



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Expresión y purificación de proteínas
recombinantes humanas involucradas en la
biogénesis ribosomal

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

BRENDA SALGUERO SILVA

TUTORA: DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG.
INSTITUTO DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR: DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA
DE LOS MONTEROS (INVITADO)
INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Expresión y purificación de proteínas
recombinantes humanas involucradas en la
biogénesis ribosomal

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

BRENDA SALGUERO SILVA

TUTORA: DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG.
INSTITUTO DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR: DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA
DE LOS MONTEROS (INVITADO)
INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/003/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de octubre de 2012** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **SALGUERO SILVA BRENDA** con número de cuenta **95196736** con la tesis titulada **"Expresión y purificación de proteínas recombinantes humanas involucradas en la biogénesis ribosomal"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG**:

Presidente: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY
Vocal: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
Secretario: DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN
Suplente: DRA. LUISA ALVARINA ALBA LOIS
Suplente: DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de enero de 2013

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/ipp



AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos primeramente a CONACYT por la beca otorgada y al proyecto PAPIIT IN204010 “Caracterización bioquímica de la GTPasa EFTUD1 y su interacción con la proteína SBDS mutada en el Síndrome Shwachman-Diamond” por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros del Comité Tutor:

A mi tutora la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig.

A los integrantes de mi comité tutor:

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO

DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA

DE LOS MONTEROS (INVITADO)

Al Laboratorio 5 de Bioquímica del departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química lugar donde se realizó el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Dr. Antonio Peña por prestarme sus instalaciones y a Norma y Martha por facilitarme su equipo para lisar células de levadura.

A la Dra. Gloria Gutiérrez por permitirme utilizar su laboratorio.

Al Dr. Salvador Uribe por su amable atención.

A la Dra. Amelia Farrés y su alumno Israel García por orientarme en la realización del zimograma.

A mi amado esposo Gabriel por su apoyo incondicional y por ayudarme a concluir este ciclo.

A mi madre Carmen y mi padre Edgar, mis hermanos Jorge y Eduardo y a mi familia materna por estar conmigo.

A la Dra. Nuria Sánchez.

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mi esposo Gabriel y a mi
querida hija Ámbar.*

A mis padres y mis hermanos.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.1. BIOGÉNESIS RIBOSOMAL EN EUKARIONTES..... | 1 |
| 1.1.1. Síntesis y procesamiento del RNA ribosomal..... | 3 |
| 2. OBJETIVOS..... | 4 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 4 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 5 |
| 3. ANTECEDENTES..... | 6 |
| 3.1. GTPASAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS DE RIBOSOMAS..... | 6 |
| 3.2. LA SUPERFAMILIA DE LAS GTPASAS..... | 9 |
| 3.2.1. Características de las GTPasas..... | 10 |
| 3.2.1.1. Dominio G1..... | 11 |
| 3.2.1.2. Dominio G2..... | 11 |
| 3.2.1.3. Dominio G3..... | 11 |
| 3.2.1.4. Dominio G4..... | 11 |
| 3.2.1.5. Dominio G5..... | 12 |
| 3.2.2. Estructura y función de la GTPasa EFTUD1..... | 12 |
| 3.2.2.1. Justificación..... | 12 |
| 3.2.2.2. Hipótesis..... | 13 |
| 4. MÉTODOS Y MATERIALES..... | 13 |
| 4.1. REACTIVOS QUÍMICOS Y MATERIALES..... | 13 |
| 4.1.1. Reguladores de pH y soluciones..... | 13 |
| 4.1.2. Medios de cultivo celular..... | 15 |
| 4.2. CEPAS..... | 15 |
| 4.3. PLÁSMIDOS..... | 16 |
| 4.4. OLIGONUCLEÓTIDOS..... | 16 |
| 4.5. METODOLOGÍAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR..... | 17 |
| 4.5.1. Fenotipificación de la cepa BCY 123 de <i>S. cerevisiae</i> | 17 |
| 4.5.2. Transformación del plásmido pRS426-EFTUD1 en <i>S. cerevisiae</i> BCY123 por el método del acetato del litio..... | 17 |
| 4.5.3. Obtención de DNA total a partir de una colonia de <i>S. cerevisiae</i> | 18 |
| 4.5.4. Amplificación de secuencias específicas de DNA por medio de la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)..... | 18 |
| 4.5.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa..... | 19 |
| 4.6. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EFTUD1 POR WESTERN BLOT..... | 19 |
| 4.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN EL EXTRACTO CRUDO DE <i>S.CEREVISIAE</i> BCY123..... | 20 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.8. | ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE LISIS CELULAR DE LEVADURAS..... | 20 |
| 4.8.1. | Métodos de lisis celular..... | 21 |
| 4.9. | EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EFTUD1 Y SBDS-FLASH..... | 22 |
| 4.9.1. | Expresión de la proteína EFTUD1 | 22 |
| 4.9.2. | Purificación de la proteína EFTUD1 | 23 |
| 4.9.3. | Expresión de la proteína SBDS-Flash..... | 23 |
| 4.9.4. | Purificación de la proteína SBDS-Flash..... | 24 |
| 4.10. | ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE SDS-PAGE | 24 |
| 4.11. | PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNA CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA) | 24 |
| 5. | RESULTADOS | 26 |
| 5.1. | FENOTIPIFICACIÓN DE LA CEPA BCY123 DE S. CEREVISIAE Y OBTENCIÓN DE TRANSFORMANTES | 26 |
| 5.2. | AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UNA SECUENCIA DEL PLÁSMIDO pRS426-EFTUD1... 27 | 27 |
| 5.3. | DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EFTUD1 POR WESTERN BLOT | 28 |
| 5.4. | ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE UN EXTRACTO CRUDO DE CÉLULAS DE S. CEREVISIAE BCY123 | 29 |
| 5.5. | ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE LISIS DE CÉLULAS DE LEVADURA DE S. CEREVISIAE | 30 |
| 5.6. | EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE EFTUD1 | 31 |
| 5.7. | EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SBDS-FLASH | 34 |
| 6. | DISCUSIÓN..... | 36 |
| 6.1. | ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE LISIS CELULAR..... | 36 |
| 6.2. | ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA SOBREENPRESIÓN DE EFTUD1 38 | |
| 6.2. | DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EFTUD1 | 39 |
| 7. | CONCLUSIONES | 42 |
| 8. | PERSPECTIVAS | 43 |
| 9. | LITERATURA CITADA | 44 |

Abreviaturas

Amp: Ampicilina

RNA: Ácido ribonucleico

RNA pol III: Polimerasa del ácido ribonucleico III

dH₂O: Agua destilada

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600nm

EFTUD1-1: Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 1
isoforma 1 [*Homo sapiens*]

EFTUD1-2: Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 1
isoforma 2 [*Homo sapiens*]

Efl1: Elongation factor-like 1 [*S. cerevisiae*]

GTP: Guanosín trifosfato

GTPasa: guanosina trifosfatasa

IPTG: Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido

LB: Medio Luria-Bertani

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSA: Persulfato de amonio

PVDF: Polifluoruro de vinilo

RMN: Resonancia magnética nuclear

rRNA: RNA ribosomal

S: Unidades Svedberg

SBDS: Proteína humana mutada en el Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond

SD-ura: Synthetic Drop-out sin uracilo

SDS: Síndrome Shwachman-Diamond

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina

YM4: Medio para levadura 4.

Resumen

Los ribosomas son la maquinaria fundamental de las células que se encarga de la síntesis proteica. La regulación de la biogénesis ribosomal es clave para el control del crecimiento celular, ya que para una célula en división, este proceso constituye el principal consumidor de energía y biomateriales. Un déficit en la biogénesis y función ribosomal ocasionan el desarrollo de enfermedades que se han denominado recientemente como ribosomopatías; siendo una de ellas el Síndrome de Shwachman-Diamond. La proteína mutada en esta enfermedad se le conoce como SBDS, que junto con la GTPasa EFTUD1 participan directamente en la maduración de la subunidad 60S del ribosoma liberando el factor de anti-asociación eIF6 permitiendo de esta forma que se ensamble con la subunidad 40S.

Con objeto de poder en un futuro caracterizar estructural y bioquímicamente a la GTPasa EFTUD1, así como su interacción con SBDS, en este trabajo nos enfocamos en obtener de forma recombinante a la isoforma 1 de EFTUD1, y a una variante de la proteína SBDS que contiene una etiqueta Flash en su extremo C-terminal. La expresión de la proteína SBDS-Flash se realizó de forma similar a lo reportado en la literatura, mientras que EFTUD1, de la cual no existe reporte alguno, se expresó en la levadura *S. cerevisiae*. La expresión de EFTUD1 se optimizó evaluando diferentes condiciones de cultivo en las que se modificó la fuente de carbono, densidad óptica al momento de la inducción, cantidad de inductor y tiempo de inducción. Finalmente se estableció una metodología de purificación para ambas proteínas. El contar con cantidades abundantes de estas proteínas será de gran utilidad para estudios posteriores donde se evalúen interacciones proteína-proteína y proteína-nucleótidos.

Abstract

Ribosomes are the essential machinery of the cells that are responsible for protein synthesis. Regulation of ribosome biogenesis is critical for controlling cell growth because in a dividing cell this process constitutes the main consumer of energy and biomaterials. A deficit in ribosomal biogenesis and function causes the development of diseases that have recently been termed as ribosomopatias; one of them being the Shwachman-Diamond syndrome. The protein mutated in this disease is known as SBDS, which together with the GTPase EFTUD1 are directly involved in the maturation of the 60S ribosomal subunit and function at releasing eIF6 to allow its subsequent assemble with the 40S subunit.

Structural and biochemical characterization of the GTPase EFTUD1 and its interaction with the SBDS protein require large amounts of protein. This work focused on obtaining recombinant EFTUD1 1 isoform, and a variant of the SBDS protein that contains a Flash tag at its C-terminus. The SBDS-Flash protein expression was performed in a manner similar to that reported in the literature, while EFTUD1, of which there is no report, was expressed in the yeast *S. cerevisiae*. The expression of EFTUD1 was optimized by evaluating different culture conditions such as carbon source, optical density at the time of the induction, amount of inducer and induction time. Finally a purification strategy was established for both proteins. The production of abundant quantities of these proteins will be useful for protein-protein and protein-nucleotide interactions studies.

1. INTRODUCCION

1.1. Biogénesis ribosomal en eucariontes

Los ribosomas constituyen la maquinaria especializada en la síntesis de proteínas. Constan de dos subunidades: la subunidad grande 60S y la subunidad pequeña 40S (Lafontaine and Tollervey, 2001; Leary and Huang, 2001; Strunk and Karbstein, 2009). La subunidad 60S está compuesta por tres RNA ribosomales (rRNA) 5.8, 5 y 28S y la subunidad 40S contiene solo un rRNA (18S).

La biogénesis ribosomal en eucariontes involucra una ruta compleja que comienza en el nucleólo y termina en el citoplasma de las células. Globalmente, este proceso implica la síntesis, procesamiento y modificación de los pre-rRNAs, el ensamblaje de 80 proteínas ribosomales y la interacción transitoria con más de 200 proteínas accesorias para finalmente formar el ribosoma maduro y traduccionalmente competente (Fromont-Racine et al., 2003; Kressler et al., 1999; Lempiainen and Shore, 2009; Tschochner and Hurt, 2003). En la biogénesis ribosomal se pueden distinguir tres fases: la temprana, que inicia con la síntesis del transcrito primario del pre-rRNA grande 35S por la RNA polimerasa I a partir de los genes del DNA ribosomal (rDNA), formándose el precursor ribosomal 90S. La RNA polimerasa III sintetiza al rRNA 5S en otra región del nucleólo, y los genes que codifican para las proteínas ribosomales son transcritos por la RNA polimerasa II, y el pre-RNA mensajero es dirigido hacia el citoplasma para su traducción. La partícula 90S está compuesta por el pre-rRNA 35S, el procesoma, que es un rRNA pequeño que se encuentra en el nucleólo y que se une a proteínas ribonucleolares pequeñas (snoRNP U3), factores asociados a U3 y proteínas accesorias involucradas en el procesamiento del rRNA. El transcrito primario sufre escisiones realizadas por endonucleasas específicas y se produce la liberación de los rRNA 5.8, 18 y 28S. La snoRNP U3 es necesaria para la escisión inicial del pre-rRNA que se produce en la región externa (ETS) 5'. El precursor 90S sufre un rompimiento y se separa en las subunidades pre-40S y pre-60S. Posterior a la separación de las dos subunidades, el procesoma (U3 y factores asociados a éste) se disocia de la partícula pre-40S y factores adicionales se unen a dicha subunidad antes de su salida del núcleo. De forma paralela, la subunidad pre-60S sigue su proceso de maduración mediante la acción conjunta de proteínas como helicasas, transportadores intranucleares, GTPasas, ATPasas y

factores exportadores. Durante el movimiento del núcleo hacia el poro nuclear, se distinguen otras dos fases: la intermedia y la tardía, donde muchos de los factores de maduración de la subunidad pre-60S se desensamblan mientras que otras proteínas de asocian transitoriamente. La maduración final ocurre después de que las subunidades 40 y 60S atraviesan el poro nuclear para llegar al citoplasma (**Figura 1**).

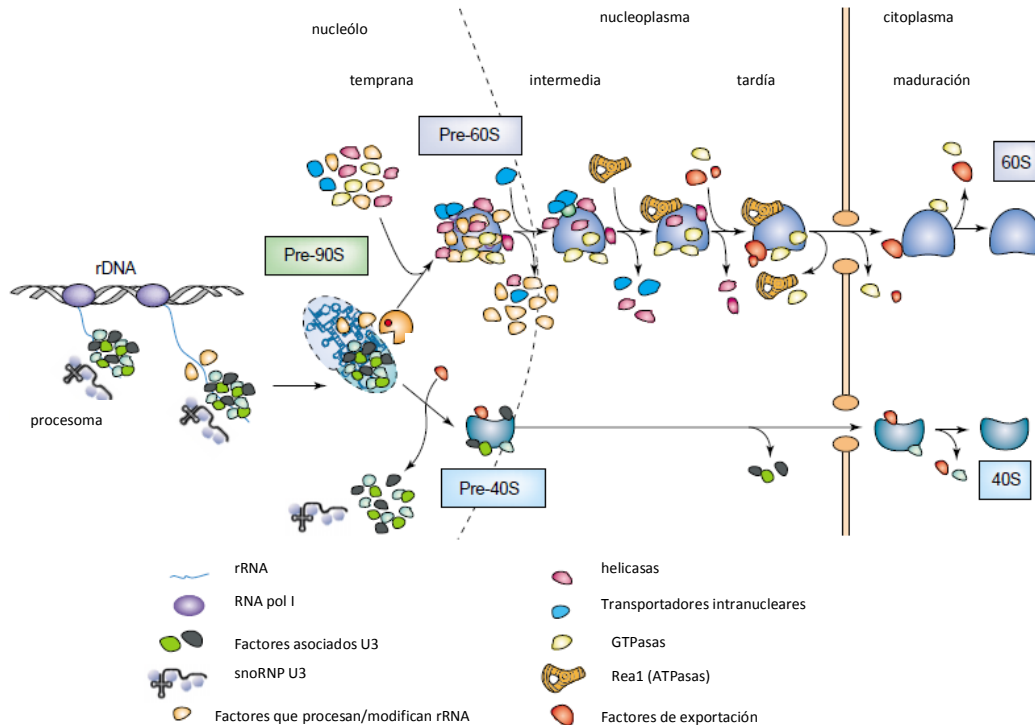


Figura 1. Modelo de la biogénesis ribosomal en eucariontes. Se muestran las diferentes etapas de la síntesis de ribosomas, así como los factores necesarios para la maduración y exportación de las subunidades ribosomales 40 y 60S (Tomado de Tschochner and Hurt, 2003).

Se han descrito más de 200 proteínas accesorias no ribosomales que participan en la biogénesis ribosomal. Entre ellas se encuentran proteínas que procesan y modifican al pre-rRNA (endo y exonucleasas, pseudouridil-sintetasas y metiltransferasas), proteínas que pliegan y remodelan al RNA como las RNA helicinas, chaperonas y proteínas facilitadoras que asocian y disocian a otras proteínas como las GTPasas, las AAA-ATPasas y cinasas. También se han descrito los denominados RNA nucleolares pequeños (snoARN), que reconocen sitios de modificación del rRNA y que al asociarse con proteínas forman un

complejo llamado ribonucleoproteínas pequeñas (snoRNP) (Fromont-Racine et al., 2003; Strunk and Karbstein, 2009; Tschochner and Hurt, 2003). Las funciones de las distintas proteínas accesorias se conoce someramente y sólo en algunos casos su participación ha sido descrita con detalle. Sin embargo, se sabe que deficiencias en la síntesis de ribosomas, y en particular mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales del ribosoma o que participan en dicho proceso, son responsables del desarrollo de enfermedades conocidas como ribosomopatías. Dentro de estas enfermedades se encuentran la anemia de Blackfan-Diamond, la disqueratosis congénita, el síndrome 5q⁻, la hipoplasia cartílago-cabello y el síndrome de Shwachman-Diamond (SDS) (Dokal and Vulliamy, 2008; Ganapathi and Shimamura, 2008; Liu and Ellis, 2006; Shimamura, 2006).

1.1.1. Síntesis y procesamiento del RNA ribosomal

Como se mencionó, la síntesis de los rRNAs 18S, 5.8S y 25S está dirigida por la RNA polimerasa I a partir de un pre-rRNA inicial 35S. El cuarto rRNA (5S) se sintetiza por la RNA polimerasa III. Los cuatro rRNA están codificados en una unidad de rDNA de 9.1kb, la cual se repite de 100 a 200 veces en el brazo largo del cromosoma XII de *S. cerevisiae*.

En el pre-rRNA^{35S}, las secuencias maduras de los rRNAs están separadas por dos espacios de secuencias internas transcritas (ITS), secuencias ITS1 e ITS2, y son flanqueados por dos espacios de secuencias externas transcritas (ETS), 5'ETS y 3'ETS. El rRNA 5S se encuentra localizado entre los dos espacios no transcritos (NTS1 y NTS2) (Figura 2).

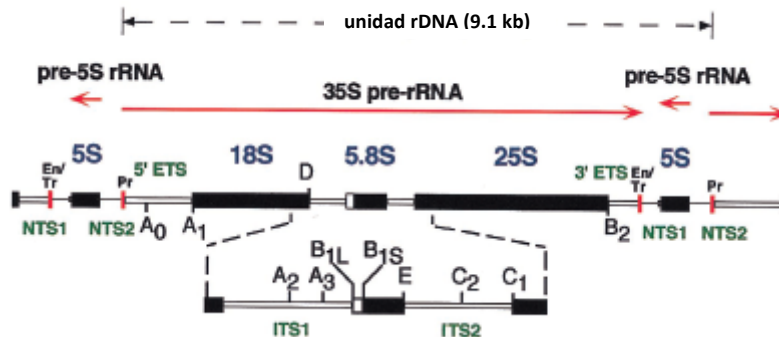


Figura 2. Estructura genómica de la unidad de DNA ribosomal. Cada unidad contiene un operón que codifica para los rRNAs 18, 5.8 y 25S, la cual se transcribe por la RNA polimerasa I (pr, promotor; tr, terminador; eh, aumentador), y la RNA pol III sintetiza al rRNA 5S. Las secuencias maduras correspondientes al transcrito de la RNA pol I están separadas por ITS1 e ITS2, flanqueadas por 5' ETS y 3' ETS. El gen que codifica para el rRNA 5S está localizado entre dos espacios que no se transcriben (NTS1 y NTS2). Las barras negras representan a los rRNA maduros, las barras delgadas blancas representan los espacios que se transcriben y las líneas representan los espacios que no se transcriben. Las letras indican los sitios de procesamiento del rRNA (Tomado de Kressler et al., 1999).

La maduración del pre-rRNA 35S se presenta después del procesamiento, mediado por proteínas accesorias que realizan digestiones exo y endonucleotídicas. Por otro lado, el procesamiento del pre-rRNA 5S es independiente de la maduración del pre-rRNA 35S y es cinéticamente más rápido que la formación de los rRNA maduros 18, 5.8 y 25S. Para alcanzar la madurez funcional, varios nucleótidos específicos dentro del rRNA también sufren modificaciones post-transcripcionales que incluyen isomerización de uridina a pseudouridina por rotación de base, metilación de un grupo hidroxilo del azúcar y metilación en la base. El procesamiento y modificación del pre-rRNA no ocurre en las moléculas desnudas, ya que desde su síntesis los pre-rRNAs se asocian con varias proteínas ribosomales y accesorias en el nucléolo para formar las pre-partículas ribosomales (Kressler et al., 1999).

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Expresar mediante técnicas de DNA recombinante a las proteínas humanas EFTUD1 y SBDS y purificarlas mediante técnicas convencionales de cromatografía.

Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de cultivo para la expresión de las proteínas EFTUD1 en *Saccharomyces cerevisiae* (BCY123) y SBDS en *Escherichia coli* (BL21) recombinantes.
- Estandarizar el método de lisis de las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123 para tener una eficiente ruptura celular y maximizar el rendimiento de la proteína recombinante.
- Identificar la proteína EFTUD1 mediante la técnica de western blot usando un anticuerpo que identifique la etiqueta de histidinas que se encuentra en el extremo C-terminal de EFTUD1.
- Identificar las proteasas presentes en el extracto total de *Saccharomyces cerevisiae* para evitar la degradación de la proteína EFTUD1 recombinante.
- Establecer un protocolo de purificación para las proteínas EFTUD1 y SBDS mediante técnicas cromatográficas convencionales.

3. ANTECEDENTES

3.1. GTPasas involucradas en la síntesis de ribosomas

Filogenéticamente, las GTPasas se agrupan en dos grandes grupos: 1) la clase TRAFAC (translation factor class) que incluye enzimas relacionadas con la traducción (factores de liberación, iniciación y elongación), traducción de señales, motilidad celular y transporte intracelular y 2) la clase SIMIBI (signal recognition particle, MinD y BioD), son GTPasas para el reconocimiento de señales relacionadas con el transporte de proteínas, el ensamblaje de enzimas ATPasas de tipo MinD, localización de proteínas, la partición de cromosomas, transporte a nivel de membrana plasmática y un grupo con actividad cinasa o de transferasa de fosfatos. Las GTPasas implicadas en la biogénesis ribosomal pertenecen a la clase TRAFAC.

Actualmente se encuentran identificadas seis GTPasas involucradas en la síntesis del ribosoma: Bms1, Efl1/Ria1, Lsg1/Kre35, Nog1, Nug1 y Nug2/Nog2. Bms1 es esencial para la biogénesis de la subunidad 40S y las otras cinco están relacionadas con diferentes aspectos de la biogénesis ribosomal de la subunidad 60S (Becam et al., 2001; Johnson et al., 2002; Kressler et al., 2010; Strunk and Karbstein, 2009; Tschochner and Hurt, 2003) .

Senger y colaboradores (2001) encontraron que la proteína Efl1/Ria1 (elongation factor like 1) es una GTPasa citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* homóloga a los factores de elongación EF-2 y EF-G. Efl1 tiene la organización estructural similar a estos factores de elongación, y está compuesta por un dominio G (dominio I), en el que los residuos involucrados en la interacción con el GTP están conservados. A diferencia del factor de elongación EF-2, Efl1 presenta una inserción de 160 aa entre el dominio G y el dominio I (Becam et al., 2001; Senger et al., 2001). La GTPasa Efl1 presenta homólogos en varias especies, y a su contraparte en humanos se le denomina EFTUD1. En la Figura 3 se ilustra a las GTPasas EF-2 de 842 aa, Efl1 de 1,111 aa y EFTUD1 de 1,121 aa, mostrando la inserción de los aminoácidos en las dos últimas proteínas en el dominio II, así como su organización estructural.

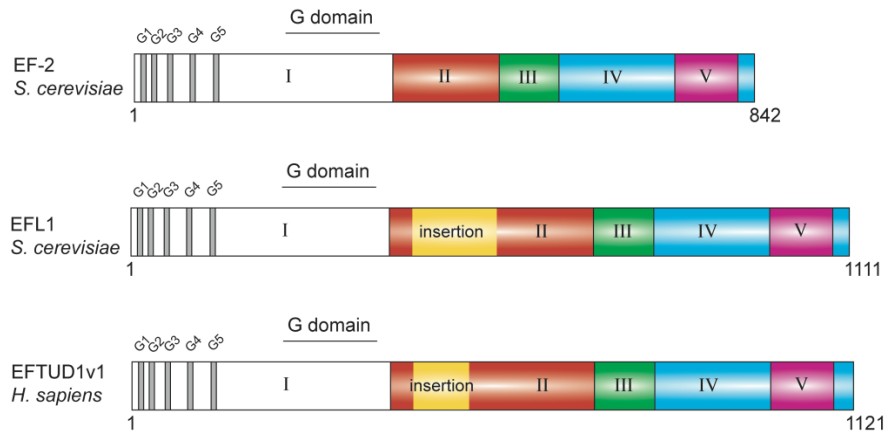


Figura 3. Representación esquemática de la organización estructural de EF-2, EFL1 de *Saccharomyces cerevisiae* y EFTUD1 de *Homo sapiens*. Se observa el dominio G y los cinco motivos del dominio I de las GTPasas (realizado por Nuria Sánchez Puig).

Las proteínas Efl1 y EFTUD1 son GTPasas citoplasmáticas requeridas en la maduración tardía de la subunidad ribosomal 60S. EFTUD1 interactúa con otra proteína llamada SBDS y juntas promueven la liberación del factor de antiasociación eIF6 (eukaryotic initiation factor 6) que se encuentra unido a la subunidad pre-60S. El factor eIF6 se une a la subunidad pre-60S desde el núcleo hasta el citoplasma, en donde previene la asociación prematura de la subunidad pre-40S (Gartmann et al., 2010). La hidrólisis de GTP por parte de la GTPasa EFTUD1, permite la liberación de eIF6 de la superficie de la partícula pre-60S y su consecuente ensamblaje con la subunidad pre-40S, formando el ribosoma maduro 80S para iniciar la traducción (Finch et al., 2011).

El gen *SBDS* (Shwachman-Bodian-Diamond syndrome) codifica para una proteína conservada con ortólogos en arquea y eucariontes denominada SBDS y que consta de 250 aa arreglados en tres dominios (Boocock et al., 2003). Este gen se encuentra mutado en el síndrome Shwachman-Diamond (SDS), que es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por anomalías óseas, disfunción de la médula ósea, insuficiencia pancreática exócrina y predisposición a desarrollar leucemia (Dror and Freedman, 2002).

El modelo de la liberación de eIF6 propuesto por Finch, *et. al.*, (2011) sugiere que SBDS acopla fuertemente la energía de hidrólisis de GTP y la liberación de fosfato inorgánico (Pi) de EFTUD1 para liberar el factor eIF6 a través de mecanismos conformacionales. La concentración celular de GTP es más alta que la concentración de GDP, por lo que se cree que EFTUD1 se encuentra unida a GTP en la superficie la subunidad pre-60S

probablemente cerca del puente B6, que es donde el factor de antiasociación eIF6 se sienta en la subunidad ribosomal pre-60S. El puente B6 es uno de los varios puentes que por medio de enlaces no covalentes mantiene unidas a las partículas ribosomales 60 y 40S durante la traducción (Klinge et al., 2011; Sun et al., 2011). La unión e hidrólisis de GTP precede a la disociación de eIF6 de la subunidad pre-60S, por lo que es probable que EFTUD1 sufra cambios conformacionales dependientes de GTP en el ribosoma, análogos a los que presenta EF-G. Estudios de RMN muestran que los dominios de la proteína SBDS son altamente flexibles, de tal forma que el dominio I tiene una movilidad autónoma respecto a los dominios II y III. Debido a esto, existe la posibilidad de movimiento interdominio que puede ser importante para la disociación de eIF6, por lo que se sugiere que después de la hidrólisis de GTP y la liberación de Pi, los cambios conformacionales en EFTUD1 inducen la rotación del dominio de SBDS que conducen a un rearrreglo estructural del ribosoma, desplazando al puente B6. Esto desestabiliza la interacción de eIF6 con la subunidad pre-60S, lo que dispara la disociación de eIF6. Posterior a la liberación de este factor, la subunidad 60S se ensambla con la subunidad 40S. De esta forma contribuyen las proteínas SBDS y EFTUD1 en la maduración del ribosoma (Finch et al., 2011) (Figura 4).

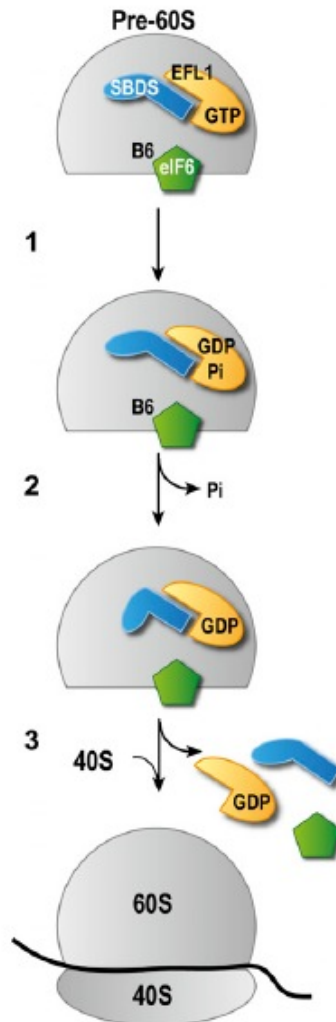


Figura 4 Modelo de liberación del factor eIF6 por SBDS y EFTUD1.1)SBDS estimula la actividad de GTPasa de EFTUD1. 2) Después de la liberación del Pi, EFTUD1 adopta conformaciones de unión a GDP (EFTUD1.GDP) y el dominio I de SBDS es rotado relativamente a dominio II y III interrumpiendo el puente B6. 3) La unión de eIF6 a la partícula 60S es desestabilizada, por lo que se promueve la liberación del factor, EFTUD1.GDP y SBDS se disocian del ribosoma. La liberación de eIF6 permite la formación de ribosomas activos 80S los cuales pueden comenzar la traducción. (tomado de Finch et al., 2010).

3.2. La superfamilia de las GTPasas

La superfamilia de las GTPasas contiene más de 100 proteínas regulatorias conservadas universalmente, y que se encuentran involucradas en diversas funciones celulares como: transducción de señales, formación del citoesqueleto, transporte intracelular, traducción y biogénesis ribosomal, tanto en bacterias como en eucariontes (Karbstein, 2007; Li, Mar 2003). Dentro de esta familia de hidrolasas regulatorias se encuentran las GTPasas pequeñas, denominadas Ras, cuyo peso es entre 20-30 kD y sus homólogos cercanos, las

proteínas G heterotriméricas, y los factores de elongación de bacterias y eucariontes EF-Tu/EF1 y EFG/EF2 respectivamente (Sprang, 1997) .

3.2.1. Características de las GTPasas

Las GTPasas son enzimas de tipo hidrolasa que pueden unir e hidrolizar GTP. Una característica común entre estas enzimas es su alta afinidad por el GTP, con una constante de disociación (K_D) del orden de picomoles (Li, Mar 2003), además de tener secuencias y estructuras similares y contar con cinco dominios (G1-G5) implicados en la unión de nucleótidos. La unión de la GTPasa con su sustrato, ocurre en una región de la enzima que conservada y común en todas las GTPasas, denominada dominio G o G1 (Hauryliuk, 2008) .

La hidrólisis y unión del GTP genera un ciclo en el cual se distinguen tres estados conformacionales, que son: unión de la GTPasa al GDP, la GTPasa sin unión, es decir, sin formar un complejo con GTP o GDP y la GTPasa unida al GTP (Bourne et al., 1990). La GTPasa está activa cuando está unida al GTP y promueve la función celular, e inactiva cuando está unida al GDP (Figura 5). En las células, el ciclo de la GTPasa se facilita por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que aceleran la hidrólisis del GTP, y factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), que estimulan la disociación de GDP.

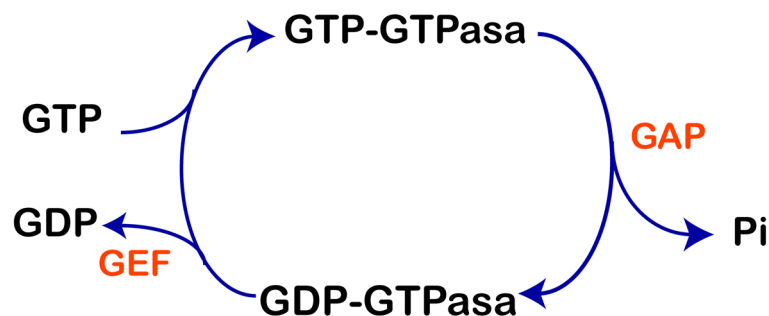


Figura 5. Ciclo catalítico de una GTPasa y su regulación. La GTPasa pasa de un estado inactivo en complejo con GDP a un estado activo en complejo con GTP vía intercambio de nucleótidos, después el GTP se hidroliza y la enzima regresa al estado inicial. GAP=proteína activadora de GTPasa. GEF=factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Tomado de Hauryliuk, 2008).

3.2.1.1. Dominio G1

Los dominios de las GTPasas pueden ser clasificados como dominos G1 al G5 o mediante su designación con un nombre específico a cada uno.

El dominio G1, también conocido como asa P de unión al fosfato (Walker A), tiene una secuencia consenso (G/A)XXXGK (S/T); dicho dominio se une fuertemente al fosfato α y β del GDP y GTP (Bourne et al., 1990; Karbstein, 2007).

3.2.1.2. Dominio G2

El dominio G2, llamado también switch I o asa efectora, presenta cambios conformacionales en el ciclo de hidrólisis del GTP y permite a la GTPasa discriminar entre GTP o GDP vía interacción de un residuo de treonina con el γ -fosfato del GTP. El dominio G2 normalmente contiene una treonina específica, a veces remplazada por una serina, la cual coordina a un ión Mg^{2+} , que es parte de una secuencia conservada RXITI. El papel de la treonina o serina es promover la unión selectiva del GTP por la GTPasa y prevenir la hidrólisis prematura del complejo GTPasa-GTP.

3.2.1.3. Dominio G3

El dominio G3, o switch II, posee un motivo Walker B y presenta una secuencia consenso DXXG que une los subsitios para unión de Mg^{2+} y del γ -fosfato del GTP, lo cual es necesario para la reacción de hidrólisis del GTP (Sprang, 1997). Este dominio permite a la GTPasa discriminar entre GDP o GTP vía interacción de una glicina con el γ -fosfato del GTP.

3.2.1.4. Dominio G4

A este dominio se le llama también región específica de guanina, ya que tiene múltiples interacciones con el anillo de guanina y la ribosa del GTP. El dominio G4 tiene un motivo conservado, NKXD (Li, Mar 2003).

3.2.1.5. Dominio G5

El dominio G5, al igual que el dominio G4, une fuertemente a la guanina y al anillo de ribosa. Su motivo conservado es SAL, aunque algunas GTPasas carecen de él (Bourne et al., 1991). La interacción del dominio G5 con el anillo de guanina estabiliza la conformación del dominio G4 (Li, Mar 2003).

3.2.2. Estructura y función de la GTPasa EFTUD1

En este estudio se trabajó con la proteína EFTUD1 (elongation factor Tu GTP-binding domain containing protein 1), que consta de 1,121 aminoácidos, peso molecular de 125.5 kDa, punto isoelectrico teórico de 5.65 y coeficiente de extinción teórico de 105,655 M⁻¹cm⁻¹. Esta proteína presenta dos isoformas, de las cuales la isoforma 2 tiene una delección de 51 residuos en el dominio G y en el motivo G1 y G2, los cuales están involucrados en la unión de GTP. En la Figura 6 se muestra el alineamiento de las secuencias primarias de la isoforma 1 y 2 de EFTUD1, en la que se ilustra solo la sección referente a la delección de la isoforma 2, ya que el resto de la secuencia es idéntica.

| | | | | |
|--------------|----|--|-----------|-----|
| | | | G1 | |
| EFTUD1_iso_1 | 1 | MVLNSLDKMIQLQKNTANIRNICVLAHVDPHGKTTLADCLISSNGIIS | | 48 |
| EFTUD1_iso_2 | 1 | MVLNSLDKMIQLQKNTANIRNICVLAHVDPHG----- | | 31 |
| | | | G2 | |
| EFTUD1_iso_1 | 49 | RLAGKLRMYDSREDEQIRGITMKSSAISLHYAT-----GNE | | 84 |
| EFTUD1_iso_2 | 32 | -----NE | | 33 |
| | | | G3 | |
| EFTUD1_iso_1 | 85 | EYLNLIIDSPGHVDFSSEVSTAVRICDGCIIVDDAVEGVCPQTQAVLR | | 132 |
| EFTUD1_iso_2 | 34 | EYLNLIIDSPGHVDFSSEVSTAVRICDGCIIVDDAVEGVCPQTQAVLR | | 81 |

Figura 6. Alineamiento de la secuencia primaria de las dos isoformas de EFTUD1 donde se muestra la delección de la isoforma 2 y los motivos G1-G3 que se encuentran en el dominio G (realizado por Nuria Sánchez Puig).

3.2.2.1. Justificación

El presente estudio plantea expresar y purificar a las proteínas recombinantes EFTUD1 y SBDS, con el objetivo de realizar estudios posteriores que permitan estudiar las bases estructurales de la interacción entre estas dos proteínas.

3.2.2.2. Hipótesis

Si se requiere obtener la mayor cantidad posible de proteína recombinante y se sabe que factores como la composición del medio de cultivo, el tiempo y la temperatura de inducción y la cantidad inicial de células son determinantes en la obtención de proteínas recombinantes, entonces la optimización de estos parámetros permitirán obtener un mejor rendimiento.

4. MÉTODOS Y MATERIALES

4.1. Reactivos químicos y materiales

Todos los reactivos químicos se compraron de Sigma-Aldrich Company Ltd. Las membranas de diálisis se compraron a Spectrum Laboratories, Inc. (Houston, TX, USA). Las unidades de concentración de proteína por centrifugación tipo Centricon se compraron a Millipore. Las columnas de cromatografía fueron de GE Amersham Biosciences (Sweden).

4.1.1. Reguladores de pH y soluciones

Los reguladores de pH y soluciones utilizados en el proyecto se describen en la Tabla 4. 1.

Tabla 4. 1. Composición de los reguladores de pH y soluciones utilizadas.

| Solución | Componentes |
|--|--|
| Buffer de unión Ni-NTA | 50mM Tris-HCl pH=7.4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM 2- mercaptoetanol |
| Buffer de elución Ni-NTA | 50 mM Tris-HCl pH=7.4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol 10 mM 2- mercaptoetanol |
| Buffer de diálisis para columna de intercambio catiónico (S) | 20 mM de fosfato pH=6.5, 20 mM NaCl, 10 mM de 2-mercaptoetanol |

| | |
|--|--|
| | |
| Buffer A | 20 mM de NaCl, 20 mM fosfato de sodio, 10mM 2-mercaptoetanol |
| Buffer B | 0.5mM de NaCl, 20 mM fosfato de sodio, 10mM 2-mercaptoetanol |
| Buffer C | 1 M de NaCl, 20 mM fosfato de sodio, 10mM 2-mercaptoetanol |
| Buffer de lisis celular | 50 mM Tris-HCl pH=7.4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM 2-mercaptoetanol, PMSF 1mg/ml |
| Buffer de lisis celular para zimograma | 10 mM Tris-HCl pH=7.4 |
| Buffer de carga para gel de agarosa (6X) | 0.25% (p/v) naranja G, 50% (v/v) glicerol, 2.5X TBE. |
| Buffer de tanque para SDS-PAGE (10X) | 30% Tris-Base, 14.4 % glicina, 20% SDS |
| Buffer de carga para SDS PAGE (2X) | 100 mM Tris-base, 100 mM 2-mercaptoetanol, 4 % (p/v) SDS, 1% Azul de bromofenol, 20 % (v/v) glicerol |
| Solución desteñidora SDS PAGE | 30 % (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial |
| Solución teñidora SDS PAGE | 1 % (p/v) Azul de Coomasie (R-250), 40 % (v/v) metanol, 20% (v/v) ácido acético glacial |
| Buffer de transferencia | 2.9% glicina, 5.9% Tris base, 0.37% SDS, 2% (v/v) metanol |
| TBS-T | 50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20 |
| IPTG | 1M IPTG estéril |
| Ampicilina (1000x) | Ampicilina 100mg/ml estéril |
| TE 1X /LiAc | 0.5 ml TE 10X, 0.5ml CH ₃ COOLi, 1 M |
| TE 1X /LiAc/PEG | 4 ml 50% PEG, 0.5 ml TE 10X, 0.5ml CH ₃ COOLi, 1 M |
| TE 10X | 100 mM Tris-HCl pH=7.4, 10 mM EDTA pH=8.0 |
| TCA | 50% (p/v) |

| | |
|------------------------|--|
| | |
| Solución de desarrollo | NaCl 11.7 g, Tris 6.06g, CaCl ₂ 0.56g, pH=8, c.b.p 1L |

4.1.2. Medios de cultivo celular

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4.2.

Tabla 4. 2 Medios de cultivo.

| Medio | Componentes |
|------------------|--|
| LB/Amp | Bactotripton 1% (p/v), NaCl 1% (p/v), extracto levadura 0.5% (p/v), 100µg/ml ampicilina. |
| YPD | Extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), D-glucosa 2% (p/v). |
| YPD/agar | Extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), D-glucosa 2% (p/v), agar 2.5%. |
| SD-ura (glucosa) | Base nitrogenada de levadura 0.8% (p/v), casaminoácidos 1.1% (p/v), adenina 0.0055%, tirosina 0.0055%, leucina 0.0055%, triptofano 0.0055%, glucosa 2% (p/v), pH 5.8. |
| SD-ura (lactato) | Base nitrogenada de levadura 0.8% (p/v), casaminoácidos 1.1% (p/v), adenina 0.0055%, tirosina 0.0055%, leucina 0.0055%, triptofano 0.0055%, lactato 2% (p/v), pH 5.8. |
| SD-ura/agar | Base nitrogenada de levadura 0.8% (p/v), casaminoácidos 1.1% (p/v), adenina 0.0055%, tirosina 0.0055%, leucina 0.0055%, triptofano 0.0055%, glucosa 2% (p/v), agar 2.5%, pH 5.8. |
| YPG | Extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), galactosa 2% (p/v). |

4.2. Cepas

Las cepas de *E. coli* y *S. cerevisiae* se guardaron a -80°C en medio rico y 25% de glicerol.

***S. cerevisiae* BCY123:** *MATa, Can1, ade2, trp1, ura3-52, his3, leu2-3, 112, pep4::his+, prb1::leu2+, bar1::hisG+, lys2::pGAL1/10-GAL4+*.

***E. coli* BL21(DE3):** *F- ompT- (hsd SB rB- mB-) gal dcm recA+ (DE3)*.

4.3. Plásmidos

pRSETA-SBDS-Flash

El vector se construyó clonando la secuencia codificante de la proteína SBDS humana en el vector pRSET-A (Invitrogen), con una cola correspondiente al péptido Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys en el extremo C-terminal, a la cual se le denominó “Flash” y 6 histidinas (6xHistag) en la región N-terminal.

pRS426-EFTUD1

Este plásmido se construyó usando como esqueleto el vector episomal para levadura pRS426. La secuencia codificante correspondiente a la EFTUD1 isoforma 1 se clonó entre los sitios *NcoI* y *BamHI* y mediante PCR de traslape, se adicionaron entre los sitios *NotI* del plásmido las regiones reguladoras promotor *GAL1* y región terminadora MAT α . En el extremo C-terminal se adicionó una etiqueta de seis histidinas.

4.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se usaron para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se enlistan en la Tabla 4. 3.

Tabla 4. 3. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR.

| Oligo | Secuencia 5'-3' |
|----------------|--|
| M13F | GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA |
| EFToulR | GATTGATCAGGTACTCCTCATTACCATGGTCAACATGAGCCAAAACAC |

4.5. Metodologías de biología molecular

4.5.1. Fenotipificación de la cepa BCY 123 de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de verificar el fenotipo de la cepa BCY123 de *S.cerevisiae* se realizaron cultivos a partir del stock en glicerol y se reactivaron las células en medio YPD sólido. Posteriormente se tomó una colonia, se depositó en medio YPD líquido y se incubó a 30°C durante 5 horas, dicho cultivo se utilizó para hacer 3 diluciones seriales 1/10 a partir de una $DO_{600}=1$. Las diluciones se sembraron en medio YPD y SD-ura sólido.

4.5.2. Transformación del plásmido pRS426-EFTUD1 en *S. cerevisiae* BCY123 por el método del acetato del litio

Existen tres métodos para introducir DNA exógeno en levadura: formación de esferoplastos, el método de acetato de litio (LiAc) y la electroporación (Guthrie, 1991; Romanos et al., 1992). El primer método consiste en remover enzimáticamente la pared celular produciendo esferoplastos capaces de introducir el DNA exógeno con calcio y polietilenglicol, después las transformantes se siembran en un medio donde la pared celular se regenera. Posteriormente se desarrolló el método del acetato de litio, donde las células intactas se hacen competentes por un tratamiento con iones de litio; este método es más conveniente que el anterior ya que reduce el tiempo y costo para producir transformantes (Ito et al., 1983). Por último se encuentra la electroporación, en la que mediante pulsos eléctricos se introduce el DNA a la levadura. Meilhoc y colaboradores lo describen como un método altamente eficiente, pero que requiere de equipo especializado (Meilhoc et al., 1990). Debido a su simplicidad se decidió ocupar el método del acetato de litio que se describe en detalle a continuación:

Se inoculó una colonia de la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 en tres ml de medio YPD líquido y se incubó toda la noche con agitación constante a 30°C. Tres mililitros de este cultivo se utilizaron para inocular 100ml de YPD, el cual se creció a 30°C con agitación constante hasta que se alcanzó la fase logarítmica (DO_{600} 0.5-0.75). Después de este tiempo se centrifugaron las células a 3,500 rpm a 4°C por 5 minutos en una microcentrifuga. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de agua estéril, se centrifugó a 3,500 rpm a 4°C por 5 minutos y se resuspendió en 1 ml de solución estéril de 1XTE/LiAc. Se mezclaron 200 ng

del plásmido pRS426-EFTUD1 con 100 µg de esperma de salmón como DNA acarreador (Invitrogen). La mezcla anterior se añadió a 100µl de células competentes y se mezcló con un vórtex. Después se añadió 600µl de una solución estéril de 1XTE/LiAc/PEG y se incubó por 2 hrs a 30°C con agitación constante. Posteriormente se añadió 70µl de DMSO y se mezcló por inversión. Se realizó un choque térmico a 42°C por 15 minutos, posteriormente las células se enfriaron sumergiendo el tubo de la mezcla en hielo por 2 minutos y se centrifugó a 3,500 rpm por 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 100µl de 1XTE, se sembró en medio SD-ura y se incubó a 30°C por 2 días.

4.5.3. Obtención de DNA total a partir de una colonia de *S. cerevisiae*

A partir de las transformantes obtenidas, se extrajo DNA total para mediante PCR determinar la presencia del plásmido pRS426-EFTUD1. Se depositó un poco de la colonia de *S. cerevisiae* BCY123 pRS426-EFTUD1 en las paredes de un tubo eppendorf de 500µl y se calentó por 5 minutos en un horno de microondas para lisar las células. A continuación las células lisadas se resuspendieron en 30 µl de agua estéril, la muestra se calentó 5 minutos más en el horno de microondas y se centrifugó a 5,000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante con el DNA se transfirió a otro tubo eppendorf limpio y se congeló a -20°C.

4.5.4. Amplificación de secuencias específicas de DNA por medio de la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)

La presencia del plásmido pRS426-EFTUD1 se verificó mediante PCR utilizando los oligos M13F y EFToulR (Tabla 4. 3). El tamaño del amplicón esperado era de 690 pares de bases. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl por reacción usando *Taq* DNA polimerasa. La mezcla de reacción contenía 30-50ng de DNA molde, 1X de buffer *Taq*, 0.2 µM dNTPs, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1mM MgCl₂ y 5U de *Taq* DNA polimerasa. Las condiciones del termociclador fueron: 25 ciclos en el cada ciclo consistió de 94°C- 30s; 55°C-30s; 72°C-1min seguido de un ciclo final de 72°C por 10min. Al terminar el programa de la PCR 15 µl de la muestra se analizaron por electroforesis en gel de agarosa para monitorear la amplificación.

4.5.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 1% preparados con TBE 1X. Los geles se sumergieron en una cámara de electroforesis cubiertos con buffer TBE 1X y las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga para gel de agarosa, se depositaron en los pozos del gel y se corrieron a 90 volts por 45 min. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

4.6. Detección de la proteína EFTUD1 por Western blot

Se utilizó la técnica de Western blot para detectar inmunológicamente la proteína EFTUD1. Las muestras de proteína se separaron mediante SDS-PAGE en un gel al 6%, el cual se transfirió a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Como anticuerpo primario se utilizó el His-probe (H3) (Santa Cruz Biotech.) en una dilución de 1:1000, que reconoce la etiqueta de histidinas que presenta esta proteína EFTUD1 en el carboxilo-terminal. Como anticuerpo secundario se utilizó un Anti-his de ratón de la misma compañía con una dilución de 1:2000. La transferencia del gel a la membrana de PVDF se hizo en cámara húmeda de Biorad por 2.30 horas a 25 volts, posteriormente se bloqueó con 5% de leche descremada en polvo en buffer TBS-T. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo toda la noche con agitación constante a 4°C, y la incubación del anticuerpo secundario fue durante tres horas con agitación constante a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario estaba conjugado a la peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase, HRP) 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 autoradiográfica. La membrana fue tratada con el sustrato quimioluminiscente (Pierce ECL Western blot substrate) y se expuso a una película de rayos X.

4.7. Estudio de la actividad proteolítica en el extracto crudo de *S.cerevisiae* BCY123

Con el objetivo de identificar las proteasas presentes en el extracto total de EFTUD1 se realizó un zimograma. Esta técnica electroforética permite la visualización del número y tamaño aproximado de las proteasas en la muestra. La presencia de actividad proteolítica se basa en la hidrólisis de un gel embebido en sustrato proteínico como gelatina o caseína, en este caso se utilizó gelatina. Se obtuvo un extracto total de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pRS426-EFTUD1. De este extracto se midió la concentración de proteína por medio de Bradford y se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, al cual se añadió 10 mg de gelatina de piel bovina tipo B (Sigma). Se utilizaron nueve muestras sin hervir que contenían buffer de carga sin 2-mercaptoetanol para SDS-PAGE y se cargó una cantidad de 50 µg de proteína por pozo del gel. Se aplicó al gel un voltaje constante de 120V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el fondo del gel. Después, el gel se lavó con agua destilada por 30 minutos con agitación constante a temperatura ambiente, se colocó en una solución de Tritón X-100 al 2.5% durante 30 minutos. Acabado este proceso se lavó con agua destilada y el gel se cortó en tiras verticales y cada una se incubó en solución de desarrollo con diferentes inhibidores de proteasas (PMSF, EDTA, EGTA, Complete (Roche), en concentración de 1 y 10 mM a 37°C con agitación constante toda la noche. Al siguiente día se eliminó la solución de desarrollo, se lavó con agua y se tiñó con solución teñidora para SDS-PAGE; por último se destiñó el gel con solución desteñidora para SDS-PAGE y se analizaron los resultados.

4.8. Estandarización del método de lisis celular de levaduras

Las células de *S. cerevisiae* son difíciles de romper debido a que la pared celular es una estructura dinámica que varía en composición de acuerdo a las condiciones de cultivo, fase de crecimiento y estrés (Lipke and Ovalle, 1998). La pared celular está compuesta de tres grupos principales de polisacáridos: polímeros de manosa (manoproteínas 40%), polímeros de glucosa (β -glucanos 60%) y polímeros de *N*-acetilglucosamina (quitina 2%) (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003).

Se han descrito métodos químicos y mecánicos para la lisis de levaduras, los primeros consisten en utilizar enzimas que degradan la pared celular como liticasa, zimolasa o glucolasa. Sin embargo, esto puede resultar demasiado costoso cuando se procesan grandes cantidades de muestra, además de que la enzima podría ser ineficiente en la lisis y de esta forma hacer difícil la obtención del producto, en este caso de las proteínas recombinantes (Knorr, 1979). El método mecánico más utilizado es el homogenizador con perlas de vidrio, si la muestra es de menor tamaño se puede usar vórtex, o bien también se emplea la prensa francesa. Como un primer acercamiento para optimizar la obtención de la proteína recombinante EFTUD1 se estandarizó el método de lisis, se probaron dos métodos mecánicos, vórtex y homogenizador con perlas de vidrio.

4.8.1. Métodos de lisis celular

Se utilizó el homogenizador (bead beater) y el vórtex con perlas de vidrio. Se hizo un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* cepa BCY123, primero se tomó una colonia aislada y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 10ml de medio YPD y se incubó toda la noche a 30°C con agitación constante. Este cultivo se utilizó para inocular 2L de medio YPD el cual se incubó a 30°C con agitación constante después de 18 horas de crecimiento las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos en un rotor JA-14 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a 4 °C. Si la lisis celular no se llevó a cabo inmediatamente, el pellet celular se guardó a -20°C. Se determinó el peso del paquete celular y se dividió en cuatro partes, dos se destinaron para romperse en el vórtex y dos para el homogenizador. El paquete celular se resuspendió en un tubo Falcon de 50ml en una relación 1:1 ó 2:1, es decir, por cada gramo de pellet se utilizó 1 ó 2 ml de buffer de lisis según fuera el caso. A esta suspensión se le añadió un 50-75% perlas de vidrio 400-600 µm (Sigma- Aldrich) del volumen total y se guardó en hielo. Se realizaron ciclos de un minuto con el vórtex prendido a velocidad máxima y tres minutos de descanso en hielo. Cada 10 ciclos se evaluó el proceso de lisado en el microscopio. La misma metodología se utilizó con el homogenizador bead beater, utilizando ciclos de 1 minuto en velocidad media y tres minutos de descanso en hielo evaluando el proceso en el microscopio cada dos ciclos.

4.9. Expresión y purificación de las proteínas EFTUD1 y SBDS-Flash

4.9.1. Expresión de la proteína EFTUD1

La cepa que se utilizó para la expresión de la proteína EFTUD1 fue *S. cerevisiae* BCY123 previamente transformada con el plásmido pRS426-EFTUD1. Con objeto de optimizar el rendimiento de la proteína y de acuerdo a la literatura consultada (Griffith et al., 2003; Romanos et al., 1992) se decidió expresar con cuatro medios de cultivos distintos cuyas características se describen a continuación:

Método 1: crecimiento de las células en medio SD-ura+2% de glucosa hasta una $DO_{600nm}=0.6$, centrifugar las células y resuspenderlas en medio YPG+2% de galactosa e inducir por 20hr.

Método 2: crecimiento de las células en medio SD-ura+2% de glucosa hasta una $DO_{600nm}=0.6$, adicionar 2% de galactosa e inducir por 20hr.

Método 3: crecimiento de las células en medio SD-ura+2% de lactato hasta una $DO_{600nm}=0.6$, adicionar 2% de galactosa e inducir por 20hr.

Método 4: crecer las células en medio SD-ura+1% de glucosa hasta una $DO_{600nm}=2.0$, adicionar 4% de galactosa e inducir por 20 hr.

De las colonias transformadas con el plásmido pRS426-EFTUD1 se tomó solo una colonia aislada y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 100 ml de medio líquido SD-ura+ glucosa. Este cultivo se incubó toda la noche a 30°C con agitación constante. El cultivo se utilizó para inocular 1L de medio de cultivo correspondiente a los métodos 1, 2, 3 y 4. Estos medios se incubaron de 4 a 6 hrs o hasta que el cultivo alcanzó la densidad óptica de $DO_{600}=0.6$ para los métodos 1,2 y 3, mientras que para el método 4 se utilizó una densidad óptica de entre 2.5-3. Posteriormente, para la inducción se agregó galactosa a la concentración correspondiente y se mantuvo en incubación a 30°C con agitación constante por 18-20 hrs. Por último las células se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 minutos en un rotor JA-14 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a 4 °C. Si la purificación no se llevaba a cabo inmediatamente, el paquete celular se guardó a -20°C.

4.9.2. Purificación de la proteína EFTUD1

Después de la lisis de las células de levadura, el extracto crudo se centrifugó (rotor JA-14 Beckman Coulter) por 1 hora a 14,000rpm y el sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore de 0.45 μm . El sobrenadante filtrado se introdujo en una columna de afinidad al níquel de Amersham (Ni Sepharose 6 Fast Flow, 5ml) previamente equilibrada con el buffer de unión Ni-NTA. La columna se lavó 3 veces con el mismo buffer para remover la proteína que no se pega a la columna. La GTPasa EFTUD1 se eluyó de la columna con buffer de elución Ni-NTA. La elución de EFTUD1 se dializó toda la noche contra un buffer 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl. La expresión y purificación de EFTUD1 se monitoreó mediante una electroforesis SDS-PAGE. Por último la proteína se congeló en hielo seco y acetona en tubos de 600 μl y se guardó a -80°C .

4.9.3. Expresión de la proteína SBDS-Flash

La proteína SBDS-Flash representa a la proteína SBDS silvestre con un péptido correspondiente a Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys en el extremo C-terminal al que se le denominó Flash. La adición de este péptido se realizó con el objeto de realizar estudios posteriores de interacción proteína-proteína mediante fluorescencia anisotrópica, ya que la etiqueta Flash reacciona con un compuesto biársenico capaz de emitir una fluorescencia característica. La proteína SBDS-Flash se expresó en *E. coli* BL21(DE3) previamente transformada con el plásmido pRSET-SBDSFlash. Se tomó una colonia aislada y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 10ml de medio LB/amp y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. El cultivo se utilizó para inocular 1L de medio LB/amp, el cual se incubó de 2-3 horas o hasta que alcanzó la densidad óptica de $\text{DO}_{600} = 0.6$. La expresión de la proteína se indujo con 0.5mM IPTG y se incubó toda la noche a 20°C o 5 horas a 37°C con agitación constante. Por último, las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos en un rotor JA-14 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a 4°C . Si la purificación no se llevaba a cabo inmediatamente el paquete celular se guardó a -20°C .

4.9.4. Purificación de la proteína SBDS-Flash

El paquete celular de un litro de cultivo se depositó en hielo y se resuspendió en 30ml de buffer de lisis celular, posteriormente se lisaron las células con un sonicador por un tiempo total de 4 min con ciclos de 5 segundos prendido y 10 segundos apagado en hielo para evitar el calentamiento de la muestra y la subsecuente degradación de la proteína. El lisado se centrifugó (rotor JA-14 Beckman Coulter) por 1 hora a 14,000rpm. El sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore de 0.45 μm y se purificó a través de una columna de afinidad al níquel siguiendo el mismo protocolo usado para la proteína EFTUD1. La proteína eluida de la columna de afinidad a Ni^{2+} se dializó contra el buffer de diálisis para columna de intercambio aniónico toda la noche en un cuarto frío con agitación constante. La proteína dializada se introdujo en una columna de intercambio aniónico S-FF con un volumen de cama de 5ml, previamente equilibrada con el buffer de unión A y se eluyó con dos volúmenes de cama del buffer B. El monitoreo de la proteína se realizó por electroforesis SDS-PAGE. La proteína SBDS-Flash se concentró con un centricon (ultra centrifugal filter, millipore MW cutoff 10kDa) y se cuantificó el rendimiento total de la proteína espectroscópicamente a partir del coeficiente de extinción molar de SBDS que es de $11460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a una longitud de onda 280nm. La proteína SBDS-Flash se alicuotó y se guardó a -80°C .

4.10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturizante SDS-PAGE

El monitoreo de la expresión y purificación de las proteínas EFTUD1 y SBDS-Flash se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE al 6 y 12% respectivamente. Las muestras para los geles de SDS-PAGE se mezclaron con el buffer de carga para SDS-PAGE (2X), se utilizó buffer de tanque SDS-PAGE (1X) y se corrieron las muestras a un voltaje constante de 100V. Los geles se tiñeron con solución teñidora SDS-PAGE por 15 minutos y se utilizó la solución desteñidora SDS-PAGE para la observación de las proteínas.

4.11. Precipitación de proteína con ácido tricloroacético (TCA)

La precipitación de proteínas se realizó con ácido tricloroacético (TCA), para ello se agregó un volumen de TCA 50% (p/v) a 2 volúmenes de la elución de la proteína EFTUD1 y se

incubó por 10 minutos a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos para separar la proteína precipitada. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con acetona fría. La acetona remanente se evaporó por calentamiento a 95°C y el pellet se resuspendió en buffer de carga (2X) SDS-PAGE y se calentaron por 10 minutos a 95°C.

5. RESULTADOS

5.1. Fenotipificación de la cepa BCY123 de *S. cerevisiae* y obtención de transformantes

Se verificó que el fenotipo de la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 concordara con lo reportado para su genotipo, esto es, que la cepa fuera efectivamente auxótrofa a uracilo. Se sembraron diluciones seriadas de 1/10 de la cepa BCY123 de *S. cerevisiae* en medio YPD y SD-ura. Las células solo crecieron en el medio rico YPD, y a pesar de que se plaqueó en el medio mínimo SD-ura no hubo crecimiento alguno (Figura 7).

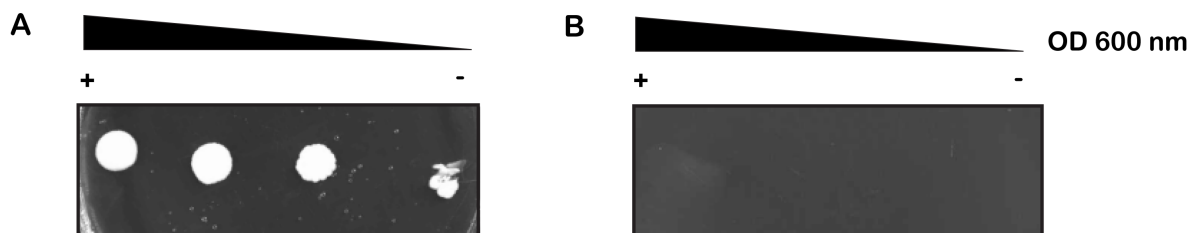


Figura 7. Crecimiento de *S. cerevisiae* BCY123 en A) medio rico YPD y B) en medio mínimo sin uracilo SD-ura.

Una vez corroborado el fenotipo de la cepa BCY123, se procedió a transformarla con el plásmido pRS426-EFTUD1 por el método del acetato de litio. Este plásmido tiene un marcador de selección a uracilo de tal forma que sólo las transformantes en las que se haya complementado dicha auxotrofia podrán crecer en el medio mínimo SD-ura. En la Figura 8 puede apreciarse que la transformación fue altamente eficiente, pues se obtuvo una gran cantidad de transformantes (más de 300 UFC).

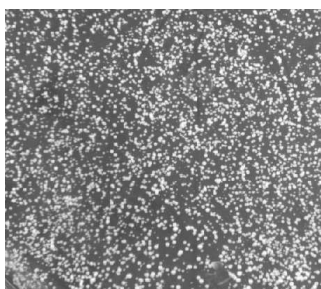


Figura 8. Transformantes positivas de pRS426-EFTUD1 con marcador de selección a uracilo sembradas en medio SD-ura.

5.2. Amplificación por PCR de una secuencia del plásmido pRS426-EFTUD1

Se corroboró la presencia del plásmido pRS426-EFTUD1 en la cepa BCY123 de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se extrajo DNA de las colonias transformantes y su presencia se verificó mediante PCR. Debido a que la secuencia de EFTUD1 contiene 3,400pb, se usaron dos oligonucleótidos que no amplifican la secuencia completa, pero que permite identificar tanto al plásmido como al inserto. Uno de ellos, el oligo M13F, contiene una secuencia que alinea con el plásmido pRS426, mientras que el oligo EftoulR alinea en la secuencia codificante del gen *EFTUD1*. El amplicón resultante de utilizar estos dos oligonucleótidos es de ~ 700 pb y esta colonia positiva fue la que se utilizó para estudios posteriores (Figura 9).

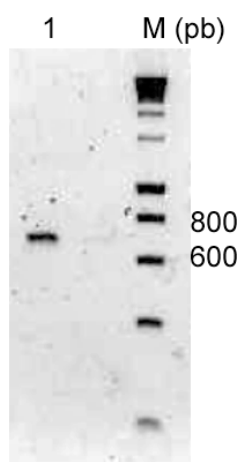


Figura 9. Gel de agarosa 1%, donde se observa producto de ~ 700pb de la PCR de colonias transformadas con el plásmido pRS426-EFTUD1. Carril 1 – amplicón, M - marcador de DNA.

5.3. Detección de la proteína EFTUD1 por Western blot

Se procedió a expresar a la proteína EFTUD1, siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.9.1. Para comprobar que efectivamente la proteína se expresó exitosamente se realizó un western blot con un anticuerpo capaz de identificar la etiqueta de histidinas que se encuentra en el extremo C-terminal de EFTUD1. El peso molecular esperado para esta proteína con la etiqueta de seis histidinas es de 127.8 kDa. La técnica de western blot es altamente sensible y capaz de detectar hasta 0.1 ng de la proteína de interés. El western blot reveló la presencia de una banda muy tenue de alto peso molecular y varias bandas de diferentes intensidades, pero de menor peso molecular que el correspondiente para la proteína completa (Figura 10). Lo anterior sugiere que existe muy poca proteína intacta y la presencia de varias bandas de bajo peso molecular reconocidas por el anticuerpo indican que también pertenecen a la proteína EFTUD1 y que muy probablemente representan fragmentos de degradación. La cepa *S. cerevisiae* BCY123 es una cepa deficiente en proteasas, por lo que resulta notable que este fenómeno se presente. En células de levadura las proteínas que están mal plegadas, dañadas, mutadas o inclusive normales pero que no son requeridas son detectadas por un mecanismo de control de calidad y son mandadas a una ruta celular que se conoce como UPR (unfolded protein response) donde son ubiquitinadas y después degradadas en el citoplasma por el proteosoma. Probablemente la sobreexpresión de la proteína esté provocando algún tipo de estrés que deriva en la degradación de la proteína EFTUD1.

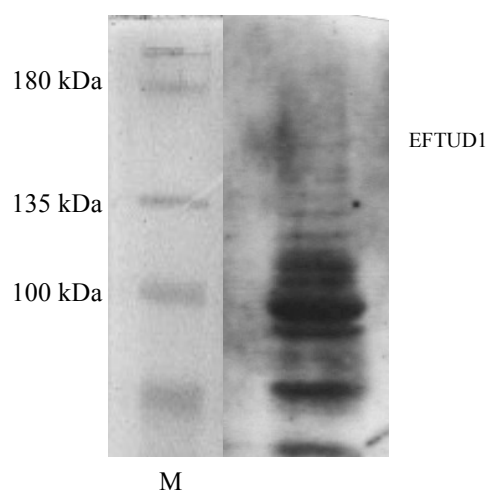


Figura 10. Detección de la proteína EFTUD1 mediante western blot usando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas presente en la proteína. M - marcador de peso molecular See blue® (Invitrogen).

5.4. Actividad proteolítica de un extracto crudo de células de *S. cerevisiae* BCY123

Debido a la degradación proteolítica de EFTUD1 evidenciada en el western blot, se decidió identificar a las proteasas presentes en la muestra por medio de un zimograma. La levadura *S. cerevisiae* tiene tres sistemas proteolíticos reportados por Jones (1991): el proteosoma citosólico, las proteasas vacuolares y las proteasas localizadas dentro de la ruta secretora. En este estudio se centró la atención en el grupo de las proteasas vacuolares ya que éstas se liberan durante la lisis celular. Para la expresión de la proteína EFTUD1 se utilizó a la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 a la cual se le eliminaron los genes *PEP4* y *PRB1* que codifican para las proteasas A y B que son de tipo aspartil y serínproteasa respectivamente. Dichas proteasas son las más abundantes en el sistema proteolítico de *S. cerevisiae*; sin embargo, existen otras proteasas como la carboxipeptidasa Y y dipeptidilaminopeptidasa B que pertenecen al grupo de la serínproteasas y la carboxipeptidasa S, aminopeptidasa I y Co que son metaloproteasas que pudieran estar atacando a la proteína EFTUD1. El peso molecular esperado de las carboxipeptidasas Y y S es de 61 y 64 kDa, de la aminopeptidasa I es de 640kDa, de la aminopeptidasa Co es de 100 kDa y de la dipeptidilaminopeptidasa B es de 120kDa (<http://www.yeastgenome.org/>).

Para comprobar la presencia de las proteasas se utilizaron diferentes inhibidores como PMSF que inhibe a las serinproteasas, EGTA y EDTA que inhiben a las metaloproteasas y Complete Protease Inhibitor + EDTA (Roche)TM, que es un inhibidor de amplio espectro e inhibe a las aspartil-, serin-, metalo y cisteín-proteasas. En la Figura 11 se observaron dos bandas de alto peso molecular en presencia de los siguientes inhibidores: EDTA, EGTA y PMSF a una concentración de 1mM y Complete Protease Inhibitor + EDTATM (Roche), mientras que en las mismas muestras tratadas con 10mM de los inhibidores antes mencionados solo se observó una banda clara. En el control carril 7 se observan tres bandas: las dos bandas de alto peso molecular anteriormente mencionadas y una más de bajo peso molecular. La presencia de estos halos claros indican actividad proteolítica como resultado de la hidrólisis de la gelatina presente en el gel (Figura 11), aunque dicha actividad es baja, ya que para poder distinguirla se tuvo que teñir el gel extensivamente. Sin embargo, esta actividad proteolítica parece ser inespecífica, ya que al usar una alta

concentración de los inhibidores, dos de las bandas desaparecieron sin importar el inhibidor utilizado. En el supuesto caso de que hubiera una metalo-proteasa, se esperaría encontrar un halo claro de hidrólisis en presencia de PMSF, ya que no habría inhibición, pero el mismo halo claro debiera desaparecer con el tratamiento de EDTA o EGTA. Este razonamiento aplicaría para los otros tipos de proteasas; sin embargo, este comportamiento no se observó, lo que sugiere que se trata de proteasas inespecíficas.

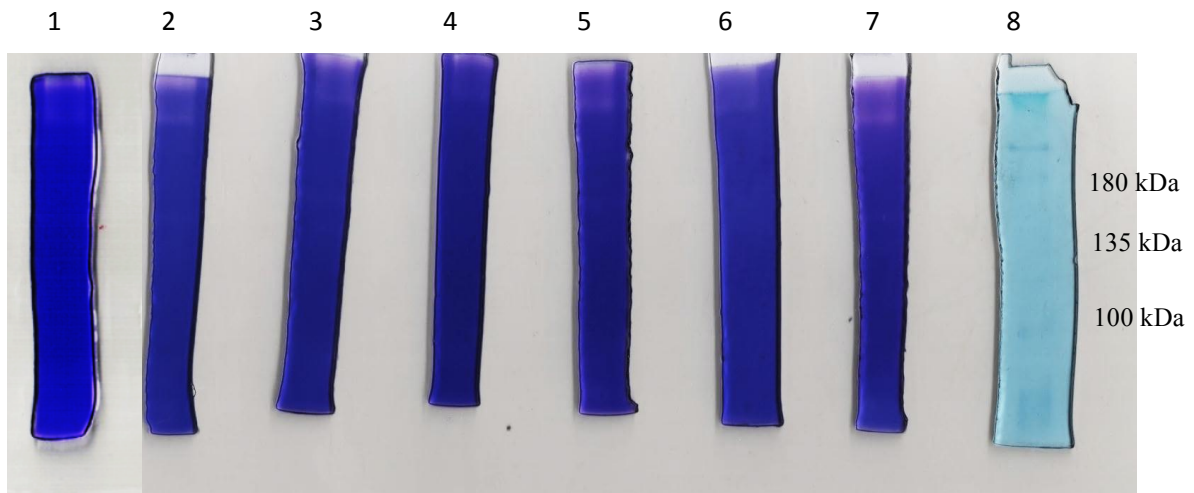


Figura 11. Zimograma de la fracción soluble de un extracto crudo obtenido de la cepa de *S. cerevisiae* BCY123. 1) Complete Protease Inhibitor™ (Roche), 2) PMSF 1mM, 3) EGTA 10mM, 4) EGTA 1mM, 5) EDTA 10mM, 6) EDTA 1mM, 7) control, 8) marcador See Blue™ (Invitrogen).

5.5. Estandarización del método de lisis de células de levadura de *S. cerevisiae*

Se evaluaron dos formas diferentes de lisar a las células de levadura con el objeto de obtener el máximo rendimiento en la cantidad de proteína total obtenida. La ruptura con perlas de vidrio usando el homogenizador bead beater resultó el método óptimo para la ruptura de las células. La aplicación de seis ciclos de homogenización de 1 minuto cada uno a velocidad media y 3 minutos de reposo en hielo resultó en una ruptura superior al 85%. En comparación, el uso del vórtex y perlas de vidrio requirió de 52 ciclos de 1 minuto cada uno seguidos de 3 minutos de reposo en hielo para conseguir el lisado de las células.

En cuanto a la resuspensión del pellet celular, se utilizó una relación 1:1 y 1:2, es decir, por cada gramo de pellet celular se utilizó 1 ó 2 ml de buffer de lisis. La relación 1:2 fue la más rápida ya que la suspensión tenía menos cantidad de células por mililitro, por lo tanto, se necesitaron de menos ciclos de lisado para que ocurriera la lisis celular. Debido a esto, el homogenizador y la resuspensión 1:2 fue el método más eficaz y rápido para lisar a las células de levadura de *S. cerevisiae*.

5.6. Expresión y purificación de EFTUD1

La expresión de la proteína EFTUD1 se realizó de cuatro formas diferentes y en cada una el medio de cultivo fue ligeramente distinto con el fin de evaluar cuál de ellos era el más adecuado para la expresión. La lógica detrás de cada método de expresión fue la siguiente:

Método 1: medio SD-ura + 2% de glucosa hasta una $DO_{600nm} = 0.6$, centrifugar las células y resuspenderlas en medio YPG e inducir por 20hr a 30°C.

El medio SD-ura es un medio selectivo que impide que el plásmido pRS426-EFTUD1 utilizado para la expresión de la proteína se elimine durante la segregación mitótica. Se utilizó glucosa como fuente de carbono, pues es un carbohidrato que favorece el rápido crecimiento de las células, además de que actúa como un represor del promotor *GAL10*, teniendo un mayor control de la expresión génica. Para la inducción, las células se cambiaron a un medio rico como el YPG (galactosa) que favorece la producción de mayor cantidad de proteína, ya que contiene al inductor galactosa y además es rico en nutrientes. La desventaja es que al ser un medio no selectivo, el plásmido se pierde entre un 1.5-5% por cada ciclo de duplicación.

Método 2: medio SD-ura + 2% de glucosa hasta una $DO_{600nm} = 0.6$, adicionar 2% de galactosa e inducir por 20 hr a 30°C.

Este método tiene las mismas bondades de ser selectivo y mantener un control férreo de la expresión, con la desventaja de que la inducción no ocurrirá, aún en presencia de galactosa, si la glucosa no se ha consumido debido a la represión por catabolito.

Método 3: crecer las células en medio SD-ura + 2% de lactato hasta una $DO_{600nm} = 0.6$, adicionar 2% de galactosa e inducir por 20 hr a $30^{\circ}C$.

Para solucionar el problema de la represión por catabolito de glucosa, en este ensayo se usó lactato, que es una fuente de carbono neutra.

Método 4: crecer las células en medio SD-ura + 1% de glucosa hasta una $DO_{600nm} = 2.0$, adicionar 4% galactosa e inducir por 20 hr a $30^{\circ}C$.

Este método contiene un medio selectivo, pero con glucosa en menor proporción, de tal manera que permite el crecimiento inicial de las células, pero al dejar que las células crezcan hasta una densidad óptica mayor que en el método 2, se espera que la glucosa se haya consumido al momento de la inducción. La adición de una cantidad mayor de galactosa se espera sea beneficiosa, pues no solo será usada como inductor sino también como fuente de carbono.

Una vez expresada la proteína mediante las diferentes metodologías antes mencionadas, las células se rompieron de acuerdo a las condiciones de lisis establecidas en la sección anterior y la fracción soluble se purificó a través de una columna de afinidad a Ni^{2+} . El contenido proteico de dichas fracciones se evaluó mediante la técnica de SDS-PAGE (Figura 12).

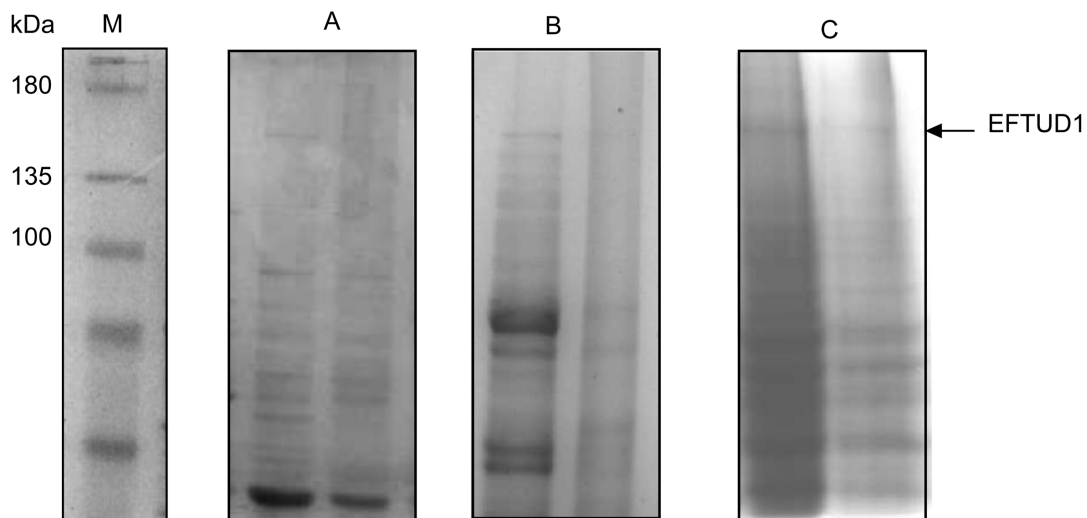


Figura 12. Gel de poliacrilamida al 6% SDS-PAGE mostrando las eluciones obtenidas de la purificación de EFTUD1 a través de la columna de afinidad a níquel. M - marcadores de peso molecular, A - método 1, B -

método 2 y C - método 3. Los carriles de la izquierda corresponden a la fracción de elución precipitada con TCA y los carriles de la derecha corresponden a la fracción eluída sin concentrar.

Los resultados de la Figura 12 muestran que en las condiciones correspondientes a los métodos 1-3 no hay producción de la proteína EFTUD1, ya que no se aprecia una banda correspondiente al peso molecular esperado para EFTUD1. Interesantemente, y como se había observado anteriormente, existe una gran cantidad de bandas de menor peso molecular que se unen a la columna de níquel. Lo anterior sugiere que del mismo modo que lo encontrado en el western-blot (Figura 10) existe una alta degradación de la proteína. En contraparte, el método 4 resultó en la sobreexpresión abundante de la proteína EFTUD1, ya que se observó una banda muy marcada y de un peso molecular de ~ 135kDa que es muy cercano al peso molecular esperado de 127.5kDa. La proteína eluída de la columna de Ni²⁺ se encuentra casi pura y no presenta fragmentos de degradación. Esta muestra subsecuentemente se purificó por una columna de exclusión molecular (Figura 13).

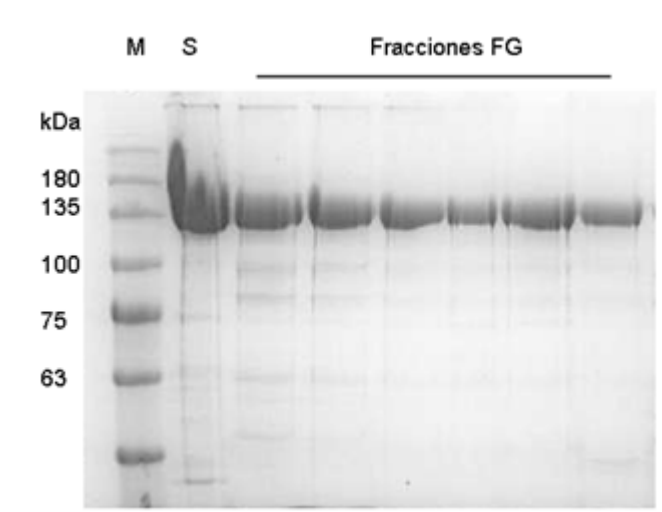


Figura 13. Gel SDS-PAGE de la purificación de la proteína EFTUD1 expresada de acuerdo al método 4 mediante una cromatografía de exclusión molecular. M – marcadores de peso molecular, S – elución de la columna de níquel, FG – diferentes fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular.

Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular de EFTUD1 muestran una proteína enriquecida correspondiente al peso molecular esperado para EFTUD1. Sin embargo, esto no implica que la proteína se encuentre plegada correctamente y que sea activa. Por lo que subsecuentes experimentos, deberán enfocarse a realizar estudios de

Dicroísmo circular y ^1H RMN para corroborar la presencia de estructura secundaria y terciaria respectivamente. Más aún, la presencia de una estructura tridimensional no asegura que la proteína sea activa, por lo que también sería recomendable realizar un ensayo enzimático específico para la actividad de la GTPasa. Los métodos para detectar esta actividad se basan en la detección iones fosfato generados de la hidrólisis de GTP. Entre los métodos comúnmente utilizados para ello se encuentran: 1) ensayos enzimáticos acoplados (Ingerman and Nunnari, 2005; Webb, 1992), 2) ensayos colorimétricos basados en la formación de complejos de fosfomolibdatos (Cogan et al., 1999) y 3) ensayos radioactivos con ^{32}P (Li et al., 1997).

5.7. Expresión y purificación de la proteína SBDS-Flash

La proteína SBDS-Flash se expresó en la cepa de *E. coli* BL21 previamente transformada con el plásmido pRSET-SBDSFlash. Las células se rompieron mediante sonicación y la fracción soluble se purificó por cromatografía de afinidad al níquel (Figura 14). Posteriormente la fracción de elución de la cromatografía de afinidad al níquel se dializó toda la noche y como último paso de purificación se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico (S – FF Amersham), el peso molecular que se observó fue de ~ 31 kDa (Figura 15).

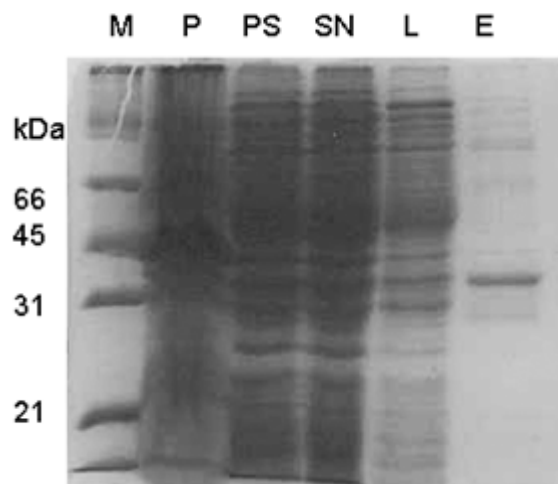


Figura 14. Gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE de la purificación de la proteína SBDS-Flash. Se observan las fracciones de la cromatografía de afinidad a metales y la elución de SBDS-Flash. M – marcador de peso molecular, P – fracción insoluble, PS – fracción soluble, SN – sobrenadante de la columna de afinidad al níquel, L – lavado de la columna, E - elución de SBDS-Flash.

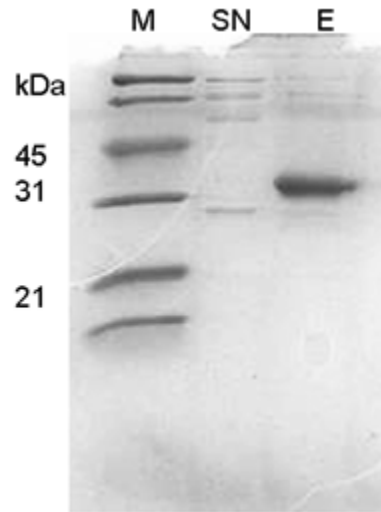


Figura 15. Gel SDS-PAGE de la purificación de la proteína SBSD-Flash mediante una columna de intercambio aniónico. M – marcadores de peso molecular, SN – fracción no retenida por la columna, E – elución.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se expresó y purificó a las proteínas humanas SBDS-Flash y EFTUD1, que se encuentran involucradas en la síntesis de la subunidad ribosomal mayor. Para ello se escogió el sistema más adecuado de expresión heteróloga, que en el caso de la proteína EFTUD1 resultó ser *S. cerevisiae*, mientras que para la proteína SBDS-Flash fue *E. coli*. La expresión recombinante de la proteína silvestre SBDS y de algunos ortólogos termófilos y el de levadura (Sdo1) ha sido exitosa usando *E. coli* como organismo hospedero (Luz et al., 2009; Savchenko et al., 2005; Shammam et al., 2005). Por lo que todo sugería, y tal fue el caso, que la expresión de la proteína SBDS con una modificación menor como la adición de una etiqueta Flash, resultaría adecuada en este mismo sistema. Respecto a la expresión recombinante de EFTUD1 no existían reportes previos de ello. Sin embargo, datos obtenidos en el grupo de trabajo mostraron que *E. coli* si es capaz de expresar a EFTUD1, pero la proteína forma agregados solubles y por tanto no se encuentra bien plegada. Debido a esto, en este trabajo nos avocamos a expresar a EFTUD1 en un sistema de expresión eucarionte. A pesar de que EFTUD1 es una proteína humana, se escogió a la levadura *S. cerevisiae* dada su simplicidad en la manipulación, bajo costo de trabajo y altos rendimientos proteicos. Para lograr la exitosa expresión de EFTUD1, además de seleccionar adecuadamente a la cepa de levadura y al plásmido de expresión, también se optimizó la metodología de ruptura celular y las condiciones de cultivo con miras a obtener el máximo rendimiento posible. Finalmente, se estableció la metodología de purificación para ambas proteínas, tal que en el menor número de etapas cromatográficas se obtuviera la mayor cantidad de proteína pura. El trabajo realizado en esta tesis es el punto de partida de futuras investigaciones, ya que sienta las bases para la obtención de la materia prima para estudios estructurales, biofísicos y enzimáticos posteriores.

6.1. Estandarización del método de lisis celular

La optimización y estandarización del método de lisis de células de levadura es de vital importancia, ya que una eficiente lisis celular evita pérdidas resultantes de no liberar totalmente el contenido celular. La pared celular de *S. cerevisiae* es un organelo altamente

adaptable compuesto principalmente de manoproteínas, β 1-3 y β 1-6 glucanos. El grosor y composición de la pared celular varía de acuerdo a las condiciones de cultivo, fase de crecimiento y estrés (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003; Lipke and Ovalle, 1998). Por tal motivo, fue importante controlar estas variables. La primera etapa de este trabajo consistió en establecer un método de lisis adecuado a nuestras condiciones de cultivo. Para ello la cepa de levadura se dejó durante 18-20 horas en un medio rico, pasado este período las células se centrifugaron y el paquete celular se lisó con dos métodos mecánicos. El primero consistió en utilizar el vórtex y perlas de vidrio y el segundo se realizó con el homogenizador bead beater y perlas de vidrio. Además se analizó el impacto que tenía la concentración de células en la suspensión a lisar. El método más rápido y eficaz fue el bead beater resuspendiendo el pellet celular en una relación de 1 gramo de pellet por 2 ml de buffer de lisis. Esto se debe a que el bead beater es un dispositivo más agresivo que cuenta con aspas y con las perlas de vidrio permite romper la gruesa pared celular de la levadura. La resuspensión 1:2 fue la más rápida pues al haber menos cantidad de células por mililitro la ruptura celular ocurrió con menos ciclos de lisado. El lisar las células en el menor número de etapas repercute a su vez en un mayor rendimiento, pues se evita la posible pérdida de proteína por desnaturalización.

El sistema de expresión se diseñó de manera tal que la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 y el plásmido pRS426-EFTUD1 fueran óptimos para la sobreexpresión de la proteína de interés. Antes de empezar los ensayos de expresión se aseguró de que estos elementos realmente fueran los seleccionados. Para ello, se corroboró que la cepa fuera auxótrofa para uracilo debido a mutaciones en el gen *ura3*. En los cultivos de la cepa BCY123 en medio rico (YPD) y en medio mínimo (SD-ura), la cepa solo creció en medio rico porque éste le proveía uracilo y por lo tanto se comprueba que es auxótrofa para uracilo (**Figura 7**). El plásmido pRS426-EFTUD1 tiene como marcador de selección al gen URA3, por lo que las transformantes que se sembraron en medio mínimo SD-ura completaron la auxotrofia por uracilo y por tanto se pudo concluir que contenían al plásmido pRS426. Finalmente, para asegurar que no solo se trataba del plásmido pRS426 sino del plásmido con la construcción pRS426-EFTUD1, se realizó una segunda prueba mediante PCR. La amplificación positiva a partir de DNA total de las transformantes usando oligos complementarios al vector y al gen

corroboraron que efectivamente las transformantes contenían el plásmido de interés (Figura 9).

6.2. Análisis de las condiciones de cultivo para la sobreexpresión de EFTUD1

Se probaron cuatro métodos para la expresión de la proteína EFTUD1. De acuerdo a los resultados observados en la Figura 12, los primeros tres métodos tuvieron bajos rendimientos, pues no se observó una banda correspondiente a la proteína EFTUD1. La cantidad de proteína total producida en los diferentes métodos se cuantificó por el método de Bradford, que no es selectivo para la proteína de interés.

En la **Error! Reference source not found.** se resumen las características de las condiciones de cultivo utilizadas para la expresión de la proteína EFTUD1 y de acuerdo a esta, el método 1 tuvo un rendimiento de 1.7 mg/L. En este ensayo se utilizó un medio selectivo (SD-ura) que impide que el plásmido pRS426-EFTUD1 se elimine durante la segregación mitótica con glucosa como fuente de carbono, que favoreció el crecimiento celular. El bajo rendimiento probablemente se debió a que durante la inducción las células se cambiaron a un medio no selectivo (YPG), ocasionando la pérdida del plásmido. El método 2 tuvo el rendimiento más bajo de todos (1.18 mg/L cultivo), lo cual se debió muy probablemente a represión por catabolito, ya que en el medio de cultivo se utilizó como fuente de carbono inicial a la glucosa. Esta última probablemente no se había consumido totalmente y la inducción no ocurrió aún en presencia de la galactosa. En el método 3 se utilizó lactato como fuente de carbono neutra para eliminar el problema de la represión por catabolito de glucosa, sin embargo, el rendimiento de EFTUD1 fue de 2mg/L cultivo. En todos estos casos, pese a obtener rendimientos de entre 1-2 mg de proteína/L cultivo, que si se trata de una proteína pura correspondería a un rendimiento aceptable, es claro que no se trata de la proteína EFTUD1, ya que no se observa en el gel y en realidad la señal del reactivo de Bradford se debe a la reacción con fragmentos de degradación de EFTUD1, como se mostró en la sección 3.3.

Finalmente, con el método 4 sí se sobreexpresó la proteína EFTUD1. Este método, a diferencia de los tres anteriores, utilizó glucosa como fuente de carbono en el cultivo de crecimiento pero a una concentración de 1%, la mitad de la usada en los ensayos previos.

Esto aseguró que al momento de la inducción las células ya hubieran consumido por completo la glucosa, eliminando así el fenómeno de represión por catabolito. La segunda diferencia fue la densidad celular, ya que se dejó crecer el cultivo hasta una DO₆₀₀ de 2.5-3, con esto se obtuvo mayor cantidad de células de levaduras disponibles para inducir. La tercera diferencia fue el porcentaje de galactosa (4%), una mayor cantidad de galactosa sirvió tanto como fuente de carbono como inductor para obtener el mayor número de células de levadura presentes en el cultivo. Con los primeros tres métodos se obtuvo bajo rendimiento, y con el método 4 se sobreexpresó la proteína.

Tabla 6.1. Métodos de cultivo utilizados en la expresión de la proteína EFTUD1.

| | Medio de cultivo | Fuente Carbono | DO _{600nm} | Inductor |
|-----------------|------------------|----------------|---------------------|----------------|
| Método 1 | SD-ura | Glucosa 2% | 0.6 | YPGalactosa 2% |
| Método 2 | SD-ura | Glucosa 2% | 0.6 | Galactosa 2% |
| Método 3 | SD-ura | Lactato 2% | 0.6 | Galactosa 2% |
| Método 4 | SD-ura | Glucosa 1% | 2.5-3 | Galactosa 4% |

6.2. Detección de la proteína EFTUD1

El plásmido pRS426-EFTUD1 fue diseñado para la sobreexpresión de la proteína EFTUD1; por este motivo causaba interrogante si la proteína observada en la Figura 12 correspondía a la proteína de interés. La proteína EFTUD1 tiene una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal que puede ser detectada por un anticuerpo mediante un western blot. En el western blot se observó una banda muy tenue de más de 135kDa, característica de EFTUD1 y varias bandas de bajo peso molecular. Esto indica que hay poca proteína completa y que como estos fragmentos fueron reconocidos por el anticuerpo, entonces es muy probable que también pertenezcan a EFTUD1. Los fragmentos de bajo peso molecular probablemente se deban a la degradación de la proteína y no a fragmentos

resultantes de una traducción incompleta, ya que para que estos fragmentos sean reconocidos por el anticuerpo, cuyo epítipo se encuentra en el extremo C-terminal, se debió de haber sintetizado la proteína en su totalidad y después haberse generado los fragmentos. Es muy probable que estos fragmentos se hayan generado después de la síntesis y no durante la lisis, ya que se utilizó un inhibidor de proteasas de amplio espectro durante la ruptura celular. En general, los anticuerpos existentes para la detección de etiquetas de histidina reconocen con alta especificidad secuencias de 4-6 histidinas contiguas sin importar su posición o el contexto de amino ácidos entre los que se encuentre localizada, y secuencias endógenas con estas características son poco frecuentes en las proteínas. Sin embargo, se sabe que los métodos de detección de proteínas basados en anticuerpos requieren de varios lavados para evitar el ruido de fondo inherente a la técnica. Por lo que, no se descarta la posibilidad de que algunas de estas bandas correspondan a señales inespecíficas.

Se ha reportado que algunas proteasas de *Saccharomyces cerevisiae* y de otros hongos son reguladas por la fuente de carbono, nitrógeno y fase de crecimiento (Gonzalez-Lopez et al., 2002; Hansen et al., 1977; Holzer, 1976; Naik et al., 1997). Hansen, et al., (1977) describen que la actividad específica de tres proteasas (A, B y carboxipeptidasa) de *Saccharomyces cerevisiae* se incrementa durante la transición de crecimiento exponencial a crecimiento estacionario y sus niveles de expresión son bajos en medio rico comparado con medio mínimo. Por otro lado, demostraron que los niveles de proteasas son bajos en medios que contienen glucosa como fuente de carbono. La levadura *S. cerevisiae* puede utilizar una variedad de fuentes de carbono, sin embargo, la glucosa y la fructosa son las preferidas. Cuando se utiliza cualquiera de estas dos fuentes, las enzimas requeridas para metabolizar fuentes de carbono alternativas se sintetizan a tasas bajas o no se sintetizan, por lo que la fuente de carbono juega un papel fundamental (Gancedo, 1998). En nuestro experimento uno de los medios de cultivo que se utilizó para expresar la proteína EFTUD1 contenía lactato como fuente de carbono y es factible que esto haya aumentado los niveles de expresión de ciertas proteasas. Por otro lado, es importante destacar que la cepa BCY123 es específica para la sobreexpresión de proteínas y los genes *PEP 4* y *PRB1* que codifican para las proteasas más importantes en *S. cerevisiae* fueron eliminados. Sin embargo, las células de levadura cuentan con otros sistemas proteolíticos como el proteosoma citosólico

que pudieran estar actuando en la proteólisis de EFTUD1 (Jones, 1991). Es bien sabido que la sobreexpresión de proteínas heterólogas está asociada a altos niveles tanto de estrés celular (Mattanovich et al., 2004) como de estrés ambiental (Teixeira et al., 2011). La expresión de altos niveles de una proteína exógena limita los procesos celulares del hospedero al competir por los diferentes sustratos. A nivel celular, el principal mecanismo que limita los niveles de expresión es la respuesta a proteínas desplegadas ó UPR por sus siglas en inglés (Unfolded Protein Response). Durante UPR se inducen chaperonas que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas y que en caso de fallar se activa otro sistema que es la degradación proteica vía retículo endoplásmico (ERAD, endoplasmic reticule associated degradation), en donde proteínas mal plegadas son degradadas por el proteosoma (Mattanovich et al., 2004). No es claro cómo las condiciones utilizadas en el método 4 eliminaron el problema de degradación inespecífica de EFTUD1, pero parece que los factores ambientales jugaron un papel importante para corregir el problema. El uso de una fuente de carbono fácilmente metabolizable, la fase de crecimiento al momento de la inducción y el tiempo de expresión, probablemente disminuyeron los niveles de proteasas y por ende, la proteólisis.

7. CONCLUSIONES

- Factores como fuente de carbono, fase de crecimiento al momento de la inducción y tiempo de inducción, juegan un papel primordial en la sobreexpresión de EFTUD1.
- El método más eficiente para la lisis de grandes cantidades de células de levadura fue un método mecánico mediante fricción con perlas de vidrio y un equipo tipo licuadora (bead beater).
- La purificación de EFTUD1 a un 95% de pureza se logra con una sola etapa mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺.
- La adición de cuatro residuos extras en el extremo C-terminal de la proteína SBDS no modifica su plegamiento y por ende su capacidad de ser expresada en forma heteróloga en *E. coli*.
- La purificación de SBSD-Flash a homogeneidad se logró mediante una cromatografía de afinidad a Ni²⁺ seguida de una cromatografía de intercambio catiónico.

9. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Uscanga, B. and Francois, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology*, 37(3): 268-274.
- Becam, A.M., Nasr, F., Racki, W.J., Zagulski, M. and Herbert, C.J., 2001. Rialp (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular genetics and genomics* : MGG, 266(3): 454-462.
- Boocock, G.R., Morrison, J.A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P.R. and Rommens, J.M., 2003. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet*, 33(1): 97-101.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F., 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348(6297): 125-132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305): 117-127.
- Cogan, E.B., Birrell, G.B. and Griffith, O.H., 1999. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal Biochem*, 271(1): 29-35.
- Dokal, I. and Vulliamy, T., 2008. Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes. *Blood reviews*, 22(3): 141-153.
- Dror, Y. and Freedman, M.H., 2002. Shwachman-diamond syndrome. *British journal of haematology*, 118(3): 701-713.
- 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(9): 917-929.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. and Fasiolo, F., 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313: 17-42.
- Ganapathi, K.A. and Shimamura, A., 2008. Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure. *British journal of haematology*, 141(3): 376-387.
- Gancedo, J.M., 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 62(2): 334-361.
- Gartmann, M., Blau, M., Armache, J.P., Mielke, T., Topf, M. and Beckmann, R., 2010. Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *The Journal of biological chemistry*, 285(20): 14848-14851.
- Gonzalez-Lopez, C.I., Szabo, R., Blanchin-Roland, S. and Gaillardin, C., 2002. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics*, 160(2): 417-427.
- Griffith, D.A., Delipala, C., Leadsham, J., Jarvis, S.M. and Oesterhelt, D., 2003. A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS letters*, 553(1-2): 45-50.
- Guthrie, C.a.F., G.R., 1991. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. In: S.D. Academic Press (Editor), *Methods in Enzymology*.

- Hansen, R.J., Switzer, R.L., Hinze, H. and Holzer, H., 1977. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 496(1): 103-114.
- Haurlyuk, V., 2008. A few strokes to the family portrait of translational GTPases., Uppsala Universitet, Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology., 86 pp.
- Holzer, H., 1976. Proceedings: Characteristics and functions of proteinases and proteinase-inhibitors in yeast. *Journal of biochemistry*, 79(4): 39P.
- Ingerman, E. and Nunnari, J., 2005. A continuous, regenerative coupled GTPase assay for dynamin-related proteins. *Methods in enzymology*, 404: 611-619.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153(1): 163-168.
- Johnson, A.W., Lund, E. and Dahlberg, J., 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends in biochemical sciences*, 27(11): 580-585.
- Jones, E.W., 1991. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 266(13): 7963-7966.
- Karbstein, K., 2007. Role of GTPases in ribosome assembly. *Biopolymers*, 87(1): 1-11.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S. and Ban, N., 2011. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*, 334(6058): 941-948.
- Knorr, D., Shetty, K. J. and Kinsella, J. E. , 1979. Enzymatic lysis of yeast cell walls. *Biotechnol. Bioeng*, 21(11): 2011-2021.
- Kressler, D., Hurt, E. and Bassler, J., 2010. Driving ribosome assembly. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(6): 673-683.
- Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J., 1999. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(12): 7897-7912.
- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D., 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(7): 514-520.
- Leary, D.J. and Huang, S., 2001. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS letters*, 509(2): 145-150.
- Lempiainen, H. and Shore, D., 2009. Growth control and ribosome biogenesis. *Current opinion in cell biology*, 21(6): 855-863.
- Li, G., Mar 2003. GTP-binding Loop, eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Li, R., Zhang, B. and Zheng, Y., 1997. Structural determinants required for the interaction between Rho GTPase and the GTPase-activating domain of p190. *The Journal of biological chemistry*, 272(52): 32830-32835.
- Lipke, P.N. and Ovalle, R., 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, 180(15): 3735-3740.
- Liu, J.M. and Ellis, S.R., 2006. Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood*, 107(12): 4583-4588.
- Luz, J.S., Georg, R.C., Gomes, C.H., Machado-Santelli, G.M. and Oliveira, C.C., 2009. Sdo1p, the yeast orthologue of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein, binds RNA and interacts with nuclear rRNA-processing factors. *Yeast*, 26(5): 287-298.
- Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H. and Sauer, M., 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of biotechnology*, 113(1-3): 121-135.

- Meilhoc, E., Masson, J.M. and Teissie, J., 1990. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Bio/technology*, 8(3): 223-227.
- Naik, R.R., Nebes, V. and Jones, E.W., 1997. Regulation of the proteinase B structural gene PRB1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 179(5): 1469-1474.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J., 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6): 423-488.
- Savchenko, A., Krogan, N., Cort, J.R., Evdokimova, E., Lew, J.M., Yee, A.A., Sanchez-Pulido, L., Andrade, M.A., Bochkarev, A., Watson, J.D., Kennedy, M.A., Greenblatt, J., Hughes, T., Arrowsmith, C.H., Rommens, J.M. and Edwards, A.M., 2005. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 280(19): 19213-19220.
- Senger, B., Lafontaine, D.L., Graindorge, J.S., Gadal, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J.M., Breitenbach, M., Hurt, E. and Fasiolo, F., 2001. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Molecular cell*, 8(6): 1363-1373.
- Shammas, C., Menne, T.F., Hilcenko, C., Michell, S.R., Goyenechea, B., Boocock, G.R., Durie, P.R., Rommens, J.M. and Warren, A.J., 2005. Structural and mutational analysis of the SBDS protein family. Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *The Journal of biological chemistry*, 280(19): 19221-19229.
- Shimamura, A., 2006. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology: 63-71.
- Sprang, S.R., 1997. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*, 66: 639-678.
- Strunk, B.S. and Karbstein, K., 2009. Powering through ribosome assembly. *Rna*, 15(12): 2083-2104.
- Sun, Q., Vila-Sanjurjo, A. and O'Connor, M., 2011. Mutations in the intersubunit bridge regions of 16S rRNA affect decoding and subunit-subunit interactions on the 70S ribosome. *Nucleic acids research*, 39(8): 3321-3330.
- Teixeira, M.C., Mira, N.P. and Sa-Correia, I., 2011. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in biotechnology*, 22(2): 150-156.
- Tschochner, H. and Hurt, E., 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology*, 13(5): 255-263.
- Webb, M.R., 1992. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11): 4884-4887.

8. PERSPECTIVAS

La posibilidad de producir grandes cantidades de las proteínas EFTUD1 y SBDS-Flash con alta pureza constituye la base para que en el futuro cercano se puedan hacer estudios de interacción proteína-proteína y proteína-nucleótidos. En general, este tipo de experimentos contribuirán a ampliar nuestro conocimiento de un proceso biológico fundamental como es la biogénesis ribosomal. La adición de la etiqueta Flash en la proteína SBSD y las mutantes asociadas con el Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond permitirá realizar estudios de fluorescencia anisotrópica para cuantificar la interacción con EFTUD1. La descripción cuantitativa de las constantes de disociación entre EFTUD1 y SBDS dará indicios acerca de la posible pérdida de la interacción entre estas proteínas con el desarrollo de la enfermedad. Además, abre la posibilidad de hacer otros experimentos, como ensayos de cristalización de la proteína EFTUD1 de la que no existe información estructural, estudios de calorimetría o fluorescencia para medir la interacción de EFTUD1 con nucleótidos de guanina. Lo anterior permitirá entender con mayor detalle cómo funciona la proteína EFTUD1 y si existe una intercomunicación en los procesos de reconocimiento por GTP/GDP y por la proteína SBDS o si son independientes uno del otro. Este tipo de estudios proveerá información valiosa de la red de interacciones en que participa EFTUD1 y de la cual solo hay poca información en la literatura.