



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE LA FOSFORILACIÓN EN LA FAMILIA DE
GTPASAS EFTUD1/EFL1**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ADRIÁN GARCÍA MÁRQUEZ



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Rebecca Elizabeth Franco y Bourland _____

VOCAL: Profesora: Herminia de Jesús Loza Tavera _____

SECRETARIO: Profesora: Nuria Victoria Sánchez Puig _____

1er. SUPLENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri _____

2°. SUPLENTE: Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO BIOQUÍMICA 5 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS DEL INSTITUTO DE QUÍMICA Y EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.

ASESORA DEL TEMA: DRA. NURIA SÁNCHEZ PUIG _____

SUSTENTANTE: ADRIÁN GARCÍA MÁRQUEZ _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	Resumen	1
2	Antecedentes	2
2.1	Biogénesis ribosomal en eucariontes	2
2.1.1	La GTPasa ribosomal EFTUD1	4
2.2	Superfamilia GTPasas	6
2.2.1	Dominio G	6
2.3	Transducción de señales en eucariontes	7
2.3.1	Recepción	8
2.3.2	Segundo Mensajero	11
2.3.3	Respuesta	11
2.3.4	Término de la señal	13
3	Hipótesis	15
4	Objetivos	16
4.1	Objetivo general	16
4.2	Objetivos específicos	16
5	Materiales y métodos	17
5.1	Ensayo de fosforilación en levadura. Determinación de la fosforilación de Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 en <i>S. cerevisiae</i>	17
5.1.1	Vector de expresión en <i>S. cerevisiae</i> para Efl1 y EFTUD1	17
5.1.2	Vector de expresión para la mutante Efl1 S430A. Construcción de pRS426-Efl1-S430A	19
5.1.3	Transformación de células de levadura	22
5.1.4	Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en levadura	22
5.1.5	Purificación de proteínas recombinantes	23
5.1.6	Caracterización de las proteínas recombinantes sobreexpresadas en levadura	23
5.1.7	Western blot	25
5.2	Ensayo de fosforilación en células de mamífero. Determinación de la fosforilación de EFTUD1 en la línea celular AD-293	27
5.2.1	Materiales, reactivos y medios de cultivo	27

5.2.2	Construcción del vector de expresión para EFTUD1 en células de mamífero	28
5.2.3	Transfección transitoria de células adherentes AD-293 con el vector de expresión pCDNA3.1-EFTUD1	30
5.2.4	Protocolo de transfección de células AD-293 mediada por liposomas catiónicos	34
6	Resultados	36
6.1	Resultados del ensayo de fosforilación en levadura. Determinación de la fosforilación en Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 expresadas en <i>S. cerevisiae</i>	36
6.1.1	Construcción del vector de expresión EFL-1 S430A	36
6.1.2	Sobreexpresión de las proteínas recombinantes	37
6.1.3	Caracterización de las proteínas recombinantes expresadas en levadura	39
6.2	Determinación de la fosforilación de EFTUD1 en células de mamífero AD-293	43
6.2.1	Vector de expresión pCDNA3.1-EFTUD1	43
6.2.2	Determinación de la eficiencia de la transfección del plásmido peGFP en células AD-293 mediante la co-precipitación con fosfato de calcio	45
6.2.3	Transfección de células adherentes AD-293 con el plásmido pCDNA3.1-EFTUD1 mediada por liposomas catiónicos	46
7	Análisis de resultados	49
7.1	Fosforilación de EFTUD1 en células humanas	51
8	Conclusiones	53
9	Apéndices	54
10	Bibliografía	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la biogénesis ribosomal de Eucariontes	3
Figura 2. Modelo de liberación del factor eIF6 por SBDS y EFTUD1	5
Figura 3. Representación esquemática de una cascada de señalización	8
Figura 4. Ciclo funcional de la actividad de proteínas G.....	10
Figura 5. Reacción de fosforilación catalizada por una cinasa.....	12
Figura 6. Proteínas cinasas.....	13
Figura 7. Esquema del plásmido de expresión en <i>S. cerevisiae</i> de Efl1 (pRS426-Efl1).....	18
Figura 8. Esquema de la PCR inversa.....	19
Figura 9. Alineamiento de los oligos mutagénicos utilizados en la PCR inversa.....	20
Figura 10. Ley de Lambert-Beer.....	24
Figura 11. Ecuación que permite convertir la elipticidad en miligrados a elipticidad molar.	24
Figura 12. Producto de la PCR inversa para introducir la mutación S430A en el gen de EFL1	36
Figura 13. Patrón de restricción de las posibles clonas pRS426-Efl1 S430A con BamHI.....	37
Figura 14. Purificación de la proteína EFTUD1 recombinante mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺	38
Figura 15. Proteínas recombinantes purificadas	38
Figura 16. Espectros de Dicroísmo circular de las proteínas recombinantes.....	40
Figura 17. Esquema del plásmido de expresión de EFTUD1 (pCDNA3.1-EFTUD1).....	43
Figura 18. Amplificación por PCR del gen EFTUD1	44
Figura 19. Escrutinio de las posibles clonas que corresponden al vector pCDNA3.1+ con gen EFTUD1.....	44
Figura 20. Patrón de restricción experimental y teórico de pCDNA3.1-EFTUD1 con la enzima HindIII	45
Figura 21. Microscopía de fluorescencia de las células AD-293 transfectadas con el plásmido peGFP	46
Figura 22. Microscopía de las células AD-293 co-transfectadas con los plásmidos peGFP-N1 y pCDNA3.1-EFTUD1.....	47
Figura 23. Determinación de la fosforilación de EFTUD1 expresada en AD-293 mediante Western blot	48

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Moléculas comúnmente involucradas en la transducción de señales</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción para la PCR normal y la PCR inversa.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. Genotipo relevante de la cepa de S. cerevisiae BCY123.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 4 Reactivos y medios de cultivo utilizados para la transfección de células AD-293 con el plásmido pRS426-EFTUD1.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 5. Condiciones utilizadas para la amplificación por PCR del gen EFTUD1</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 6. Reactivos utilizados para evaluar el efecto de la concentración de cloruro de calcio en la eficiencia de la transfección</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 7. Reactivos utilizados para evaluar el efecto de la cantidad de DNA plasmídico en la eficiencia de la transfección</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 8. Rendimiento proteica obtenido para las proteínas recombinantes en estudio.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 9. Deconvolución de los espectros de Dicroísmo circular de las proteínas en estudio para la estimación de su contenido de estructura secundaria.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 10. Determinación de fosforilación de Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 por Western Blot.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 11. Sitios de fosforilación determinados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....</i>	<i>42</i>

ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxinucléico
DO ₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
Ef11	Proteína tipo factor de elongación 1
EFTUD1	Proteína tipo factor de elongación Tu 1
eIF6	Factor de iniciación 6 eucarionte
GDP	Guanosina difosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
HEK 293	Células embrionarias de riñón 293 (por sus siglas en inglés)
HRP	Peroxidasa de rábano
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
mM	Milimolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Polivinilidenofluoruro
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturante de proteínas en geles de poliacrilamida
TBS	Buffer tris salino
TBST	Buffer tris salino Tween
TE	Buffer tris EDTA
TEV	Tobacco etch virus
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

1 Resumen

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios para definir las bases moleculares de la señalización en eucariontes. La fosforilación de proteínas es un mecanismo de señalización muy importante por lo que es de gran trascendencia determinar la ubicación de este tipo de modificaciones postraduccionales en proteínas que intervienen en procesos celulares esenciales.

EFTUD1 es una proteína humana que participa en la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S. El ortólogo de EFTUD1 en *S. cerevisiae* se denomina Efl1 y para quien se ha descrito una fosforilación en el residuo S430. Esta modificación no ha sido estudiada por lo que no se le ha atribuido ninguna función biológica ni se ha determinado la cinasa involucrada. En este trabajo de investigación se estudió la fosforilación de la familia de GTPasas EFTUD1 y Efl1 en sus respectivos sistemas biológicos. Para ello se construyeron vectores de expresión de EFTUD1 en células de mamífero (AD-293) y de Efl1 en *S. cerevisiae*. La fosforilación se evaluó mediante ensayos inmunológicos (Western blot) en los que se detectó la presencia de serinas, treoninas y tirosinas fosforiladas con los anticuerpos antifosfo-residuo correspondientes. Los estudios de Western blot mostraron que la proteína Efl1 se encuentra fosforilada en residuos de serina y treonina pero no en tirosinas. Una mutación en el residuo S430A de Efl1, demostró que esta posición no es la única serina que se fosforila en Efl1 y por tanto deben de existir más de una posición modificada. La fosforilación de EFTUD1 expresada en células de mamífero (AD-293) arrojó datos inconclusos ya que no se observó fosforilación en las condiciones del experimento a pesar de que sí hubo sobreexpresión de la proteína. Posteriormente, fragmentos obtenidos de la digestión con tripsina y quimotripsina de las proteínas recombinantes Efl1 y Efl1 S430A se analizaron por espectrometría de masas para ubicar las fosforilaciones detectadas en el western blot. El total de fosforilaciones detectadas en la proteína Efl1 fueron dieciséis (7 serinas, 7 treoninas y 2 tirosinas), mientras que para la mutante Efl1 S430A se detectaron quince fosforilaciones (6 serinas, 5 treoninas y 3 tirosinas). Finalmente también se analizó por espectrometría de masas a la proteína EFTUD1 expresadas en *S. cerevisiae* encontrándose nueve fosforilaciones (4 serinas, 3 treoninas y 2 tirosinas). Con herramientas de predicción bioinformática se analizó las posibles cinasas que realizan estas fosforilaciones. Ensayos futuros nos permitirán determinar la relevancia biológica de estas modificaciones postraduccionales, así como, las cinasas que llevan a cabo estos eventos de fosforilación.

2 Antecedentes

2.1 Biogénesis ribosomal en eucariontes

Los ribosomas son la maquinaria responsable de la producción de proteínas y están a su vez, constituídos por proteínas (35%) y RNAr (65%). Son un complejo formado por dos subunidades, 60S y 40S, en asociación no covalente (1). En eucariontes la biogénesis ribosomal abarca la producción y el correcto ensamblaje de cuatro RNA ribosomales y 80 proteínas estructurales. Este proceso requiere de la acción coordinada de más de cien proteínas que no están presentes en la partícula madura. Dentro de estas proteínas accesorias se han descrito ATPasas tipo AAA, GTPasas, factores de exportación y helicasas entre otras.

La biogénesis ribosomal comienza en el nucléolo donde la RNA polimerasa III sintetiza el RNAr 5S, mientras que la RNA polimerasa I sintetiza un pre-RNAr que consta de los RNAr 18S, 5.8S y 28S (partícula 35S en levaduras). La transcripción de los RNAm de las proteínas ribosomales se lleva a cabo por la RNA polimerasa II, estas son sintetizadas en el citoplasma y transportadas posteriormente al núcleo. El pre-RNAr se asocia a proteínas ribosomales para formar una partícula pre-ribosomal 90S, la cual, por una serie de reacciones endo y exonucleolíticas, es separada en las partículas pre-40S y pre-60S, y cuya maduración, aún dentro del núcleo, continúa de forma independiente. Después de la maduración nucleoplásmica, las dos partículas pre-ribosomales son transportadas al citoplasma, donde varias proteínas continúan su maduración (Figura 1). Varias de las proteínas que se asocian desde el núcleo y que se conservan hasta las fases citoplasmáticas de la maduración tienen que ser adecuadamente recicladas o retransportadas al núcleo donde continuarán su función. Algunos de los eventos que ocurren en la maduración citoplasmática del precursor de la subunidad 60S en levadura se han descrito en detalle. Tal es el caso de la liberación del factor de anti-asociación Tif6 mediado por Sdo1 que recluta a Efl1 (Ria1), la cual con su actividad de GTPasa cataliza la disociación de Tif6 de la subunidad 60S completando su maduración.

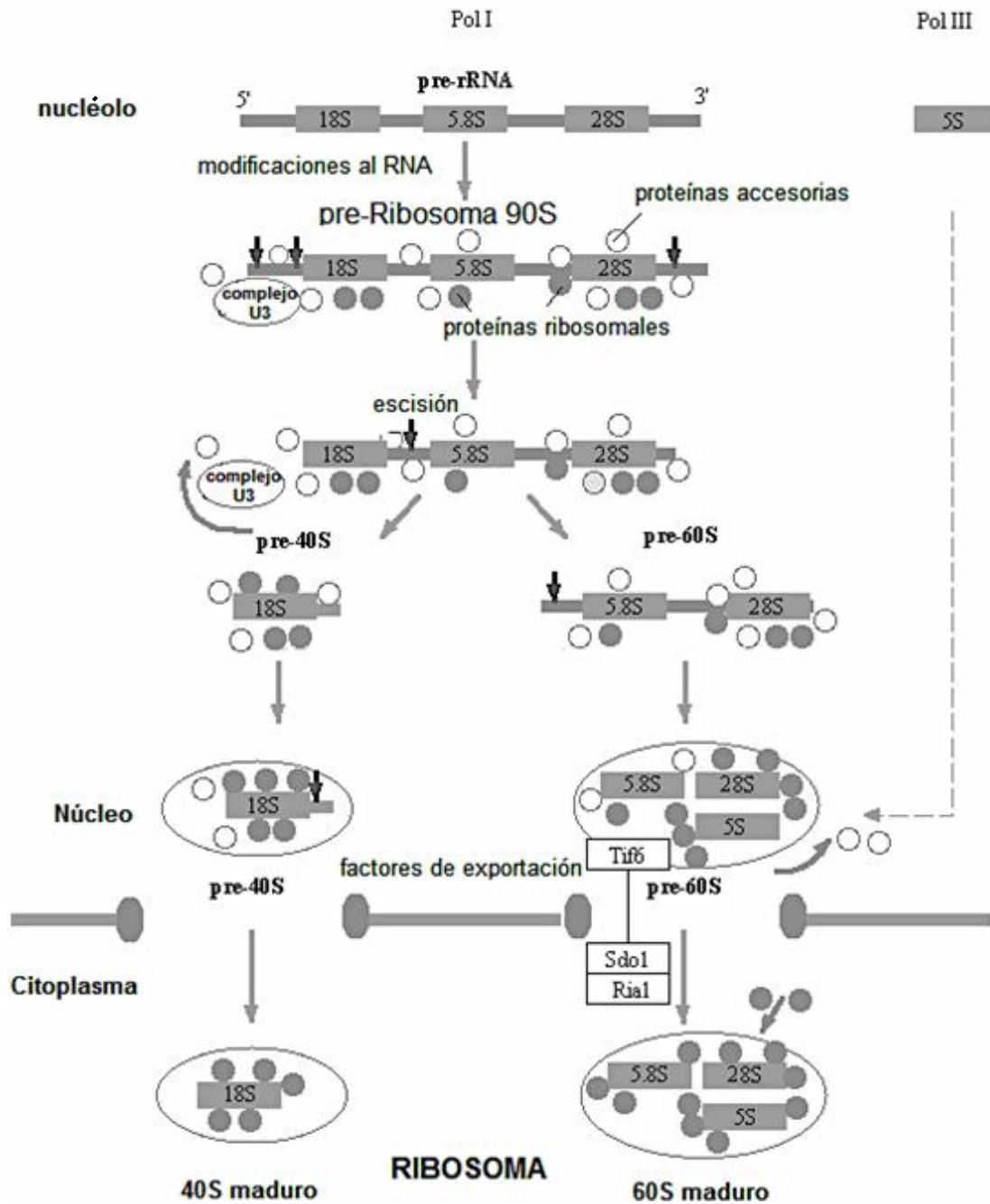


Figura 1. Esquema general de la biogénesis ribosomal de eucariontes en el que se muestran las diferentes etapas de maduración que comienzan en el nucléolo con la síntesis de los RNAr y culminan con la formación de las subunidades maduras de 40S y 60S del ribosoma. Una de las etapas finales de la maduración de la subunidad 60S requiere de la liberación del factor de anti-asociación Tif6 mediado por SdoI que recluta a Efl1 (Ria1), la cual con su actividad de GTPasa cataliza la disociación de Tif6 de la subunidad 60S completando su maduración (2).

La proteína EFTUD1 es una GTPasa humana que interviene en la fase final de la maduración de la subunidad 60S del ribosoma. Nuestros estudios de fosforilación se enfocan en esta proteína y su ortólogo de levadura Efl1.

2.1.1 La GTPasa ribosomal EFTUD1

EFTUD1 (elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein isoform 1) es una GTPasa que participa en la fase final de la biogénesis ribosomal de la subunidad 60S y en la activación traduccional de los ribosomas en humano. Junto con la proteína SBDS desencadenan la liberación, dependiente de la hidrólisis de GTP, de eIF6 del pre-ribosoma 60S en el citoplasma, permitiendo así el ensamblaje del ribosoma 80S y el reciclaje de eIF6 al núcleo (3). La proteína eIF6 actúa como un factor de anti-asociación bloqueando físicamente la formación del puente entre las dos subunidades del ribosoma (Figura 2). Estudios con Efl1 y Sdo1 (ortólogos de levadura de EFTUD1 y SBDS respectivamente) han demostrado que existe una interacción física entre ambas proteínas. Estudios por RMN sugieren que el dominio II de Sdo1 es el que participa en la interacción con Efl1. Además, estudios proteómicos han descrito una fosforilación en el residuo S430 de Efl1(4). Esta modificación no ha sido estudiada por lo que no se ha corroborado con otras técnicas. Tampoco se le ha atribuido alguna función biológica ni se ha determinado la cinasa involucrada.

Además de EFTUD1 existen otras GTPasas que participan en la biogénesis ribosomal (*e.g.* Lsg1 (5)). Por lo que es importante entender las características de las GTPasas y sus mecanismos de regulación.

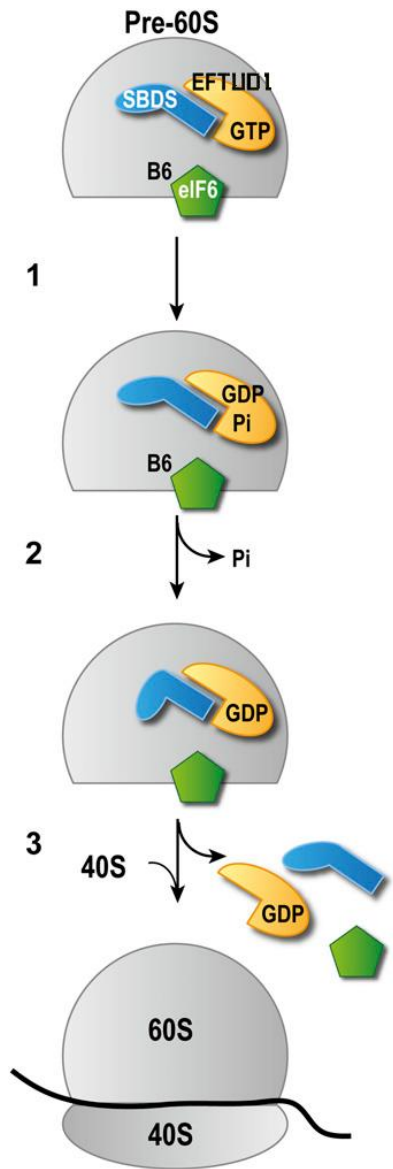


Figura 2. Modelo de liberación del factor eIF6 por SBDS y EFTUD1. 1) SBDS estimula la actividad de GTPasa de EFTUD1. 2) hidrólisis de GTP, EFTUD1 adopta conformaciones de unión a GDP y SBDS rota interrumpiendo el puente B6 (sitio de unión de las subunidades del ribosoma). 3) Se desestabiliza la unión de eIF6 a la partícula 60S liberándolo, mientras que EFTUD1 y SBDS se disocian del ribosoma. La liberación de eIF6 permite la formación del ribosoma activo 80S el cual puede comenzar la traducción (3).

2.2 Superfamilia GTPasas

Las GTPasas son una clase de proteínas reguladoras involucradas en procesos celulares centrales, tales como la biogénesis ribosomal, traducción, transporte intracelular y formación de citoesqueleto entre otras. En todos estos procesos la participación de proteínas efectoras es de suma importancia generando una red de interacciones proteína-nucleótido y proteína-proteína que son la base de la transducción de señales (*e.g.* proteínas de la familia RAS) (6).

Las GTPasas son capaces de unir GTP e hidrolizarlo y su conformación estructural oscila dependiente de su estado de unión a GTP (T) o a GDP (D), a través de ciclos de regulación precisos de hidrólisis de GTP a GDP inducidos por proteínas efectoras. Los factores que estimulan la actividad hidrolítica y el intercambio de GDP/GTP de una GTPasa son comúnmente referidos como las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) y los factores intercambiadores de guanina (GEF) respectivamente. Además de los factores anteriormente descritos, existen factores que modifican la conformación de la GTPasa no unida a nucleótido (forma apo). Estos son los llamados factores de estabilización del GTP (GFS) los cuales cambian el equilibrio de la conformación D (GTPasa-GDP) a T (GTPasa-GTP) de la forma apo de la GTPasa. Esto implica que la afinidad de algunas GTPasas por GDP y GTP depende de otros ligandos o cofactores (7). La gran mayoría de las GTPasas que intervienen en el ensamblaje del ribosoma enlazan a los nucleótidos débilmente, sugiriendo que la liberación de GDP es rápida y a diferencia de la familia RAS (GTPasas pequeñas) no requieren la asistencia de GEFs para promover la liberación de GDP y el enlace de GTP (8). Una característica común de las GTPasas es su alta afinidad por el GTP con una constante de disociación (K_D) del orden de picomolar, además de tener secuencias y estructuras similares y contar con el dominio G implicado en la unión de nucleótidos.

2.2.1 Dominio G

El dominio de unión a GTP/GDP en la familia de GTPasas tiene secuencias conservadas. En él se han identificado cinco motivos estructurales involucrados en la unión con el

nucleótido (9). El asa P (Walker A), la región NKXD y el motivo SAL, los cuales interaccionan de manera inespecíficas tanto con el GTP como con el GDP. El motivo del asa P tiene la secuencia consenso (G/A)XXXXGK(S/T) y enlaza a los fosfatos α y β del GDP y GTP. El motivo NKXD asistido por el motivo SAL, enlaza fuertemente a la porción de guanina y el anillo de ribosa del nucleótido. Las asas de los switches I y II (Walker B) permiten la discriminación entre GTP y GDP de la GTPasa. El switch I normalmente contiene una treonina, a veces remplazada por serina, la cual coordina un ion Mg^{2+} que es determinante en la afinidad de la GTPasa por el nucleótido de guanina. El switch II acomoda el fosfato- γ del GTP y junto con un residuo semiconservado de Gln, participan en la reacción de hidrólisis del GTP. El motivo switch II sufre cambios conformacionales drásticos en respuesta a la hidrólisis de GTP o del intercambio de nucleótido de guanina (10).

Otro mecanismo de regulación de la actividad de las GTPasas es la modificación post-traducciona l llamada fosforilación (11), que ocurre en respuesta de una transducción de señal.

2.3 Transducción de señales en eucariontes

Los sistemas de transducción de señales coordinan información celular compleja como el efecto de las proteínas que participan en las vías que se utilizan para regular las respuestas celulares a estímulos extracelulares e intracelulares (*e.g.* nutrientes, hormonas), regulación de vías metabólicas, proliferación y diferenciación. La evidencia acumulada indica que la fosforilación es el principal efector en la transducción de señales (12). De esto recae la importancia de la comprensión y correcta descripción de aspectos como la ubicación, regulación y función de los eventos de fosforilación en la transducción de señales. La cascada de transducción consiste en un circuito complejo molecular que detecta, amplifica e integra diversas señales externas para generar respuestas tales como el cambio de actividad enzimática, expresión de genes o actividad de canales iónicos (Figura 3).

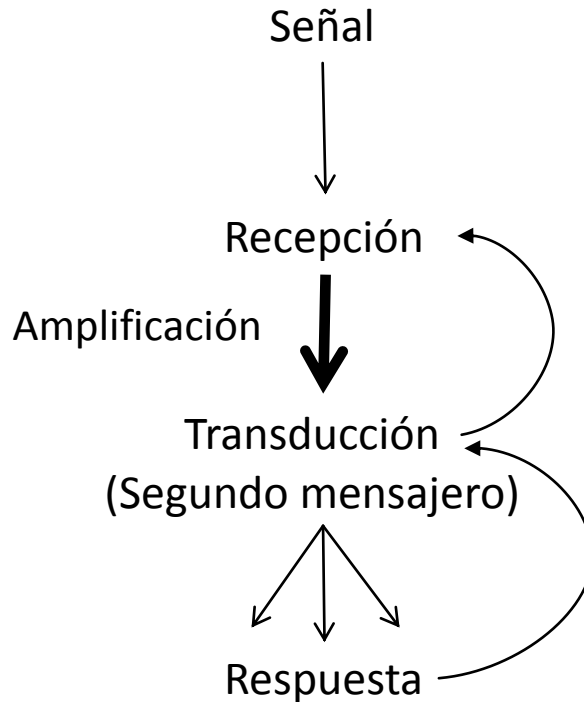


Figura 3. Representación esquemática de una cascada de señalización en la que participa una molécula señal, que interacciona de forma específica con un componente celular. La información que contiene la molécula señal es convertida a otras formas químicas (transducción) y es frecuentemente amplificada antes de causar una respuesta. Vías de retroalimentación y cooperatividad positiva/negativa regulan el proceso de señalización.

2.3.1 Recepción

Pocas moléculas señal no polares, tales como las hormonas esteroidales, son capaces de atravesar la membrana por difusión simple. Una vez dentro de la célula, estas moléculas pueden unirse a proteínas que interactúan directamente con el DNA y modulan la transcripción de genes. Sin embargo, la mayoría de las moléculas señal son muy grandes o muy polares para pasar a través de la membrana, además de que normalmente no presentan un sistema de transporte apropiado. Por lo tanto, la información presente en estas moléculas debe de ser transmitida a través de la membrana, sin entrar en la célula. Un receptor asociado a membrana realiza la función de transferencia de señal al otro lado de la membrana. Tal receptor corresponde a una proteína intrínseca de membrana que presenta un dominio extracelular y otro intracelular. En el dominio extracelular se encuentra un sitio de unión al ligando (molécula señal). La interacción del ligando, también llamado primer

mensajero o antagonista, ocasiona un cambio conformacional del receptor. Este cambio estructural frecuentemente no es suficiente para producir una apropiada respuesta, por la poca proporción en que se encuentran estos receptores en la membrana. En general, el sistema transmembranal de señalización presenta dos elementos básicos, un receptor y un efector, el cual es controlado por el receptor y es el encargado de generar una señal intracelular. Existen tres familias principales de receptores de superficie celular que transmiten la señal extracelular. 1) Los receptores asociados a canales iónicos funcionan como canales que se abren y cierran brevemente permitiendo la entrada de iones específicos. 2) Los receptores asociados a proteínas cinasas, las cuales fosforilan proteínas específicas (e.g. los receptores de tirosina cinasa). 3) Los receptores asociados a proteínas G, los cuales activan o inactivan indirectamente a enzimas unidas a la membrana plasmática o a canales iónicos a través de proteínas triméricas que unen GTP (13). A continuación se detallan las características generales de los receptores acoplados a proteínas G.

2.3.1.1 Receptores acoplados a proteínas G

En eucariontes superiores hay un acoplamiento entre las proteínas G y muchos receptores de hormonas, neurotransmisores, medicamentos y receptores acoplados a adenilato ciclasa. El sistema de señalización regulado por proteínas G es relativamente complejo, consiste en un receptor, una proteína heterotrimérica y un efector. Cada uno de estos componentes puede ser regulado independientemente por proteínas adicionales o a nivel transcripcional. Estudios sobre las proteínas G muestran que la hidrólisis de GTP puede actuar como interruptor de la señal, siendo activa la forma (T) e inactiva la forma (D) de la GTPasa. Las proteínas G heterotriméricas constan de una subunidad α que contiene el dominio G (característico de las GTPasas) y las subunidades β y γ que forman un complejo estable. En el estado basal o inactivo el complejo β - γ y la subunidad α unida a GDP están asociados (14). La unión de la molécula señal con el receptor produce un cambio conformacional en el receptor activándolo, esto promueve el acoplamiento del receptor activo a la proteína G induciendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , lo que ocasiona que la subunidad α se disocie del receptor activo así como del complejo β - γ y ambos por separado

modulen la actividad de una variedad de efectores como canales iónicos o enzimas (Figura 4).

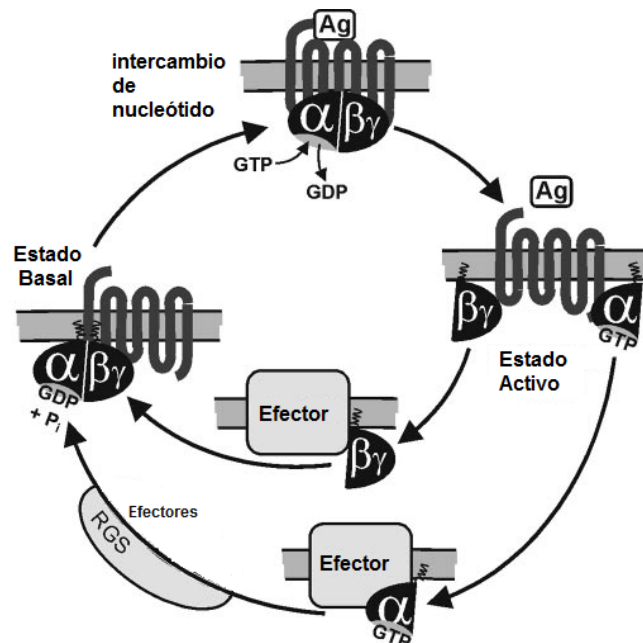


Figura 4. Ciclo funcional de la actividad de proteínas G. El receptor (complejo con dominio transmembranal de siete alfas hélices) y una molécula señal (Ag, Agonista) promueven la liberación de GDP de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica resultando en el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α ($G\alpha$). La $G\alpha$ en su forma (T) y el complejo β - γ ($G\beta\gamma$) se disocian para así, ser capaces de modular por separado la función de varios efectores. La hidrólisis de GTP a GDP puede ser acelerada por varios efectores así como por reguladores de señal de proteínas G (RGS, por sus siglas en inglés). La $G\alpha$ en su forma (D) se reasocia con la $G\beta\gamma$ regresando al estado basal.

Un efector común de este sistema es la enzima adenilato ciclasa que cataliza la síntesis de AMP cíclico a partir de ATP. Este acoplamiento de receptor/efector dirige la generación de un segundo mensajero que constituye el siguiente paso de la cascada de señalización. Cabe mencionar que la activación de la adenilato ciclasa en levaduras, en respuesta a señales nutricionales, está principalmente dirigido por proteínas relacionadas con la familia de GTPasas monoméricas Ras (15).

2.3.2 Transducción: Segundo Mensajero

El efecto que genera el segundo mensajero se debe a su libre difusión a otros compartimentos de la célula, a la amplificación de la señal y a la activación de canales membranales y enzimas las cuales pueden dirigir la generación de muchos más segundos mensajeros que pueden interactuar en diferentes vías de señalización en la célula (integración). Por lo cual, una pequeña concentración de molécula señal en el ambiente, puede desencadenar una respuesta intracelular grande. En la Tabla 1 se muestran algunos efectores, los segundos mensajeros asociados y su principal función que generalmente corresponde a la activación de una cinasa.

Tabla 1. Moléculas comúnmente involucradas en la transducción de señales.

Efactor	Segundo mensajero	Cinasa diana
Adenilato ciclasa	AMP cíclico	PKA
Guanilato ciclasa	GMP cíclico	PKG
Fosfolipasa C	1,4,5-trisfosfato inositol, (IP ₃) y diacilglicerol (DAG)	PKC
Canal iónico	ion de calcio	Cinasa CaM

2.3.3 Respuesta

La fosforilación de proteínas es un efecto común en la transferencia de la información. Las proteínas cinasas son las que responden a la concentración de segundos mensajeros y fosforilan a proteínas para regular su función. La mayoría de los procesos celulares son regulados por fosforilación reversible de proteínas mediante la acción controlada de cinasas y fosfatasa.

2.3.3.1 Cinasas

Las cinasas son enzimas que fosforilan los residuos de serina, treonina y tirosina en una proteína. El estado fosforilado de una proteína modula su actividad enzimática, influye en su estructura terciaria y cuaternaria, controla la distribución subcelular y regula la interacción con otras proteínas. La acción de las cinasas consiste en la transferencia del fosfato gamma del ATP a un grupo hidroxilo de una proteína (Figura 5). Las cinasas pueden ser activadas por fosforilación y/o mediante la interacción con nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), ácidos grasos (DAG), proteínas (*e.g.* ciclinas), iones (Ca^{2+}) entre otros.

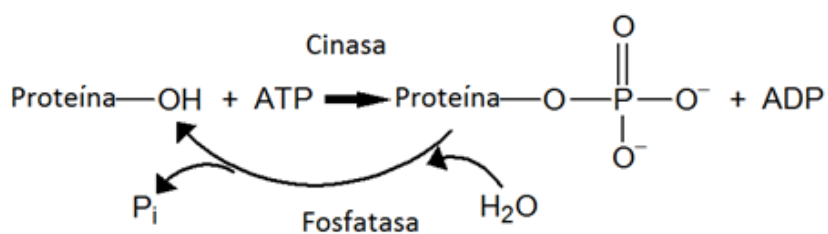


Figura 5. Reacción de fosforilación catalizada por una cinasa. Esta reacción es reversible por la acción de las fosfatasas.

En humanos se han identificado más de 500 cinasas las cuales pueden ser subdivididas de acuerdo a su especificidad catalítica en: tirosina cinasas o serina/treonina cinasas. Las tirosina cinasas, que incluyen los receptores tirosina cinasas, activan un gran número de vías de señalización involucradas en la proliferación celular, diferenciación, migración y cambios metabólicos. Las serina/treonina cinasas (STK, por sus siglas en inglés) juegan un papel preponderante en la homeostasis celular y señalización, ya que pueden fosforilar factores de transcripción, reguladores de ciclo celular y un vasto grupo de efectores citoplasmáticos y nucleares (16). En la Figura 6 se muestra algunas proteínas cinasas presentes en humano.

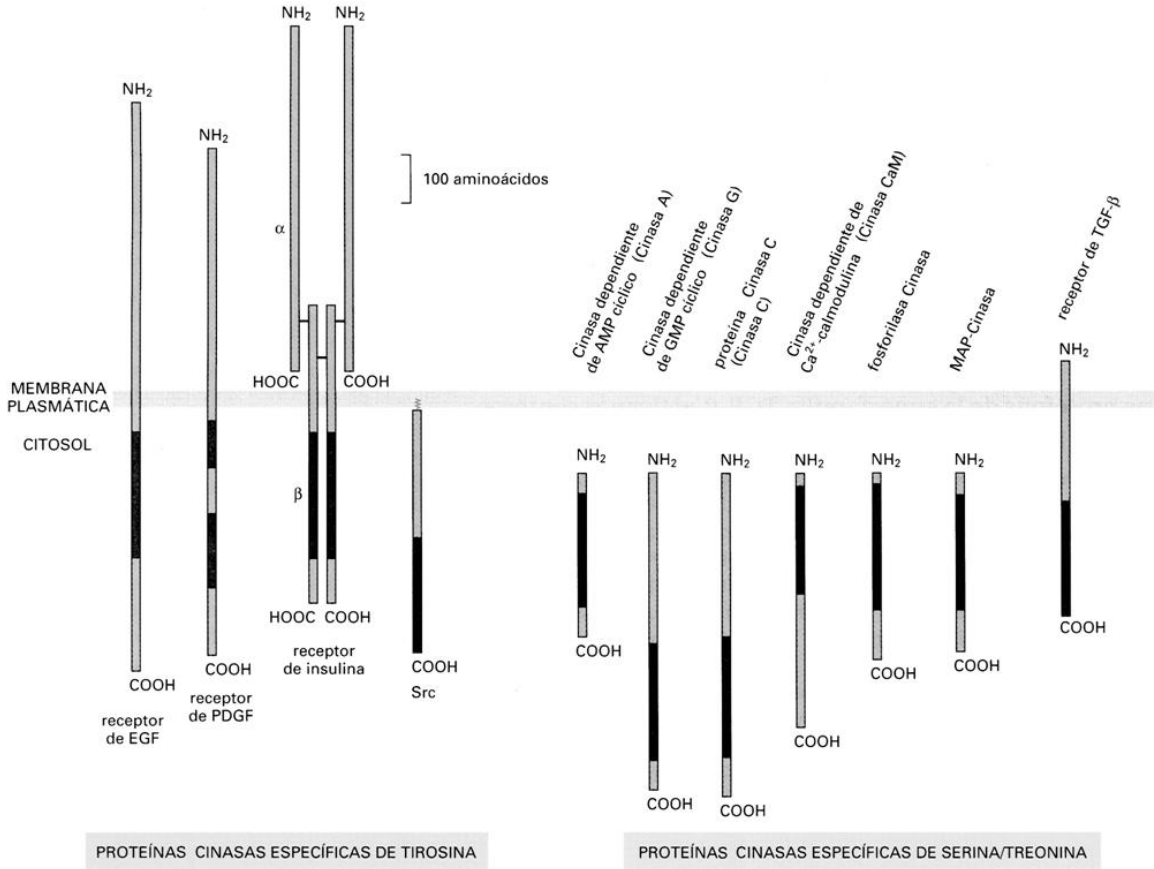


Figura 6. Proteínas cinasas. Se muestra el tamaño y localización de sus dominios catalíticos (negro). Las tirosina cinasas mostradas se encuentran unidas a la membrana plasmática, mientras que la mayoría de las proteínas Serina/Treonina cinasas se localizan en el citósol (15).

2.3.4 Término de la señal

Las diferentes respuestas mediadas por receptores son rápidamente frenadas cuando el ligando señal extracelular y los segundos mensajeros son eliminados. Por ejemplo, las proteínas G se autoinactivan hidrolizando el GTP que llevan unido, el IP_3 es rápidamente desfosforilado mediante una fosfatasa (o fosforilado por una cinasa), el diacilglicerol es rápidamente degradado, los nucleótidos cíclicos son rápidamente hidrolizados por una fosfodiesterasa, el Ca^{2+} es rápidamente bombeado hacia afuera del citósol y las proteínas son rápidamente desfosforiladas por proteínas fosfatasas.

La transducción de señales es un proceso muy complejo y altamente controlado. La fosforilación de proteínas juega un papel determinante en la respuesta a los diferentes estímulos que percibe la célula, por lo cual, es de gran trascendencia determinar la ubicación de la fosforilación en proteínas que intervienen en procesos celulares esenciales. Existen ensayos de alta densidad que emplean la espectrometría de masas (proteómica) para determinar los patrones globales de fosforilación en cierto tipo de células en determinadas etapas del ciclo celular o en respuesta a estímulos específicos (17) (4). Estos ensayos de alta densidad han permitido describir un gran número de fosforilaciones Sin embargo, los resultados de estos ensayos proteómicos corresponden a una asociación estadística de los tamaños de los péptidos obtenidos con los más semejantes de una base de datos, lo que significa que existe la posibilidad de que haya una incorrecta asignación de la fosforilación los péptidos obtenidos por lo que se requiera corroborar estos resultados con técnicas más finas.

3 Hipótesis

Estudios de proteómica de alta densidad han reportado la fosforilación del residuo S430 de Efl1. Sin embargo, este tipo de técnica se fundamenta en asociaciones estadísticas que deben ser confirmadas con técnicas más específicas. Por lo tanto, si esta fosforilación ocurre, entonces al analizar la fosforilación de Efl1 mutada en el residuo 430, por Western blot con anticuerpos anti-fosforesiduos y por Espectrometría de masas, se determinará si este fuera el único residuo fosforilado de esta proteína.

Los mecanismos de regulación por fosforilación son altamente conservados en eucariontes. Por lo tanto, si la proteína Efl1 es fosforilada, entonces es posible que el ortólogo humano EFTUD1 también presente este tipo de modificación.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

- Comprobar la fosforilación de Efl1 en el residuo serina 430 y en otros residuos y si estas modificaciones ocurren en EFTUD1.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la fosforilación de EFTUD1 y Efl1 en sus respectivos sistemas biológicos.
- Sobreexpresar la proteína EFTUD1 recombinante en células humanas.

5 Materiales y métodos

5.1 Ensayo de fosforilación en levadura. Determinación de la fosforilación de Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 en *S. cerevisiae*

La sobreexpresión de Efl1 y EFTUD1 en *S. cerevisiae* se realizó con el protocolo diseñado por la doctora Nuria Sánchez Puig y que fue optimizado por el estudiante de doctorado Axel Luviano Jardón.

5.1.1 Vector de expresión en *S. cerevisiae* para Efl1 y EFTUD1

Los vectores utilizados para la sobreexpresión de Efl1 y EFTUD1 en *S. cerevisiae* fueron construidos por la Doctora Nuria Sánchez Puig. Cada vector contiene el gen correspondiente a la secuencia codificante de la proteína de interés más un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y una etiqueta de 8 histidinas en el extremo C-terminal insertado en el plásmido pRS426 entre los sitios *NcoI* y *BamHI*. Mediante una PCR de traslape se agregaron entre los sitios *NotI* (adicionados en la construcción) el promotor *GALI* y la secuencia terminadora *MAT α* . El plásmido PRS426 es un vector cuyo marcador de selección en bacteria es la resistencia a ampicilina y en levadura es la complementación genética de la auxotrofia a uracilo por la presencia del gen *URA3* que le confiere la capacidad de crecer en medio sin uracilo. También contiene las secuencias de REP3 y FRT necesarias para la propagación de alta copia en levadura (Figura 7).

Vector de expresión pRS426-Efl1

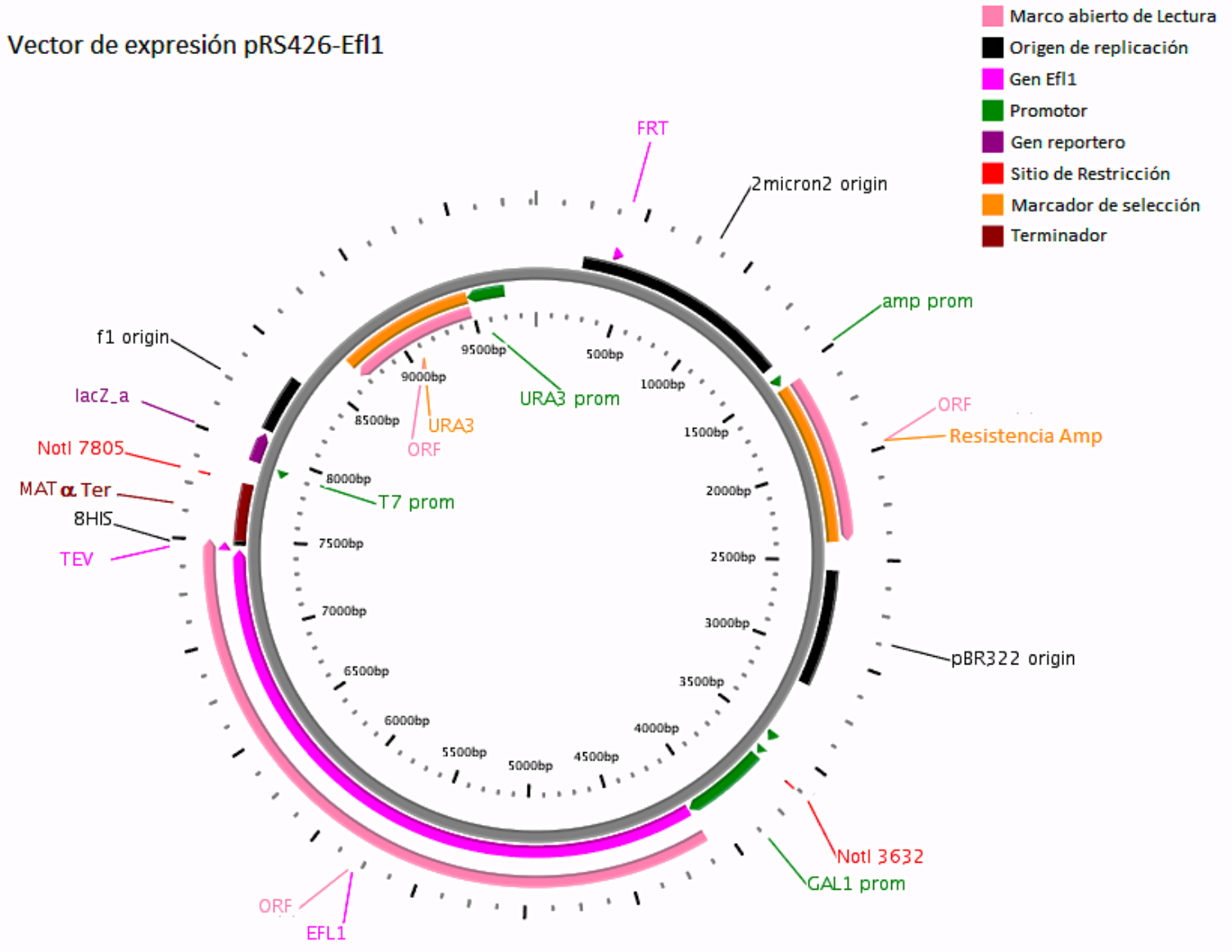


Figura 7. Esquema del plásmido de expresión en *S. cerevisiae* de Efl1 (pRS426-Efl1). Las barras sólidas representan las diferentes secuencias funcionales.

5.1.2 Vector de expresión para la mutante Efl1 S430A. Construcción de pRS426-Efl1-S430A

La construcción de este plásmido se realizó mediante una PCR inversa en la cual, el traslape de oligos mutagénicos permitieron la introducción de la mutación dirigida S430A. La PCR inversa consiste en la amplificación completa, en este caso, del plásmido PRS426-Efl1 con oligos complementarios mutagénicos que se alinean a la misma región, pero en direcciones opuestas de las cadenas de DNA (Figura 8).

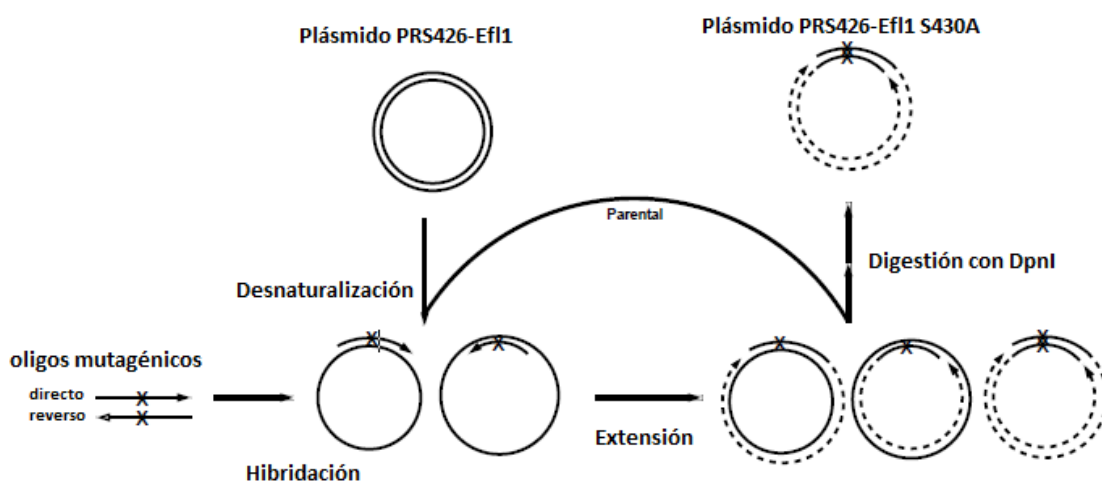


Figura 8. Esquema de la PCR inversa utilizada para la introducción de la mutación S430A en el vector de expresión de Efl1.

5.1.2.1 Diseño de oligos

La mutación puntual que se llevó a cabo corresponde a la transversión de timina a guanina cambiando el codón TCT por GCT que se traduce en alanina (Figura 9).

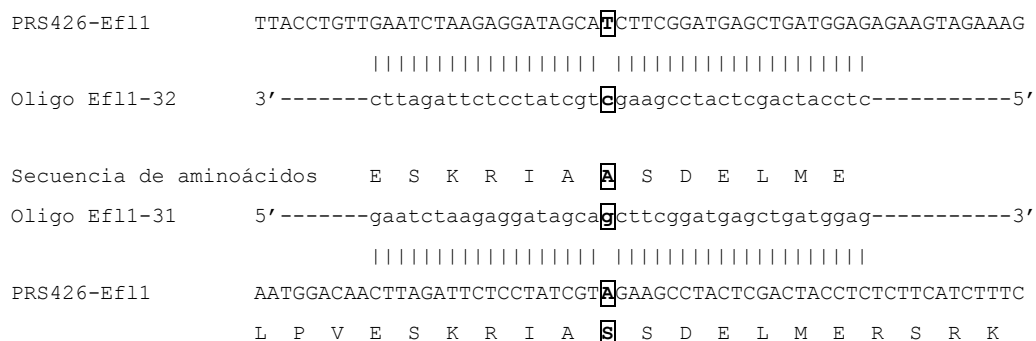


Figura 9. Alineamiento de los oligos mutagénicos utilizados para introducir la mutación S430A mediante PCR inversa. Esquema que muestra la región donde alinean el oligo Efl1-32 directo en la cadena 5'-3' y el oligo Efl1-31 reverso en la cadena 3'-5'.

Para una mayor eficiencia en la PCR se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones en el diseño de los oligos:

- Tm mayor a 65 °C
- Mutación ubicada en la parte central de los oligos
- %GC mayor o igual 50%

5.1.2.2 PCR inversa

Las condiciones utilizadas para la PCR inversa presentan diferencias substanciales con respecto a la PCR convencional (Tabla 2). Con el fin de aumentar la eficiencia de la amplificación de un amplicón de gran tamaño se utiliza una mayor cantidad de nucleótidos, pues se requiere polimerizar un amplicón de más de 8,000 pb. La adición de DMSO facilita la separación de regiones ricas en GC y reduce la propensión del DNA a formar estructura secundaria. Por otra parte la temperatura de hibridación y la relación de concentración oligo/molde pueden ser menores que en la PCR convencional. Mediante estas

modificaciones se favorece la interacción oligo-molde y por ende se disminuye la dimerización de los oligos.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción para la PCR normal y la PCR inversa.

	PCR normal (µL)	PCR inversa (µL)	Condiciones del termociclador	
Buffer 10x KOD	5	2.5	Iniciación	= 94 °C / 2 min
MgSO ₄ (25 mM)	2	1		
dNTP (2 mM)	1	1		
oligo Efl1-31 (10 µM)	1	0.5	Desnaturalización	= 94 °C / 30 s
oligo Efl1-32 (10 µM)	1	0.5	Hibridación	= 65/60 °C / 30 s
Molde PRS426-Efl1 (20 ng)	1	0.5	Extensión	= 72 °C / 5 min
Enzima KOD (U/µl)	1	0.5		
DMSO	-	0.5		
H ₂ O	38	18	Elongación final	= 72 °C / 5 min

5.1.2.3 Transformación bacteriana

La transformación se realizó con el producto obtenido de la PCR inversa previamente digerido con la enzima de restricción *DpnI*. El DNA que resiste a la digestión enzimática corresponde al DNA amplificado en la PCR y que por ende contiene la mutación S430A. El DNA molde al estar metilado es degradado por la enzima. A su vez, el DNA obtenido en la PCR corresponde a un fragmento lineal que es recircularizado intracelularmente, así que, no requiere una reacción de ligación previa a la transformación. El sistema biológico usado para la transformación fue la cepa *E. coli* DH5α. La transformación se realizó mediante choque térmico a 42 °C por 40 segundos para introducir el plásmido. Posteriormente las células transformadas se plaquearon en medio sólido LB-amp (ampicilina 100 µg/ml) y se incubaron durante 12 horas a 37 °C.

5.1.2.4 Selección de transformantes

A partir de las colonias que crecieron en el medio LB-amp se extrajo DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina para su subsecuente escrutinio por patrón de restricción y así verificar las posibles clonas positivas. Finalmente el DNA plasmídico se secuenció para verificar la correcta mutación.

5.1.3 Transformación de células de levadura

Los diferentes plásmidos de expresión se transformaron en la cepa *S. cerevisiae* BCY123. Las principales cualidades de esta cepa son, ser deficiente en proteasas, ser auxótrofa a uracilo y su capacidad de sobreexpresar al factor de transcripción GAL4 (Tabla 3). Lo anterior lo hace una cepa apta para la sobreexpresión de proteínas heterólogas presentes en plásmidos URA⁺ y cuya expresión esté controlada por el promotor *GAL10*. La transformación de BCY123 se hizo mediante el método de acetato de litio (18) y las transformantes se sembraron en medio sintético sin uracilo (SD-URA).

Tabla 3. Genotipo relevante de la cepa de *S. cerevisiae* BCY123.

Cepa	Genotipo relevante
BCY123	<i>MATa pep4::HIS3 prb1::LEU2 bar1::HISG lys2::GAL1/10-GAL4 can1 ade2 trp1 ura3 his3 leu2-3</i>

5.1.4 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en levadura

Un preinóculo de células previamente transformadas con el plásmido correspondiente se cultivaron en medio SD-URA suplementado con 2 % de glucosa como fuente inicial de carbono toda la noche. Al día siguiente se inoculó 1 L de medio SD-URA suplementado con 1 % de glucosa a una DO₆₀₀ inicial de 0.05. Se dejó crecer a temperatura ambiente y sin agitación durante 12 h. Posteriormente se incubó a 30 °C con agitación por 6 h más (con el fin de agotar la glucosa) o hasta alcanzar una DO₆₀₀ final de 3.0. En este momento se indujo con 3 % de galactosa y se incubó por 20 h a la misma temperatura.

5.1.5 Purificación de proteínas recombinantes

Para la purificación de todas las proteínas en estudio se utilizó el mismo protocolo de purificación. Todas las disoluciones usadas se filtraron con una membrana de tamaño de poro de 0.45 μm . Como primer paso de la purificación, se realizó una centrifugación del cultivo 5,000 rpm/10 min (Beckman, No. 02V4446) para la obtención del paquete celular. El paquete celular se resuspendió en buffer de lisis (25 mM Tris, 300 mM NaCl, 25 mM imidazol, pH 8) adecuado para la estabilidad de las proteínas. El rompimiento celular se llevó a cabo por fricción mecánica con perlas de vidrio de 425-600 μm . Se resuspendieron 10-15 gramos de biomasa en el doble de volumen de buffer de lisis con inhibidor de proteasas y se mezcló con el mismo volumen de perlas de vidrio. La mezcla se agitó en una licuadora (Bead Beater) durante 8 ciclos de un minuto intercalados de 3 minutos de reposo en hielo. El lisado se centrifugó a 12,500 rpm por 50 min para obtener el extracto crudo. El extracto crudo se filtró por membrana de tamaño de poro de 0.45 μm y se aplicó a una cromatografía de afinidad con una resina cargada con níquel como fase estacionaria. El hexapéptido de histidinas añadido en el extremo C-terminal de la proteína presenta afinidad por el níquel, lo que permite su retención en la columna Ni^{2+} His Trap (Invitrogen). La elución se logró mediante la adición del buffer de elución a la columna que difiere con el buffer de lisis solo en la concentración de imidazol de 250 mM. La alta concentración de imidazol favorece el equilibrio imidazol-columna sobre el equilibrio histidina-columna, desplazando así, a la proteína recombinante. Las muestras obtenidas de la purificación fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 7.5 % y fueron teñidas con azul de Coomassie R.

5.1.6 Caracterización de las proteínas recombinantes sobreexpresadas en levadura

5.1.6.1 Cuantificación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante absorción en el UV a una longitud de onda de 280nm. El coeficiente de extinción molar teórico de cada una de las proteínas recombinantes se calculó, con base en la secuencia de aminoácidos, en el servidor <http://expasy.org/tools/protparam.html>. Mediante la ley de Lambert-Beer se calculó la

concentración (c) a partir del valor de ϵ y la medida obtenida de Absorbancia a 280 nm (Figura 10).

$$A_{\lambda} = \epsilon c l = \epsilon c \quad \text{Cuando } l = 1 \text{ cm}$$

Figura 10. Ley de Lambert-Beer. Ecuación que nos permite relacionar la Absorbancia a una determinada longitud de onda con la concentración de la proteína.

5.1.6.2 Determinación del contenido de estructura secundaria de una proteína

El contenido de estructura secundaria se determinó por Dicroísmo circular (CD). Cada muestra se preparó dializando la proteína purificada en un buffer de fosfatos (K_3PO_4 50 mM, pH 7). La concentración de proteína se ajustó a 0.1 mg/ml. Las mediciones se llevaron a cabo en una celda de cuarzo de 0.2 cm de paso óptico en un espectropolarímetro Jasco J-710 en el UV lejano (195-260) y a temperatura de 25 °C. El espectro representa el promedio de tres acumulaciones realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido de 20 nm/min. Para procesar los datos se transformó el valor de elipticidad observada a elipticidad molar utilizando la ecuación que se muestra en la Figura 11.

$$\theta_{\text{Molar}} = \frac{\theta_{\text{obs}} * MW}{[P] * d}$$

Figura 11. Ecuación que permite convertir la elipticidad en miligrados a elipticidad molar.

donde θ Molar es la elipticidad molar, θ obs es el valor de la elipticidad en mdeg (miligrados), MW es el peso molecular promedio de los aminoácidos, [P] es la concentración de la proteína en mg/cm³ y d es el paso óptico en cm. Los valores de elipticidad molar se procesaron con los programas K2D3 (19) y CDNN (20), los cuales deconvolucionan el espectro de dicroísmo circular para estimar la cantidad de alfa hélices y hojas beta de una proteína a partir de su espectro de dicroísmo circular.

5.1.6.3 Espectrometría de masas

Con el fin de evaluar que residuos son los que se fosforilan en las proteínas en cuestión se realizó un estudio de espectrometría de masa. Las proteínas fueron digeridas con tripsina y quimiotripsina y los péptidos generados se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta es una técnica de ionización suave denominada así por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI, desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*. La matriz utilizada para el ensayo fue el ácido α -hidroxicinámico. Los experimentos fueron realizados por el Dr. David Surkowsky.

5.1.7 Western blot

La técnica de Western blot es un método útil para identificar una proteína de interés usando un anticuerpo específico contra ella. Para la separación de la proteína deseada se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con una subsecuente transferencia a un soporte sólido, el cual puede ser una membrana de nitrocelulosa o PVDF que fija a la proteína y permite la presentación del epítopo que reconoce el anticuerpo. El paso inicial de un Western blot es la transferencia de las proteínas de un gel a un soporte sólido que las inmoviliza haciendo a las proteínas accesibles a un ensayo inmunológico. A continuación se bloquea la membrana con una proteína inerte al ensayo para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se van a utilizar en la detección. Posteriormente, se aplica el anticuerpo específico fusionado a una enzima capaz de producir un producto detectable. En los ensayo de Western blot se cargaron 4 μ g de proteína purificada que fueron separados en un gel al 6% de poliacrilamida mediante electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis se corrió a 120 volts durante 1.5 horas.

Las diferentes etapas de las que consta la metodología se resumen en la siguiente lista:

1. Equilibrar el gel y la membrana en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 10 % v/v metanol).
2. Preparar un sándwich que consiste en papel/gel/PVDF/papel.

3. Exclusión de las burbujas de aire.
4. Transferencia electroforética a 200 mA/1h (Cámara electroforética, BioRad).
5. Lavar la membrana con buffer TBS (100 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 8).
6. Bloquear la membrana con 5% de leche desengrasada en TBS.
7. Lavar la membrana con buffer TBS.
8. Adicionar el anticuerpo primario (1:1,000).
9. Incubar durante 12 horas en constante agitación a 10 °C (en caso de anticuerpo primario conjugado seguir el procedimiento en el paso 13).
10. Lavar 4 veces con buffer TBST (100 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.05% Tween, pH 8).
11. Adicionar el anticuerpo secundario (1:8,000).
12. Incubar por 1 hora.
13. Lavar 4 veces por 5 min la membrana con buffer TBST.
14. Incubar la membrana con un sustrato quimioluminiscente.
15. Exponer a película radiográficas.

Se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales desarrollados en ratón para anti-fosfoserina, anti-fosfotreonina y anti-fosfotirosina (Santa Cruz: sc-81516, sc-5267 y sc-7020 respectivamente) que reconocen cada uno de los fosforesiduo correspondientes. Debido a que estos anticuerpos no están conjugados con una enzima sonda, requieren de un segundo anticuerpo para su detección. El anticuerpo secundario ocupado fue una anticuerpo policlonal anti-ratón fusionado a la enzima peroxidasa de rábano que cataliza la reacción de oxidación del luminol a 3-aminofalato. La reacción de oxidación está acompañada de la emisión de luz, la cual puede ser detectada con una película radiográfica. De esta manera, se atestigua la unión del anticuerpo primario con su epítipo. Para la detección de la proteína recombinante se usó el anticuerpo primario monoclonal (sc-8036 HRP, Santa Cruz) anti-polihistidinas conjugado a la enzima peroxidasa de rábano.

5.2 Ensayo de fosforilación en células de mamífero. Determinación de la fosforilación de EFTUD1 en la línea celular AD-293

5.2.1 Materiales, reactivos y medios de cultivo

Las manipulaciones, pasajes y transfecciones de la células AD-293 se realizaron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar (Nuair) en contenedores especializados para cultivo celular estéril, instrumentos volumétricos esterilizados por autoclave y reactivos y medios filtrados con membranas de 0.22 μm . Los reactivos y medios utilizados se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4 Reactivos y medios de cultivo utilizados para la transfección de células AD-293 con el plásmido pRS426-EFTUD1.

Reactivos y medios de cultivo	Componentes
Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Cantidades expresadas en mg/L 200 CaCl_2 ; 0,1 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 400 KCl; 97.67 MgSO_4 ; 6400 NaCl; 3700 NaHCO_3 ; 125 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 4500 D-glucosa; 15 Rojo de Fenol; 84 L-arginina; 584 L-glutamina; 30 glicina; 42 L-histidina; 105 L-isoleucina; 105 L-leucina; 146 L-lisina; 30 L-metionina; 66 L-serina; 66 L-fenilalanina; 42 L-serina; 95 L-treonina; 16 L-triptofano; 72 L-tirosina; 94 L-valina; 4 D-Ca pantotenato; 4 Cloruro de colina; 4 Ácido fólico; 4 Niacinamida; 0.4 Ribofalvina; 4 Tiamina; 4 Piridoxina.
DMEM suplementado	Medio de Cultivo Eagle modificado por Dulbecco (SIGMA D-7777) + 1% Antibiótico-antimicótico (GIBCO BRL cat. No. 105240-062) + 10 % Suero bovino fetal (GIBCO BRL cat. No. 10099-141).
Solución de tripsina	Tripsina GIBCO BRL 2.5 g/L y 0.38 g/L EDTA en solución de Hanks.
2X HEPES-buffered saline (HBS)	280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mM dextrosa, 50 mM HEPES. Disolver en 90 ml de H_2O . Ajustar pH a 7.05 con 0.5 N NaOH y aforar a 100 ml Esterilizar la solución por filtración (filtro 0.22 μm)
2.4 M CaCl_2	Disolver 10.8 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml H_2O destilada. Esterilizar

	la solución por filtración (filtro 0.22 µm)
0.1X TE	1 mM Tris·Cl, 0.1 mM EDTA, pH 8 Esterilizar la solución por filtración (filtro 0.22-µm)
Kit de transfección lipofectamine Reagent-plus (Invitrogen)	Lipofectamine ® Opti-MEM ® PLUS reagent ®
Buffer de lisis para líneas celulares	Tris HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M, Nonidet P40 1 %, PMSF 0.5 M, aprotinina 50 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 50 µg/ml, ortovanadato de sodio 0.4 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM, pH 7.4
Seroalbúmina bovina 0.5 mg/ml	0.125 g BSA (SIGMA) en 250 ml agua destilada.

5.2.2 Construcción del vector de expresión para EFTUD1 en células de mamífero

5.2.2.1 Plásmido pCDNA3.1+

El plásmido pCDNA3.1+ es un vector de 5.4 kb diseñado para la alta expresión estable o transitoria en células de mamífero. El vector contiene los siguientes elementos:

- Promotor humano de citomegalovirus inmediato temprano (CMV IE) para niveles altos de expresión en una gran variedad de células de mamífero. El promotor CMV muestra una fuerte transactivación por la proteína E1a de adenovirus expresada constitutivamente en células HEK293 (21).
- Gen de resistencia a neomicina para la selección de células de expresión estable.
- Marcador de resistencia a ampicilina para la selección en bacteria.
- Sitio de clonación múltiple.

Por las características antes mencionadas se optó por el plásmido pCDNA3.1 (+) para la sobreexpresión de proteína EFTUD1. La secuencia codificante de la proteína humana EFTUD1 se clonó entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I del vector pCDNA3.1+. Estos sitios de restricción se adicionaron a la secuencia codificante mediante PCR usando los oligos EFTUD-pCDNA y His-Not.

5.2.2.2 Diseño de oligonucleótidos y amplificación de la secuencia codificante de EFTUD1

La secuencia codificante de EFTUD1 se obtuvo mediante una PCR usando como molde el plásmido pYTH-EFTUD1-TH con los oligos EFTUD-pcDNA directo, el cual confiere el sitio de reconocimiento de la enzima *Bam*HI más la secuencia consenso Kozack antes del codón de inicio para asegurar una buena eficiencia de la transcripción, y el oligo complementario His-Not reverso que agrega a la secuencia codificante un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV, 6 histidinas, codón de paro y el sitio de restricción *Not*I. Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones utilizadas para la amplificación por PCR del gen EFTUD1.

	PCR (μ L)	Condiciones del termociclador	
Buffer 10x KOD	6	Iniciación	= 94 °C / 3 min
MgSO ₄ (25 mM)	2		
dNTP (2 mM)	1		
oligo EFTUD-pcDNA directo (10 μ M)	1	Desnaturalización	= 94 °C / 30 s
oligo His-Not reverso (10 μ M)	1	Hibridación	= 60 °C / 30 s
molde pYTH-EFTUD1-TH (20 ng)	1	Extensión	= 72 °C / 3.5 min
Enzima KOD	1		} 24 ciclos
DMSO	-		
H ₂ O	38		
Volumen final	50	Elongación final	= 72 °C / 5 min

El amplicón esperado (3042 bp) está construido de la siguiente manera:

5' sitio *Bam*HI – CCATGG....EFTUD1 – sitio TEV – 6 Histidinas – TAA – sitio *Not*I 3'

5.2.2.3 Ligación y transformación bacteriana

El fragmento de PCR con la secuencia antes mencionada y el plásmido pCDNA3.1+ fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I para generar los extremos cohesivos

correspondientes. El plásmido se purificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% para su posterior extracción y purificación con el QIAGel extracción kit (QIAGEN). El producto de la doble digestión de la PCR se purificó con el PCR purification kit (QIAGEN). Posteriormente se realizó la reacción de ligación entre el inserto y el plásmido usando una relación 1:2 (inserto:vector) con la enzima ligasa T4 (NEB) a una temperatura de 4 °C durante 18 horas. Paralelamente también se realizó una reacción de ligación control en la que no se adicionó inserto para discriminar el trasfondo debido al plásmido no digerido. El producto de la ligación y el control sin inserto se transformaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.1.2.3. Las transformantes se analizaron mediante la extracción de plásmido con la técnica de lisis alcalina y el subsecuente escrutinio por patrón de restricción de las posibles clonas positivas con la enzima *HindIII*. Finalmente las posibles clonas positivas se mandaron a secuenciar para corroborar la construcción.

5.2.3 Transfección transitoria de células adherentes AD-293 con el vector de expresión pCDNA3.1-EFTUD1

La transfección consiste en la introducción no viral de DNA plasmídico en células eucariontes (22). Cuando las células toman el DNA lo expresan durante un periodo de tiempo corto ya que eventualmente el DNA se pierde de la población, ya sea por acción de nucleasas o diluido por la división celular, a este proceso se le conoce como expresión transitoria. En cambio si el DNA se integra al cromosoma o se mantiene como episoma la expresión se denomina estable (23). Existen varios métodos de transfección que se pueden clasificar como físicos (electroporación, microinyección directa) y químicos (liposomas, co-precipitación con fosfato de calcio). En este trabajo de investigación se probaron dos métodos químicos de transfección: 1) co-precipitación con fosfato de calcio y 2) transfección mediada por liposomas catiónicos.

5.2.3.1 Mantenimiento de la línea celular AD-293

AD-293 es una línea celular derivada de células HEK293 cuya principal diferencia es tener un aumento en la capacidad de adherencia. La línea celular HEK293 son células

embrionarias de riñón transformadas por fragmentos de DNA de adenovirus tipo 5 (24). Estas células pueden ser transfectadas eficientemente con fosfato de calcio (25).

Las células AD-293 se cultivaron en cajas Falcon en medio DMEM suplementado. Los pasajes posteriores o subcultivos de estas células se hicieron manteniendo una confluencia menor a 80% para evitar pérdida del fenotipo de adherencia. Los pasajes se realizaron mediante la tripsinización de las células, es decir, se succionó el medio dejando expuesta la monocapa de células, para después aplicar 5 ml de una solución de tripsina directamente a las células adheridas a la caja falcon durante 2 min a 37 °C. La digestión con tripsina permite romper la matriz de conexiones entre las células. Pasado los 2 minutos de incubación se agregaron inmediatamente 5 ml de medio DMEM suplementado para inactivar la tripsina y así evitar daño o muerte celular. La suspensión celular se centrifugó por 5 min a 3,000 rpm, para después descartar el sobrenadante. El botón de células se resuspendió en medio DMEM nuevo donde una quinta parte corresponde a las células de trabajo que se incuban a 37 °C en una incubadora con 5% CO₂ para su propagación y el resto se destina a la preparación de stocks de AD-293 en nitrógeno líquido para su preservación mediante un protocolo usual de congelación de células de mamífero (26).

5.2.3.2 Transfección de células AD-293 con fosfato de calcio

La co-precipitación de DNA con fosfato de calcio fue desarrollada por Graham y van der Eb y consiste en la adición controlada de cloruro de calcio a DNA disuelto en una solución salina amortiguada con fosfatos. La adición controlada de CaCl₂ genera la formación de un precipitado el cual se dispersa sobre las células cultivadas. Se cree que la densidad catiónica de este precipitado promueve su entrada a las células por medio de endocitosis o fagocitosis. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto con que se lleva a cabo este proceso (27). En células en proliferación, el DNA puede entrar subsecuentemente al núcleo cuando la envoltura nuclear se rompe durante la mitosis (28).

5.2.3.2.1 Determinación de la eficiencia de transfección con el protocolo con fosfato de calcio

El precipitado DNA-fosfato es muy inestable y por ende susceptible a pequeños cambios de pH, temperatura, pureza y concentración de reactivos (29). Por lo que se optó por estandarizar el protocolo de transfección para encontrar el máximo de eficiencia con los reactivos y equipos que se cuenta tomando como base el protocolo de transfección descrito por Ausubel y Frederick (26). La eficiencia de la transfección se evaluó mediante el conteo directo de células transfectadas con el plásmido pEGFP-N1, el cual codifica a la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein por su siglas en inglés) y que ocasiona que las células se observen color verde con un microscopio de fluorescencia. Las células transfectadas se observaron con un microscopio invertido (Zeiss). El vector pEGFP-N1 es un vector que contiene el gen EGFP bajo el control del promotor CMV IE y codifica a una variante de la proteína GFP que ha sido optimizada para una mayor intensidad de fluorescencia (Excitación max = 488 nm; Emisión max = 507 nm) y una mayor expresión en células de mamífero. La alta expresión es debida a la optimización de la secuencia para traducción en eucariontes y la conversión de la secuencia que acompaña al codón de inicio a una secuencia consenso Kozak (30). El plásmido pEGFP-N1 fue donado por el Doctor Humberto Gutiérrez del Instituto de Fisiología celular de la UNAM, ya purificado con el kit QIAGEN maxi prep.

5.2.3.2.2 Metodología de transfección de células eucariontes con cloruro de calcio

Durante la manipulación de las células de mamífero se realizaron los siguientes preparativos para asegurar que el área de trabajo estuviera estéril: encender la campana de flujo laminar 15 minutos antes cada sesión de trabajo, limpiar el área de trabajo con alcohol al 70 % y aplicar luz UV durante 5 min. Las variables que se decidió probar por su relevancia en la formación del co-precipitado fueron las concentraciones de cloruro de calcio y DNA. Además, se probó las condiciones reportadas en tres artículos que refieren una alta eficiencia de transfección. Primeramente se determinó el efecto de la concentración de cloruro de calcio en la eficiencia de la transfección. En la Tabla 6 se muestran las diferentes cantidades de cloruro de calcio adicionadas a la mezcla de reacción

para la formación del complejo peGFP(N1)-fosfato de calcio. Determinada la concentración de cloruro de calcio que presenta mayor eficiencia de transfección se prosiguió a la evaluación del efecto de la concentración del plásmido pEGFP-N1 (Tabla 7). A continuación se enlistan los pasos del protocolo base de transfección, donde se describe la preparación de dos soluciones, una de calcio y otra de fosfatos-DNA por separado. La mezcla de estas disoluciones debe ser controlada y gradual.

- Un día antes de la transfección se recolectaron las células en fase exponencial de crecimiento (subconfluentes) y se subcultivaron en platos para cultivo de tejidos de 24 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo y se incubaron por 24 horas a 37 °C y 5-7% CO₂. El conteo celular se realizó con una cámara de Neubauer usando los 4 cuadrantes externos. Al día siguiente se cambió el medio por 1 ml de medio DMEM suplementado nuevo una hora antes de la transfección. La preparación del microprecipitado de DNA-fosfato de calcio se realizó en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente.
- Mezclar el DNA que se encuentra disuelto en buffer 0.1X TE con 50 µL de buffer 2XHBS. Agitar con vortex.
- Agregar lentamente con una micropipeta la solución de 2.4 M CaCl₂. Volumen final 100µL.
- Mezclar cuidadosamente durante 30 segundos por inversión. Se consideraron diferentes formas de mezclar los ingredientes: agitación constante en la adición de DNA seguido de ligera agitación con vórtex.
- Incubar la muestra por 20-30 min a temperatura ambiente. También se probó cambiar el tiempo de incubación a 1 min (31).
- Transferir la suspensión de fosfato de calcio-DNA sobre el medio con la monocapa de células (cantidad 1:10).
- Incubar las células por 16-24 h, remover el medio y el precipitado por aspiración. Lavar la monocapa de células con PBS y agregar medio de crecimiento precalentado.
- Incubar por 24-60 h.
- Observar las células por microscopía de fluorescencia.

Tabla 6. Reactivos utilizados para evaluar el efecto de la concentración de cloruro de calcio en la eficiencia de la transfección.

Muestra	fosfatos [mM]	CaCl ₂ [mM]	pEGFP [μg]	Volumen Total [μL]	DMEM(□L)
Control negativo	0.75	-	2	100	900
100	0.75	100	2	100	900
150	0.75	150	2	100	900
300	0.75	300	2	100	900
450	0.75	450	2	100	900

Cantidades ocupadas para pozos de 2 cm² de área superficial y con una densidad celular de 1x10⁴ células/pozo.

Tabla 7. Reactivos utilizados para evaluar el efecto de la cantidad de DNA plasmídico en la eficiencia de la transfección.

Muestra	fosfatos [mM]	CaCl ₂ [mM]	pEGFP [μg]	Volumen Total [μL]	DMEM(μL)
Control -	0.75	150	-	100	900
1.25B	0.75	150	1.25	100	900
2B	0.75	150	2	100	900
4B	0.75	150	4	100	900
Flamington (32)	0.75	150	1.1	100	900
Jordan (31)	0.75	125	1.25	100	900
Meissner (33)	0.75	125	2.5	100	900

Cantidades ocupadas para pozos de 2 cm² de área superficial y con una densidad celular de 1x10⁴ células/pozo.

5.2.4 Protocolo de transfección de células AD-293 mediada por liposomas catiónicos

La transfección mediada por liposomas catiónicos es una técnica simple que no requiere de equipo especializado y muestra una alta reproducibilidad. Consiste en la formación de complejos estables entre agregados lipídicos policatiónicos y DNA exógeno. El complejo macromolecular interactúa con las células permitiendo la absorción e ingreso del DNA

exógeno. De igual manera que en la transfección con calcio, se cree que el ingreso de DNA se lleva a cabo por endocitosis y es liberado en el citosol (34).

Se realizó la co-transfección de células AD-293 en pozos de 3.5 cm de diámetro (cajas con 6 pozos) utilizando el reactivo lipofectamina Reagent-plus (Invitrogen) con los plásmidos pEGFP-N1 y pcDNA3.1-EFTUD1 usando 500 ng y 1.5 µg respectivamente por pozo. Se subcultivó las células en platos de 3.5 cm un día antes de la transfección con una densidad de 2×10^5 células/pozo. El protocolo que se llevó a cabo es el estipulado por el kit de transfección. Las células se dejaron recuperar 48 horas y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Finalmente, las células se rasparon con un gendarme, se recuperaron, se resuspendieron en 25 µL de buffer de ruptura y se lisaron por sonicación (Sonicador Lab-Line instruments). El lisado se centrifugó a 12,500 rpm por 15 min/10 °C para obtener el extracto crudo. El extracto crudo se utilizó sin purificación alguna en los ensayos de Western blot bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 5.1.7. Para la determinación de la concentración de proteína total se ocupó el método de Lowry usando una disolución estándar de seroalbúmina bovina para la curva patrón.

6 Resultados

6.1 Resultados del ensayo de fosforilación en levadura. Determinación de la fosforilación en Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 expresadas en *S. cerevisiae*

6.1.1 Construcción del vector de expresión EFL-1 S430A

6.1.1.1 PCR inversa

Se probaron temperaturas de 60 °C y 65 °C para la hibridación de los oligonucleótidos usados en la PCR. En ambos casos se obtuvo un amplicón de aproximadamente 10,000 pb que compara adecuadamente con el producto esperado de 9,899 pb (Figura 12). Lo anterior sugiere que la PCR fue exitosa por lo que se prosiguió con la transformación en bacteria de ambos productos de PCR por el método de choque térmico descrito en la sección 5.1.2.3.

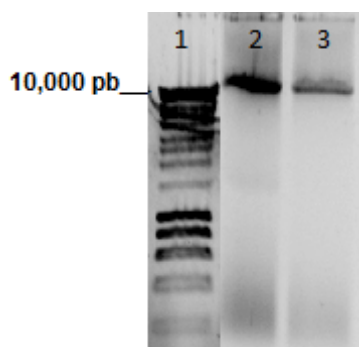


Figura 12. Gel de agarosa mostrando el producto de la PCR inversa para introducir la mutación S430A en el gen de *EFL1*. 1) Marcador (Hyperladder 1 Bioline). 2) Amplicón obtenido utilizando una temperatura de hibridación 60 °C. 3) Amplicón obtenido utilizando una temperatura de hibridación 65 °C.

6.1.1.2 Selección de transformantes *pRS426-Efl1 S430A*

Se obtuvieron dos clones de la transformación con el producto de la PCR inversa usando como temperatura de hibridación 60 °C, mientras que en la transformación de la PCR obtenida usando una temperatura de hibridación de 65 °C no se desarrollaron colonias. Se aisló DNA plasmídico de las dos clonas obtenidas y se verificó la correcta presencia del inserto mediante patrón de restricción con *Bam*HI. El resultado demostró que ambas clonas tenían el correcto patrón de restricción (Figura 13). La subsecuente secuenciación

corroboró que efectivamente se obtuvo la construcción deseada con la mutación de la serina 430 por alanina.

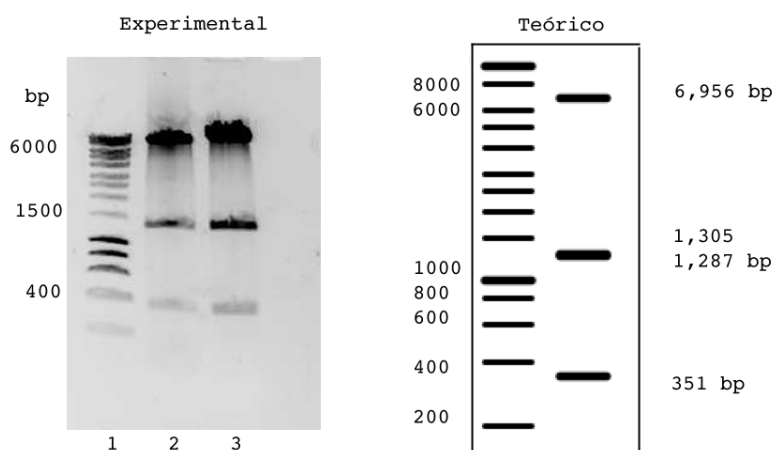


Figura 13. Patrón de restricción de las posibles clonas pRS426-Efl1 S430A con *Bam*HI.

6.1.2 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes

Las construcciones correspondientes para la sobreexpresión de EFTUD1, EFL1 y EFL1-S430A se transformaron en la cepa de *S. cerevisiae* BCY123. En los tres casos se obtuvo una eficiencia de transformación muy alta (>300 UFC), ya que el crecimiento de colonias en el medio SD-URA indica la adquisición del plásmido.

Se procedió a expresar las tres proteínas en estudio siguiendo el protocolo descrito en la metodología correspondiente. Se realizó la purificación de EFL1 S430A y EFTUD1 mediante una cromatografía de afinidad a Ni²⁺. La purificación de EFL1 fue hecha por el alumno de Doctorado Axel Luviano Jardón. El proceso de purificación se monitoreó mediante una electroforesis SDS-PAGE. La Figura 14 ejemplifica la purificación de la proteína EFTUD1 en la que se puede apreciar que con una sola etapa de purificación se logra un enriquecimiento superior al 80%. Se observa también la presencia de bandas de menor peso molecular que sugieren la posible presencia de productos de degradación.

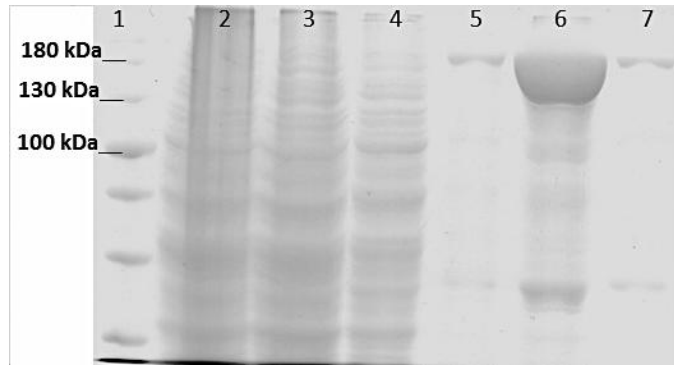


Figura 14. Purificación de la proteína EFTUD1 recombinante mediante una cromatografía de afinidad a Ni^{2+} . 1) Marcador de peso molecular (Goldbio BlueStain3), 2) Extracto crudo, 3) Fracción no retenida por la columna de Ni^{2+} , 4) Lavado con el buffer de lisis, 5-7) Fracciones eluidas de la columna de Níquel.

Las proteínas Efl1 y Efl1 S430A se purificaron siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para EFTUD1. La Figura 15 muestra las proteínas purificadas que se usaron para los análisis posteriores de western blot y difracción circular.

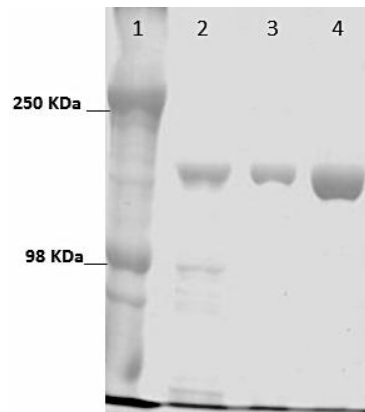


Figura 15. Proteínas recombinantes purificadas. 1) Marcador de peso molecular, 2) EFTUD1, 3) Efl1, 4) Efl1 S430A.

6.1.3 Caracterización de las proteínas recombinantes expresadas en levadura

6.1.3.1 Determinación del rendimiento proteico

Para determinar la cantidad de proteína obtenida se cuantificó la absorbancia a 280 nm. Se asumió que la absorbancia a 280 nm correspondía a la proteína recombinante y que la contribución del resto de las proteínas presentes en la muestra es despreciable pues están en una proporción mucho menor. El coeficiente de extinción molar teórico se calculó con el programa ProtParam el cual considera la contribución de los triptófanos, tirosinas y cistinas presentes en la proteína. Las proteínas Efl1 y la mutante S430A se lograron expresar de forma recombinante en grandes cantidades, lo cual era de esperarse para una proteína no tóxica propia de levadura. En comparación, el rendimiento de la proteína humana EFTUD1 fue 5 veces menor que el obtenido para Efl1 (Tabla 8).

Tabla 8. Rendimiento obtenido de las proteínas recombinantes en estudio.

Proteína recombinante	Masa molecular (Da)	Coefficiente de extinción molar ^a [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Rendimiento [mg proteína/L cultivo]
EFTUD1	127,997	105,770	2.7
Efl1	127,031	83,770	10
Efl1 S430A	127,015	83,770	12

^a Coeficiente de extinción molar considerando que todos los residuos de cisteína están reducidos.

6.1.3.2 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD) es una técnica espectroscópica que mide la diferencia en la absorción de luz circularmente polarizada a la izquierda y la absorción de luz circularmente polarizada a la derecha. Para que una muestra tenga señal de dicroísmo circular debe ser ópticamente activa. Las proteínas son moléculas quirales cuyos espectro de dicroísmo circular proveen información valiosa acerca de su contenido de estructura secundaria, en particular de su contenido de hélices- α . El espectro de CD de una proteína puede considerarse como la contribución lineal de los espectros de dicroísmo de cada tipo de estructura secundaria que conforman a la proteína. Las hélices- α muestran dos mínimos

negativos a 208 y 222 nm, mientras que la señal característica de las hojas- β es un mínimo negativo a 218 nm. Una proteína que carece de estructura sólo presenta una señal negativa a 200 nm. Los espectros en el UV lejano de las proteínas Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 muestran un mínimo negativo muy marcado a 208 nm, otro mínimo negativo menos prominente a 222 nm y una señal positiva a 200 nm. Lo anterior indica la presencia de ambos tipos de estructura secundaria, α -hélices y hojas- β , donde la señal a 222 nm enmascara a la de 218 resultando en una meseta más que un mínimo característico (Figura 16). La deconvolución de los espectros de dicroísmo circular sugiere que efectivamente estas proteínas contienen una mezcla de α -hélices y hojas- β . La mutación S430A en Efl1 no alteró la conformación de la proteína ya que los espectros se superponen adecuadamente y la deconvolución predice un contenido de estructura secundaria casi igual. Sin embargo, el mínimo a 208 nm es menos pronunciado en la mutante S430A, lo cual puede sugerir la destrucción de ciertas estructuras secundarias. En lo que respecta a EFTUD1 su espectro de dicroísmo circular también parece corresponder a una proteína con una mezcla de α -hélices y hojas- β . Los resultados del contenido de estructura secundaria resultantes de la deconvolución de los espectros correspondientes se presentan en la Tabla 9.

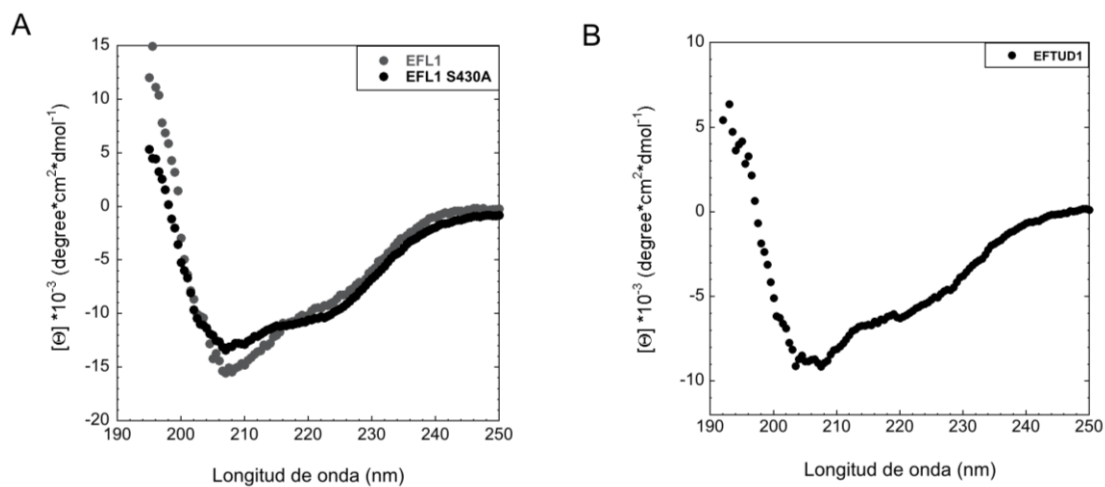


Figura 16. Espectros de Dicroísmo circular de A) Efl1 y Efl1S430A y, B) EFTUD1.

Tabla 9. Deconvolución de los espectros de Dicroísmo circular de las proteínas en estudio para la estimación de su contenido de estructura secundaria.

Estructura secundaria	Proteína		
	Efl1	Efl1 S430A	EFTUD1
Hélice α (%)	37.3	35.3	34
Hoja β (%)	15.5	17.5	18
Giro β (%)	16.5	14.5	17
Hebra al azar	27.6	25	29

6.1.3.3 Determinación de los sitios de fosforilación de las proteínas recombinantes

6.1.3.3.1 Western blot

El estado de fosforilación de las proteínas en estudio se determinó mediante western blot. También se corroboró la presencia de la cola de histidinas adicionada durante la clonación en las proteínas en estudio. En la Tabla 10 se observa que existe fosforilación en residuos de serina y treonina en las tres proteínas evaluadas, pero no en los residuos de tirosina, o al menos no se detectaron, por este método, en ninguna de las tres proteínas evaluadas. El anticuerpo anti-fosfotirosina es usado habitualmente en el laboratorio por lo que se consideró que es funcional. Además de que se realizó este mismo análisis empleando otro lote de anticuerpo obteniéndose el mismo resultado.

Tabla 10. Determinación de fosforilación de Efl1, Efl1 S430A y EFTUD1 por Western Blot.

Tratamiento	Efl1S430A	Efl1	EFTUD1
1. Azul de Coomassie			
2. Western blot anti poli-Histidinas			
3. Western blot anti-fosfoserina			
4. Western blot anti-fosfotreonina			
5. Western blot anti-fosfotirosina			

6.1.3.3.2 Espectrometría de masas

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de los fragmentos tripticos de las diferentes proteínas recombinantes sobreexpresadas en levadura arrojó datos muy interesantes (Tabla 11). Evidenció la fosforilación de Efl1 en más de un residuo de serina, treonina y tirosina, pero no en el de la serina 430 reportada en la literatura. La mutante Efl1 S430A presenta un diferente patrón de fosforilación con respecto a la especie nativa (Efl1) ya que no se encontraron la mismas fosforilaciones en ambos casos. También, EFTUD1 recombinante presenta fosforilaciones cuando se produce en el sistema de levadura aunque no se puede precisar si éstas son fisiológicamente relevantes o no. Por este método se determinó la fosforilación de residuos de tirosina en las tres proteínas recombinantes; evento que no se observó mediante Western blot. Fosforilaciones en sitio TEV

Tabla 11. Sitios de fosforilación determinados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Proteína	Residuo		
	Serina	Treonina	Tirosina
Efl1	S36, S76, S185, S525, S769, S866.	T137, T345, T386, T621, T887, T954, T982.	Y223, Y306.
Efl1 S430A	S36, S76, S185, S523, S769, S866.	T137, T345, T386, T722, T982.	Y223, Y306, Y589, Y624.
EFTUD1	S41, S76, S196, S752.	T321, T407, T1044.	Y564, Y954.

6.2 Determinación de la fosforilación de EFTUD1 en células de mamífero AD-293

6.2.1 Vector de expresión pCDNA3.1-EFTUD1

La Figura 17 muestra los diferentes elementos de los que consta el plásmido pCDNA3.1-EFTUD1 que se construyó para la sobreexpresión de la proteína EFTUD1 en células de mamífero.

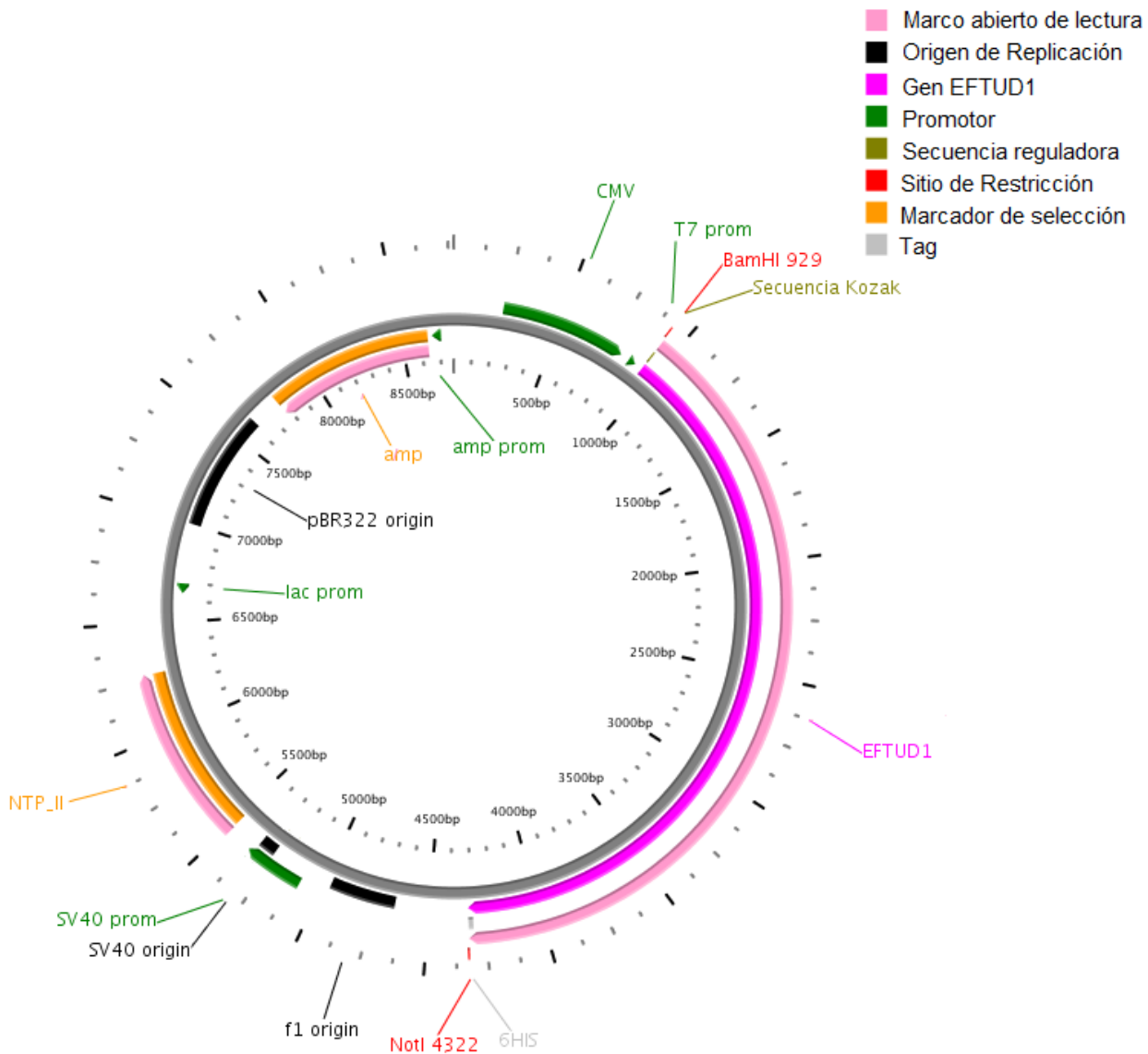


Figura 17. Esquema del plásmido de expresión de EFTUD1 (pCDNA3.1-EFTUD1) en células de mamíferos. Las barras sólidas representan las diferentes secuencias funcionales.

6.2.1.1 Clonación del gen *EFTUD1* en el vector *pCDNA3.1+*

El gen *EFTUD1* se amplificó por PCR usando los oligos EFTUD-pcDNA y HisNot. El gel de agarosa mostró un amplicón de tamaño entre 3,000 y 4,000 pares de bases, lo que corresponde al producto esperado de 3,402 pb (Figura 18).

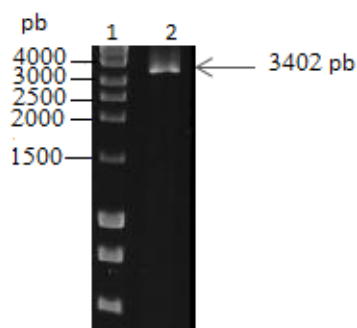


Figura 18. Amplificación por PCR del gen *EFTUD1*. Electroforesis en gel de Agarosa 1 %. 1) Marcador hyper ladder (bioline), 2) Producto de la PCR.

El inserto y el vector *pCDNA3.1* fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I para después unir los extremos cohesivos entre el inserto y el vector con la ligasa T4 (Fermentas). El producto de la ligación se transformó en células competentes *DH5 α* obteniéndose 12 posibles clonas que se analizaron mediante la migración electroforética de sus plásmidos en un gel de agarosa.

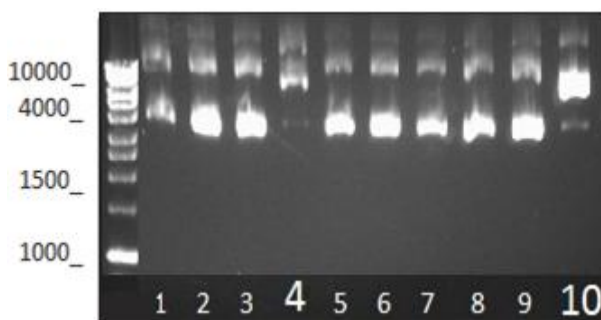


Figura 19. Escrutinio, mediante cambio en la migración electroforética, de las posibles clonas que corresponden al vector *pCDNA3.1+* con gen *EFTUD1*. El carril uno corresponde al plásmido *PCDNA3.1+* vacío. Los Carriles 4 y 10 corresponden a posibles clonas.

El escrutinio de las clonas determinó dos posibles clonas positivas. Las clonas 4 y 10 presentan una migración más lenta en el gel, lo cual probablemente se deba a que contiene el inserto que los hace más grande y por ende migran más lento que el plásmido pCDNA3.1+ vacío (Figura 19). Para efectivamente verificar la presencia del inserto en estas dos clonas se realizó una digestión con *Hind*III que corta tanto en la secuencia del inserto y como en el plásmido pCDNA3.1+. El patrón de restricción experimental de la clona 4 generó 5 fragmentos que concuerdan con lo esperado según el patrón de restricción teórico (Figura 20). Finalmente, esta clona se secuenció para corroborar la correcta construcción.

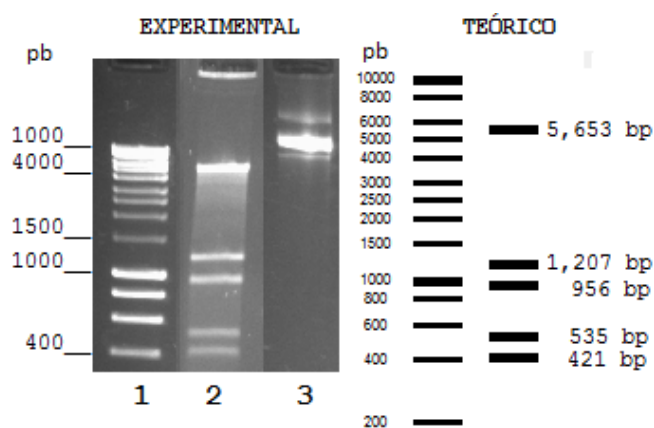


Figura 20. Patrón de restricción experimental y teórico de pCDNA3.1-EFTUD1 con la enzima *Hind*III. 1) Marcador hyper ladder (bioline), 2) Clona 4 digerida, 3) Clona 4 sin digerir.

6.2.2 Determinación de la eficiencia de la transfección del plásmido peGFP en células AD-293 mediante la co-precipitación con fosfato de calcio

Con el fin de estandarizar la transfección se probaron diez condiciones diferentes en las que se variaron las concentraciones tanto de cloruro de calcio así como de un plásmido reportero (pEGFP-N1) que codifica a la proteína verde fluorescente. También se evaluaron diferentes tiempos y formas de mezclado para la formación del co-precipitado DNA-fosfato de calcio. Las células transfectadas con plásmido peGFP-N1 se inspeccionaron visualmente mediante el monitoreo de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente en un microscopio. Para determinar el número total de células vivas se tiñeron con el reactivo

Hoechst. En todos los ensayo de transfección con calcio se encontró un alto índice de muerte celular debido al tratamiento para la transfección. El máximo de eficiencia de transfección fue de 14.5% (Figura 21) para el ensayo 2B (Tabla 7), es decir aquel en el que se usaron 2 μ g de plásmido. El resto de las condiciones de transfección ensayadas en la Tabla 7 tuvieron una eficiencia de transfección aún menor por lo que se descartaron como útiles para utilizarlas en ensayos subsecuentes. Debido a lo anterior, se optó por el uso de liposomas catiónicos como método alternativo de transfección.

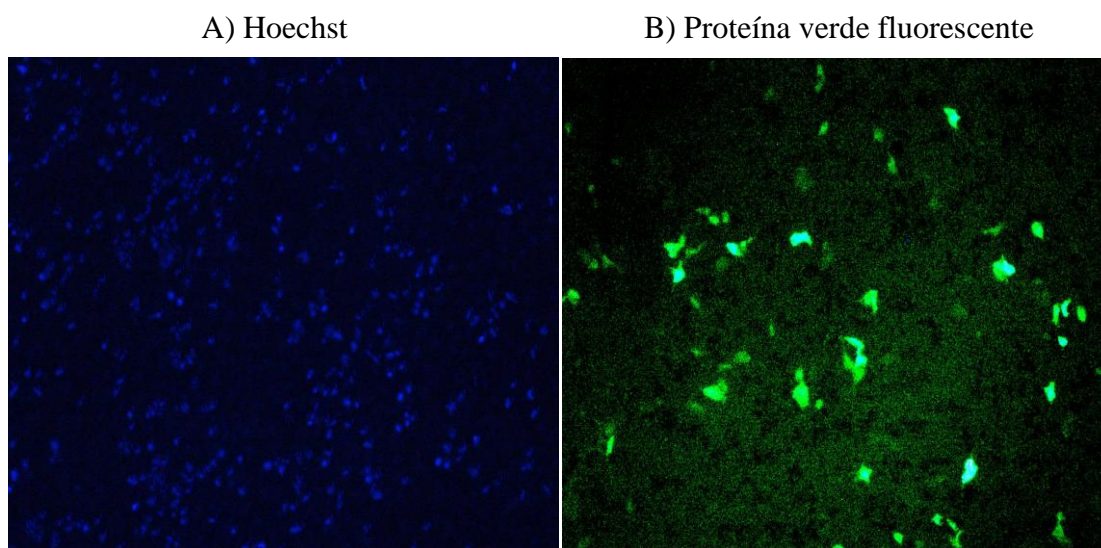


Figura 21. Microscopía de fluorescencia de las células AD-293 transfectadas con el plásmido peGFP. A) Tinción con el reactivo Hoechst para teñir los núcleos de las células vivas (azul). B) Fluorescencia de la proteína GFP.

6.2.3 Transfección de células adherentes AD-293 con el plásmido pCDNA3.1-EFTUD1 mediada por liposomas catiónicos

La co-transfección de las células AD-293 con los plásmidos pCDNA3.1-EFTUD1 y peGFP presentó una eficiencia de transfección del 74.5% (Figura 22). La eficiencia de la transfección, igual que para la transfección con fosfato de calcio, fue medida por conteo directo de células transfectadas observadas por microscopía de fluorescencia. Se asumió que aquellas células que adquirieron el plásmido peGFP también presentan el plásmido pCDNA3.1-EFTUD1 ya que en la mezcla de co-transfección el plásmido pCDNA-EFTUD1 se encontraba en una proporción 4 veces mayor que la del plásmido peGFP. Después de la

transfección con lipofectamina las células se encontraban en buen estado (adherentes y con conformación típica) y fáciles de observar al microscopio.

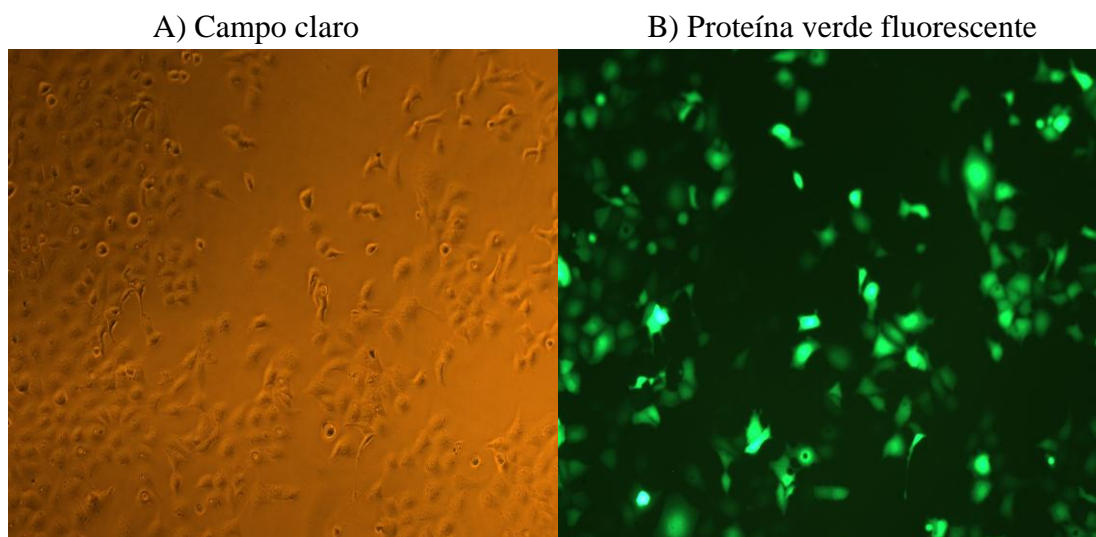


Figura 22. Microscopía de las células AD-293 co-transfectadas con los plásmidos peGFP-N1 y pCDNA3.1-EFTUD1 mediante lipofectamina. A) microscopía de campo claro de las células sometidas al tratamiento de transfección. B) fluorescencia del campo presentado en A) donde se muestran la células que expresan la proteína GFP (verde).

6.2.3.1 *Western blot*

Una vez obtenida una alta eficiencia de transfección se prosiguió a recuperar las células para su ruptura y análisis del extracto crudo. Los resultados de este ensayo inmunológico corroboraron la expresión de EFTUD1 recombinante ya que la señal del western blot contra la etiqueta de histidinas fue muy intensa (Figura 23 A). Sin embargo, no se obtuvo evidencia concluyente para aseverar que exista la fosforilación en residuos de treonina y serina en la proteína EFTUD1. En la Figura 23 panel B y C se observa la presencia de bandas que presuntamente corresponden al peso molecular esperado de la proteína de interés, sin embargo, estas mismas bandas se aprecian en el control negativo, el cual corresponde al extracto crudo de las células sometidas al mismo proceso de transfección pero sin plásmidos.

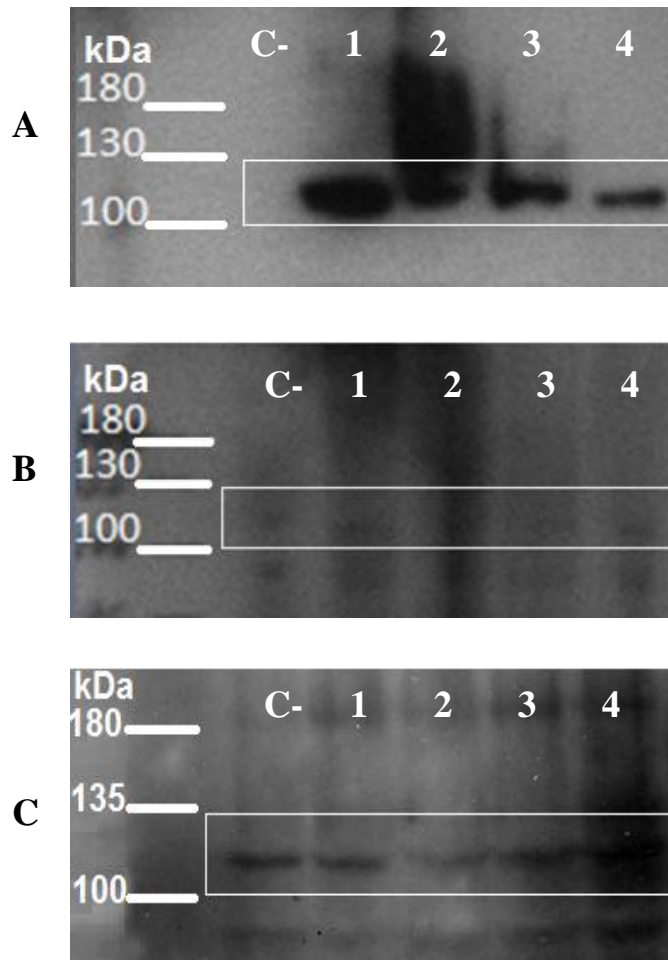


Figura 23. Determinación de la fosforilación de EFTUD1 expresada en células AD-293 mediante Western blot. A) etiqueta de poli-histidinas, B) fosfotreonina y C) fosfoserina. Carril [C-] Control negativo, extracto crudo de células sin transfectar. Carriles 1-4. Extractos crudos de cuatro muestras de células transfectadas bajo las mismas condiciones. Se aplicaron 50 μ g de proteína total por cada carril.

7 Análisis de resultados

El estado de fosforilación de una proteína es transitorio, generalmente en estequiometría baja y dependiente de una gran variedad de procesos bioquímicos. Es decir, solo una fracción de la concentración total de la proteína puede estar fosforilada en un sitio dado y por un tiempo determinado. En este trabajo estudiamos las posibles fosforilación(es) en la familia de GTPasas ribosomales Efl1/EFTUD1 mediante ensayos inmunológicos tipo Western blot y espectrometría de masas MALDI-TOF. EFTUD1 y su ortólogo de levadura Efl1 se expresan en cantidades muy bajas en estado estacionario, por lo que el primer objetivo que se cumplió fue la sobreexpresión de estas proteínas en sus correspondientes sistemas nativos. En el laboratorio ya se tenían los vectores para sobreexpresar Efl1 y EFTUD1 en levadura, así como también los protocolos de sobreexpresión y purificación para la proteína Efl1. Por lo que se aplicó el mismo procedimiento para obtener EFTUD1 y la mutante Efl1 S430A. Las cantidades obtenidas significan un buen rendimiento y una pureza que nos permite caracterizar estas proteínas bioquímica y biofísicamente.

El interés de construir la mutante Efl1 S430A se debió a la posibilidad de que el residuo de serina 430 en Efl1 podría ser el único sitio de fosforilación en esta proteína. Por lo que una mutación en este sitio por un residuo no fosforilable, no sería detectado por el anticuerpo anti-fosfoserina. Sin embargo, los resultados obtenidos con el Western blot indican que existe fosforilación de residuos de serina en ambas proteínas, la mutante y la nativa. Lo anterior puede deberse a que la mutación ocasionó que quedara expuesto otro residuo de serina fosforilable y/o que Efl1 contiene más de un sitio de fosforilación en serina. Los estudios de espectrometría de masas corroboraron que efectivamente existe la fosforilación de otros residuos de serina. El mismo fenómeno se observó para la fosforilación en residuos de treonina concluyéndose que existe más de un residuo fosforilado. El ensayo con el anticuerpo anti-fosfotirosina no reveló fosforilación en los residuos de tirosina para ninguna de las tres proteína estudiadas. Sin embargo, este resultado puede que corresponda a un falso negativo ya que con los estudios de espectrometría de masas si se encontró este tipo de modificaciones. La imposibilidad de detectarla mediante Western blot se puede deber a que secuencias aledañas a alguna de las

tirosinas fosforiladas no correspondan al epítipo del anticuerpo usado o que los niveles de fosforilación estén por debajo de los niveles de detección de la técnica.

Para determinar si existen variaciones en la conformación de la proteína Efl1 S430A con respecto a la proteína Efl1 silvestre que afectaran el patrón de fosforilación, se obtuvieron los espectros de microísmo circular. Los espectros mostraron que el contenido de estructura secundaria de Efl1 y la mutante S430A no difiere drásticamente (Tabla 9). Sin embargo, pueden existir cambios en la estructura terciaria que no son detectados por esta técnica. Si bien, los espectros son muy similares, se aprecia diferencia en la intensidad de los mínimos a 208 nm. Por lo que, las diferencias encontradas por espectrometría de masas en los patrones de fosforilación de Efl1 S430A (Tabla 11) pueden ser debidas a un cambio conformacional distinto al de la especie nativa, exponiendo sitios de fosforilación que no estaban accesibles inicialmente. Se sabe también que la fosforilación de algunas proteínas no depende únicamente de la secuencia aledaña al residuo fosforilable, sino que también es dirigida por ciertos dominios estructurales alejados de la secuencia del fosfopéptido. Por ende, el reacomodo de ciertos dominios estructurales pudiera ocasionar un cambio en los sitios de fosforilación. Otra razón para explicar las diferencias en los patrones de fosforilación entre Efl1 y Efl1 S430A puede ser una asignación errónea en la espectrometría de masas de los fragmentos resultantes de la digestión y/o sus sitios de fosforilación. Así, en un fosfopéptido con más de un residuo fosforilable puede haber una incorrecta asignación del residuo fosforilado. Esto explicaría también el por qué se contraponen los resultados del ensayo inmunológico anti-fosfotirosina y el obtenido con espectrometría de masas. Experimentos a futuro, basados en la purificación de péptidos fosforilados, nos permitirán esclarecer estos resultados.

La proteína EFTUD1 recombinante sobre-expresada en levadura fue fosforilada en 10 residuos, si consideramos correctos los datos arrojados por espectrometría de masas. Estas fosforilaciones no necesariamente pueden ocurrir en células humanas, sin embargo la levadura, tiene ortólogos de la mayoría de las proteínas cinasas humanas, incluyendo a la

Proteína cinasa A (PKA), Proteína cinasa C (PKC), Proteína cinasa activada con 5'-AMP (AMPK), cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), etc (35) por lo que estas fosforilaciones pueden ser un reflejo de lo que ocurre en células humanas.

Las fosforilaciones determinados por espectrometría de masas se analizaron con la herramienta de predicción de cinasas Networkin. El Apéndice muestra un resumen de los resultados obtenidos para la predicción de las posibles cinasas responsables de las fosforilaciones en residuos de serina encontradas por espectrometría de masas en Efl1. Estas predicciones por si solas están muy lejos de ser resultados contundentes, ya que suelen ser ambiguas y deben corroborarse experimentalmente. Es decir, no siempre la cinasa que presenta mayor probabilidad es la que realiza la fosforilación. Sin embargo, si se complementaran con información que nos permita correlacionar la cinasa con la proteína blanco pueden ser la base para dirigir experimentos posteriores.

7.1 Fosforilación de EFTUD1 en células humanas

Primeramente se estandarizó el proceso de transfección con un plásmido reportero (peGFP). La técnica de transfección con co-precipitación DNA-fosfato de calcio mostró una eficiencia muy baja (14%). Esta baja tasa de transfección pudo ocurrir debido a la calidad de los reactivos como: pureza del cloruro de calcio y del fosfato de sodio, contaminación con RNA, estado de las células, contaminación bacteriana o pH del tampón de fosfatos. De estas posibles fuentes de error, el pH es el que probablemente resulta crítico en la transfección, pues cambios de tan sólo 0.1 de unidad reducen drásticamente la formación del co-precipitado y llevan eventualmente a la muerte celular. Finalmente, la sobre-expresión de EFTUD1 en células de mamífero se logró mediante el uso de liposomas catiónicos que permitió alcanzar niveles de transfección del 74%. Este valor es menor que el reportado para células HEK 293 ($\geq 99\%$), sin embargo es un valor por demás aceptable para los estudios realizados. El haber obtenido un valor de transfección de 74% pudo deberse al pasaje en el que se encontraban las células y a su densidad ya que se sabe que estos factores afectan directamente al proceso. El uso de una densidad celular menor y/o

células con menor número de pasajes (50 aprox.) podría aumentar el número de células transfectadas.

El ensayo de identificación de la proteína EFTUD1 fue positivo puesto que se detectó la cola de histidinas en una proteína de un peso molecular entre 100 y 130 kDa, que corresponde adecuadamente con el peso esperado de 128 kDa de la proteína EFTUD1 recombinante. Sin embargo, el monitoreo de la fosforilación por Western blot en residuos de serina y treonina resultó ambiguo y no se pudo asegurar la existencia de este tipo de modificaciones en EFTUD1. El Western blot mostró la existencia de una banda a la altura del tamaño esperado, que también se encontró en el control negativo, por lo que esta banda no puede corresponder a EFTUD1 recombinante. Ensayos a futuro se enfocarán en aumentar la eficiencia de transfección, aunados a un paso de purificación por afinidad para obtener mayor cantidad de la proteína de interés y así poder evaluar su fosforilación mediante Western blot y espectrometría de masas. Un aspecto que pudiera impactar positivamente en la cantidad de proteína EFTUD1 obtenida es incrementar el inicio de la traducción. En el diseño de la construcción del plásmido pCDNA3.1-EFTUD1 se consideró la adición de una secuencia consenso Kozak para favorecer un inicio de la traducción adecuado. Para ello en las posiciones +4 y -1 se adicionó una guanina y una citosina respectivamente. Sin embargo, en la posición -3 se colocó una timina siendo adenina ó guanina los nucleótidos que se presentan con mayor frecuencia en esta posición. Es posible que la transversión de timina a adenina en la posición -3 aumente los niveles de expresión de EFTUD1 recombinante.

8 Conclusiones

- La proteína Efl1 es modificada postraduccionalmente *in vivo* por fosforilaciones en residuos de serina y treonina.
- Existe más de un sitio de fosforilación en serinas y treoninas en Efl1.
- Las fosforilaciones en Efl1 se encuentran distribuidas en todas las regiones de la proteína.
- La proteína EFTUD1, expresada en un sistema heterólogo, es fosforilada en residuos de serina y treonina.
- La transfección de líneas celulares de mamífero con liposomas catiónicos es más eficiente que la co-precipitación con cloruro de calcio.
- El plásmido pCDNA3.1-EFTUD1 sirve como vector de expresión de EFTUD1 en células AD-293.

9 Apéndice

Apéndice 1. Predicción de las posibles cinasas involucradas en la fosforilación de los residuos de serina de Efl1 con el programa Networkin beta (http://networkin.info/version_2_0/newPrediction.php).

Residuo	Familia	Probabilidad	Gen ID de la cinasa	Descripción de Cinasa	Secuencia del fosfopéptido
S36	AMPK	0.0615	YDR477W SNF1	Ser/Thr cinasa activada por AMP. Presente en complejo con Snf4p y miembros de la familia Sip1p/Sip2p/Gal83p. Requerida para la transcripción de genes de represión de glucosa, termotolerancia, esporulación y biogénesis de peroxisomas (1).	GKTSLsDSLlA
S36	CK2	0.0607	YOR061W CKA2	Subunidad catalítica α de caseína cinasa 2. Ser/Thr cinasa que participa en el crecimiento y proliferación. La holoenzima contiene a las subunidades CKA1, CKB1 y CKB2 (2).	GKTSLsDSLlA
S36	CK2	0.0607	YIL035C CKA1	Ver (2)	GKTSLsDSLlA
S36	MAPK3 MAPK1 MAPK7 NLK	0.0679	YBL016W FUS3	Proteína cinasa activada por Mitógeno que interviene en la respuesta inducida por feromonas en la reproducción sexual. Activada por fosforilación de la cinasa Ste7p.	GKTSLsDSLlA
S36	MAPK3 MAPK1 MAPK7 NLK	0.0679	YGR040W KSS1	Proteína cinasa activada por Mitogeno (MAPK) involucrada en la vía de transducción de señales que controlan el crecimiento filamentoso y la respuesta a feromonas.	GKTSLsDSLlA
S76	GSK3	0.0886	YMR139W RIM11	Proteína cinasa que se requiere para la transducción de señal durante la entrada a meiosis. Promueve la formación del complejo Ime1p-Ume6p fosforilando Ime1p y Ume6p (3).	ESSAIsLYFRV
S76	CK1	0.1374	YPL204W	Proteína cinasa envuelta en la regulación de	ESSAIsLYFRV

			HRR25	diversos eventos incluyendo transporte de vesículas, expresión de genes, reparación de DNA y segregación de los cromosomas. Homologa a la caseina cinasa de mamífero 1 delta (CK1 delta).	
S76	CK1	0.1374	YHR135C YCK1	Proteína caseina cinasa unida a palmítico de la membrana plasmática isoforma 1. Comparte funciones redundantes con Yck2p en morfogénesis, ensamblaje adecuado de septina y transporte endocítico (4).	ESSAI _s LYFRV
S76	CK1	0.1374	YNL154C YCK2	Ver (4).	ESSAI _s LYFRV
S185	GSK3	0.0921	YMR139W RIM11	Ver (3)	IEQVN _s VIGSF
S523	CK2	0.6256	YOR061W CKA2	Ver (2).	EGEDD _s DSQDN
S523	CK2	0.6256	YIL035C CKA1	Ver (2)	EGEDD _s DSQDN
S525	CK2	0.2944	YOR061W CKA2	Ver (2).	EDDSD _s QDNFG
S525	CK2	0.2944	YIL035C CKA1	Ver (2)	EDDSD _s QDNFG
S769	PKC	0.1013	YBL105C PKC1	Ver (5).	NPPQN _s QLGRG
S866	PKC	0.1320	YBL105C PKC1	Ver (5).	AGFGP _s RVGCN
S866	AMPK	0.0538	YDR477W SNF1	Ver (1).	AGFGP _s RVGCN

10 Bibliografia

1. Bohinski, R. C. (1993) *Modern concepts in biochemistry*, 5th ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
2. Zemp, I., and Kutay, U. (2007) Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits, *FEBS letters* 581, 2783-2793.
3. Finch, A. J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L. F., Goyenechea, B., Menne, T. F., Gonzalez Fernandez, A., Simpson, P., D'Santos, C. S., Arends, M. J., Donadieu, J., Bellanne-Chantelot, C., Costanzo, M., Boone, C., McKenzie, A. N., Freund, S. M., and Warren, A. J. (2011) Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome, *Genes & development* 25, 917-929.
4. Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S. H., and Zhou, H. (2007) Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10364-10369.
5. Kallstrom, G., Hedges, J., and Johnson, A. (2003) The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively, *Molecular and cellular biology* 23, 4344-4355.
6. Hauryliuk, V. V. (2006) [GTPases of prokaryotic translational apparatus], *Molekuliarnaia biologii* 40, 769-783.
7. Manser, E., and Leung, T. (2002) *GTPase protocols : the Ras superfamily*, Humana Press, Totowa, N.J.
8. Karbstein, K. (2007) Role of GTPases in ribosome assembly, *Biopolymers* 87, 1-11.
9. Hauryliuk, V., Hansson, S., and Ehrenberg, M. (2008) Cofactor dependent conformational switching of GTPases, *Biophysical journal* 95, 1704-1715.
10. Raw, A. S., Coleman, D. E., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1997) Structural and biochemical characterization of the GTPgammaS-, GDP.Pi-, and GDP-bound forms of a GTPase-deficient Gly42 --> Val mutant of Galpha1, *Biochemistry* 36, 15660-15669.
11. Robinson, P. J., Sontag, J. M., Liu, J. P., Fykse, E. M., Slaughter, C., McMahon, H., and Sudhof, T. C. (1993) Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals, *Nature* 365, 163-166.
12. Hunter, T. (2000) Signaling--2000 and beyond, *Cell* 100, 113-127.
13. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th ed., W.H. Freeman, New York.
14. Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions, *Physiological reviews* 85, 1159-1204.
15. Alberts, B. (2002) *Molecular biology of the cell*, 4th ed., pp xxxiv, [1548] p., Garland Science, New York.
16. Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Boldorini, R., Pallotti, F., Viale, G., Gishizky, M. L., Draetta, G. F., and Di Fiore, P. P. (2006) Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers, *Cancer research* 66, 8147-8154.
17. Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S., and Mann, M. (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis, *Science signaling* 3, ra3.
18. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *Journal of bacteriology* 153, 163-168.

19. Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A., and Perez-Iratxeta, C. (2011) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra, *Proteins*.
20. Dalmas, B., Hunter, G. J., and Bannister, W. H. (1994) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra using artificial neural network techniques, *Biochemistry and molecular biology international* 34, 17-26.
21. Gorman, C. M., Gies, D., McCray, G., and Huang, M. (1989) The human cytomegalovirus major immediate early promoter can be trans-activated by adenovirus early proteins, *Virology* 171, 377-385.
22. Groskreutz, D., and Schenborn, E. T. (1997) Reporter systems, *Methods Mol Biol* 63, 11-30.
23. Kaufman, R. J. (1997) DNA transfection to study translational control in mammalian cells, *Methods* 11, 361-370.
24. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *The Journal of general virology* 36, 59-74.
25. Jordan, M., Kohne, C., and Wurm, F. M. (1998) Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media. Transfection and protein expression in mammalian cells, *Cytotechnology* 26, 39-47.
26. Ausubel, F. M. (1987) *Current protocols in molecular biology*, Greene Pub. Associates ;J. Wiley, order fulfillment, Brooklyn, N.Y. Media, Pa.
27. Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5, *Virology* 54, 536-539.
28. Karra, D., and Dahm, R. (2010) Transfection techniques for neuronal cells, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 6171-6177.
29. Wright, J. L., Jordan, M., and Wurm, F. M. (2003) Transfection of partially purified plasmid DNA for high level transient protein expression in HEK293-EBNA cells, *Journal of biotechnology* 102, 211-221.
30. Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells, *Journal of molecular biology* 196, 947-950.
31. Jordan, M., Schallhorn, A., and Wurm, F. M. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation, *Nucleic acids research* 24, 596-601.
32. Rodriguez, A., and Flemington, E. K. (1999) Transfection-mediated cell-cycle signaling: considerations for transient transfection-based cell-cycle studies, *Analytical biochemistry* 272, 171-181.
33. Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K., and Wurm, F. M. (2001) Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells, *Biotechnology and bioengineering* 75, 197-203.
34. McCluskie, M. J., Chu, Y., Xia, J. L., Jessee, J., Gebyehu, G., and Davis, H. L. (1998) Direct gene transfer to the respiratory tract of mice with pure plasmid and lipid-formulated DNA, *Antisense & nucleic acid drug development* 8, 401-414.
35. Brinkworth, R. I., Munn, A. L., and Kobe, B. (2006) Protein kinases associated with the yeast phosphoproteome, *BMC bioinformatics* 7, 47.