



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN
EN LA GTPASA EFL1

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
NINA DEL CARMEN CASTRO MORENO



MÉXICO, D.F.

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: NURIA ESTURAU ESCOFET**
VOCAL: **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**
SECRETARIO: **Profesor: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG**
1er. SUPLENTE: **Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR**
2° SUPLENTE: **Profesor: LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE
BIOMACROMOLÉCULAS, LABORATORIO DE BIOQUÍMICA 7**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. EUGENIO DE LA MORA LUGO

SUSTENTANTE:

NINA DEL CARMEN CASTRO MORENO

Agradecimientos

A los apoyos recibidos de CONACyT en el proyecto 167359 "*Estudios del reconocimiento molecular de proteínas involucradas en la maduración ribosomal*" y PAPIIT IN201615 "*Estudios de complementación funcional en la familia de proteínas EFL1/SBDS involucradas en la maduración ribosomal*" por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo.

Let us give wings to the molecular elephants.

John B. Fenn

(Nobel Lecture, 2002)

Índice de contenido

1	Antecedentes	2
1.1	Biogénesis ribosomal en eucariotes	2
1.1.1	Biogénesis ribosomal y las enfermedades.....	4
1.2	Las GTPasas en la biogénesis ribosomal	4
1.3	Efl1	5
1.4	Modificaciones postraduccionales	6
1.4.1	Definición y tipos de modificaciones postraduccionales	6
1.4.2	Fosforilaciones	7
1.4.3	Cinasas	9
1.4.4	Métodos para caracterizar modificaciones postraduccionales.....	11
1.4.4.1	Espectrometría de masas	11
1.4.4.2	Western blot.....	12
2	Objetivos	14
2.1	Objetivos generales	14
2.2	Objetivos particulares	14
3	Hipótesis	15
4	Métodos y materiales.....	16
4.1	Material y reactivos químicos y biológicos	16
4.1.1	Soluciones y amortiguadores	16
4.1.2	Medios de cultivo.....	17
4.2	Expresión recombinante de Efl1 en <i>S. cerevisiae</i>	18
4.3	Expresión recombinante de Efl1 en <i>E. coli</i>	19
4.4	Purificación de proteínas recombinantes	19
4.4.1	Purificación de la GTPasa Efl1 expresada en <i>S. cerevisiae</i>	19

4.4.2	Purificación de la GTPasa Efl1 expresada en <i>E. coli</i>	19
4.4.2.1	Purificación de Efl1 por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺	20
4.4.2.2	Purificación de Efl1 por exclusión molecular	20
4.5	Electroforesis de proteínas	20
4.5.1	Geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS – PAGE)	20
4.5.2	Geles nativos de poliacrilamida.....	21
4.6	Cuantificación de proteína por absorción en el UV	21
4.7	<i>Western blot</i>	22
4.8	Análisis por espectrometría de masas de la GTPasa Efl1	22
4.9	Digestión en gel para la caracterización por espectrometría de masas de proteínas	23
4.9.1	Enriquecimiento de los fosfopéptidos.....	24
4.10	Preparación e introducción de los péptidos de Efl1 al espectrómetro de masas (MALDI-TOF).....	25
4.11	Análisis de los espectros de masas	25
4.11.1	Peptide Mass (Expasy)	26
4.11.2	mMass.....	26
4.11.3	NetPhos.....	26
5	Resultados y discusión	27
5.1	Sobreexpresión de las proteínas recombinantes	27
5.2	Espectros de masas de Efl1 y Efl1 + fosfatasa	28
5.3	<i>Western blots</i> antifosfoserina y antifosfotreonina	29
5.4	Digestión enzimática	30
5.5	Determinación de las fosforilaciones en Efl1 mediante espectrometría de masas	31
5.6	Análisis global.....	36

6	Conclusiones	37
7	Perspectivas	38
8	Referencias bibliográficas.....	39

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de las disoluciones y amortiguadores de pH utilizados.	16
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos.	17
Tabla 3. Preparación de amortiguadores de lavado por columna.	24
Tabla 4. Péptidos identificados de la digestión enzimática de Efl1 con diferentes proteasas: tripsina, Asp-N, Lys-C y quimotripsina.	31
Tabla 5. Resumen de los péptidos fosforilados en Efl1 encontrados mediante digestión con tripsina, quimotripsina, Asp-N y Lys-C, con sus respectivas masas experimentales encontradas con espectrometría de masas.	34

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la biogénesis ribosomal.....	3
Figura 2. Maduración de la subunidad pre-60S mediada por Sdo1 y la GTPasa Efl1..	5
Figura 3. Adición de fosfato a un aminoácido como serina, treonina o tirosina.....	8
Figura 4. Proteín-cinasas.....	10
Figura 5. Procedimiento experimental para realizar un <i>western blot</i>	13
Figura 6. Purificación de la proteína recombinante Efl1 por medio de cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ ..	27
Figura 7. Espectros de masas de la GTPasa Efl1..	29
Figura 8. <i>Western blot</i> de Efl1 usando anticuerpos específicos para reconocer las fosforilaciones.	29
Figura 9. Espectros de masas de péptidos fosforilados en residuos de serina.....	32
Figura 10. Espectros de masas de péptidos fosforilados en residuos de treonina..	33
Figura 11. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína Efl1 en el que se muestran las fosforilaciones encontradas..	35

Resumen

El ribosoma es un complejo molecular fundamental en todas las células ya que está encargado de la síntesis de proteínas requeridas para el mantenimiento celular. Cada partícula ribosomal eucariota está formada por una subunidad menor (40S) y una subunidad mayor (60S). La producción de ribosomas está altamente coordinada en tiempo y espacio, comienza en el nucléolo para su posterior exportación al citoplasma. La biogénesis ribosomal involucra la síntesis coordinada de cuatro RNA ribosomales (25S/28S, 18S, 5.8S y 5S) y 79 proteínas ribosomales. Además, este proceso es asistido por más de 150 proteínas no ribosomales y cerca de 70 RNA pequeños nucleolares (snoRNAs). Antes de participar en el proceso de traducción, ambas presubunidades son exportadas al citoplasma en donde experimentan los últimos pasos de maduración. Particularmente EFL1 y SBDS son dos proteínas accesorias involucradas en la maduración de la subunidad 60S. En conjunto, promueven la liberación del factor de antiasociación eIF6 de la superficie de la subunidad mayor para permitir la formación del ribosoma funcional (80S). Para ello se cree que la energía liberada durante la hidrólisis de GTP por parte de la GTPasa EFL1 es acoplada por SBDS para generar un cambio conformacional en la subunidad 60S que provoca el desprendimiento de eIF6 quien constituye un impedimento estérico entre ambas subunidades ribosomales. La actividad de GTPasa de EFL1 es estimulada tras la unión a las subunidades pre-60S citoplásmicas. Interesantemente, las proteínas EFL1 y SBDS se encuentran conservadas en levadura, teniendo como ortólogos a Efl1 y Sdo1, respectivamente. La proteína humana SBDS se encuentra mutada en los pacientes con el síndrome Shwachman-Diamond.

Actualmente, la espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta complementaria y muy útil en la biología estructural, debido a que nos da información de la estructura y dinámica de los complejos de proteínas, así como de sus modificaciones postraduccionales. En este trabajo se estudió una de las principales modificaciones postraduccionales, la fosforilación, siendo uno de los mecanismos más comunes para la regulación y la modulación dinámica de las funciones celulares. Se encontraron e identificaron varios sitios de fosforilación en la proteína Efl1 en residuos de serina y de treonina. Estos sitios están en los residuos de serina 430, 806, 828, 896 y 1036, así como en los residuos de treonina 982 y 1060. Se desconoce aún su función, pero se cree que podrían ser importantes para la interacción de Efl1 con Sdo1 y con la subunidad ribosomal 60S.

1 Antecedentes

1.1 Biogénesis ribosomal en eucariotes

El ribosoma eucariote es un complejo molecular fundamental en todas las células, ya que es requerido para la síntesis de proteínas. Está formado por una subunidad menor (40S) y una subunidad mayor (60S). A pesar de su función molecular conservada, las subunidades ribosomales eucariotas y procariotas difieren significativamente en tamaño y complejidad (*Saccharomyces cerevisiae*: 40S [18S rRNA, 33 RPs]; 60S [25S, 5.8S, 5S rRNA, 46 RPs] –*Escherichia coli*: 30S [16S rRNA, 21 RPs]; 50S [23S, 5S rRNA, 34 RPs]). [1-3] La síntesis de ribosomas es un proceso energéticamente demandante, ya que en promedio cada segundo se generan 40 nuevos ribosomas en una célula de levadura en crecimiento. [4] La biogénesis ribosomal está estrechamente acoplada con la tasa de crecimiento: las células que se dividen activamente, incluyendo las células cancerígenas, dependen de la biogénesis ribosomal activa, mientras que las células quiescentes o malnutridas interrumpen la producción de nuevas subunidades ribosomales. [1]

La biogénesis ribosomal involucra la síntesis, ensamblaje, modificación y transporte de los cuatro rRNA y las 79 proteínas que conforman las dos subunidades ribosomales. Este proceso es asistido por proteínas no ribosomales que interactúan transitoriamente con las partículas prerribosomales. En total han sido identificados, excluyendo las proteínas ribosomales, más de 170 factores accesorios [5] y cerca de 70 complejos ribonucleolares pequeños (snoRNP). [3-6] Debido a su accesibilidad experimental por métodos genéticos, bioquímicos y celulares, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el modelo eucariote más utilizado para estudiar la formación de ribosomas y la función de los factores accesorios no ribosomales. [1, 4, 5]

La biogénesis de los ribosomas eucariotes depende de la acción concertada de las tres RNA polimerasas (RNA Pol I, II y III) para llevar a cabo la transcripción de los rRNAs. La RNA Pol I produce los rRNA 25S/28S, 5.8S y 18S, la RNA Pol III sintetiza el rRNA 5S, mientras que Pol II transcribe los mRNA de las proteínas ribosomales y de las proteínas accesorias [4].

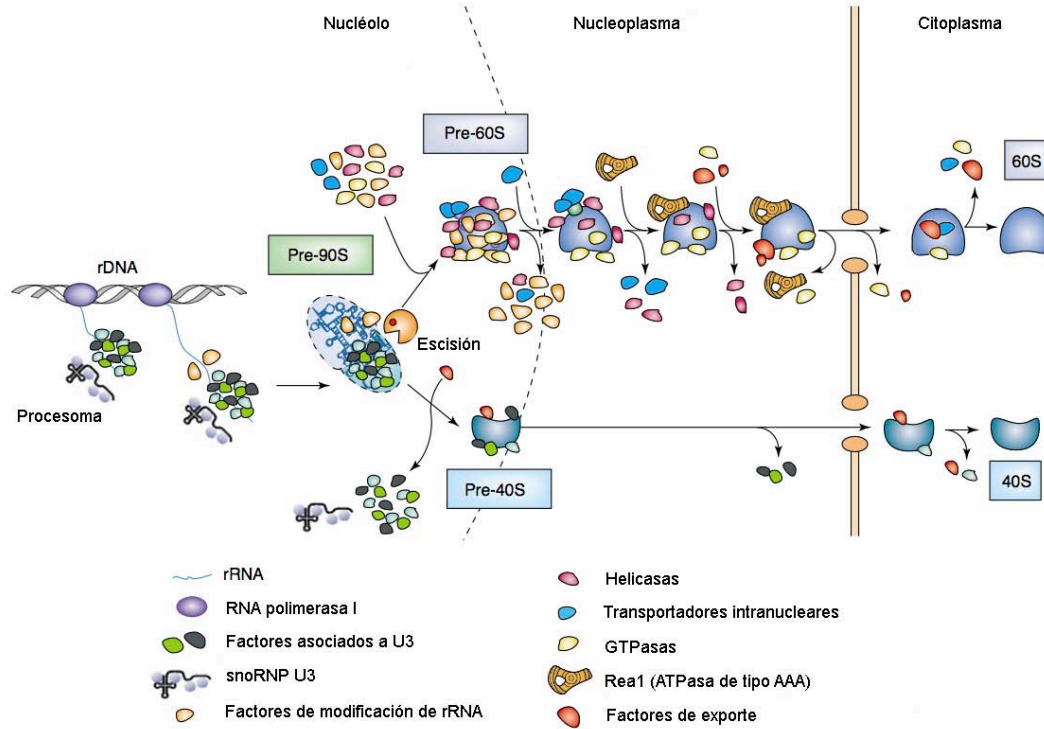


Figura 1. Esquema de la biogénesis ribosomal. La primera partícula prerribosomal detectable es la partícula pre-90S. Esta partícula se separa en las presubunidades pre-40S y pre-60S. Las partículas siguen su maduración en el núcleo. Durante el movimiento desde el nucléolo hacia el poro nuclear, muchos de los factores pre-60S se desmontan de la subunidad naciente en los pasos posteriores, mientras que unas pocas proteínas se asocian transitoriamente en etapas posteriores. La maduración final de ambas subunidades se lleva a cabo en el citoplasma después del paso a través del poro nuclear. (Modificada de [4]).

La primera partícula prerribosomal detectable es la partícula 90S formada principalmente por proteínas estructurales y snoRNPs que se encargan de la modificación postranscripcional del rRNA. La escisión en la región espaciadora entre las secuencias de los rRNA 18S y 5.8S conduce a la separación del prerribosoma 90S en partículas pre-40S y pre-60S. La subsecuente maduración de los precursores de las dos subunidades ocurre en su mayoría de manera independiente y la interferencia de la biogénesis de una de las subunidades permite en la mayoría de los casos la maduración de la otra subunidad ya que pocos factores están involucrados en las dos rutas. Las mutaciones que interfieren con el ensamblaje de cualquiera de las dos subunidades no impiden la exportación de la subunidad afectada. [1-3]

Después del ensamblaje nucleolar y nucleoplásmico, los prerribosomas son exportados al citoplasma a través del complejo de poro nuclear (NPC). Los dos precursores de las subunidades son traslocados como entidades independientes y una vez que las partículas pre-60S y pre-40S llegan al citoplasma, son sometidas a varios pasos de maduración antes de formar al ribosoma traduccionalmente competente. [2, 5] Las últimas modificaciones de las subunidades ribosomales maduras ocurren en el citoplasma. Un ejemplo de uno de los últimos pasos es la acción de la GTPasa citoplásmica Efl1 (homóloga a los factores de elongación EF-G/EF2) en la partícula pre-60S a través del factor Tif6. Tif6 (ortólogo de eIF6 en mamíferos) se asocia con el precursor de las partículas 60S dentro del nucléolo y permanece unido hasta el citoplasma, ahí, la hidrólisis de GTP catalizada por Efl1, provoca la liberación de Tif6 de la subunidad 60S como un paso esencial para la maduración de ésta. [4, 5, 7] Se cree que la liberación de Tif6 es facilitada por cambios conformacionales en la subunidad mayor inducidos por la unión de Efl1.

1.1.1 Biogénesis ribosomal y las enfermedades

Mutaciones en diversas biomoléculas involucradas en la síntesis de ribosomas han sido vinculadas con enfermedades genéticas denominadas ribosomopatías. Muchas de estas enfermedades están asociadas con un grupo de síndromes hereditarios de la insuficiencia de médula ósea, los cuales se caracterizan por números reducidos de células sanguíneas y la predisposición a desarrollar cáncer. Los precursores de los eritrocitos tienen una enorme demanda de ribosomas, debido al elevado número de divisiones celulares y la necesidad de sintetizar una gran cantidad de ribosomas (dedicados a la síntesis de hemoglobina), antes de perder su núcleo. En consecuencia, muchas ribosomopatías presentan afecciones en el sistema hematopoyético como son la anemia de Diamond-Blackfan (DBA), el Síndrome Shwachman-Diamond (SDS), el Síndrome 5q⁻ y la hipoplasia cartílago-pelo. (CHH). [1] El síndrome Shwachman-Diamond (SDS) es un desorden autosómico recesivo que se caracteriza por hematopoyesis deficiente, insuficiencia pancreática exócrina, anomalías del esqueleto, baja estatura y un mayor riesgo de leucemia. El SDS se ha asociado con mutaciones en la proteína SBDS, la cual es ortóloga a la proteína Sdo1 en levadura y que también tiene ortólogos en *Archaea* y plantas. Sdo1 y Efl1 son proteínas citoplásmicas involucradas en la liberación de Tif6 de las subunidades pre-60S. [1, 8]

1.2 Las GTPasas en la biogénesis ribosomal

Las GTPasas son reguladores clave de muchos procesos celulares. Hasta la fecha se han descrito seis GTPasas que participan en la biogénesis ribosomal: Bms1, Efl1/Ria1, Lsg1/Kre35, Nog1, Nug1 y Nug2/Nog2. [1]

La GTPasa Bms1 es esencial en la biogénesis de la 40S mediando la incorporación de Rcl1 en las partículas 90S. Las otras cinco GTPasas están involucradas en diferentes aspectos de la biogénesis de la subunidad 60S. La GTPasa citoplásmica Efl1 estimula la liberación de Tif6, el factor de antiasociación que es reclutado por las partículas pre-60S nucle(ol)ares. La actividad de GTPasa de Efl1 es estimulada tras su unión a las subunidades pre-60S citoplásmicas. Además, como se observa en la **Figura 2**, la disociación de Tif6 es estimulada por Sdo1, el ortólogo de levadura de la proteína humana SBDS mutada en los pacientes con el síndrome Shwachman-Diamond. Dado que la presencia de Tif6 en las subunidades 60S evita la asociación con la subunidad 40S, su liberación es uno de los últimos pasos en la biogénesis de la 60S. [1, 5, 9]

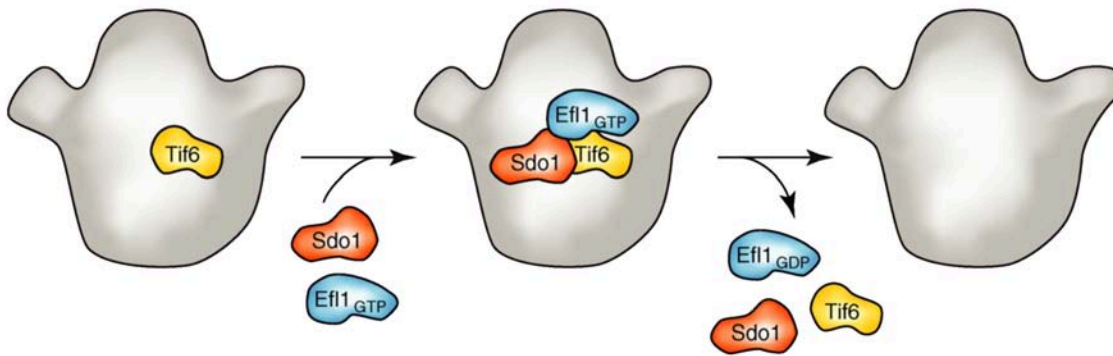


Figura 2. Maduración de la subunidad pre-60S mediada por Sdo1 y la GTPasa Efl1. Sdo1 recluta a Efl1, cuya actividad de GTPasa desencadena la disociación de Tif6 de las partículas pre-60S. (Tomada de [2]).

1.3 Efl1

Efl1 es homóloga a las traslocasas ribosomales EF-G/EF2 y tiene muchas características conservadas de esta familia de proteínas incluyendo el dominio G, el cual está involucrado en la unión e hidrólisis del GTP. De acuerdo con esto, se ha demostrado que Efl1 recombinante es capaz de hidrolizar GTP *in vitro*, y que esta actividad puede ser estimulada varias veces en presencia de la subunidad 60S. [7, 10]

Efl1 no es una proteína esencial en levaduras, pero se requiere de ella para un crecimiento óptimo. Las cepas en las que se elimina Efl1 muestran niveles bajos de polirribosomas y casi no acumulan subunidades 60S. Los análisis de procesamiento de preRNA revelan que las cepas deficientes en Efl1 no pueden realizar la síntesis de los rRNAs 5.8S y 25S. El hecho de que Efl1 sólo pueda ser detectada en el citoplasma indica que juega un papel indirecto en el

procesamiento nucleolar del preRNA y sugiere una participación en una etapa tardía de maduración citoplásmica de la biogénesis de las subunidades 60S. Los estudios genéticos llevaron a la identificación de Tif6, quien actúa como un supresor extragénico de las cepas de Efl1 Δ , así como de las Sdo1 Δ . Tif6 es una proteína nucleolar esencial asociada establemente con las subunidades 60S y es requerida para el procesamiento de los preRNA 5.8S y 25S. La energía proporcionada por Efl1 en la hidrólisis de GTP es usada para una etapa tardía de rearrreglo estructural citoplasmático en los prerribosomas. [5, 7] Debido a las similitudes de Efl1 con el factor de elongación 2 (40% de identidad) se cree que estos cambios conformacionales son similares a los que desencadena EF-2 durante la translocación en la traducción. La hidrólisis de GTP que convierte al complejo EF-Tu·GTP en EF-Tu-GDP+Pi entrega un aminoacil-tRNA al sitio A; mientras que la hidrólisis de GTP por parte de EF-G induce una gran cantidad de rearrreglos del complejo tRNA-mRNA-ribosoma durante la translocación. [7]

Efl1, Sdo1 y Tif6 son tres proteínas conservadas en todos los eucariotes. Sin embargo, los organismos del dominio *Archaea* carecen de ortólogos de la GTPasa Efl1, aunque sí tienen homólogos tanto de Sdo1 como de Tif6. En bacterias no se han descrito homólogos de ninguno de ellos. La homología estructural entre el dominio III de la proteína SBDS de *Archaea* y el dominio V de EF2 respaldan la hipótesis de que Sdo1 puede unirse en la vecindad del centro de GTPasa de la subunidad 60S. Así, Sdo1 podría ser requerida para reclutar transitoriamente a Efl1 al centro de GTPasa de los ribosomas pre-60S citoplásmicos, donde basados en el modo de acción de EF-2 durante la elongación, la hidrólisis de GTP llevada a cabo por Efl1 podría resultar en un rearrreglo estructural del ribosoma pre-60S unido a Tif6, facilitando así la liberación de Tif6. Ya que Tif6 no se encuentra en los ribosomas 80S, Efl1 y Sdo1 juntas pueden vincular la liberación de Tif6 con la unión de las subunidades 60S nacientes al complejo de preiniciación 43S, acoplado así uno de los últimos pasos en la biogénesis al inicio de la traducción. [2, 3, 8, 10]

1.4 Modificaciones postraduccionales

1.4.1 Definición y tipos de modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales son cambios químicos que ocurren en las proteínas después de su síntesis. Las modificaciones pueden ser reversibles o irreversibles, enzimáticas o no enzimáticas. A continuación se presentan algunos de los tipos de modificaciones postraduccionales más comunes en las proteínas:

- Acetilación: adición de un grupo acetilo.

- **Fosforilación: adición de un grupo fosfato.**
- Metilación: adición de un grupo metilo.
- Hidroxilación: adición de un grupo hidroxilo.
- Glicosilación: adición de un carbohidrato.
- Sulfonilación: adición de un grupo sulfato.
- ADP-ribosilación: adición de una molécula de ADP-ribosa.
- Nitrosilación: adición de un grupo nitroxilo.
- Nitración: adición de un grupo nitro.
- Prenilación: adición de moléculas hidrofóbicas.
- Miristoilación: adición de un grupo miristoilo.
- Palmitoilación: adición de un ácido graso.
- Sumoilación: adición de la proteína SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)
- Ubiquitinación: adición de la proteína ubiquitina.

Las modificaciones postraduccionales constituyen uno de los mecanismos más extensos de regulación de la función de proteínas en células y tejidos. La fosforilación de proteínas, en particular, modula dinámicamente numerosas vías de señalización y es controlada por la acción complementaria de proteín-quinasas y proteín-fosfatasas. [11]

1.4.2 Fosforilaciones

Las células son altamente sensibles a su ambiente. La fosforilación de proteínas es una modificación postraducciona ampliamente usada que regula muchos procesos biológicos en las células, la cual consiste en la adición de un grupo fosfato a un aminoácido como serina, treonina o tirosina como se muestra en la **Figura 3**. El fosfoproteoma, que se refiere al perfil de fosforilación de las células, sufre muchos cambios en respuesta a varios estímulos. El fosfoproteoma de las células es altamente complejo, contiene fosforilaciones en proteínas de alta y baja abundancia en múltiples sitios. Para identificar fosforilaciones en proteínas de baja abundancia en un análisis de fosforilación global, es necesario tener un mapeo a fondo del fosfoproteoma. [12]

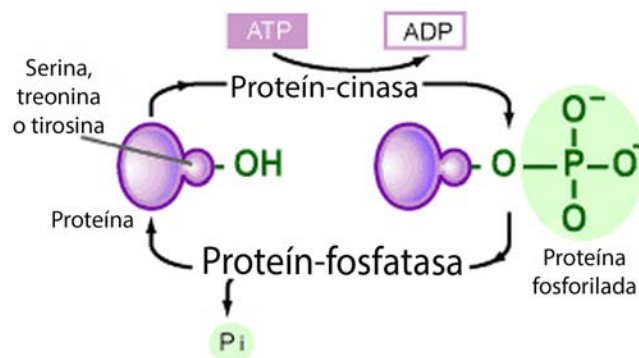


Figura 3. Adición de fosfato a un aminoácido como serina, treonina o tirosina. Las proteín-cinasas convierten el ATP en ADP para fosforilar proteínas, mientras que las proteín-fosfatasas liberan fosfato inorgánico al medio cuando desfosforilan proteínas. (Modificada de [13]).

El mapeo de los sitios de fosforilación es un paso importante hacia la comprensión de su efecto en los eventos de transducción de señales. La secuencia de aminoácidos que rodean a un residuo fosforilado es importante para predecir si un sitio en particular se encuentra fosforilado. [14] La mayoría de los sitios de fosforilación en levadura ocurren en residuos de serina (82.3%), mientras que el resto están en residuos de treonina (17.5%) y tirosina (0.027%). La baja proporción de fosforilaciones en residuos de tirosina se debe a que no existen tirosin-cinasas verdaderas en levadura. Las fosfoproteínas tienen un número alto de interacciones físicas, interactúan sobre todo con otras fosfoproteínas que con proteínas sin fosforilar. La explicación a esto es que las cascadas de señalización a menudo son organizadas en andamios moleculares que promueven la asociación física de las proteínas que participan en la vía de transducción de señales. Están altamente enriquecidas en genes conservados, por lo que se ha demostrado, juegan un papel central en los procesos biológicos haciendo que su conservación sea evolutivamente ventajosa. [15] La fosforilación reversible, llevada a cabo por las cinasas y fosfatasas, ha evolucionado hacia un mecanismo de señalización ubicuo que puede alterar el metabolismo celular en respuesta a cambios en el ambiente. Por ejemplo, la fosforilación de Ef-Tu, uno de los factores de elongación procariotas, regula la interacción de Ef-Tu con el GTP y ha sido demostrada en varios organismos procariotes como *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Streptomyces collinus*. En contraparte, el papel de la fosforilación en varios proteasomas es un poco confuso, porque se han observado efectos tanto positivos como negativos en la actividad del proteasoma y de estabilidad/ensamblaje. [16, 17] Las fosforilaciones afectan a las proteínas en dos formas, proporcionando una carga negativa a la proteína y por las perturbaciones estructurales que generan. [16]

La espectrometría de masas representa una herramienta muy útil para identificar y posteriormente estudiar a largo plazo cómo las fosforilaciones afectan las interacciones y la función de las proteínas. Por ejemplo, se ha demostrado que la fosforilación en los factores de iniciación sirve para regular la traducción de proteínas. [18] El problema más grande es determinar las funciones biológicas de la gran cantidad de sitios fosforilados y su influencia en la dinámica de la

señalización y las redes de interacción de proteínas. Las consecuencias biológicas de la fosforilación de sitios múltiples y de la combinación de diferentes modificaciones postraduccionales, son poco conocidas, se sabe que contribuyen de manera importante a la complejidad biológica, actuando como interruptores o reguladores graduales dependiendo del contexto en el que se encuentren. Un solo polipéptido puede ser modificado en numerosos sitios de fosforilación, u otras clases de modificaciones postraduccionales, produciendo muchas isoformas, cada una con una combinación diferente de modificaciones postraduccionales y, posiblemente, una actividad biológica distinta. [19]

1.4.3 Cinasas

Las proteín-quinasas son las enzimas que catalizan las reacciones de fosforilación, y son esenciales para la regulación de procesos celulares como metabolismo, proliferación, diferenciación y apoptosis. En la **Figura 4** se muestran algunos ejemplos de éstas. [14] La fosforilación de cualquier proteína por una proteín-kinasa puede dar como resultado la activación o la inhibición de una enzima, cambios conformacionales que alteren las propiedades de reconocimiento o la creación de una superficie con distintas propiedades de unión. Estos cambios estimulan un amplio rango de respuestas celulares, dependiendo de las proteínas que se fosforilen. Las proteín-quinasas se han vuelto un blanco importante para el desarrollo de inhibidores con potencial de aplicación terapéutica. [20]

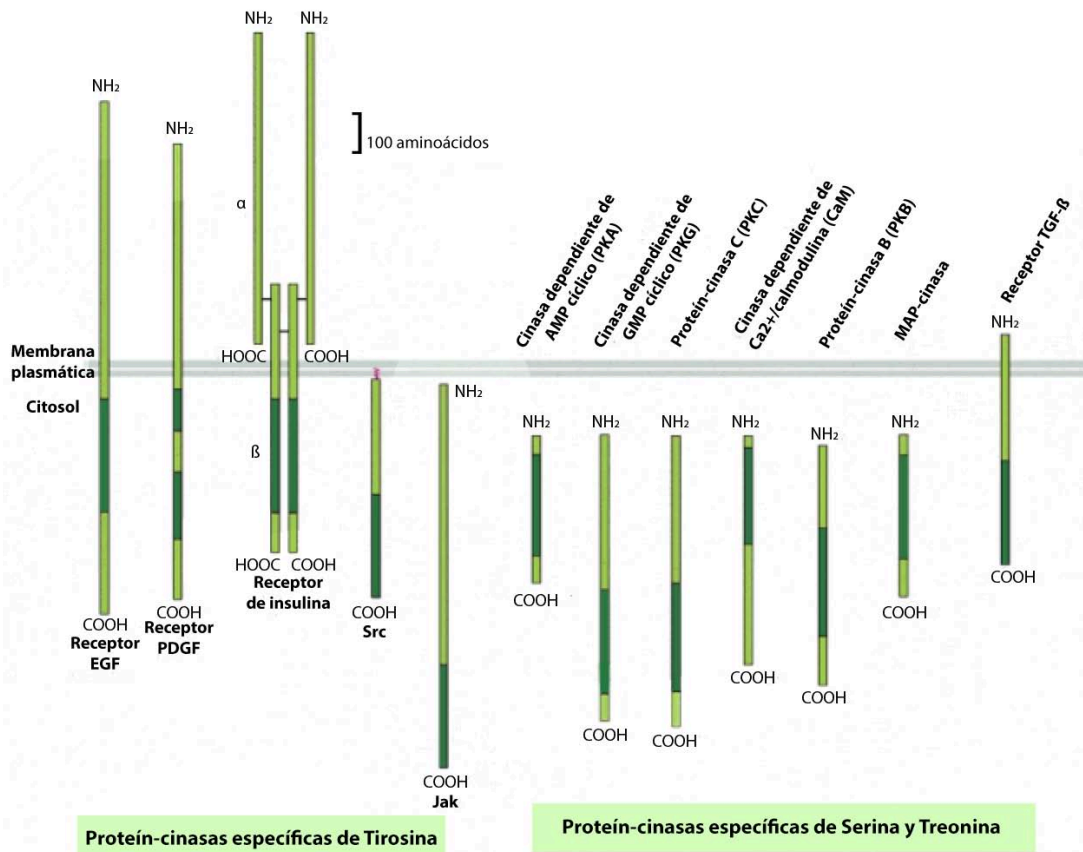


Figura 4. Proteín-quinasas. En color verde oscuro se muestran los dominios catalíticos de las quinasas y constan de aproximadamente 250 aminoácidos. Las tirosin-quinasas están unidas a la membrana plasmática, mientras que la mayoría de las serin/treonin-quinasas están en el citosol. (Modificada de [21]).

La mayoría de las proteín-quinasas se activan en respuesta a una señal celular y catalizan la transferencia del grupo fosfato y proveniente del ATP al grupo hidroxilo de una serina, treonina o tirosina de la proteína blanco. La señal se apaga con la remoción del grupo fosfato por una proteín-fosfatasa, lo que conduce a la proteína a su estado original.

La especificidad de las proteín-quinasas es determinada por los residuos ácidos, básicos o hidrofóbicos adyacentes al residuo fosforilado, pero la gran variación de éstas secuencias adyacentes hace muy difícil la predicción de secuencias blanco de fosforilación los sitios biológicamente activos. Las serin/treonin-quinasas son capaces de fosforilar, como su nombre lo indica, ya sea residuos de serina o treonina en el mismo lugar de la secuencia. Se ha observado que los sitios de fosforilación están localizados en regiones flexibles con el fin de encajar con la hendidura de reconocimiento presente en las quinasas. [14] Las quinasas implicadas

en la biogénesis ribosomal juegan un papel predominante en la formación de la 40S. Sin embargo, debido a sus múltiples sustratos, es probable que tengan funciones celulares adicionales. [1]

1.4.4 Métodos para caracterizar modificaciones postraduccionales

1.4.4.1 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una herramienta complementaria en la biología estructural y se ha convertido en una tecnología de gran importancia en la proteómica para la identificación de proteínas y su interacción con otras biomoléculas. Se ha establecido como un método que permite realizar mediciones muy precisas, ya que mide la relación masa/carga (m/z) de las moléculas presentes. Un espectro de masas puede darnos una idea de la estructura y dinámica de los complejos de proteínas y de sus modificaciones postraduccionales. A valores bajos de m/z se pueden distinguir las masas de pequeñas moléculas y ligandos, mientras que a valores intermedios y altos de m/z se abarcan las distintas proteínas y complejos de proteínas intactas, respectivamente. [22]

Un espectrómetro de masas consta de una fuente de ionización que genera los iones en fase gaseosa, un analizador de masas que mide la proporción m/z de los analitos ionizados y un detector que registra el número de iones en cada valor de m/z . La espectrometría de masas llamada MALDI, por sus siglas en inglés (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) y la ionización por electrospray (ESI) son las técnicas estándar en espectrometría de masas para proteínas, especialmente por la detección de proteínas grandes así como de sus posibles modificaciones postraduccionales, a partir de la determinación de sus masas moleculares exactas. El uso de MALDI es favorecido sobre el de ESI debido a su tolerancia a la presencia de sales comúnmente usadas en las disoluciones de proteína, la velocidad con la que se obtiene el análisis, el rango alto accesible de m/z y la interpretación simple del espectro de masas. [23] Además de medir la relación m/z de un ion en campos eléctricos y/o magnéticos, pueden medir el tiempo de vuelo (siglas en inglés, TOF: *time of flight*). La intensidad de la señal obtenida refleja la abundancia del ion y ésta puede variar con la ionización, por tanto las muestras pueden ser marcadas con isótopos estables para determinar cuantitativamente la proporción de péptidos en diferentes estados (midiendo la relación m/z y la abundancia). [11] A diferencia del análisis de péptidos y de proteínas pequeñas, el cual puede llevarse a cabo en espectrómetros de masas con un rango de m/z bajo, el estudio de complejos macromoleculares intactos requieren un intervalo m/z mayor en el instrumento, ya que las señales de los iones cargados

individualmente a menudo resultan en grandes picos de masa (parcialmente inducidos por la formación de aductos). [24] Aunque otros instrumentos puedan tener rangos de m/z extensos, la técnica más utilizada es la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). Esto no sólo es por el virtualmente ilimitado rango de m/z , sino también por la alta sensibilidad y la velocidad del análisis en TOF. La medición en TOF depende de un haz de iones pulsante, por lo tanto, el desarrollo de equipos que se puedan acoplar a éste es esencial para la espectrometría de masas.

1.4.4.2 Western blot

El *western blot* es un método inmunológico utilizado para detectar proteínas específicas de entre una mezcla de proteínas. [25] También puede ser utilizado para evaluar el tamaño de una proteína o para medir la cantidad de proteína expresada. Este procedimiento fue nombrado así por su similitud con un método inventado previamente conocido como *Southern blot*, llamado así por su inventor Edward Southern. El primer paso en un *western blot* es preparar la muestra de proteína mezclándola con un detergente llamado dodecilsulfato de sodio (SDS) el cual hace que las proteínas se desplieguen en cadenas lineales y entonces las cubre con una carga negativa. Después, las proteínas son separadas de acuerdo a su tamaño utilizando electroforesis en gel. Tras la separación, las proteínas se transfieren del gel a una membrana de transferencia, como se muestra en la **Figura 5**. Una vez que la transferencia se completó, la membrana contiene todas las bandas de proteínas que originalmente estaban en el gel. Después, la membrana se incuba con leche para *blotting* (BioRad) lo cual previene que ocurra cualquier reacción no específica. La membrana es incubada con el anticuerpo primario, el cual reconoce específicamente a la proteína de interés. Siguiendo a la incubación, cualquier molécula de anticuerpo primario que no interaccionó con su molécula blanco es lavada y la membrana se vuelve a incubar, pero esta vez con un anticuerpo secundario que reconoce y se une específicamente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está acoplado a una enzima reportera cuya reacción catalizada produce color o luz, lo cual hace que sea detectado fácilmente. También existen los anticuerpos primarios que ya están acoplados a la enzima reportera. Los anticuerpos unidos son detectados revelando una placa fotográfica que previamente fue expuesta sobre la membrana. Debido a que los anticuerpos sólo se pegan a la proteína de interés, sólo debería ser visible una banda. El grosor o la intensidad de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente. [26]

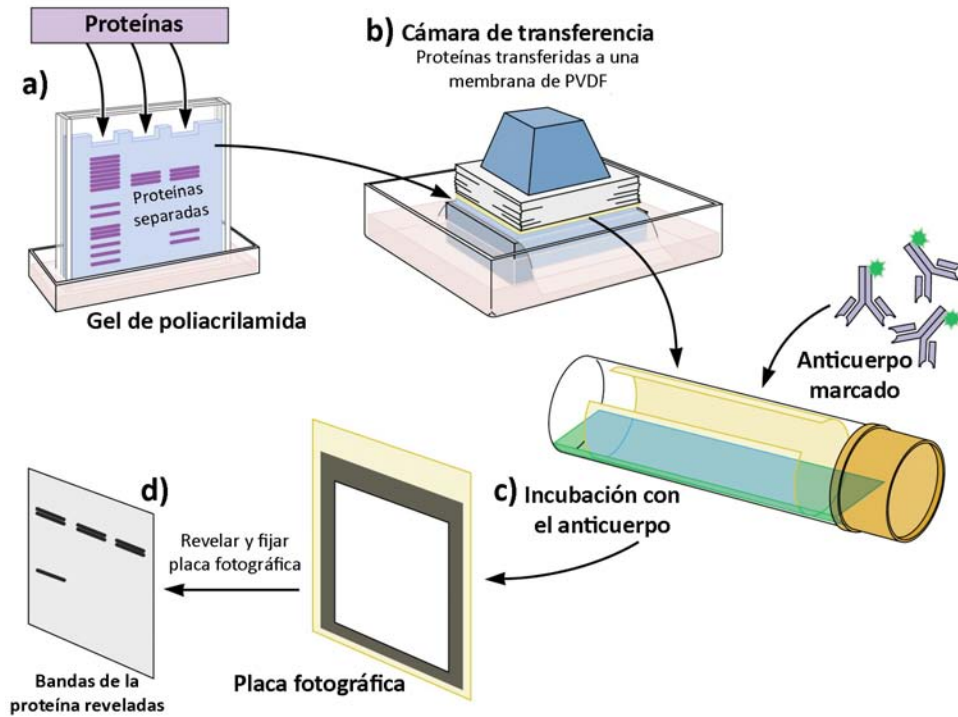


Figura 5. Procedimiento experimental para realizar un *western blot*. a) las proteínas se separan en un gel de poliacrilamida, b) las proteínas separadas en el gel se transfieren a una membrana, c) la membrana se incuba con los anticuerpos deseados, d) se revela con una placa fotográfica. (Modificada de [27])

2 Objetivos

2.1 Objetivos generales

Determinar los sitios específicos de fosforilación de la GTPasa Efl1 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

2.2 Objetivos particulares

- Sobreexpresar la proteína Efl1 en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Confirmar que existen fosforilaciones en Efl1 en residuos de serina y treonina mediante *western blot*.
- Digerir enzimáticamente a la GTPasa Efl1 con diferentes proteasas (tripsina, quimotripsina, y las endoproteinasas Asp-N y Lys-C).
- Determinar la masa experimental de los péptidos resultante de la proteólisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF e identificar las posibles fosforilaciones.

3 Hipótesis

Si la GTPasa Efl1 se encuentra fosforilada, entonces la combinación de métodos como el *western blot* y la espectrometría de masas MALDI-TOF permitirán determinar de manera específica los péptidos fosforilados de ésta.

4 Métodos y materiales

4.1 Material y reactivos químicos y biológicos

El antibiótico kanamicina se adquirió de Sigma Chemical Co. y el antibiótico cloranfenicol se adquirió de ForMedium®. Los reactivos químicos usados fueron adquiridos de Sigma® Chemical Co., BD™ y Merck & Co. Los componentes de los medios de cultivo se compraron a ForMedium®. El inhibidor de proteasas de amplio espectro, ProBlock™ sin EDTA, se obtuvo de la compañía GoldBio Technology®.

Las columnas para enriquecer fosfopéptidos se adquirieron de Thermo Scientific™. Las proteasas utilizadas fueron obtenidas de varias compañías: tripsina y quimotripsina de Promega, endonucleasa lisina-C de Sigma Aldrich® y endonucleasa aspártico-N de Thermo Scientific™.

Las puntas ZipTip® (columna C18 de fase reversa), y las unidades para concentración de proteínas por centrifugación, Amicon Ultra de 0.5, 4 y 15 mL, se compraron a Millipore®. La membrana de diálisis, con poros cuyo tamaño impide el paso de moléculas a partir de 10 000 Da, se obtuvo de Spectrum® Laboratories.

4.1.1 Soluciones y amortiguadores

La composición de las soluciones y amortiguadores de pH comúnmente usados en este trabajo se encuentran listados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de las disoluciones y amortiguadores de pH utilizados.

Soluciones	Componentes
Glucosa al 20%	100 g de glucosa y aforar a 0.5 L con agua desionizada
Galactosa al 20%	200 g de galactosa y aforar a 1 L con agua desionizada
Solución <i>DropOut</i> –leu –trp 100x	0.6 g de leucina y 0.4 g de triptófano en 100 mL de agua desionizada
Amortiguador para lisis de levadura	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 30 mM imidazol
Amortiguador para elución de columna de Ni ²⁺	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 500 mM imidazol
Amortiguador para diálisis para proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl
Amortiguador para diálisis para proteínas de <i>E. coli</i>	50 mM Tris-HCl pH 6.0, 50 mM NaCl
Amortiguador para ruptura de <i>E.</i>	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20

<i>coli</i>	mM imidazol
Amortiguador para gel concentrador	0.5 M Tris-HCl pH 6,8
Amortiguador para gel separador	1.5 M Tris-HCl pH 8,8
Solución fijadora de SDS – PAGE	40% etanol, 10% ácido acético
Inhibidor de proteasas	200 µL de <i>buffer</i> para reconstitución de un vial de ProBlock™ libre de EDTA
Solución Coomassie G-250	0.025% Coomassie G-250, 10% ácido acético
Amortiguador gel nativo	28.8 g glicina, 6 g Tris, 2 L agua destilada
Amortiguador de transferencia <i>western blot</i>	12 mM Trizma Base, 96 mM glicina (agregar metanol al 10% antes de utilizarlo)
Amortiguador TBS <i>western blot</i>	100 mM Trizma Base, 140 mM NaCl
Amortiguador TBST <i>western blot</i>	100 mM Trizma Base, 140 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (debe ajustarse el pH a 8.0 antes de agregar Tween)
Stock kanamicina 1000x	500 mg de kanamicina en 10 mL de agua destilada. Filtrar a través de una membrana de 0.22 µm para esterilizar. Alicuotar y guardar a -20° C.
Stock cloranfenicol 1000x	340 mg de cloranfenicol en 10 mL de etanol 100%. Filtrar a través de una membrana de 0.22 µm para esterilizar. Alicuotar y guardar a -20° C.
Solución de rojo de Ponceau	1 g de Ponceau en 50 mL de ácido acético, aforar a 1 L con agua destilada. Guardar a 4° C.

4.1.2 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo sólido y líquido utilizados en este trabajo se enlista en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos.

Soluciones	Componentes
SD-URA	Se disolvieron en 1 L de agua desionizada: 12 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 16.5 g de casaminoácidos, 200 mg de adenina y 150 mg de tirosina.
LB líquido	Se disolvieron en 1 L de agua desionizada: 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona.

LB sólido + kanamicina + cloranfenicol	Se disolvieron en 1 L de agua desionizada: 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 20 g de agar. Posterior a la esterilización y cuando el medio se encontraba a una temperatura de 40° C se le agregaron 50 µg/mL kanamicina y 30 µg/mL cloranfenicol.
YEPD	Se disolvieron en 900 mL de agua desionizada: 25 g de agar, 11 g de extracto de levadura, 22 g de peptona y 55 mg de sulfato de adenina. Se autoclaveó, y cuando el medio se encontraba a temperatura ambiente se agregaron 100 mL de glucosa al 20%.

4.2 Expresión recombinante de Efl1 en *S. cerevisiae*

La construcción del vector para la sobreexpresión de la GTPasa Efl1 en *S. cerevisiae* y su transformación de células fue hecha por la Dra. Nuria Sánchez Puig, en el laboratorio Bioquímica 7 del Instituto de Química. El vector de expresión de la GTPasa contiene el gen correspondiente a la secuencia codificante de Efl1 (UniProtKB: P53893.1) a la cual se le añadió un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y una etiqueta de seis histidinas en el extremo C-terminal. La construcción fue insertada en el plásmido pRS426. La expresión de los genes se encuentra regulada por el promotor *GAL1* y la secuencia terminadora *MAT α* . El vector pRS426 contiene como marcador de selección en levadura la complementación genética de la auxotrofia a uracilo por la presencia del gen *URA3*, que le confiere la capacidad de crecer en un medio sin uracilo. Como cepa de expresión se utilizó *S. cerevisiae* BCY123. [28] Se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* BCY123, previamente transformada con el plásmido pRS426, en 20 mL de medio SD-URA suplementado con 2% de glucosa y *DropOut* -leu-trp 1X. Se dejó crecer toda la noche con agitación constante de 200 rpm a 30° C en el equipo Excella E24 Incubator Shaker™ (New Brunswick). Se tomaron 10 mL de estas células para inocular 1 L del mismo medio con una OD₆₀₀ final de aproximadamente 0.05. Este cultivo se incubó con agitación constante de 200 rpm a 30° C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 2.0. Una vez alcanzada esta OD₆₀₀ se indujo con una concentración final de 2.8% de galactosa y se incubó con agitación constante de 200 rpm a 30° C durante 16 – 18 h. Pasado este tiempo, se colectaron las células por centrifugación a 5 000 rpm por 6 min en una centrifuga Thermo Scientific™ MegaFuge 16R. La pastilla celular se guardó a -20°C. La manipulación de reactivos se llevó a cabo en zona estéril en campana de flujo laminar ESCO®.

4.3 Expresión recombinante de Efl1 en *E. coli*

La construcción del vector para la sobreexpresión de la GTPasa Efl1 en *E. coli* y su transformación de células de *E. coli* BL21 pRIL fue hecha por el alumno de doctorado Axel Luviano Jardón en el laboratorio Bioquímica 7 del Instituto de Química. La cepa *E. coli* BL21 pRIL contiene un plásmido donde se encuentran codificados los tRNAs *argU*, *ileY*, *leuW* y cuyo marcador de selección de resistencia es cloranfenicol. La secuencia codificante de Efl1 se clonó en el vector pET28a cuyo marcador de selección en bacteria es la resistencia a kanamicina. Células de *E. coli* BL21 pRIL previamente transformadas con el plásmido pET28-Efl1 se inocularon en 30 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina y 30 µg/mL de cloranfenicol, y se incubaron toda la noche a 37° C. Se tomaron 10 mL de este cultivo para inocular 1 L de medio LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol que se incubó con agitación constante de 200 rpm a 37° C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5 – 0.7. Alcanzado este punto, la expresión de Efl1 se indujo con IPTG a una concentración final de 0.25 mM para ser incubado nuevamente durante 24 h a 15° C. Al término de esta etapa se centrifugó el cultivo por 8 min a 5 000 rpm en una centrifuga Thermo Scientific™ MegaFuge 16R, se eliminó el sobrenadante y el pellet se guardó a -20° C. El manejo de reactivos se realizó en zona estéril en una campana de flujo laminar ESCO®.

4.4 Purificación de proteínas recombinantes

4.4.1 Purificación de la GTPasa Efl1 expresada en *S. cerevisiae*

Se descongeló el paquete celular proveniente de 1 L de cultivo y se resuspendieron en 15 mL de amortiguador para lisis, suplementado con 150 µL de inhibidor de proteasas ProBlock™-EDTA. La suspensión de células se vació en el contenedor del *BeadBeater* previamente llenado hasta la mitad con perlas de vidrio (Ø = 500 µm) humedecidas con el mismo amortiguador hasta llenar el contenedor. Las células se lisaron a 4° C, realizando dos ciclos de tres minutos, con diez minutos de reposo entre cada ciclo para evitar que la temperatura aumentara. El lisado se recuperó en un tubo de 50 mL diluido con 10 mL de amortiguador para lisis y se centrifugó a 15 000 rpm durante 45 min en una centrifuga Beckman-Coulter®, rotor JA-17. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm.

4.4.2 Purificación de la GTPasa Efl1 expresada en *E. coli*¹

Se descongeló el paquete celular proveniente de 1 L de cultivo y se resuspendieron 8 mL de amortiguador de lisis. La suspensión celular se colocó en

¹ Trabajar lo más rápido posible y mantener la muestra y soluciones en frío.

un frasco pequeño y éste a su vez se colocó sobre un vaso con hielo suficiente para cubrirlo.² Las células se lisaron en un sonicador Misonix Sonicator® 3 000 durante 4 minutos totales con una potencia de 5.5 en intervalos de 10 segundos de sonicación y 30 segundos entre cada pulso.³ El lisado se centrifugó a 15 000 rpm por 45 min en una centrífuga Beckman-Coulter®, rotor JA-17 a 4°C.

4.4.2.1 Purificación de Efl1 por cromatografía de afinidad a Ni²⁺

La purificación por cromatografía de afinidad a níquel se llevó a cabo en una columna HisTrap™ (GE Healthcare Life Sciences) de 5 mL. Se lavó la columna con cuatro volúmenes de columna (20 mL) de ddH₂O, seguidos de 20 mL de amortiguador de lisis para equilibrarla. Se inyectó el volumen de muestra a través de la columna y se hizo un lavado con 20 mL con amortiguador para lisis para eluir las proteínas que interaccionan inespecíficamente con la columna. Por último se hizo la elución con 10 mL, dos volúmenes de columna, del amortiguador de elución y un lavado de 10 mL con el mismo amortiguador.

4.4.2.2 Purificación de Efl1 por exclusión molecular

Se equilibró la columna con amortiguador de diálisis. Se inyectaron de 2 a 3 mL de la elución en una columna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Life Sciences) a un flujo de 1 mL por minuto y se colectaron fracciones de 2 mL a partir de los 40 mL correspondientes al volumen muerto.

4.5 Electroforesis de proteínas

4.5.1 Geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS – PAGE)

Para evaluar el proceso de purificación de la proteína se llevó a cabo una electroforesis SDS – PAGE en geles de poliacrilamida al 7.5 %. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250. El gel separador se preparó mezclando 763 µL de agua ddH₂O, 1 250 µL de tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 937 µL de acrilamida 40%, 40 µL de PSA, 50 µL de SDS 10% y 10 µL de TEMED. El gel concentrador se preparó mezclando 1267 µL de agua ddH₂O, 500 µL de tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 203 µL de acrilamida 40%, 30 µL de PSA, 20 µL de SDS 10% y 5 µL de TEMED. Una vez incorporados todos los componentes del gel separador, la mezcla se vertió en el dispositivo previamente armado y en la superficie se agregaron 100 µL de isopropanol al 60% para evitar que el borde superior fuese irregular. Al finalizar la polimerización, se retiró el isopropanol realizando un lavado con agua, se vertió la

² Colocar, con cuidado, la punta del sonicador en el vaso con las células resuspendidas hasta que ésta toque la base del vaso y después levantar un poco la punta y fijar el sonicador de tal manera que quede lo más cerca de la base pero sin tocarla

³ No permitir que, durante la sonicación, la punta del sonicador rebese la mitad superior del lisado porque se forman burbujas y deja de sonicar.

mezcla del gel concentrador hasta el borde del dispositivo y se insertaron los peines que darían lugar a los pozos para cargar las muestras. La electroforesis se realizó aplicando un potencial eléctrico de 90 V durante 15 minutos y de 120 V durante hora y media. El gel se fijó colocándolo primeramente en solución fijadora por 5 min y posteriormente en solución teñidora de Coomassie por 20 min. Finalmente el gel se destiñó con agua destilada durante una hora en agitación.

4.5.2 Geles nativos de poliacrilamida

El gel se preparó mezclando 2.5 mL de acrilamida al 40%, 2.5 mL del amortiguador de separación 1.5 M y 5 mL de agua desionizada. Después se agregaron 50 µL de persulfato de amonio al 10% y 10 µL de TEMED. Se vertió la mezcla entre los vidrios y se colocó el peine. La acrilamida se dejó polimerizar durante una hora. La muestra se preparó mezclando 10 µL de la proteína y 10 µL de *buffer* de carga (0.187 M Tris/HCl pH 6.8, 30% glicerol y 80 µg/mL de azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo con un potencial eléctrico de 100 V durante tres horas. El gel se tiñó con azul de Coomassie y destiñó con agua destilada.

4.6 Cuantificación de proteína por absorción en el UV

La concentración de proteína se determinó mediante espectrofotometría de absorción en el UV a 280 nm en un espectrofotómetro BioSpec-nano de Shimadzu. Para la determinación se ajustó el blanco con el amortiguador en el que se almacena la proteína y a partir de la ecuación correspondiente a la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración.

$$A = \epsilon * l * C \quad (1)$$

Donde **A** es la cantidad de luz absorbida por un compuesto con base en su concentración **C**. ϵ corresponde al coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$) y **l** a la longitud que recorre la luz a través de la muestra (cm^{-1}).

Los valores de los coeficientes de extinción molar a 280 nm se calcularon a partir de la composición de aminoácidos de las proteínas usando la siguiente ecuación.

$$\epsilon_{280} = a \cdot \epsilon_{280}^{Trp} + b \cdot \epsilon_{280}^{Tyr} + c \cdot \epsilon_{280}^{Cys} \quad (2)$$

Donde a, b y c corresponden al número de triptófanos, tirosinas y cistinas presentes en la proteína. ϵ_{280}^{Trp} , ϵ_{280}^{Tyr} y ϵ_{280}^{Cys} corresponden a los coeficientes de extinción molar del triptófano ($5,502 M^{-1}cm^{-1}$), tirosina ($1,209 M^{-1}cm^{-1}$) y cistina

($120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 280 nm respectivamente. De acuerdo con lo anterior, el coeficiente de extinción molar de Efl1 es $\epsilon_{280} = 83\,770 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7 Western blot⁴

Se corrió un gel SDS – PAGE como se describe en la sección 4.5.1. Se cortó un pedazo de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) del tamaño del gel SDS – PAGE. Se sumergió durante 5 minutos en metanol al 100% y después se transfirió a un recipiente con agua mili-Q. Se equilibró la membrana en amortiguador de transferencia durante 5 minutos. Concluida la electroforesis, el gel SDS – PAGE se remojó en un recipiente con amortiguador de transferencia, así como cuatro pedazos de papel filtro extra grueso. Se colocaron dos de estos pedazos en la cámara, sobre ellos se colocó la membrana, después el gel SDS – PAGE y por último los otros dos pedazos de papel filtro formando un sándwich. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia semiseca a 20 V por 30 minutos. Una vez terminada la transferencia, se colocó la membrana de PVDF en una solución de rojo de Ponceau para verificar que se hubieran transferido las proteínas. Se destiñó realizando tres lavados con amortiguador TBST. Se bloqueó la membrana con leche al 1 % en amortiguador TBST y se adicionó el anticuerpo primario (antifososerina o antifosfotreonina abcam®) en una dilución 1:125 toda la noche a 4° C. Al día siguiente, la membrana se lavó por triplicado durante 5 minutos con amortiguador TBST, y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (anticonejo abcam®) en una dilución 1:10000 durante dos horas a 37° C. Se lavó por triplicado durante 5 minutos con amortiguador TBST. Antes de revelar la membrana, se preparó la mezcla para la reacción de peroxidasa (Thermo Scientific™) mezclando en proporción 1:1 el sustrato quimioluminiscente y el potenciador y se colocó sobre la membrana. La membrana se colocó en un *cassette* para películas de rayos X para mantenerla en oscuridad y se llevó al cuarto oscuro para revelar.

4.8 Análisis por espectrometría de masas de la GTPasa Efl1

Para poder analizar la proteína Efl1 en el equipo MALDI TOF se dializó contra un amortiguador (NaCl 25 mM y Tris 25 mM)⁵ toda la noche a 4° C. Asimismo, se preparó una muestra con fosfatasa para desfosforilar a Efl1 y ésta se dializó e incubó con la fosfatasa al mismo tiempo toda la noche a 4° C. Se tomaron 2 μL de

⁴ La mínima cantidad de proteína que puede ser detectada mediante un *western blot* es de aproximadamente 1 – 5 ng.

⁵ Máxima concentración de sal con la que puede trabajar el espectrómetro de masas y mínima en la Efl1 se encuentra estable.

cada muestra para analizarla. Se calibró el equipo con BSA; ya que su monómero tiene una masa molecular de 66.5 kDa y su dímero de 133 kDa. La matriz que se utilizó tanto para el calibrador como para la muestra fue el ácido sinapínico (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico). Se utilizó el modo lineal positivo ya que es el indicado para péptidos y proteínas. La potencia del láser fue del 50% y se realizaron 200 disparos por muestra.

4.9 Digestión en gel para la caracterización por espectrometría de masas de proteínas

El protocolo para obtención de péptidos a partir de bandas de un gel SDS – PAGE descrito a continuación fue modificado de Shevchenko et al 2006. [29]

Para el lavado de bandas se cortó del gel SDS – PAGE la banda de la proteína a digerir, aproximadamente de 1 mm de largo y se colocó en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL. Se lavó con agua suficiente para cubrir la banda (300 – 500 μ L) y se dejó reposando por 5 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos en una microcentrífuga miniSpin plus de Eppendorf® y se retiró el líquido. Posteriormente, se agregó un volumen de acetonitrilo (ACN) correspondiente al doble o triple (\approx 700 μ L) del que ocupaba la banda y se incubó a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. Se retiró el líquido y finalmente se secó con vacío. Seguido de esto, para provocar la reducción y carbamidometilación de los puentes disulfuro, a la banda se le agregaron 500 μ L de una disolución de ditrioteitol (DTT) 10 mM y NH_4HCO_3 100 mM y se incubó a 56° C durante 30 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. Se retiró el líquido. Después, se incubó con ACN a temperatura ambiente por 5 minutos. Se retiró el líquido y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con yodoacetamida⁶ 50 mM en NH_4HCO_3 100 mM (volumen final 500 μ L). Se retiró el líquido.

Posteriormente, se lavó con 500 μ L de NH_4HCO_3 durante 15 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y se retiró el líquido. Se incubó con ACN a temperatura ambiente por 5 minutos. Se volvió a centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos, se retiró el líquido y se secó con vacío. Para decolorar los fragmentos, se rehidrató la banda durante 15 minutos con 250 μ L de NH_4HCO_3 100 mM y se añadieron 250 μ L de ACN. Se agitó durante 20 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y se retiró el líquido. Se incubó con ACN a temperatura ambiente por 5 minutos. Se retiró el líquido y se secó con vacío.⁷ Y por último,

⁶ Esta disolución debe ser preparada al momento.

⁷ Si hay restos de colorante, debe repetirse el proceso hasta que la banda sea completamente blanca.

para la digestión enzimática y extracción de los productos de digestión, se rehidrató la banda durante 40 minutos a 4° C con 500 µL de NH₄HCO₃ 25 mM y se retiró el líquido. Se preincubó una hora a temperatura ambiente con las diferentes proteasas:

- 1 µL de tripsina (1 µg/µL) en 39 µL de amortiguador de digestión (NH₄HCO₃ 40 mM, 10% ACN)
- 1 µL de quimotripsina (0.5 µg/µL) en 39 µL de amortiguador de digestión (Tris-HCl 100 mM, 10 mM CaCl₂)
- 1 µL de lisina-C (0.1 µg/µL) en 39 µL de amortiguador de digestión (100 mM NH₄HCO₃ pH = 8.5)
- 5 µL de aspártico-N (0.032 µg/µL) en 35 µL de amortiguador de digestión (250 mM Tris-HCl, ZnOAc 2.5 mM pH = 8.0)

Pasada la hora, se agregaron 40 µL de su respectivo amortiguador de digestión y se incubó toda la noche a 37° C. Se retiró el líquido y se pasó a otro tubo para secar la muestra por centrifugación a vacío (SpeedVac) hasta que el tubo estuviera completamente seco (≈45 minutos a alta temperatura).

4.9.1 Enriquecimiento de los fosfopéptidos⁸

La preparación de los amortiguadores de lavado se describe en la **Tabla 3**. Todos los demás reactivos son parte del kit “*Fe-NTA Phosphopeptide Enrichment Kit*” de Thermo Scientific™.

Tabla 3. Preparación de amortiguadores de lavado por columna.

Amortiguadores de lavado	
Amortiguador de lavado A	
<i>Wash buffer 2X stock</i>	150 µL
Agua desionizada	150 µL
Amortiguador de lavado B	
<i>Wash buffer 2X stock</i>	150 µL
Acetonitrilo	30 µL
Agua desionizada	120 µL

La muestra proveniente del SpeedVac se resuspendió en 200 µL de *buffer* de unión, ésta se transfirió a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos en agitación de doble rotación. Terminando esta incubación, se removió la tapa inferior de la columna y se colocó en un tubo para microcentrífuga. Se centrifugó a 1 000 g por 1 minuto y se transfirió la columna a un nuevo tubo. Se guardó el eluato sobrante para después analizarlo.

⁸ Cada columna puede enriquecer hasta 150 µg de fosfopéptidos.

Se agregaron 100 µL de amortiguador de lavado A a la columna y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 1 000 g por 1 minuto. Esto se hizo por duplicado y se guardó el eluato sobrante para después analizarlo. Después, se agregaron 100 µL de amortiguador de lavado B a la columna y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 1 000 g por 1 minuto. Esto se hizo por duplicado y se guardó el eluato sobrante para después analizarlo. Finalmente, para equilibrar la resina para elución, se agregaron 100 µL de agua desionizada a la columna y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 1 000 g por 1 minuto y la columna se transfirió a un tubo nuevo.

Se agregaron 50 µL de amortiguador de elución a la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 1 000 g por 1 minuto. Esto se hizo por duplicado. Se agregaron 200 µL de TFA 2.5%. Los eluatos de los pasos anteriores y éste se centrifugaron a vacío (SpeedVac) por una hora en alta temperatura.

4.10 Preparación e introducción de los péptidos de Efl1 al espectrómetro de masas (MALDI-TOF)

Se resuspendió la muestra proveniente del SpeedVac en una solución de 20 µL TFA al 0.1%. Se tomó el volumen del paso anterior con una punta ZipTip® y se hicieron tres ciclos de pipeteo para asegurar que todos los péptidos se adhieran a la columna C18 contenida en la punta. Se depositó el volumen en un tubo nuevo.⁹ Los péptidos que permanecieron unidos a la ZipTip® se eluyeron con 20 µL de matriz¹⁰, realizando tres ciclos de pipeteo para asegurar que todos los péptidos se eluyan. Se tomaron de 1 a 2 µL del eluato y se colocaron en la placa del equipo para obtener las masas de los péptidos mediante MALDI-TOF. Se calibró el equipo con estándares con masas alrededor de las masas de los péptidos; angiotensina II (1 046 Da), melitina (2 900 Da) e insulina (5 700 Da). La matriz que se utilizó tanto para los estándares de calibración como para la muestra fue el ácido α-ciano-4-hidroxicinámico. Se utilizó el modo lineal positivo ya que es el indicado para péptidos y proteínas, también se utilizó el modo reflectrón para aumentar la resolución de los espectros. . La potencia del láser fue del 50% y se realizaron 200 disparos por muestra.

4.11 Análisis de los espectros de masas

Las principales técnicas computacionales empleadas para el análisis de espectros de masas se dividen en dos categorías: los enfoques de búsqueda en bases de

⁹ Debido a que la C18 de la punta ZipTip® no es tan eficiente, se debe preparar también este volumen para introducirlo al espectrómetro (1 µL + 5 µL de matriz).

¹⁰ Preparación de la matriz: pesar 2 mg de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico y disolver en 200 µL de 70% ACN/0,3% TFA.

datos que comparan cada espectro contra péptidos en una base de datos de secuencias o en técnicas de *novo* que reconstruyen directamente la secuencia del péptido a partir de cada espectro. En este trabajo se utilizó la primera categoría.

4.11.1 Peptide Mass (Expasy)

La secuencia de Efl1 se introdujo en un programa en línea llamado Peptide Mass. [30] Este programa está diseñado para calcular las masas teóricas de los péptidos generados por la escisión química o enzimática de proteínas, la cual dependerá de la especificidad de la proteasa utilizada. La masa teórica de los péptidos fue comparada con la masa experimental obtenida del espectrómetro MALDI TOF. Los parámetros para la búsqueda fueron: intervalo de tolerancia de masa de 3.0 Da, ± 80 Da de diferencia en los péptidos debido a la fosforilación y máximo dos modificaciones por péptido.

4.11.2 mMass

Los espectros obtenidos fueron procesados para corregir la línea base e identificar los picos y sus masas correspondientes en el programa mMass. [31]

4.11.3 NetPhos

NetPhos es un servidor que realiza predicciones en una red neuronal para los sitios de fosforilación en serina, treonina y tirosina en proteínas de eucariotes. [14] Métodos de predicción como éste tienen muchas ventajas, son rápidos, reproducibles, disponibles para todos y han mostrado ser bastante precisos para optimizar experimentos. Se introdujo la secuencia de Efl1 y se obtuvo la probabilidad de fosforilación de los residuos antes mencionados, esta información complementó la obtenida con la espectrometría de masas para así conocer los residuos fosforilados en Efl1.

5 Resultados y discusión

5.1 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes

La purificación de la proteína Efl1, expresada tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en *Escherichia coli*, se realizó siguiendo la metodología antes mencionada. La **Figura 6a** muestra las fracciones en cada paso de la purificación de la proteína sobreexpresada en células de *S. cerevisiae*. En el carril correspondiente a la elución de la proteína que se observa una banda con el peso molecular esperado de 127 kDa. El rendimiento de la purificación de Efl1 después de la columna de afinidad a Ni²⁺ fue de 5 mg/L de cultivo.

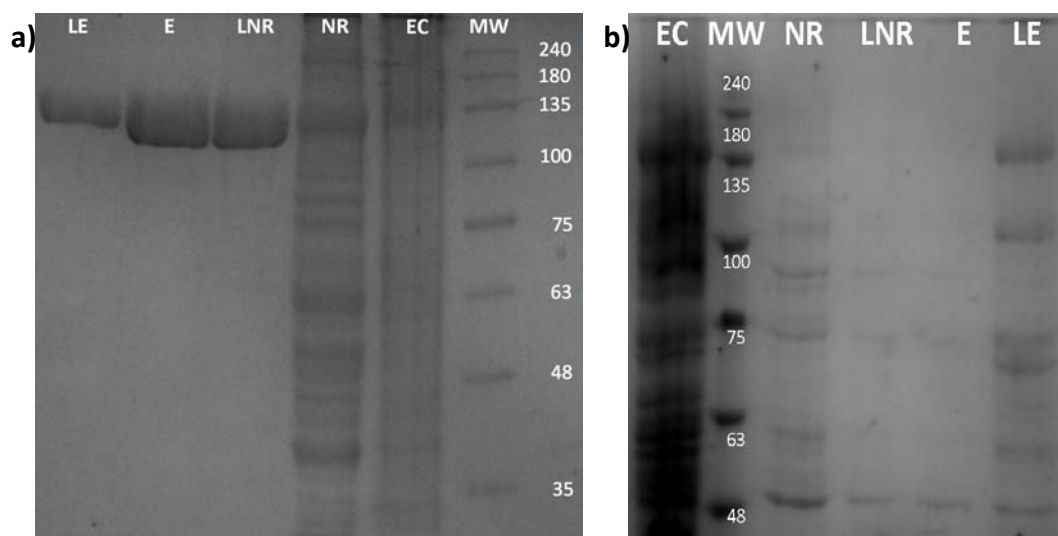


Figura 6. Purificación de la proteína recombinante Efl1 por medio de cromatografía de afinidad a Ni²⁺. (a) Efl1 sobreexpresada en *Saccharomyces cerevisiae*. De derecha a izquierda se encuentran: marcador de peso molecular (MW), extracto crudo (EC), fracción no retenida por la columna (NR), fracción obtenida de hacer un lavado con amortiguador de lisis (LNR), fracción de elución de la proteína Efl1 (E), fracción obtenida de lavar la columna con amortiguador de elución (LE). (b) Efl1 sobreexpresada en *Escherichia coli*. De izquierda a derecha se encuentran: extracto crudo (EC), marcador de peso molecular (MW), fracción no retenida por la columna (NR), fracción obtenida de hacer un lavado con amortiguador de lisis (LNR), fracción de elución de la proteína Efl1 (E), fracción obtenida de hacer un lavado con amortiguador de elución (LE).

En contraparte, la purificación de Efl1 sobreexpresada en células de *E. coli* no mostró la banda correspondiente en la fracción resultante de la elución de la columna de afinidad a metales (**Figura 6b**). Sin embargo, en el carril correspondiente al extracto crudo se observa una banda prominente entre los marcadores de 100-135 kDa. Lo anterior sugiere que: 1) la proteína se expresa en

cantidades muy pequeñas que no se pueden detectar mediante una tinción con azul de Coomassie o 2) Efl1 se expresa pero su plegamiento obstruye la cola de histidinas tal que no se puede unir a la columna. Además, en la fracción eluída de la columna se observan bandas de menor tamaño molecular lo cual puede deberse a la degradación de la proteína. Dada la dificultad de obtener la proteína en este sistema de expresión y a que la finalidad de expresarla en un sistema procarionte era utilizarla como un control negativo, se decidió no continuar con su expresión en este sistema.

5.2 Espectros de masas de Efl1 y Efl1 + fosfatasa

Se obtuvo el espectro de masas de Efl1 antes y después de tratarla con fosfatasa alcalina para comparar la diferencia en peso debido al tratamiento.

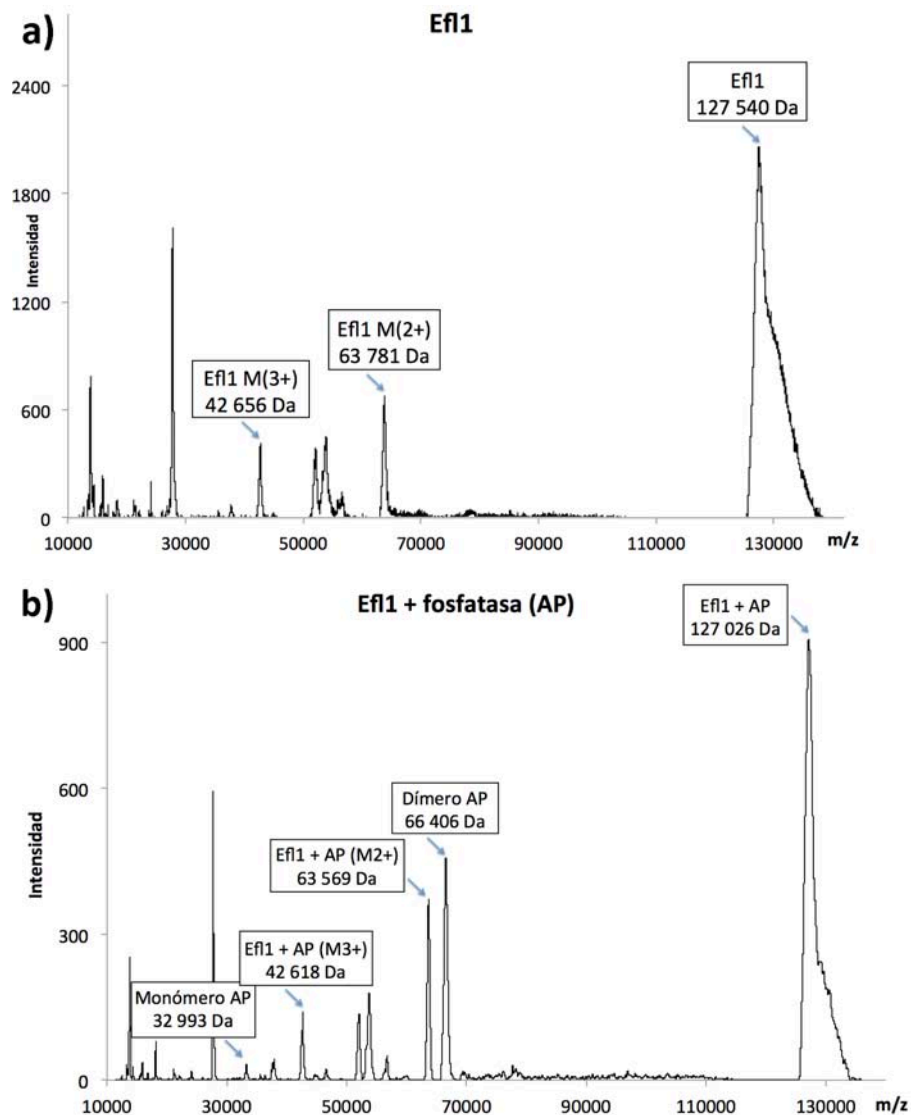


Figura 7. Espectros de masas de la GTPasa Efl1. (a) Efl1 y (b) Efl1 incubada con fosfatasa alcalina (AP).

Como puede observarse en la **Figura 7a**, la masa experimental de Efl1 corresponde a 127 540 Da, el M^{2+} a 63 781 Da y el M^{3+} a 42 656 Da; mientras que la masa de la misma proteína incubada con la fosfatasa (**Figura 7b**) muestra una disminución en su masa molecular de más de 500 Da, por lo que se observa el pico de la proteína en 127 026 Da, el M^{2+} en 63 569 Da y el M^{3+} en 42 618 Da, así como los picos del dímero y monómero de la fosfatasa alcalina en 66 406 Da y 32 993 Da, respectivamente. Al comparar ambos resultados con la masa teórica de 127 031 Da, calculada a partir de la secuencia primaria de Efl1 recombinante, puede observarse que el peso determinado a partir de la muestra incubada con fosfatasa está dentro del intervalo de error esperado para una proteína de este tamaño. La fosfatasa alcalina es una hidrolasa capaz de remover grupos fosfato de moléculas diversas, entre ellas proteínas y ácidos nucleicos. Así, la diferencia en peso en Efl1 debido al tratamiento con fosfatasa alcalina se debe a la remoción del grupos fosfatos y por ende de posibles fosforilaciones en Efl1. Considerando que el peso que suma una fosforilación a la masa de una proteína cualquiera es de 80 Da, obtenemos que la diferencia de 514 Da equivale a aproximadamente 6.5 fosforilaciones por molécula de Efl1. La diferencia en los espectros es bastante notable, el ancho del pico tras incubación a la proteína con fosfatasa disminuye, lo cual indica que la muestra es más homogénea cuando no está fosforilada.

5.3 Western blots antifosfoserina y antifosfotreonina

Se realizaron *western blots* para confirmar la fosforilación de Efl1 de acuerdo con lo analizado de los espectros de masas de Efl1, además, de establecer en qué tipo de residuos se presentaba la fosforilación. Los ensayos de *western blot* se realizaron de acuerdo con la metodología mencionada en la sección correspondiente pero la muestra de proteína se corrió en un gel de poliacrilamida nativo. Las membranas para antifosfoserina y antifosfotreonina se incubaron y revelaron por separado. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8**.



Anticuerpo	Imagen
(a) Antifosfoserina	
(b) Antifosfotreonina	

Figura 8. Western blot de Efl1 usando anticuerpos específicos para reconocer las fosforilaciones. a) fosfoserina y b) fosfotreonina.

Como puede observarse en la **Figura 8a**, el anticuerpo dirigido contra serinas fosforiladas reconoce a la banda de Efl1, la misma afirmación es válida para la **Figura 8b**, que muestra el reconocimiento de fosforilaciones en residuos de treonina. Con esto se comprueba el resultado obtenido en los espectros de masas anteriores, la GTPasa Efl1 se encuentra fosforilada específicamente en los residuos serina y treonina. El tiempo de exposición fue de una hora, lo cual es muy elevado si se compara con la señal de anticuerpos como el anti-His. Esto nos indica: 1) que la afinidad de los anticuerpos dirigidos contra residuos fosforilados es baja o 2) los niveles de fosforilación en Efl1 son bajos y sólo una pequeña porción de la proteína tiene esta modificación.

5.4 Digestión enzimática

Para determinar la identidad de los residuos fosforilados, la proteína Efl1 fue digerida con cuatro proteasas distintas: tripsina, quimotripsina y las endoproteinasas Asp-N y Lys-C, para posteriormente analizar los péptidos obtenidos por espectrometría de masas. La diferencia en estas proteasas radica en la especificidad o secuencia de reconocimiento en la que realizan el corte sobre el polipéptido. La tripsina corta en el extremo carboxilo de las lisinas y argininas, la quimotripsina en los enlaces amido peptídicos donde en el extremo carboxilo del enlace amida tiene un aminoácido hidrofóbico como la tirosina, el triptófano o la fenilalanina, la Asp-N en el extremo amino terminal de los ácidos aspárticos y la Lys-C en el extremo carboxilo de las lisinas. La combinación de estas cuatro proteasas, nos permitió identificar de manera inequívoca las fosforilaciones encontradas en la GTPasa Efl1, así como aumentar la cobertura de péptidos identificados en la secuencia primaria de Efl1.

En la **Tabla 4** puede observarse el porcentaje de cobertura alcanzado por cada una de las proteasas, así como el porcentaje total obtenido por todas las proteasas.

Tabla 4. Péptidos identificados de la digestión enzimática de Efl1 con diferentes proteasas: tripsina, Asp-N, Lys-C y quimotripsina.

Enzima	Cobertura	
	Aminoácidos	Porcentaje (%)
Tripsina (otras temperaturas) ¹¹	551	48.67
Tripsina, seguida de una columna que une grupos fosfatos	295	26.06
Asp-N	451	39.84
Lys-C	290	25.62
Quimotripsina	335	29.59
Todas las proteasas	957	84.54¹²

Estos datos de cobertura se obtuvieron comparando el patrón de digestión teórico generado por Peptide Mass con los resultados experimentales obtenidos de MALDI TOF.

En ninguno de los experimentos con las diferentes proteasa fue posible obtener el 100% de cobertura de la secuencia primaria de Efl1. Frecuentemente encontramos péptidos cuyas masas no se pudieron asignar y que explicamos como péptidos cuya digestión fue incompleta. Este corte ineficiente puede deberse a que Efl1 no se haya desplegado por completo, que no se haya reducido y/o alquilado totalmente, que existan metioninas oxidadas o por la presencia de modificaciones postraduccionales. [30] Sin embargo, mediante el uso combinado de las distintas proteasas el porcentaje de cobertura de la secuencia primaria de Efl1 aumenta considerablemente y es bastante alto como se observa en la **Tabla 4**.

5.5 Determinación de las fosforilaciones en Efl1 mediante espectrometría de masas

Siguiendo la metodología de digestión en gel, se analizaron los péptidos en un MALDI TOF y se obtuvieron los siguientes espectros de posibles péptidos fosforilados.

¹¹ Se incubó la digestión de Efl1 con tripsina a otras temperaturas (4° C, temperatura ambiente y 30° C) y se obtuvieron otros péptidos que no habían sido encontrados a 37° C.

¹² Este porcentaje fue obtenido de acuerdo a todos los péptidos que se encontraron con cada enzima, este número no puede salir de la suma de los porcentajes de las proteasas ya que algunas cortan en los mismos péptidos.

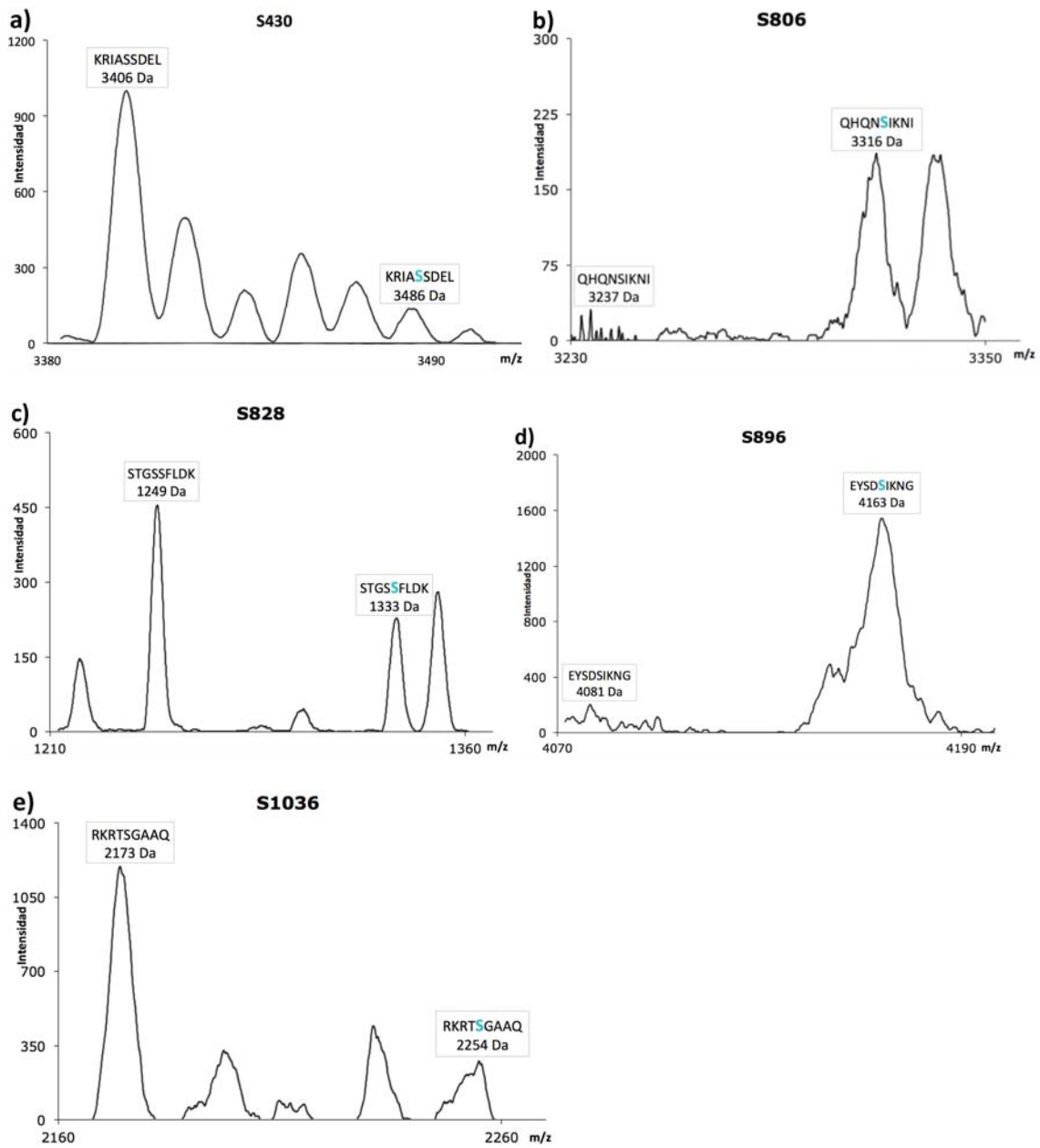


Figura 9. Espectros de masas de péptidos fosforilados en residuos de serina. (a) S430, (b) S806, (c) S828, (d) S896, (e) S1036. La serina marcada con un color distinto en cada péptido, es la que posiblemente se encuentre fosforilada.

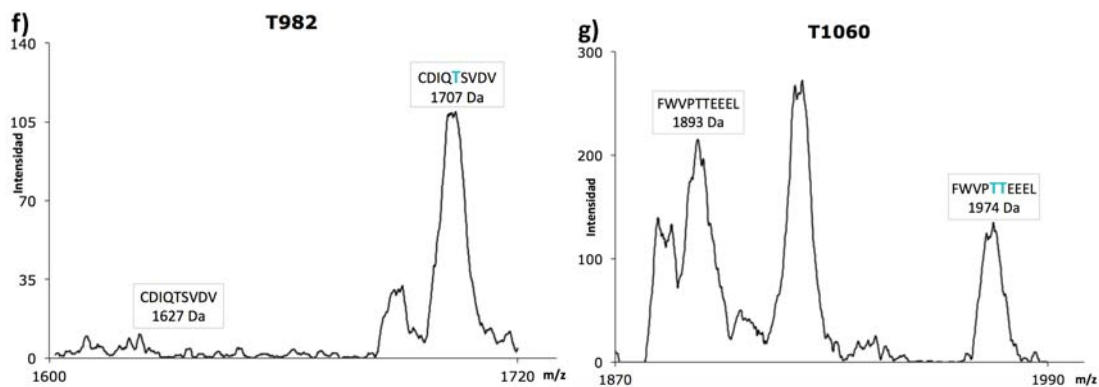


Figura 10. Espectros de masas de péptidos fosforilados en residuos de treonina. (f) T982, (g) T1060. La treonina marcada con un color distinto en cada péptido, es la que posiblemente se encuentre fosforilada.

Los espectros obtenidos fueron procesados para corregir la línea base y eliminar la mayor cantidad de ruido posible para así notar las diferencias de 80 Da que indican péptidos fosforilados. En cada uno de los espectros se encontró tanto la población del péptido fosforilado como la del péptido no fosforilado, esto sólo demuestra que las fosforilaciones en la proteína no son permanentes o no ocurren en todas las moléculas de Efl1, en este caso particular debemos tomar en cuenta que es una proteína sobreexpresada y que tal vez no representa lo que ocurre fisiológicamente o bien la maquinaria encargada de la modificación postraducciona no es suficiente para modificar a la proteína sobreexpresada.

Se identificaron cinco posibles péptidos fosforilados en residuos de serina (**Figura 9a – e**) y dos péptidos fosforilados en residuos de treonina (**Figura 10f** y **Figura 10g**). Para confirmar que un péptido estuviera fosforilado se buscó que apareciera en la digestión de por lo menos dos de las cuatro proteasas evaluadas. En varios de estos péptidos existe más de un residuo que puede ser fosforilado y no es posible distinguirlo con precisión mediante restricción con proteasas. El software NetPhos es un programa utilizado para predecir las fosforilaciones de una proteína y con el cual se obtiene la probabilidad de fosforilación de todos los residuos de serina, treonina y tirosina presentes en la proteína. En los péptidos con más de un sitio posible de modificación, se utilizó este programa para predecir el residuo modificado. De acuerdo con este programa, los residuos con mayor probabilidad de ser fosforilados son las serinas 430, 806, 828, 896 y 1036; numéricamente la probabilidad de que estén fosforiladas de acuerdo a NetPhos va de 0,996 a 0,949, aunque la serina 806 (**Figura 9b**) es la que menos señal da en los espectros. Para los residuos de treonina sólo hay dos péptidos fosforilados y son los que tienen a la treonina 982 y 1060, la probabilidad de que estén fosforiladas es 0,878 y 0,903, respectivamente. Sin embargo, es necesario establecer experimentalmente que efectivamente estos son los residuos modificados, además de que todavía no se

conoce el efecto de estas fosforilaciones y su papel fisiológico. Los resultados se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resumen de los péptidos fosforilados en Efl1 encontrados mediante digestión con tripsina, quimotripsina, Asp-N y Lys-C, con sus respectivas masas experimentales encontradas con espectrometría de masas.

Residuo fosforilado	Péptido ¹³	Proteasa utilizada	Masa teórica del péptido no fosforilado (Da)	Masa experimental del péptido fosforilado (+80 Da)
S 430	KRIAS S DEL	Lys-C	1677.87	1760.661
		Asp-N	3402.7937	3483.917
S 806	QHQN S IKNI	Tripsina	1516.7754	1591.381
		Lys-C	1516.7754	1600.716
		Quimotripsina	3236.6103	3316.478
S 828	STGSS S FLDK	Asp-N	1251.6103	1333.503
		Quimotripsina	3236.6103	3316.478
S 896	EYSD S IKNG	Tripsina	3301.6296	3386,329
		Lys-C	4087.048	4168.909
S 1036	RKRT S GAAQ	Quimotripsina	2173.1723	2253.948
		Asp-N	2423.2499	2503.159
		Lys-C	5280.5429	5359.682
T 982	CDIQ T SVDV	Quimotripsina	1626.8043	1706.917
		Tripsina	2142.0609	2224.879
T 1060	FWVP T TEEEL	Asp-N	1890.8643	1974.197
		Lys-C	5280.5429	5355.315

La masas teóricas de los péptidos no fosforilados se obtuvieron a partir del patrón de digestión teórico de cada enzima, la masa experimental de los péptidos fosforilados se obtuvieron a partir de los espectros resultantes del análisis de los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF. Se eligieron estos péptidos, ya que la diferencia entre estas masas era de ± 80 Da.

La única fosforilación reportada en Efl1 es en la serina 430 [12], con estos experimentos no sólo se confirma lo anterior sino que también se encuentran seis fosforilaciones más. Las siete fosforilaciones identificadas coinciden con las 6.5 modificaciones esperadas a partir de la diferencia de masas observada en los espectros de Efl1 (**Figura 7a**) y Efl1 incubada con fosfatasa (**Figura 7b**).

¹³ El aminoácido en negritas es el que posiblemente está fosforilado, en los péptidos en los que hay más de una serina o treonina no se puede asegurar cuál de ellos está fosforilado ya que no existe una proteasa que corte en ese sitio.

La estructura tridimensional de Efl1 aún no se conoce, sin embargo, en el laboratorio se cuenta con un modelo obtenido por homología empleando como molde la estructura de EF-2 de *S. cerevisiae* (ID PDB: 1N0U). [32, 33] Este modelo lo realizó el alumno Alfonso Méndez Godoy.

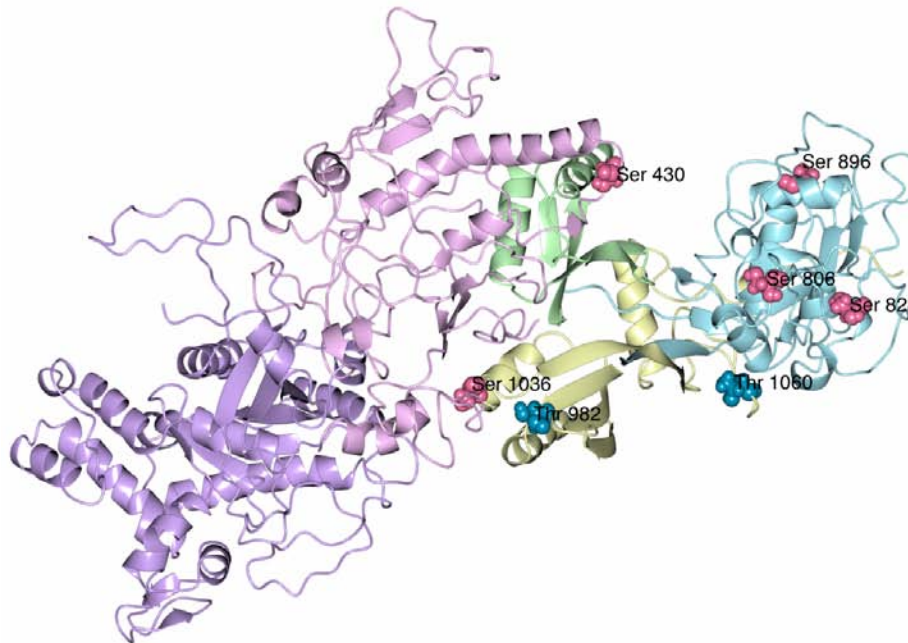


Figura 11. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína Efl1 en el que se muestran las fosforilaciones encontradas. Morado: Dominio I (residuos 1-365); Rosa: dominio II (residuos 365-675); Verde: dominio III (residuos 675-747); Azul: dominio IV (residuos 747-976); Amarillo: dominio V (residuos 976-1110). La serinas están representadas por esferas rosas y las treoninas por esferas azules.

La localización de los posibles residuos fosforilados en el modelo de Efl1 muestran que la serina 430 se encuentra en el dominio II en la región que pertenece a la inserción (región desestructurada de 160 aminoácidos). Esta inserción es una región que distingue a la familia de proteínas Efl1 de las proteínas EF-2. Además, evidencia en el grupo de trabajo han demostrado que el dominio II de Efl1 participa en la interacción con Sdo1, por lo que esta fosforilación podría tener un papel relevante en la interacción entre Efl1 y Sdo1. [32, 34] Las demás fosforilaciones: S806, S828, S896, S1036, T982 y T 1060 se encuentran en los dominios IV y V, los cuales en EF-G participan en la interacción con la subunidad 60S, por lo que se cree que estas fosforilaciones podrían estabilizar esta unión (**Figura 11**). [35]

5.6 Análisis global

Las fosforilaciones en una proteína son transitorias y se encuentran en bajas concentraciones, aun así causan grandes efectos a su alrededor, lo que las hace un interesante tema de estudio. En este trabajo se encontró que la GTPasa citoplasmática Efl1, involucrada en la maduración de la subunidad 60S, está fosforilada en cinco residuos de serina y dos de treonina. Como primer paso, se analizó la proteína completa por espectrometría de masas en un MALDI TOF y se comparó con el espectro de la proteína desfosforilada, lo que dio como resultado una diferencia significativa de 514 Da equivalente a 6.5 fosforilaciones. Resultó muy claro que la proteína se encontraba fosforilada, ya que al incubarla con fosfatasa el ancho del pico se redujo considerablemente sugiriendo una muestra más homogénea. Para comprobar que efectivamente la GTPasa se encontraba fosforilada, se realizaron *western blots* utilizando anticuerpos específicos para reconocer residuos de fosfoserina y fosfotreonina, confirmando así las fosforilaciones.

La metodología de digestión en gel, permitió desplegar a la proteína para que las proteasas pudieran cortar a Efl1. Además, con esta metodología se garantizó que la proteína estaba pura, ya que sólo se utilizó la banda en el gel de poliacrilamida donde se localizaba ésta. Posteriormente, se determinaron los residuos fosforilados digiriendo a Efl1 con cuatro diferentes proteasas; seguido de un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Antes de analizar la muestra en el espectrómetro de masas, los péptidos se pasaron por las puntas ZipTip®, ya que el MALDI TOF no tolera altas concentraciones de sal lo que provoca que los péptidos no vuelen. Al analizar los espectros con el programa mMass se encontraron siempre dos poblaciones de péptidos, la fosforilada y la no fosforilada, lo que una vez más confirma que las fosforilaciones son transitorias y dependen de múltiples factores.

6 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos mediante *western blot*, se demostró que la GTPasa Efl1 de *Saccharomyces cerevisiae* está fosforilada en residuos de serina y en residuos de treonina.

Mediante la espectrometría de masas MALDI TOF se encontró que existen cinco posibles sitios de fosforilación en serina, en los residuos 430, 806, 828, 896 y 1036, así como dos posibles fosforilaciones en residuos de treonina, 982 y 1060.

Estas fosforilaciones se encuentran en los dominios II (S430), IV (S806, S828, S896) y V (S1036, T982, T1060) de Efl1.

7 Perspectivas

Realizar *western blots* contra antifosfotirosina y, en caso de ser positivo, realizar un análisis de masas similar al reportado previamente para serina y treonina, y evidenciar los residuos de tirosina fosforilados.

Estudiar la función biológica de estas fosforilaciones mediante mutagénesis dirigida y complementación genética.

Realizar estudios de interacción de Efl1 con Sdo1 y la subunidad 60S para saber si las fosforilaciones encontradas en este trabajo estabilizan o no estas uniones, respectivamente.

8 Referencias bibliográficas

1. Dieter Kressler, E.H., Jochen Baßler, *Driving ribosome assembly*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2010. **1803**(6): p. 673-83.
2. Ivo Zemp, U.K., *Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits*. FEBS Letters, 2007. **581**(15): p. 2783-93.
3. Arlen W. Johnson, E.L.a.J.D., *Nuclear export of ribosomal subunits*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**(11): p. 580-5.
4. Hurt, H.T.a.E., *Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm*. Trends in Biochemical Sciences, 2003. **13**(5): p. 255-63.
5. Micheline Fromont-Racine, B.S., Cosmin Saveanu, Franco Fasiolo, *Ribosome assembly in eukaryotes*. . Gene, 2003. **313**: p. 17-42.
6. Robledo S, I.R., Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M, *The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production*. RNA, 2008. **14**(9): p. 1918-29.
7. Bruno Senger, D.L.J.L., Jean-Sebastien Graindorge, Olivier Gadad, Alain Camasses, Ambaliou Sanni, Jean-Marie Garnier, Michael Breitenbach, Eduard Hurt, and Franco Fasiolo, *The Nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p Are Required for a Late Cytoplasmic Step of Ribosome Synthesis* Molecular Cell, 2001. **8**(6): p. 1363-73.
8. Tobias F Menne, B.G., Nuria Sánchez-Puig, Chi C Wong, Louise M Tonkin, Philip J Ancliff, René L Brost, Michael Costanzo, Charles Boone & Alan J Warren, *The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast*. Nature Genetics, 2007. **39**(4): p. 486-95.
9. Culver, K.C.a.G., *Deconstructing ribosome construction*. Trends in Biochemical Sciences, 2009. **34**(5): p. 256-63.
10. Cyril Bussiere, Y.H., Sucheta Arora, Joachim Frank, and Arlen W. Johnson, *Integrity of the P-site is probed during maturation of the 60S ribosomal subunit*. The Journal of Cell Biology, 2012. **197**(6): p. 747-59.
11. Benjamin F. Cravatt, G.M.S.J.R.Y.I., *The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics*. Nature, 2007. **450**: p. 991-1000.
12. Claudio P. Albuquerque, M.B.S., Samuel H. Payne, Vineet Bafna, Jimmy Eng, and Huilin Zhou, *A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis*. Molecular & Cellular Proteomics, 2008. **7**(7): p. 1389-96.
13. Secko, D. *Protein Phosphorylation: A Global Regulator of Cellular Activity* 2003.
14. Nikolaj Blom, S.G.a.S.B., *Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites*. Journal of Molecular Biology, 1999. **294**(5): p. 1351-62.
15. An Chi, C.H., Lewis Y. Geer, Joshua J. Coon, John E. P. Syka, Dina L. Bai, Jeffrey Shabanowitz, Daniel J. Burke, Olga G. Troyanskaya, and Donald F. Hunt, *Analysis of phosphorylation sites on proteins from Saccharomyces cerevisiae by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry*. PNAS, 2007. **104**(7): p. 2193-8.

16. Andaleeb Sajid, G.A., Meetu Gupta, Anshika Singhal, Kausik Chakraborty, Vinay Kumar Nandicoori and Yogendra Singh, *Interaction of Mycobacterium tuberculosis elongation factor Tu with GTP is regulated by phosphorylation*. Journal of Bacteriology, 2011. **193**(19): p. 5347-58.
17. Tripti Anandan, J.H., Heather Baun, Seeta Nyayapathy, Jacob T. Brown, Rebekah L. Dial, Juan A. Moltalvo, Min-Seon Kim, Seung Hwan Yang, Donald R. Ronning, Robert N. Husson, Joowon Suh, and Choong-Min Kang, *Phosphorylation regulates mycobacterial proteasome*. Journal of Microbiology, 2014. **52**(9): p. 743-54.
18. Eugen Damoc, C.S.F., Min Zhou, Hortense Videler, Greg L. Mayeur, John W. B. Hershey, Jennifer A. Doudna, Carol V. Robinson, and Julie A. Leary, *Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(7): p. 1135-46.
19. Scott, T.P.a.J.D., *Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(6): p. 286-90.
20. Johnson, L., *Protein kinases and their therapeutic exploitation*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**(1): p. 7-11.
21. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors*, in *Molecular Biology of the Cell*. 2002, New York: Garland Science: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26822/>
22. Robinson, M.Z.a.C.V., *When proteomics meets structural biology*. Trends in Biochemical Sciences, 2010. **35**(9): p. 522-9.
23. Birgit K. Seyfried, J.S., Omar Belgacem, Ryan J. Wenzel, Peter L. Turecek and Günter Allmaiera, *MALDI linear TOF mass spectrometry of PEGylated (glyco)proteins*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(6): p. 612-7.
24. Heuvel, A.J.R.H.a.R.H.H.v.d., *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 2004. **23**(5): p. 368-89.
25. Scitable, N. *Western Blot*. 2014.
26. Yang, T.M.a.P.-C., *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. North American Journal of Medical Sciences, 2012. **4**(9): p. 429-34.
27. Racaniello, V. *Virology Toolbox: The Western Blot*. 2010.
28. Mark R. Macbeth, B.L.B., *Large-scale overexpression and purification of ADARs from Saccharomyces cerevisiae for biophysical and biochemical studies*. Methods in Enzymology, 2007. **424**: p. 319-31.
29. Andrej Shevchenko, H.T., Jan Havlis, Jesper V Olsen & Matthias Mann, *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nature Protocols, 2006. **1**(6): p. 2856-60.
30. Wilkins MR, L.I., Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Appel RD., *Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 403-8.
31. M, N.T.a.S., *mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra*. PLoS One, 2012. **7**(9).
32. Godoy, A.M., *Estudios de Interacción entre las proteínas Efl1 y Sdo1 mediante doble híbrido en levadura*. 2015, Universidad Nacional Autónoma de México.

33. Jorgensen, R., et al., *Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(5): p. 379-85.
34. Nozomi Asano, H.A., Akiyoshi Nakamura, Yoshikazu Tanaka, Isao Tanaka, Min Yao, *Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014. **443**(4): p. 1251-6.
35. Connell SR, T.C., Wilson DN, Wang H, Murayama K, Terada T, Shirouzu M, Rost M, Schüler M, Giesebrecht J, Dabrowski M, Mielke T, Fucini P, Yokoyama S, Spahn CM., *Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors*. Molecular Cell, 2007. **25**(5): p. 751-64.