podría estar relacionada con la catálisis reversible hacia la formación de fosfoenolpiruvato a partir de 2-fosfoglicerato.

Se han reportado tres diferentes isoformas cuya estructura cuaternaria depende de arreglos aleatorios entre subunidades de Eno1 y Eno2, las cuales conforman 3 dímeros con actividad catalítica que corresponden a Eno1/Eno1, Eno2/Eno2 y un heterodímero conformado por Eno1/Eno2. A pesar de conocerse las 3 distintas isoformas, se desconoce la prevalencia de cada una de ellas en

distintas fuentes de carbono. En este estudio se analizó la composición oligomérica de Eno1 y Eno2 in vivo.

La metodología denominada BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation Assay) ha resultado particularmente útil para analizar interacciones entre proteínas in vivo. Este ensayo consiste en fusionar dos fragmentos complementarios de una proteína fluorescente (FP) a las proteínas cuya interacción se pretende evaluar. Sólo si existe una interacción, la FP se reconstituye emitiendo una señal fluorescente. Este trabajo se centra en la generación de una colección de plásmidos para implementar la metodología BiFC en *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo, se utilizó esta metodología para determinar la prevalencia y composición de las diferentes formas oligoméricas de Eno1 y Eno2. En este estudio, se observó por primera vez la presencia del heterodímero Eno1/Eno2 in vivo, este heterodímero se encuentra presente en todas las fuentes de carbono analizadas (dextrosa, etanol y lactato). Por último, se determinó que la presencia de los distintos estados oligoméricos formados por Eno1 y Eno2 fluctúan dependiendo la fuente de carbono.



# Introducción

## Importancia de las interacciones entre proteínas

En las células una parte importante de las proteínas se encuentran interactuando consigo mismas y formando complejos con otras proteínas (Barabasi & Oltavi, 2004). La trascendencia de estas interacciones está asociada con la función, estabilidad y con mecanismos de regulación que presentan los distintos complejos proteínicos (Nooren & Thorton, 2003). En *Escherichia coli* el estado de oligomerización promedio a nivel de proteoma es de 4. Por otro lado, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha determinado que una proteína tiene al menos 3 compañeros de interacción y en humanos dos terceras partes del proteoma está conformado por asociaciones oligoméricas (Nooren & Thorton, 2003).

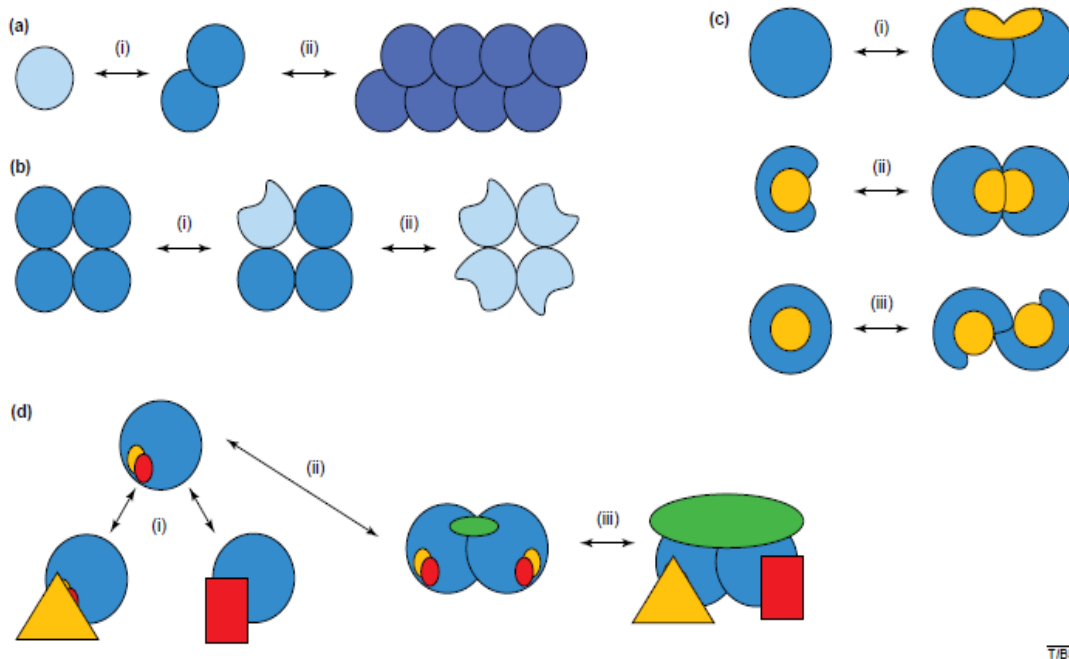


Figura 1. Consecuencias funcionales de la oligomerización. (a) La dimerización sólo ocurre cuando la concentración es mayor que la constante de disociación (i), lo cual constituye un mecanismo para censar la concentración de proteína. Así mismo se pueden ensamblar grandes estructuras proteínicas para realizar distintas funciones celulares (ii). (b) La cooperación y el alosterismo pueden conferir nuevas propiedades a las enzimas. La transición entre distintos estados oligoméricos puede regular la función de una proteína. (c) La oligomerización puede modificar los sitios activos generando nuevos sitios en la interface, así mismo, puede modificar la especificidad de los existentes, bloqueándolos o exponiéndolos. (d) La oligomerización puede ayudar a generar complejos regulatorios que permitan concentrar múltiples funciones en una subunidad. Marianayagam, *et al.*, 2004.

La oligomerización puede conferir distintas ventajas estructurales y funcionales tales como: mayor estabilidad, niveles adicionales de regulación y se cree, puede influir en la reducción del tamaño del genoma (Marianayagam, *et al.*, 2004).

Un ejemplo de la importancia de la oligomerización lo ilustra la fosforribosil antranilato isomerasa (TrpF) de *Thermotoga maritima*, un organismo termófilo que puede sobrevivir a temperaturas cercanas a 90°C, en este organismo TrpF funciona como un homodímero, ortólogos de esta proteína en organismos mesófilos son monómeros; se ha demostrado, que la dimerización de esta proteína de *T. maritima* estabiliza su estructura para mantener su función a altas temperaturas (Sterner, *et al.*, 2006). Las interacciones a nivel de complejos también son determinantes para la función celular, tal es el caso de las diferentes subunidades que permiten el ensamble de la RNA polimerasa, la cual es un complejo proteínico esencial en los organismos.

Las interacciones proteína-proteína generan redes complejas de interacción proteínicas denominadas PIN por sus siglas en inglés (**P**rotein **I**nteraction **N**etwork), las cuales son fundamentales para realizar las diversas funciones celulares. Se han mapeado PINs de diferentes organismos a través de estudios de proteoma a nivel global y a pequeña escala, utilizando principalmente el ensayo de doble híbrido (Uetz, *et al.*, 2000; Ito, *et al.*, 2001; Ho, *et al.*, 2002; Gavin, *et al.*, 2006; Krogan, *et al.*, 2006; Butland, *et al.*, 2005; Giot, *et al.*, 2003; Li, *et al.*, 2004; Rual, *et al.*, 2005; Stelzl, *et al.*, 2005). A pesar de ello, existen todavía muchas preguntas referentes a su funcionamiento y estructura. Lo anterior se debe a lo complejas que pueden llegar a ser las PIN y a que los estudios que se realizan no son exhaustivos. Análisis a gran escala sobre interactomas proveen mucha información, sin embargo, esta clase de estudios normalmente se limitan a una condición metabólica específica y pueden presentar datos contradictorios cuando se analizan casos particulares; la mayoría de los trabajos a gran escala se limitan al crecimiento en un medio particular y al comparar dos bases de datos

independientes generadas con la misma metodología muchos resultados no coinciden (Kritikos, *et al.*, 2011).

La información que se tiene de las PIN se ha obtenido al hacer recopilaciones bioinformáticas basadas en estudios bioquímicos experimentales de interacciones. Al mapear interacciones, las proteínas (nodos de la red) que las conforman, se clasifican de acuerdo al número de interacciones que presentan aquellas proteínas que tienen muchos compañeros de interacción y las que tienen pocos. Se ha puesto un interés particular en aquellos nodos que tienen muchos interactores es decir que constituyen “concentradores” o “hubs” en las PIN, se ha demostrado que la remoción de los hubs altera de manera significativa la estructura de la red. Por el contrario, la remoción de otros nodos generalmente no tiene grandes efectos sobre la misma, esto obedece a una estructura robusta que permite cierta cantidad de perturbaciones en las PIN (Albert, *et al.*, 2000).

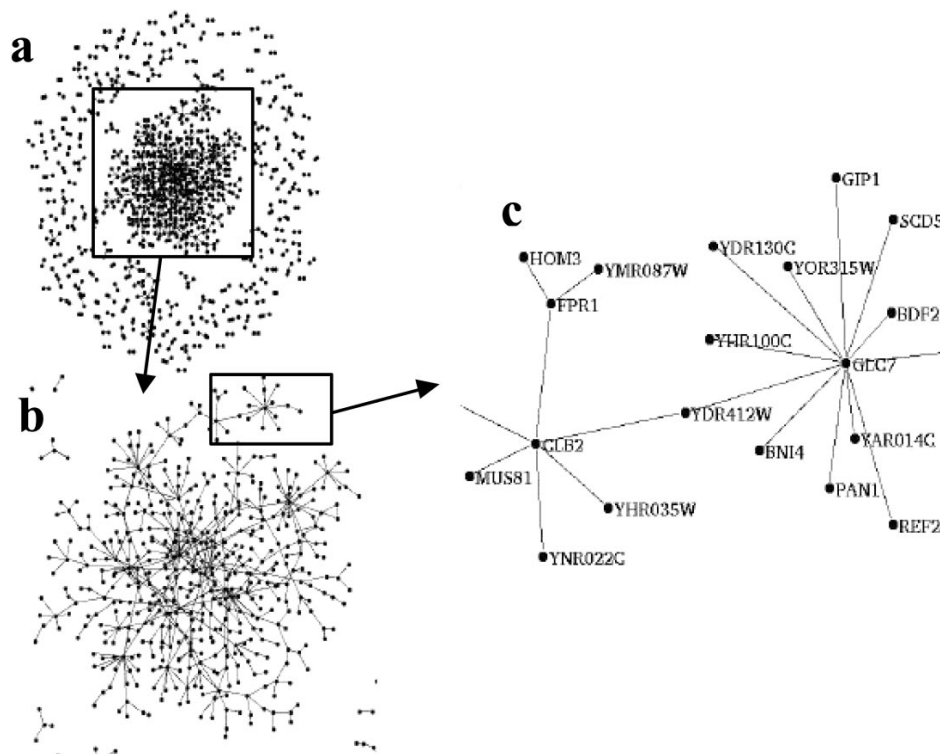


Figura 2. Esquema de la PIN de *S. cerevisiae*. Cada punto corresponde a una proteína y las líneas a una interacción detectada entre ellas. Tomado de Wagner 2001.

Las PIN se comportan como redes de mundo pequeño, es decir que cuentan con muchos nodos interconectados de manera indirecta. Las interconexiones de la misma “reducen” la distancia entre dos proteínas que no se encuentran interactuando directamente, haciendo que las alteraciones en la primera puedan llegar a afectar la función de la segunda sin necesidad de un contacto directo (Hase, *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la estructura de las PIN está altamente conservada a lo largo de la evolución. Las PIN de organismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la mosca *Drosophila melanogaster* presentan una estructura básica, que se cree, se encarga de cumplir con las funciones metabólicas esenciales de la célula, sobre esta estructura se agregan otras funciones específicas que son organismo y tejido dependientes (Schüler & Bornberg-Bauer, 2011). El que haya una estructura altamente conservada, implica poca variabilidad temporal de los hubs. Aquellos con múltiples interfaces de interacción evolucionan más despacio que el resto de las proteínas (Chakraborty, *et al.*, 2010; Pang, *et al.*, 2010). Lo anterior resulta importante, pues le da a las interacciones un papel determinante en la evolución de las proteínas.

### **Interacciones entre proteínas parálogas**

Un modelo útil para el estudio de interacciones proteína-proteína y la evolución de dichas interacciones, son los productos de genes duplicados, ya que pueden representar un buen ejemplo cuando se trata de estudiar la transición entre la formación de homo y hetero-oligómeros, las estructuras hetero-oligoméricas pueden proporcionar mayor diversidad estructural y versatilidad funcional (Entian, *et al.*, 1987).

Todas las especies hasta ahora secuenciadas tienen elementos redundantes en su genoma (figura 3), ante tal hecho, es posible que la homo y hetero-oligomerización entre productos de genes parálogos sea un evento frecuente en los organismos, de ahí la importancia de su estudio.

Los genes parálogos son genes que provienen de un evento de duplicación, estos pueden originarse por eventos independientes o de duplicaciones a nivel de genoma (Wolfe & Shields, 1997).

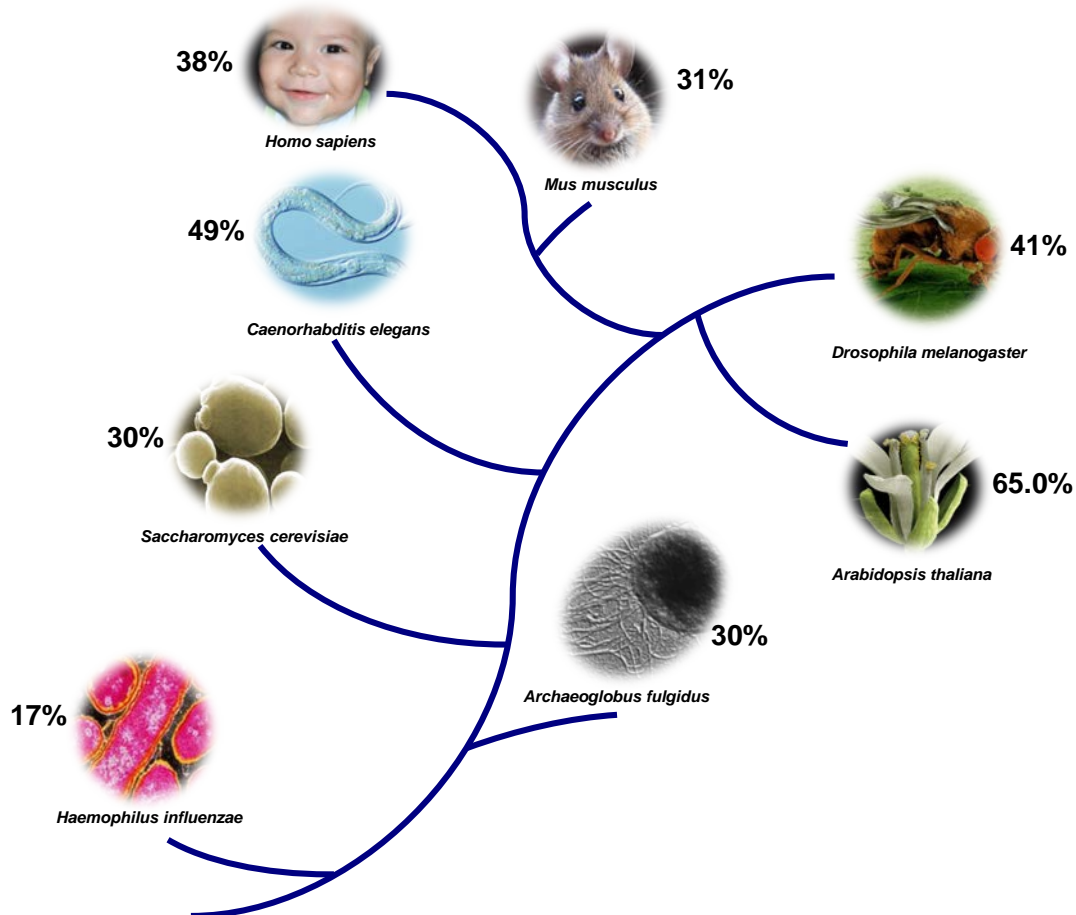


Figura 3. Presencia de genes parálogos en diferentes especies. El esquema muestra el porcentaje de genes duplicados en diferentes especies.

Tras una duplicación, ambas copias del gen son susceptibles a acumular mutaciones por lo que en un eventos posteriores a la duplicación se presenta alguno de los siguientes escenarios: a) pérdida de función o pseudogenización de una de las copias, es decir pérdida del duplicado; b) conservación de ambas copias intactas, proceso que se conoce como “aumento en la dosis génica”; c) subfuncionalización, ocurre cuando las copias pierden algunas propiedades del gen original por lo que ambas deben estar presentes para cumplir con las funciones que presentaba el ancestro; d) neofuncionalización, una de las copias

mantiene la función original y la segunda adquiere una nueva función (Krakauer & Nowak, 1999).

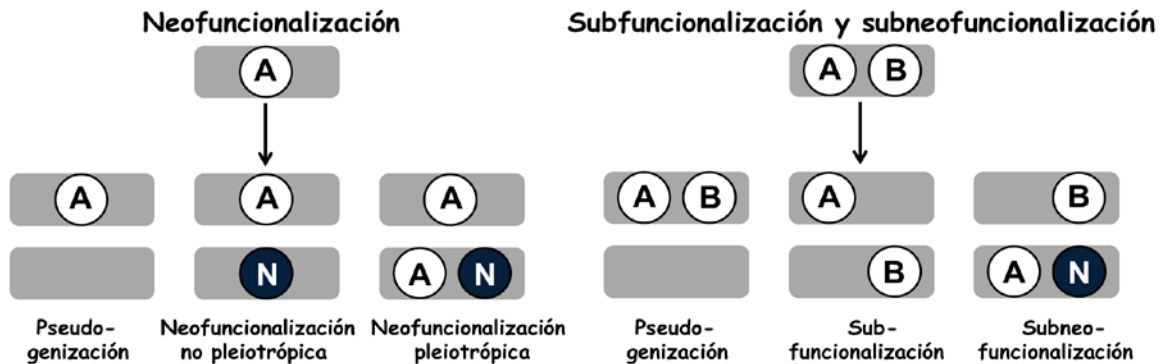


Figura 4. Representación esquemática de los procesos subsecuentes a la duplicación génica. Posterior a la duplicación puede ocurrir una pseudogenización, en la que una de las copias pierde la función; neofuncionalización pleiotrópica, cuando una de las copias mantiene la función ancestral y adquiere una nueva función, o no pleiotrópica cuando una copia mantiene la función ancestral y la segunda adquiere la nueva función; subfuncionalización, en el caso de un gen que cumpla con dos funciones, cada una de las copias desempeña una de las mismas de manera independiente; subneofuncionalización, hay una división de las funciones ancestrales, además de que una de las copias adquiere una nueva función (tomado de López *et. al.*, 2011).

La función de las proteínas depende de las propiedades bioquímicas que presente y de las interacciones proteína-proteína que tenga. Papp (2003) sugirió que un evento importante tras la duplicación es el cambio en los interactores de las proteínas parálogas. Se ha propuesto que el mantener interactores en común ocasiona un desbalance en la PIN de tal manera que merma la adecuación del organismo. Así mismo, se ha especulado que la mayoría de productos de genes duplicados no forman parte de un mismo subsistema en la PIN y por lo tanto, tienden a no compartir interactores (Wagner, 2001). Sin embargo, también se ha demostrado que la duplicación génica puede dar origen a nuevos sistemas de regulación por medio de interacciones entre proteínas parálogas (Amoutzias, *et al.*, 2004). Ejemplo de ello, son la familia de factores de transcripción Mad, los cuales forman una compleja red de interacción que les permite regular la transcripción de genes involucrados en el crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular; en respuesta a diferentes vías de señalización. Los diferentes hetero y homo-oligómeros que se generan entre los distintos miembros de esta

familia y entre miembros de la familia Myc y Max, se unen a secuencias específicas del ADN, para posteriormente, reclutar complejos co-represores y co-activadores los cuales a su vez generan alteraciones en la estructura de la cromatina.

En proteínas homo-oligoméricas después de una duplicación, si se mantiene una alta identidad entre ellas, y se mantienen las interfaces de oligomerización, estas podrían formar complejos hetero-oligoméricos con nuevas propiedades funcionales, catalíticas y estructurales, distintas a las de los complejos homo-oligoméricos. (Nooren & Thornton, 2003). Por ello, el estudio de las interacciones entre proteínas parálogas y las propiedades que emergen de las mismas resultan relevantes.

### ***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

El genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con un 30% de genes parálogos, es decir, casi 1000 pares de genes (Mewes, *et al.*, 1997) lo cual convierte a *S. cerevisiae* en un buen modelo de estudio para analizar interacciones entre proteínas parálogas. Interacciones entre algunos productos de genes parálogos ya han sido reportadas; un caso caracterizado de interacciones entre proteínas parálogas son las glutamato deshidrogenasas productos de los genes *GDH1* y *GDH3* (DeLuna, *et al.*, 2001).

Cuando la levadura se encuentra en condiciones fermentativas, Gdh1 es la isoforma predominante encargada de la síntesis de glutamato. Sin embargo, en condiciones respiratorias se induce la expresión de *GDH3* cuyo producto se demostró forma hetero-oligómeros con Gdh1 (DeLuna, *et al.*, 2001). Es probable que estas formas permitan regular el balance entre la producción de glutamato para la síntesis de amino ácidos y la concentración necesaria de  $\alpha$ -cetoglutarato para el ciclo de Krebs (figura 5).

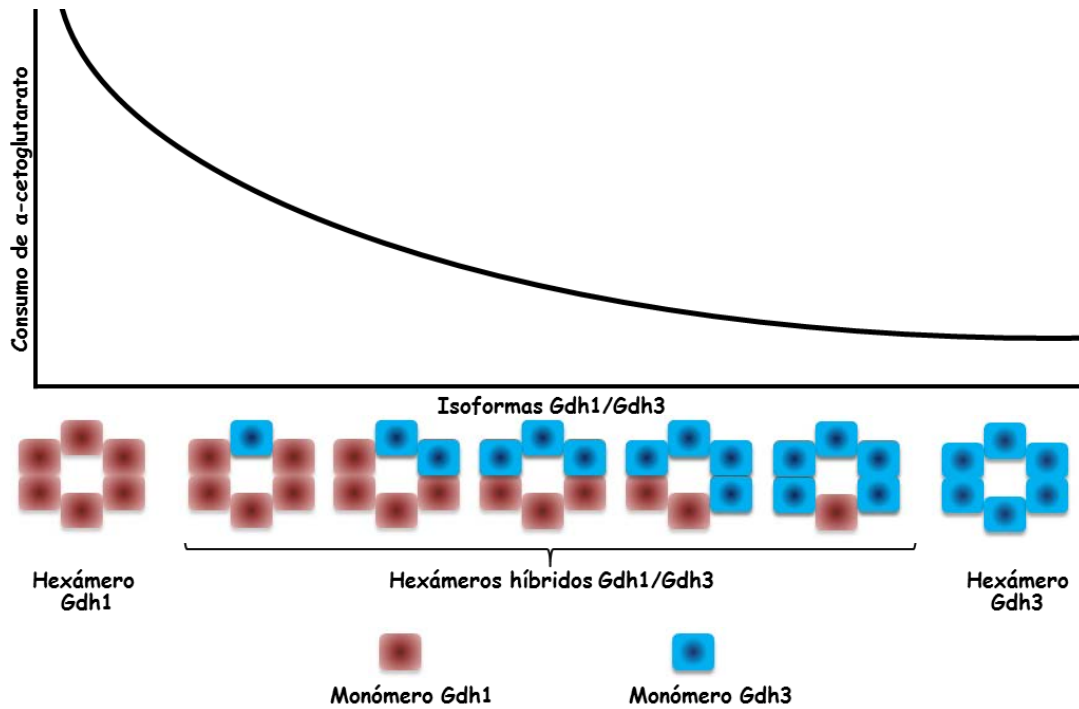


Figura 5. Esquema de consumo de  $\alpha$ -cetoglutarato en función de la formación de diferentes isoformas de Gdh1/Gdh3, hexámeros híbridos. Tomado de López *et. al.*, 2011.

Las fosfofructo cinasas Pfk1 y Pfk2 catalizan la reacción de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato durante la glicólisis, estas enzimas ilustran otro caso de interacción entre proteínas parálogas en *S. cerevisiae*. Su estructura es un hetero-octámero conformado por cuatro subunidades de cada Pfk. Se requiere de la presencia de ambas para su correcta función y regulación. La mutación de cualquier subunidad afecta la respuesta de la levadura ante la adición de dextrosa (Kopperschlager, 1977).

La isocitrato deshidrogenasa mitocondrial en *S. cerevisiae*, también tiene una estructura hetero-octamérica de tetrámeros de Idh2 que constituyen el dominio catalítico e Idh1 que constituyen el dominio regulatorio. Estas proteínas comparten un 42% de identidad en su secuencia de amino ácidos (Keys & McAlister-Henn, 1990).

Otros parálogos cuyas interacciones se han propuesto, son las homocitrato sintasas Lys20 y Lys21, ambas participan en la síntesis de lisina y tienen diferente



afinidad por su sustrato. Se ha propuesto que la heteroforma Lys20/Lys21 es más estable que el homodímero Lys20/Lys20, pero también tiene una mayor afinidad por sus sustratos en comparación al homodímero Lys21/Lys21, esto podría implicar una mejor regulación para la síntesis de lisina y el uso balanceado de los sustratos (Quezada, *et al.*, 2008).

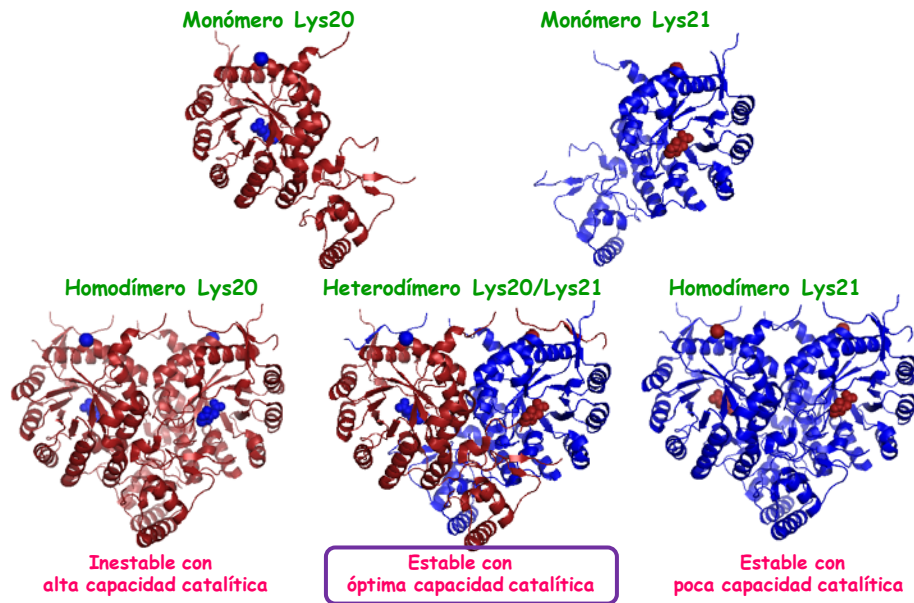


Figura 6. Propiedades de los oligómeros de Lys20 y Lys21. Se muestra una caricatura de la estructura cristalina de los monómeros Lys20 y Lys21, y de las conformaciones diméricas que se presume existen como resultado de su asociación: el homodímero Lys20 es inestable pero con alta capacidad catalítica, el homodímero Lys21 es estable pero tiene una baja capacidad catalítica; se ha propuesto que el heterodímero Lys20/Lys21 tiene una estabilidad y capacidad catalítica intermedias.

## Eno1 y Eno2 un caso específico

Las enzimas Eno1 y Eno2 son enzimas diméricas que catalizan la reacción de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (figura 7). Esta reacción corresponde a la penúltima de la glicólisis y la segunda de la gluconeogénesis (figura 8). Ambas enzimas son producto de los genes parálogos *ENO1* y *ENO2*, los cuales tienen un 95% de identidad en secuencia (figura 9). Los genes de las enolasas son altamente conservados a lo largo de las diferentes especies y se ha encontrado que otras levaduras presentan varios genes de las mismas (Holland, *et al.*, 1981).

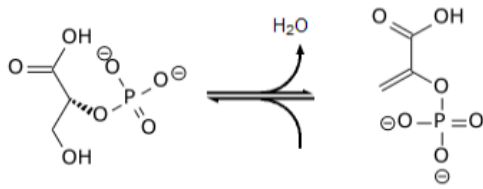


Figura 7. Reacción que catalizan las enolasas, la interconversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Tomado de: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycolysis>

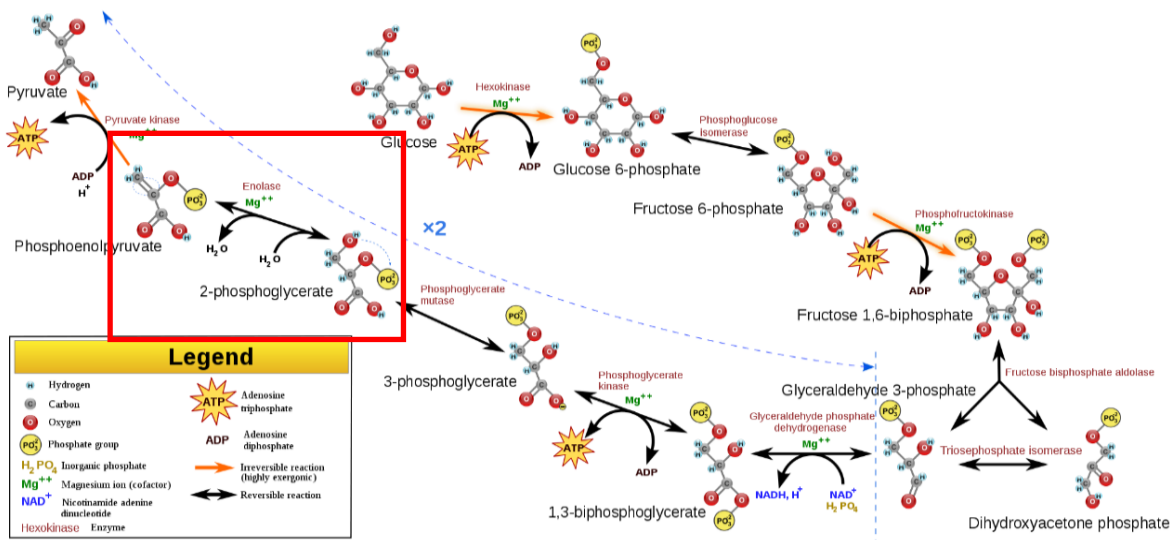


Figura 8. Esquema de la glicólisis y gluconeogénesis. Se ilustra el lugar que ocupan las enolasas (recuadro rojo) dentro de estas vías. Tomado de: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glycolysis.svg>

Se sabe que estas enzimas pueden formar 3 estructuras diméricas producto de las combinaciones de monómeros de Eno1 y Eno2, es decir, asociaciones homoméricas Eno1/Eno1, Eno2/Eno2 y un heterómero compuesto por Eno1/Eno2 (McAlister & Holland, 1982). Estudios bioquímicos demostraron que el homodímero de Eno1 es inhibido por los sustratos glicolíticos, el homodímero de Eno2 se inhibe por sustratos gluconeogénicos y el heterodímero no presenta inhibición por ninguno de los dos sustratos (Entian, *et al.*, 1987), a pesar de estar reportadas las tres diferentes isoformas de las enolasas la discusión sobre su existencia *in vivo* no ha sido aclarada.

A

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Eno1 MAVSKVYARS VYDSRGNPTV EVELTTEKGV FRSIVPSGAS TGVHEALEMR DGDKSKWMGK GVLHAKNVN NVIAPAFVKA
Eno2 MAVSKVYARS VYDSRGNPTV EVELTTEKGV FRSIVPSGAS TGVHEALEMR DEDKSKWMGK GVMNAVNVN NVIAAAAFVKA

      90     100     110     120     130     140     150     160
Eno1 NLDVVDQKAV DDFLHSLDGT ANKSKLGANA ILGVSFAASR AAAAEKKNVPL YKHLADLSKS KTSPYVLPVP FLNVLNGGSH
Eno2 NLDVVDQKAV DDFLHSLDGT ANKSKLGANA ILGVSFAASR AAAAEKKNVPL YKHLADLSKS KTSPYVLPVP FLNVLNGGSH

      170     180     190     200     210     220     230     240
Eno1 AGGALALQEF MIAPTGAQTF AEAMRIGSEV YHNLKSLTKK RYGASAGNVG DEGGVAPNIQ TAEALDLIV DAIKAAGHDG
Eno2 AGGALALQEF MIAPTGAQTF AEAMRIGSEV YHNLKSLTKK RYGASAGNVG DEGGVAPNIQ TAEALDLIV DAIKAAGHDG

      250     260     270     280     290     300     310     320
Eno1 KIKIGLDCAS SEFFKDGKYD LDFKNPNSDK SKWLTGVELA DLYHSLMKRY PIVSIEDPPA EDDWEAWSHF FKTAGIQIVA
Eno2 KIKIGLDCAS SEFFKDGKYD LDFKNPESDK SKWLTGVELA DLYHSLMKRY PIVSIEDPPA EDDWEAWSHF FKTAGIQIVA

      330     340     350     360     370     380     390     400
Eno1 DDLTVINPKR IATAIEKKA DALLLKVNQI GTLSESIKAA QDSFAAGWV MVSHRSGETE DTFIADLVVG LRTGQIKTGA
Eno2 DDLTVINPAR IATAIEKKA DALLLKVNQI GTLSESIKAA QDSFAANWV MVSHRSGETE DTFIADLVVG LRTGQIKTGA

      410     420     430
Eno1 PARSERLAKL NQLLRIEEEL GDNVAFAGEN FHHGDKL
Eno2 PARSERLAKL NQLLRIEEEL GDKAVYAGEN FHHGDKL

```

B

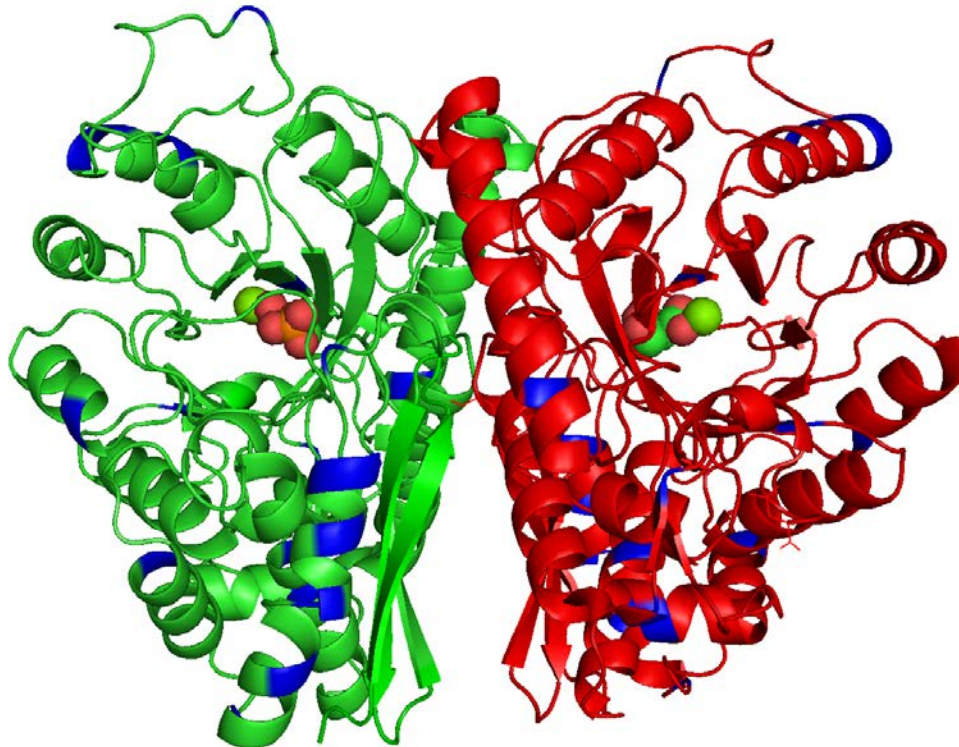


Figura 9. A) Alineación de secuencia de aminoácidos de enolasas en *S. cerevisiae*. Se muestra el alineamiento entre las dos proteínas, los cuadros negros corresponden a aquellos residuos diferentes entre Eno1 y Eno2. B) Representación gráfica de un heterodímero Eno1/Eno2, se muestran los monómeros de color verde y rojo y las diferencias a nivel de aminoácidos entre ambas enolasas en azul. (PDB, 2ONE; Zhang *et. Al.* 1997)

La expresión de las enolasas depende de la fuente de carbono, Eno2 se expresa 20 veces más en dextrosa que en fuentes de carbono no fermentables como etanol; se ha descrito que los niveles de expresión de Eno1 tienen una menor fluctuación (Cohen, *et al.*, 1987). Estas fluctuaciones en la expresión así como las diferencias que presentan en la inhibición por sustratos sugieren una especialización de las enzimas hacia una función específica en la glicólisis o la gluconeogénesis, sin dejar clara la función del heterodímero. Se ha evaluado *in vitro* mediante ensayos de actividad en gel la prevalencia de las tres isoformas en diferentes fuentes de carbono y se han determinado fluctuaciones de actividad entre las mismas (figura 10, Entian, *et al.*, 1987).

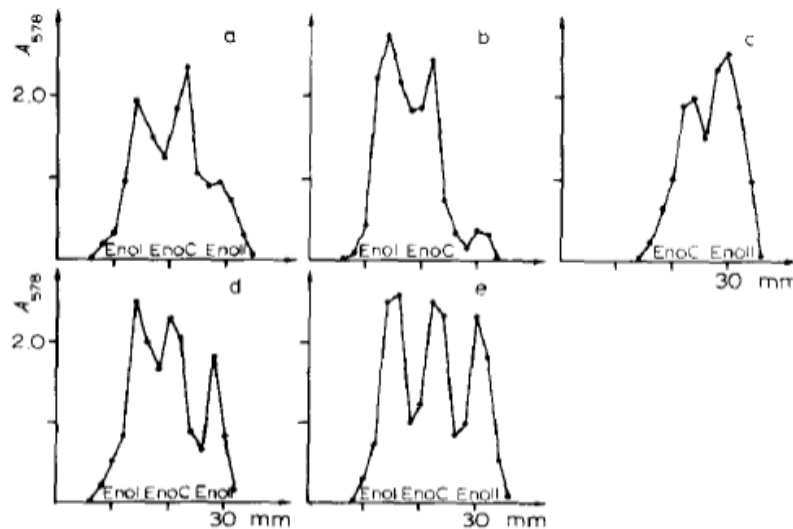


Figura 10. Prevalencia de actividad de las diferentes isoformas de enolasas. Homodímeros de Eno1 (EnoI) y Eno2 (EnoII) así como el heterodímero (EnoC) en diferentes fuentes de carbono. Las graficas muestran la actividad de las distintas formas de enolasas, la absorbancia medida a 578 nm del ensayo de actividad en relación a la movilidad electroforética. (a) etanol 3%, (b) acetato 2%, (c) dextrosa 4%, (d) lactato 3% y (e) glicerol 3%. Tomada de Entian, *et al.*, 1987.

La figura 10 muestra que hay una mayor actividad del homodímero Eno1 en etanol y acetato, una mayor presencia de homodímero de Eno2 en dextrosa y existe una actividad similar de estas dos isoformas en lactato y glicerol. Además de las fluctuaciones en la actividad de los homodímeros, en todas las condiciones hay una presencia de heterodímero de Eno1/Eno2 (EnoC). Esto sugiere que esta isoforma es importante dentro del metabolismo central del carbono en *S.*

*cerevisiae*. Los reportes mencionan que la actividad del heterodímero puede ser un artefacto del ensayo *in vitro*, dejando como interrogante la existencia y prevalencia de las diferentes isoformas *in vivo* (Entian, *et al.*, 1987).

### **Metodologías para el análisis de interacciones proteína-proteína**

El estudio de interacciones de proteínas presenta algunas problemáticas, la primera, es definir una interacción, las herramientas metodológicas han establecido que dos proteínas que se encuentren muy cercanas, en algún momento están interactuando, la naturaleza de esa interacción así como su funcionalidad quedan en segundo plano en muchos estudios, sobre todo los de gran escala. Para estudiar estas interacciones se han descrito metodologías diferentes, las más comunes son los ensayos de co-inmuno precipitación y doble híbrido. Sin embargo, estas metodologías tienen la limitante de sacar a los interactores de su contexto biológico y subcelular por lo que pueden implicar un sesgo en la obtención e interpretación de datos.

Las técnicas de complementación consisten en la fusión de dos fragmentos de proteínas reporteras a las proteínas que presuntamente están interaccionando. Los fragmentos complementarios por sí mismos no tienen una función, es mediante la asociación de las proteínas a las que están fusionados que se complementan, adquiriendo una función detectable. Para esto, se han utilizado fusiones a  $\beta$ -galactosidasa, dihidrofolato reductasa y diferentes luciferasas entre otras (figura 11). La desventaja de estas es que requieren la administración de reactivos exógenos y no necesariamente proporcionan información sobre la localización subcelular de dicha interacción. Se han realizado una serie de estudios globales de interactoma en *S. cerevisiae* usando diferentes metodologías de complementación como la dihidrofolato reductasa (Tarassov, *et al.*, 2008) y el ensayo de doble híbrido (Ito, *et al.*, 2000; 2001 a; 2001 b; Rajagopala & Uetz, 2011). Sin embargo, dadas sus limitaciones es necesario diseñar nuevas aproximaciones.

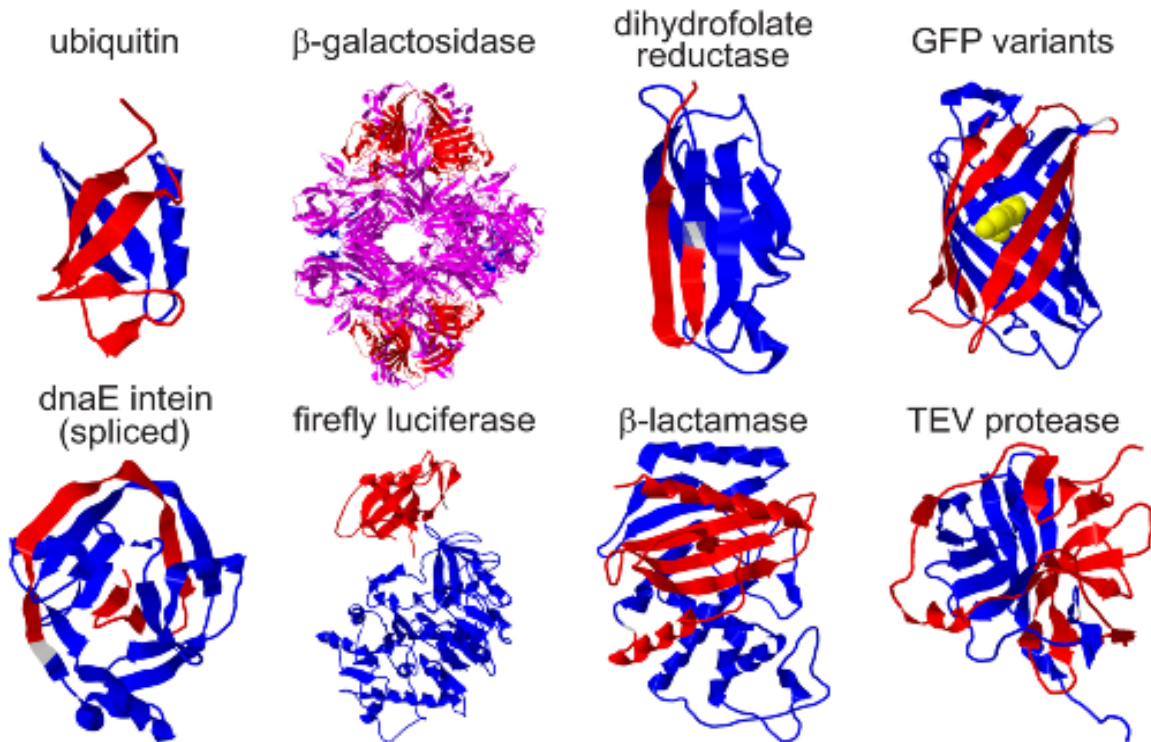


Figura 11. Métodos de complementación para la detección de interacciones entre proteínas. El esquema muestra representaciones gráficas de las distintas proteínas usadas para detectar interacciones, los colores rojo y azul ilustran fragmentos complementarios. Tomado de Kerppola, 2009.

### El uso de la GFP en los estudios de interacción proteína-proteína

Como alternativa a los ensayos de complementación no fluorescentes mencionados, están los ensayos con fluorescencia, como FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) y el ensayo de complementación BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), ambas metodologías permiten la visualización de interacciones mediante la emisión de una señal fluorescente. El FRET utiliza la transferencia de energía de un fluorocromo, la cual se encarga de excitar a un segundo fluorocromo cuya señal de emisión se detecta; esta transferencia de energía de un fluorocromo a otro sólo se establece si se encuentran muy próximos, es decir acoplados a proteínas que están interactuando (figura 12).

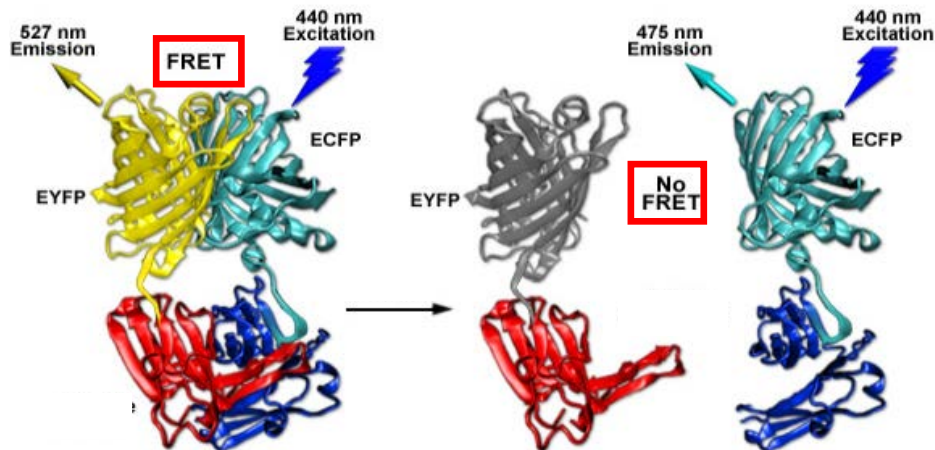


Figura 12. Esquema del funcionamiento del FRET. Para detectar una interacción se fusionan dos proteínas fluorescentes a dos compañeros de interacción, en este caso ECFP y EYFP. La ECFP es capaz de transferir energía y excitar a la EYFP por resonancia cuando se encuentran muy próximas, por lo que la señal fluorescente puede demostrar una interacción. Tomado de: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fret/fretintro>

Esta metodología ha probado ser de gran utilidad, sin embargo, el análisis post imagen resulta ser sumamente complejo.

En el caso de BiFC, se utiliza la proteína verde fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein) y sus diversas variantes (FP's), esta metodología consiste en fusionar versiones truncas complementarias de las diversas FP's a las proteínas que se presume interactúan. Si hay una interacción física entre ellas, se reconstituye la proteína fluorescente y por lo tanto hay emisión de fluorescencia. Las ventajas de esta metodología son: i) la detección de interacciones *in vivo* sin la necesidad de agregar reactivos exógenos, ii) visualización de la localización subcelular de la interacción, iii) cuantificación mediante el uso de microscopía o citometría de flujo, iv) permite visualizar la competencia entre diferentes compañeros de interacción, a través de una variante de esta técnica llamada Multicolor-BiFC. El BiFC se ha usado de manera exitosa en muchos organismos como *Escherichia coli* (Atamakuri, *et al.*, 2005), *Agrobacterium tumefaciens* (Cascales, *et al.*, 2005), *Bacillus subtilis* (Nakahara, *et al.*, 2006; Soufo & Graumann, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Blondel, *et al.*, 2005; Kass, *et al.*,

2006), *Acremonium chrysogenum* (Hoff & Kuck, 2005), *Aspergillus nidulans* (Blumenstein, *et al.*, 2005), *Magnaporthe grisea* (Zhao & Hu, 2007), múltiples especies de plantas (Abe, *et al.*, 2005), *Caenorhabditis elegans* (Nakahara, *et al.*, 2006) y líneas celulares de mamíferos (Hu & Kerppola, 2003). En el caso de multicolor BiFC, se ha utilizado para determinar la localización subcelular y afinidad de interacciones entre proteínas de la familia Myc/Mad/Max (Hu & Kerppola, 2003), esta metodología consiste en fusionar el extremo carboxilo de la proteína fluorescente cian (CC), a una proteína con dos compañeros de interacción cuya preferencia se quiere evaluar. La CC puede complementar a su propio extremo amino (CN) resultando en emisión de fluorescencia azul y al extremo amino de la proteína fluorescente amarilla (VN), resultando en emisión de fluorescencia amarilla. Las CN y VN se fusionan a ambos interactores a la proteína cuya preferencia de interacción se quiere evaluar (Kerppola, 2009) (figura 13).

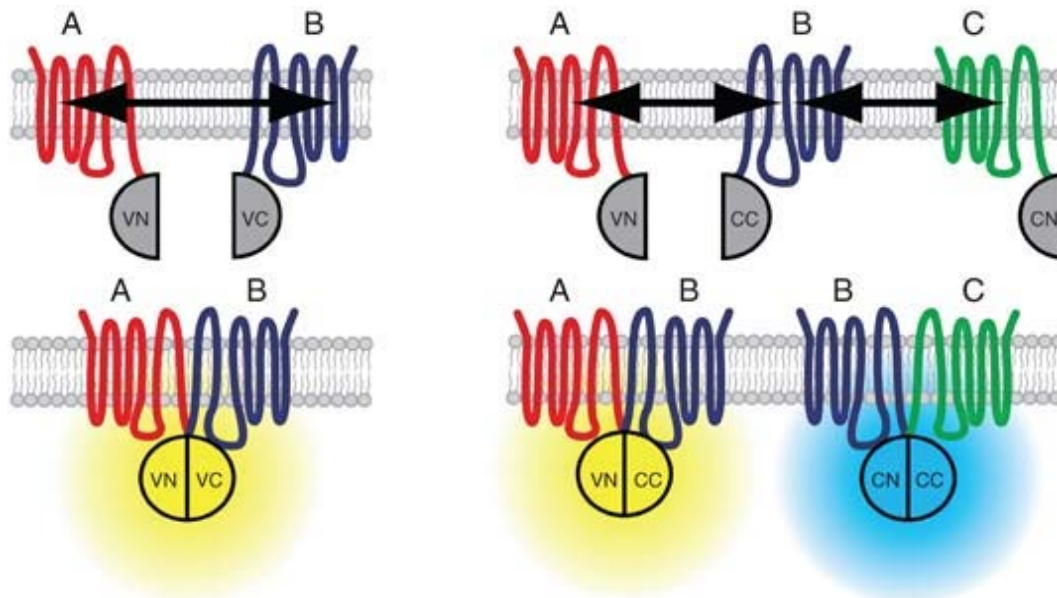


Figura 13. Esquema de BiFC y multicolor-BiFC entre receptores de siete dominios transmembranales. En el caso del BiFC (izquierda) la interacción entre dos proteínas reconstituye la proteína venus fluorescente (unión del extremo amino VN y carboxilo VC). El Multicolor BiFC (derecha) muestra la competencia de interacción de la proteína B con las proteínas A y C para generar una señal en amarillo o azul respectivamente. Tomado de Vidi *et al.*, 2010.



## Objetivo General

Generar una colección de plásmidos que permitan mediante BiFC determinar las interacciones oligoméricas de Eno1 y Eno2 en *S. cerevisiae*.

## Objetivos particulares

- Generar una colección de plásmidos para análisis de BiFC y multicolor BiFC.
- Determinar la existencia de las interacciones entre Eno1 y Eno2 de *S. cerevisiae* mediante BiFC.
- Analizar las fluctuaciones de las conformaciones oligoméricas de Eno1 y Eno2 en distintas fuentes de carbono.

## Material y Métodos

### Cepas

En este estudio se utilizaron las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) y Y8205 (*MATa can1Δ::STE2pr-SpHIS5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0met15Δ0 TEF1-mCherry*). Estas se transformaron con la metodología de acetato de litio (descrita más adelante) para realizar las fusiones con las diferentes variantes truncas y completas de la yECitrine (variante de la GFP) y CFP (Cyan Fluorescent Protein).

### Condiciones de cultivo

Los cultivos crecieron a 30°C con agitación de 250rpm. El medio rico utilizado para los precultivos fue YPD, extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2% y dextrosa al 2%. Los medios de cultivo utilizados para analizar los complejos oligoméricos de Eno1 y Eno2 mediante BiFC fueron: YP dextrosa 4%, YP etanol 3% y YP lactato 3%. Las células crecieron en las diferentes fuentes de carbono hasta una densidad óptica (D.O.) = 0.5 en matraces con una proporción

líquido/aire 1/5, de donde fueron colectadas para su estudio por microscopía y citometría de flujo. Para la adquisición de datos se tomaron 3 colonias independientes de cada cepa.

## Generación de plásmidos para BiFC y Multicolor BiFC

Para la generación de plásmidos de BiFC y multicolor BiFC se utilizaron como templado los plásmidos pKT101 y pKT175 (Sheff & Thorn, 2004), que codifican para la CFP con el gen HIS5 de *Schizosaccharomyces pombe* como marcador de selección y la yECitrine con URA3 de *Candida albicans* como marcador de selección respectivamente (figura 14).

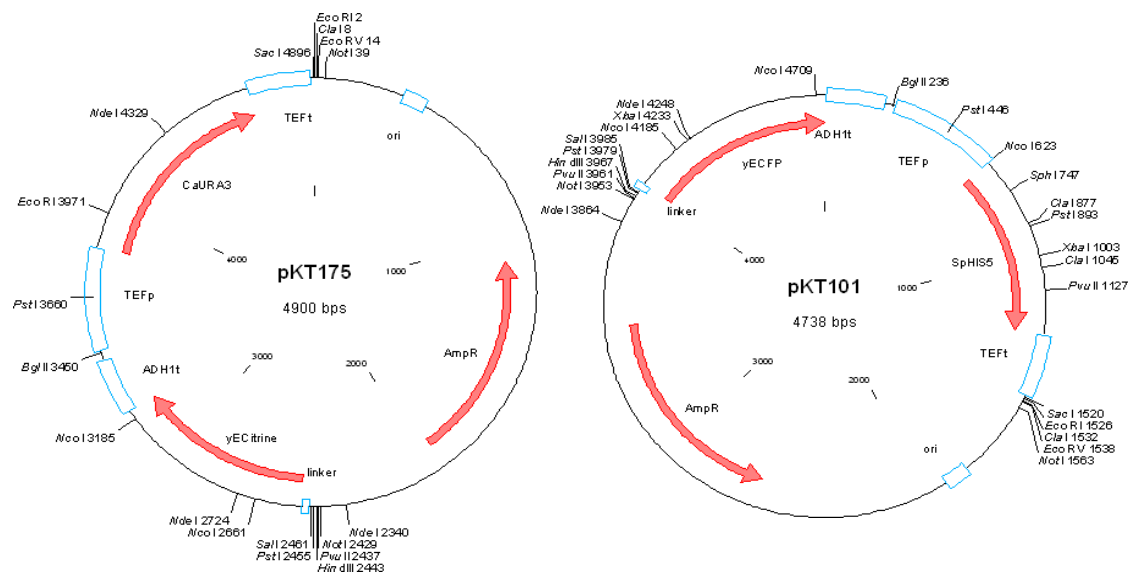


Figura 14. Esquema de los plásmidos pKT175 y pKT101. Se muestran los sitios de corte de algunas enzimas de restricción y las regiones que codifican para las FP's, los marcadores de selección y el gen AmpR que confiere resistencia a la ampicilina, útil en la replicación del plásmido en *E. coli*.

Como se mencionó previamente, se modificaron los plásmidos utilizando el kit QuikChange site directed mutagenesis (Stratagene #200518) siguiendo la metodología descrita en el manual de usuario. Se realizaron las mutaciones para obtener las mitades CN-155, CC-155, YN-155 y YC-155 descritas por Hu y Kerppola (2003). La mitad amino terminal (N) codifica para los primeros 155

aminoácidos y la carboxilo terminal (C) codifica para los aminoácidos 156-238. Para el PCR mutagénico se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

<b>Mut CN 155 Fw</b>	CTCTCACAATGTTTACATCACTGCTtAatAACAAAAGAATGGTATCAAAGC
<b>Mut CN 155 Rv</b>	GCTTTGATACCATTCTTTTGTtTaAGCAGTGATGTAACATTGTGAGAG
<b>Mut YN 155 Fw</b>	CTCTCACAATGTTTACATCATGGCTtAatAACAAAAGAATGGTATCAAAG
<b>Mut YN 155 Rv</b>	CTTTGATACCATTCTTTTGTtTaAGCCATGATGTAACATTGTGAGAG
<b>Mut CC-YC 155 Fw</b>	GGTGACGGTGCTGGTTTAATTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAG
<b>Mut CC-YC 155 Rv</b>	CTTTGATACCATTCTTTTGTtTGTCAATTAACCAGCACCGTCACC
<b>Conf p101/175 Fw</b>	GGTGACACTATAGAACGCGG
<b>Conf p101/175 Rv</b>	CCTGAGAAAGCAACCTGACC
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el PCR mutagénico de los plásmidos y para el proceso de secuenciación.	

Los oligonucleótidos Mut CN155 Fw y Rv, así como Mut YN 155 Fw y Rv se utilizaron para que la secuencia de las FP's de los plásmidos pKT101 y pKT175 respectivamente presenten un codón de término después de los nucleótidos que codifican para el amino ácido 154, en minúsculas se muestran los nucleótidos mutados de la secuencia original el resto son idénticos a dicha secuencia. Los oligonucleótidos Mut CC-YC 155 Fw y Rv están diseñados para escindir los primeros 462 nucleótidos los cuales codifican para los aminoácidos 1-154. Los oligonucleótidos Conf p101/175 Fw y Rv se utilizaron para secuenciar los diferentes plásmidos para asegurar que las mutaciones se realizaron de manera exitosa.

El protocolo del kit de mutagénesis se esquematiza en la figura 15. Se toma un plásmido patrón (verde con amarillo), se introduce en una reacción de PCR con un par de oligonucleótidos cuya secuencia contiene las mutaciones que se quieren introducir en el plásmido (azul y rosa). Durante la reacción de PCR una polimerasa sintetiza nuevos plásmidos que tienen la mutación deseada (X). Posteriormente se trata la reacción con una enzima de digestión que digiere específicamente ADN metilado, es decir las copias del plásmido original que quedan en la reacción (enzima *Dpn1* 1 h a 37°C). De manera que se pueden seleccionar plásmidos nuevos que contienen la mutación deseada; la presencia de la mutación en los plásmidos se verifica por secuenciación.

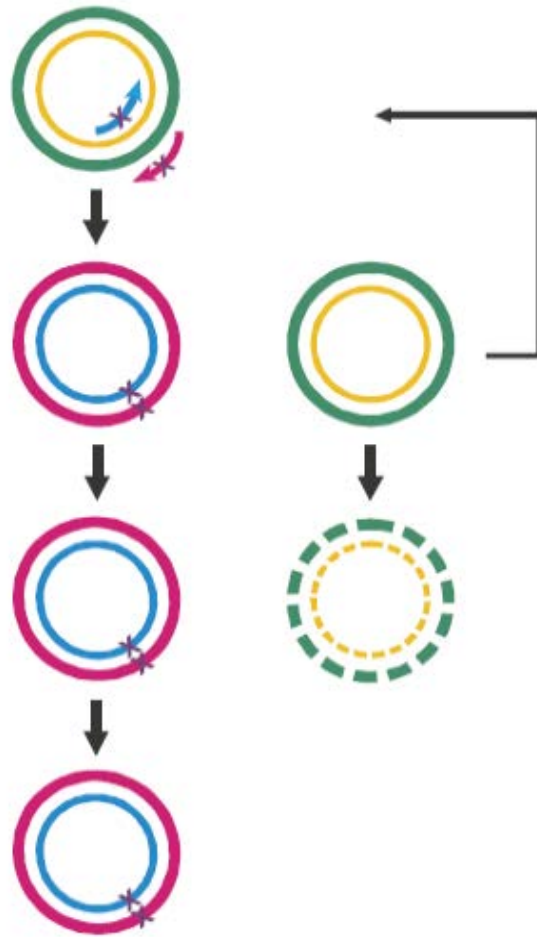


Figura 15. Esquema de funcionamiento del kit Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit. En verde con amarillo se dibuja el plásmido templado y en rosa con azul los oligos utilizados para insertar la mutación deseada (X) y el plásmido mutado. Después del PCR mutagénico, se digiere de manera específica el plásmido templado (línea punteada verde con amarillo). Tomada del manual de usuario.

Las condiciones del PCR mutagénico se muestran a continuación:

Elemento	Cantidad (µl)
Buffer de reacción 10X	2.5
Plásmido templado (25ng/µl)	0.5
Primer Fw 100 ng/µl	0.63
Primer Rv 100 ng/µl	0.63
DNTP mix 10 mM	0.5
Agua	19.8
Polimerasa pfuTurbo 2.5 U/µl	0.5
Total	25

Tabla 2. Condiciones para el PCR mutagénico de acuerdo al manual de usuario.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
95	30	1
95	30	18
55	60	
68	300	
4	∞	∞

Tabla 3. Programa del termociclador del PCR mutagénico.

Después de obtener los plásmidos con las mutaciones pertinentes, se intercambiaron los módulos de selección entre los mismos para tener nuevos marcadores de selección. Para esto se digirieron cada uno de los plásmidos con las enzimas *SacI* y *BglII* (3 h a 37°C), las cuales tienen un sitio de restricción en los extremos de los marcadores de selección. Posteriormente se corrieron en un gel de agarosa, se purificaron los dos fragmentos de ADN, que fueron el vector y el marcador de selección, ambos por separado. Se ligaron cada uno de los vectores digeridos con el marcador de selección contrario al original (*URA3* y *HIS5*) con la T4 ligasa (16°C 12 h). El siguiente esquema ilustra este proceso.

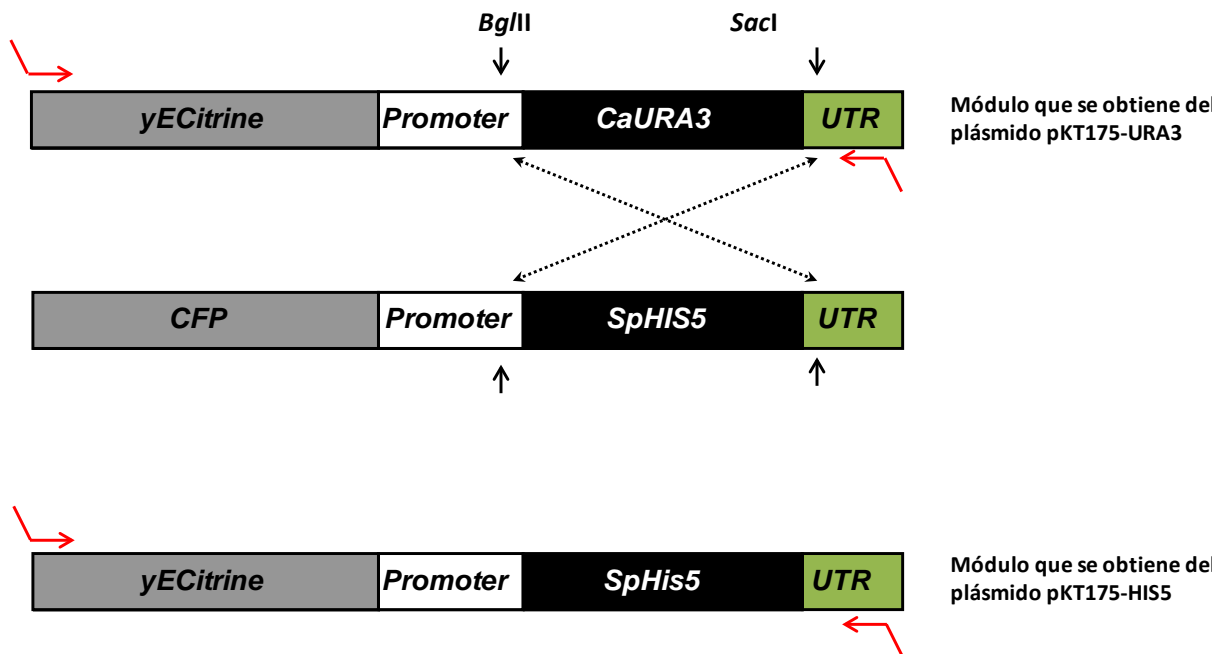


Figura 16. Esquema de la metodología seguida para intercambiar los módulos de selección entre los diferentes plásmidos. Las flechas rojas son el lugar en donde se amplifican los módulos para la transformación. Las flechas negras muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción.

La colección de plásmidos resultante es:

- pKT175-His (YFP)
- pKT101-Ura (CFP)
- pYN155C-Ura
- pYN155C-His
- pYC155C-Ura
- pYC155C-His
- pCN155C-His
- pCN155C-Ura
- pCC155C-His
- pCC155C-Ura

### Transformación de acetato de litio

Para implementar la metodología de BiFC se fusionaron los diferentes genes que codifican para las FP's a *ENO1* y *ENO2* sobre el genoma de *S. cerevisiae* mediante la técnica de transformación con acetato de litio (figura 17).

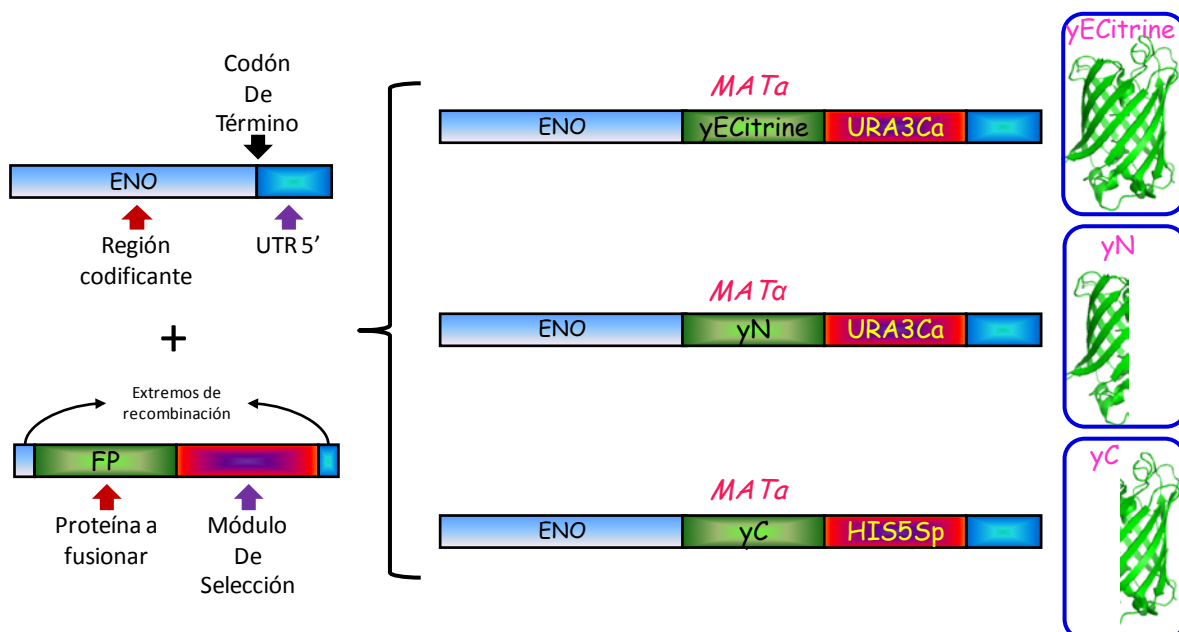


Figura 17. Esquema del protocolo de transformación. Se insertan por recombinación homóloga a ambos extremos del codón de término las diferentes FP's con su respectivo módulo de selección.

Se amplificaron módulos para fusionar al extremo carboxilo de Eno1 y Eno2 las construcciones pertinentes de las FP's, esto mediante la técnica de PCR con la Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), bajo las siguientes condiciones:

Elemento	Concentración del Stock	Cantidad (µl/reacción)	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-	68	-
DMSO	-	3	3%
Buffer phusion 5X	5X	20	1X
Oligo Fw	100 ng/µl	2.5	2.5 ng/µl
Oligo Rv	100 ng/µl	2.5	2.5 ng/µl
DNTP's	10 mM	2	200 µM
Plásmido Templado	100 ng/µl	1	1 ng/µl
Polimerasa Phusion	2 Unidades/µl	1	2 Unidades/100µl
TOTAL	-	100µl	-

Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificar módulos de Eno1 y Eno2.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
98	60	1
98	20	32
63	30	
72	90	
4	∞	∞

Tabla 5. Condiciones de PCR para amplificación de módulos.

Los oligos Forward (Fw) y Reverse (Rv) constan de dos regiones, una de 50 pares de bases (pb) con secuencia homóloga a la sección 5' (Fw) y 3' (Rv) próximas al codón de término de *ENO1* y *ENO2*, para la construcción del control negativo, secuencia homóloga próxima al codón de inicio de *ENO1*, esta última genera una versión no-acoplada bajo el promotor de Eno1 de las diferentes FP's. La otra sección de 18 pb es complementaria a los plásmidos, a partir de los cuales se amplificarán los módulos. Los oligos Fw y Rv utilizados para amplificar los diferentes módulos se muestran en la siguiente tabla. En mayúsculas se encuentran las regiones homólogas al genoma de la levadura y en minúsculas y cursiva, las bases complementarias al plásmido.

Nombre	Secuencia
Eno1Fw Tag	GTGACAACGCTGTTTTTCGCTGGTGAAAACCTCCACCACGGTGACAAATTA <i>ggtgacggtgctggttta</i>
Eno1Rv Tag	TAAATGACAAAAAACGCTGTTTTTTGGACTAGAAGGCTTAATCAAAAGCT <i>tcgatgaattcgagctcg</i>
Eno2Fw Tag	GTGACAAGGCTGTCTACGCCGGTGAAAACCTCCACCACGGTGACAAGTTG <i>ggtgacggtgctggttta</i>
Eno2Rv Tag	ATGATGAAAAAATAAGCAGAAAAGACTAATAATTCTTAGTTAAAAGCACT <i>tcgatgaattcgagctcg</i>
PEnoFw Tag	ATAAAAAACCAAGCAACTGCTTATCAACACACAAACACTAAATCAAATG <i>ggtgacggtgctggttta</i>
PEnoRv Tag	GGGTTACCACGGGAGTCGTAGACGGATCTAGCGTAACTTTAGAGACAGC <i>tcgatgaattcgagctcg</i>

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los módulos de transformación de las enolasas. En mayúsculas se encuentran las secuencias homólogas al genoma de *S. cerevisiae* y en minúsculas y cursivas la secuencia homóloga a los plásmidos.

Para el protocolo de transformación de todas las cepas generadas en este estudio se hicieron pre-cultivos en medio YPD de 12-16 h. A partir de éste, se inoculó un cultivo nuevo a una D.O. de ~0.2. Éste se incubó por aprox. 4 h hasta alcanzar una D.O. de ~0.7. Posterior a ello, se centrifugaron las células y se lavaron con agua estéril. Después se resuspendió el pellet en una solución de Acetato de Litio (100mM, Tris HCl 10mM pH7.5, EDTA 1mM). Posteriormente se incubó en la solución PEG (polietilenglicol 35%, Acetato de Litio 100mM, Tris HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM) por 30 min a 30°C y se dio un choque térmico a 42°C por 15 min. Finalmente se lavaron las células con agua estéril y se cultivaron en el medio de selección pertinente.

Para confirmar las transformaciones se hizo PCR sobre ADN genómico de colonias aisladas. El protocolo de extracción de ADN genómico fue por Tritón X-100 (Tritón X-100 2%, SDS 1%, 100mM NaCl, 10mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA) y Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1). Los oligonucleótidos de confirmación amplifican un fragmento de ≈800 pb a los extremos de la zona de fusión de las FP's. De tal manera que se confirma la fusión a las mismas con el cambio en la longitud del fragmento amplificado. La secuencia de los oligonucleótidos y condiciones del PCR se muestran a continuación (las condiciones del PCR son las mismas mostradas anteriormente).



Nombre	Secuencia	Tamaño del fragmento
Eno1 conf Fw	CATCAAGGCTGCTCAAGACTC	843
Eno1 conf Rv	GCACATACGACACATCCTCTC	
Eno2 conf Fw	CACCAACCCAGCTAGAATTGC	802
Eno2 conf Rv	GCCACCATTCAAAGACGACAC	
PEno conf Fw	AGGCGGGTTATCTACTGATCC	859
PEno conf Rv	GCAGCCAAAGAAACACCCAAG	

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos de confirmación de las cepas. Se muestra el tamaño del fragmento silvestre.

Elemento	Concentración del Stock	Cantidad (µl/reacción)	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-	13.4	-
Buffer phusion 5X	5X	4	1X
Oligo Fw	100 ng/µl	0.5	2.5 ng/µl
Oligo Rv	100 ng/µl	0.5	2.5 ng/µl
DNTP's	10 mM	0.4	200 mM
ADN genómico	100 ng/µl	1	5 ng/µl
Polimerasa Phusion	2 Unidades/µl	0.2	2 Unidades/100µl
TOTAL	-	20 µl	-

Tabla 8. Condiciones de PCR de confirmación.

Si la fusión en el extremo carboxilo no se llevó a cabo se amplifica el fragmento silvestre de ≈800 pb y si la fusión es exitosa, se amplifica un fragmento de ≈3000 pb que corresponde al gen fusionado con la FP y el marcador de selección. El tamaño del producto varía de acuerdo al marcador de selección utilizado y a la proteína fluorescente, los pesos correspondientes (pb) a los diferentes productos se muestran a continuación:

Secuencia	Tamaño del módulo	Eno1 conf	Eno2 conf	PEno conf
YN Ura	2541	3284	3243	3400
YC His	1917	2660	2619	2776
yECitrine Ura	2541	3284	3243	3400
yECitrine His	2379	3122	3081	3238

Tabla 9. Longitud de los diferentes módulos de transformación y fragmentos amplificados en el genoma posterior a la transformación.

## Cepas y cruzas para ensayos de BiFC

Para identificar las distintas formas oligoméricas de las enolasas se requieren diferentes construcciones y cruzas. El esquema que se muestra a continuación ilustra el protocolo a seguir para realizar estas construcciones (figura 18).

A partir de las cepas haploides BY4741-Eno1YcHis, BY4741-Eno2YcHis, Y8205-Eno1YnUra y Y8205-Eno2YnUra, se obtuvieron las cepas diploides Eno1YcHis/Eno1YnUra (**Eno1Yn/Eno1Yc**), Eno2YcHis/Eno2YnUra (**Eno2Yn/Eno2Yc**) y Eno2YcHis/Eno1YnUra (**Eno1Yn/Eno2Yc**), éstas sirven para cuantificar la señal del homodímero Eno1, del homodímero Eno2 y el heterodímero Eno1/Eno2, respectivamente. Se generaron cepas diploides con ambos alelos de enolasas fusionadas a la secuencia de la yECitrine completa, esto es, cepas diploides Eno1yECitrine/Eno1yECitrine (**Eno1yECitrine**) y Eno2yECitrine/Eno2yECitrine (**Eno2yECitrine**). De este modo se puede comparar la cantidad total de proteína de enolasas con la prevalencia relativa de las formas oligoméricas obtenida mediante la señal de BiFC.

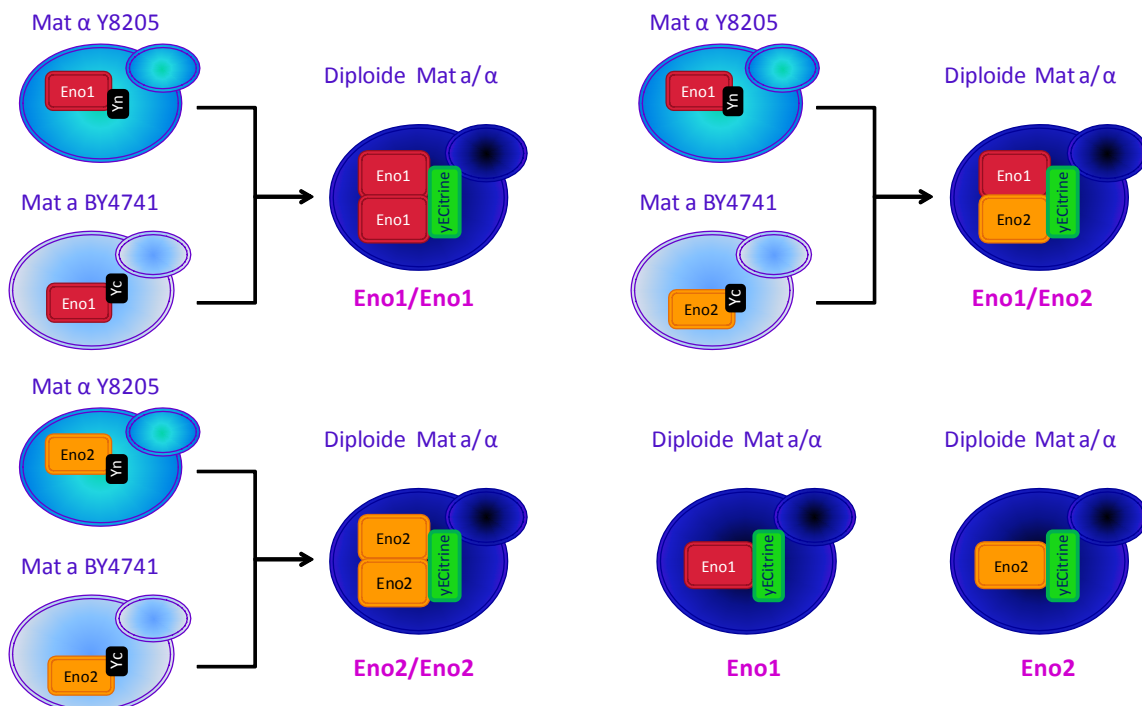


Figura 18. Metodología para estudiar las diversas formas oligoméricas de las enolasas, estas construcciones permitirán estudiar la prevalencia relativa de las diferentes isoformas en distintas fuentes de carbono.

El control negativo utilizado para estos experimentos fue la cepa PEno1YcHis/Eno1YnUra, una cepa diploide que expresa una mitad Yc de la yECitrine soluble no acoplada a ninguna proteína y la otra mitad fusionada a la

Eno1, esto con la finalidad de asegurar que la reconstitución de la yECitrine se debe a la interacción específica de las enolasas y no por una complementación de las mitades por sí mismas.

### **Microscopía**

Para determinar la localización subcelular de las enolasas y los complejos oligoméricos de las mismas, se analizaron las diferentes cepas por microscopía confocal. Para ello se utilizó un microscopio confocal Fluoview FV-1000 (Olympus) con un objetivo de inmersión en aceite 60X IX81 (UPLSAPO 60X O NA: 1.35). Con un zoom de 5 X y una apertura confocal de 3.5  $\mu\text{m}$ . Los parámetros de adquisición para la yECitrine fueron excitación a 488nm; emisión 520nm BF 500nm y un rango de 30nm. Para la mCherry se uso excitación de 545 nm y emisión de 580 nm. Su análisis se hizo en el software Olympus Fluoview FV1000 (versión 1.7).

### **Citometría de Flujo**

El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Con un laser de excitación de 488 nm y detector de 530nm. Los parámetros de adquisición son: FSC: E00 gain 3.45, SSC 489, FL1 gain 582. Utilizando el software Cell Quest Pro. La cuantificación subsecuente se hizo con el software libre Cyflogic.

### **Análisis de Datos**

El análisis de datos estadísticos y la construcción de las gráficas se realizó utilizando el software OriginPro 7.0 (OriginLab). Para el análisis de secuencias y construcción de oligonucleótidos utilizamos el software Clone Manager (Sci-Ed Software). Para generar las secuencias de amino ácidos y analizar los cromatogramas utilizamos el software BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carsbad, CA).

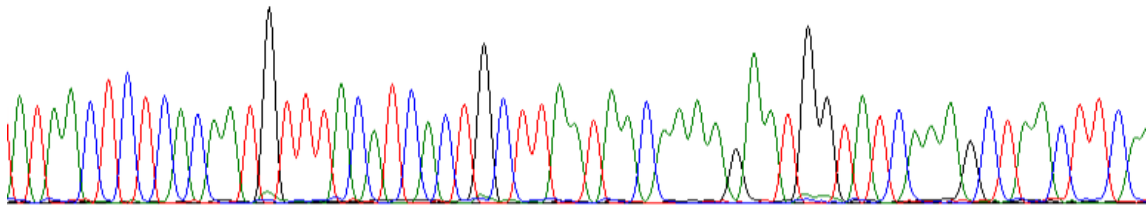
# Resultados

## Generación de la colección de plásmidos para análisis de BiFC y multicolor BiFC

Para generar los diversos plásmidos que permitieran análisis de interacción proteína-proteína mediante BiFC y multicolor BiFC se utilizó el Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene #200518). A continuación se muestra el cromatograma de la región mutada; el alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los templados originales vs. los mutados y el alineamiento de las secuencias codificantes para los fragmentos del extremo amino y la secuencia final de amino ácidos en el caso de los fragmentos del extremo carboxilo. Los cuadros rojos muestran en donde se realizaron mutaciones.

### pCN155C

ATAACTCTCACAA TGT T TACATCACTGCTTAA TAA CAAAAGAATGGTATCAAAGCTAACTTCA



CFP	1	atgggtgacggtgctggtttaattaacatgtctaaaggtgaagaattatcactgggtgtgtcccaatttgggtgaattagatggtgatgtaaatggct
CN155	1	atgggtgacggtgctggtttaattaacatgtctaaaggtgaagaattatcactgggtgtgtcccaatttgggtgaattagatggtgatgtaaatggct
CFP	101	acaaattttctgtctccggtgaaggtgaaggtgatgctacttacggtaaatgaccttaaaatttattgtactactggtaaatgcccagttccatggcc
CN155	101	acaaattttctgtctccggtgaaggtgaaggtgatgctacttacggtaaatgaccttaaaatttattgtactactggtaaatgcccagttccatggcc
CFP	201	aaccttagtcactactttaacttgggggtgtccaatgttttctagataccagatcatatgaacaacatgacttttcaagctgcccagcagaaggt
CN155	201	aaccttagtcactactttaacttgggggtgtccaatgttttctagataccagatcatatgaacaacatgacttttcaagctgcccagcagaaggt
CFP	301	tatgttcaagaagaactattttttcaagatgacggtaactacaagaccagagctgaagtcaggtttgaaggtgatcccttagttaaagaatcgaat
CN155	301	tatgttcaagaagaactattttttcaagatgacggtaactacaagaccagagctgaagtcaggtttgaaggtgatcccttagttaaagaatcgaat
CFP	401	taaaaggtattgatTTTaaagaagatggtaacatTTtaggtcacaatTggaatacattTataactctcacaatgttacatcactggtgacaaacaaaa
CN155	401	taaaaggtattgatTTTaaagaagatggtaacatTTtaggtcacaatTggaatacattTataactctcacaatgttacatcactggtgacaaacaaaa
CFP	501	gaatggtatcaaaagctaacttcaaaattagacacacaacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaactccaattgggtgatggt
CN155	501	gaatggtatcaaaagctaacttcaaaattagacacacaacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaactccaattgggtgatggt
CFP	601	ccagtcctgttaccagacaaccattacttatccactcaatctgacctatccaagatccaacgaaaagagagaccacatggtcttgttagaatttggtta
CN155	601	ccagtcctgttaccagacaaccattacttatccactcaatctgacctatccaagatccaacgaaaagagagaccacatggtcttgttagaatttggtta
CFP	701	ctgctgctggattaccatgggtatggatgaattgtacaataa
CN155	701	ctgctgctggattaccatgggtatggatgaattgtacaataa

CFP MGDGAGLINMSKGEELFTGVVPIIIVLEDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLPKFICTTGKLEVPWPPTLVTTTLTWGVQCF  
pCN155 MGDGAGLINMSKGEELFTGVVPIIIVLEDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLPKFICTTGKLEVPWPPTLVTTTLTWGVQCF

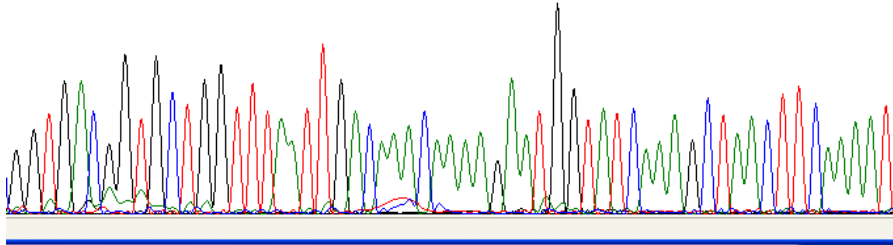
CFP SRYPDHMKQHDFFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYIYNSHNVY  
pCN155 SRYPDHMKQHDFFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDITLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYIYNSHNVY

CFP ITADRQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSTQSALSKDPEKRDHMLLEFVTAAGITH  
pCN155 ITADRQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSTQSALSKDPEKRDHMLLEFVTAAGITH

CFP GMDELYK\*  
pCN155 GMDELYK\*

## pCC155C

G G T G A C G G T G C T G G T T T A A T T G A C A A A C A A A A G A A T G G T A T C A A A G C T A A C T T C A A A A T :



pCC155 1 atgggtgacgggtgctggttaat-----  
CFP 1 atgggtgacgggtgctggttaataacatgctctaaagtgagaattattcaactggtgtgtcccaatttggttgaattagatggtgatgtaaggtc

pCC155 -----  
CFP 101 acaaatctctgctccggggaaggtgaaggtgatgctacttacgtaaatgacctaaatttttactactgtaaatgccagttccatggcc

pCC155 -----  
CFP 201 aacottagtcactactttaacttgggtgttcaatgtttcttagataccagatcatatgaaacaacatgactttttcaagtctgccatgccagaaggt

pCC155 -----  
CFP 301 tatgttcaagaagaactatcttttcaaaagtgacggttaactacaagaccagagctgaagtcaggtttgaagtgataccottagtaataagaatcgaat

pCC155 24 -----Tgacaacacaaa  
CFP 401 taaaaggtattgatttaagaagatggttaacatcttaggtcacaattggaatacattataactctcaaatggtttacatcactgctgacaacacaaa

pCC155 36 gaatggtatcaaaagtaacttcaaaattagacacacaacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaatactccaattggtgatggt  
CFP 501 gaatggtatcaaaagtaacttcaaaattagacacacaacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaatactccaattggtgatggt

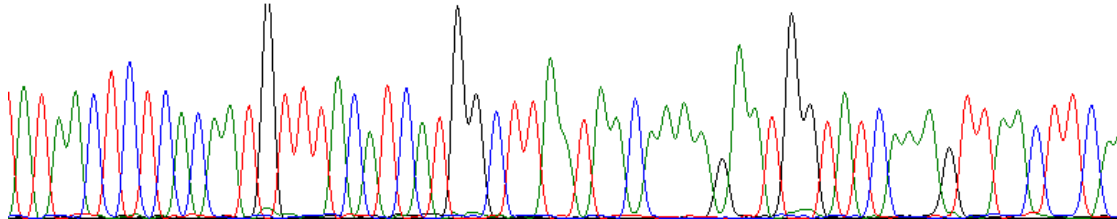
pCC155 136 ccagtccttgttacacagacaaccattacttatccactcaatctgccttatccaaagatccaaacgaaaagagagaccacatggtctctttagaatttggta  
CFP 601 ccagtccttgttacacagacaaccattacttatccactcaatctgccttatccaaagatccaaacgaaaagagagaccacatggtctctttagaatttggta

pCC155 236 ctgctgctggtattaccatggtatggatgaattgtacaataa  
CFP 701 ctgctgctggtattaccatggtatggatgaattgtacaataa

pCC155 MGDGACLIDKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSTQSALSKDPEKRDHMLLEFVTA  
pCC155 AGITHGMDELYK

## pYN155C

' A T A A C T C T C A C A A T G T T T A C A T C A T G G C T T A A T A A C A A A A G A A T G G T A T C A A A G T T A A C T T C A :



```

YFP      1 ggtgacggtgctggtttaattaacatgctctaaaggtgaagaattatcactggtggtgccccaaatttgggtgaattagatggtgatgtaaatggtcaca
pYN155   1 ggtgacggtgctggtttaattaacatgctctaaaggtgaagaattatcactggtggtgccccaaatttgggtgaattagatggtgatgtaaatggtcaca

YFP      101 aatctctgtctccggtgaaggtgaaggtgatgctactacggtaaaattgaccttaaaatttatttgtactactggtaaaatgccagttccatggccaac
pYN155   101 aatctctgtctccggtgaaggtgaaggtgatgctactacggtaaaattgaccttaaaatttatttgtactactggtaaaatgccagttccatggccaac

YFP      201 cttagtcaactacttaggttatggtttgatggttttctagatgataccagatcatatgaaacaacatgactttttcaagtctgccatgccagaaggttat
pYN155   201 cttagtcaactacttaggttatggtttgatggttttctagatgataccagatcatatgaaacaacatgactttttcaagtctgccatgccagaaggttat

YFP      301 gtccaagaagaactatTTTTTcaaatgacggttaactacaagaccagagctgaagtcgaagttgaaggtgataccttagttaataagaatcgaattaa
pYN155   301 gtccaagaagaactatTTTTTcaaatgacggttaactacaagaccagagctgaagtcgaagttgaaggtgataccttagttaataagaatcgaattaa

YFP      401 aaggtattgattttaagaagatggttaacatTTTtaggtcacaattggaatacaactataaactctcaaatggtttacatcatggcTgacaaacaaaagaa
pYN155   401 aaggtattgattttaagaagatggttaacatTTTtaggtcacaattggaatacaactataaactctcaaatggtttacatcatggcTgacaaacaaaagaa

YFP      501 Tggtatcaaaagttacttcaaaattagacacacacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaactccaattggtgatggtcca
pYN155   501 Tggtatcaaaagttacttcaaaattagacacacacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaactccaattggtgatggtcca

YFP      601 gtctgttaccagacaaccattacttctctatcaactctgcttaccagatcacaagatcacaacgaaaagagagaccacatggtcttgttagaatttgttactg
pYN155   601 gtctgttaccagacaaccattacttctctatcaactctgcttaccagatcacaagatcacaacgaaaagagagaccacatggtcttgttagaatttgttactg

YFP      701 ctgctggtattaccocatggtatggatgaattgtacaataaa
pYN155   701 ctgctggtattaccocatggtatggatgaattgtacaataaa

```

```

YFP      MGDGAGLINMSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPVLVTTTLGYGLMCF
pYN155   MGDGAGLINMSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPVLVTTTLGYGLMCF

```

```

YFP      ARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD TLVNR IELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVY
pYN155   ARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD TLVNR IELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVY

```

```

YFP      IMADRDKQKNGIKVNFKIRHNI EDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDRDHMLLEFVTAAGITH
pYN155   IMADRDKQKNGIKVNFKIRHNI EDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDRDHMLLEFVTAAGITH

```

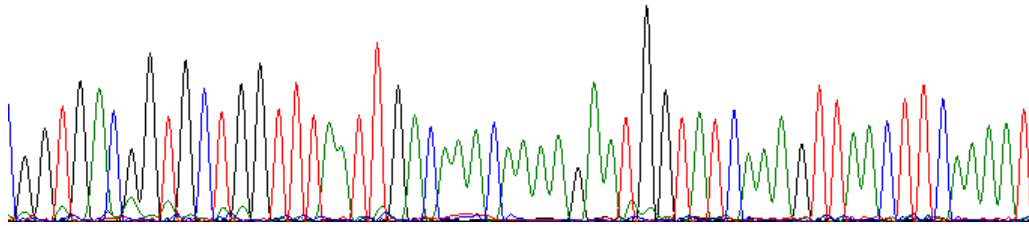
```

YFP      GMDELYK
pYN155   GMDELYK

```

## pYC155C

! G G T G A C G G T G C T G G T T T A A T T G A C A A A C A A A A G A A T G G T A T C A A A G T T A A C T T C A A A A T



```

pYN155   1 atgggtgacggtgctggtttaat-----
YFP      1 atgggtgacggtgctggtttaattaacatgctctaaaggtgaagaattatcactggtggtgccccaaatttgggtgaattagatggtgatgtaaatggtcaca

pYN155   -----
YFP      101 acaaatctctgtctccggtgaaggtgaaggtgatgctactacggtaaaattgaccttaaaatttatttgtactactggtaaaatgccagttccatggcc

pYN155   -----
YFP      201 aaccttagtcaactacttaggttatggtttgatggttttctagatgataccagatcatatgaaacaacatgactttttcaagtctgccatgccagaaggt

pYN155   -----
YFP      301 tatgtccaagaagaactatTTTTTcaaatgacggttaactacaagaccagagctgaagtcgaagttgaaggtgataccttagttaataagaatcgaat

pYN155   -----
YFP      24 -----tgacaacaaaa
pYN155   401 taaaaggtattgattttaagaagatggttaacatTTTtaggtcacaattggaatacaactataaactctcaaatggtttacatcatggcTgacaacaaaa

pYN155   36 gaatggtatcaaaagttacttcaaaattagacacacacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaactccaattggtgatggt
YFP      501 gaatggtatcaaaagttacttcaaaattagacacacacattgaagatggttctgttcaattagctgaccattatcaacaaaactccaattggtgatggt

pYN155   136 caagtcttgttaccagacaaccattacttctctatcaactctgcttaccagatcacaagatcacaacgaaaagagagaccacatggtcttgttagaatttgtta
YFP      601 caagtcttgttaccagacaaccattacttctctatcaactctgcttaccagatcacaagatcacaacgaaaagagagaccacatggtcttgttagaatttgtta

pYN155   236 ctgctgctggtattaccocatggtatggatgaattgtacaataaa
YFP      701 ctgctgctggtattaccocatggtatggatgaattgtacaataaa

```

```

pYC155   MGDGAGLIDDRKQKNGIKVNFKIRHNI EDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDRDHMLLEFVTA

```

```

pYC155   AGITHGMDELYK*

```

Después de haber generado estos plásmidos, se hizo el intercambio de marcadores de selección entre ellos, para obtener la colección de plásmidos siguiente:

Nombre del Plásmido	FP que codifica	Marcador de selección	Descripción
<b>pKT175</b>	yECitrine	<i>URA3 Ca</i>	Plásmido original utilizado como templado
<b>pKT101</b>	CFP	<i>HIS5 Sp</i>	Plásmido original utilizado como templado
<b>pKT175-HIS</b>	yECitrine	<i>HIS5 Sp</i>	Se cambió el módulo de selección del plásmido pKT175 que contenía <i>URA3 Ca</i> por <i>HIS5 Sp</i> .
<b>pKT101-URA</b>	CFP	<i>URA3 Ca</i>	Se intercambió el módulo de selección del plásmido templado pKT101
<b>pYN155-URA</b>	YN-155	<i>URA3 Ca</i>	Codifica el extremo amino de la yECitrine (a.a. 1-155), construido a partir del pKT175 mediante PCR mutagénico.
<b>pYN155-HIS</b>	YN-155	<i>HIS5 Sp</i>	Codifica para el extremo amino de la yECitrine (a.a. 1-155). Cambia el módulo de selección del plásmido pYN155-URA por <i>HIS5</i>
<b>pYC155-URA</b>	YC-155	<i>URA3 Ca</i>	Codifica para el extremo carboxilo de la yECitrine (a.a. 156-238), construido a partir del plásmido pKT175.
<b>pYC155-HIS</b>	YC-155	<i>HIS5 Sp</i>	Codifica para el extremo carboxilo de la yECitrine (a.a. 156-238). Cambia el módulo de selección del plásmido pYC155-URA por <i>HIS5</i> .
<b>pCN155-HIS</b>	CN-155	<i>HIS5 Sp</i>	Codifica el extremo amino de la CFP (a.a. 1-155), construido a partir del pKT101 mediante PCR mutagénico.
<b>pCN155-URA</b>	CN-155	<i>URA3 Ca</i>	Codifica para el extremo amino de la CFP (a.a. 1-155). Cambia el módulo de selección del plásmido pCN155-HIS por <i>URA3</i> .
<b>pCC155-HIS</b>	CC-155	<i>HIS5 Sp</i>	Codifica para el extremo carboxilo de la CFP (a.a. 156-238), construido a partir del plásmido pKT101.
<b>pCC155-URA</b>	CC-155	<i>URA3 Ca</i>	Codifica para el extremo carboxilo de la CFP (a.a. 156-238). Cambia el módulo de selección del plásmido pCN155-HIS por <i>URA3</i> .

Para comprobar que el cambio de marcadores de selección fue exitoso se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *PvuII*. La enzima *EcoRI* tiene 2 sitios de corte en el plásmido pKT175 y sólo uno en el pKT101, uno de los sitios de corte del pKT175 se encuentra sobre la secuencia del módulo de selección (*URA3*). Para comprobar el caso contrario, es decir la inserción del módulo de selección *HIS5* originalmente en el plásmido pKT101 y todos sus derivados usamos la enzima *PvuII* que tiene 1 sitio de corte en el plásmido pKT175 y 2 en el pKT101 (sobre la secuencia de *HIS5*).

Después de confirmar las construcciones por secuenciación y utilizando enzimas de restricción (en el caso del cambio de marcador de selección), se

realizaron pruebas funcionales de los mismos, marcando a las enolasas con las diferentes variantes de la yECitrine.

### Localización y expresión de las enolasas

Las enolasas tienen una localización citoplásmica, la cual se demostró mediante microscopía y co-localización con la proteína mCherry citoplásmica (figura 19). Las imágenes de ambas cepas fueron tomadas bajo los mismos parámetros de intensidad de fluorescencia en cultivos provenientes de YP dextrosa 4%. Se puede ver que la intensidad de la señal de la Eno2 es mayor que la Eno1. Esto se cuantificó mediante citometría de flujo.

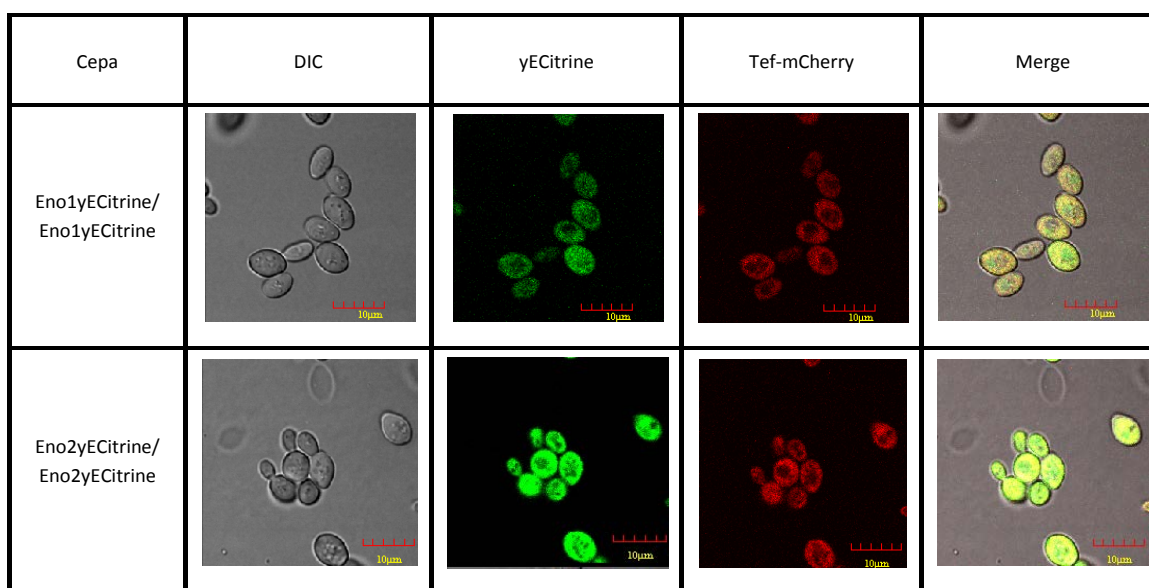


Figura 19. Expresión de las enolasas en YP dextrosa 4%. Imágenes de microscopía confocal de las enolasas fusionadas a la yECitrine. El primer panel muestra el nombre de la cepa, el segundo la imagen de luz transmitida, el tercero la fluorescencia correspondiente a yECitrine, el cuarto a mCherry y el quinto es el empalme de las diferentes imágenes.

### Expresión de las enolasas en diferentes fuentes de carbono

Para comparar los niveles de proteína de cada una de las enolasas en diferentes fuentes de carbono, se cuantificó la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo en las cepas Eno1yECitrine/Eno1yECitrine y Eno2yECitrine/Eno2yECitrine. Dado que la intensidad de fluorescencia es un



reflejo de la cantidad de proteína, se demostró que la concentración de enolasas fluctúa en función de la fuente de carbono: en dextrosa la enolasa predominante es Eno2, la intensidad de la señal de ésta es aproximadamente 20 veces mayor que la de Eno1. En etanol la Eno1 es la enolasa predominante, aunque la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las enolasas no es tan marcada como en dextrosa. Finalmente, en lactato hay una mayor cantidad de Eno2, de acuerdo a nuestro ensayo (figura 20).

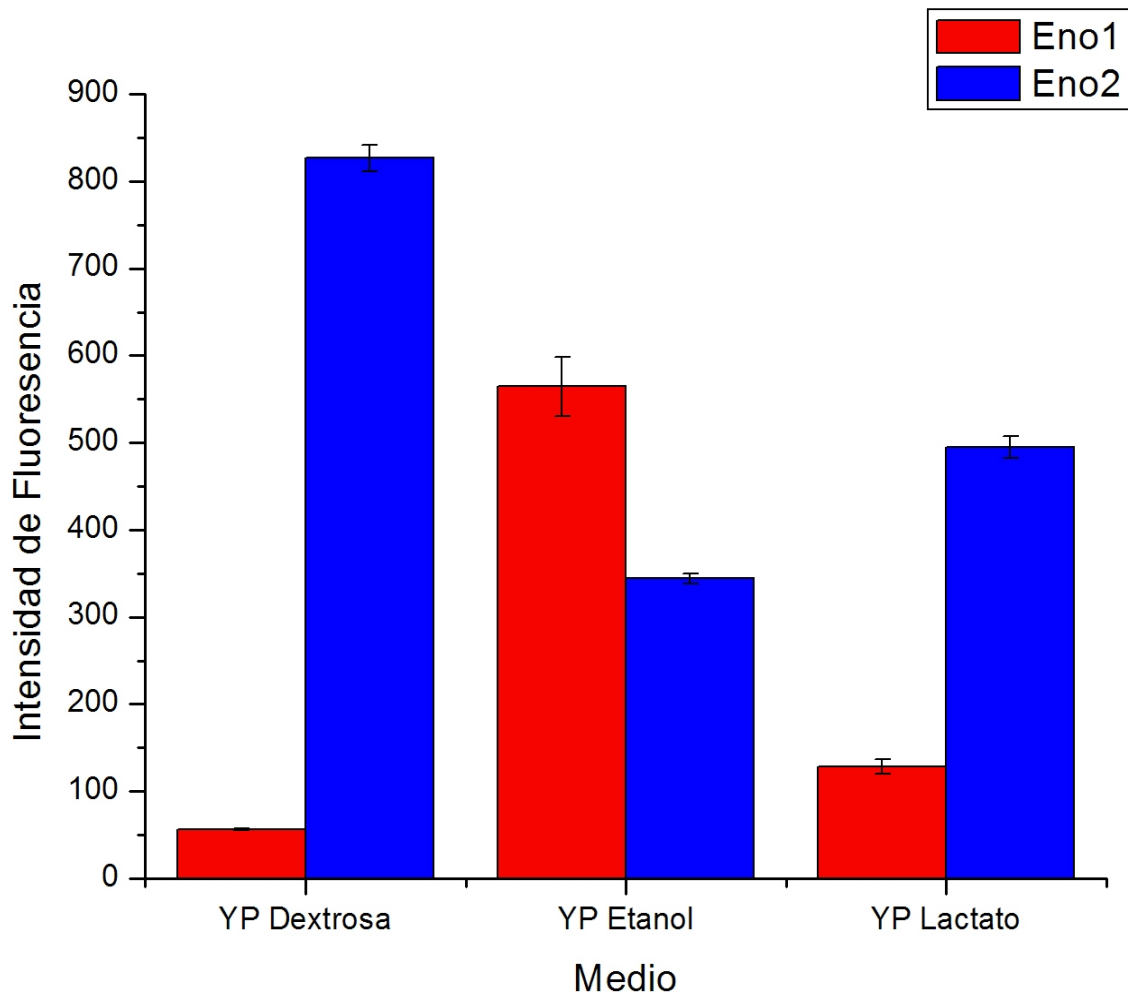


Figura 20. Intensidad de fluorescencia de Eno1yECitrine/Eno1yECitrine (Eno1, rojo) y Eno2yECitrine/Eno2yECitrine (Eno2, azul) en medios con diferentes fuentes de carbono, YP dextrosa 4%, YP etanol 3% y YP lactato 3%.

Estas fluctuaciones reflejan la divergencia en la regulación de estos genes. Es probable que se den fluctuaciones similares en muchos otros parálogos, en particular en aquellos involucrados en el metabolismo central del carbono. Los

cambios en expresión apoyan la teoría de que Eno2 se especializó en la función glicolítica y Eno1 en la gluconeogénica (Entian *et. al.*, 1987).

### Oligomerización de enolasas

Al observar las cepas Eno1Yn/Eno1Yc, Eno1Yn/Eno2Yc y Eno2Yn/Eno2Yc mediante microscopía confocal se determinaron 3 diferentes formas oligoméricas. La localización de los complejos formados es citoplásmica. Las imágenes se muestran en la figura 21.

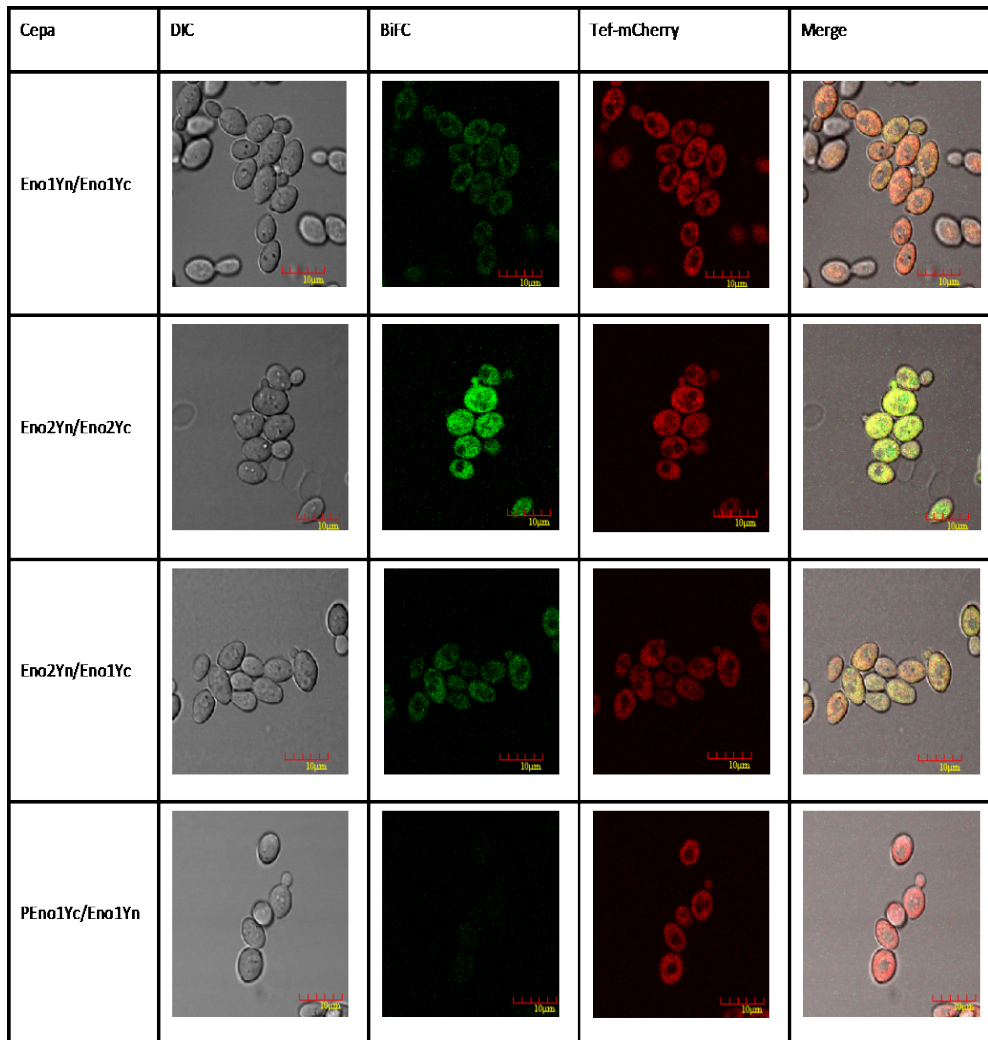


Figura 21. Presencia de las diferentes formas oligoméricas de las enolasas en YP dextrosa 4%. Imágenes de microscopía confocal de cepas diploides con las enolasas fusionadas a versiones truncas de la yECitrine para BiFC. El primer panel muestra el nombre de la cepa, el segundo la imagen de luz transmitida, el tercero la fluorescencia correspondiente a yECitrine, el cuarto a la mCherry y el quinto es la sobreposición de las diferentes imágenes.

Paralelo a la identificación de las diferentes isoformas, se muestra la señal producida por la cepa PEno1Yc/Eno1Yn, el control negativo. Es importante mencionar que existe una señal de fondo, pero su intensidad resulta despreciable en comparación con la señal de las interacciones. Paralelo a ello, se comprobó que la localización e intensidad de fluorescencia de una cepa PEno1-yECitrine es igual a los de la cepa Eno1-yECitrine (figura 22).

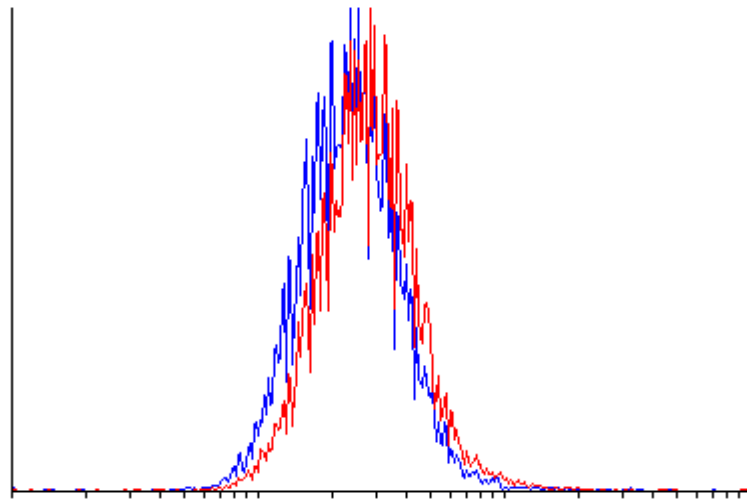
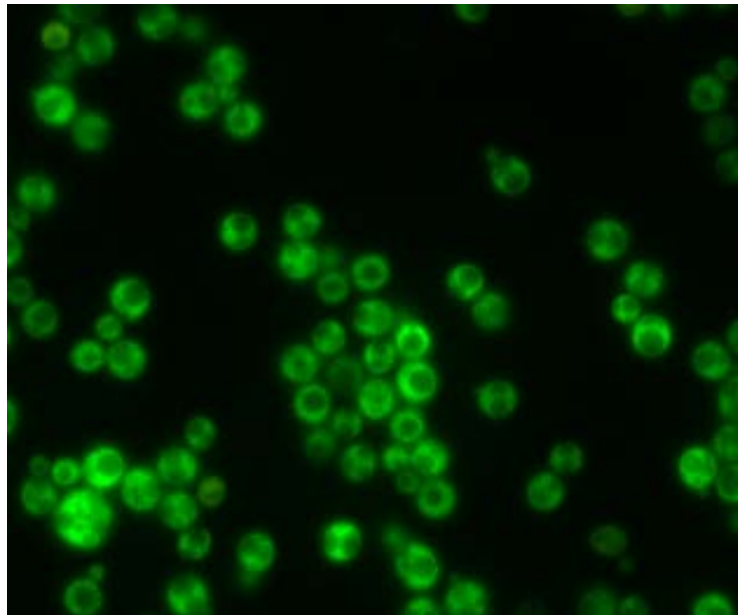


Figura 22. Imagen de microscopía de PEno1-yECitrine e histograma de citometría de flujo de las cepas Eno1-yECitrine y PEno1-yECitrine.

## Fluctuaciones en los estados oligoméricos de enolasas dependiendo la fuente de carbono

El primer medio analizado fue dextrosa al 4%, en esta condición hay una cantidad 20 veces mayor de Eno2 que de Eno1 (figura 20). La velocidad específica de crecimiento en este medio fue de  $0.455 \text{ h}^{-1}$ . Se realizó el análisis de prevalencia de las tres formas oligoméricas de enolasas mediante BiFC en esta condición. Los resultados cuantificados por citometría de flujo se muestran a continuación.

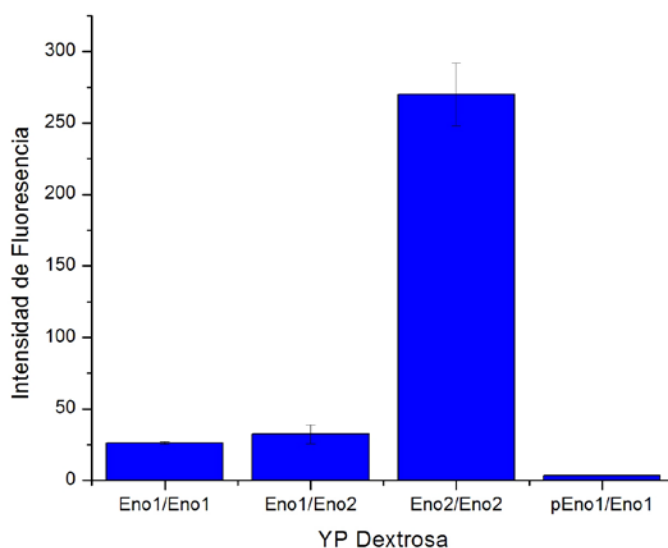


Figura 23. Intensidad de la señal de BiFC para los diferentes oligómeros de las enolasas en YP dextrosa 4%.

Posteriormente se analizó una condición de metabolismo respiratorio, etanol al 3%. La velocidad específica de crecimiento fue  $0.016 \text{ h}^{-1}$ , es decir fue menor a la obtenida en dextrosa. Paralelo a los cambios en la expresión de las enolasas descritos anteriormente (figura 20) se encontraron cambios en la prevalencia de las distintas formas oligoméricas (figura 24). En esta fuente de carbono, la distribución de las isoformas fue: la señal de Eno1Yn/Eno1Yc fue mayor que la de la heteroforma y esta a su vez fue mayor que la de la isoforma Eno2Yn/Eno2Yc.

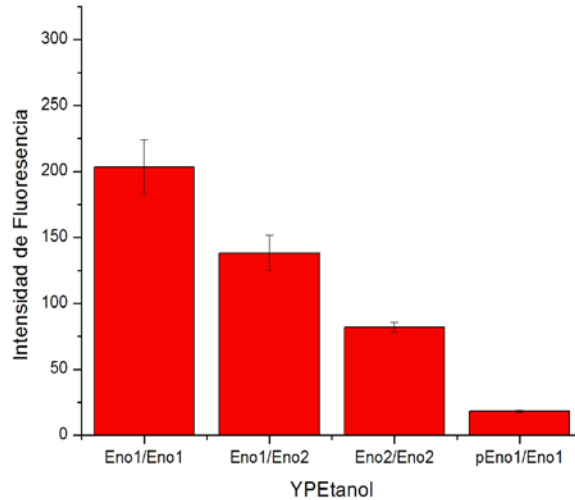


Figura 24. Intensidad de la señal de BiFC para los diferentes oligómeros de las enolasas en YP etanol 3%.

Se estudió la prevalencia de las isoformas de enolasas en otra fuente de carbono no fermentable, lactato 3%, la velocidad específica de crecimiento de estas cepas en este medio es de  $0.0567 \text{ h}^{-1}$ . Bajo esta condición la isoforma Eno2Yn/Eno2Yc está presente en una mayor concentración que el resto de las asociaciones oligoméricas, tal como sucedió en dextrosa. Dados estos resultados se puede llegar a considerar que el lactato es una fuente de carbono intermedia entre dextrosa y etanol, esto se refleja tanto en la velocidad de crecimiento como en la composición oligomérica (figura 25).

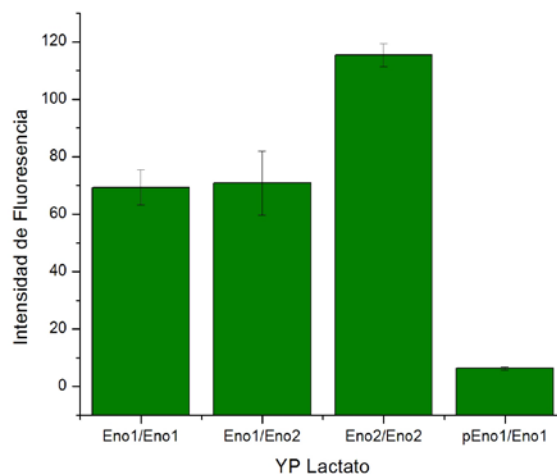


Figura 25. Intensidad de la señal de BiFC para los diferentes oligómeros de enolasas en YP lactato 3%.

Paralelo a las fuentes de carbono descritas previamente, también se examinaron fuentes no fermentables como YP glicerol 3% y YP acetato 2%, sin embargo, en estas condiciones las cepas no crecieron; por lo cual, el análisis de las fluctuaciones oligoméricas de enolasas quedó restringido a YP dextrosa 4%, etanol 3% y YP lactato 3%.

# Discusión

## Colección de plásmidos para BiFC

Este trabajo tiene un valor metodológico importante ya que la colección de plásmidos generada y la aproximación que se hace para el análisis de interacción de las diferentes isoformas de enolasas, podría permitir estudios de interacción cuantitativos y a gran escala. Las construcciones de plásmidos previas para realizar BiFC en levadura (Kojima, *et al.*, 2011; Sung & Huh, 2010; Skarp, *et al.*, 2008; Barnard, *et al.*, 2008 a; 2008 b) no tienen el mismo alcance metodológico que la colección que aquí se desarrolló, cuyas características son:

- El marcado de las proteínas directamente sobre el genoma. Por lo que se pueden estudiar interacciones en un contexto genómico y fisiológico.
- Permiten que en la fusión de cualquiera de las FP's (completas y trucas) se pueda usar *URA3Ca* o *HIS5Sp* como marcador de selección.
- Se diseñaron las versiones 155 de BiFC (primeros 154 amino ácidos, mitad amino y del aminoácido 155-238, mitad carboxilo), está reportado que estas construcciones reducen la probabilidad de encontrar falsos positivos en comparación a los fragmentos 173 (Kerppola, 2009).
- El mismo par de oligonucleótidos se utiliza para llevar a cabo la fusión de una proteína con cualquiera de las FP's, lo cual abate costos al momento de fusionar las diversas proteínas con alguna proteína fluorescente y analizar las interacciones mediante BiFC.
- Los plásmidos generados permitirán hacer estudios de multicolor BiFC, esta metodología nunca ha sido implementada en levadura y sirve para determinar la preferencia entre dos compañeros de interacción tal y como se describió previamente.

- Permiten establecer una relación entre la cantidad de proteína y la intensidad de interacción al marcar con las versiones completas de las FP's.

La colección de plásmidos fue caracterizada funcionalmente para el par de parálogos Eno1 y Eno2. Se estableció un protocolo para estudiar interacciones *in vivo* entre proteínas parálogas. Esta aproximación contempla la cuantificación de las interacciones por citometría de flujo. Otros miembros del laboratorio han probado estas construcciones para determinar interacciones entre otras proteínas parálogas (López, *et al.*, en preparación).

## **Enolasas**

Se ha establecido que *S. cerevisiae* tuvo un evento de duplicación total del genoma, se especula que la prevalencia y pérdida selectiva de algunos genes está relacionada con una adaptación de *S. cerevisiae* para sobrevivir en condiciones respiratorias y fermentativas (Skarp, *et al.*, 2008). Conant y Wolfe (2007) relacionaron la preservación de ciertos genes duplicados con un incremento en el flujo glicolítico, esto propiciaría una ventaja adaptativa en ambientes ricos en fuentes de carbono fermentables. El análisis de genes duplicados involucrados durante procesos fermentativos y respiratorios han mostrado que algunos genes son regulados dependiendo de la fuente de carbono (Piskur, 2001; DeLuna, *et al.*, 2001). Un ejemplo en el cambio de regulación son los genes que codifican para las enolasas Eno1 y Eno2. Se demostró *in vivo* que en efecto, la expresión de estas proteínas parálogas se regula dependiendo de la fuente de carbono. Así mismo, las fluctuaciones en la expresión de las proteínas llevan a fluctuaciones en la composición oligomérica de las enolasas. Se desconoce por qué la levadura requiere tres diferentes isoformas, pero se piensa que esto podría estar relacionado con la movilidad de sustratos glicolíticos y gluconeogénicos, al existir una heteroforma que no se inhibe por ninguno de estos sustratos, esta podría ser una isoforma ideal que regula el flujo hacia la glucólisis o gluconeogénesis.



Como se comentó anteriormente, se estableció que los niveles de expresión de Eno1 son constantes (Cohen, *et al.*, 1987), sin embargo este dato contrasta con lo reportado por Entian (1987) y lo observado en este estudio, ya que se demostró que la expresión de Eno1 puede llegar a aumentar un orden de magnitud cuando se comparan fuentes de carbono como dextrosa y etanol, este dato resulta ser sumamente relevante y más en el contexto de formación de heterodímeros, puesto que la asociación de éstos, dependerá de la cantidad de Eno1 y Eno2.

Los ensayos de fluorescencia de las proteínas mostraron la tendencia de Eno1 a expresarse en mayor concentración en condiciones gluconeogénicas, mientras que Eno2 en glicolíticas. En lactato, a pesar de ser una fuente no fermentable, hay una cantidad ligeramente mayor de Eno2 que de Eno1, es de suponer que si Eno2 es la isoforma predominante en fuentes de carbono fermentables, su regulación sería muy parecida a la que se da en etanol, sin embargo esto no sucede. Parece ser que la presencia de ambas enolasas es importante en las diferentes fuentes de carbono.

En dextrosa, donde se encuentra una gran cantidad de Eno2 se observa una prevalencia del homodímero Eno2/Eno2, la cantidad de este es 10 veces mayor que de las otras dos formas diméricas. En Etanol existen cantidades similares del homodímero Eno1/Eno1 y del heterodímero, mientras que existe una cantidad menor del homodímero Eno2/Eno2. En Lactato hay una mayor cantidad de homómeros Eno2/Eno2 y cantidades menores de Eno1/Eno2 y Eno1/Eno1. En todas estas condiciones las tres isoformas están presentes. Las fluctuaciones sugieren un equilibrio dinámico espacial de estos complejos oligoméricos.

El heterodímero Eno1/Eno2 se encontró en todas las condiciones de estudio, es probable que esta isoforma se encuentre presente en otras condiciones metabólicas donde ambas proteínas se expresen. La relevancia de la existencia de diferentes isoformas de enolasas queda como interrogante. Sería interesante diseñar una metodología que evite la formación de homo o heterodímeros de manera selectiva, pero es difícil realizar esta aproximación pues

al tratar de evitar la hetero u homo-oligomerización invariablemente se afectará la asociación entre si mismas o con el hetero.

La función del heterómero tiene propiedades bioquímicas más flexibles (Entian *et. al.*, 1987). Es probable que la participación del hetero Eno1/Eno2 esté asociada a condiciones donde existan cambios repentinos en el flujo de los sustratos (2-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato), es decir cuando se presentan cambios de condiciones glicolíticas a gluconeogénicas y viceversa.

## Conclusiones

- Se generó una colección de plásmidos que permiten detectar y cuantificar interacciones entre proteínas mediante BiFC. Estos mismos plásmidos pueden servir para determinar afinidades entre diversos pares de proteínas mediante la metodología denominada multicolor BiFC en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Se caracterizó funcionalmente la colección de plásmidos generados durante el análisis de interacción de Eno1 y Eno2.
- Se determinaron las interacciones espaciales que presentan los complejos oligoméricos de Eno1 y Eno2, en diferentes fuentes de carbono.
- La expresión diferencial de los monómeros de las enolasas producen fluctuaciones de sus distintos estados oligoméricos.
- Las formas oligoméricas de las enolasas son dos homodímeros y un heterodímero. Esta tercera forma está presente en las diferentes condiciones estudiadas, y responde a la interrogante de su existencia *in vivo*.

## Perspectivas

Para continuar con este trabajo, será necesario probar los plásmidos de Multicolor BiFC, lo cual permitirá determinar la preferencia de interacción entre dos proteínas (parálogas en nuestro caso). Será la primera vez que se implemente esta metodología en levadura, abriendo la puerta para hacer estudios de interacción cuantitativos más completos. Además, se pretende en un futuro diseñar una colección de plásmidos equivalente para hacer un marcado por el extremo amino. Esto debido a que algunas proteínas pueden perder su función al marcarse por el extremo carboxilo y no el amino.

Hasta ahora, el porqué de la existencia simultánea de las diferentes isoformas de Eno1 y Eno2 sigue sin conocerse, se requieren análisis fisiológicos y bioquímicos más detallados a fin de establecer el impacto real de los distintos estados oligoméricos de estas proteínas parálogas.

Por otra parte, sería interesante explorar otras fuentes de carbono fermentables y no fermentables, para de esta manera, entender los mecanismos de regulación involucrados en la expresión de ambos genes. Otro aspecto que resultaría atractivo para su estudio, es la posible interacción con las proteínas producto de los genes *ERR1*, *ERR2* y *ERR3*. Estos genes están reportados como proteínas con función desconocida, pero presentan una identidad de entre 60% y 70% con las enolasas, lo cual muestra que son parálogos, sin embargo, hasta ahora no se conoce si presentan actividad enzimática. *S. cerevisiae* es la única levadura reportada con estos 5 genes parálogos de enolasas; estudios bioquímicos, fisiológicos y estructurales de estas proteínas podrían arrojar más datos sobre la dinámica evolutiva de sus capacidades catalíticas y sus niveles de regulación.

## Referencias

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, *et al.* (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. 309:1052.
- Albert R, Jeong H, Barabasi AL. (2000) Error and attack tolerance of complex networks. *Nature*, 406:378-382.
- Amoutzias, Robertson DL, Oliver SG, Bornberg-Bauer E. (2004) Convergent evolution of gene networks by single-gene duplications in higher eukaryotes. *EMBO Rep*, 5(3):274-9.
- Atmakuri K, Ding ZY, Christie PJ. (2003) VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*.;49:1699.
- Barabasi AL, Oltvai ZN. (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*, 5:101-113.
- Barnard E, McFerran NV, Trudgett A, Nelson J, Timson DJ. (2008) Detection and localization of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* using a split-GFP method. *Fungal Genet Biol*. May;45 (5):597-604.
- Barnard E, McFerran NV, Trudgett A, Nelson J, Timson DJ. (2008) Development and implementation of split-GFP-based bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays in yeast. *Biochem Soc Trans*. Jun;36 (Pt 3):479-82.
- Blondel M, Bach S, Bamps S, Dobbelaere J, Wiget P, *et al.* (2005) Degradation of Hof1 by SCFGrr1 is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *Embo Journal*. 24:1440.
- Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, *et al.* (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current Biology*. 15:1833..

- Butland G, Peregrín-Alvarez JM, Li J, Yang W, Yang X, Canadien V, Starostine A, Richards D, Beattie B, Krogan N, Davey M, Parkinson J, Greenblatt J, Emili A. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*, 433:531-537.
- Cascales E, Atmakuri K, Liu Z, Binns AN, Christie PJ. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* oncogenic suppressors inhibit T-DNA and VirE2 protein substrate binding to the VirD4 coupling protein. *Molecular Microbiology*.58:565.
- Chakraborty S, Kahali B, Ghosh TC. (2010). Protein complex forming ability is favored over the features of interacting partners in determining the evolutionary rates of proteins in the yeast protein-protein interaction networks. *BMC Syst Biol*. Nov 12; 4:155.
- Chen J, Carter MB, Edwards BS, Cai H, Sklar LA. (2012) High throughput flow cytometry based yeast two-hybrid array approach for large-scale analysis of protein-protein interactions. *Cytometry A*. Jan;81(1):90-8.
- Cohen R, Yokoi T, Holland JP, Pepper AE, Holland MJ. (1987) Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene ENO1 is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Mol Cell Biol*. Aug;7(8):2753-61.
- Conant GC, Wolfe KH.(2007) Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol Syst Biol*. 2007;3:129.
- Cristescu ME, Egboşimba EE. (2009) Evolutionary history of D-lactate dehydrogenases: a phylogenomic perspective on functional diversity in the FAD binding oxidoreductase/transferase type 4 family. *J Mol Evol*. Sep; 69(3):276-87.
- DeLuna A, Avendano A, Riego L, Gonzalez A. (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification,

kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem.* Nov 23;276(47):43775-83.

Entian KD, Meurer B, Köhler H, Mann KH, Mecke D. (1987) Studies on the regulation of enolases and compartmentation of cytosolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* Feb 20;923(2):214-21.

Fröhlich KU, Entian KD. (1982) Regulation of gluconeogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for conversion of enolase isoenzymes. *FEBS Lett.* Mar 22;139(2):164-6.

Gavin AC, Aloy P, Grandi P, *et al.* (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 440:631-636.

Giot L, Bader JS, Brouwer C, *et al.* (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302:1727-1736.

Hase T, Niimura Y, Tanaka H. (2010) Difference in gene duplicability may explain the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes. *BMC Evol Biol.* Nov 18;10:358.

Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, *et al.* (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415:180-183.

Hoff B, Kuck U. (2005) Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Current Genetics.* 47:132.

Holland MJ, Holland JP, Thill GP, Jackson KA. (1981) The primary structures of two yeast enolase genes. Homology between the 5' noncoding flanking regions of yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem.* Feb 10;256(3):1385-95.

- Hu CD, Kerppola TK. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol.* May;21(5):539-45.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:4569-4574.
- Ito T, Chiba T, Yoshida M. (2001) Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol.* Oct;19(10 Suppl):S23-7. Review.
- Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y. (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* Feb 1;97(3):1143-7.
- Jeffery CJ. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci.* Jan;24(1):8-11. Review.
- Kass G, Arad G, Rosenbluh J, Gafni Y, Graessmann A, *et al.* (2006) Permeabilized mammalian cells as an experimental system for nuclear import of geminiviral karyophilic proteins and of synthetic peptides derived from their nuclear localization signal regions. *Journal of General Virology.* 87:2709.
- Kerppola TK. (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys.* 37:465-87. Review.
- Kerppola TK. (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev.* Oct; 38(10):2876-86. Review.



- Keys DA, McAlister-Henn L. (1990) Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* Aug;172(8):4280-7.
- Kojima T, Karasawa S, Miyawaki A, Tsumuraya T, Fujii I. (2011) Novel screening system for protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* Apr;111(4):397-401.
- Kopperschlager G, et al. (1977) Physicochemical parameters and subunit composition of yeast phosphofructokinase. *Eur J Biochem* 81(2):317-25.
- Krakauer DC, Nowak MA. (1999) Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. *Semin Cell Dev Biol.* Oct;10(5):555-9. Review.
- Kritikos GD, Moschopoulos C, Vazirgiannis M, Kossida S (2011) Noise reduction in protein-protein interaction graphs by the implementation of a novel weighting scheme. *BMC Bioinformatics.* 2011 Jun 16;12:239.
- Krogan NJ, Cagney G, Yu H, et al. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 440:637-643.
- Li S, Armstrong CM, Bertin N, et al. (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*, 303:540-543.
- Lodi T, Ferrero I. (1993) Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *Mol Gen Genet.* Apr;238(3):315-24.
- Lopez G, Flores M, Duhne M, Sanchez J, González A. (2011) Duplicación Génica: Implicaciones Bioquímicas, Fisiológicas y Evolutivas en *Saccharomyces cerevisiae*. En Álvarez G, Bustos I, Castañeda C, Guevara J, Vázquez H (Ed.), Mensaje Bioquímico vol XXV (pp. 27-38). México DF: UNAM Facultad de Medicina.

- Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci.* Nov;29(11):618-25. Review.
- McAlister L, Holland MJ. (1982) Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J Biol Chem.* Jun 25;257(12):7181-8.
- Mewes HW, Albermann K, Bähr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature.* May 29;387(6632 Suppl):7-65.
- Mirzarezaee M, Araabi BN, Sadeghi M. (2010) Features analysis for identification of date and party hubs in protein interaction network of *Saccharomyces Cerevisiae*. *BMC Syst Biol.* Dec 19; 4:172.
- Nakahara S, Hogan V, Inohara H, Raz A. (2006) Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *Journal of Biological Chemistry.* 281:39649.
- Nooren IMA, Thornton JM (2003) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 22:3486–3492
- Pang K, Cheng C, Xuan Z, Sheng H, Ma X. (2010) Understanding protein evolutionary rate by integrating gene co-expression with protein interactions. *BMC Syst Biol.* Dec 30; 4:179.
- Papp B, Pal C, Hurst L (2003) Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* 424: 194–197
- Pereira-Leal JB, Levy ED, Kamp C, Teichmann SA. (2007) Evolution of protein complexes by duplication of homomeric interactions. *Genome Biol.* 8(4):R51.
- Piskur J. (2001) Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* Jun;17(6):302-3. Review.

- Prein B, Natter K, Kohlwein SD. (2000) A novel strategy for constructing N-terminal chromosomal fusions to green fluorescent protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* Nov 17;485(1):29-34.
- Quezada H, Aranda C, DeLuna A, Hernández H, Calcagno ML, Marín-Hernández A, González A. (2008) Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* Jun;154(Pt 6):1656-67.
- Rajagopala SV, Uetz P. (2011) Analysis of protein-protein interactions using high-throughput yeast two-hybrid screens. *Methods Mol Biol.* 781:1-29.
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, *et al.* (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437:1173-1178.
- Schüler A, Bornberg-Bauer E.(2011). The evolution of protein interaction networks. *Methods Mol Biol.* 696:273-89.
- Sheff MA, Thorn KS. (2004) Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 21(8):661-70.
- Skarp KP, Zhao X, Weber M, Jantti J. (2008) Use of bimolecular fluorescence complementation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 457:165-75.
- Soufo HJD, Graumann PL. (2006) Dynamic localization and interaction with other *Bacillus subtilis* actin-like proteins are important for the function of MreB. *Molecular Microbiology.* 62:1340.
- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksöz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 122:957-968.

- Sterner R, Kleemann GR, Szadkowski H, Lustig A, Hennig M, Kirschner K. (2006) Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci.* Oct;5(10):2000-8.
- Sung MK, Huh WK. (2010) In vivo quantification of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* using bimolecular fluorescence complementation assay. *J Microbiol Methods.* Nov;83(2):194-201.
- Tarassov K, Messier V, Landry CR, Radinovic S, Serna Molina MM, Shames I, Malitskaya Y, Vogel J, Bussey H, Michnick SW. (2008) An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science.* Jun 13;320(5882):1465-70.
- Treco DA, Reynolds A, Lundblad V. (2001) Growth and manipulation of yeast. *Curr Protoc Protein Sci.* May;Appendix 4:Appendix 4L.
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403:623-627.
- Vidi PA, Przybyla JA, Hu CD, Watts VJ. (2010) Visualization of G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Interactions in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). *Curr Protoc Neurosci.* Apr;Chapter 5:Unit 5.29
- Wagner A. (2001) The yeast protein interaction network evolves rapidly and contains few redundant duplicate genes. *Mol Biol Evol.* Jul;18(7):1283-92.
- Wolfe KH, Shields DC. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* Jun 12;387(6634):708-13.
- Zhang E, Brewer JM, Minor W, Carreira LA, Lebioda L. (1997) Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry.* Oct 14; 36(41):12526-34.

Zhao XH, Xu JR. (2007) A highly conserved MAPK-docking site in Mst7 is essential for Pmk1 activation in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology*. 63:881.