



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE

DE LA GTPasa RIBOSOMAL Lsg1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Nancy Gabriela Marcial Bazaldua





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: PROFESORA: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN

VOCAL: PROFESORA: AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRES GÓNZALEZ SARABIA

SECRETARIO: PROFESORA: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

1er. SUPLENTE: PROFESORA: LILIAN GONZÁLEZ SEGURA

2° SUPLENTE: PROFESORA: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 7 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

SUSTENTANTE

NANCY GABRIELA MARCIAL BAZALDUA

Agradecimientos

A los apoyos recibidos de CONACYT por la beca otorgada dentro del proyecto CONACYT 167359 Ciencia Básica 2011 “Estudios del reconocimiento molecular de proteínas involucradas en la maduración ribosomal” y por el financiamiento brindado para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las GTPasas son enzimas reguladoras que están implicadas en procesos celulares esenciales como la transducción de señales, la formación del citoesqueleto y la biogénesis ribosomal (Karbstein, 2007).

La biogénesis ribosomal es un proceso que en *Saccharomyces cerevisiae* requiere de la acción coordinada de más de 75 complejos ribonucleoproteicos nucleolares pequeños (snoRNP), y 200 proteínas que no están presentes en el ribosoma traduccionalmente competente (Henras, et al., 2008).

Son pocos los casos en los que se conoce con cierto detalle la función de las diversas proteínas accesorias. La GTPasa Lsg1 participa en la etapa final de la maduración de la subunidad 60S que ocurre en el citoplasma. Lsg1, junto con la proteína Rpl10, participa en la liberación de la proteína Nmd3, un adaptador para la exportación de la subunidad pre-60S a través del poro nuclear. A su vez, Rpl10 requiere de la interacción con la chaperona Sqt1 para unirse a la subunidad pre-ribosomal 60S. La unión de Rpl10 es necesaria para la liberación de Nmd3, ya sea porque proporciona un sitio de unión para Lsg1, o porque afecta la actividad de hidrólisis de GTP de Lsg1 (Karbstein, 2007).

En este trabajo el objetivo fue producir de forma recombinante a la GTPasa Lsg1, para lo cual se realizaron las construcciones y se probaron dos sistemas de expresión, para finalmente establecer un protocolo de purificación que permitiera obtenerla en cantidades abundantes, para su estudio posterior. También se realizó una caracterización presuntiva sobre su estructura y función.

La proteína se obtuvo de manera recombinante con un rendimiento de 3.5 mg/L, y de acuerdo a los resultados obtenidos con técnicas como difracción circular, fluorescencia y dispersión dinámica de la luz, la proteína se encuentra plegada y es funcional.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
DO ₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
LSG1	Del inglés Large-subunit GTPase
GAP	Del inglés GTPase-activating Protein
GSF	Del inglés Guanine Stabilizing Factor
GDP	Guanosín difosfato
GppNHp	Guanosín-5'-[(β , γ)-imido] trifosfato de sodio
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
Kb	Kilobase
LB	Medio Luria-Bertani
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
PSA	Persulfato de amonio
PEG	Polietilenglicol
SD-URA	Synthetic Drop-out sin uracilo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida

ÍNDICE

1	ANTECEDENTES	2
1.1	La superfamilia de las GTPasas.....	2
1.1.1	Características generales de las GTPasas	2
1.1.2	Actividad enzimática de las GTPasas	4
1.2	Ribosomas y la biogénesis ribosomal	5
1.2.1	GTPasas que actúan en la biogénesis ribosomal	6
1.3	La GTPasa ribosomal Lsg1	8
1.4	Proteínas recombinantes	9
1.4.1	Sistemas de expresión	12
1.4.2	<i>Escherichia coli</i>	12
1.4.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2	HIPÓTESIS	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	Objetivo general	16
3.2	Objetivos específicos	16
4	MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1	Reactivos químicos	17
4.2	Soluciones y amortiguadores de pH.....	17
4.3	Medios de cultivos.....	18
4.4	Métodos generales de Biología Molecular	19
4.4.1	Extracción de ADN genómico	19
4.4.2	Amplificación de la secuencia codificante de <i>LSG1</i>	20
4.4.3	Digestión y purificación de los amplicones.....	21
4.4.4	Reacción de ligación de ADN.....	22
4.4.5	Transformación bacteriana con ADN plasmídico por choque térmico.....	23
4.4.6	Aislamiento de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	23
4.4.7	Identificación de las construcciones por patrón de restricción	24
4.4.8	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	24

4.4.9	Transformación de células de levadura con ADN plasmídico	24
4.5	Métodos generales de Bioquímica de Proteínas	25
4.5.1	Cinética de expresión en células bacterianas	25
4.5.2	Expresión de la proteína Lsg1 en bacteria	25
4.5.3	Expresión de la proteína Lsg1 en levadura	26
4.5.4	Lisis de células bacterianas	26
4.5.5	Lisis de células de levadura	26
4.5.6	Purificación de Lsg1 por cromatografía de afinidad a iones Ni ²⁺	27
4.5.7	Purificación de Lsg1 por cromatografía de exclusión molecular	27
4.5.8	Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	28
4.5.9	Western blot	28
4.6	Dicroísmo circular (CD)	29
4.7	Dispersión dinámica de luz (del inglés DLS)	30
4.8	Fluorescencia	30
4.8.1	Ensayo para verificar estructura terciaria	30
4.8.2	Ensayo de unión de Lsg1 con nucleótidos de guanina	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Extracción de ADN genómico	31
5.2	Amplificación de la secuencia de Lsg1 mediante PCR	31
5.3	Construcción de los vectores para la expresión recombinante de Lsg1	32
5.4	Escrutinio de las clonas	33
5.5	Secuenciación de las construcciones	35
5.6	Expresión de la proteína Lsg1 en células procariontes	36
5.7	Purificación de la proteína Lsg1 en células procariontes	38
5.8	Expresión y purificación de la proteína Lsg1 en células eucariotas	39
5.9	Dicroísmo Circular	41
5.10	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	43
5.11	Fluorescencia	43
5.11.1	Estructura terciaria de la proteína	43
5.11.2	Ensayo de unión al nucleótido Gpp(NH)p	45
6	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48

6.1	Expresión de la proteína Lsg1 en el sistema procarionte	51
6.2	Expresión de la proteína Lsg1 en el sistema eucarionte	54
6.3	Estabilidad y método de purificación	56
6.4	Plegamiento y estructura	57
6.5	Ensayos de unión a nucleótidos de guanina	58
7	CONCLUSIONES	60
8	BIBLIOGRAFÍA	61
9	Bibliografía	61
9	APÉNDICE	63

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Estructura tridimensional del dominio G de una GTPasa Ras.....	3
Figura 2. Ciclo catalítico de las GTPasas.....	4
Figura 3. Modulación de la actividad de una GTPasa por biomoléculas efectoras.	5
Figura 4. Esquema de la estructura y composición de un ribosoma eucarionte.....	6
Figura 5. Esquema de los motivos estructurales conocidos de la proteína Lsg1.	8
Figura 6. Modelo para la función de Lsg1 en la biogénesis ribosoma.	9
Figura 7. ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	31
Figura 8. Amplificación por PCR del gen <i>LSG1</i>	32
Figura 9. Vectores y productos de PCR utilizados en la reacción de ligación	33
Figura 10. Escrutinio de la construcción pET28b- <i>LSG1</i>	34
Figura 11. Escrutinio de la construcción pYES2/CT- <i>LSG1</i>	35
Figura 12. Cinética de expresión de la construcción pET28b- <i>Lsg1</i> en <i>E. coli</i> BL21pRIL.....	37
Figura 13. Cinética de expresión de la construcción pET28b- <i>Lsg1</i> en <i>E. coli</i> BL21pRIL y C41.....	38
Figura 14. Purificación de la proteína Lsg1 mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni ²⁺ ..	38
Figura 15. Purificación de la proteína Lsg1 mediante una cromatografía de exclusión molecular.....	39
Figura 16. Purificación de la proteína Lsg1 (levadura) mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni ²⁺	40
Figura 17. Análisis por Western Blot de la proteína Lsg1 expresado en el sistema eucarionte.....	41
Figura 18. Espectro de dicroísmo circular de la proteína recombinante Lsg1 expresada en <i>E. coli</i> BL21pRIL. ...	42
Figura 19. Espectro de dispersión dinámica de la luz de Lsg1 expresada en células de <i>E. coli</i> BL21pRIL.....	43
Figura 20. Espectro de emisión de fluorescencia de los triptófanos de la proteína Lsg1 nativa y en urea 4 M ...	44
Figura 21. Espectro de emisión de fluorescencia de los triptófanos de la proteína Lsg1 interacción Gpp(NH)p. 46	
Figura 22. Dependencia de la fluorescencia de Lsg1 vs la concentración del nucleótido Gpp(NH)p.	47
Figura 23. Modelo de interacción a un solo sitio de unión.	47
Figura 24. Esquema de la proteína Lsg1 de los aminoácidos variables para la cepa <i>S. cerevisiae</i> BCY123.....	49
Figura 25. Análisis de los codones presentes en el gen <i>Lsg1</i> de <i>S. cerevisiae</i> respecto al uso de codones en <i>E. coli</i>	53
Figura 26. Localización de los triptófanos en la secuencia primaria de Lsg1.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y función de los cinco motivos del dominio G de una GTPasa.....	3
Tabla 2. GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal.....	7
Tabla 3. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión de proteínas recombinantes.....	11
Tabla 4. Soluciones y amortiguadores de pH en Métodos Biología Molecular.....	17
Tabla 5. Soluciones y amortiguadores de pH en Métodos Bioquímica de Proteínas.....	18
Tabla 6. Medios de cultivo para bacteria.....	19
Tabla 7. Medios de cultivo para levadura.....	19
Tabla 8. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para amplificar el gene <i>Lsg1</i>	20
Tabla 9. Condiciones utilizadas para la reacción de PCR.....	21
Tabla 10. Composición de la reacción de restricción para digerir el plásmido pET28b.....	21
Tabla 11. Composición de la reacción de restricción para digerir el plásmido pYES2/CT.....	22
Tabla 12. Composición de la reacción de ligación del plásmido pET28b con el inserto.....	22
Tabla 13. Composición de la reacción de ligación del plásmido pYES2/CT con el inserto.....	23
Tabla 14. Colonias obtenidas de transformar la construcción pET28b- <i>LSG1</i> en <i>E. coli</i> DH5α.....	33
Tabla 15. Colonias obtenidas de transformar la construcción pYES2/CT- <i>LSG1</i> en <i>E. coli</i> DH5α35	
Tabla 16. Contenido de estructura secundaria de la proteína Lsg1 mediante deconvolución de su espectro de dicroísmo circular.....	42
Tabla 17. Variaciones encontradas en la proteína Lsg1 recombinante.....	48
Tabla 18. Variación de los aminoácidos en las posiciones 131 y 227 de la proteína Lsg1 en diversas cepas de <i>S. cerevisiae</i>	50
Tabla 19. Frecuencia del uso de codones en <i>Escherichia coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
Tabla 20. Relación peso - radio hidrodinámico de proteínas modelo determinado mediante dispersión dinámica de luz.....	58

1 ANTECEDENTES

1.1 La superfamilia de las GTPasas

Las GTPasas son una clase universalmente conservada de proteínas reguladoras implicadas en diversas funciones celulares como: la transducción de señales, la traducción, la biogénesis ribosomal, el transporte intracelular y la formación de citoesqueleto entre otras (Karbstein, 2007). Las GTPasas se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su secuencia y su estructura (Leipe, et al., 2003). La primera clase se denomina TRAFAC (Factores de traducción), que incluye enzimas que participan en la traducción, en la motilidad celular, en la transducción de señales y en el transporte celular. Mientras que la segunda clase, nombrada como SIMIBI por sus tres grandes subgrupos; las GTPasas de reconocimiento de señal, la superfamilia MinD y la BioD, que son ATPasas implicadas en la localización de las proteínas, la partición del cromosoma y en el transporte a nivel de membrana plasmática (Leipe, et al., 2003).

1.1.1 Características generales de las GTPasas

Todas las GTPasas tienen un dominio altamente conservado denominado el dominio G (Blombach, et al., 2011), cuyo plegamiento es conocido como P-loop NTPasa el cual consiste en una mezcla de seis láminas β y cinco α -hélices intercalados (Figura 1), (Leipe, et al., 2003). El dominio G está formado por cinco motivos característicos denominados G1, G2, G3, G4 y G5, los cuales son responsables de la unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina (Leipe, et al., 2003). Las contribuciones más importantes a la unión, son generadas por las interacciones del nucleótido con los motivos G4, G5 y G1. El motivo N/TKXD (G4) que es responsable de la especificidad por la guanina, una Ala invariante del motivo SAK (G5) interacciona con la base, y los fosfatos β y γ son reconocidos por el motivo (G/A)XXXXGK(S/T) (G1) (motivo de unión a fosfatos o P-loop). Una glicina en el motivo (DXXG) (G3, Switch II), contribuye a la discriminación entre GDP y GTP al interactuar con el fosfato γ , y forma un contacto con la molécula de agua responsable de la hidrólisis. Finalmente, una treonina del motivo RXITI

(G2, Switch I) interacciona con el fosfato y participa en la interacción con el magnesio (Tabla 1).

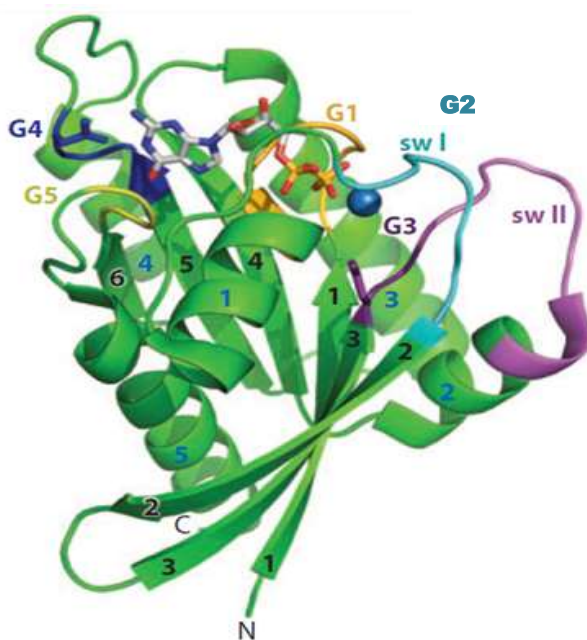


Figura 1. Estructura tridimensional del dominio G de una GTPasa Ras en donde se muestra el plegamiento y los motivos que lo conforman (Wittinghofer & Vetter, 2011).

Tabla 1. Características y función de los cinco motivos del dominio G de una GTPasa.

Motivo	Nombre	Secuencia Consenso	Función
G1	Asa P o Walker A	(G/A)XXXXGK(S/T)	Enlaza a los fosfatos α y β del GDP y GTP
G2	Switch I	RXITI	Funciona como mediador entre el agua y el ion Mg^{2+} el cual es necesario para enlazar fuertemente al fosfato γ del GTP. Sufre grandes cambios estructurales en entre GTP o GDP
G3	Walker B o Switch II	DXXG	Involucrado en la coordinación del ion Mg^{2+} y unión al fosfato γ
G4	Región NKXD	(N/T)KXD	Se une al anillo de guanina a través de enlaces de hidrógeno
G5	Motivo SAL	SA(K/L)	Interacciona con el oxígeno de la guanina (poco conservado en las GTPasas que participan en el ensamblaje de los ribosomas).

1.1.2 Actividad enzimática de las GTPasas

Las GTPasas llevan a cabo la reacción de hidrólisis de GTP obteniendo como productos a GDP y fósforo inorgánico (PO_4^{3-}). La hidrólisis del GTP conduce a la formación de tres estados en la GTPasa (Figura 2) (Wittinghofer & Vetter, 2011).

- 1) El estado activo cuando la GTPasa se encuentra unida a GTP
- 2) El estado inactivo unido a GDP una vez hidrolizado GTP.
- 3) El estado vacío una vez que la proteína libera al GDP que es ocupado inmediatamente por una nueva molécula de GTP

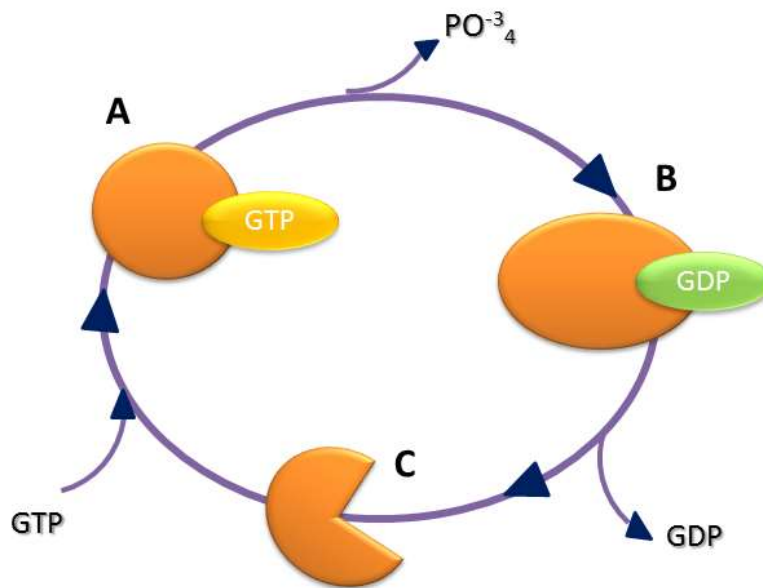


Figura 2. Ciclo catalítico de las GTPasas en donde encontramos a la enzima en sus tres estados: A) activo-unido a GTP, B) inactivo- unido GDP y C) vacío.

En general, las GTPasa no están diseñadas para responder a cambios en la concentración de nucleótidos en el medio y su afinidad por ellos es modulada por biomoléculas efectoras. Existen proteínas reguladoras que favorecen la liberación del GDP de la GTPasa (GDS), factores que favorecen la unión del GTP a la enzima (GSF), proteínas reguladoras que aceleran la hidrólisis del GTP (GAP) y proteínas que inhiben la disociación del nucleótido una vez ocurrida la hidrólisis (GDI) (Wittinghofer & Vetter, 2011) (Figura 3).

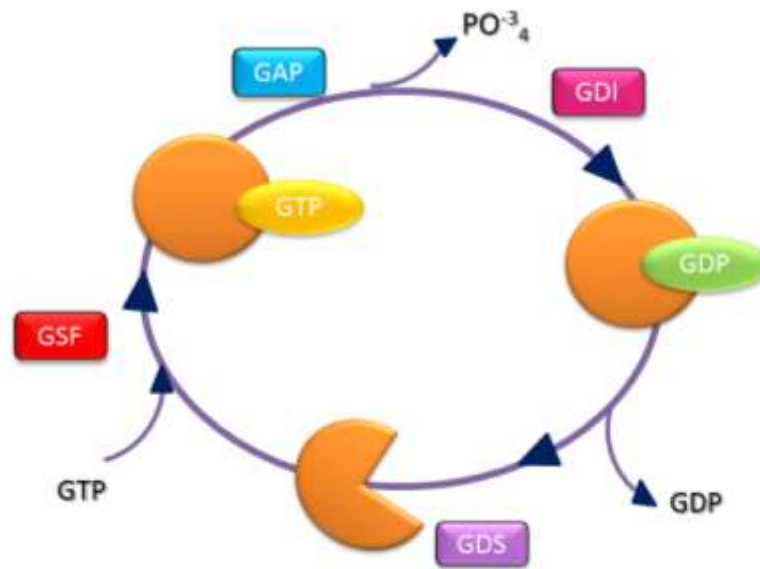


Figura 3. Modulación de la actividad de una GTPasa por biomoléculas efectoras en cada etapa del ciclo catalítico. GSF: Factor Estabilizador de GTP, GAP: Proteína Activadora de GTP, GDI: Inhibidor de Disociación de GDP, GDS: Estimulador de Disociación de GDP (Wittinghofer & Vetter, 2011).

1.2 Ribosomas y la biogénesis ribosomal

Los ribosomas son complejos macromoleculares formados por proteínas y RNA. Son los responsables de la síntesis de las proteínas en todas las células. En eucariontes, el ribosoma está compuesto por dos subunidades, la subunidad mayor 60S y la subunidad menor 40S. En levaduras, la subunidad 60S está formada por 46 proteínas ribosomales y tres rRNA (5.8S, 5S y 25S) mientras que la subunidad 40S está formada por un sólo rRNA, 18S, y 32 proteínas ribosomales (Figura 4)(García, et al., 2015).

La biogénesis ribosomal es la ruta celular mediante la cual se sintetizan los ribosomas y es el proceso que más recursos energéticos consume en un célula (Thomson, et al., 2013). Es un proceso dinámico, complejo y altamente regulado que requiere de la acción coordinada de más de 75 complejos ribonucleoproteicos nucleolares pequeños (snoRNP), y 200 proteínas que no están presentes en el ribosoma traduccionalmente competente (Henras, et al., 2008). El proceso comienza en el nucléolo, un subcompartimento del núcleo, en donde son transcritos los rRNA 35S y 5S por la RNA polimerasa I y III

respectivamente. Los pre-RNAr sufren diversas modificaciones post-transcripcionales como digestiones endo- y exo-nucleolíticas y pseudouridinilación antes de ser ensamblados, junto con las proteínas ribosomales (Thomson, et al., 2013). Una vez ensamblados dan lugar a la partícula pre-90S la cual posteriormente es modificada por un complejo macromolecular conocido como el procesoma, que escinde a la partícula pre-90S en las partículas pre-40S y pre-60, las cuales continúan su maduración en el núcleo. Posteriormente son exportadas independientemente al citoplasma donde continúa el proceso de maduración para originar las partículas 40S y 60S quienes se unen para conformar el ribosoma maduro 80S (Thomson, et al., 2013).

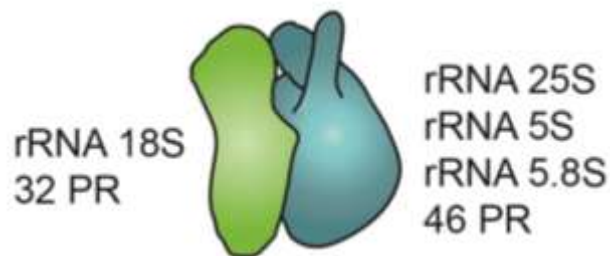


Figura 4. Esquema de la estructura y composición de un ribosoma eucarionte.

1.2.1 GTPasas que actúan en la biogénesis ribosomal

Dentro de las proteínas accesorias que participan en la biogénesis ribosomal se encuentran varias GTPasas cuya función es esencial en el proceso, sin que se conozca su función exacta. Sus posibles funciones asociadas a la hidrólisis de GTP en la síntesis de ribosomas son:

- Facilitar la asociación o disociación de proteínas ribosomales, y/o factores que participan en la maduración (Goto, et al., 2013).
- Promover re-arreglos conformacionales.
- Marcadores de posición para evitar la unión prematura de proteínas (Karbstein, 2007).

Las GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal, contienen un dominio de unión a ARN además del dominio G. Hasta ahora se han descrito seis proteínas con actividad de GTPasa involucradas en la biogénesis ribosomal (Tabla 2).

Tabla 2. GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal.

GTPasas	Ubicación	Efecto mutante/depleción	Función putativa
Nug1	Nucléolo/ núcleo	Su reducción resulta en la acumulación de pre-rRNA 27SB	Requerida para la exportación citoplasmática de la pre-60S (Babler, et al., 2001)
Nog 1	Nucléolo/ núcleo	Su reducción resulta en la acumulación de pre-rRNA 27SA	Forma parte de la partícula pre-66S (Park, et al., 2000)
Nug2 (Nog 2)	Nucléolo/ núcleo	Su eliminación resulta en la disminución del rRNA 25S	Exportación y maduración nuclear de la subunidad 60S
Efl1	Citoplasma	Acumulación Tif6 en el citoplasma	*Verificar la integridad del ensamble del tallo de subunidad 60S. *Liberación del factor Tif6.
Lsg1	Citoplasma	Acumulación de subunidades pre-60S en el núcleo y de NMD3 en citoplasma (Hedges, et al., 2005).	*Liberación del factor adaptador NMD3 *Ensamblaje de la proteína Rpl10 en la subunidad 60S
Bms 1	Núcleo	Disminuye la cantidad de subunidad pre-40S por defecto en el procesamiento del rRNA 35S. (Wegierski, et al., 2001)	Procesamiento de rRNA 18S. Síntesis de la subunidad 40S

A continuación se describe con más detalle la función de la GTPasa Lsg1 la cual es el objeto de estudio.

1.3 La GTPasa ribosomal Lsg1

La proteína Lsg1 pertenece a la familia de las GTPasas circularmente permutadas o YRG, la cual está presente en todos los dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya). Se caracterizan por tener los motivos del dominio G permutados de la siguiente manera G4, G5, G1, G2 y G3 (Reynaud, et al., 2005). Sin embargo hay estudios que demuestran que la estructura invertida parece no afectar la actividad de GTPasa o el plegamiento (Anand, et al., 2006).

Lsg1 es una proteína monómerica que no ha sido cristalizada, pero a partir de su secuencia primaria se han descritos algunos motivos estructurales como la presencia de los motivos del dominio G, una región de hélice superenrollada (coiled-coil), así como una región que posiblemente corresponde a una señal de localización nuclear (NLS) (Figura 5). Esta señal de localización nuclear parece ser funcional en el ortólogo humano más no en el de levadura.



Figura 5. Esquema de los motivos estructurales conocidos de la proteína Lsg1.

El gen de esta proteína se encuentra en el cromosoma VII de *Saccharomyces cerevisiae* y está constituido por 1923 pb que en el proceso de traducción dan como resultado una proteína de 640 aa y cuya masa molecular es de aproximadamente 75 kDa con un punto isoeléctrico teórico de 8.76.

Es una enzima citoplasmática esencial en levaduras (Kallstrom, et al., 2003) cuya función principal se cree tiene lugar al final de la maduración citoplasmática de la subunidad ribosomal 60S, en un proceso en el cual la secuencia temporal y celular de los eventos no está bien establecida pero en donde su supresión tiene consecuencias letales para el desarrollo de las células (Kallstrom, et al., 2003).

Su función específica parece ser la de cargar la proteína estructural Rpl10 en la subunidad 60S y la subsecuente liberación de Nmd3 (Figura 6) (West, et al., 2005). Nmd3 es un adaptador para la exportación de la subunidad pre-60S al

citoplasma que es reconocido por el receptor Crm1 (Kallstrom, et al., 2003). Una vez en el citoplasma a la subunidad pre-60S se le une la proteína estructural ribosomal Rpl10, que forma un complejo con la chaperona Sgt1, lo cual le permite unirse a la subunidad. Lo que sugiere que la unión de Rpl10 es necesaria para la liberación de Nmd3 ya sea porque proporciona un sitio de unión para Lsg1, porque afecta la actividad de hidrólisis de GTP de Lsg1 (Karbstein, 2007) o porque la energía liberada de la hidrólisis de GTP causa un cambio conformacional que permite el correcto ensamblaje de la proteína Rpl10 y, a su vez, la liberación del adaptador Nmd3 y de ella misma para ser reciclada, ya que esta proteína solo ha sido encontrada en asociación con la subunidad 60S libre.

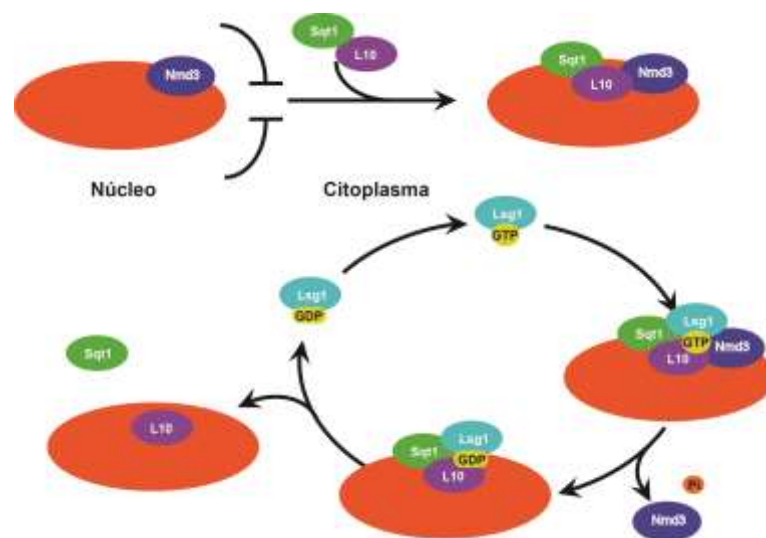


Figura 6. Modelo para la función de Lsg1 en la biogénesis ribosoma. La subunidad 60S (naranja) es exportada al citoplasma por el adaptador Nmd3, una vez en el citoplasma se une la proteína ribosomal L10 junto con Sgt1. Lsg1 se une a este precursor 60S y promueve la liberación de Nmd3 y la incorporación de L10 en la subunidad 60 para luego ser reciclada.

1.4 Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes o proteínas heterólogas son aquellas proteínas que se obtienen a partir de organismos hospedadores, en los que se ha introducido material genético procedente de otro organismo mediante técnicas de ADN recombinante, de tal manera que el organismo hospedador o huésped, emplea su maquinaria biológica para producir la proteína cuya secuencia está codificada en el ADN introducido artificialmente (Guerrero- Olazarán, et al., 2004).

Tradicionalmente, la producción de proteínas consistía en el aislamiento y mejora de las propiedades biológicas de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales, como por ejemplo; animales, plantas o microorganismos, para su posterior utilización en diversas aplicaciones terapéuticas o de otra índole.

Gracias al avance en las técnicas de ADN recombinante y al desarrollo de sistemas de expresión de proteínas recombinantes, ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural (Guerrero- Olazarán, et al., 2004).

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación (Guerrero- Olazarán, et al., 2004).

Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de ADN que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo, además de contener al transgene en estudio. Para la selección de un sistema de expresión adecuado en la síntesis de una proteína recombinante se toma en consideración su origen biológico, sus propiedades químicas y su aplicación, entre otras propiedades (Tabla 3).

Tabla 3. Factores determinantes en la selección de un sistema de expresión de proteínas recombinantes.

Origen de la Proteína	Procariota Eucariota		
Propiedad de la Proteína	Secuencia nucleotídica	-Uso preferencial de codones	
	Propiedades químicas	- Tamaño - pI - Modificaciones postraduccionales	
	Estabilidad	- Proteólisis - pH - Temperatura	
	Toxicidad		
	Destino celular	- Extracelular - Intracelular	
	Grado de pureza		
Aplicación	Biomedicina	- Agente terapéutico - Vacunas - Diagnóstico	*Humanos * Animales
	Alimentos	- Procesos Industriales - Aditivos - Nutraceuticos - Suplemento alimenticio	*Plantas
	Química de la Transformación	- Industria del Papel - Industria Textil - Industria Farmacéutica	
	Medio Ambiente	- Energía y combustibles - Tratamiento de residuos	
Bioproceso	Condiciones de cultivo	-Aeróbico - Anaeróbico	
	Escala		
	Costo		

1.4.1 Sistemas de expresión

La expresión de proteínas recombinantes se ha realizado tanto en células procariotas como en células eucariotas, siendo las primeras las más conocidas, las más estudiadas y las más utilizadas.

Dentro de los sistemas procariotas, uno de los modelos de expresión más utilizados ha sido *Escherichia coli*, debido entre otras cosas, a su fácil manipulación, dentro de los modelos procariontes también podemos encontrar bacterias como *Lactobacillus lactis* la cual es considerada como GRAS (Generally Recognized As Safe) y por ello muy utilizada en la industria alimentaria, además de la capacidad que tiene para secretar las proteínas (Khow & Suntrarachun, 2012). Las células eucariotas más utilizadas a nivel industrial son las levaduras (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), los hongos filamentosos (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*), las células de insecto (*Drosophila S2*) y las células de mamífero (CHO, HEK, HELA). Las células de insecto son útiles para el procesamiento de proteínas complejas, especialmente glicoproteínas, sin embargo, su patrón de glicosilación difiere respecto a las células de mamífero (Kost, et al., 2005). Las células de mamífero tienen la ventaja de que producen correctamente glicoproteínas humanas, pero el costo de la producción es elevado en comparación con los otros sistemas procariotas debido al costo de materiales, a la densidad celular y el tiempo de generación celular.

1.4.2 *Escherichia coli*

El sistema de expresión de proteínas recombinantes más empleado es la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. Está constituido por dos componentes: una bacteria hospedera y un vector de expresión que posee los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicha bacteria. Para seleccionar el vector de expresión adecuado es necesario tener en cuenta varios criterios con el fin de obtener una expresión eficiente: 1) el

origen de replicación que influye en el número máximo de copias del vector de expresión por cada célula, 2) las características de las secuencias de inicio y final de la transcripción, entre las que se incluyen los promotores y terminadores, 3) las señales de comienzo de la traducción, como son el codón de inicio de la traducción y los sitios de unión al ribosoma, 4) la localización subcelular de la proteína que se va a expresar (citoplasma o periplasma) y 5) el control de la segregación plasmídica para la retención del vector en la célula. El mecanismo clásico para tener una segregación homogénea en la población bacteriana, es la incorporación de un gen codificante para la resistencia a un marcador de selección, generalmente un antibiótico, en el vector de expresión. Únicamente las células que posean en su interior el vector serán capaces de propagarse en un medio de cultivo que contenga el marcador de selección.

Dentro de las ventajas que tiene el utilizar a *E. coli* como microorganismo para la expresión de proteínas recombinantes podemos mencionar las siguientes:

- ✓ Se tiene un amplio conocimiento de su fisiología.
- ✓ Su crecimiento es rápido (alcanza densidades celulares elevadas).
- ✓ Es fácilmente manipulable.
- ✓ Crece en medios de cultivo económicos.
- ✓ Existe un elevado número de mutantes y vectores de expresión disponibles.
- ✓ Se ha observado que los niveles de expresión en este sistema son altos y de fácil caracterización.

Sin embargo, *E. coli* presenta ciertos inconvenientes en la síntesis de proteínas recombinantes:

- No lleva a cabo modificaciones post-traduccionales propias de células eucariotas, como es el caso de la glicosilación o fosforilación, lo cual afecta la estructura, estabilidad, solubilidad y actividad biológica de la proteína producida.

- Carece de chaperonas (proteínas de plegamiento) adecuadas para permitir un plegamiento correcto de las proteínas recombinantes.
- No forma puentes disulfuro en el citoplasma, salvo en ciertas cepas mutantes (Ario, 2009).

1.4.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes basados en levaduras han demostrado ser una fuente eficiente y económica de proteínas eucariotas de gran interés. Estos sistemas ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas y son capaces de llevar a cabo algunas modificaciones postraduccionales, así como su secreción al medio de cultivo. Las levaduras mantienen las ventajas de las bacterias al ser de fácil manipulación y tener un crecimiento rápido. Por otro lado, estos microorganismos cuentan con una organización celular eucariótica que permite la realización de procesos de expresión y maduración característicos de este tipo de células, lo cual les proporciona una ventaja para la producción de proteínas de origen eucarionte (Guerrero- Olazarán, et al., 2004).

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras mejor caracterizada, su genoma ha sido totalmente secuenciado y es considerado como organismo GRAS (del inglés Generally Recognized as Safe, Generalmente Reconocido como Seguro) por la FDA americana (Food and Drug Administration). Otro microorganismo perteneciente a este grupo es *Pichia pastoris*, el cual posee la gran ventaja de emplear los promotores más fuertes y eficientemente regulados de los cuales se tenga conocimiento. Las principales desventajas de estos sistemas de expresión son las glicosilaciones no deseables, ya que en ocasiones se presentan hiperglicosilaciones que limitan la actividad de la proteína, además de brindar una baja eficiencia en la secreción de proteínas (Çelik & Çalık, 2012).

2 HIPÓTESIS

Si se clona y se logra expresar Lsg1 en un sistema heterólogo adecuado, entonces podremos obtener una proteína plegada con la cual se podrán realizar ensayos de estructura y función.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Obtención recombinante de la GTPasa ribosomal Lsg1 plegada correctamente y funcional.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar la secuencia codificante de la proteína Lsg1 en vectores que permitan su sobre-expresión en levadura y bacteria.
- Purificación por técnicas de cromatografía convencional a la proteína Lsg1.
- Caracterización preliminar de su estructura y función.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Reactivos químicos

Los antibióticos que se utilizaron en este trabajo fueron el cloranfenicol, la kanamicina (ForMedium®) y la ampicilina (Sigma Chemical Co).

4.2 Soluciones y amortiguadores de pH

Los reactivos utilizados en la elaboración de las disoluciones y los amortiguadores de pH fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., Becton, Dickinson and Company y Merck & Co. En la Tabla 4 y Tabla 5 se muestra la composición de las diferentes disoluciones y amortiguadores de pH utilizados en este trabajo.

Tabla 4. Soluciones y amortiguadores de pH en Métodos Biología Molecular.

Extracción de ADN genómico	
Amortiguador o disolución	Composición
Amortiguador Harju	10mM Tris-HCl pH 8, 2% TritonX-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 1mM EDTA
Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	
Solución P1	50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 100µmol/mL RNAsa A
Solución P2	1% SDS, 0.2M NaOH
Solución P3	3M Acetato de potasio pH 5.5
Electroforesis en gel de agarosa	
Amortiguador de carga 6X	0.1% naranja G, 40% sacarosa
Amortiguador TAE 10X	48.4 g Tris base, 11.4 mL ácido acético glacial, 3.7 g sal disódica EDTA en un volumen de 1L
Transformación de células de levadura	
Amortiguador TE 10X	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA pH 8.0
L1	Amortiguador TE 1X, 100 mM LiCl en agua
L2	Amortiguador TE 1X, 100 mM LiCl en 50% PEG 4000
Expresión en levadura	
Drop Out +Leu +Trp	0.6% leucina, 0.4% triptófano
Glucosa 20%	Glucosa 20% (w/v) en agua
Galactosa 20%	Galactosa 20% (w/v) en agua

Tabla 5 .Soluciones y amortiguadores de pH en Métodos Bioquímica de Proteínas.

Electroforesis SDS-PAGE	
Gel concentrador	0.5 M Tris-HCl pH 6.8
Gel separador	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
Amortiguador de carga 4x	200 mM Tris-HCl pH 8, 400mM β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 8% SDS, 0.4% azul de bromofenol
Solución teñidora	0.025% Coomassie G-250, 10% ácido acético
Solución fijadora SDS-PAGE	40% etanol, 10% ácido acético
Amortiguador de tanque	3% Trizma base, 14.4% glicina, 1% SDS
Purificación de proteína expresada en levadura por cromatografía de afinidad a iones Ni²⁺	
Amortiguador de lisis L	50 mM Tris-HCl pH 7, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 30mM imidazol
Amortiguador de elución para la columna de Ni ²⁺	50 mM de Tris-HCl pH 7, 300mM NaCl, 10% glicerol, 5m M de MgCl ₂ 500mM Imidazol
Purificación de proteína expresada en bacteria por cromatografía de afinidad a iones Ni²⁺	
Amortiguador de lisis B	50 mM PO ₄ ³⁻ pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM imidazol, 5 mM MgCl ₂ , 10% glicerol, 20 mM β -mercaptoetanol
Amortiguador de alta sal	50 mM PO ₄ ³⁻ pH 7.5, 2 M NaCl, 5 mM MgCl ₂
Amortiguador de elución para la columna de Ni ²⁺	50 mM PO ₄ ³⁻ pH 6, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 250 mM imidazol, 10% glicerol
Purificación por columna de exclusión molecular	
Amortiguador filtración en gel	50 mM PO ₄ ³⁻ pH 6, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂
Western blot	
Amortiguador de transferencia 1X	12 mM Trizma base, 96mM glicina, 20% metanol
Amortiguador TBST	100 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20
Solución de Rojo de Ponceau	0.01% Rojo Ponceau, 0.1% ácido acético
Dicroísmo circular	
Amortiguador C	50 mM PO ₄ ²⁻ pH 7, 50 mM NaCl

4.3 Medios de cultivos

A continuación se muestran la composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo (Tabla 7 y Tabla 7).

Tabla 6. Medios de cultivo para bacteria.

Medio	Composición
LB (Luria Bertani)	1% NaCl, 0.5% extracto de levadura, 1% triptona.
LB-Ampicilina	1% NaCl, 0.5% extracto de levadura, 1% triptona, 100 µg/mL ampicilina.
LB-Kanamicina	1% NaCl, 0.5% extracto de levadura, 1% triptona, 50 µg/mL kanamicina.
LB-Cloranfenicol- Kanamicina	1% NaCl, 0.5% extracto de levadura, 1% triptona, 50 µg/mL kanamicina y 50 µg/mL cloranfenicol.
2xTY	1.6 % triptona, 1% extracto de levadura, 0.5% NaCl

*Para los medios sólidos se adicionó 1.5% de agar.

Tabla 7. Medios de cultivo para levadura.

Medio	Composición
YEPD	1.1% extracto de levadura, 2.2% peptona, 0.006% sulfato de adenina, 2% glucosa.
YM4	0.8 % base nitrogenada sin aminoácidos, 1.1% casaminoácidos, 0.013% adenina, 0.01% tirosina
SD-URA	YM4, 1X Drop out +Leu+Trp, 2% glucosa

4.4 Métodos generales de Biología Molecular

4.4.1 Extracción de ADN genómico

Para extraer ADN genómico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123 (su genotipo se muestra en el Apéndice 1), se utilizó la metodología propuesta por (Harju, et al., 2004). La metodología se divide en dos etapas:

- I. Lisado de las células
- II. Purificación del ADN genómico

La ruptura de las células se realizó de la siguiente manera: se crecieron las células de levadura en 5 mL de medio YEPD por 20 h a 30°C y con agitación constante. Una vez crecidas las células éstas se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos. Se obtuvo un botón celular el cual se re-suspendió en el amortiguador Harju y fue sometido a ciclos de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (baño de agua a 95°C). Una vez que las células fueron lisadas se prosiguió a la purificación del ADN, lo cual se realizó colocando 200 µL de cloroformo a la mezcla por dos minutos, se desechó la fase orgánica y se adicionó 400 µL de etanol 100%, frío por 30 minutos. La mezcla se centrifugó por 15 minutos a 14,000 rpm y el botón obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se eliminó el etanol y la pastilla con el ADN se resuspendió en 50 µL de agua Milli-Q.

4.4.2 Amplificación de la secuencia codificante de *LSG1*

La secuencia codificante de *LSG1* se amplificó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esta técnica se utilizó el ADN genómico extraído como ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, en la Tabla 8 se muestra la composición de la mezcla de reacción utilizada en la PCR

Tabla 8. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para amplificar el gene *Lsg1*.

Reactivos	Cantidad
Oligo Forward Lsg1 (10 µM)	1 µL
Oligo Reverse Lsg1 (10 µM)	1 µL
ADN genómico 15 ng/µL (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BCY123)	2 µL
KOD ADN polimerasa (1U/µL)	1 µL
Amortiguador 10X KOD	5 µL
dNTPs (2mM)	1µL
DMSO 100%	2.5 µL
MgSO ₄ (25 mM)	3 µL
H ₂ O	33.5 µL
Volumen Final	50 µL
Amplicón esperado	1953 pb

*Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en el Apéndice 2.

Para realizar la PCR se utilizó el termociclador Biometra T Gradient 96 bajo las siguientes condiciones:

Tabla 9. Condiciones utilizadas para la reacción de PCR.

	Temperatura (°C)	Tiempo
30 ciclos	94	5 minutos
	94	30 segundos
	60	30 segundos
	72	1 minuto
	72	5 minutos

4.4.3 Digestión y purificación de los amplicones

La mitad del producto de PCR resultante de la amplificación del gene *Lsg1* y el plásmido pET28b fueron digeridos con las enzimas de restricción *NcoI* (New England Biolabs) y *XhoI* (Fermentas), mientras que el vector pYES/2CT (Invitrogen) y el resto del producto de PCR se dirigieron con las enzimas de restricción *BamHI* (Fermentas) y *XhoI* (Fermentas) por 3 h a 37°C. La composición de las reacciones de restricción se muestran en las Tabla 10 y Tabla 11.

Tabla 10. Composición de la reacción de restricción para digerir el plásmido pET28b.

Componentes	Volumen agregado
Amortiguador NEB3 (10X)	5µL
<i>NcoI</i> (10,000 U/µL)	2 µL
<i>XhoI</i> (10U/µL)	2 µL
Plásmido pET28b (80 ng/µL)	30µL
Agua libre de nucleasas	11µL

*El producto de PCR (20 µL) se digirió bajo las mismas condiciones.

Tabla 11. Composición de la reacción de restricción para digerir el plásmido pYES2/CT.

Componentes	Volumen agregado
Amortiguador NEB3 (10X)	5µL
<i>Bam</i> HI (20,000 U/µL)	2 µL
<i>Xho</i> I (10U/µL)	2 µL
Vector pYES-2CT	30µL
Agua libre de nucleasas	11µL

*El producto de PCR (20 µL) se digirió bajo las mismas condiciones.

Cada reacción de restricción se resolvió en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de ADN correspondiente, se purificó utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Jena Bioscience) siguiendo las instrucciones del proveedor.

4.4.4 Reacción de ligación de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 20 µL utilizando la DNA ligasa T4 (New England Biolabs), 50 ng de plásmido y la cantidad de inserto necesaria para alcanzar una relación molar 1:3 entre el vector y el inserto. La cantidad de inserto se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$ng \text{ de inserto} = \frac{(ng \text{ plásmido})(kb \text{ inserto})}{kb \text{ plásmido}} \quad (3)$$

Para cada reacción de ligación se realizó una reacción control. Las reacciones se incubaron durante 12 h a 4°C y la composición de las reacciones de ligación se muestra en la Tabla 12 y Tabla 13.

Tabla 12. Composición de la reacción de ligación del plásmido pET28b con el inserto.

Reactivos	Ligación con inserto	Control: Ligación sin inserto
Amortiguador T4 (10x)	2 µL	2 µL
Inserto PCR (30 ng/µL)	3.3 µL	----
Vector (30 ng/µL)	3 µL	3 µL
Ligasa	0.8 µL	0.8 µL
H ₂ O MilliQ	10.1 µL	13.4 µL

Tabla 13. Composición de la reacción de ligación del plásmido pYES2/CT con el inserto.

Reactivos	Ligación con inserto	Control: Ligación sin inserto
Amortiguador T4 (10x)	2 µL	2 µL
Inserto PCR (30 ng/µL)	3 µL	----
Vector (25 ng/µL)	4 µL	4 µL
Ligasa	0.8 µL	0.8 µL
H ₂ O MilliQ	10.2 µL	13.2 µL

4.4.5 Transformación bacteriana con ADN plasmídico por choque térmico

Se mezclaron 7µL de cada reacción de ligación con 50 µL de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (su genotipo se muestra en el Apéndice 3) y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C durante 45 s, se colocaron en hielo por 2 min y finalmente las células se incubaron en medio LB durante 1h, a 37°C en agitación. Las células transformadas se plaquearon en cajas de LB/ampicilina para las transformantes con el vector pYES/2CT y LB/kanamicina para las transformantes con el vector pET28.

4.4.6 Aislamiento de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

Se tomaron 10 colonias transformantes y se inocularon por separado en 5 mL de medio LB con su respectivo antibiótico. Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 18 h con agitación constante (220 rpm). De cada cultivo se obtuvo el botón celular por centrifugación (9000 rpm 2min), y se trataron como se describe a continuación: se agregaron 100 µL de la solución de P1 y se resuspendió con el vórtex hasta obtener una mezcla homogénea. Después se adicionaron 200 µL de la solución P2, se mezcló por inversión hasta que la disolución se tornó translúcida y se agregaron 150 µL de la solución P3. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 15 min para eliminar los restos celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo con 400 µL de isopropanol frío (4°C). Esta mezcla se

centrifugó a 12000 rpm 15 min y el botón se lavó con 500 μ L de una solución de etanol al 70 % v/v. Finalmente, el etanol se eliminó por evaporación y el pellet con el ADN se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas. La composición de las soluciones utilizadas en esta sección se encuentra descrita en el la sección de soluciones y amortiguadores de pH.

4.4.7 Identificación de las construcciones por patrón de restricción

Las construcciones anteriores se verificaron por patrón de restricción antes de mandarlas a secuenciar. La construcción pYES2CT-LSG1 se digirió con la enzima *EcoRV* (NEB) mientras que la construcción pET28b-LSG1 fue digerida con la enzima *XbaI* (NEB). Las reacciones de restricción se realizaron durante 3 horas a 37°C, para luego resolverse en un gel de agarosa al 1%. El patrón de restricción experimental se comparó con el patrón electroforético teórico. Las construcciones que mostraron un patrón de restricción correcto se purificaron con el kit *Plasmid Mini-Prep* de Jena Bioscience y se secuenciaron con la compañía GENSCRIPT.

4.4.8 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se visualizaron en geles de agarosa al 1% con el amortiguador TAE 1X. Previo a la electroforesis, las muestras de ADN (10 μ L) se mezclaron con 2 μ L amortiguador de carga 5X. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se cubrieron con el amortiguador. Después se cargaron las muestras y se corrieron a 90V por 45 minutos. La visualización del ADN se realizó mediante tinción con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) y se observó la muestra en un transiluminador (radiación U.V 312 nm).

4.4.9 Transformación de células de levadura con ADN plasmídico

La transformación de células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123 con ADN plasmídico se realizó siguiendo el método descrito por (Ito, et al., 1983) en el cual se obtienen células competentes mediante un tratamiento con una solución de LiCl 1 M. La construcción pYES2/CT-LSG1 (500ng) se mezcló con 20 μ L (100 μ g) de ADN acarreador (esperma de salmón, Invitrogen), y 100 μ L de las células competentes de levadura. A esta mezcla se le adicionó 600 μ L de solución L2, se mezcló por inversión y se incubó durante 2h a 30°C con agitación

constante (220 rpm). Posteriormente, se agregaron 70 μ L de DMSO (Sigma) y se les dio un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Se centrifugaron las células a 5000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 100 μ L de amortiguador TE1X y se sembraron en cajas con medio SD-Ura. Estas cajas fueron incubadas a 30°C durante 3 días.

4.5 Métodos generales de Bioquímica de Proteínas

4.5.1 Cinética de expresión en células bacterianas.

Se probaron dos cepas distintas de *E. coli* para evaluar la óptima expresión de la proteína Lsg1. Se transformaron las cepas *E. coli* C41 y BL21pRIL (Apéndice 3) con el plásmido pET28b-LSG1 de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.4.5. Las transformantes de cada cepa se crecieron en 3 mL de medio LB con sus respectivos antibióticos, kanamicina y cloranfenicol para la cepa BL21pRIL o kanamicina para la cepa C41, durante 18h a 37°C con agitación constante a 220 rpm. Con estos cultivos se inoculó 50 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes. Los cultivos se dejaron crecer a 37°C con agitación constante hasta alcanzar un valor de 0.7 unidades de D.O a 600 nm. Se indujo la expresión con 0.5 mM de IPTG a 18°C durante 24h. Se tomaron muestras de células por duplicado durante las primeras 9 horas y una muestra final. El botón celular se lisó con Bug Buster 10X (Novagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. La proteínas presentes en la fracción soluble e insoluble se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10%.

4.5.2 Expresión de la proteína Lsg1 en bacteria

Se inoculó una colonia de *E. coli* BL21pRIL previamente transformada con el plásmido pET28b-LSG1 en 25 mL de medio 2xTY suplementado con kanamicina y cloranfenicol. Las células se crecieron durante 18h a 37°C con agitación constante. Este cultivo se utilizó para inocular 1L de medio 2xTY con antibióticos, se dejó crecer con agitación constante a 37°C hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.6-0.7. Se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y el cultivo se incubó a 18°C por 18h. Al término de esta etapa se centrifugó el cultivo por 10 min a

5,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se guardó a -20°C para la posterior purificación de proteína.

4.5.3 Expresión de la proteína Lsg1 en levadura

Se inoculó una colonia de *Saccharomyces cerevisiae* BCY123 con la construcción pYES2/CT-LSG1 en 20 mL en medio SD-URA y se dejó crecer durante 18h a 30°C con agitación constante (220 rpm). Este cultivo se utilizó para inocular un litro de medio SD-URA que se incubó a 30°C con agitación constante (220 rpm) hasta que alcanzó a una $D.O_{600} \approx 1.8$, se indujo la expresión de la proteína con 2.8% de galactosa, y se dejó crecer durante 18h a 30°C con agitación constante. Al término de esta etapa se centrifugó el cultivo durante 10 min a 5,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se guardó a -20°C para la posterior purificación de proteína.

4.5.4 Lisis de células bacterianas

El paquete celular bacteriano se resuspendió en 35 mL de amortiguador de lisis B suplementado con PMSF (1mM) y benzamidina (1mM). La ruptura de las células se realizó por medio de sonicación con un esquema que consistió de un tiempo total de 5 minutos, con intervalos de 10s encendido y 30s apagado con potencia de 6. Durante todo el proceso se controló la temperatura de la muestra a 4°C. La suspensión de células rotas se centrifugó por 1 hora a 12,500 rpm, la fase soluble se filtró por una membrana de 0.45 μm y la proteína se purificó a través de una columna His Trap (GE Healthcare Life Sciences).

4.5.5 Lisis de células de levadura

Se descongeló el botón de células de levadura provenientes de 1 L de cultivo y se resuspendieron en 30 mL de amortiguador para lisis L, suplementado con 1mM de benzamidina. La suspensión de células se vació en el contenedor del BeadBeater, previamente llenado hasta la mitad con perlas de vidrio ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) humedecidas con el mismo amortiguador de lisis hasta llenar el contenedor. Las células se lisaron a 4°C, realizando cuatro ciclos de 2 minutos, con 15 minutos de reposo entre cada ciclo para evitar que la temperatura aumentara. El lisado se recuperó y se centrifugó a 15,000 rpm durante 45 min, en una

centrífuga Beckman-Coulter, rotor JA-17. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.45 μm .

4.5.6 Purificación de Lsg1 por cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+}

La purificación por cromatografía de afinidad a iones níquel se llevó a cabo en una columna de His Trap (GE Healthcare Life Sciences) de 5 mL. El siguiente procedimiento se realizó, para la purificación de las proteínas de ambos sistemas de expresión con sus respectivos amortiguadores.

La columna de níquel se equilibró previamente de la siguiente manera:

1. Se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de agua filtrada.
2. Se lavó con 5 CV de amortiguador de lisis.

La muestra filtrada se hizo pasar a través de la columna de afinidad a iones Ni^{2+} , posteriormente se lavó con 2CV del amortiguador de lisis para remover a las proteínas que no se unieron a la columna. A este lavado le siguió otro con 3CV de amortiguador de alta sal, el cual tuvo el objetivo de romper las interacciones de Lsg1 con los ácidos nucleicos. Finalmente se realizó segundo lavado con 2 CV del amortiguador de lisis, para eliminar la alta concentración de NaCl y se eluyó la muestra con 20 mL de amortiguador de elución para la columna de Ni^{2+} . La columna se lavó con 2 CV más del amortiguador de elución. Todas las fracciones se recolectaron y se resolvieron a través de un gel de un SDS-PAGE al 10%.

4.5.7 Purificación de Lsg1 por cromatografía de exclusión molecular

Las muestras obtenidas de la cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} , se concentraron por ultrafiltración con un Centricon de corte de peso molecular 10 kDa (Millipore) hasta un volumen final de 2 mL. Este volumen de muestra se inyectó a una columna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada con el amortiguador correspondiente a un flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 2 mL y la proteína Lsg1 eluyó en un volumen de aproximadamente 85 mL. Las muestras colectadas se analizaron

con un gel SDS-PAGE al 10%, aquellas con la proteína Lsg1 se juntaron, se concentraron y se guardaron a -80°C hasta su uso posterior.

4.5.8 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Para evaluar el proceso de purificación de la proteína se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE. Debido al tamaño de Lsg1 se utilizaron geles de poliacrilamida al 10%. La composición del gel separador y concentrador se muestra en la sección de amortiguadores. Previo al análisis, las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga 5X y se calentaron por 5 minutos en baño maría a 90°C . El gel se corrió en una cámara de electroforesis vertical, en donde se cargaron las muestras y se aplicó un potencial eléctrico de 120 V durante hora y media. Posteriormente el gel se colocó en la solución fijadora por 5 min y después se transfirió a la solución teñidora con Coomassie G-250 por 10 min. Finalmente el gel se destiñó con agua destilada durante una hora en agitación.

4.5.9 Western blot

Debido a que en un gel SDS-PAGE de las fracciones resultantes de la columna de afinidad a iones Ni^{2+} , no fue evidente la presencia de Lsg1 expresada en levaduras, se realizó un Western blot. Esta técnica analítica nos permitió identificar cantidades muy pequeñas de la proteína recombinante en la mezcla obtenida de la lisis celular. La técnica consta de los siguientes pasos: 1) La separación por tamaño de las proteínas en un gel SDS-PAGE, 2) la transferencia de las proteínas a un soporte sólido y 3) la identificación de la proteína con un anticuerpo específico y adecuado para su visualización. Para el primer paso, se realizó un gel SDS-PAGE al 10% como se mencionó en la sección anterior. La transferencia de las proteínas se llevó a cabo a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada en metanol. Para ello se preparó un sándwich en el que se colocaron dos pedazos de papel filtro extra-grueso, la membrana, el gel de proteínas y dos pedazo más de papel filtro; todos previamente embebidos en amortiguador de transferencia. Este sándwich se colocó sobre una cámara de transferencia semiseca (Bio Rad), para hacer la transferencia a 20V 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 el amortiguador TBST. Para la identificación de la proteína, la membrana se bloqueó con 5% de leche desgrasada en el amortiguador TBST durante 15 h a 4°C. La membrana se enjuagó con tres lavados rigurosos con el amortiguador TBST. Se adicionó el anticuerpo conjugado con la peroxidasa de rábano contra la etiqueta de histidinas presente en Lsg1 (anti-His HRP dilución 1:1000, Santa Cruz®), y se incubó por 1 hora en agitación constante. A continuación, se lavó cuatro veces la membrana con el amortiguador TBST, se incubó con el sustrato quimioluminiscente y se expuso a una película radiográfica.

4.6 Dicroísmo circular (CD)

El contenido de estructura secundaria de Lsg1 se determinó por la técnica de dicroísmo circular. La muestra se cambió a una solución amortiguadora de 50 mM PO₄³⁻ pH 6.0, 50 mM NaCl y se utilizó una concentración de 2 μM de proteína. El espectro de dicroísmo circular se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J-710 en el UV lejano (195-260nm) a temperatura constante de 25°C, utilizando una celda de cuarzo de 0.1cm de paso óptico. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones realizadas a una velocidad de barrido de 20nm/min. El resultado se expresó en unidades de elipticidad molar (Θ), utilizando la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{CD_{obs} * 10^3}{NoR * [C] * L}$$

Donde θ es la elipticidad molar, CD_{obs} es el valor de la elipticidad experimental en mdeg (mili grados), NoR es el número de los aminoácidos que conforman la proteína, [C] es la concentración de proteína en μM y L es el paso óptico en cm. El procesamiento de los datos se realizó con el programa SELCON3, el cual se utilizó para deconvolucionar el espectro de dicroísmo circular y estimar la cantidad de alfas hélices y hojas beta de la proteína Lsg1, a partir del espectro de dicroísmo circular experimental.

4.7 Dispersión dinámica de luz (del inglés DLS)

Esta técnica es una de las más usadas para determinar el tamaño de partículas. Permite medir radios hidrodinámicos de hasta 0.001 μm y no es destructiva. Los experimentos de DLS se realizaron con el instrumento Malvern Nano S (Malvern, Ltd) equipado con un láser NIBS (Laser no invasivo de dispersión) y un peltier para controlar la temperatura. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C a una longitud de onda de 663 nm. El radio hidrodinámico fue calculado a partir del valor Z usando el software presente en el equipo.

4.8 Fluorescencia

La espectrofluorometría es un método espectroscópico y que en este proyecto se utilizó primero para verificar la estructura terciaria de la proteína recombinante Lsg1 y después para monitorear los ensayos de unión a nucleótidos. El equipo que se utilizó fue un espectrofluorómetro OLIS DM45 a una temperatura de 25°C.

4.8.1 Ensayo para verificar estructura terciaria

La muestra de proteína (1 μM) se excitó a una longitud de onda de 290 nm con una resolución espectral de 5 nm para la excitación y la emisión. Se procedió a realizar un barrido de emisión de 310 a 410 nm, para determinar la longitud de máxima emisión. Los espectros de emisión se obtuvieron para Lsg1 en amortiguador y en presencia de 8 M de urea después de incubar a diferentes tiempos.

4.8.2 Ensayo de unión de Lsg1 con nucleótidos de guanina

Los ensayos de unión a nucleótidos de guanina se llevaron a cabo con dos diferentes nucleótidos, GDP y Gpp(NH)p (Guanosine-5'-[(β , γ)-imido]triphosphate). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen inicial de 350 μL y con una concentración de Lsg1 de 0.5 μM . Se realizaron adiciones sucesivas de 2 μL del nucleótido, hasta alcanzar un total de 20 μL y se colectaron los datos a la longitud de onda de máxima emisión (332 nm). Se realizó un re-gráfico del valor fluorescencia en función de la concentración de nucleótido y se ajustaron los datos a un modelo de unión a un sitio.

5 RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123, utilizando el protocolo de Harju. et. al. el cual se basa en la ruptura de la pared celular por choque térmico y una posterior purificación del ADN mediante fenol-cloroformo. Por el método anterior se obtuvieron 50 μ L de ADN genómico con una concentración de 15 μ g / μ L que se observa como una banda con un tamaño mayor a 10kb (

Figura 7), lo cual se debe a que el genoma *Saccharomyces cerevisiae* tiene un tamaño que varía entre 200 y 2200 kb.

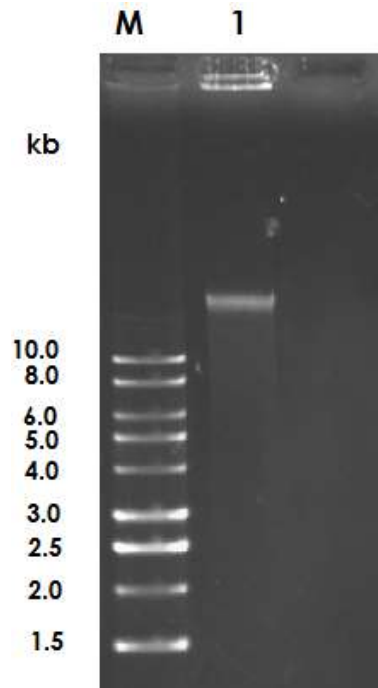


Figura 7. ADN genómico de *S. cerevisiae*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1kb Gold Bio); 1: ADN genómico extraído de *Saccharomyces cerevisiae* BCY123.

5.2 Amplificación de la secuencia de *Lsg1* mediante PCR

El gen *Lsg1* se amplificó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando como ADN molde el ADN genómico obtenido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron

tal que el amplicon contenía en su extremo 5' los sitios de restricción para las enzimas *NcoI* y *BamHI* y en su extremo 3' el sitio de restricción para la enzima *XhoI*. Estos sitios se utilizaron posteriormente para la clonación del inserto en los respectivos vectores de expresión.

El producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 1% el cual se muestra en la Figura 8, donde se obtuvo una sola banda de un peso cercano a 2 kb, que era lo esperado debido a que el gen *LSG1* tiene un tamaño de 1.973 kb.

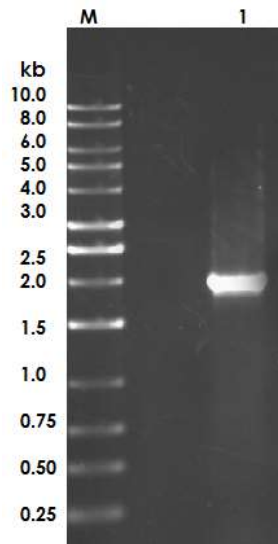


Figura 8. Amplificación por PCR del gen *LSG1*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1kb Gold Bio); 1: Producto de la PCR.

5.3 Construcción de los vectores para la expresión recombinante de *Lsg1*

Las construcciones se realizaron utilizando dos vectores de expresión, el primero fue el vector pET28b, el cual es un vector de expresión bacteriana.

El vector pET28 se caracteriza por tener un promotor T7, el cual es un promotor fuerte, seguido del operador lactosa que resulta en una expresión inducible, un marcador de selección por resistencia al antibiótico kanamicina, así como una etiqueta de 6His en el C-terminal de la proteína.

Para la expresión de *Lsg1* en el sistema de levadura se utilizó el vector pYES/2CT. Este vector se caracteriza por tener como promotor del transgene al promotor *Gal1*, que es inducible por galactosa, y además contiene como

marcador de selección bacteriana al gen de resistencia al antibiótico ampicilina y en la levadura a la complementación de la auxotrofia a uracilo por la presencia del gen *URA3*, además de una etiqueta de 6xhistidinas en el extremo C-terminal de la proteína. Ambos vectores y sus correspondientes insertos fueron purificados (Figura 9) y cuantificados para utilizarse en las reacciones de ligación.

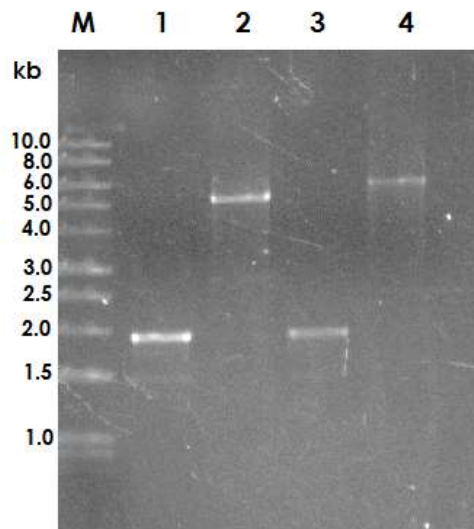


Figura 9. Vectores y productos de PCR utilizados en la reacción de ligación para construir los plásmidos de expresión de Lsg1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (1kb Gold Bio); 1: Amplicon de *LSG1* (digerido *NcoI/XhoI*), 2: Plásmido pET28b (digerido *NcoI/XhoI*), 3: Amplicon de *LSG1* (digerido *BamHI/XhoI*), 4: Plásmido pYES2/CT (digerido *BamHI/XhoI*).

5.4 Escrutinio de las clonas

Una vez llevadas a cabo las reacciones de ligación, las construcciones se transformaron en *Escherichia coli* DH5 α . Las clonas de la construcción pET28b-*LSG1* se seleccionaron en medio LB/kanamicina. También se realizó una ligación control en la que se preparó una reacción bajo las mismas condiciones sólo que no se adicionó inserto. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Colonias obtenidas de transformar la construcción pET28b-*LSG1* en *E. coli* DH5 α .

Construcción	No de colonias obtenidas
pET28b- <i>LSG1</i>	11
pET28b sin inserto (Control de auto-ligación)	0

Las clonas obtenidas de la construcción pET28b-*LSG1*, se sometieron a un escrutinio mediante patrón de restricción para seleccionar las clonas con el inserto. Mediante el programa *Serial Cloner 2.6.1* se obtuvo el patrón de restricción teórico con la enzima *Xba*I, para la construcción con y sin el inserto y poder compararlo con el patrón experimental. En la Figura 10 se, observa el patrón de restricción experimental de 9 clonas y en donde se observa que sólo una de las clonas analizadas no contenía inserto.

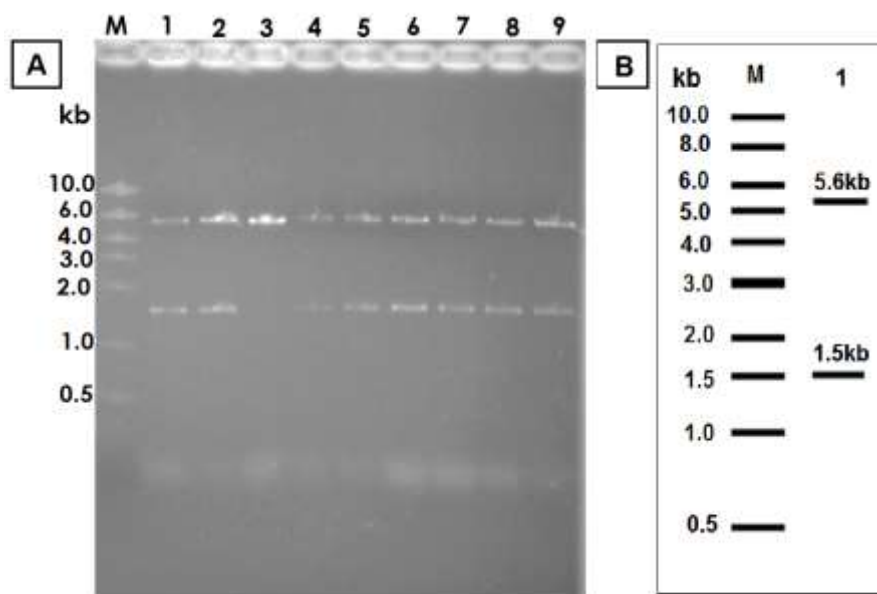


Figura 10. Escrutinio de la construcción pET28b-*LSG1* por restricción con la enzima *Xba*I. [A]: Patrón de restricción experimental; M: Marcador de peso molecular (1 kb ladder GoldBio), 1,2,4,5,6,7,8,9: Clonas positivas. [B]: Patrón de restricción esperado de la restricción de pET28b-*LSG1*; M: Marcador de peso molecular (1kb NEB), 1: Fragmentos esperados al realizar la restricción.

La construcción pYES2CT-*LSG1* también fue transformada en *E. coli* DH5 α y las clonas obtenidas, se seleccionaron por el marcador de resistencia al antibiótico ampicilina propio del vector. Para esta construcción también se realizó un control de auto-ligación y en la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 15. Colonias obtenidas de transformar la construcción pYES2/CT-LSG1 en *E. coli* DH5 α .

Construcción	UFC observadas
pYES2CT+Lsg1	23
pYES2CT s/inserto (Control de auto-ligación)	2

Sólo dos clonas se encontraron en el control de auto-ligación en contraste con las 23 clonas que se obtuvieron de las construcciones.

Se realizó el escrutinio de las clonas obtenidas mediante restricción con la enzima *EcoRV* (Figura 11), se muestran los patrones experimentales de la restricción con la enzima de 8 clonas y se compararon con los patrones teóricos de la construcción con inserto, donde sólo la mitad presenta el inserto.

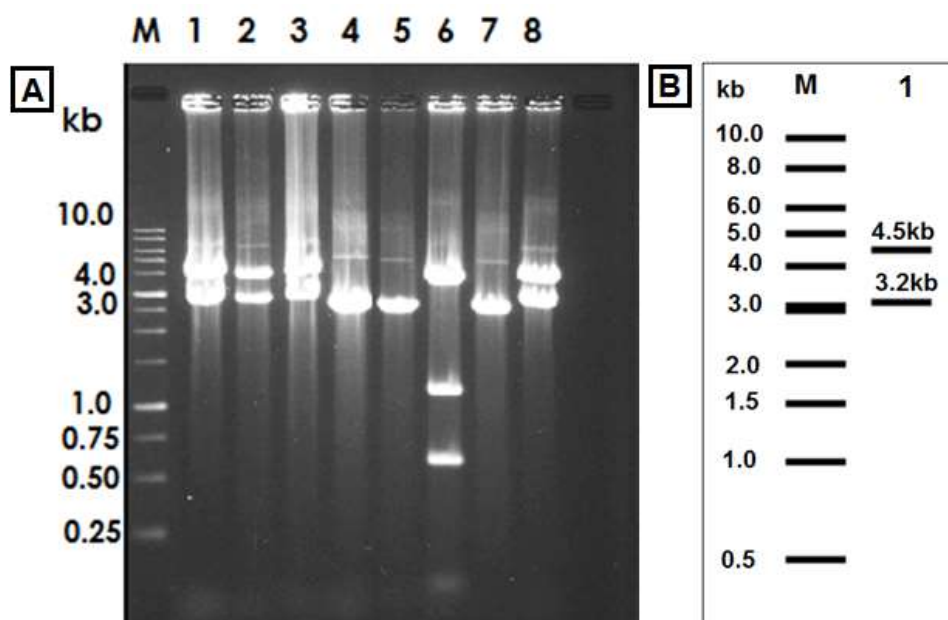


Figura 11. Escrutinio de la construcción pYES2/CT-LSG1 por restricción con la enzima *EcoRV*. [A]: Patrón de restricción experimental; M: Marcador de peso molecular (1kb NEB), 1, 2, 3, 8: Clonas positivas. [B]: Patrón de restricción esperado para la construcción pYES2/CT-LSG1; M: Marcador de peso molecular (1kb NEB), 1: Fragmentos esperados al realizar la restricción.

5.5 Secuenciación de las construcciones

Dos de las construcciones de cada vector, cuyo patrón de restricción coincidió con el esperado, se mandaron a secuenciar con la compañía GENSCRIPT. Al

comparar las secuencias obtenidas con la secuencia reportada en NCBI para *Saccharomyces cerevisiae* S288c se encontraron tres mutaciones. Las mutaciones corresponden a A131T, D227N y una mutación silenciosa GAG – GAA que codifica para el ácido glutámico de la posición 515. Todas las construcciones analizadas, presentaron las mismas mutaciones que podrían explicarse como resultado de errores introducidas en etapas tempranas de la PCR. Por ello se realizó de forma independiente un segundo ensayo de la construcción de las clonas desde la amplificación del gen *Lsg1*. Sin embargo, el resultado fue el mismo, las clonas presentaron las mismas mutaciones. Es poco probable que en dos eventos independientes de clonación se obtengan las mismas mutaciones, por lo que muy probablemente *S. cerevisiae* BCY123 presente variaciones en el gen *Lsg1* y existan diferentes isoenzimas según el trasfondo genómico del que se trate.

5.6 Expresión de la proteína Lsg1 en células procariontes

Una vez listas las construcciones, se procedió a expresar a *Lsg1* en el sistema de expresión procarionte, para lo cual, la construcción pET28b-*LSG1* se transformó en dos cepas de *Escherichia coli*, C41 y BL21pRIL (apéndice 3). Se realizó una cinética de expresión monitoreando la cantidad de proteína producida a diferentes tiempos después de la inducción. Las muestras tomadas en la cinética de expresión se resolvieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 %, los geles se muestran en las Figura 12 y Figura 13.

En el gel de la Figura 12 se puede observar cómo en el tiempo aumenta una banda de peso cercano a 75 kDa, la cual corresponde con el peso esperado para *Lsg1* que es de 75 kDa. En la muestra correspondiente a las 7h después de la inducción, se puede observar que la banda que ha triplicado su grosor respecto a la misma banda después de la primera hora de inducción. Lo anterior sugiere que la cantidad de esa proteína, ha aumentado con el paso del tiempo después de la inducción. Esto es aún más evidente en el gel de la Figura 13, donde la muestra correspondiente a las 24h después de la inducción es notablemente mayor.

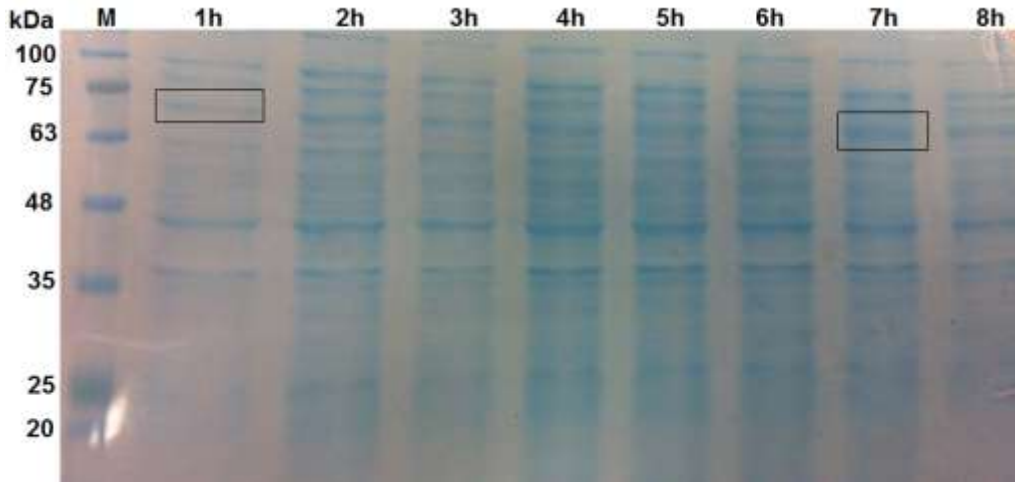


Figura 12. Cinética de expresión de la construcción pET28b-Lsg1 en *E. coli* BL21pRIL. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, teñido con azul de Coomassie-G250. M: Marcador de peso molecular (Gold Bio BLUEstain 2). Carriles: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a muestras tomas después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h después de la inducción con IPTG.

En comparación, la cinética de expresión de Lsg1 en la cepa *E. coli* C41 no muestra un aumento en el grosor de la banda de interés con respecto al tiempo, aún después de 24h (Figura 13). Lo cual indica que no hay un aumento de la concentración de la proteína Lsg1, como consecuencia de la inducción con IPTG. Después de comparar los resultados obtenidos se seleccionó a la cepa de *E. coli* BL21pRIL como cepa de expresión para obtener a la proteína Lsg1.

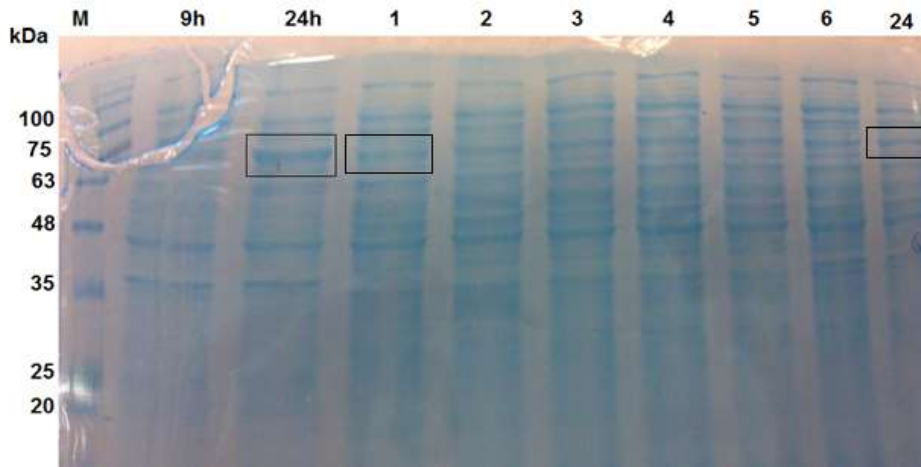


Figura 13. Cinética de expresión de la construcción pET28b-Lsg1 en *E. coli* BL21pRIL y C41. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, teñido con azul de Coomassie G-250. M: Marcador de peso molecular (Gold Bio BLUEstain 2). Carriles 2 y 3 corresponden a muestras tomas después de 9 y 24 h después de la inducción con IPTG en células *E. coli* BL21pRIL. Carriles: 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 muestras tomas después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h después de la inducción con IPTG en células *E. coli* C41.

5.7 Purificación de la proteína Lsg1 en células procariontes

Una vez llevado a cabo el proceso de expresión de la proteína Lsg1 en la cepa *E. coli* BL21pRIL se procedió a purificar a la proteína. Como primer paso de purificación se utilizó una columna de afinidad a iones Ni^{2+} gracias a la etiqueta de poli-histidina que se colocó a la proteína recombinante Lsg1 en su extremo C-terminal. La separación de la proteína se basa en la formación de un complejo de coordinación entre las histidinas y el ion Ni^{2+} , lo cual permite su retención en la columna. Se tomaron muestras de cada paso del proceso de purificación y se resolvieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% (Figura 14).

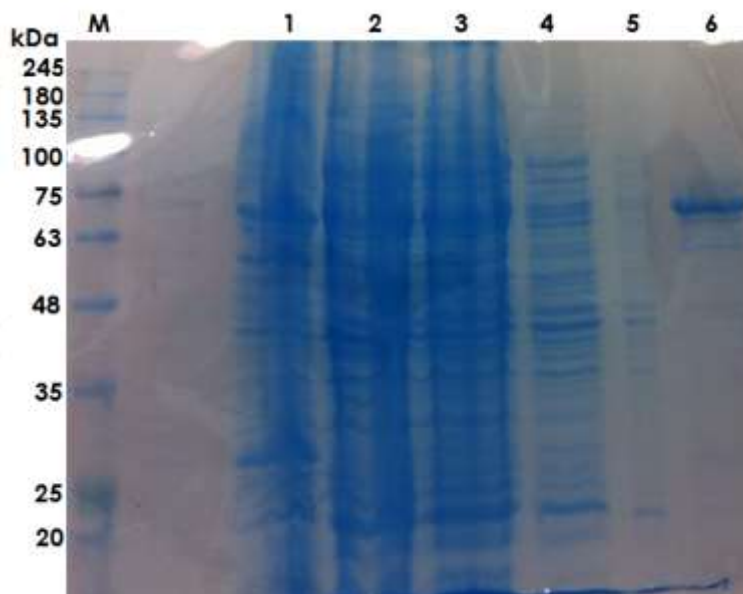


Figura 14. Purificación de la proteína Lsg1 expresada en bacteria recombinante mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} . Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, teñido con azul de Coomassie G-250. M: Marcador de peso molecular (Gold Bio BLUEstain 2), 1: Muestra del botón celular, 2: Extracto crudo, 3: Fracción no retenida por la columna de Ni^{2+} , 4: Lavado con el amortiguador de lisis, 5: Lavado con el amortiguador de alta sal, 6: Fracción eluida.

En el gel se puede observar que se obtuvo una banda enriquecida con un peso cercano a los 75 kDa en la fracción que se eluyó de la columna, que

probablemente corresponda a la proteína Lsg1, pero no es la única banda presente en esta fracción, por lo cual fue necesario implementar otro paso a la purificación.

La muestra obtenida de la fracción eluída de la columna de afinidad se concentró y se inyectó a una columna de exclusión molecular. Esta cromatografía permite separar a las partículas en base a su peso molecular. Las muestras colectadas se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% (Figura 15). Se puede observar que las fracciones de los carriles 1- 9 contiene a la proteína Lsg1 que corresponde a la banda con un peso de alrededor de 75kDa. Las fracciones anteriores no presentaron la banda correspondiente a Lsg1 mientras que fracciones superiores se muestran otras bandas de menor peso molecular que pueden corresponder a otras proteínas.

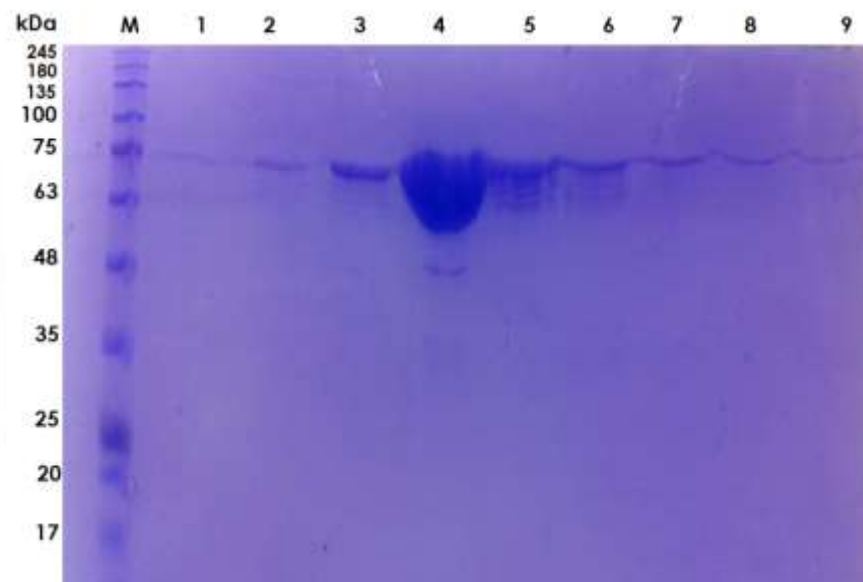


Figura 15. Purificación de la proteína Lsg1 expresadas en bacteria mediante una cromatografía de exclusión molecular. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie G-250. M: Marcador de peso molecular (Gold Bio BLUEstain 2). Carril 1): 62mL, 2) 70mL, 3) 76mL, 4) 82 mL, 5) 86mL, 6) 90mL, 7) 94mL, 8) 98mL, 9) 102 mL

5.8 Expresión y purificación de la proteína Lsg1 en células eucariotas

La expresión de la proteína recombinante Lsg1 en el sistema eucarionte se llevó a cabo en la cepa de *S. cerevisiae* BCY123, misma de la que se amplificó el gen *LSG1*. La inducción se llevó a cabo mediante la adición de galactosa 2.8% (m/v)

por un tiempo de 18 h. La purificación se llevó acabo en una columna de afinidad a iones Ni^{2+} gracias a la etiqueta de poli-histidinas presente en el extremo C-terminal de la proteína recombinante. Se obtuvieron muestras del proceso de purificación y se corrieron en un gel SDS-PAGE En el gel se muestran todas las fracciones de la purificación (Figura 16) pero no se observa una banda enriquecida correspondiente a 75 kDa para la fracción correspondiente a la elución. Lo anterior sugiere que no hubo sobreexpresión en este sistema.

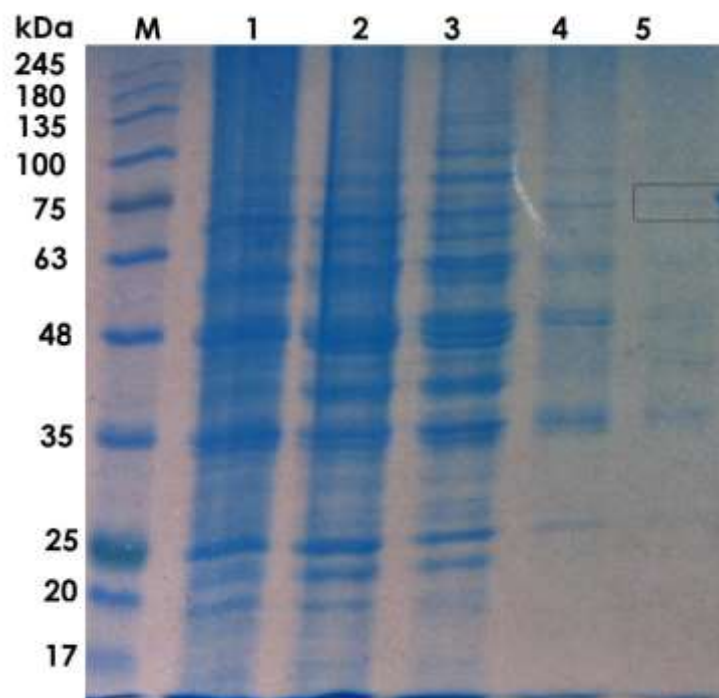


Figura 16. Purificación de la proteína Lsg1 expresada en levadura mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} . Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, teñido con azul de Coomassie G-250. M: Marcador de peso molecular (Gold Bio BLUEstain 2), 1: Muestra del botón celular, 2: Extracto crudo, 3: Fracción no retenida por la columna de Ni^{2+} , 4: Lavado con el amortiguador de lisis, 5 Fracción eluída.

Para verificar si la proteína Lsg1 se expresó, en niveles que se encuentran por debajo del límite de detección del azul de Coomassie, se realizó un western blot contra la etiqueta de histidinas presente en la proteína recombinante. El análisis por western blot se muestra en la

Figura 17 donde se confirmó un expresión incipiente de la proteína recombinante Lsg1 en el sistema eucarionte.



Figura 17. Análisis por Western Blot de la proteína Lsg1 expresado en el sistema eucarionte. Se utilizó usando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas presentes en la proteína, anti-HisHRP dilución 1:1000 y con un tiempo de exposición de 15 s sobre una placa fotográfica.

Así se concluyó que el mejor sistema para expresar de forma recombinante a la proteína Lsg1 fue la cepa *E. coli* BL21pRIL a una temperatura de 20°C con 0.5 mM IPTG. Una vez purificada la proteína obtenida de este sistema de expresión se procedió con su caracterización.

5.9 Dicroísmo Circular

La estructura secundaria de las proteínas se puede conocer mediante espectroscopia de dicroísmo circular (DC) en la región espectral del Ultravioleta lejano (190-260 nm). Esta técnica se basa en la absorción diferencial que tienen las moléculas quirales (compuesto ópticamente activo) con la luz polariza circularmente a la derecha y luz polariza circularmente a la izquierda. En un espectro de dicroísmo circular las α -hélices se muestran como dos mínimos negativos a 208 y 222 nm y una señal positiva a 200 nm. La señal que caracteriza a una hoja- β es un mínimo 218 nm, mientras que una proteína que carece de estructura presenta una banda fuertemente negativa a 195-200 nm. El espectro de dicroísmo circular de Lsg1 se muestra en la Figura 18.

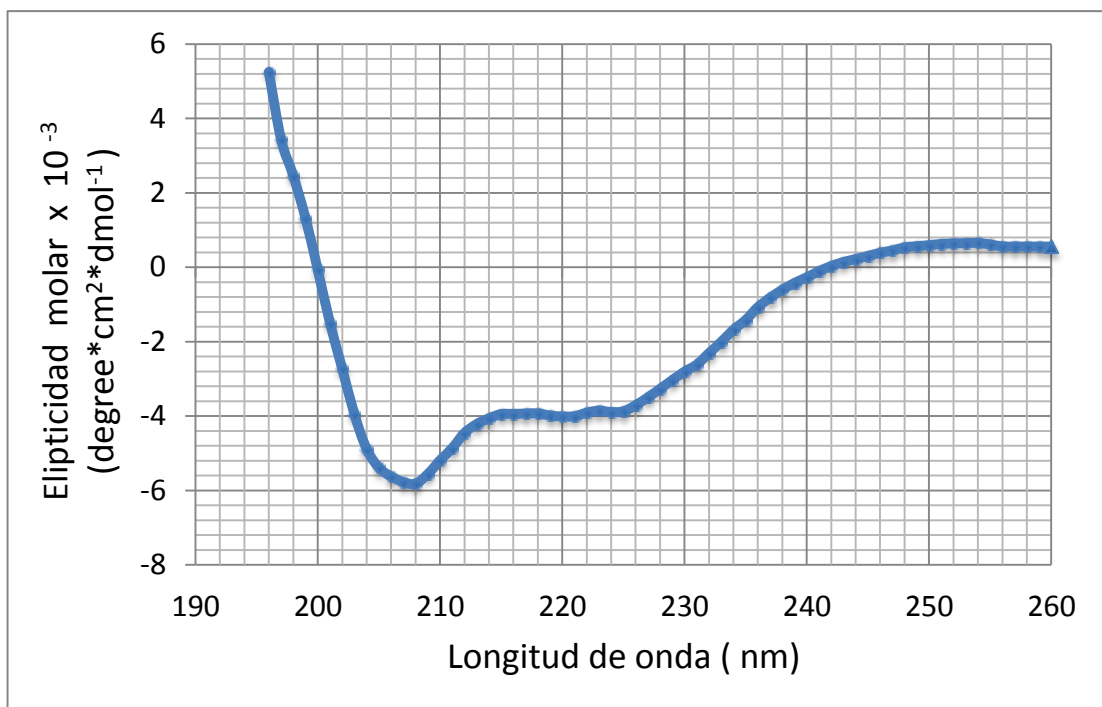


Figura 18. Espectro de dicroísmo circular de la proteína recombinante Lsg1 expresada en *E. coli* BL21pRIL.

En el espectro de CD de Lsg1 muestra un mínimo muy evidente a 208 nm y una señal positiva a 200nm, lo cual sugiere la presencia de α -hélices. El mínimo a 222 nm no se observa y más bien parece una meseta que va desde los 216 a los 225 nm. Esto sugiere que la meseta corresponde a la conjunción de los mínimos de 218 y 222 nm, por lo que probablemente Lsg1 también presente hojas- β en su estructura. La deconvolución del espectro de dicroísmo circular sugiere que Lsg1 contiene una mezcla de hélices- α y hojas- β (Tabla 16).

Tabla 16. Contenido de estructura secundaria de la proteína Lsg1 mediante deconvolución de su espectro de dicroísmo circular.

Estructura secundaria	%
Hélice α	18.5
Hoja β	25.9
Giro β	11.8
Hebra al azar	37.6
Total	93.6

5.10 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) mide las fluctuaciones de la intensidad de luz difractada con respecto al tiempo debido al movimiento browniano de las partículas. Esta técnica es una de las más usadas para determinar el tamaño de moléculas y nano partículas. El análisis por DLS de una muestra provee información acerca del radio hidrodinámico (R_H) de una partícula, su peso molecular y cuantitativamente nos dice cuántas especies existen en la disolución y su dispersión. La proteína Lsg1 se analizó con esta técnica donde se observa un solo pico indicando que es la muestra es monomodal, es decir, existe una sola especie en la disolución. Su radio hidrodinámico de 4.21 nm.

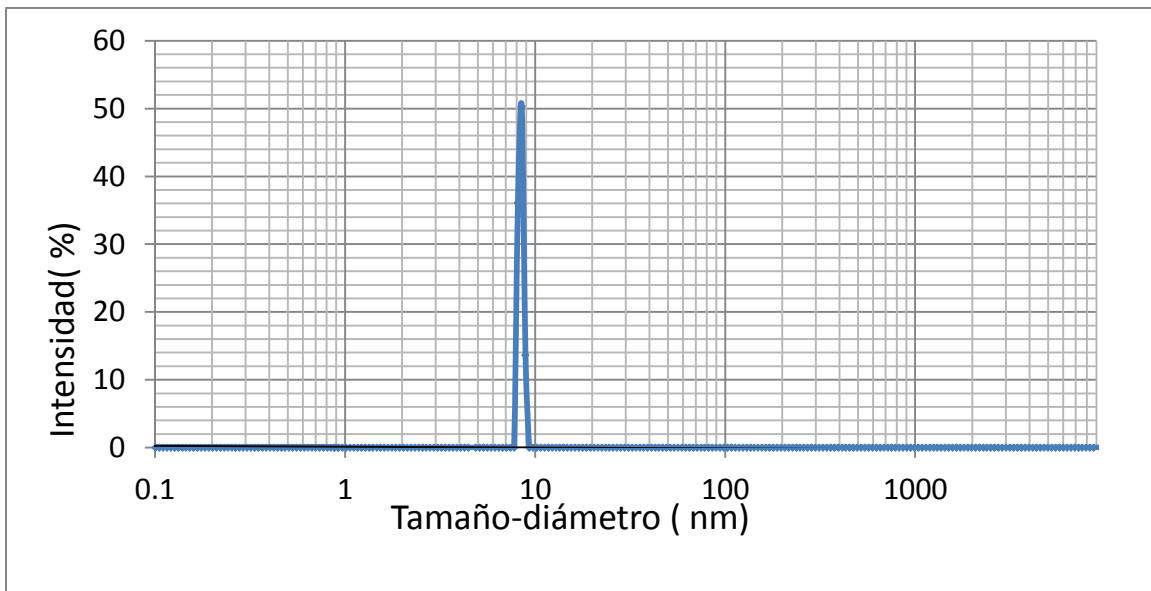


Figura 19. Espectro de dispersión dinámica de la luz de Lsg1 expresada en células de *E. coli* BL21pRIL.

5.11 Fluorescencia

5.11.1 Estructura terciaria de la proteína

La fluorescencia es una técnica espectroscópica que se caracteriza por el hecho de que algunas sustancias (fluoróforos) tienen la capacidad de absorber energía

a una determinada longitud de onda para luego emitir esta energía a una longitud de onda mayor. Los fluoróforos naturales de las proteínas son los aminoácidos aromáticos, particularmente el triptófano, el cual es excitado de forma selectiva a una longitud de onda de 290 nm. Mientras que su emisión ocurre a longitudes de entre 300-350 nm dependiendo de la polaridad del medio en donde se encuentre el triptófano. Debido a esta sensibilidad de los triptófanos al medio en que se encuentren, su fluorescencia es muy utilizada como reportero de los cambios conformacionales de las proteínas.

La señal de fluorescencia de los triptófanos presentes en Lsg1 se utilizó para verificar la presencia de estructura terciaria en la proteína (Figura 20). Lsg1 posee 7 triptófanos y uno de ellos se encuentra en el dominio G.

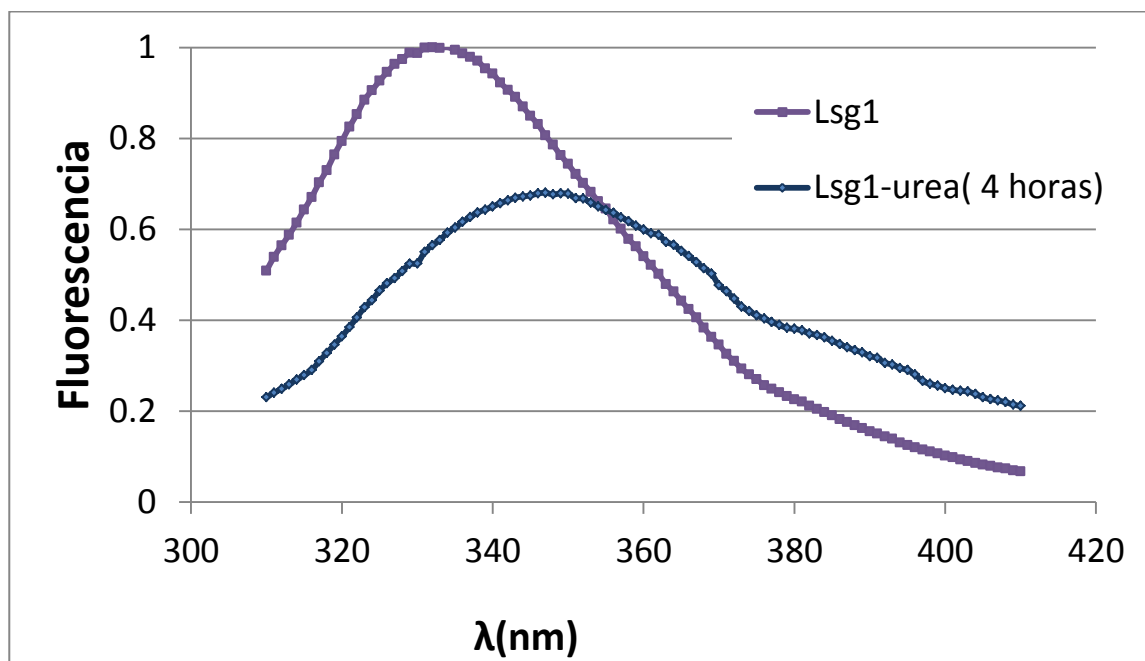


Figura 20. Espectro de emisión de fluorescencia de los triptófanos presentes en la proteína Lsg1 en solución amortiguadora y en urea 4 M después de 4 horas de incubación en presencia del agente desnaturalizante.

El espectro de emisión de Lsg1 muestra un máximo de emisión a 332 nm en su conformación nativa, en contraste cuando la proteína se colocó en presencia de un agente desnaturalizante (urea 4 M) se observó un corrimiento al rojo en su espectro de emisión, tal que el máximo de emisión se recorrió a 349 nm, además

de presentar una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida. Lo anterior sugiere que los triptófanos de Lsg1 en el estado nativo se encuentran ocultos en la estructura terciaria de la proteína y quedaron expuestos al solvente cuando la proteína se desnaturalizó. En conjunto, los resultados obtenidos de los experimentos de dicroísmo circular, fluorescencia y dispersión dinámica de luz demostraron que la proteína Lsg1 obtenida de forma recombinante en *E. coli* se encuentra plegada.

5.11.2 Ensayo de unión al nucleótido Gpp(NH)p

Después se procedió a evaluar la función de Lsg1 en función de su capacidad de unir nucleótidos de guanina. Para ello, se tituló a la enzima con diferentes concentraciones de un análogo no-hidrolizable de GTP, el Gpp(NH)p (guanosin-5'-[(β,γ)-imido]trifosfato) (Figura 21) y se midió el espectro de emisión resultante

. La adición de concentraciones que van en aumento de Gpp(NH)p resulta en una disminución en la intensidad de la emisión de los triptófanos de Lsg1 sin cambiar la longitud de máxima emisión. Estos cambios en la intensidad de la señal de fluorescencia como resultado de la presencia de nucleótidos de guanina pueden atribuirse a la interacción con el nucleótido o a un fenómeno de filtro interno o ambos.

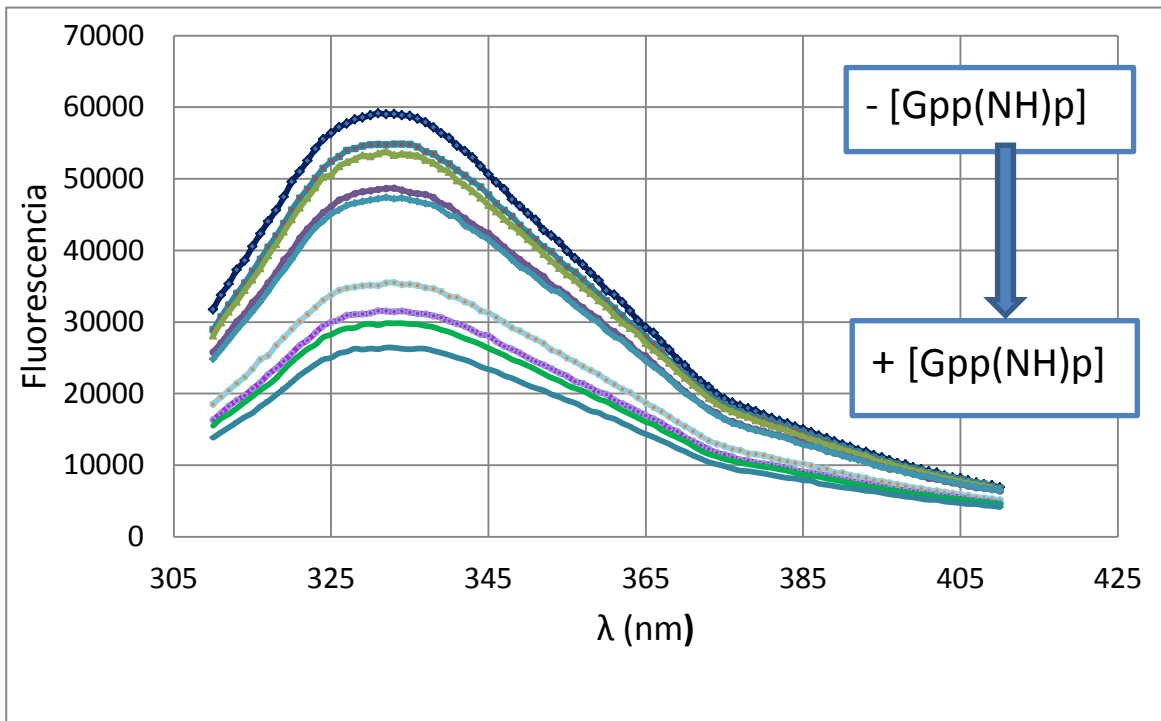


Figura 21. Espectro de emisión de fluorescencia de los triptófanos de la proteína Lsg1 en presencia de diferentes concentraciones de nucleótido Gpp(NH)p.

A partir de los espectros obtenidos se tomaron los valores de emisión a la longitud de máxima emisión y se corrigieron considerando el efecto de filtro interno. El efecto de filtro interno es un fenómeno en donde hay una aparente disminución en la fluorescencia de máxima emisión debido a que el ligando adicionado, absorbe parte de la intensidad de la luz incidente o emitida. Debido a esto es la absorción que pueden tener otras moléculas presentes en el ensayo a la longitud de onda de excitación y/o emisión del fluoróforo. En este ensayo el nucleótido Gpp(NH)p absorbe ligeramente a la longitud de onda de excitación de los triptófanos (290nm). La corrección de los datos se llevó a cabo con la siguiente ecuación:

$$F_{Corregida} = F_{Observada} \left(10^{\frac{A_{Excitación} + A_{Emisión}}{2}} \right)$$

donde $F_{\text{Corregida}}$ es la fluorescencia corregida por filtro interno, $F_{\text{Observada}}$ es la fluorescencia medida experimentalmente, $A_{\text{Excitación}}$ es la absorbancia del ligando a la longitud de onda de excitación del fluoróforo y $A_{\text{Emisión}}$ es la absorbancia del ligando a la longitud de onda de máxima emisión del fluoróforo. Una vez corregidos los valores de fluorescencia a la longitud de máxima emisión por el efecto de filtro interno, se re-graficaron con respecto a la concentración de nucleótido (Figura 22).

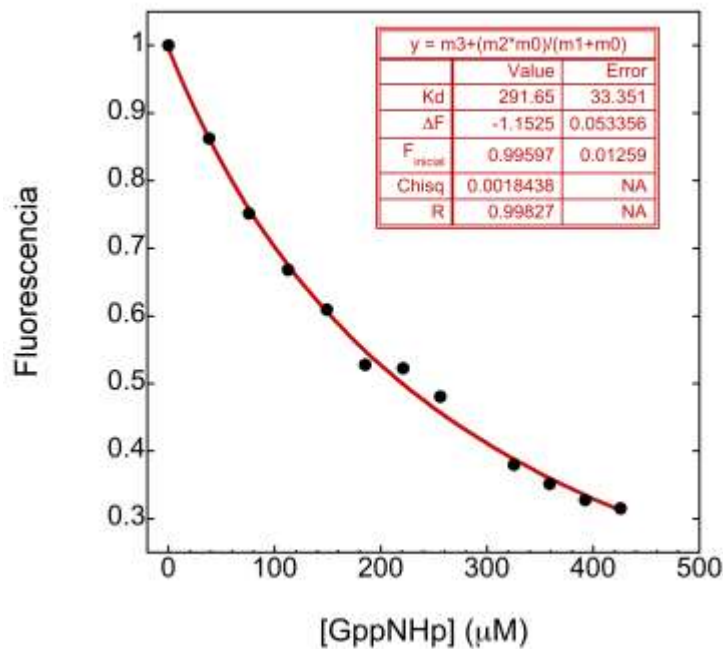


Figura 22. Dependencia de la fluorescencia de Lsg1 con respecto a la concentración del nucleótido Gpp(NH)p. La línea roja representa el ajuste de los datos a un modelo de un sitio de unión.

Los datos se ajustaron a un modelo de unión a un solo sitio como el que se describe en la Figura 23 y se obtuvo una constante de disociación de 292 μM para el análogo no hidrolizable de GTP, Gpp(NH)p.

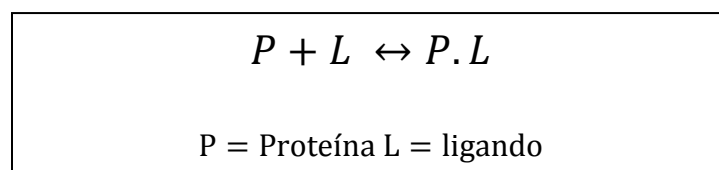


Figura 23. Modelo de interacción a un solo sitio de unión.

6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Sintetizar proteínas recombinantes ha sido posible gracias al advenimiento de la ingeniería genética. La posibilidad de obtener estas proteínas en grandes cantidades cuando proceden de fuentes en las que se encuentran en baja concentración, representa una gran ventaja en el campo de la investigación y el desarrollo de fármacos. Aprovechando las herramientas de la biología molecular y de ADN recombinante se procedió la obtención de la GTPasa Lsg1. El proceso de clonación comenzó con la obtención del ADN del gen que codifica a la proteína, haciendo uso de la metodología propuesta en el artículo (Harju, et al., 2004) que se basa en la ruptura de la pared celular por choque térmico y su posterior purificación por el método de fenol-cloroformo, lo cual permitió tener ADN de buena calidad (alta pureza y rendimiento) para realizar la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa. Los oligonucleótidos fueron diseñados para añadir los sitios de restricción para las enzimas *NcoI*, *BamHI* y *XhoI*, lo cual permitió hacer la clonación sitio dirigido en los plásmidos utilizados.

Una vez obtenidas las construcciones se enviaron a secuenciar, y al comparar las secuencia obtenida con la reportada se encontraron variaciones en la secuencia codificante del gen de la proteína Lsg1. Estas variaciones se podrían explicar porque se trata de dos cepas diferentes, la cepa de la cual se amplificó el gen es la cepa BCY123 mientras que la secuencia reportada pertenece a la cepa S288C. Estas variaciones implican un cambio en la codificación para los aminoácidos de las posiciones 131 y 227 de la siguiente manera (Tabla 17).

Tabla 17. Variaciones encontradas en la proteína Lsg1 recombinante.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Variaciones en los aa de las posiciones :	
	131	227
S288C	A	D
BCY123	T	N

Como podemos observar, los cambios no son conservados ya no presentan la misma naturaleza química, inclusive hay cambios en la polaridad, lo cual podría tener efectos negativos en la proteína: 1) alterar el plegamiento de la proteína y 2) alterar su función ya sea modificando la unión e hidrólisis de GTP o bien alterando sus interacciones proteína-proteína. Ninguna de variaciones se encuentran dentro del dominio G (residuos 234-390) como se puede ver en la Figura 24.



Figura 24. Esquema de la proteína Lsg1 en donde se ubican los amino ácidos variables para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* BCY123.

Por lo que tentativamente la hidrólisis de GTP por Lsg1 no tendría que verse afectada. Después se analizó la variación de estas posiciones con respecto a otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, para lo cual se realizó el alineamiento de varias secuencias reportadas en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>). Como se observa en la Tabla 18 el cambio A131T y D227N es una variación común en *Saccharomyces cerevisiae*, por lo cual no se trata de una mutación y es probable que el plegamiento de la proteína no esté comprometido. Sin embargo el impacto en otra función diferente a la hidrólisis de GTP no se puede predecir.

Tabla 18. Variación de los aminoácidos en las posiciones 131 y 227 de la proteína Lsg1 en diversas cepas de *S. cerevisiae*.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Variaciones en los aa de las posiciones	
Cepas:	131	227
YGL099W_S288C	A	D
YGL099W_AWRI796	T	N
YGL099W_BC187	T	N
YGL099W_BY4741	A	D
YGL099W_BY4742	A	D
YGL099W_CBS7960	T	N
YGL099W_CEN.PK	A	D
YGL099W_CLIB215	T	N
YGL099W_CLIB324	T	N
YGL099W_D273-10B	A	D
YGL099W_DBVPG6044	A	D
YGL099W_EC1118	T	D
YGL099W_EC9-8	T	D
YGL099W_FL100	A	D
YGL099W_FY1679	A	D
YGL099W_JAY291	T	D
YGL099W_JK9-3d	A	D
YGL099W_K11	A	D
YGL099W_Kyokai7	A	D
YGL099W_L1528	T	N
YGL099W_LalvinQA23	T	D
YGL099W_PW5	A	D
YGL099W_RM11-1a	T	N
YGL099W_RedStar	A	D
YGL099W_SEY6210	A	D
YGL099W_SK1	A	D
YGL099W_T7	A	D
YGL099W_T73	T	N
YGL099W_UC5	A	D
YGL099W_W303	T	N
YGL099W_X2180-1A	A	D
YGL099W_Y55	A	D
YGL099W_YJM269	A	D
YGL099W_YJM339	T	N
YGL099W_YJM789	A	N
YGL099W_YPH499	A	D
YGL099W_YPS128	A	D
YGL099W_YPS163	A	D
YGL099W_YS9	A	D
YGL099W_ZTW1	A	D

6.1 Expresión de la proteína Lsg1 en el sistema procarionte

Con las construcciones analizadas se comenzó la etapa de expresión, para lo cual las construcciones se transformaron en las cepas *E. coli* C41 y BL21pRIL, cuyas características principales son:

- Ambas son cepas deficientes en la expresión de las proteasas OmpT y Lon
- La cepa BL21pRIL cuenta con el plásmido pRIL que le provee copias adicionales para los tRNAs que reconocen codones poco utilizados por *Escherichia coli* como los codones AGA y AGG de arginina, el codón AUA que codifica para isoleucina y el codón CUA de leucina
- La cepa C41 es adecuada para la producción de toxinas y proteínas de membrana.

Al expresar una proteína de origen eucarionte en un sistema procarionte es necesario considerar que cada aminoácido puede ser codificado por más de un codón y que un codón puede ser más o menos utilizado por el organismo hospedero lo que se ve reflejado en la cantidad de tRNAs presentes. Así, la producción de una proteína puede limitarse si existe en su secuencia codones poco usados en *Escherichia coli* debido a que la disponibilidad de estos tRNA raros es baja y pueden agotarse cuando existen niveles altos de expresión de proteína, lo que resulta en un paro momentáneo de la traducción y repercute en la obtención de proteínas truncas y/o mal plegadas. La expresión de Lsg1 en *E. coli* sólo se observó en la cepa BL21pRIL, mientras que en C41 la sobreexpresión fue muy pobre.

Por lo cual se analizó la frecuencia del uso de codones en *E. coli* y en *S. cerevisiae* para los tRNA que provee la cepa BL21pRIL (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia del uso de codones en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Aminoácido	Codones	Frecuencia de uso en <i>E. coli</i>	Frecuencia de uso en <i>S. cerevisiae</i>
Arginina	CGU	21	6.4
	CGC	22.3	2.6
	CGA	3.5	3.0
	CGG	5.4	1.7
	AGA	2.0	21.3
	AGG	1.1	9.2
Isoleucina	AUU	30.4	30.1
	AUC	25.2	17.2
	AUA	4.2	17.8
Leucina	CUU	11	12.3
	CUC	11.1	5.4
	CUA	3.8	13.4
	CUG	53.1	10.5
	UUA	30.1	30.1
	UUG	25.2	17.2

En la Tabla 19 se puede observar en color morado que los codones que menos utiliza *Escherichia coli* para codificar al aminoácido arginina son los que más utiliza *Saccharomyces cerevisiae* y viceversa (codones en rojo, mientras que para el aminoácido isoleucina el codón más utilizado es el mismo en ambos casos (codón en azul).

Esta información indica que el uso preferencial de codones es importante y es más evidente para la traducción del aminoácido arginina. Lo anterior puede impactar en la sobre-expresión de Lsg1 en *E. coli* como hospedero, en particular cuando varios de estos codones codificados por tRNA escasos se encuentra en forma consecutiva en la secuencia primaria de la proteína (Figura 25). Lo anterior puede explicar porque Lsg1 solo se logró expresar en *E. coli* BL21pRIL y no en C41.

Una vez seleccionada la cepa se utilizaron las siguientes condiciones para su expresión:

- Las células transformadas se crecieron en el medio rico 2xTY con el cual se tiene una mayor densidad óptica en comparación con el medio LB, ya que aunque ambos son medios de cultivos rico y están compuestos por los mismo reactivos, la proporción de extracto de levadura es mayor en el primero y favorece más el crecimiento bacteriano.
- La inducción se hace con 0.5 mM de IPTG cuando la densidad óptica a 600 nm es de 0.6 y 0.7, para asegurar una concentración adecuada de microorganismos en fase logarítmica de crecimiento.
- Después de inducir se disminuye la temperatura a 18°C con ello se favorece el plegamiento de la proteína (Khow & Suntrarachun, 2012) .

6.2 Expresión de la proteína Lsg1 en el sistema eucarionte

La proteína Lsg1 en estudio, corresponde al ortólogo de levadura y al ser una proteína propia de *S. cerevisiae* se buscó expresarla en la misma levadura como sistema heterólogo. Se utilizó la levadura *S. cerevisiae* BCY123 como hospedero pues tiene la bondad de ser una cepa deficiente en proteasas, además de sobreexpresar al factor de transcripción Gal4 en respuesta a galactosa. El vector utilizado fue el pYES/2CT, que controla la expresión del transgene mediante el promotor *GAL1* el cual es reconocido por el factor de transcripción Gal4 y es inducible por galactosa y reprimible por glucosa, además de tener el terminador del gen *CYC1*. Para su expresión se procedió de acuerdo con lo establecido en el laboratorio para la expresión de la GTPasa ribosomal EFL1 Las condiciones son las siguientes:

- Las células se crecieron en un medio SD-URA para asegurar la permanencia de la construcción durante la segregación mitótica y con 0.2% de glucosa como fuente de carbono hasta una densidad de 2. Lo anterior asegura que se haya consumido toda la glucosa que reprime al promotor *GAL1*.

- Después se indujo con 2.8% de galactosa, que además de inductor también funge como fuente de carbono.

Después de la expresión y purificación mediante una columna de afinidad a iones Ni^{2+} no se apreció la sobreexpresión de Lsg1. Mediante western blot se confirmó que aunque incipiente sí hubo expresión de la proteína. Resulta extraño que siendo Lsg1 una proteína propia de la levadura no se exprese en levadura. En este caso el uso preferencial de codones no representa un problema como fue en el caso del sistema de expresión bacteriano, porque se trata del gen de levadura y por tanto tiene el uso de codones de levadura. Otros factores que pudieron afectar la expresión se enuncian a continuación:

- Se ha descrito que la expresión de proteínas heterólogas en alto nivel puede limitar directamente otros procesos celulares al competir por bio-estratos, o indirectamente al interferir con el metabolismo. Esto induce una reacción de estrés celular que origina entre otras muchas cosas la producción de proteasas que degradarían la proteína de interés o bien problemas en el plegamiento (Mattanovich, et al., 2004). Un mal plegamiento sería evidente mediante una banda enriquecida en la fracción insoluble de las células lisadas. En contraparte, la degradación de la proteína sería evidente por la aparición de fragmentos de menor tamaño tanto en el gel SDS-PAGE como en el western blot. Sin embargo, ninguno de estos dos fenómenos se observó en la expresión de Lsg1 en levadura.
- La transcripción es un proceso fundamental para la sobre-expresión de proteínas, por lo cual se utilizan promotores fuertes que permitan la expresión, pero si las regiones reguladoras del promotor no se encuentran completas o la construcción no es la adecuada no se tienen niveles de expresión óptimos. En el laboratorio se ha sobre-expresado en cantidades considerables la GTPasa ribosomal Efl1(7 mg/L cultivo) usando la misma cepa de *S. cerevisiae* BCY123 pero usando un vector que dirige la expresión bajo el control de un promotor híbrido Gal1/10. Así que una

posibilidad es que el promotor en el vector pYES/2CT no es del todo adecuado para dirigir una expresión abundante.

6.3 Estabilidad y método de purificación

Para diseñar un esquema de purificación adecuado es necesario conocer ciertas características de la proteína como son su tamaño, punto isoeléctrico, solubilidad y función entre otras. La proteína Lsg1 tiene un punto isoeléctrico estimado en 8.76 y un peso de 75 kDa. Debido a que el pI de la proteína se encuentra muy cercano a la neutralidad fue importante utilizar tampones capaces de amortiguar a pH por debajo de 7. Por lo anterior tampones de Tris fueron descartados, además de que el Tris tiene la desventaja de presentar grandes variaciones en el pH en función de la temperatura. Así se utilizaron tampones a base de fosfatos a pH 6 que aseguraron estar lejos del pI de Lsg1 y prevenir la agregación de la proteína. En los primeros ensayos de purificación se observó que durante la cromatografía de filtración en gel, Lsg1 eluía en dos fracciones y una de ellas se encontraba en el volumen muerto de la columna, lo que sugería que esa fracción tenía un tamaño aparente muy grande. El espectro de absorción de esa fracción presentó un máximo de absorción cercano a 260 nm y no a 280 nm como es de esperarse para las proteínas. Este mismo fenómeno ya se había observado para la GTPasa ribosomal Efl1 y se atribuyó a la unión de la proteína con RNA. En analogía, es probable que una parte de la Lsg1 aislada también se encuentre unida a RNA. Debido a esto, después de la cromatografía de afinidad a Ni²⁺ se realizó un lavado con una solución con 2 M de NaCl para romper las interacciones de la proteína Lsg1 con RNA. Todas las GTPasas ribosomales y de traducción además de del dominio G, tiene un dominio de unión a RNA por lo que pueden formar complejos fuertemente unidos a RNA. La proteína se guardó en un amortiguador con 10% de glicerol para prevenir su agregación. Por cada litro de cultivo se obtuvo un rendimiento de 3.5 mg de la proteína Lsg1.

6.4 Plegamiento y estructura

Las proteínas son polímeros de aminoácidos con diferentes niveles estructurales y en donde el plegamiento de la estructura terciaria está relacionada con su función, por ello es importante que la proteína obtenida de manera recombinante se encuentre plegada. Para determinar el contenido de estructura de la proteína Lsg1 se analizó por medio de la técnica de dicroísmo circular. Su espectro de dicroísmo circular es típico de una proteína con estructura secundaria y no muestra indicios de estar desestructurada ya que no se observa un mínimo en 200 nm dado que esta señal negativa es característica de que una proteína está desestructurada, por el contrario se observó un mínimo a 208 nm que es característico de la estructura secundaria α hélice y una pequeña meseta que une dos señales entre 216-224 nm. La deconvolución del espectro experimental con el programa SELCON3, confirmó que Lsg1 contiene en su estructura secundaria una mezcla de α -hélices, hojas β y hebra al azar. También presenta regiones desestructuradas que son comunes en las GTPasa como las hebras que forman parte del dominio G cuya flexibilidad es esencial para la hidrólisis de los nucleótidos.

Lsg1 también fue analizada por medio de la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés). Esta técnica permite determinar el tamaño de las partículas ya que mide fluctuaciones que son resultado de los movimientos brownianos y que se pueden correlacionar con el coeficiente de difusión y el tamaño (radio hidrodinámico). El radio hidrodinámico se refiere al radio equivalente de una esfera rígida que difunde a la misma velocidad, por lo que es reflejo del supuesto tamaño de la molécula hidratada. La proteína Lsg1 mostró en solo un pico, lo cual indica que tenemos solo una población formada por la misma especie con un radio hidrodinámico de 4.21 nm. La comparación del radio hidrodinámico de Lsg1 con el de otras proteínas cuyo tamaño y radio es conocido, indica que la proteína se encuentra plegada pero tiene una forma elongada (Tabla 20).

Tabla 20. Relación peso - radio hidrodinámico de proteínas modelo determinado mediante dispersión dinámica de luz.

Proteína	R _H (nm)	Masa molecular (kDa)
Lisozima	1.9	14.7
Insulina humana (pH=7)	2.7	34.2
Ovoalbúmina	3	43
Hemoglobina	3.5	65
Albúmina sérica bovina (BSA)	3.55	67
Alcohol deshidrogenasa (Caballo)	3.7	80
Hexoquinasa	4.3	102

Después de analizar la estructura secundaria y su tamaño con respecto a su plegamiento se realizó un ensayo para verificar la estructura terciaria de Lsg1 basado en la fluorescencia. Cambios en el espectro de emisión de los triptófanos de Lsg1 nativa y en presencia de un agente desnaturizante, evidenciaron que la proteína tiene estructura terciaria. Cambios en el máximo de emisión de la fluorescencia a una longitud de onda mayor y una disminución en su intensidad indican que los triptófanos cambiaron su ambiente y ahora algunos se encuentran más expuestos al medio y otros se han apagado.

6.5 Ensayos de unión a nucleótidos de guanina

Los resultados anteriores indicaron que la proteína se encuentra plegada, por lo que se procedió a corroborar la función de la proteína mediante ensayos de unión a nucleótidos de guanina. La proteína Lsg1 cuenta con un total de 7 triptófanos y uno de ellos se encuentra dentro del dominio G (entre G4 y G5,

Figura 26), por lo que la interacción se monitoreó mediante cambios en la fluorescencia por unión al nucleótido. La adición de un análogo no hidrolizable del GTP a la proteína, causa una disminución en la fluorescencia y ésta disminución aumenta conforme aumenta la adición del nucleótido. Esto sugiere que el apagamiento de los triptófanos se da probablemente por la interacción

con el nucleótido, es decir que hay un cambio en el ambiente de los triptófanos ya sea porque transfiere energía al nucleótido o porque ahora está interaccionando con otro residuo dando como resultado el apagamiento. Para corroborar el primer escenario sería necesario realizar ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia FRET (en inglés, fluorescence resonance energy transfer), utilizando análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina.

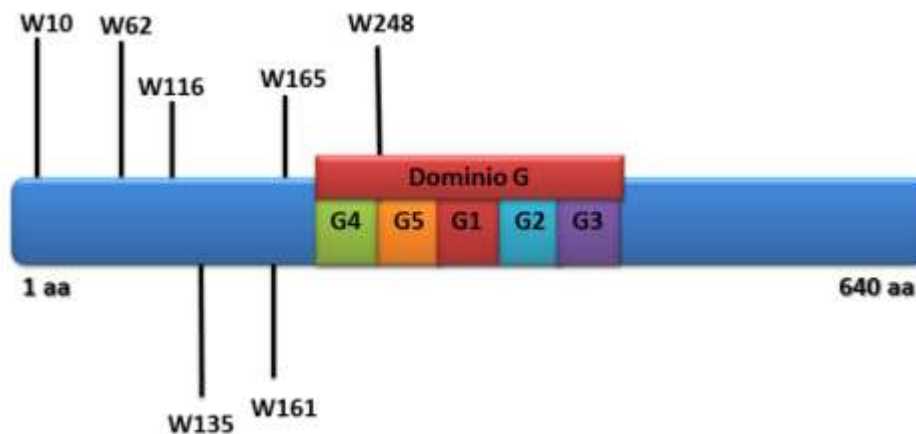
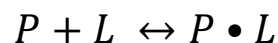


Figura 26. Localización de los triptófanos en la secuencia primaria de Lsg1.

Después de obtener este gráfico se tomaron los valores de máxima emisión y se graficaron con respecto a la concentración del nucleótido añadido y se llevó a cabo el ajuste por una regresión no lineal aun modelo de un sitio de unión:



El modelo describe adecuadamente los datos experimentales y se obtuvo una constante de disociación de 292 μM . Este valor sugiere que la afinidad de Lsg1 por su análogo de sustrato es baja. Esto ya se había observado para la GTPasa Efl1 que presenta una baja afinidad por este análogo pero no para el sustrato natural (García, et al., 2015). Es necesario realizar más experimentos para poder comparar la afinidad por diversos sustratos.

7 CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos construcciones para la expresión recombinante en *E. coli* y *S. cerevisiae* de la proteína Lsg1.
- Se logró la expresión recombinante de la proteína Lsg1 en la bacteria *E. coli* BL21pRIL.
- Se estableció un método de purificación para la proteína recombinante Lsg1.
- La proteína recombinante Lsg1 presenta estructura secundaria y terciaria por lo que se obtuvo de forma plegada.
- Lsg1 tiene una baja afinidad por el análogo no hidrolizable de GTP, Gpp(NH)p, con una constante de disociación de 292 μM .

8 BIBLIOGRAFÍA

Anand, B., Kumar, S. & Prakash, B., 2006. Structural stabilization of GTP-binding domains incircularly permuted GTPases: Implications for RNA binding. *Nucleic Acids Research*, 34(8), p. 2196–2205.

Ario, D. M., 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8(26), pp. 1-18.

Babler, J. y otros, 2001. Identification of a 60S Preribosomal Particle that is closely linked to nuclear export. *Cell Press*, Volumen 8, pp. 517-529.

Blombach, F., Brouns, S. J. & Oost van der, J., 2011. Assembling the archaeal ribosome: roles for. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), pp. 45-50.

Çelik, E. & Çalık, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advance*, Volumen 30, pp. 1108-1118.

García, M. ,, Gijsbers, A., De la Mora, E. & Sánchez, P. ,, 2015. Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 17 Julio, 290(29), pp. 17669-17678.

Goto, S., Akira, M. & Himeno, H., 2013. GTPases involved in bacterial ribosome maturation. *The Journal of Biochemistry*, 153(5), pp. 403-414.

Guerrero- Olazarán, M., Cabrera, B. ., E., Galán, W. & Viader, S. J., 2004. *Biología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura*. Hermosillo, Sonora , México, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Harju, S., Fedosyuk, H. & Peterson, K. R., 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 21 Abril, Volumen 4, pp. 1-6.

Hedges, J., West, M. & Johnson, A. W., 2005. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO Journal*, 20 Junio, 24(3), pp. 567-579.

Henras, A. K. y otros, 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Volumen 65, pp. 2334-2359.

Ho, J., Kallstrom, G. & Johnson, A., 2000. Nmd3p is a Crm1p dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *The Journal Cell Biology*, 151(5), pp. 1057-1066.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A., 1983. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Enero, 153(1), pp. 163-168.

Kallstrom, G., Hedges, J. & Johnson, A., 2003. The putative GTPases Nog1p and Lsg1 are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Molecular and Cellular Biology*, Junio, 23(12), pp. 4344-4355.

Karbstein, K., 2007. Role of GTPases in Ribosome Assembly. *InterScience*, 18 Mayo, 87(1), pp. 1-10.

Khow, O. & Suntrarachun, S., 2012. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), pp. 159-162.

Kost, T. A., Condreay, J. P. & L, J. D., 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect. *Nat Biotechnol*, 23(5), pp. 567-575.

Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Aravind, L., 2003. Classification and Evolution of P-loop GTPases and Related ATPases. *JMB*, 312(32), pp. 41-72.

Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H. & Sauer, M., 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology*, Volumen 113, p. 121-135.

Park, J.-H., C., J. B., Kifer, C. T. & Parsons, M., 2000. A novel nucleolar G-protein conserved in eukaryotes. *Journal of Cell Science*, Volumen 114, pp. 173-185.

Reynaud, E. G. y otros, 2005. Human Lsg1 defines a family of essential GTPases that correlates with the evolution of compartmentalization. *BioMedCentral*, 3(21), pp. 3-14.

Thomson, E., Ferreira-Cerca, S. & Ed, H., 2013. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, Volumen 126, pp. 4815-4821.

Wegierski, T., Billy, E., Nasr, F. & Filipowicz, W., 2001. Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *RNA Society*, Volumen 7, pp. 1254-1267.

West, M., Hedges, J., Chen, A. & Johnson, A., 2005. Defining the order in which Nmd3 and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), pp. 3802-3818.

Wittinghofer, A. & Vetter, I. R., 2011. Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *The Annual Review of Biochemistry*, Volumen 80, pp. 943-971.

9 APÉNDICE

Apéndice 1. Genotipo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123.

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

Apéndice 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *Lsg1*.

Nombre	Secuencia 5´-3´
Forward	CGCGGGATCCATGGGTCCACCAAAGAAGCTCCCAAGAAATG
Reverse	CCCGCTCGAGATTATTTTCAATGCTAAAACTTTGC

Apéndice 3. Genotipo de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>F</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>Escherichia coli</i> C41	No disponible
<i>Escherichia coli</i> BL21 pRIL	<i>E. coli</i> BL21 <i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte plasmid pRIL[argU ileY leuW Cam^r]</i>