



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Modularidad en interruptores optogenéticos basados
en la arquitectura de doble híbrido en levaduras:
sistema *Fungal Light-Oxygen-Voltage* como caso de
estudio”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

ANDRÉS AARON BARUC ROMERO QUEZADA

Director del Seminario de Título: Dr. Luis Fernando Larrondo Castro

Profesora Patrocinante: Dra. Jennifer Cecilia Alcaíno Gorman

Fecha: 22 de Marzo del 2019

Santiago-Chile

BIOGRAFÍA



Nació el 20 de Octubre de 1993 y se crió en la población El Polígono de la comuna de Quinta Normal. A los 12 años se mudó al barrio Brasil de la comuna de Santiago Centro, actual domicilio pesar de volver a vivir en Quinta Normal durante toda su educación superior. Su educación Básica tuvo lugar en la Escuela Básica Salvador Sanfuentes, la educación media en el Intituto Nacional José Miguel Carrera, y finalmente la educación superior en la Universidad de Chile.

El 2012 Ingresó al programa académico de Bachillerato, para luego ingresar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. A lo largo de la carrera participó activamente de la selección de balónmano del campus Juan Gómez Millas, selección que se niega dejar hasta que la universidad diga lo contrario.

Fuera de la universidad mantiene una hermosa relación con sus amigos de colegio, la cerveza, y el hardcore punk.

Actualmente es parte del laboratorio del Dr. Larrondo y se desempeña en el área de biología sintética y genética de levaduras.

DEDICATORIA

Dedicada a mi madre, abuela y hermano. Son la mejor familia que pude haber alguna vez imaginado o querido.

Después de tanto, lo logramos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Luis Larrondo y a su laboratorio, por darme las herramientas para crecer como científico y poder realizar este seminario de título.

A los amigos del laboratorio, por todo su apoyo y camaradería en todo este proceso.

A los amigos de la música, por permitirme acompañarlos en lo creativo, lo cotidiano y lo político.

A la familia balónmano JGM, por hacer de la universidad un espacio mucho más lindo y humano.

A Diego Valderrama, por ser un compañero de mil batallas.

Agradezco tremendamente a los amigos del colegio y a mi familia por tanto cariño y apoyo. Gracias por nunca dejar de creer en mí y en mis proyectos.

Este trabajo fue financiado en el marco del FONDECYT-Regular 1171151 y por el Instituto Milenio de Biología Integrativa (iBio).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTAS DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	9
Hipótesis	9
Objetivos Generales	9
Objetivos Específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Material Biológico	10
Bacterias	10
Levaduras	10
Vectores	10
Equipos	10
Medios de Cultivo	11

Bacterias	11
Levaduras	12
Medio YPD	12
Medios Sintéticos	12
Partidores	12
Secuenciación	13
Cultivos	13
Purificación de DNA Plasmidial	13
Transformación de Bacterias	13
Transformación de Levaduras	14
Generación de Construcciones Genéticas	14
Deleciones Genéticas	15
Experimentos en Lector de Placas	16
Generación de Sistemas Optogenéticos	16
Cálculo de pendiente y análisis estadístico	17
RESULTADOS	19
LexA como sitio de unión a DNA en el sistema FUN-LOV	19
Cup2p como sitio de unión a DNA en el sistema FUN-LOV	22
VP16 como dominio de transactivación en el sistema FUN-LOV	27
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	45
MATERIAL COMPLEMENTARIO	46
BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de pendientes y luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 frente a pulsos de BL de 2 horas a intensidades de 24 y 44 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	29
Tabla 2. Comparación de pendientes y luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 frente a pulsos de 30, 60 y 120 min.	32
Tabla 3. Comparación de luminiscencia máxima alcanzada y tiempo en que se llegó a este punto para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 en condiciones de BL constante.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de sistema de expresión por luz FUN-LOV.	8
Figura 2. Esquema de construcciones y cepas utilizadas para evaluar los nuevos sistemas.	18
Figura 3. Caracterización de sistema FUN-LOV LexA en respuesta a pulsos de luz.	21
Figura 4. Caracterización de sistema FUN(AND)LOV en respuesta a cobre y pulsos de luz.	24
Figura 5. Caracterización de sistema AND en respuesta a cobre y pulsos de luz.	26
Figura 6. Caracterización de sistema FUN-LOV VP16 en respuesta a pulsos de luz.	28
Figura 7. Respuesta diferencial entre sistema FUN-LOV y FUN-LOV VP16 a pulsos de luz de distinta duración en el tiempo.	31
Figura 8. Cinéticas de luminiscencia en el tiempo en condiciones de luz y oscuridad constantes.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AD: Activation Domain.

Amp: Ampicilina.

BL: Blue Light.

CTD: Carboxy Terminal Domain.

DBD: DNA Binding Domain.

FAD: Flavín Adenin Dinucleótido.

FMN: Flavín Mononucleótido.

FUN-LOV: Fungal Light-Oxygen-Voltage.

GOI: Gene of Interest.

His: L- Histidina.

LB: Luria-Bertani.

Leu: L- Leucina.

LRE: Light Response Elements.

Nat: Nourseotricina.

PAS: Per-Arnt-Sim.

PCB: Ficocianobilina.

PEG: Polyethylene Glycol.

PIF3: Phytochrome Interacting Factor.

PhyB: Phytochrome B.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RL: Red Light.

RNA pol II: RNA polimerasa II.

SAGA: Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferasa.

TF: Transcription Factor.

TFIID: Transcriptional Factor II D.

UAS: Upstream Activation Sequence.

Ura: Uracilo.

VVD: VIVID.

WC-1: WHITE COLLAR-1.

WCC: White Collar Complex.

YPD: Yeast Peptone Dextrose.

YNB: Yeast Nitrogen Base.

RESUMEN

Los fotorreceptores se encuentran ampliamente distribuidos en todos los dominios de la vida, y se caracterizan por experimentar cambios de conformación inducidos por la presencia o ausencia de luz. Estas moléculas, junto con distintas herramientas ópticas, han permitido la aparición de la optogenética, que consiste en el uso de luz para permitir el comando de distintos procesos biológicos con un fino control espacio-temporal. El uso de luz como tratamiento inductor se destaca debido a que es una señal fácil de regular y con gran resolución espacial, popularizando su uso en sistemas mamíferos. Recientemente, el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* ha sido también adoptado como una plataforma para este tipo de aproximaciones, ya que no presenta fotorreceptores descritos, y por lo tanto, no es capaz de sensar la luz.

Recientemente, se ha descrito un sistema optogenético llamado *Fungal Light-Oxygen-Voltage* (FUN-LOV). Este se basa en la interacción de los dominios LOV de las proteínas WHITE COLLAR 1 (WC-1) y VIVID (VVD) del hongo *Neurospora crassa*, y en la arquitectura clásica de los sistemas de doble híbrido. FUN-LOV presentó notables niveles de inducción en la transcripción de un gen reportero luciferasa, y bajo ruido en condiciones de oscuridad, por lo que se presenta como uno de los sistemas optogenéticos más robustos reportados hasta la fecha. Sin embargo, poco se sabe sobre

el papel que cumplen los distintos dominios de las proteínas que participan en este tipo de arquitectura para la funcionalidad y robustez del sistema optogenético.

Es por esto que este seminario de título se presenta como una revisión de la modularidad y robustez del sistema FUN-LOV. Para esto se intercambiaron los dominios de unión a DNA (DBD) y de activación (AD) del sistema original por el de diferentes factores de transcripción (TF), ampliamente descritos en *S. cerevisiae*, tales como el DBD de las proteínas LexA y Cup2p, y el AD de VP16.

Con el objetivo de realizar esta evaluación se generaron las correspondientes construcciones genéticas *in silico*, para luego ensamblarlas *in vivo* usando clonamiento por recombinación en levaduras. La evaluación de los sistemas se realizó de forma indirecta a través de la cuantificación de la actividad del gen reportero luciferasa (LUC) en respuesta a luz azul (BL) y al estímulo particular de cada dominio intercambiado (cobre, luz roja).

Como resultado se obtuvo que ambos sistemas en los que se hizo un cambio a nivel de DBD/promotor, presentaron una pérdida en su funcionalidad y robustez, lo que sugiere fuertemente que dichos módulos son de vital importancia para este tipo de sistemas optogenéticos. Por su parte, el sistema FUN-LOV VP16 mantuvo su funcionalidad como interruptor-optogenético, pero presentó un menor nivel de inducción de actividad luciferasa, además de una cinética más lenta comparado con el sistema ya reportado.

Finalmente, se concluye que el sistema FUN-LOV no es modular a nivel de DBD/promotor, ya que al remplazar estos módulos el sistema pierde su funcionalidad y

robustez. Por otro lado, el sistema es modular a nivel de AD, ya que mantiene su funcionalidad, mientras que la robustez varía dependiendo de la naturaleza del AD a utilizar.

ABSTRACT

Photoreceptors are widely distributed in all the domains of life and are characterized by undergoing conformational changes induced by the presence or absence of light. These molecules, together with different optical tools, have allowed the appearance of optogenetics, which involves the use of light to allow the command of different biological processes with a fine spatio-temporal control. Light as an inducer treatment is remarkable since it is easy to regulate and provides great spatial resolution, which has boosted its use in mammalian systems. Recently, the model organism *Saccharomyces cerevisiae* has been adopted as an ideal platform for this kind of systems, due to the absence of described photoreceptors, and therefore, it is not capable to sense the light.

Recently, an optogenetic system called FUN-LOV has been described. FUN-LOV is based on the interaction of *Neurospora crassa* photoreceptors WC-1 and VVD, and on the classical architecture of the double hybrid systems. FUN-LOV showed remarkable levels of luciferase gene expression, and low noise in dark conditions, so it is presented as one of the most robust optogenetic systems reported so far. Nonetheless, little is known about the role played by the different protein domains for the functionality and robustness of the optogenetic system.

Therefore, this title seminar is presented as a revision of modularity and robustness of the FUN-LOV system. For this, the DBD and AD of the original system were exchanged for different TF domains widely described in *S. cerevisiae*, such as the DBD of the LexA and Cup2 proteins, and the AD of VP16.

The evaluation was carried out generating the genetic constructions *in silico*, to then assemble them *in vivo* using yeast recombinational cloning. The evaluation of the systems was performed indirectly through the activity quantification of LUC reporter gene in response to BL and the particular stimulus for each domain exchanged (copper, red light).

As results, a loss of functionality and robustness was observed when the domains where exchanged at the DBD/promoter level, strongly suggesting that these modules are crucial for this type of optogenetic systems. On other side, the FUN-LOV VP16 system keep its functionality as an opto-switch, but showed a lower induction of luciferase activity, and slower kinetics in relation with the already reported system.

Finally, we concluded that FUN-LOV is not a modular system at the DBD/promoter level, because functionality and robustness of the system are lost when these modules were replaced. Nonetheless, the system is modular at the AD level, since it maintained its functionality, meanwhile the robustness varies depending on the nature of the AD used.

INTRODUCCIÓN

Los fotorreceptores cumplen papeles fundamentales en los organismos vivos, incluyendo plantas, bacterias, hongos y eucariontes superiores en general. Para sentir luz, los fotorreceptores suelen incorporar un cofactor exógeno, llamado cromóforo, que absorbe la luz y la transmite en forma de energía a la estructura proteica del fotorreceptor. Esta transmisión de energía lleva a un cambio conformacional, que se traduce a la activación del receptor, y la consecuente propagación de una determinada señal (Shcherbakova y col., 2015).

Entre los fotorreceptores más estudiados encontramos a los dominios LOV, los cuales pertenecen a la familia de proteínas Per–Arnt–Sim (PAS) (Shcherbakova y col., 2015). Estos dominios se caracterizan por funcionar como fotorreceptores de luz azul (BL) en plantas, bacterias y hongos, aunque con considerables diferencias en cinéticas y mecanismos de respuesta (Zoltowski y col., 2009). Junto con sentir BL, estos dominios son capaces de regular una gran cantidad de respuestas frente a este estímulo lumínico, tales como fototropismos, movimientos de cloroplastos (Christie 2007), entrenamiento de relojes circadianos (Froehlich y col., 2002; Hevia y col., 2016), e incluso uniones célula a célula en bacterias (Purcell y col., 2007). En cuanto a las proteínas en sí, nos encontramos con que estos dominios LOV se caracterizan por tener tamaños pequeños (~11– 15 kDa) (Shcherbakova y col., 2015) y porque pueden unir flavín mononucleótido (FMN) o flavín adenin dinucleótido (FAD) como cofactor, en donde

independientemente de cuál de estas molécula unan, siempre son capaces de generar un aducto cisteinil flavina C4a al ser excitadas con luz azul (Zoltowski y col., 2009). Por el contrario, en condiciones de oscuridad la reacción se dirige térmicamente en sentido contrario, tomando entre 10 a 10^3 segundos en volver al estado inicial de la proteína (Shcherbakova y col., 2015).

Dos casos bien estudiados de proteínas con dominios LOV corresponden a las proteínas WC-1 y VVD de *Neurospora crassa*. WC-1 junto a WC-2 forman el factor de transcripción (TF) heterodimérico White Collar Complex (WCC), el cual no sólo actúa como un fotoreceptor de luz azul, que lleva a la activación transcripcional frente a este estímulo, sino que además un elemento clave del oscilador circadiano de *Neurospora* (Montenegro-Montero y col., 2015). Este factor de transcripción controla a una red transcripcional que regula cerca de 20% de los genes de este organismo, generando oscilaciones diarias en sus niveles así como también aumentando su transcripción de forma aguda en respuesta a luz (Chen y col., 2009; Smith y col., 2010; Montenegro-Montero y col., 2015). Entre estos genes se destaca *vvd*, el que si bien no es esencial para la función del reloj, es clave en el proceso de fotoadaptación. La transcripción de este gen es comandada por WCC, el cual en respuesta a luz forma un complejo homodimérico que es capaz de unirse directamente al promotor de *vvd* (Malzahn y col., 2010). Una vez expresado, VVD es capaz de interactuar a través de su dominio LOV con WCC, actuando como un inhibidor competitivo de los homodímeros, y reduciendo la unión de WCC a los elementos de respuesta a luz (LREs). Esta interacción termina por impedir una mayor transcripción en respuesta a luz, generándose de esta forma el proceso de fotoadaptación (Montenegro-Montero y col., 2015).

A partir del año 2002, es que ciertos fotorreceptores se comenzaron a utilizar para generar distintos sistemas sintéticos capaces de ser activados por luz, surgiendo de esta forma el término *optogenética*, el cual se define como la combinación de la genética y los métodos ópticos para la activación o represión de procesos celulares por luz (Deisseroth 2011).

Uno de los primeros campos en donde se utilizó la optogenética fue en el de la neurociencia, en donde un canal catiónico sensible a luz llamado *Channelrhodopsin-2* permitió el control por luz de eventos de transmisión sinápticos tanto excitatorios como inhibitorios, con una notable resolución temporal de milisegundos (Boyden y col., 2005). Este trabajo fue rápidamente seguido por un aumento de la cantidad de canales sensibles a luz disponibles, junto a una amplia gama de procesos bajo control optogenético, llegando incluso a notables aplicaciones como la modulación de conducta en animales, entre otros (Aravanis y col., 2007). Otra de las estrategias que aunque poco apreciada en su momento, pero relevante desde el punto de vista histórico para el desarrollo de la optogenética, se basó en la interacción luz roja (RL) dependiente del fitocromo B (PhyB) y el factor de transcripción PIF3 de *Arabidopsis thaliana* (Shimizu-Sato y col., 2002). En este trabajo, por medio del sistema de doble híbrido, se utilizó el DBD y el AD del TF GAL4 unidos a PhyB y PIF3 con el fin de reconstituir un factor de transcripción quimérico funcional en respuesta a luz roja, el cual terminó por generar nuevos sistemas de control transcripcional, basados en los cambios conformacionales e interacciones dependientes de luz. De esta forma, estos dos hitos han permitido situar el uso de la luz como una herramienta notable al momento de manipular y responder variadas interrogantes en torno a los sistemas biológicos.

Un tercer sistema de importancia para el desarrollo de la optogenética y para este seminario de título, corresponde al sistema *LightOn*, ya que a partir de esta investigación se comenzó a utilizar los dominios LOV para la generación de nuevos sistemas optogenéticos (Wang y col., 2012). *LightOn* consta de sólo un componente, el cual corresponde a una proteína quimérica basada en el AD de P65, el DBD de Gal4, además de una versión modificada del dominio LOV de la proteína VVD de *N. crassa*. Este sistema se diseñó sin el dominio de dimerización del DBD de Gal4, el cual es vital para que el TF se una a *pGAL1*, con el fin de que la proteína dimerice de forma dependiente de BL gracias al cambio conformacional de VVD. De esta forma, este único componente es capaz de unirse al DNA en forma de homodímero y generar un TF capaz de reclutar la maquinaria de transcripción en respuesta a BL. Se destaca que este sistema presentó entre 200 y 300 veces de inducción del gen reportero luciferasa en un amplio rango de células de mamíferos, mientras que la versión optimizada a nivel de promotor del gen reportero y su relación respecto a la cantidad de proteínas del sistema alcanzó 1000 veces de inducción (Ma y col., 2013).

Algunas de las ventajas que ha mostrado la optogenética, y en particular, el uso de la luz en estos sistemas, es que permiten inducir eficientemente la expresión de genes, destacándose la rapidez y facilidad con que la luz se puede aplicar o remover desde un medio de cultivo a diferencia del convencional uso de inductores químicos. Además de esto, la luz presenta las características de ser un recurso barato, fácil de regular, y que permite un fino control espacio-temporal de la expresión génica (Salinas y col., 2017).

Dentro de los distintos organismos en los que se han implementado estos sistemas, se destaca que *S. cerevisiae* ha sido una plataforma ideal para el desarrollo de interruptores optogenéticos, ya que no se ha descrito en esta levadura ningún tipo de fotorreceptor de los conocidos en otros organismos (p. ej., criptocromos, fitocromos y rodopsinas) que puedan sensar intensidad y espectro de luz (Robertson y col., 2013). De esta forma, es que está ampliamente aceptado que *S. cerevisiae* no es capaz de responder al espectro de luz visible, destacándose además, que tampoco se ha reportado ningún comportamiento de anticipación a luz que pueda estar mediado por un mecanismo oscilatorio de mantención del tiempo (Robertson y col., 2013). En otras palabras, la luz se comporta como una señal ortogonal en *S. cerevisiae*, ya que interfiere mínimamente con su metabolismo endógeno (Shcherbakova y col., 2015). Sumado a las características ya mencionadas, este organismo presenta otras notables cualidades que lo han llevado a ser una de las principales plataformas biológicas para la producción de pequeñas y grandes moléculas, tales como el poseer un rápido crecimiento en fuentes de carbono relativamente baratas, una genética bien desarrollada, un metabolismo endógeno capaz de producir precursores para distintos compuestos de interés, robustez en fermentaciones a gran escala, además de presentar resistencia a distintos inhibidores o virus (Hong & Nielsen 2012). A esto se suma la capacidad y disponibilidad de distintas herramientas genéticas para perturbar las vías metabólicas, colecciones públicas de cepas *knockouts*, además de la facilidad para la generación y análisis de mutantes (Hong & Nielsen 2012).

Un caso particular, y en el cual se centra este seminario de título, es el recientemente publicado interruptor optogenético llamado *Fungal Light-Oxygen-Voltage* (FUN-LOV) (Salinas y col., 2018). Este último consiste en un sistema de doble híbrido

que utiliza DBD y AD de Gal4 unidos a los dominios LOV de las proteínas WC-1 y VVD provenientes de *N. crassa* (Figura 1). Este interruptor fue desarrollado en *S. cerevisiae* y ha permitido activar la expresión de genes en respuesta a BL o luz blanca, generándose de esta forma un estado de “encendido” y uno de “apagado” dependiendo de la presencia o ausencia de luz, respectivamente. Dentro de los resultados más notables que presenta este interruptor, respecto al resto de los que se encuentran en la literatura, es que al inducir la expresión del gen reportero luciferasa, bajo el comando del interruptor optogenético, se obtienen altos valores de inducción de la actividad luciferasa, mientras que en oscuridad los valores de la luminiscencia se encuentran prácticamente en cero. En específico, se destaca la existencia de un rango dinámico de más de 1300 veces de inducción que depende principalmente del tiempo de exposición a la luz al cual se sometan las células (Salinas y col., 2018).

Junto con el éxito de los resultados obtenidos a partir de este interruptor optogenético, es que también surgieron interrogantes respecto a las propiedades de los distintos dominios proteicos utilizados en la arquitectura del sistema FUN-LOV, en particular, refiriéndose a cuál sería la relevancia de cada uno de los distintos dominios del doble híbrido que componen el interruptor, y si estos dominios pueden ser reemplazados por otros de similares características sin que el sistema pierda su robustez frente a luz, entendiéndose *robustez* como una propiedad que le permite a un sistema mantener su funcionalidad frente a perturbaciones internas y externas (Kitano 2004). Por esta razón, el siguiente seminario de título se presenta como una revisión de los distintos dominios del interruptor optogenético FUN-LOV, en donde el objetivo es evaluar la modularidad del sistema a nivel DBD y AD, entendiéndose *modularidad* como una propiedad de un sistema, tal que puede ser dividido entre subunidades discretas que

realizan tareas específicas de forma independiente de las otras subunidades (Mukherji & Van Oudenaarden 2009).

Esta característica es de relevancia no sólo en la biología sintética, ya que por una parte, ha permitido estudiar el surgimiento de la complejidad a partir de combinaciones de estructuras pre-existentes en la aparición de nuevos fenotipos, mientras que por otra, ha permitido explorar los principios de diseño que determinan la estructura y funcionamiento de los sistemas biológicos (Mukherji & Van Oudenaarden 2009). Esto ha sido de vital importancia al momento de desarrollar y aplicar de herramientas de biología sintética para controlar el comportamiento celular, ya que mediante el uso racional de estas partes o módulos precisamente caracterizados, ha sido posible generar verdaderos circuitos genéticos capaces de realizar una función determinada, como por ejemplo, una función *Booleana* (Wang y col., 2011).

De esta manera, para evaluar la modularidad de los dominios del sistema optogenético FUN-LOV, se utilizaron DBDs y ADs distintos de los utilizados en el sistema original, tales como el DBD del represor de *Escherichia coli* llamado LexA, el DBD de la metalotioneína de *S. cerevisiae* Cup2p, y el AD proveniente del virus herpes simplex conocido como VP16. La funcionalidad y robustez de cada sistema para inducir la transcripción se evaluó de forma indirecta a través de la cuantificación de la actividad del gen reportero LUC en respuesta BL y al estímulo particular de cada dominio intercambiado (cobre, RL).

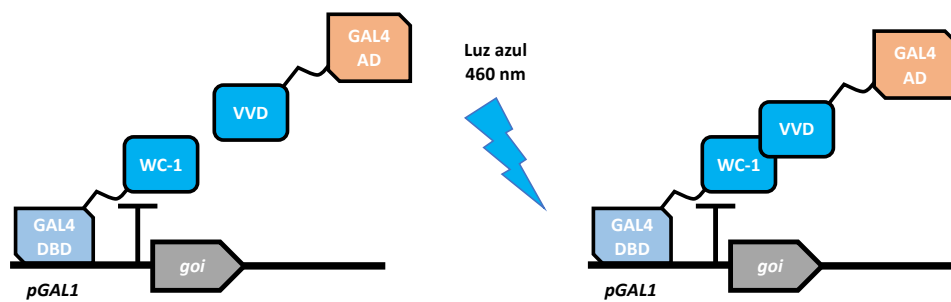


Figura 1. Esquema de sistema de expresión por luz FUN-LOV. En condiciones de oscuridad las proteínas WC-1 y VVD no son capaces de interactuar y, por lo tanto, no permiten la transcripción del gen de interés (*goi*). Por el contrario, al exponerse el sistema a BL los dominios LOV de las proteínas ya mencionadas son capaces de interactuar, permitiendo la transcripción del *goi*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: El interruptor optogenético FUN-LOV es capaz de mantener su robustez aun cuando sus dominios de unión a DNA y de transactivación son intercambiados por otros dominios de similares características.

Objetivo General: Evaluar la modularidad del dominio de unión a DNA/promotor y del dominio de transactivación en el sistema FUN-LOV, luego de intercambiarlos por otros de similar naturaleza.

Objetivos Específicos:

- Diseñar y generar las construcciones con los distintos DBD/promotor y AD que van a permitir obtener las nuevas variantes del sistema FUN-LOV.
- Caracterizar los niveles de expresión de los nuevos sistemas tanto en condiciones de luz como en oscuridad, mediante el gen reportero de la luciferasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.

Bacterias.

Se utilizó la cepa *DH5 α* de *Escherichia coli* (F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYAargF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r κ ⁻, m κ ⁺) *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*).

Levaduras.

Se utilizó la cepa *PJ69-4A* de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ*).

Vectores.

Se utilizó los vectores de clonamiento pRS423, pRS425 y pRS426.

Equipos.

- Termoblock Pierce.
- Termomixer Eppendorf.
- Cabina de flujo laminar vertical NuAire AireGard 126-400E.
- Baño termostático Haake K20 DC3.

- Balanza electrónica Sartorius TE 1502 S.
- Balanza analítica ADAM AFA-180LC.
- Vortex Mixer Vision Scientific Co., LTD KMC-1300V.
- Agitador magnético Thermolyne Nuova II Stirrer S-18525.
- Fuente de poder CBS Scientific Company INC EPS250.
- Purificador Ultrapure (TYPE I) Water Simplicity Merck Millipore.
- Centrífuga refrigerada Hermle Z300K.
- Microcentrífuga refrigerada Hettich Mikro 22R.
- pH-metro HI 2221 Hanna Instruments.
- Transiluminador UV Vilber Lourmat.
- Sistema UltraCam Digital Imaging con cámara fotográfica Canon PowerShot A650 con filtro UV.
- Estufa de incubación a 37°C LabTech.
- Estufa de incubación a 30°C LabTech.
- Termociclador Veriti de 96 pocillos Applied Biosystems.
- Nanodrop 2000 Thermo Scientific.
- Lector Multi-Modal con Sistema de Captura de Imágenes Celulares Cytation 3 BioTek.
- Incu-Shaker 10L Benchmark.
- ChemiDoc™ MP Imaging System Bio-Rad.

Medios de cultivo.

Bacterias.

Medio Luria-Bertani (LB): Compuesto por L-Broth 1,55%. En caso de preparar LB sólido, se adiciona agar en una concentración final de 1,5%. En ambos casos, la esterilización del medio se realiza por medio de autoclave a 121°C durante 18 minutos. La selección de bacterias se realizó por medio de ampicilina (Amp) a una concentración final de 100 µg/mL.

Levaduras.

Medio YPD: Compuesto por extracto de levadura 1%, peptona 2%, D-glucosa 2%. En caso de preparar YPD sólido, se adiciona agar a una concentración final de 2%. La esterilización del medio se realizó por medio de autoclave a 121°C durante 18 minutos. La selección de levaduras se realizó por medio de nourseotricina (Nat) a una concentración final de 0,1 mg/mL.

Medios Sintéticos: Compuesto por YNB sin aminoácidos 0,67%, D-glucosa 2% y mix de aminoácidos determinado 0,2%. Para la preparación del medio sólido se adicionó agar a una concentración final de 2%. La esterilización de estos medios fue por medio de autoclave a 121°C durante 18 minutos. La selección de levaduras se realizó por medio de marcadores de auxotrofia para uracilo (Ura), L-leucina (Leu) y/o L-histidina (His).

Partidores.

La síntesis de partidores se hizo a través de la empresa MacroGen (Corea). El diseño de estos se realizó utilizando el programa DNASTAR7 y Benchling (<https://benchling.com/>). En Material complementario 1 se encuentra el listado de los partidores utilizados en este seminario de título.

Secuenciación.

La secuenciación de DNA se llevó a cabo a través del servicio de la empresa Macrogen.

Cultivos.

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron a 37°C en medio LB-Amp con agitación constante a 180 rpm. Para el caso de cultivos sólidos se utilizó una incubadora a la misma temperatura.

Los cultivos líquidos de levaduras se realizaron a 30°C en medio YPD o medios sintéticos con agitación constante. Para el caso de cultivos sólidos se utilizó una incubadora a la misma temperatura.

Purificación de DNA plasmidial.

La purificación de plásmidos desde bacterias se realizó utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración fue cuantificada mediante el sistema Nanodrop 2000.

La purificación de plásmidos desde levaduras se realizó usando el kit Zymoprep Plasmid Miniprep Kit II (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transformación de bacterias.

Las bacterias ultracompetentes se prepararon de acuerdo al protocolo de Inoue y col. (1990). Las células se descongelaron desde -80°C, donde se mezclaron con 2 a 10 µL de plásmido, y se incubaron en hielo por 30 minutos. Se realizó un golpe de calor a 42°C por 1 minuto en un baño termoregulado, se adicionó un 1 mL de LB por muestra y se

recuperó por 1 hora a 37°C con agitación constante. Se centrifugó por 1 minutos a 13500 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 200 µL de LB y se plaqueó en LB-Amp.

Transformación de levaduras.

Se realizó de acuerdo al protocolo de Gietz y Woods (2002). Brevemente, se inoculó una cepa de levadura en 5 mL de YPD y se incubó *overnight* a 30°C con agitación constante. Al día siguiente, se tomó 300 µL del cultivo en 5 mL de YPD y se incubó por 4 horas a 30°C con agitación constante. Luego de esto, se puso 1mL de cultivo por tubo eppendorf para luego centrifugarlos a 8000 rpm por 5 minutos y finalmente descartar el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 1 mL de agua estéril, descartándose el sobrenadante luego de centrifugar por 1 minuto a 13500 rpm en cada ocasión. Una vez lavadas las células, se les agregó el mix de transformación, en el siguiente orden: 240 µL PEG 50% p/v, 36 µL acetato de litio 1 M, 40 µL de DNA de espermio de salmón 2 mg/mL desnaturalizado y un volumen final de 34 µL de productos de PCR, en donde se tomó 5 µL por reacción. Luego de esto se le dio a la células un golpe de calor a 42°C por 40 minutos. Éstas se centrifugaron a 13500 rpm por 1 minuto, para luego repetir un paso de lavado con agua, tal como se mencionó anteriormente. Finalmente, las células se resuspendieron con 200 µL de agua y se plaquearon en el medio correspondiente, para luego ser incubadas por 3 días a 30°C.

Generación de construcciones genéticas.

Se realizó de acuerdo al protocolo de Oldenburg y cols. (1997). Para esto se utilizó la maquinaria endógena de recombinación homóloga de *S. cerevisiae*, en donde la

levadura es capaz de ensamblar *in vivo* distintos fragmentos de DNA. Estos fragmentos fueron obtenidos por PCR usando una enzima de alta fidelidad (12,5 μ L de 2X Phusion Flash Mix, 1,25 μ L de cada partidor 10 mM, 1 μ L de DNA templado 50 ng/ μ L, 9 μ L de H₂O), en donde los partidores utilizados presentan 30 pb de homología con el fragmento siguiente. El programa de PCR utilizado consistió en 30 segundos a 98°C, 30 ciclos de 5 segundos a 98°C, 10 segundos a 55°C y una extensión de tiempo variable a 72°C (15 segundos por cada 1000 pb del fragmento a amplificar), para finalmente terminar el programa con 5 minutos a 72°C. Estos fragmentos son co-transformados en levadura junto con un vector previamente linearizado por digestión con enzimas de restricción. Las levaduras transformadas son crecidas en medio de selección, lo que permite recuperar sólo aquellas levaduras que han sido capaces de circularizar los plásmidos mediante el correcto ensamblaje de las construcciones diseñadas.

Los plásmidos recombinantes generados fueron purificados y transformados en *E. coli*, donde cada fragmento de la construcción fue chequeado por PCR (12,5 μ L de 2X GoTaq Green Mix, 0,5 μ L de cada partidor a una concentración de 10 mM/ μ L, 10,5 μ L de H₂O y una fracción de la colonia de interés). El programa de PCR consistió en 7 minutos a 98°C; 30 ciclos de 30 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y tiempo variable a 72°C (1 minuto por cada 1000 pb del fragmento a amplificar); 7 minutos a 72°C. Dos clones de cada plásmido fueron enviados a secuenciación. El detalle de cada plásmido generado se encuentra en material complementario 2.

Deleciones Genéticas.

Se utilizaron partidores con 50 pb de homología con las zonas que flanquean el ORF completo del gen a delecionar, en donde la transformación se hizo de igual modo que la

transformación en levaduras mencionada anteriormente, pero con una incubación *overnight* a 4°C luego del paso por el baño termoregulado a 42°C. En particular, en esta tesis sólo se generó la cepa PJ60-4A *CUP2* Δ , en donde el gen que codifica para el factor de transcripción Cup2p fue reemplazado por el marcador *Nat*.

Experimentos en lector de placa.

En este tipo de experimentos se creció las cepas de levadura en placas de 96 pocillos, en cultivo *overnight* a 30°C y en condiciones de oscuridad, en donde se evaluó 3 réplicas técnicas para cada una de las 3 réplicas biológicas utilizadas para evaluar cada sistema. Al día siguiente se creció las cepas en medio suplementado con luciferina a una concentración final de 0,1 mM, a una dilución 1:10, en placas de 96 pocillos con fondo óptico, en donde para el caso particular de los experimentos con PhyB y PIF3, el medio se llevó a una concentración final de 12 μ M de ficocianobilina (PCB) (Santa Cruz Biotechnology). A partir de esto se evaluó OD₆₀₀ y de luminiscencia en el tiempo cada 10 minutos, en donde se utilizó BL (460nm) a una intensidad de 24 μ mol m⁻² s⁻¹ y RL (660nm) a una intensidad de 700 μ mol m⁻² s⁻¹. Para esto se utilizó el usando el software Gen5 3.04 junto con el sistema Cytation 3. Todos los experimentos se realizaron en 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas en cada corrida experimental (n=9).

Generación de sistemas optogenéticos.

El diseño de los sistemas consta de 3 plásmidos, los que corresponden al AD_VVD en el vector pRS425, Al DBD_WC-1 en vector pRS243 y promotor_LUC en el vector pRS426 (Figura 2).

Cálculo de pendiente y análisis estadístico.

Las regresiones lineales de las curvas de luminiscencia en el tiempo se realizaron con el programa Prism 7, donde las rectas con mejor ajuste y sus respectivos errores estándar se calcularon a partir del valor de la luminiscencia promedio para cada punto de interés. Se utilizó el sistema FUN-LOV VP16 como referencia al momento de determinar los puntos para dichos cálculos, en donde se consideró desde el último punto con un valor dentro del promedio en condiciones de DD, hasta el punto máximo de luminiscencia en respuesta a luz.

La evaluación de las pendientes de las distintas rectas se llevó a cabo en el mismo programa. Para determinar si las pendientes de las rectas eran distintas de cero, se realizó un ANOVA con un *P-value* al 95%.

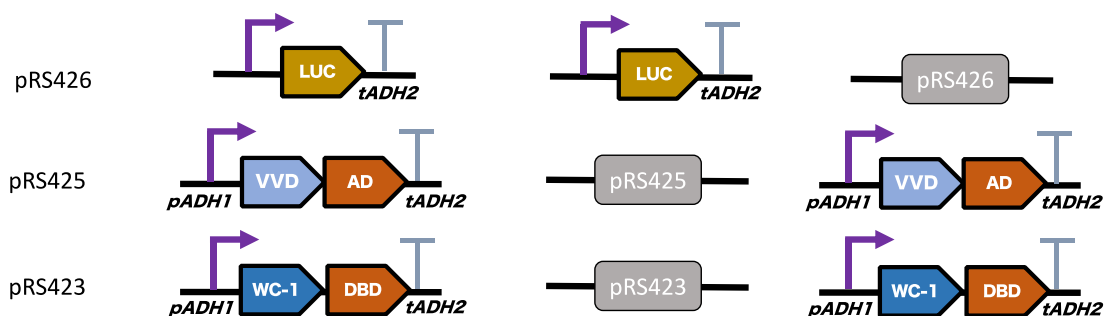


Figura 2. Esquema de construcciones genéticas y cepas utilizadas para evaluar los nuevos sistemas. Representación gráfica de las construcciones y vectores utilizados al momento de probar las variantes del sistema FUN-LOV, las cuales corresponden al WC-1_DBD en vector pRS243, al VVD_AD en el vector pRS425 y al promotor_LUC en el vector pRS426 . **(A)** Cepa con el sistema FUN-LOV de interés con los 2 plásmidos del sistema más el plásmido reportero, **(B)** cepa promotor_LUC con el plásmido reportero y los vectores pRS423 y pRS425 vacíos y **(C)** cepa FUN-LOV Control con los 2 plásmidos que componen el sistema y con el vector pRS426 vacío en vez del plásmido reportero.

RESULTADOS

LexA como sitio de unión a DNA en el sistema FUN-LOV.

Con el objetivo de evaluar la modularidad del sitio de unión a DNA del sistema FUN-LOV se decidió cambiar el DBD de Gal4 por el bien caracterizado represor LexA de *Escherichia coli*. Esta proteína es conocida por ser capaz de reprimir la transcripción de un variado número de respuestas coordinadas y reguladas en *E. coli*, incluyendo la respuesta SOS (Kovačič y col., 2013). LexA está compuesta por 202 residuos aminoacídicos (Markham y col., 1981) y se une al DNA como un homodímero a través de un motivo *helix-turn-helix* ubicado en su dominio aminoterminal. Por otra parte, el dominio carboxyterminal de LexA se caracteriza por permitir la dimerización y por poseer una latente actividad serin proteinasa (Kovačič y col., 2013). Además de estas características, este represor ha sido ampliamente utilizado en sistemas de doble híbrido tanto en levaduras como en otro tipo de células eucariontes, por lo que este DBD se presenta como un candidato ideal para evaluar la modularidad del sistema a este nivel.

Los experimentos de funcionalidad del *switch* optogenético se realizaron cuantificando la actividad luciferasa de las cepas de interés en el tiempo, tanto en condiciones de oscuridad constante (DD), como en condiciones de 7 horas de oscuridad interrumpidas por un pulso de BL de 2 h, esto con el objetivo de evaluar si el sistema era capaz de responder frente a un estímulo luminoso puntual. Las transformantes que se

evaluaron contenían el sistema optogenético completo (Figura 2A), el plásmido reportero sin el sistema de doble híbrido a modo de evaluar la actividad propia del promotor o cualquier reclutamiento de la maquinaria de transcripción de forma independiente del interruptor optogenético (Figura 2B), y el sistema de doble híbrido sin el plásmido reportero para descartar cualquier posible luminiscencia que pueda generar las proteínas del sistema optogenético (Figura 2C). Estas transformantes se mencionarán de aquí en adelante como FUN-LOV LexA, opLexA_LUC Control y FUN-LOV Control respectivamente, cuya nomenclatura también se utilizará para los demás sistemas propuestos en este seminario de título.

Como resultado de estos experimentos se obtuvo que los niveles de luminiscencia observados en condiciones de DD (Figura 3A) son similares a los observados frente al pulso de BL (Figura 3B), destacándose la mínima respuesta a la luz que presenta el sistema propuesto. Junto con esto se observó que opLexA_LUC Control también es capaz de responder a BL (Figura 3B), y que esta respuesta es incluso mayor que la que genera FUN-LOV LexA (Figura 3B). De esta forma, el sistema FUN-LOV LexA, tal como fue propuesto, no se presenta como un buen candidato para utilizarse como un interruptor optogenético, ya que sus niveles de inducción son bajos, y su promotor presenta actividad incluso aún mayor que la transformante que alberga el sistema completo. Estos resultados sugieren que el par promotor/DBD es un punto crítico para el funcionamiento correcto los interruptores optogenéticos basados en sistemas de doble híbrido.

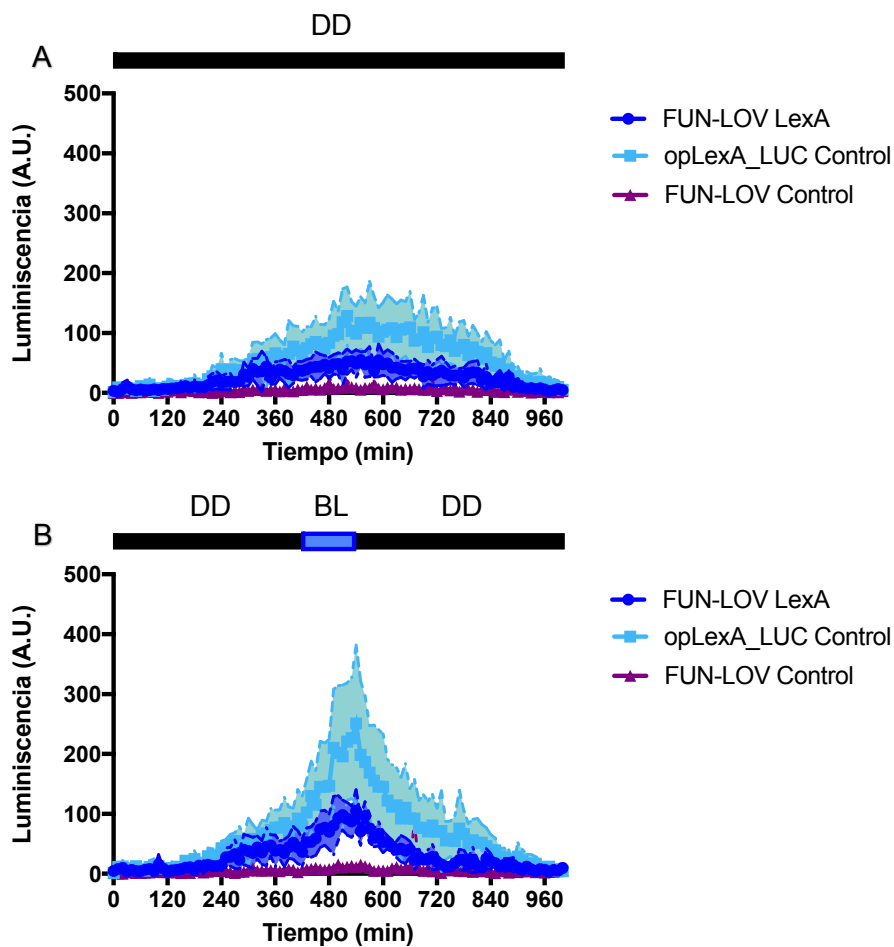


Figura 3. Caracterización de sistema FUN-LOV LexA en respuesta a pulsos de luz. Gráficos de actividad luciferasa en el tiempo para el sistema FUN-LOV LexA en (A) oscuridad constante (DD), y (B) con pulso de BL por 2 h a $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ luego de 7 h de DD. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

Cup2p como sitio de unión a DNA en el sistema FUN-LOV.

Como prueba de concepto se propuso utilizar DBD del TF Cup2p en conjunto al promotor de *CUP1* de *S. cerevisiae*, ya que se ha reportado que Cup2p en presencia de cobre es capaz de adquirir un cambio conformacional en su N-terminal rico en cisteínas, generando una superficie que se une al DNA y que es capaz de reconocer específicamente las secuencias de activación río arriba (UAS) del gen *CUP1*, el que codifica para una proteína capaz de quelar el cobre (Buchman y col., 1989; Leblanc y col., 2000). De esta forma, ya no sólo se necesitaría del estímulo luminoso para que los dominios LOV sean capaz de interactuar y generar la expresión del gen reportero, sino que también sería necesario un *input* de cobre para que el DBD de Cup2p sea capaz de interactuar con el promotor de *CUP1*. Por lo tanto, lo que se propone es generar un factor de transcripción que necesite de dos *inputs* para generar un *output*, o es otras palabras, un TF que presente las características de una compuerta lógica u operador *Booleano* del tipo AND.

En la evaluación de este sistema, que necesita tanto de luz azul como de cobre y que desde ahora llamaremos como FUN(AND)LOV, se generó una cepa *CUP2Δ::NatMx* dado que este gen es propio de *S. cerevisiae* y genera una fuerte respuesta en presencia de cobre al unirse al promotor de *CUP1*. Una vez obtenida esta cepa, se realizó el mismo experimento para evaluar el interruptor con LexA, pero con la diferencia de que a las 7 horas de iniciado el experimento se le agregó sulfato de cobre (CuSO₄) en solución a los pocillos llevándolos a una concentración final de 50 μM, para luego darles el pulso de BL por 2 h. Las transformantes control utilizadas para la evaluación de este sistema se generaron también en un *background CUP2Δ::Nat* , y

corresponden a *pCUP1_LUC* y FUN(AND)LOV Control, las que siguen el mismo principio mencionado en las Figuras 2B y 2C respectivamente. Como resultado se observó que la cepa con la compuerta lógica presenta una menor respuesta en presencia de cobre por sí solo (Figura 4A) que cuando se encuentra en presencia de ambos *inputs* (Figura 4B). Sin embargo, se observa que *pCUP1_LUC* presenta niveles de actividad luciferasa muy similares a lo que se observa en la cepa FUN(AND)LOV en las distintas condiciones, lo que sugiere que la actividad observada corresponde a actividad del promotor más que la del sistema propuesto.

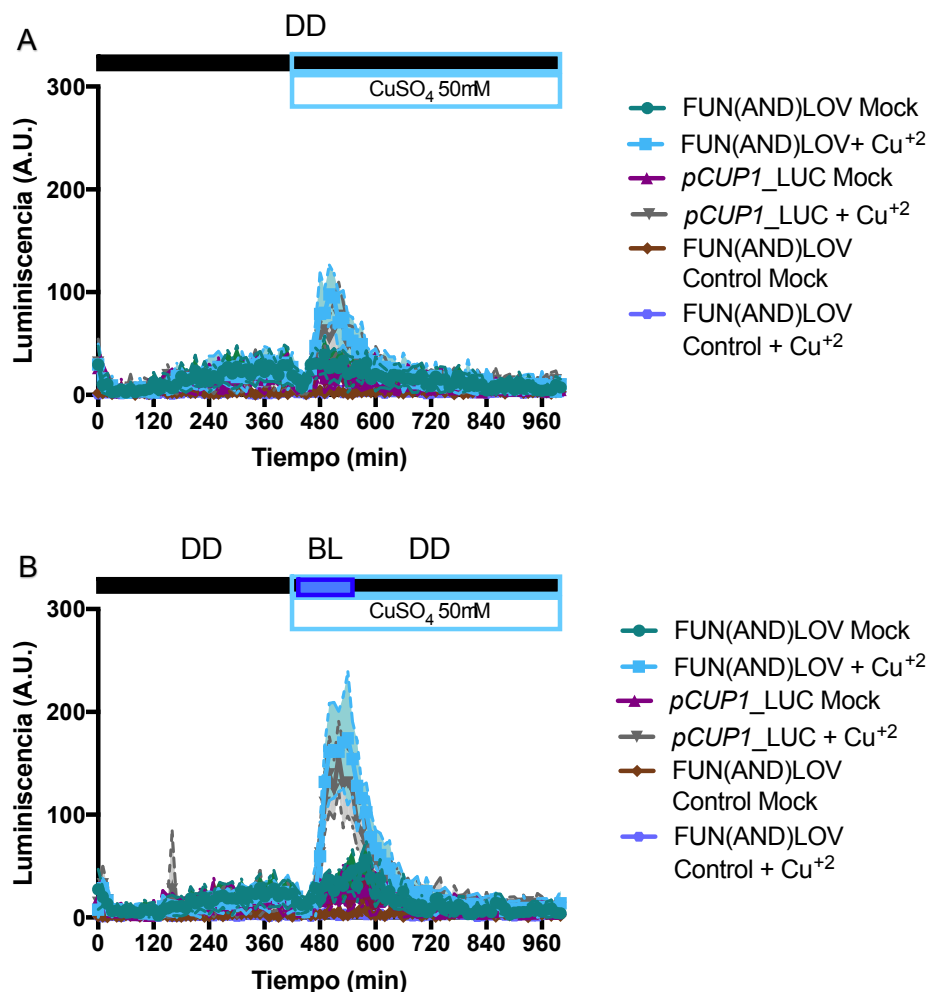


Figura 4. Caracterización de sistema FUN(AND)LOV en respuesta a cobre y pulsos de luz. Gráficos de actividad luciferasa en el tiempo para la cepa PJ69-4A *CUP2Δ::NatMx* con el sistema FUN(AND)LOV, utilizando 50 μ M de CuSO₄ luego de 7 horas de iniciado el cultivo, y mantenida en condiciones de **(A)** DD y **(B)** en condiciones de DD interrumpidas por un pulso BL de 2 h a 24 μ mol m⁻² s⁻¹ luego de 7 horas de cultivo. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

Considerando estos resultados, es que se decidió generar un sistema similar al propuesto anteriormente, pero esta vez haciendo uso de las proteínas PhyB y PIF3 de *Arabidopsis thaliana*, las cuales son capaces de interactuar en respuesta a RL y que fueron previamente utilizadas en el interruptor optogenético publicado por Shimizu-Sato y col. (2002) PhyB y PIF3 podrían evitar posibles complicaciones para el sistema FUN-LOV, ya que estas proteínas son mucho más grandes que los dominios LOV de WC-1 y VVD, y por lo tanto, éstas estarían menos afectadas por el cambio conformacional del DBD de Cup2p.

De esta forma, se repitió el protocolo de pulsos de luz, esta vez de luz roja, y cobre utilizado con el sistema FUN(AND)LOV. Se observó que el nuevo sistema AND es capaz de presentar un aumento en la actividad luciferasa en respuesta a cobre, pero no frente a RL, por lo tanto, no presenta las características de un circuito AND (Figura 4A y B). Además de esto, se observó que los niveles de inducción de la actividad luciferasa del sistema AND son similares a los que presenta la transformante *pCUP1_LUC*. Esto sugiere que el sistema AND no es capaz de inducir la expresión génica, y que la actividad luciferasa observada corresponde sólo a la actividad que presenta el plásmido reportero.

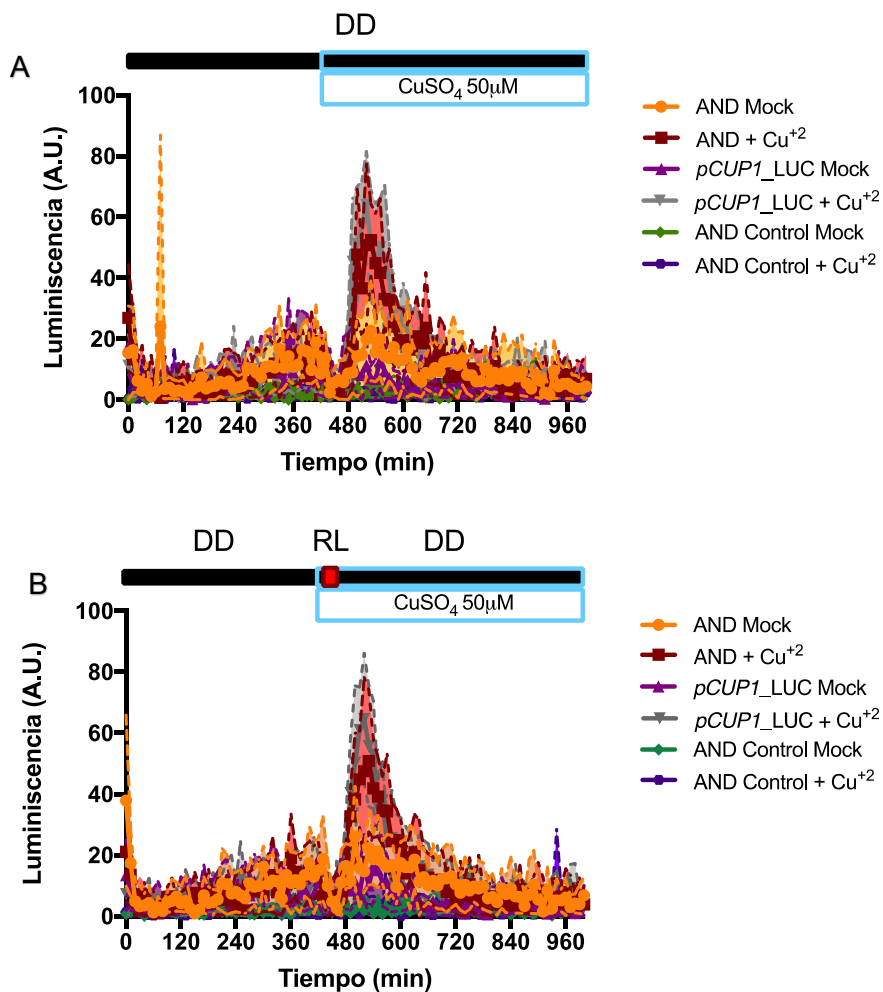


Figura 5. Caracterización de sistema AND en respuesta a cobre y pulsos de luz. Gráficos de actividad luciferasa en el tiempo para la cepa PJ69-4A *CUP2Δ::NatMx* con el sistema AND, utilizando 50 μM de CuSO₄ luego de 7 horas de iniciado el cultivo, y mantenida en condiciones de **(A)** DD y **(B)** en condiciones de DD interrumpidas por un pulso RL de 30 min a 700 μmol m⁻² s⁻¹ luego de 7 horas de cultivo. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

VP16 como dominio de transactivación en el sistema FUN-LOV.

Con el fin de seguir evaluando la modularidad del sistema FUN-LOV, pero esta vez a nivel de AD, se intercambi6 el AD de Gal4 por el ampliamente descrito y utilizado AD de VP16, que proviene del virus herpes simplex. Este AD se caracteriza por ser del tipo 6cido y por activar la transcripci6n temprana de genes virales al usar la maquinaria de la c6lula hu6sped (Milbradt y col., 2011). En humanos se ha descrito que VP16 recluta un complejo coactivador transcripcional conocido como “ARC”, el cual media el reclutamiento dependiente de activador de la RNA polimerasa II (pol II) para dirigirse a los genes blanco v6a uni6n al dominio C-terminal (CTD) de la pol II, estando este complejo estructural y funcionalmente relacionado con el complejo Mediador presente en *S. cerevisiae* (N6är y col., 2002; Milbradt y col., 2011).

Considerando estas caracter6sticas es que se realiz6 el intercambio de AD manteniendo constantes las dem6s partes del sistema FUN-LOV, y se evalu6 el desempe6o de este nuevo interruptor optogen6tico al exponer las c6lulas al mismo protocolo de luz azul utilizado en el caso del sistema con LexA. A partir de esto, se observ6 que el nuevo sistema, que desde ahora llamaremos FUN-LOV VP16, es capaz de inducir la expresi6n del gen reportero en respuesta al pulso de luz azul, mientras que en condiciones de DD el sistema no es capaz de responder (Figura 6A y B). A pesar de esto, al comparar los valores obtenidos tanto para la pendiente como para el m6ximo de luminiscencia registrados, nos encontramos con que estos fueron menores a los observados para el sistema FUN-LOV cl6sico. Por lo tanto, este nuevo sistema mantiene su funcionalidad como interruptor optogen6tico, pero presenta una disminuci6n en su robustez (Tabla 1).

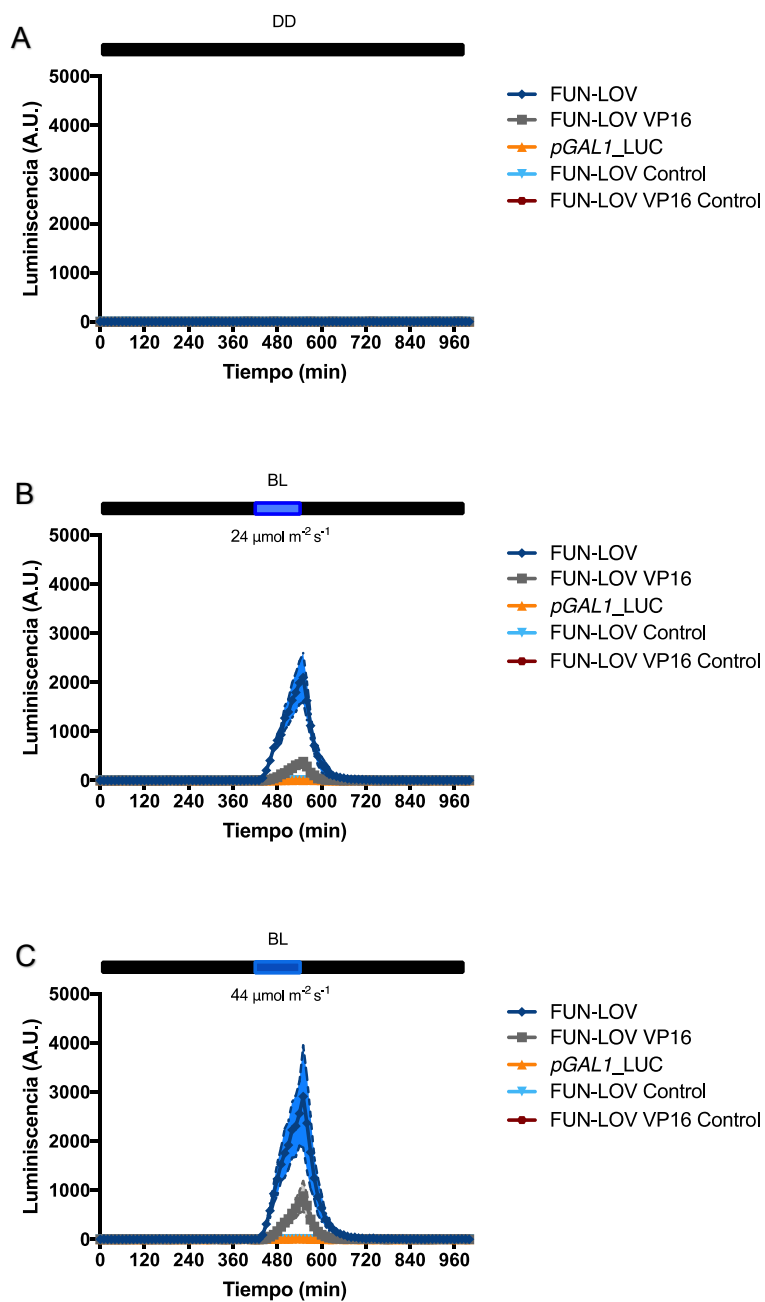


Figura 6. Caracterización de sistema FUN-LOV VP16 en respuesta a pulsos de luz. Gráficos de actividad luciferasa en el tiempo para sistema FUN-LOV VP16 en (A) DD, y (B) condiciones de DD por 7 horas con pulso BL por 2 h a $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a (C) $44 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

Tabla 1. Comparación de pendientes y luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 frente a pulsos de BL de 2 horas a intensidades de 24 y 44 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

	24 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		44 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
	Pendiente	Luminiscencia máxima (A.U.)	Pendiente	Luminiscencia máxima (A.U.)
FUN- LOV	18,79 \pm 0,4	2098	24,86 \pm 0,6	2909
FUN- LOV VP16	3,43 \pm 0,2	380	7,55 \pm 0,6	881

Tabla 1. Comparación de pendientes y luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 frente a pulsos de BL de 2 horas a intensidades de 24 y 44 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se calcularon las pendientes de la curva de activación y su respectivo error estándar a partir del promedio de cada punto obtenido, mientras que el cálculo de la luminiscencia máxima se obtuvo a partir del promedio de luminiscencia obtenido en el punto en que se registró la mayor actividad luciferasa.

Un punto interesante de los resultados obtenidos fue que el interruptor con VP16 presentó una inducción de luminiscencia a los 40 minutos de iniciado el pulso de BL, lo que corresponde a un retraso de cerca de 20 minutos con respecto al interruptor clásico. Por lo tanto, con el objetivo de visualizar si es que el nuevo interruptor es capaz de responder a los pulsos de luz menores de 40 minutos, se generaron distintos experimentos en los que se dieron pulsos de 30, 60 y 120 minutos de luz azul en el tiempo (Figura 7A, B y C respectivamente). Tal como se esperaba, y como se observa en la Figura 7A, el sistema FUN-LOV VP16 no muestra mayor activación en los pulsos de 30 min, mientras que para los pulsos de 60 (Figura 7B) y 120 min (Figura 7C) si se observa un aumento en la luminiscencia.

Para hacer un análisis mayor de los datos obtenidos, se calculó la pendiente y el punto de luminiscencia máxima observada para el segundo pulso de luz dado en cada uno de los distintos experimentos, ya que es en este punto donde se pudo observar una mayor luminiscencia para la distintas condiciones (Tabla 2). A partir de esto, se observó que al igual que en el experimento anterior (Figura 6B, Tabla 1), el sistema clásico presentó una mayor pendiente y un mayor *peak* de luminiscencia para los distintos pulsos dados (Tabla 2) y que para el caso del pulso de 30 min el sistema FUN-LOV VP16 presentó bajos niveles de luminiscencia, destacándose que la pendiente en este pulso no fue significativamente distinta de cero. Por lo tanto, se concluye que el sistema FUN-LOV VP16 no es capaz de responder a pulsos de BL menores de 30 min, a diferencia de lo que se observa en el sistema FUN-LOV clásico.

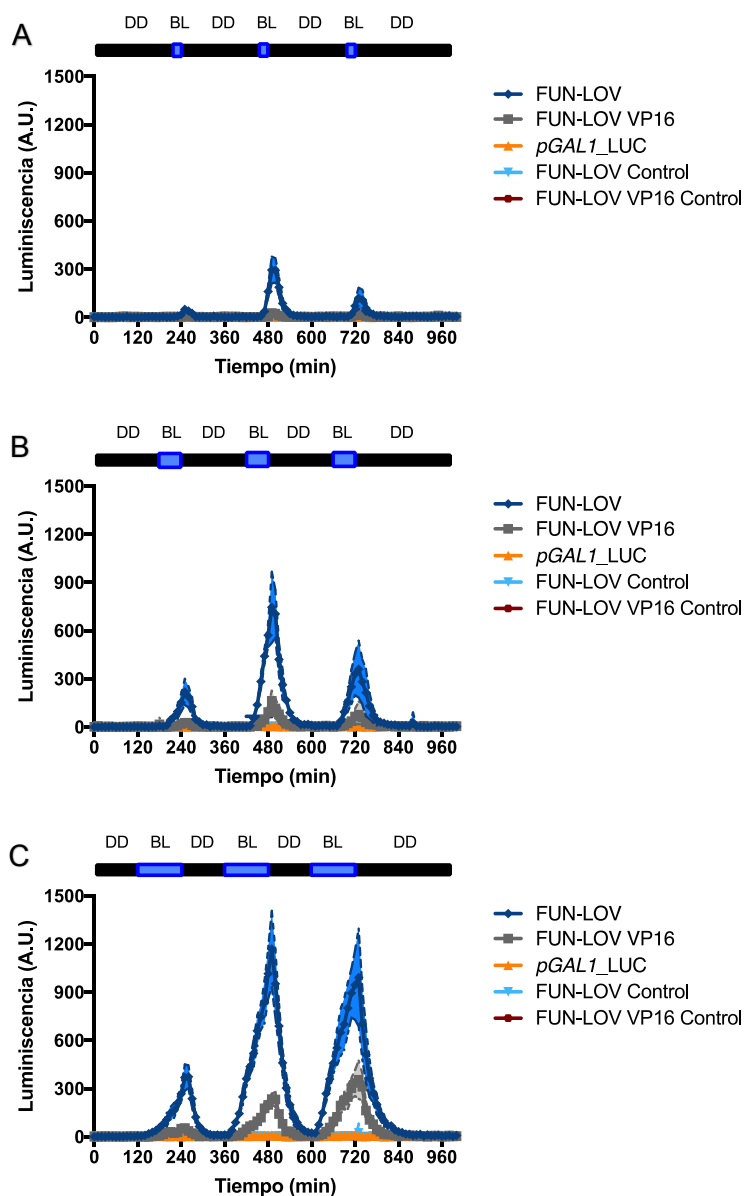


Figura 7. Respuesta diferencial entre sistema FUN-LOV y FUN-LOV VP16 a pulsos de luz de distinta duración en el tiempo. Curvas de actividad luciferasa en el tiempo de cepas que contienen el sistema FUN-LOV y FUN-LOV VP16, las cuales fueron expuestas a pulsos de BL a una intensidad de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos pulsos fueron de (A) 30, (B) 60 y (C) 120 min dentro de bloques de tiempo de 4 h, en donde cada bloque contuvo un pulso de luz. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

Tabla 2. Comparación de pendientes y luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 frente a pulsos de 30, 60 y 120 min.

	30 min		60 min		120 min	
	Pendiente	Luminiscencia máxima (A.U.)	Pendiente	Luminiscencia máxima (A.U.)	Pendiente	Luminiscencia máxima (A.U.)
FUN-LOV	12,9± 0,3	294	12,7 ± 0,9	746	9,68 ± 0,4	1169
FUN-LOV VP16	1,01 ± 0,5	27	2,50 ± 0,5	163	1,95± 0,2	235

Tabla 2. Comparación de pendientes y luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 frente a pulsos de 30, 60 y 120 min. Se calcularon las pendientes y luminiscencia máxima para el segundo pulso de luz dado en cada experimento. Para esto se determinaron las pendientes de la curva de activación y su respectivo error estándar a partir del promedio de cada punto obtenido, mientras que el cálculo de la luminiscencia máxima se obtuvo a partir del promedio de luminiscencia obtenido en el punto en que se registró la mayor actividad luciferasa. Para estos experimentos se utilizó 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas de cada una de éstas.

Luego de esto, y con el afán de describir a cabalidad la cinética del nuevo interruptor optogenético, se expusieron las cepas a condiciones de BL constante y de DD, observándose que el sistema FUN-LOV VP16 presenta una menor capacidad para inducir la expresión del gen reportero, además de un máximo de luminiscencia desplazado cerca de 160 min respecto del sistema clásico (Figura 8A y B, Tabla 3). Por otra parte, se destaca que la inducción de luminiscencia en el sistema FUN-LOV comienza prácticamente desde el inicio del experimento, mientras que el sistema FUN-LOV VP16 presenta una leve inducción a las primeras 2 h, llegando a un *plateau* cercano a las 7 h, para luego describir una trayectoria muy similar a la que se observa en su curva de O.D. (Figura 8B, Material Complementario 9).

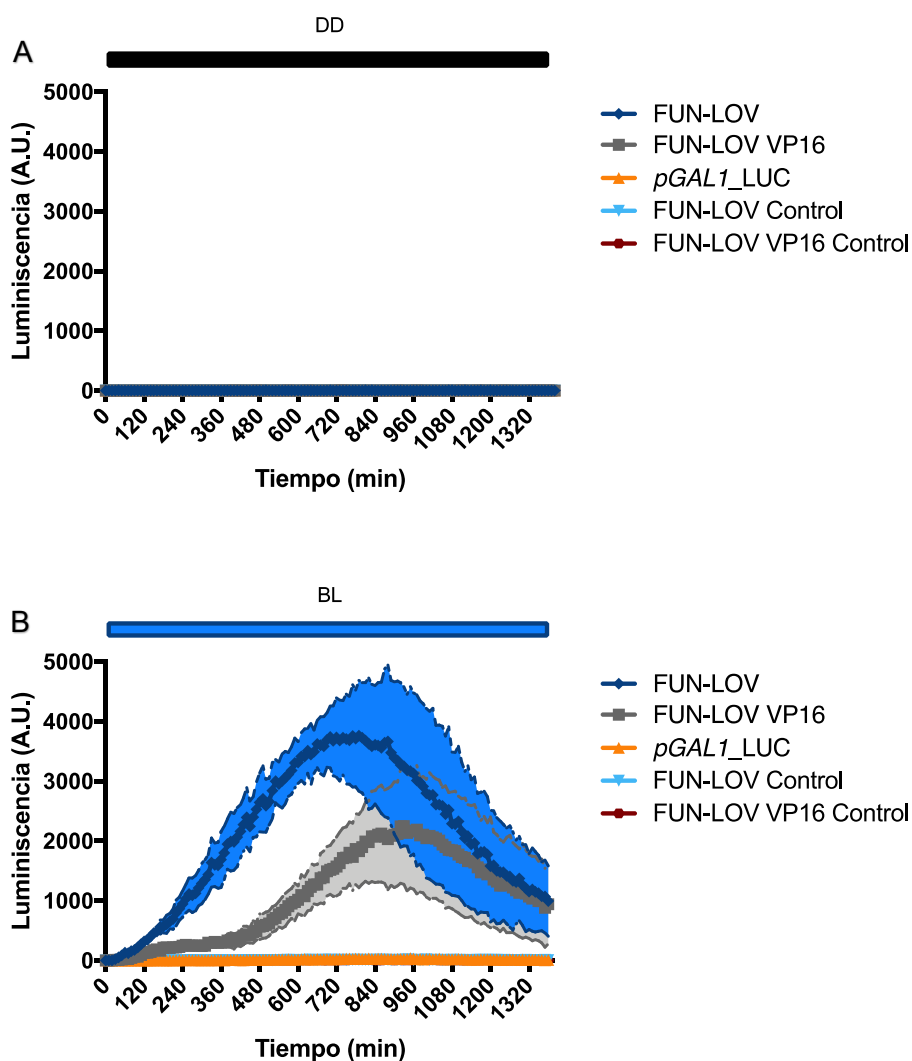


Figura 8. Cinéticas de luminiscencia en el tiempo en condiciones de luz y oscuridad constantes. Comparación de cinéticas de actividad luciferasa de las cepas con los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 en condiciones de (A) DD y (B) BL en el tiempo a una intensidad de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

Tabla 3. Comparación de luminiscencia máxima alcanzada y tiempo en que se llegó a este punto para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 en condiciones de BL constante.

	Luminiscencia máxima (A.U.)	Tiempo (min)	Tiempo (h)
FUN- LOV	3757	770	12:50
FUN- LOV VP16	2248	930	15:30

Tabla 3. Comparación de luminiscencia máxima alcanzada y tiempo en que se llegó a este punto para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 en condiciones de BL constante. Detalle del tiempo en que se alcanzó la luminiscencia máxima para los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16, en donde este valor corresponde al promedio de la luminiscencia obtenido en el punto en que se registró la mayor actividad luciferasa.

Finalmente, se quiso evaluar si el nuevo sistema presenta las características de ser dosis dependiente respecto de la intensidad de luz, por lo que se expuso las cepas con el sistema FUN-LOV VP16 por 2 h a BL a las intensidades de 24 y 44 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, siendo la primera intensidad la utilizada en todos los experimentos con BL realizados en este seminario de título, y la segunda una intensidad mayor definida de forma arbitraria. Tal como se observa en la Figuras 6B y C, ambos sistemas muestran un aumento tanto en la pendiente como en la luminiscencia máxima observada, confirmándose de esta forma que ambos sistemas responden de forma dosis dependiente a la intensidad de luz (Tabla 1). Se sugiere además que el sistema con el AD de VP16 es más sensible a las variaciones de la intensidad de luz, ya que el aumento que presentó este sistema, tanto para la pendiente como para el máximo de luminiscencia, fue de un poco más del doble que lo observado para la intensidad inicial. Por otro lado, el sistema clásico presentó un aumento para ambas mediciones de cerca de un tercio respecto de la intensidad inicial.

De esta forma, en el presente seminario de título se obtuvo que al cambiar el DBD/promotor del sistema optogenético FUN-LOV por los pares LexA/LexAop y Cup2p/*pCUP1*, éste pierde su funcionalidad y robustez, sugiriéndose fuertemente que el sistema no es modular en este punto, o al menos no modular para el tipo de dominios testeados. En cambio, se observó que al intercambiar el AD por el de VP16 se obtiene un sistema funcional, pero con una cinética de respuesta más lenta que el sistema original, sugiriéndose que el sistema si es modular en este punto.

DISCUSIÓN

El sistema optogenético conocido como FUN-LOV se presenta como un interruptor optogenético que permite controlar de forma rápida, reversible y precisa la expresión génica en *S. cerevisiae*. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel que cumplen los distintos dominios de este sistema basado en la arquitectura de doble híbrido, en cuanto a la funcionalidad y robustez. Es por esto, que este seminario de título busca evaluar la modularidad de este sistema al intercambiar el AD y el par DBD/promotor, a modo de obtener mayor información sobre la relevancia de cada uno de estos dominios en este tipo de arquitectura y facilitar la generación de nuevos sistemas basados en la arquitectura de doble híbrido.

En cuanto a la evaluación de la modularidad del sistema a nivel de DBD/promotor, se observó que al utilizar otros pares distintos al par Gal4 DBD/*pGAL1* del interruptor original, los sistemas no son capaces de inducir la transcripción del gen reportero en respuesta a BL de la forma esperada.

Para el primer caso revisado en este seminario de título, se esperaba que el sistema diseñado a partir del represor LexA presentase características similares al sistema FUN-LOV, ya que LexA y Gal4 se encuentran unidas basalmente al DNA, y

ambas han sido usadas indistintamente en un amplio número sistemas de doble híbrido (Schnarr y col., 1991; Marmorstein y col., 1992; Van Criekeing & Beyaert 1999). Sin embargo, se observó que ésta no mantiene la funcionalidad del sistema optogenético. Este resultado es inesperado, ya que LexA cuenta con una vasta historia de construcciones genéticas funcionales que la avalan como una proteína ideal para este tipo de sistemas, de forma similar a lo reportado con Gal4. Sin embargo, recientemente Xu y col. 2018 han generado un interruptor optogenético basado en dominios LOV y el DBD de *lexA*, en donde se sugiere que este tipo de sistemas no sólo dependen de la interacción entre sus cromóforos, sino que además requieren de un diseño que posea un promotor mínimo adecuado río arriba del gen reportero, además de los correspondientes operadores para poder generarse el control de la transcripción a través de luz (Xu & col., 2018). Junto con esto, se destaca que los investigadores sólo observaron diferencias notables entre los estados de encendido y apagado al utilizar el promotor mínimo de *GAL1* río arriba del gen reportero, lo que podría explicar en parte el buen funcionamiento del sistema basado en Gal4. Esto se condice con los resultados obtenidos, ya que el plásmido reportero generado para el sistema optogenético se basó en la cepa L40 de levaduras, la que se caracteriza por poseer 8 operadores de LexA en tándem comandando la expresión de *LacZ*.

Además de los resultados anteriormente discutidos, podemos encontrar en la literatura de genética de levaduras que debe existir una cierta coherencia entre el UAS (Upstream Activation Sequence) y el núcleo del promotor utilizados en el diseño de un vector, ya que existen distintas vías de activación de la transcripción que no necesariamente resultan ser compatibles entre si (Hahn & Young 2011). Esto se ha visto en casos en que, por ejemplo, al generar construcciones que presentan un UAS que

dependen del Factor de Transcripción II D (TFIID) para reclutar la maquinaria de transcripción río arriba de un promotor independiente de TFIID, terminan por generar una transcripción débil o nula respecto a cuando existe una coherencia entre el UAS y su promotor (Li & col., 2002). Tomando en cuenta este punto, es de esperar también que esta coherencia deba darse a un nivel de AD, destacándose tanto que Gal4 no tiene a TFIID como un blanco eficiente, sino que es el complejo Spt–Ada–Gcn5 acetyltransferasa (SAGA) el blanco principal del factor de transcripción. Por lo tanto, una de las primeras proyecciones de este trabajo es volver a probar el sistema FUN-LOV LexA obtenido a partir de este seminario de título, pero con la arquitectura de operadores/promotor utilizada por Xu y col. en donde se espera que el promotor mínimo de *GAL1* permita obtener un interruptor optogenético funcional similar al sistema FUN-LOV clásico.

Por otra parte, para el caso en que se utilizó el DBD de Cup2p y el promotor de *CUP1*, con el objetivo de generar un TF capaz de operar como un circuito AND, nos encontramos con que el sistema no fue capaz de responder a luz como se esperaba, mostrando sólo una leve activación de la transcripción al agregar cobre al medio, y una respuesta ligeramente mayor al recibir ambos *inputs*. Sin embargo, observamos que la actividad luciferasa de las transformantes que sólo poseían el plásmido reportero, fue similar a la observada en aquellas que poseían el sistema completo, sugiriendo de esta forma que la actividad observada en estas cepas se debe a una actividad propia del promotor, que es independiente del sistema de doble híbrido propuesto. Considerando estos resultados poco favorables, es que se quiso evaluar si es que existía alguna incompatibilidad con el sistema en las proteínas LOV y el par DBD/promotor, dados los tamaños de sus dominios y los cambios de conformación que estos experimentan. De

esta forma, se generó un nuevo sistema en base a la misma arquitectura de doble híbrido, pero esta vez utilizando la interacción proteína-proteína, luz roja dependiente, de PIF3/PhyB. Para este nuevo sistema sólo se observó respuesta frente a cobre, sin presentarse ninguna diferencia en la respuesta en presencia o ausencia de RL. Se destaca además que la respuesta observada presenta niveles indistinguibles entre las cepas con el sistema AND y las cepas *pCUP1_LUC*. Estos datos vuelven a sugerir fuertemente que la actividad, tanto para el sistema FUN(AND)LOV y AND, corresponde sólo a la actividad del plásmido reportero, y no a la presencia de los sistemas optogenéticos en las cepas de levaduras. Junto con esto, también se sugiere que el par DBD/promotor es de vital importancia al momento de generar nuevos sistemas optogenéticos basados en la arquitectura de doble híbrido, y que la interacción proteína-proteína dependiente de luz no es suficiente para obtener una respuesta de estos sistemas.

Alguna de las posibles razones de los resultados obtenidos, y como se mencionó anteriormente para el caso de LexA, es que no exista una coherencia a nivel de DBD/promotor y AD en el sistema propuesto. Por otra parte, nos encontramos con que a pesar de que Cup2p es el mayor activador de la transcripción de *CUP1*, este puede activarse en respuesta a estrés térmico, ausencia de glucosa y estrés oxidativo vía HsF1p, en donde se destaca que al menos las dos primeras respuestas mencionadas son reguladas por las proteínas Glc7 and Gac1, las cuales no estarían envueltas en la transcripción de *CUP1* vía cobre (Lin & Lis 1999; Mager & De Kruijff 1995; Tamai y col., 1994). De esta forma, considerando que la cepa utilizada es una cepa *CUP2Δ*, es posible pensar que el promotor de *CUP1* en el plásmido reportero podría estar respondiendo de alguna forma a cobre a través de estas vías alternativas más que por la vía de respuesta

a cobre a través de Cup2p. Respecto a este punto, destacamos que al momento de evaluar la respuesta a cobre en una cepa WT con el plásmido reportero, ésta es al menos 100 veces mayor que la observada en la cepa *CUP2Δ* y que se genera de forma casi inmediata (datos no mostrados). Sumado a las razones ya mencionadas, se han reportado casos notables en donde el promotor de *CUP1* en condiciones de *supercoiled* negativo puede generar la inducción del gen sin ninguna otra proteína más que la RNA Polimerasa II (Leblanc y col., 2000), lo cual podría verse favorecido al agregar el cobre al medio. Considerando todo lo anteriormente expuesto es que la utilización del DBD/promotor de Cup2p parece no ser la mejor opción para la prueba de concepto propuesta, ya que al parecer este par podría verse implicado en otro tipo de procesos moleculares propios de *S. cerevisiae* que podrían estar generando la transcripción del gen reportero de una forma distinta a la esperada.

Considerando lo anteriormente comentado, es que como segunda proyección de este trabajo se plantea utilizar pares DBD/promotor provenientes de TFs que sean altamente similares a Gal4 para el diseño de nuevos interruptores optogenéticos, a modo de evitar complicaciones como las observadas en los casos anteriormente revisados. Considerando que Gal4 pertenece a la clase III de proteínas dedos de zinc, también conocidas como C₆ o proteínas Zn₂Cys₆, y que esta clase de TFs es de alta homología, es que el TF PPR1 destaca como un posible candidato a utilizar debido a su similitud con Gal4 a nivel de estructura y de interacción con el DNA (Marmorstein & Harrison 1994; MacPherson y col., 2006). En este último punto, se destaca que ambos TF son capaces de reconocer tripletes de invertidos repetidos de CGG en el DNA. Sin embargo, el reconocimiento del ADN depende del número de nucleótidos que se encuentran entre los tripletes, siendo este número específico para cada TF. Esto se ve reflejado en el

hecho de que el *crosstalk* entre ambos TF es mínimo (Reece & Ptashne 1993). Es por este motivo, que PPR1 se presenta como un candidato ideal para general un nuevo interruptor, ya que es lo suficientemente parecido a Gal4 en cuanto a su función y unión a DNA, pero lo suficientemente distinto como para no interferir en los blancos de éste.

Por otra parte, y en cuanto a la evaluación de modularidad del sistema de doble híbrido a nivel de AD, nos encontramos con que el sistema FUN-LOV VP16 es capaz de inducir la expresión de luciferasa en respuesta a luz azul, y de mantenerse inactivo en condiciones de oscuridad. Esto confirma que el sistema propuesto funciona como un interruptor optogenético, y que este dominio es susceptible de ser modificado sin perder las características de encendido y apagado en condiciones de BL y DD respectivamente. Respecto a la inducción de este sistema frente al sistema FUN-LOV, se observó que el sistema con el AD de VP16 posee menores niveles de luminiscencia y que necesita de un mayor tiempo de exposición a luz para detectarse actividad luciferasa. Este resultado sugiere que si bien el nuevo sistema mantiene su funcionalidad como interruptor optogenético, este presenta una disminución a nivel de robustez respecto a la que presenta el sistema FUN-LOV. A pesar de esto, los resultados obtenidos son similares a los que se encuentran en la literatura al comparar la actividad β -galactosidasa, en levaduras capaces de expresar Gal4 y Gal4-VP16 AD, haciendo uso de distintos UAS en el promotor del reportero (Vashee & Kodadek 1995). Es por esto, que las diferencias observadas entre los niveles de luminiscencia de los interruptores optogenéticos evaluados se presentan dentro de un rango esperado, por lo que la disminución en la actividad luciferasa responde a la naturaleza del AD en conjunto con los UAS utilizados en este seminario de título.

Nos encontramos además con que la diferencia temporal de la activación entre ambos sistemas podría deberse en parte a la naturaleza de los dominios de transactivación, en donde se destaca que VP16 AD no posee una estructura tridimensional por sí sola, sino que depende de la interacción con otras proteínas para adquirir su estructura específica y permitir de esta forma la transcripción (Hirai y col., 2010; Uesugi y col., 1997). Sin embargo, la diferencia temporal mencionada se encuentra en escala de minutos, lo cual sobrepasa con creces la temporalidad de un cambio conformacional de un TF, que suele estar en un rango de segundos (Wands y col., 2011). Por lo tanto, a pesar de que lo recién mencionado podría influir en esta diferencia, lo más probable es que este motivo no sea el principal.

En cuanto al cómo se recluta la maquinaria de transcripción por parte del AD de VP16 respecto del AD de Gal4 en levaduras, se ha reportado que ambos son capaces reclutar proteínas tales como TFIIB, TFIID, Gal11 y los complejos SAGA y SWI/SNF (Boube y col., 2002; Traven y col., 2006). Ambos ADs actúan principalmente de forma dependiente del complejo Mediador y el cual posee un núcleo conservado desde levaduras hasta humanos (Fan y col., 2006). Respecto a esto, nos encontramos con que el principal factor que podría dar cuenta de esta diferencia temporal de la transcripción, e incluso dar cuenta del por qué se han reportado mayores niveles de transcritos inducidos por VP16 en eucariontes superiores que en *S. cerevisiae*, es el hecho de que en este organismo no hay homólogos para el gen que codifica para ARC92 (también conocido como MED25). VP16 se une a ARC92, y es parte del complejo Mediador de mamíferos, siendo éste clave para el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Mittler y col., 2003). A pesar de esto, se ha visto que VP16 interactúa con el complejo Mediador a través de la subunidad Gal11 del complejo, siendo éste su mayor blanco

durante la iniciación de la transcripción (Lee y col., 1999). Es por esto que, a pesar de que la transcripción ocurre a través del mismo complejo, la literatura y los datos obtenidos sugieren que la transcripción presenta cinéticas distintas, debido a que estos ADs interactúan de forma distinta con la maquinaria de transcripción, y por lo tanto, las diferencias vistas entre ambos sistemas se deben principalmente a la naturaleza de cada AD, y no a una mayor o menor funcionalidad del sistema.

Considerando todo lo expuesto, es que se propone como última proyección para este trabajo el probar el sistema FUN LOV VP16 en un contexto celular adecuado, en donde existan las subunidades del complejo mediador propias de un eucarionte que haya requerido de un mayor control de la transcripción que *S. cerevisiae* a lo largo de la evolución, con el fin de ver si este interruptor es capaz de presentar otra cinética y/o un nivel de activación mayor que el visto en este seminario de título.

CONCLUSIONES

La elección del par de DBD/promotor en interruptores basados en un sistema de doble híbrido se presenta como el punto de mayor complejidad al momento de diseñar interruptores optogenéticos.

El sistema FUN-LOV no presenta la característica de ser modular a nivel de DBD/promotor, ya que el sistema pierde su funcionalidad y robustez al utilizar un par distinto al de Gal4 DBD/*pGAL1*.

El cambio de AD no presenta mayores complicaciones a nivel de funcionalidad al momento de generar un nuevo sistema optogenético, por lo tanto, este dominio se presenta como modular dentro de la arquitectura de un sistema de doble híbrido.

La robustez y cinética de activación del sistema al cambiar el AD depende de la naturaleza del AD a utilizar.

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Material Complementario 1. Partidores utilizados para la generación de construcciones genéticas.

Nombre	tipo	Longitud (nt)	Secuencia (5'->3')	Descripción
oL3758	Fw	50	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA GCTAGGCGCATGCAACTTCTTT	<i>pADH1</i>
oL3567	Rv	50	ACCACCAGATCCACCAACACCAGAAACC ATCATATGTATATGAGATAGTT	<i>pADH1</i>
oL3568	Fw	50	GCATACAATCAACTATCTCATATACATAT GATGGTTTCTGGTGTGGTGG	<i>PhyB</i>
oL4054	Rv	50	GGCATATTTGACCCCGTTAATTACGACCA TGGATCCACCCAATTCATCTA	<i>PhyB</i>
oL4053	Fw	50	GAACAAGGTATAGATGAATTGGGTGGAT CCATGGTCGTAATTAACGGGGT	<i>Cup2p DBD</i>
oL4263	Rv	53	GGCTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAA ATTCAGCTGGCCGTCGTGCAGAGG	<i>Cup2p DBD</i>
oL4261	Fw	22	TTTGTAAATACGACTCACTATAG	<i>tADH2</i>
oL3148	Rv	50	GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA CGGCCGGTAGAGGTGTGGTCAA	<i>tADH2</i>

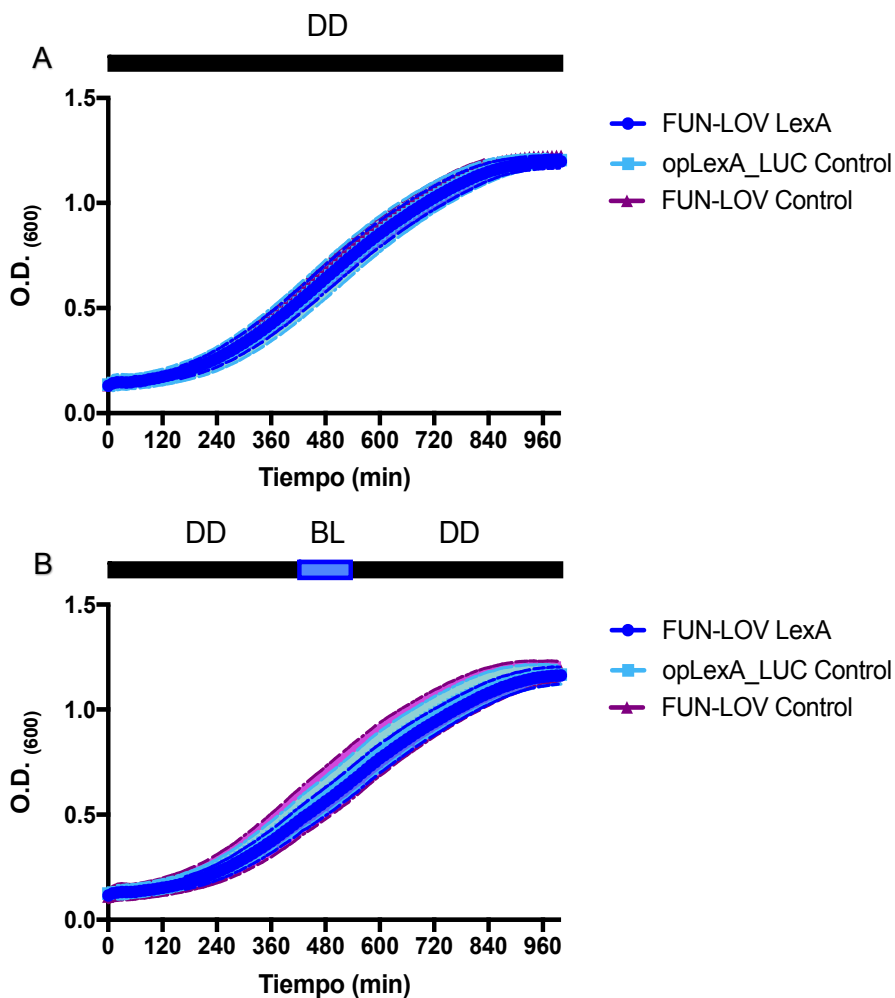
oL2451	Fw	50	AAACAGATCTGGCGCGCCTTAATTAACCC GGTTCTCTTGAAATCCCCGT	<i>KanMxRV</i>
oL4058	Rv	50	CAGTTCACTAACGGGGAATTTCAAGAGAA CCGGGTTAATTAAGGCGCGCC	<i>KanMxRV</i>
oL4057	Fw	50	AAACAGATCTGGCGCGCCTTAATTAACCC GGTTCTCTTGAAATCCCCGT	<i>pCUP1</i>
oL4060	Rv	50	GCCCTTCTTAATGTTCTTAGCATCGGCCA TTTTATGTGATGATTGATTGA	<i>pCUP1</i>
oL4059	Fw	50	GTACAATCAATCAATCAATCATCACATAA AATGGCCGATGCTAAGAACAT	<i>LUC</i>
oL3081	Rv	50	GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA CGTGGATCCTTGCAAATTAAG	<i>TATA de CYC</i>
oL3720	Rv	67	TGCAATCTAAACAATTCAAATAATGGCA TCATATGTATATGAGATAGTTGATTGTAT GCTTGGTAT	<i>pADH1</i>
oL3721	Fw	67	ATTTCAAGCTATACCAAGCATACAATCAA CTATCTCATATACATATGATGCCATTATTT GAATTGTT	<i>PIF3</i>
oL3722	Rv	57	TTGGAGGCTCGGGAATTAATTCCGCTTTA TCGGATCCTTAAGAAGAACCACAGAACT	<i>PIF3</i>
oL3723	Fw	56	TCATCTGACCAGTTCTGTGGTTCTTCTTA AGGATCCGATAAAGCGGAATTAATTCC	<i>Gal4 AD</i>
oL3084	Fw	50	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA GCATCGATGAATTCGAGCTCGT	<i>KanMxRV</i>
oL3080	Rv	50	GCCCTTCTTAATGTTCTTAGCATCGGCCA TGGTAAGCTTAATATCCCTA	<i>pGAL1</i>
oL3079	Fw	50	CGACTCACTATAGGGAATTAAGCTTAC CATGGCCGATGCTAAGAACAT	<i>LUC</i>

oL3045	Rv	51	CATGGTGCTCGAGTTCACGGTATGGCTC ATCATATGTATATGAGATAGTTG	<i>pADH1</i>
oL1960	Fw	20	ATGAGCCATACCGTGAAGCTC	<i>VVD 36</i>
oL1961	Rv	20	TTCCGTTTCGCACTGGAAAC	<i>VVD 36</i>
oL4568	Fw	50	ATGGGTTTCCAGTGCGAAACGGAAg gatcc gcccccccgaccgatgtcag	<i>VP16</i>
oL4569	Rv	53	GCTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAAAGA TTTACCCACCGTACTCGTCAATTC	<i>VP16</i>
oL3599	Rv	21	GCTGTGGGTATAGTTGACCTG	<i>WC-1 LOV domain</i>
oL1726	Fw	56	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC GCACTAGTTCGACTGCTGTATATAAAAC	<i>opLexA₈</i>
oL1728	Rv	50	GCCCTTCTTAATGTTCTTAGCATCGGCCA TCGTA CTGTACATATAACCAC	<i>opLexA₈</i>
oL1720	Fw	20	ATGGCCGATGCTAAGAACAT	<i>LUC</i>
oL1735	Rv	21	TCTTATCATGTCTGCTCGAAG	<i>LUC</i>
oL1734	Fw	50	GGCCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAA GATCATGTAATTAGTTATGTCA	<i>tCYC</i>
oL1733	Rv	58	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG CCTGGAGCTCTGGATCCTTGCAAATTTAA G	<i>tCYC</i>
oL4259	Fw	50	ATGCAGGTCAACTATACCCACAGCGGAT CCATGAAAGCGTTAACGGCCAG	<i>LexA</i>
oL4260	Rv	54	GGCTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAA ACAGCCAGTCGCCGTTGCGAATAAC	<i>LexA</i>
oL4617	Fw	53	CCCATGCAGGTCAACTATACCCACAGCG GATCCATGGTCGTAATTAACGGGGT	<i>Cup2p DBD</i>
oL4056	Rv	50	GGCTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAA AAGCTGGCCGTCGTGCAGAGG	<i>Cup2p DBD</i>

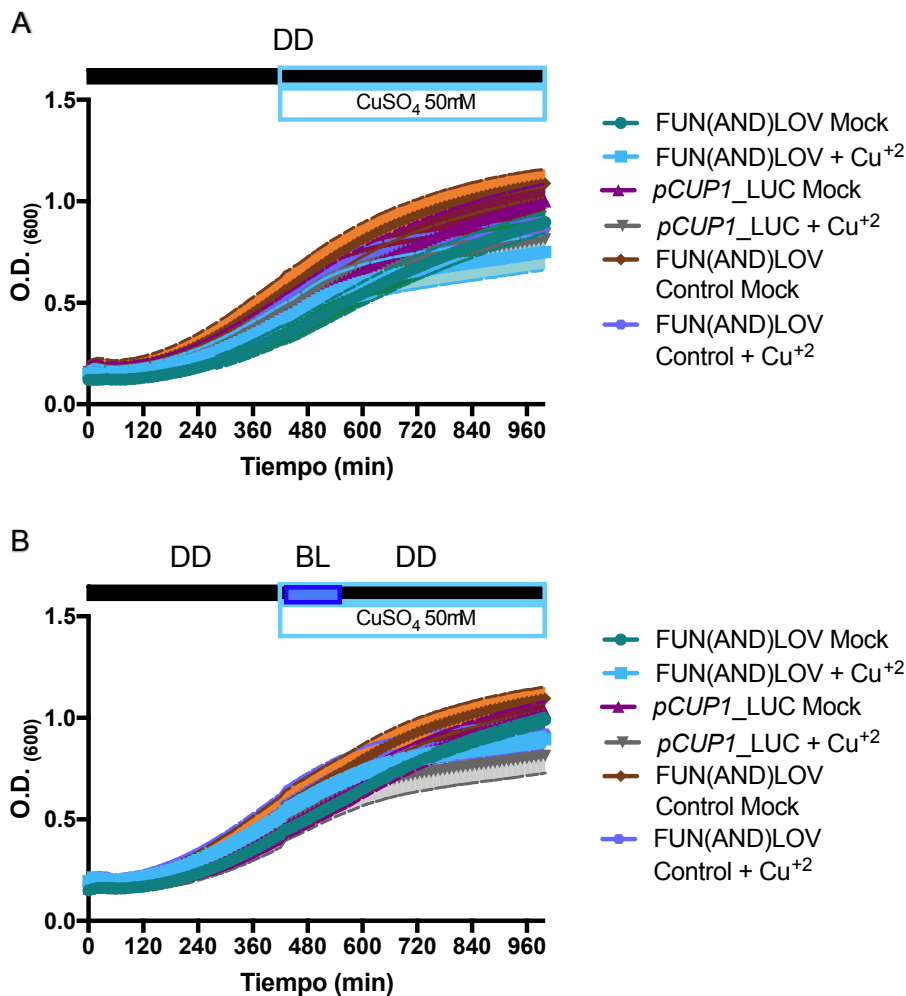
oL4055	Fw	50	TGCATGTGTGCCTCTGCACGACGGCCAG CTTTTGTAAATACGACTCACTA	<i>tADH2</i>
oL4383	Fw	20	CACCCACCTTCCACCACTAC	<i>CUP2 Flanking</i>
oL4384	Rv	20	CATCATTCCGGCTGACGTCCT	<i>CUP2 Flanking</i>
oL4381	Fw	70	ATTAGACGGCGGCTTGATAAAAGAGGAC TGATAATCAGTGTATTCACAGACGGGTTA ATTAAGGCGCGCC	<i>Nat cassette</i>
oL4382	Rv	70	AACAACCGCCAATATATGTATATGTATATT TATATAGATGTCCAGATGCAATCGATGAA TTCGAGCTCGT	<i>Nat cassette</i>

Material Complementario 2. Plásmidos utilizados en los distintos sistemas optogenéticos.

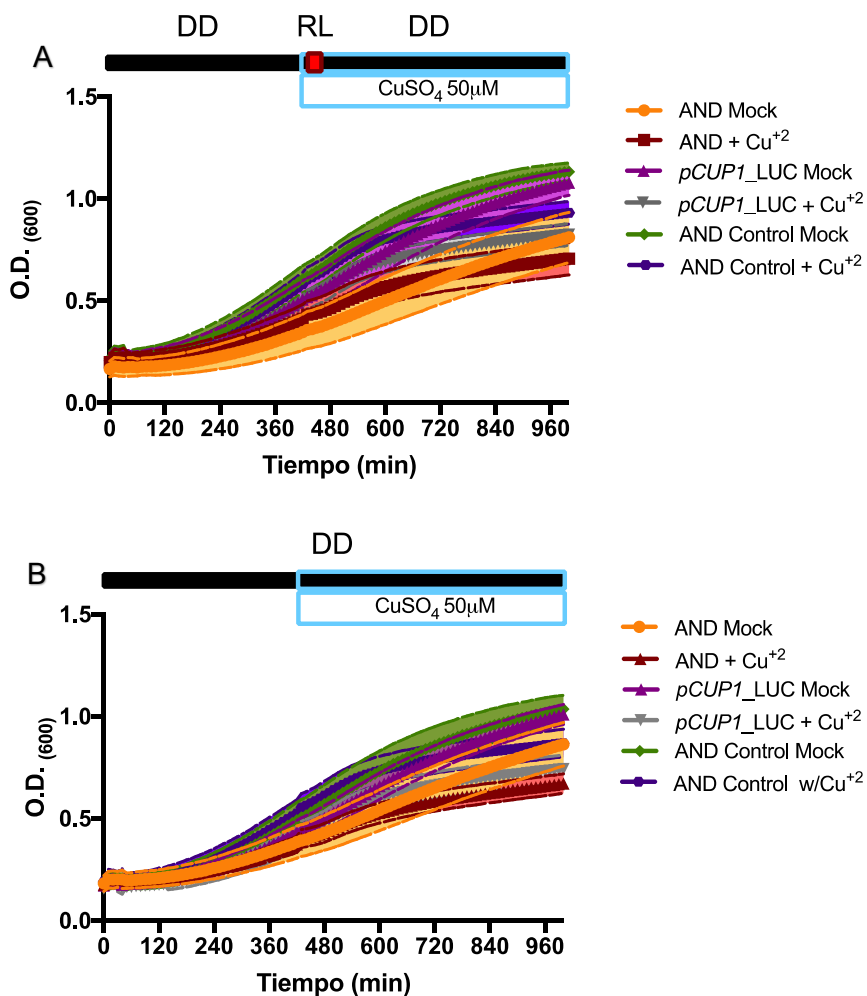
Nombre	Backbone	Selección en levaduras	Resistencia en bacterias	Construcción
pLas 842	pRS423	HIS	AMP	<i>pADH1- PhyB- Cup2p DBD- tADH2</i>
pLas878	pRS426	URA	AMP	<i>KanMxRv-pCUP1-LUC-tCYC</i>
pLas883	pRS425	LEU	AMP	<i>pADH1-PIF3-Gal4 AD + tADH2</i>
pLas750	pRS423	HIS	AMP	<i>pADH1- WC-1^{LOV}- Gal4 DBD- tADH2</i>
pLas751	pRS425	LEU	AMP	<i>pADH1- VVD^{LOV}- Gal4 AD- tADH2</i>
pLas754	pRS426	URA	AMP	<i>KanMxRv-pGAL1-LUC-tCYC</i>
pLas936	pRS425	LEU	AMP	<i>pADH1- VVD^{LOV}- VP16- tADH2</i>
pLas429	pRS426	URA	AMP	<i>opLexA₈-LUC-tCYC</i>
pLas840	pRS423	HIS	AMP	<i>pADH1- WC-1^{LOV}- LexA DBD- tADH2</i>
pLas976	pRS423	HIS	AMP	<i>pADH1- WC-1^{LOV}- Cup2p DBD- tADH2</i>



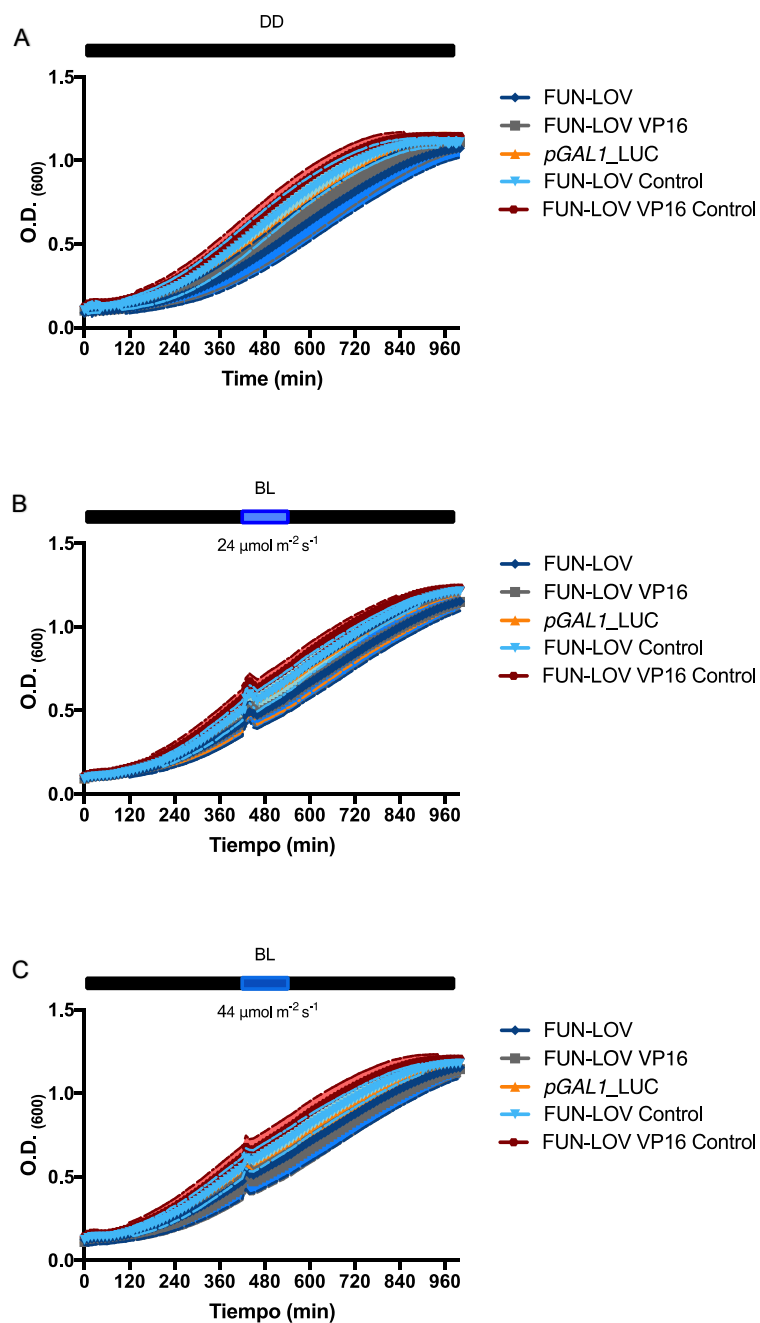
Material Complementario 3. Caracterización de sistema FUN-LOV LexA en respuesta a pulsos de luz. Gráficos de O.D.₆₀₀ en el tiempo para el sistema FUN-LOV LexA en **(A)** oscuridad constante (DD), y **(B)** con pulso de BL por 2 h a $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ luego de 7 h de DD. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.



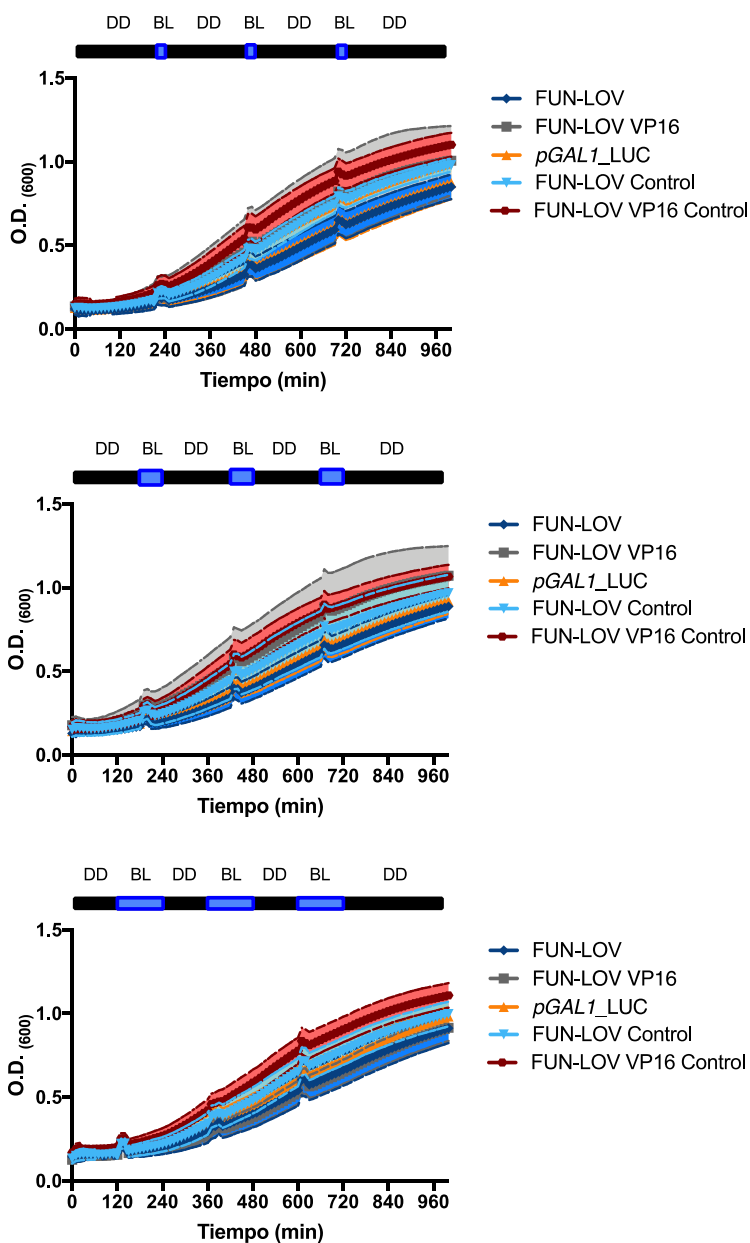
Material Complementario 4. Caracterización de sistema FUN(AND)LOV en respuesta a cobre y pulsos de luz. Gráficos de O.D. en el tiempo para la cepa PJ69-4A *CUP2Δ::NatMx* con el sistema FUN(AND)LOV, utilizando 50 μ M de CuSO₄ luego de 7 horas de iniciado el cultivo, y mantenida en condiciones de **(A)** DD y **(B)** en condiciones de DD interrumpidas por un pulso BL de 2 h a 24 μ mol m⁻² s⁻¹ luego de 7 horas de cultivo. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.



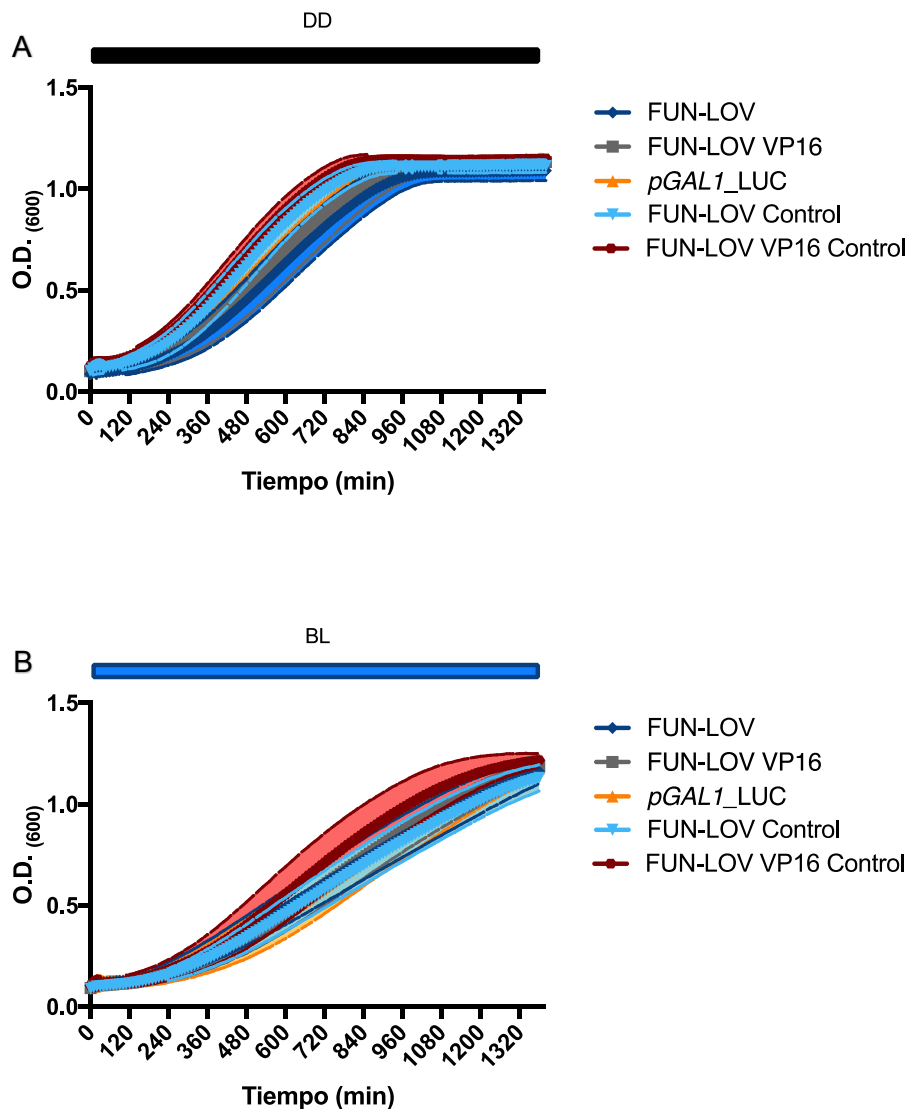
Material Complementario 5. Caracterización de sistema AND en respuesta a cobre y pulsos de luz. Gráficos de O.D.₆₀₀ en el tiempo para la cepa PJ69-4A *CUP2Δ::NatMx* con el sistema AND, utilizando 50 μ M de CuSO₄ luego de 7 horas de iniciado el cultivo, y mantenida en condiciones de **(A)** DD y **(B)** en condiciones de DD interrumpidas por un pulso BL de 30 min a 700 μ mol m⁻² s⁻¹ luego de 7 horas de cultivo. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.



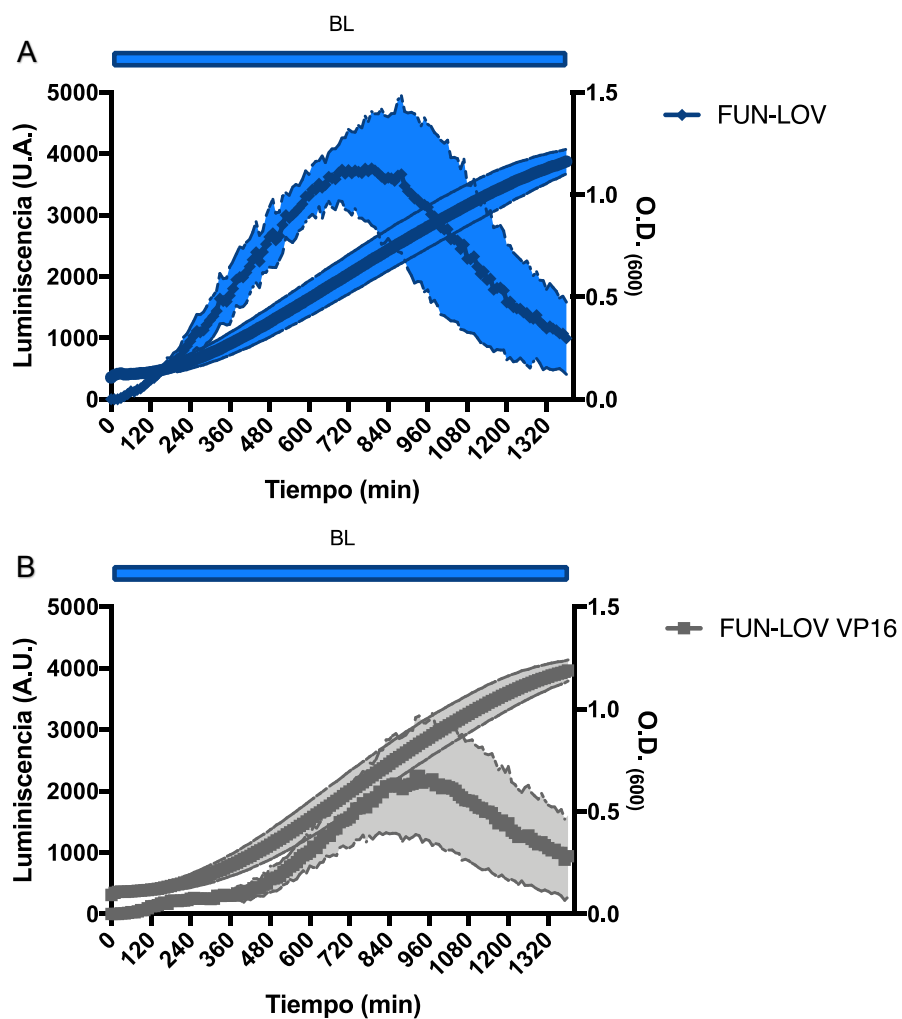
Material Complementario 6. Caracterización de sistema FUN-LOV VP16 en respuesta a pulsos de luz. Gráficos de O.D. en el tiempo para sistema FUN-LOV VP16 en (A) DD, y (B) condiciones de DD por 7 horas con pulso BL por 2 h a $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a (C) $44 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.



Material Complementario 7. O.D. en respuesta diferencial entre sistema FUN-LOV y FUN-LOV VP16 a pulsos de luz de distinta duración en el tiempo. Curvas de O.D. en el tiempo de cepas que contienen el sistema FUN-LOV y FUN-LOV VP16, las cuales fueron expuestas a pulsos de BL a una intensidad de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos pulsos fueron de (A) 30, (B) 60 y (C) 120 min dentro de bloques de tiempo de 4 h, en donde cada bloque contuvo un pulso de luz. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.



Material Complementario 8. Gráficos de O.D. en el tiempo en condiciones de luz y oscuridad constantes. Gráficos de O.D. para las cepas con los sistemas FUN-LOV y FUN-LOV VP16 en condiciones de **(A)** DD y **(B)** BL en el tiempo a una intensidad de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.



Material Complementario 9. Gráfico de luminiscencia y O.D. en el tiempo en condiciones de BL constante. Gráfico de actividad luciferasa en el tiempo en condiciones de BL a una intensidad de $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para los sistemas (A) FUN-LOV y (B) FUN-LOV VP16. Para esto se graficó el promedio de los valores para cada punto con su respectiva desviación estándar, la cual está representada como una región sombreada.

BIBLIOGRAFÍA

- Aravanis, A. M., Wang, L., Zhang, F., Meltzer, L. A., Mogri, M. Z., Schneider, M. B. y Deisseroth, K. 2007. An optical neural interface: *in vivo* control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *Journal of Neural Engineering*. **4**:S143–156.
- Boube, M., Laurent J., Cribbs D. L., y Bourbon, H. 2002. Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell*. **110**:143–151.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. y Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*. **8**:1263–1268.
- Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., y Karin, M. 1989. The CUP2 Gene Product, Regulator of Yeast Metallothionein Expression, Is a Copper-Activated DNA-Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology*. **9**: 4091-4095.
- Chen, C., Ringelberg, C., Gross, R., Dunlap, J. y Loros, J. 2009. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *The EMBO journal*. **28**: 1029-42.
- Christie, J. M. 2007. Phototropin Blue-Light Receptors. *Annual Review of Plant Biology*. **58**:21–45.
- Deisseroth, K. 2011. Optogenetics. *Nature Methods*. **8**:26–29.
- Fan, X., Chou, D. M. y Struhl K. 2006. Activator-specific recruitment of Mediator *in vivo*. *Nature Structural & Molecular Biology*. **13**:117–120.
- Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. y Dunlap, J. C. 2002. White Collar-1, a Circadian Blue Light Photoreceptor, Binding to the frequency Promoter. *Science*. **297**:815–819.

Gietz, R. D. y Woods, R. A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*. **350**: 87-96.

Hahn, S. y Young, E. T. 2011. Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*. **189**:705–736.

Hevia, M., Canessa, P. y Larrondo, L. 2016. Circadian clocks and the regulation of virulence in fungi: Getting up to speed. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **57**: 147-155.

Hirai, H., Tani, T. y Kikyo, N. 2010. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *The International Journal of Developmental Biology*. **54**:1589–1596.

Hong, K. y Nielsen, J. 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**:2671–2690.

Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**:23-28.

Kitano, H. 2004. Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*. **5**:826-837.

Kovačič, L., Paulič, N., Leonardi, A., Hodnik, V., Anderluh, G., Podlesek, Z., Žgur-Bertok, D., Križaj, I. y Butala, M. 2013. Structural insight into LexA–RecA* interaction". *Nucleic Acids Research*. **41**:9901–9910.

Leblanc, B. P., Benham, C. J. y Clark D. J. 2000. An initiation element in the yeast CUP1 promoter is recognized by RNA polymerase II in the absence of TATA box-binding protein if the DNA is negatively supercoiled. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**:10745–10750.

Lee, Y. C., Park, J. M., Min, S., Han, S. J. y Kim, Y. J. 1999. An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular and Cellular Biology*. **19**:2967–2976.

Li, X., Bhaumik, S. R., Zhu, X., Li, L., Shen, W., Dixit, B. L. y Green, M. R. 2002. Selective Recruitment of TAFs by Yeast Upstream Activating Sequences. *Current Biology*. **12**: 1240-1244.

Lin, J. T. y Lis, J. T. 1999. Glycogen synthase phosphatase interacts with heat shock factor to activate CUP1 gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **19**:3237–3245.

Ma, Z., Du, Z., Chen, X., Wang, X. y Yang, Y. 2013. Fine tuning the LightOn light-switchable transgene expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **440**: 419-423.

MacPherson, S., Larochelle, M., y Turcotte, B. 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **70**:583–604.

Mager, W. H. y De Kruijff, A. J. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiological Reviews*. **59**:506–531.

Malzahn, E., Ciprianidis, S., Káldi, K., Schafmeier, T. y Brunner., M. 2010. Photoadaptation in *Neurospora* by Competitive Interaction of Activating and Inhibitory LOV Domains. *Cell*. **142**:762–772.

Markham, B. E., Little, J. W. y Mount, D. W. 1981. Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*. **9**:4149–4161.

Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M. y Harrison, S. C. 1992. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* **356**:408–414.

Marmorstein, R. y Harrison, S. C.. 1994. Crystal structure of a PPR1-DNA complex: DNA recognition by proteins containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Genes & development*. **8**:2504–12.

Milbradt, A. G., Kulkarni, M., Yi, T., Takeuchi, K., Sun, Z., Luna, R. E., Selenko, P., Näär, A. M. y Wagner, G. 2011. Structure of the VP16 transactivator target in the Mediator. *Nature Structural & Molecular Biology*. **18**:410–415.

Mittler, G., Stühler, T., Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L. y Meisterernst, M. 2003. A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *The EMBO journal*. **22**:6494–6504.

Montenegro-Montero, A., Canessa, P. y Larrondo L. F. 2015. Around the Fungal Clock: Recent Advances in the Molecular Study of Circadian Clocks in *Neurospora* and Other Fungi. *Advances in Genetics*. **92**:107–184.

Mukherji, S. y Van Oudenaarden, A. 2009. Synthetic biology: understanding biological design from synthetic circuits”. *Nature Reviews Genetics*. **10**:859–871.

Näär, A. M., Taatjes, D. J., Zhai, W., Nogales, E. y Tjian, R. 2002. Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes & Development*. **16**:1339–1344.

Oldenburg, K. R., Vo K. T., Michaelis, S. y Paddon, C. 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research*. **25**:451-452.

Purcell, E. B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D. C., Fiebig, A. y Crosson, S. 2007. A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:18241–18246.

Reece, R. J. y Ptashne, M. 1993. Determinants of binding-site specificity among yeast C6 zinc cluster proteins. *Science*. **261**:909–911.

Robertson, J. B., Davis, C. R. y Johnson C. H. 2013. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110**:21130–35.

Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., López, J., Agosin, E. y Larrondo, L. F. 2018. Fungal Light-Oxygen-Voltage Domains for Optogenetic Control of Gene Expression and Flocculation in Yeast. *mBio*. **9**:e00626-18.

Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., Agosin, E. y Larrondo, L.. 2017. Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **101**: 2629-2640.

Schnarr, M., Oertel-Buchheit, P., Kazmaier, M. y Granger-Schnarr, M. 1991. “DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie*. **73**:423–31.

Shcherbakova, D. M., Shemetov, A. A., Kaberniuk, A. A. y Verkhusha, V. V. 2015. Natural Photoreceptors as a Source of Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools. *Annual Review of Biochemistry*. **84**:519–50.

Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J. M. y Quail, P. H. 2002. A light-switchable gene promoter system. *Nature Biotechnology*. **20**:1041–44.

Smith, K. M., Sancar, G., Dekhang, R., Sullivan, C. M., Li, S., Tag, A. G., Sancar, C., Bredeweg, E. L., Priest, H. D., McCormick, R. F., Thomas, T. L., Carrington, J. C., Stajich, J. E., Bell-Pedersen, D., Brunner, M. y Freitag, M. 2010. Transcription Factors in Light and Circadian Clock Signaling Networks Revealed by Genomewide Mapping of Direct Targets for Neurospora White Collar Complex. *Eukaryotic Cell*. **9**:1549–1556.

Tamai, K. T., Liu, X., Silar, P., Sosinowski, T. y Thiele, D. J. 1994. Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways." *Molecular and Cellular Biology*. **14**:8155–8165.

Traven, A., Jelacic, B. y Sopta, M. 2006. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Reports*. **7**:496–499.

Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A. J. y Verdine, G. L. 1997. Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science*. **277**:1310–1313.

Van Criekinge, W. y Beyaert, R. 1999. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online*. **2**:1–38.

Vashee, S. y T. Kodadek. 1995. "The activation domain of GAL4 protein mediates cooperative promoter binding with general transcription factors in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**:10683–10687.

Wands, A. M., Wang, N., Lum, J. K., Hsieh, J., Fierke, C. A. y Mapp, A. K. 2011. Transient-state kinetic analysis of transcriptional activator-DNA complexes interacting with a key coactivator. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**:16238–16245.

Wang, B., Kitney, R. I., Joly, N. y Buck, M. 2011. Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology. *Nature Communications*. **2**:508.

Wang, X., Chen, X. y Yang, Y. 2012. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nature Methods*. **9**:266-269.

Xu, X., Du, Z., Liu, R., Li, T., Zhao, Y., Chen, X. y Yang, Y. 2018. A Single-Component Optogenetic System Allows Stringent Switch of Gene Expression in Yeast Cells. *ACS Synthetic Biology*. **7**:2045–2053.

Zoltowski, B. D., Vaccaro, B. y Crane, B. R. 2009. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nature Chemical Biology*. **5**:827–834.