



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudios de interacción entre la GTPasa Lsg1 y las proteínas Rpl10, Sqt1 y Nmd3 mediante un ensayo de doble híbrido en levadura”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MARCIAL BAZALDUA NANCY GABRIELA

DRA. NURIA SÁNCHEZ PUIG
[Instituto de Química](#)

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
[Facultad de Medicina](#)

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
[Instituto de Química](#)

Ciudad de México, Febrero, 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nuria Sánchez Puig por el apoyo y asesoramiento para realizar este proyecto.

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes y al Dr. Enrique García Hernández por formar parte del comité que asesoró y evaluó este proyecto durante su desarrollo.

A los Doctores Francisco Plasencia De la Parra, Daniela Araiza Olvera Toro, Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, Carmina Montiel Pacheco, Greco Hernández Ramírez que conformaron el jurado encargado de evaluar este proyecto.

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

DEDICATORIAS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
DO₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
GAP	Del inglés GTPase Activating Protein
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GDI	Del inglés Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Del inglés Guanine nucleotide Exchange Factor
GSF	Del inglés Guanine Stabilizing Factor
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
Kb	Kilobase
LB	Medio Luria-Bertani
Lsg1	Del inglés Large subunit GTPase 1
NES	Del inglés Nuclear Export Signal
Nmd3	Del inglés Nonsense mediated mRNA Decay 3
ONPG	Orto-nitrofenil- β -galactósido
Pb	Pares de bases
Rpl10	Del inglés Ribosomal Protein of the Large subunit 10
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante de proteínas en gel de poliacrilamida
Sqt1	Suppressor of QSR1 Truncations 1
YEPD	Medio Yeast extract peptone dextrose
YM1	Medio Yeast and Mold

INDICES

Página

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
ABREVIATURAS.....	III
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
Resumen.....	VIII
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Ribosomas y Biogenesis ribosomal.....	1
1.2 La superfamilia de las GTPasas.....	5
1.2.1 Actividad enzimática de las GTPasas.....	6
1.3 Las GTPasas que participan en la biogénesis ribosomal.....	8
1.3.1 La GTPasa ribosomal Lsg1.....	9
1.4 Sistema de doble híbrido en levadura.....	11
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
5.1 Reactivos químicos.....	16
5.2 Soluciones y amortiguadores de pH.....	16
5.3 Medios de cultivo.....	18
5.4 Métodos generales de Biología Molecular.....	19
5.4.1 Extracción de ADN genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
5.4.2 Amplificación de las secuencias codificantes.....	19
5.4.3 Digestión con enzimas de restricción y purificación de ADN.....	25
5.4.4 Ligación de ADN.....	25
5.4.5 Transformación bacteriana con ADN plasmidico mediante choque térmico.....	26
5.4.6 Aislamiento de ADN plasmidico.....	27
5.4.6.1 Método de lisis alcalina.....	27
5.4.6.2 Método de Easy Prep.....	27

5.4.7	Precipitación de ADN con etanol absoluto.....	27
5.4.8	Identificación de las construcciones por patrón de restricción.....	28
5.4.9	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	28
5.4.10	Preparación de las células quimiocompetentes de levadura.....	28
5.4.11	Transformación de ADN plasmídico en levadura.....	29
5.5	Métodos generales de Bioquímica de proteínas.....	29
5.5.1	Métodos de lisis de células de levadura.....	29
5.5.1.1	Choque térmico.....	29
5.5.1.2	Lisado con perlas de vidrio.....	29
5.5.2	Electroforesis de proteína SDS-PAGE.....	30
5.5.3	Western blot.....	30
5.5.4	Ensayo de interacción proteína-proteína mediante doble híbrido..	31
6	RESULTADOS.....	32
6.1	Obtención de las construcciones de ADN para el ensayo de doble híbrido.....	32
6.1.1	Amplificación de las secuencias codificantes.....	32
6.1.2	Clonación por digestión con enzimas de restricción y ligación.....	34
6.1.3	Clonación T/A utilizando el vector pGEM-T-Easy.....	38
6.1.4	Clonación por el método de In-Fusion®.....	43
6.2	Verificación de la expresión de las proteínas por medio de Western Blot.....	46
6.3	Métodos de lisado celular.....	47
6.4	Ensayo de interacción proteína-proteína mediante doble híbrido.....	48
7	DISCUSIÓN.....	51
8	CONCLUSIONES.....	55
9	BIBLIOGRAFÍA.....	56
10	ANEXOS.....	63
10.1	Ribosomopatías.....	63
10.2	Genotipos.....	64
10.3	Oligonucleótidos.....	64
10.4	Plásmidos.....	65
10.5	Secueciación.....	66
10.6	Análisis de varianza.....	72

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Procesamiento del pre-ARN r 35S.....	1
Figura 2. Biogénesis ribosomal en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Figura 3. Exportación citoplasmática de las pre-subunidades.....	3
Figura 4 Estructura tridimensional del dominio G.....	6
Figura 5. Ciclo catalítico de las GTPasas y biomoléculas efectoras.....	7
Figura 6. Modelo para la función de Lsg1 en la biogénesis ribosomal.....	10
Figura 7. Sistema de doble híbrido.....	11
Figura 8. Interacciones evaluadas mediante el sistema de doble híbrido.....	15
Figura 9. Amplificación de secuencias codificantes con la ADN polimerasa Pushion.....	32
Figura10. Condiciones probadas para amplificar la secuencia de la proteína Rpl10.....	33
Figura11. Amplificación de la secuencia codificante de la proteína Lsg1-NLS.....	34
Figura12. Procedimiento para la restricción y purificación de los insertos.....	34
Figura13. Digestión del plásmido pEG202 para establecer condiciones óptimas de restricción.....	35
Figura14. Purificación de plásmidos.....	36
Figura15. Patrones de restricción de las diferentes construcciones en estudio con la enzima BgIII.....	37
Figura16. Amplificación de las secuencias Rpl10, Sqt1, Lsg1 y del dominio G con y sin señal de NLS usando la polimerasa Taq.....	39
Figura 17. Impacto de la concentración de iones Mg ²⁺ en la reacción de PCR para la amplificación de la secuencia Lsg1-NLS y Nmd3.....	39
Figura18. Impacto de la fuente de ADN molde en la amplificación por PCR de la secuencia codificante de [A] Lsg1-NLS y [B] Nmd3.....	40
Figura19. Amplificación de la secuencia codificante de la proteína Nmd3 con la ADN polimerasa DreamTaq con diferentes concentraciones de iones Mg ²⁺	40
Figura 20. Escrutinio de las construcciones en el vector pGEM-T-Easy.....	41
Figura 21. Escrutinio de las construcciones subclonas en los vectores de doble híbrido.....	42
Figura 22. Proceso de clonación por el método de clonación In-Fusion®.....	43
Figura 23. Amplificación de la secuencia Nmd3 para su clonación en el vector pACT2 mediante la técnica de In-Fusion.....	44
Figura 24. Escrutinio de clonas para la construcción Nmd3-pACT2 por patrón de restricción.....	45
Figura25. Detección de la expresión del dominio de unión a ADN de la proteína Lex A fusionado a la proteína Lsg1.....	46
Figura 26. Comparación de la cantidad de proteína total obtenida de dos diferentes métodos de ruptura celular para los ensayos de doble híbrido.....	47
Figura 27. Sistema de doble híbrido utilizado con las proteínas de estudios.....	49
Figura 28. Ensayos de interacción mediante doble híbrido entre las proteínas Nmd3, Sqt1, Rpl10 con la proteína Lsg1 y su dominio G con y sin señal de localización nuclear (NLS).....	50
Figura 29. Electroferograma de la secuencia de la proteína Sqt1.....	67
Figura 30. Electroferograma de la secuencia de la proteína Lsg1.....	68
Figura 31. Electroferograma de la secuencia del dominio G de la proteína Lsg1.....	69
Figura 32. Electroferograma de la secuencia final del NLS del dominio G de la proteína Lsg1.....	69
Figura 33. Electroferograma de la secuencia de la proteína Rpl10.....	70
Figura 34. Electroferograma de la secuencia de la proteína Nmd3.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Secuencia de los motivos del dominio G en una GTPasa.....	5
Tabla 2. GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal en levadura.....	8
Tabla 3. Soluciones y amortiguadores de pH usados en los métodos de Biología Molecular.....	16
Tabla 4. Soluciones y amortiguadores de pH usados en los métodos de Bioquímica de Proteínas.....	17
Tabla 5. Medios de cultivo para bacteria.....	18
Tabla 6. Medios de cultivo para levadura.....	18
Tabla 7. Composición de la reacción de PCR realizada con la DNA polimerasa Phusion® High-Fidelity.....	20
Tabla 8. Condiciones del termociclador utilizadas en las amplificaciones por PCR con la ADN polimerasa Phusion® High-Fidelity.....	20
Tabla 9. Composición de la reacción de PCR utilizada para amplificar la secuencia codificante de la proteína Lsg1 con señal de localización nuclear.....	21
Tabla 10. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación de la secuencia codificante de la proteína Lsg1 con señal de localización nuclear.....	21
Tabla 11. Composición de la reacción de PCR utilizada en la amplificación de la secuencia codificante de Nmd3.....	22
Tabla 12. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Nmd3.....	22
Tabla 13. Composición de la reacción de PCR utilizada con la ADN polimerasa Taq.....	23
Tabla 14. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación por PCR con la ADN polimerasa.....	23
Tabla 15. Composición de la reacción de PCR utilizada con la ADN polimerasa Dream Green Taq.....	24
Tabla 16. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación de la secuencia codificante del gen Nmd3 con la ADN polimerasa Dream Green Taq.....	24
Tabla 17. Composición de la reacción de restricción para la digestión de ADN plasmídico.....	25
Tabla 18. Composición de la reacción de restricción para la digestión de productos de PCR.....	25
Tabla 19. Composición de la reacción de ligación utilizando la ADN ligasa T4.....	26
Tabla 20. Algunas ribosomopatías y sus principales características.....	63
Tabla 21. Genotipo de los microorganismos empleados.....	64
Tabla 22. Oligonucleótidos de la proteína Lsg1 y su dominio G con y sin señal NLS.....	64
Tabla 23. Oligonucleótidos de la proteína Nmd3, Sgt1 y Rpl10.....	64
Tabla 24. Oligonucleótidos de la proteína Nmd3 y Rpl10 para clonar por el método de clonación In-Fusion®.....	65
Tabla 25. Características del vector de expresión pEG202.....	65
Tabla 26. Características del vector de expresión pACT2 AD.....	65
Tabla 27. Datos de unidades de β-galactosidasa del ensayo de doble híbrido.....	72
Tabla 28. Análisis de varianza de dos factores.....	72

RESUMEN

El proceso por el cual se forman los ribosomas es conocido como biogénesis ribosomal y en *Saccharomyces cerevisiae* participan más de 200 factores accesorios. Estos factores coordinan el ensamblaje de las proteínas estructurales del ribosoma, el procesamiento del ARN ribosomal y los puntos de control para generar un ribosoma funcional, sin embargo, estos factores no forman parte de los ribosomas funcionales. Dentro de estos factores accesorios se encuentra la GTPasa Lsg1, necesaria para la liberación de la proteína Nmd3 que funge como adaptador en la exportación de la subunidad pre-60S al citoplasma. En esta etapa, también participan las proteínas Rpl10 y Sqt1. La secuencia temporal y celular de estos eventos no se ha establecido, pero se sabe que fallas en el proceso tienen consecuencias letales para el desarrollo celular. Por lo tanto, es importante comprender el mecanismo por el cual actúan y así entender su función en esta etapa. En este trabajo se evaluaron, mediante un ensayo de doble híbrido en levadura, las interacciones entre las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 con la enzima Lsg1; además se evaluó si estas interacciones ocurren con el dominio G de la GTPasa.

El método de doble híbrido es un ensayo in vivo que se basa en la fusión de los dominios que conforman a los factores de transcripción a las proteínas de estudio. Cuando existe una interacción entre las proteínas de interés se reconstituye el factor transcripción que a su vez activa a un gen reportero cuyo producto puede medirse, generalmente, mediante un ensayo enzimático. Para este trabajo se utilizó el dominio de unión a ADN de la proteína Lex A y el dominio de activación de la transcripción de la proteína GAL4. Se realizaron 6 construcciones de ADN recombinante utilizando diferentes métodos de clonación que mostraron diversas ventajas con respecto al proceso tradicional. A partir de estas construcciones, se realizaron 16 ensayos de doble híbrido previa transformación en la cepa CTY10-5d de *Saccharomyces cerevisiae*. Se evaluó la expresión de las proteínas híbridas por medio de Western Blot y debido a que las proteínas se expresan de forma intracelular, se evaluaron dos métodos de lisado, siendo el método de lisado por choque térmico el que mejores resultados mostró para el ensayo. Los resultados del ensayo indicaron que: 1) solo Lsg1 y su Dominio G mostraron interacción con la proteína Nmd3, 2) las unidades de β -galactosidasa fueron mayor en el ensayo con el dominio de GTPasa de Lsg1 que con la proteína completa, lo que sugiere que esta región de Lsg1 es la responsable de la interacción con Nmd3; 3) la interacción de las proteínas Sqt1 y Rpl10 con Lsg1 y su dominio G fue negativo. Estos resultados indican que la interacción del adaptador Nmd3 con Lsg1 ocurre en el dominio GTPasa, mientras que, si bien las proteínas Sqt1 y Rpl10 se encuentran en la misma vía celular, no interaccionan físicamente con la GTPasa Lsg1.

1. ANTECEDENTES

1.1 Ribosomas y Biogénesis ribosomal

En todas las células, el ribosoma es el responsable de sintetizar todas las proteínas que son requeridas para el crecimiento y el mantenimiento celular. Este proceso es conocido como traducción (Panse & Johnson,2010). Los ribosomas son complejos de ARN y proteínas formados por dos subunidades. La subunidad menor está encargada de decodificar la información contenida en los ARN mensajeros (ARNm) y que en levaduras está formada por el ARN ribosomal (ARNr) 18S y 33 proteínas ribosomales. La subunidad mayor es el sitio donde se cataliza la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos y que está constituido por 49 proteínas ribosomales y tres ARNr (5.8S,5S y25S) (Baserga & Woolford,2013). La ruta celular mediante la cual se sintetizan los ribosomas es conocida como biogénesis ribosomal. Este proceso comienza en el nucléolo, donde se transcribe un precursor de ARNr por la ARN polimerasa I, este precursor es conocido como 35S en levaduras y sufre diversas modificaciones co-transcripcionales (ver Figura 1) para finalmente dar lugar a los ARNr 18S, 5.8S y 25S (para levaduras mientras que 28S para otros eucariontes), (Henras, *et al.*,2008).

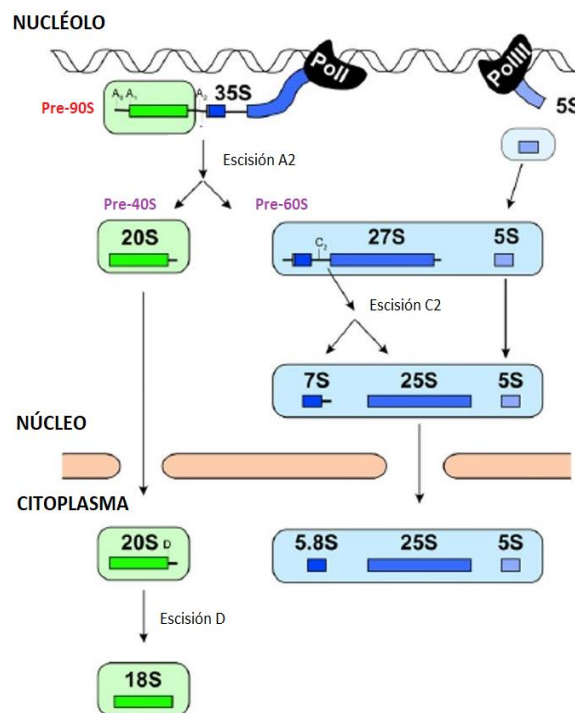


Figura 1. Procesamiento del pre-ARN r 35S (Modificado de Kressler. *et al.*, 2010.)

Al pre-ARNr 35S se le unen las proteínas ribosomales, así como factores accesorios para dar lugar a la partícula pre-90S (ver Figura 2). Este complejo es procesado por una serie de endo- y exonucleasas (Thomson, et al., 2013). Un evento principal de esta etapa es la escisión en la región espaciadora A2 del pre-ARNr lo que permite la liberación de la partícula pre-40S. A partir de este evento las pre-subunidades siguen su maduración de manera independiente, donde la partícula pre-40S sufre pocos cambios de composición en comparación con las partículas pre-60S a la que se le asocian alrededor de 100 factores no ribosomales que modifican su composición a medida que viaja del nucleoplasma al citoplasma (ver Figura 2) (Panse & Johnson, 2010).

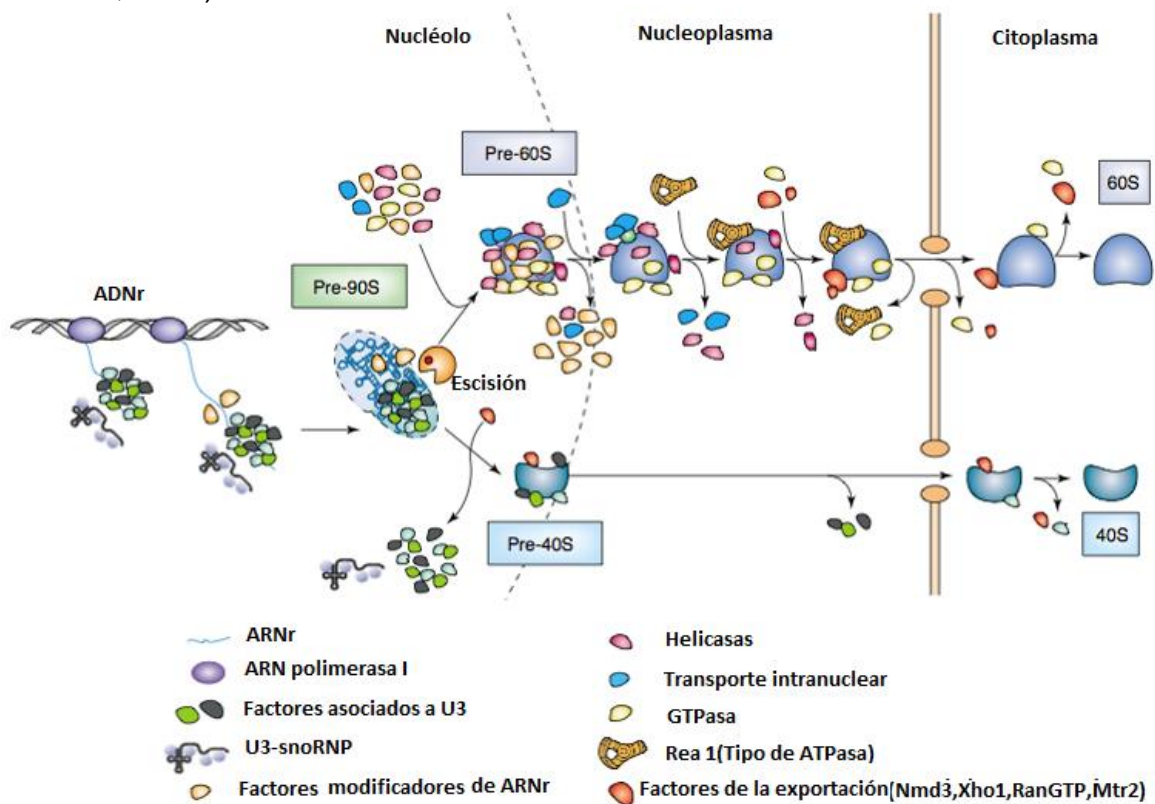


Figura 2. Biogénesis ribosomal en *Saccharomyces cerevisiae* (Tschochner & Hurt, 2013)

La exportación de las pre-subunidades al citoplasma requiere del factor Crm1 que reconoce las secuencias NES (Nuclear Export Signal) que son secuencias cortas y ricas en leucina, que están presente en ciertas proteínas, dirigiendo la exportación del núcleo al citoplasma.

Para la partícula pre-60S, Nmd3 es el único adaptador reconocido por Crm1, mientras que para la pre-40S se han reportado al menos tres factores que contienen un NES; Ltv1, Dim2 y Rio2(ver Figura 3) (Panse & Johnson, 2010).

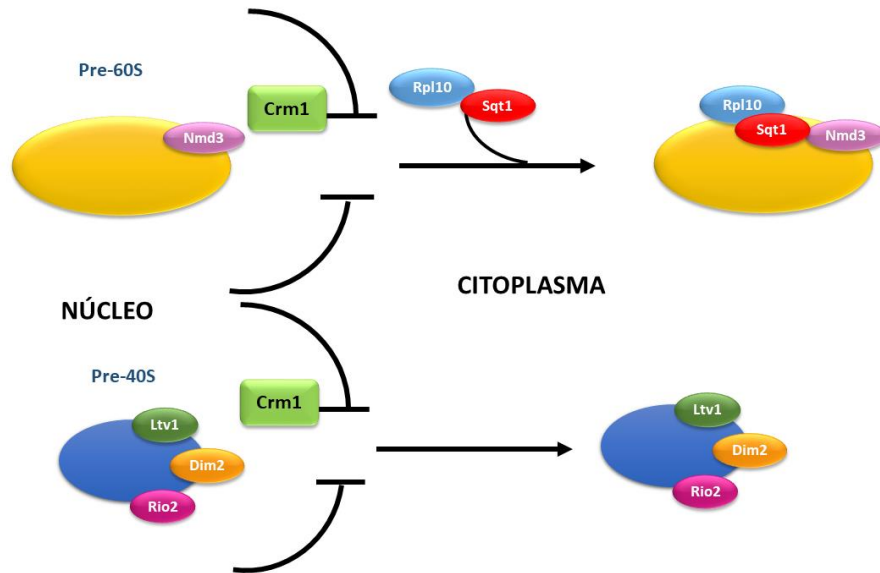


Figura 3. Exportación citoplasmática de las pre-subunidades. En la subunidad 60S, Nmd3 es el único adaptador identificado mientras que para la subunidad 40S se han identificado; Ltv1, Dim2 y Rio2.

En el citoplasma se llevan a cabo los pasos finales del proceso de maduración de ambas subunidades. Para la pre-subunidad 60S incluye el procesamiento pre-ARNr 6S a 5.8S, la liberación tanto del factor de anti-asociación Tif6 como del adaptador Nmd3 los cuales se reciclan posteriormente al núcleo y por último el ensamblaje del tallo ribosomal (Panse & Johnson, 2010). Mientras que la maduración de la pre-subunidad 40S implica el procesamiento del pre-ARNr 20S que es dimetilado y escindido para finalmente dar lugar al ARNr 18S. Seguido de un re-arreglo estructural para generar la estructura de pico que se da por eventos de fosforilación y desfosforilación llevadas a cabo por la cinasa Hrr25 lo que a su vez permite la incorporación de la proteína estructural Rps3 (Schäfer, *et al.*, 2006). Finalmente se obtienen subunidades 40S y 60S maduras que se unirán para conformar el ribosoma funcional 80S (Thomson, *et al.*, 2013). En las distintas fases, de la síntesis de los ribosomas se observa la participación de diversos factores que contribuyen desde el procesamiento de pre-ARNr hasta la maduración citoplasmática.

Estos factores, se van liberando conforme participan en el proceso ya que no forman parte del ribosoma traduccionalmente competente. Se han descrito cerca de 200 factores accesorios, que en su mayoría son esenciales y se encuentran conservados en eucariontes (Baserga & Woolford, 2013). Dentro de estos factores accesorios se han descrito endo y exo-nucleasas, ARN helicasas, fosfatasa, cinasas, ATPasas y GTPasas.

Las mutaciones en las proteínas accesorias de la biogénesis ribosomal se han vinculado a un conjunto de enfermedades genéticas conocidas como ribosomopatías (Narla & Ebert, 2010; Yelick & Trainor, 2015). Las ribosomopatías son una clase de enfermedades diversas, cuyo común denominador es la disfunción ribosómica, donde cada enfermedad difiere significativamente en su mecanismo, cuadro clínico (inclusive, se han observado diferencias clínicas en pacientes diagnosticados con el mismo síndrome) y tratamiento potencial (Nakhoul, *et al.*, 2014)(ver Anexo 10.1). Por ejemplo, en la maduración de la subunidad 60S uno de los pasos más importantes implica la liberación de la proteína eIF6; esta proteína es considerada un factor de anti-asociación que evita el ensamblaje prematuro entre las dos subunidades, por tanto, su liberación es esencial para la formación de la partícula 80S (Boocock, *et al.*, 2003; Stepensky, *et al.*, 2017). Este evento es catalizado por la participación conjunta de la GTPasa EFL1 también conocida en humanos como EFTUD1 en humanos y el factor intercambiador de nucleótidos SBDS ,cuyas mutaciones en estas últimas proteínas están relacionadas con el síndrome Shwachman-Diamond(SDS),(Menne, *et al.*, 2007; Finch ,*et al.*, 2011).

Actualmente no se han descrito mutaciones en Lsg1 que resulten en el desarrollo de una patología. Pero debido a su participación en el paso anterior a EFL1 y a su papel en la liberación de Nmd3 y ensamblaje de Rpl10, no es de sorprender que mutaciones en esta proteína también resulten en el desarrollo de ribosomopatías. Debido a la importancia de la síntesis de ribosomas y al hecho de que fallas en este proceso desencadenan procesos patológicos, es vital entender la función y los mecanismos de acción de las biomoléculas que participan en este proceso con miras a comprender los efectos funcionales de las mutaciones patológicas.

1.2 La superfamilia de las GTPasas

Las GTPasas son proteínas reguladoras que se encuentran conservadas universalmente y están implicadas en diversos procesos celulares como son, la transducción de señales, la traducción, la biogénesis ribosomal, el transporte intracelular y la formación de citoesqueleto, entre otras (Clementi & Polacek, 2010). Las GTPasas se pueden clasificar en dos clases de acuerdo con su secuencia y estructura. La primera clase se denomina TRAFAC y representa el acrónimo de “Translation factors” (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 subgrupos representativos: las GTPasas de reconocimiento de señal y las superfamilias MinD y BioD, que están implicadas en la localización de proteínas, partición de cromosomas y transporte a nivel de membrana plasmática (Leipe, *et al.*, 2003).

Las GTPasas poseen un dominio característico conocido como dominio G formado por cinco motivos denominados G1, G2, G3, G4 y G5, los cuales son responsables de la unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina (Tabla1) (Li,2002). La unión al nucleótido GTP es mediado por los motivos G1, G4 y G5, donde la especificidad por la guanina es atribuida al residuo de ácido aspártico (D) del motivo G4. Mientras que la hidrólisis del nucleótido es responsabilidad de los motivos G2 y G3 los cuales sufren grandes cambios conformacionales durante el proceso (Vetter & Wittinghofer, 2001). El plegamiento del dominio G consiste en una serie de seis láminas β y cinco α -hélices intercalados (Wittinghofer & Vetter, 2011) (ver Figura 4).

Tabla 1 Secuencia de los motivos del dominio G en una GTPasa

Motivo	Nombre(s)	Secuencia consenso
G1	Asa P o Dominio walker A	(G/A)XXXXGK(S/T)
G2	Switch I	RXITI
G3	Dominio walkerB o Switch II	DXXG
G4	Región NKXD	(N/T)KXD
G5	Motivo SAL	SA(K/L)

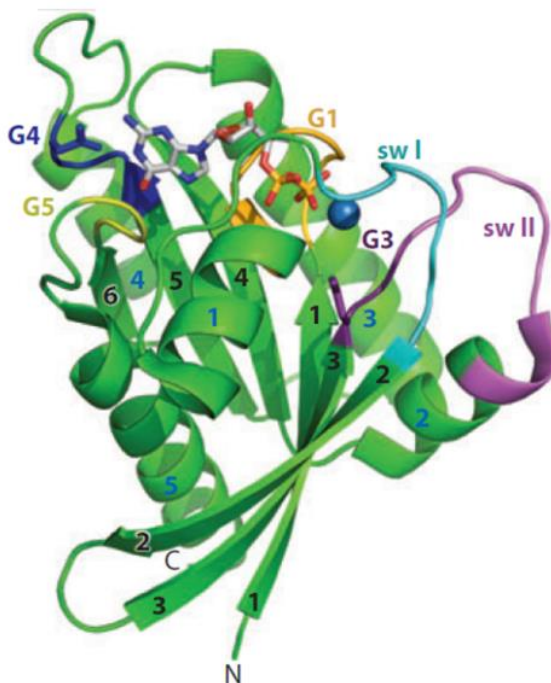


Figura 4 Estructura tridimensional del dominio G. Para la proteína H-Ras p21(PDB:5P21) (Wittinghofer & Vetter, 2011)

1.2.1 Actividad enzimática de las GTPasas

Las GTPasas llevan a cabo la reacción de hidrólisis de GTP generando como productos a GDP y fósforo inorgánico (PO_4^{3-}). El mecanismo por el cual se propone que se lleva a cabo la reacción es a través de una sustitución nucleofílica tipo 2 ($\text{S}_\text{N}2$) donde una molécula de agua previamente activada por un residuo catalítico del motivo G3 es capaz de atacar al fosfato y del nucleótido GTP (Aquist & Kamerlin, 2015).

La hidrólisis del GTP conduce a la formación de tres estados en la GTPasa: 1) activo, cuando la GTPasa se encuentra unida a GTP, 2) inactivo, unido a GDP una vez hidrolizado el GTP y 3) vacío cuando la proteína libera al GDP que es ocupado inmediatamente por una nueva molécula de GTP (ver Figura 5) (Bourne, *et al.*, 1991).

Se ha descrito que la actividad intrínseca de las GTPasas asociadas a ribosomas y de la familia Ras es muy baja (Clementi & Polacek, 2010), por lo que su actividad en la mayoría de los casos es modulada por biomoléculas efectoras.

Por un lado, se encuentran las proteínas efectoras que actúan como activadoras (GAP) favoreciendo la hidrólisis del GTP. Mientras que los factores intercambiadores de nucleótidos (GEF), favorecen la liberación de GDP (GDS) o la unión a GTP (GSF). Por último, existen proteínas que inhiben la disociación del nucleótido una vez ocurrida la hidrólisis (GDI) (Wittinghofer & Vetter, 2011) (ver Figura 5).

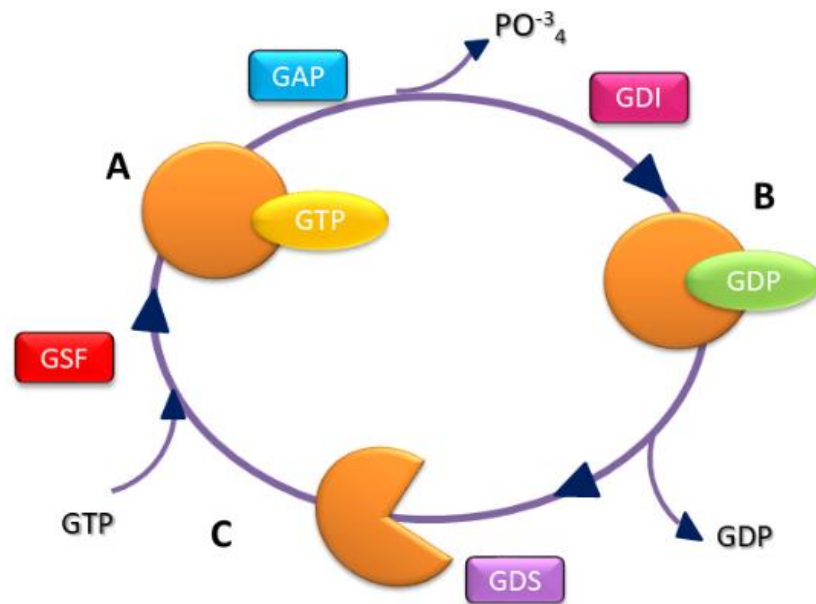


Figura 5. Ciclo catalítico de las GTPasas y biomoléculas efectoras. A) Activo - unido a GTP, B) Inactivo - unido a GDP y C) Vacío. GSF: Factor Estabilizador de GTP, GAP: Proteína Activadora de GTP, GDI: Inhibidor de Disociación de GDP, GDS: Estimulador de Disociación de GDP.

En las GTPasas asociadas a ribosomas participa el ARN ribosomal como molécula efectora, activando la hidrólisis de GTP (Voorhees, et al., 2010). Tal es el caso de la adenina 2660 que se encuentra en la región conservada del ARN ribosomal 23S conocido como el asa sarcina-ricina (SRL, del inglés sarcin-ricin loop) que activa la hidrólisis de GTP en la proteína EF-G (Clementi & Polacek, 2010). El mecanismo por el que actúan estas moléculas efectoras, si bien se ha descrito para algunos casos, no se ha encontrado un mecanismo consenso, pero en general actúan sobre el dominio G (Cherfils & Zeghouf, 2013). Esta región proporciona un residuo catalítico esencial para la hidrólisis, ayudando a orientar adecuadamente a la molécula de agua atacante o estabilizando el estado de transición en el caso de las moléculas GAP. Esto modifica la unión de los nucleótidos disminuyendo su afinidad y logrando su liberación.

Posteriormente se reemplaza el nucleótido, al deformarse el sitio de unión debido cambios conformacionales en las regiones del switch 1 y 2 (Bos, *et al.*, 2007). No se ha encontrado que exista una estructura conservada para estas proteínas efectoras.

1.3 GTPasas que participan en la biogénesis ribosomal

Solamente se han descrito seis proteínas con actividad de GTPasa involucradas en la biogénesis ribosomal en levaduras (ver Tabla 2). Todas son esenciales en dicho proceso, sin embargo, no en todos los casos se conoce su función exacta. La hidrólisis de GTP se cree facilita cambios conformacionales en la GTPasa que promueven la asociación o disociación de proteínas ribosomales, y/o factores accesorios que participan en la maduración (Goto, *et al.*, 2013). También promueven re-arreglos conformacionales y funcionan como marcadores de posición para evitar la unión prematura de proteínas (Karbtein, 2007).

Tabla 2. GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal en levadura.

GTPasa	Localización	Función putativa	Fenotipo mutante y referencia
Nug1	Núcleo	Exportación citoplasmática pre-60S	Acumulación de pre-ARNr 27SB (Babler, <i>et al.</i> , 2001)
Nog1	Núcleo	Formación de la partícula pre-66S	Acumulación de pre-ARNr 27SA (Fuentes, <i>et al.</i> , 2007)
Nug2/Nog2	Núcleo	Exportación y maduración nuclear de la subunidad 60S	Disminución del ARNr 5S y 25S (Saveanu, <i>et al.</i> , 2001)
Efl1	Citoplasma	Liberación del factor Tif6	Acumulación de Tif6 en el citoplasma (Senger, <i>et al.</i> , 2001)
Lsg1	Citoplasma	Liberación de Nmd3. Ensamblaje de Rpl10 en 60S	Acumulación pre-60S en el núcleo y de Nmd3 en citoplasma (Kallstrom, <i>et al.</i> , 2003)
Bms1	Núcleo	Procesamiento de ARNr 18S	Disminución de pre-40S por defecto en ARNr 35S (Wegierski, <i>et al.</i> , 2001)

A continuación, se describe a detalle a la GTPasa Lsg1 la cual es el objeto de estudio de este proyecto.

1.3.1 La GTPasa ribosomal Lsg1

La proteína Lsg1 pertenece a la familia de las GTPasas circularmente permutadas o YaWG/YlqF, que están presentes 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 esta estructura primaria invertida no tiene efecto sobre el plegamiento o la actividad de GTPasa (Anand,*et al.*, 2006).

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. Lsg1 es una proteína monómerica que no ha sido cristalizada, pero que a partir del análisis de su secuencia primaria y de técnicas como Crio-microscopía electrónica (cryo-EM) se han descritos algunos motivos estructurales como el dominio G y los motivos permutados que lo conforman, así como la presencia de una inserción que va del residuo 266 al 388 entre los motivos G5 y G1. De acuerdo a diversos predictores de estructura y los estudios de cryo-EM (Malyutin,*et al.*, 2017) tanto el extremo N-terminal como el C-terminal son regiones desestructuradas. También cuenta con un motivo helicoidal conformado por cinco hélices alfa que abarcan los residuos 400-502, así como una posible señal de localización nuclear (NLS) que no es funcional (Reynaud,*et al.*, 2005).

Lsg1 es una enzima citoplasmática, cuyas mutantes termo-sensibles no son viables a la temperatura restrictiva por lo cual se ha determinado como una proteína esencial en levaduras (Kallstrom,*et al.*, 2003) cuya función tiene lugar en el penúltimo paso de la maduración citoplasmática de la subunidad ribosomal 60S. Este es 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,2003).

La función específica de la proteína Lsg1 es la de cargar la proteína estructural Rpl10 (uL16) en la subunidad 60S y la subsecuente liberación de Nmd3 (West,*et al.*, 2005)(ver Figura 6).

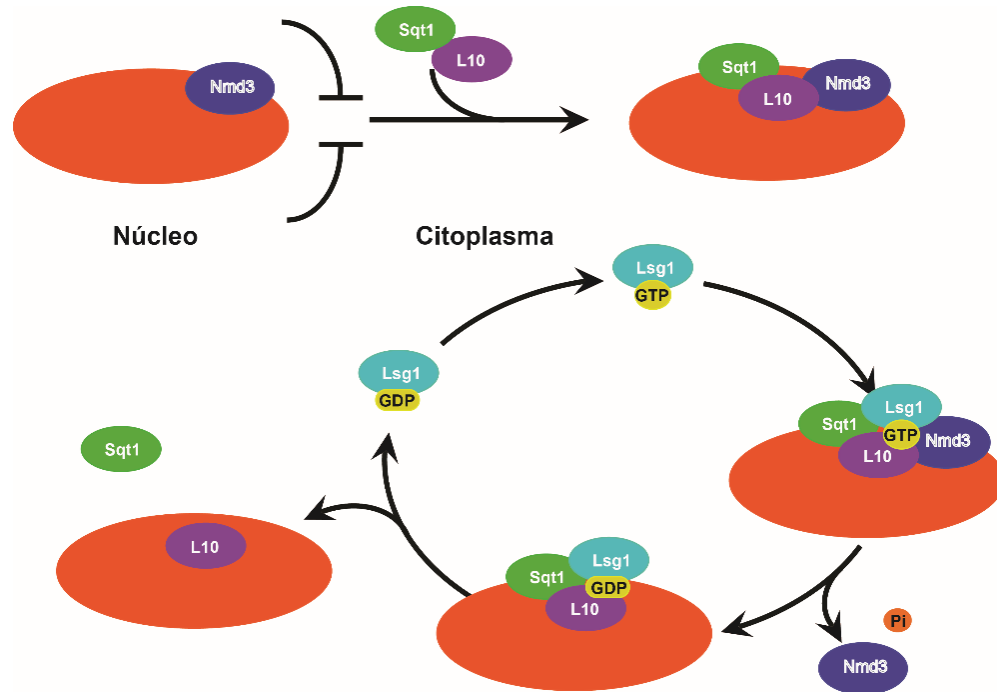


Figura 6. Modelo para la función de Lsg1 en la biogénesis ribosomal. La subunidad 60S (naranja) es exportada al citoplasma por el adaptador Nmd3, una vez en el citoplasma se une la proteína ribosomal L10 junto con Sqt1. Lsg1 se une a este precursor 60S y promueve la liberación de Nmd3 y la incorporación de L10 en la subunidad 60 para luego ser reciclada (Modificado de Kallstrom,*et al.*, 2003).

Nmd3 es un adaptador para la exportación de la subunidad pre-60S al citoplasma (Kallstrom,*et al.*, 2003). Se ha encontrado que Rpl10 requiere de la interacción con la chaperona Sqt1 para unirse a la subunidad pre-ribosomal 60S (West, *et al.*, 2005). La unión de Rpl10 es necesaria para la liberación de Nmd3 (Hedges,*et al.*, 2005), ya sea porque proporcione un sitio de unión para Lsg1 o porque permita la unión de Nmd3 a la subunidad 60S (Karbstein, 2007). En cuanto a la forma en que se activa a la GTPasa Lsg1, en estudios reciente se ha mencionado la posible participación de la subunidad 60S en específico de la hélice 69 del ARN 25S y de la proteína Nmd3 (Malyutin,*et al.*, 2017). Si bien la proteína Nmd3 requiere de la GTPasa Lsg1 para ser liberada de la subunidad 60S, este mecanismo no se ha descrito.

Por lo cual en este trabajo se propone como primer acercamiento evaluar las interacciones directas de las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 con la GTPasa Lsg1 y su dominio G a través de un ensayo de doble híbrido en levadura. La participación de estas proteínas en este paso celular se identificó mediante purificación por afinidad en tándem acoplada a espectrometría de masa, lo que permitió reconocer asociaciones o complejos funcionales, más no se han estudiado las interacciones uno a uno con la GTPasa Lsg1 (Kallstrom, *et al.*, 2003).

1.4 Sistema de doble híbrido en levadura

La técnica de doble híbrido fue descrita por primera vez por Fields y Song en 1989. Está basada en las características estructurales de los factores de transcripción eucariontes que en su mayoría están compuestos por dos dominios funcionales: uno encargado de dirigir la unión a la secuencia de ADN blanco, y un segundo que recluta la maquinaria necesaria para el proceso de transcripción (Fields & Song, 1989). Ambos dominios son funcionalmente independientes uno del otro, por lo cual es posible expresar una proteína X (señuelo) fusionada al dominio de unión a ADN (DUA), y una proteína Y (presa) fusionada al dominio de activación (DA).

La proteína de fusión que contiene el dominio de unión a ADN es capaz de reconocer una secuencia promotora que controla la expresión de un gen reportero a través del DUA. Si existe una interacción entre las proteínas X y Y, el factor de transcripción se restituye y permite la expresión del gen reportero (ver Figura7) (Ferro & Trabalzini, 2013 ;Crieeking & Beyaert, 1999).

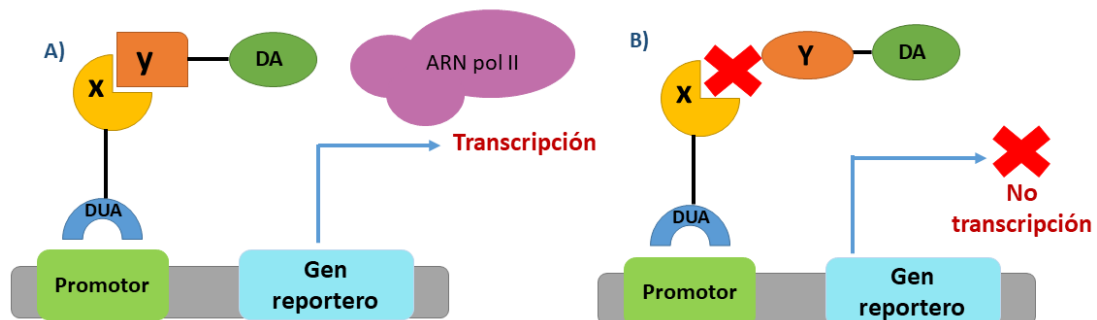


Figura 7. Sistema de doble híbrido. A) La proteína Y interactúa con la proteína X, el factor de transcripción se reconstituye y el ARNm del gen reportero se transcribe. B) Cuando no existe interacción entre las proteínas X y Y, no se reconstituye el factor de transcripción y el gen reportero no puede expresarse (Modificado de Méndez Godoy, 2015)

El sistema de doble híbrido permite analizar interacciones, y caracterizar tanto subdominios como residuos específicos que son cruciales para la interacción (De las Rivas & Fontanillo, 2010). La posibilidad de hacer estos ensayos semi-cuantitativos permite obtener información acerca de la fuerza de interacción. Finalmente, debido a que estos ensayos se realizan *in vivo*, se evita la purificación de grandes cantidades de proteína y el consumo de anticuerpos y otros materiales que limitan el uso de métodos *in vitro*.

Sin embargo, como cualquier método experimental, el sistema de doble híbrido presenta diversas desventajas implicadas con la manipulación, expresión y características funcionales de las proteínas a ensayar (Westermarck, *et al.*, 2013). Por ejemplo, proteínas que participan en el proceso de transcripción pueden auto-activarse, u otras que podrían resultar tóxicas para el hospedero sólo pueden ser ensayadas en fragmentos (Vidalain, *et al.*, 2004; Fields, 2005).

Por otro lado, debe tomarse en cuenta que el plegamiento y la disponibilidad de los sitios de interacción de las proteínas a ensayar puede estar comprometido por la presencia de los dominios de unión a ADN y de activación. A su vez, cuando se emplea a *S. cerevisiae* como hospedero, es necesario tener en mente que este organismo no es capaz de realizar todas las modificaciones pos-traduccionales que podrían resultar esenciales para el plegamiento o la interacción cuando se ensayan proteínas heterólogas (Crieking & Beyaert, 1999).

Finalmente, es necesario corroborar por otros métodos las interacciones resultantes, debido a que, en ocasiones, es posible identificar interacciones *in vivo* que no necesariamente ocurren directamente *in vitro*, ya que una macromolécula Z podría mediar la interacción (Ferro & Trabalzini, 2013).

2. HIPÓTESIS

Si las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 de levadura interaccionan con la enzima Lsg1 entonces potencialmente podrían hacerlo a través del dominio G de ésta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar las interacciones directas de la proteína Lsg1 y su dominio G con las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 a través de un ensayo de doble híbrido en levadura.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener las secuencias codificantes de las proteínas de interés para expresarlas en el sistema de doble híbrido en levadura.
- Verificar la expresión de las proteínas de interés por medio de Western blot.
- Evaluar la interacción directa de la proteína Lsg1 y el dominio GTPasa de Lsg1 con las proteínas Rpl10, Sqt1, Nmd3 por medio de un ensayo de doble híbrido semi-cuantitativo (actividad de β -galactosidasa).

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El sistema de doble híbrido que se utilizó en este proyecto fue el siguiente:

- El dominio de unión a ADN (DUA) de la proteína LexA
- El dominio de activación (DA) de la proteína Gal4

Las interacciones que se evaluaron fueron son las siguientes (Figura):

- Interacción de la proteína Lsg1 fusionada al DUA de la proteína LexA (señuelo), reacción con las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 que se fusionaron al DA del factor transcripcional Gal4 (presas).
- Una variación a este ensayo se realizó mediante la adición de una señal de localización nuclear para la construcción señuelo debido a que la proteína Lsg1 es una proteína citoplasmática y este ensayo se lleva a cabo en el núcleo.
- Ciertamente, aunque las proteínas fusionadas al dominio de activación ya contienen una señal de localización nuclear se añadió otra en las proteínas fusionadas al DUA para evaluar si la señal de interacción era más fuerte.
- Se evaluó la interacción del dominio G de la proteína Lsg1 fusionada al DUA de la proteína LexA, con las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 fusionas al DA de Gal4. Y su variante con la señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés).

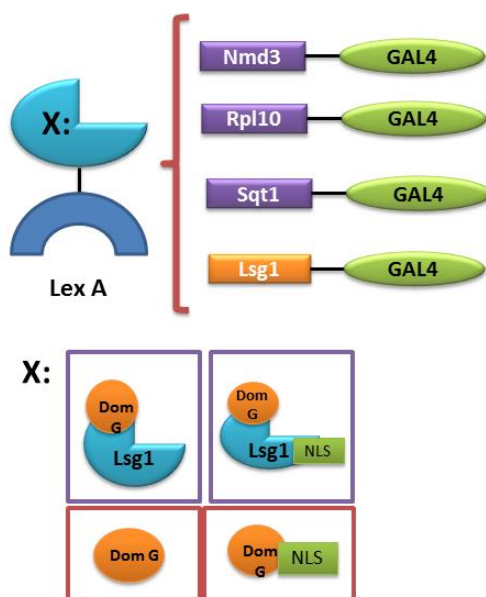


Figura 8. Interacciones evaluadas mediante el sistema de doble híbrido. Para este trabajo se ensayaron 4 variantes de la proteína Lsg1 (X) con las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos químicos

El antibiótico ampicilina y los reactivos químicos X-GAL, IPTG y DMSO fueron adquiridos en Formedium™ y Sigma Aldrich. Los componentes de los medios de cultivo se compraron a Formedium™.

5.2 Soluciones y amortiguadores de pH

Tabla 3. Soluciones y amortiguadores de pH usados en los métodos de Biología Molecular.

Extracción de ADN genómico	
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, 100 µmol/mL RNAsa A
Solución P2	1% SDS, 0.2M NaOH
Solución P3	3M Acetato de potasio pH 5.5
Purificación de ADN por el método Easy prep	
Solución E	10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, BSA 100 mg/L, RNAsa A 200 µg/L, Sacarosa 15%, Lizosima 1 mg/L
Electroforesis en gel de agarosa	
Amortiguador de carga 6X	0.1% naranja G, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol, 3% glicerol
Amortiguador TAE 10X	400mM Tris base-acético glacial, 10mM EDTA
Amortiguador TBE 10X	1M Tris base, 1M ácido bórico, 0.02M EDTA
Preparación de células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	
Amortiguador TE 10X	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA
L1	Amortiguador TE 1X, 100 mM LiCl en agua
L2	Amortiguador TE 1X, 100 mM LiCl en 50% PEG 4000

Tabla 4. Soluciones y amortiguadores de pH usados en los métodos de 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% Azul de Coomasie 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
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
Ensayo de doble híbrido	
Amortiguador Z	100 mM NaH_2PO_4 / $\text{Na}_2\text{HP0}_4$, 10 Mm KCl, 1 mM MgSO_4 pH 7
Amortiguador Z con β -mercaptoetanol	Amortiguador Z con 25 mM de β -mercaptoetanol
Amortiguador Z con ONPG	Amortiguador Z con 4mg/mL de ONPG
Solución de Na_2CO_3	1 M Na_2CO_3

5.3 Medios de cultivo

A continuación, se muestra la composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Tabla 5. 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. Agar al 1.5 % solo para los medios sólidos
LB-Ampicilina-IPTG-XGal	Medio LB-Ampicilina con 0.5mM IPTG, 80 µg/mL X-Gal

Tabla 6. Medios de cultivo para levadura.

Medio	Composición
YEPD	1.1% extracto de levadura, 2.2% peptona, 0.006% sulfato de adenina, 2% glucosa.
YM1	0.8% base nitrogenada sin aminoácidos con sulfato de amonio, 0.006% uracilo, 0.006% adenina, 0.006% tirosina
YM1-Leu-His	YM1, 1X Drop out –Leu –His, 2% glucosa
Drop out –Leu –His 100X	0.2% arginina, 0.6% isoleucina, 0.4% lisina, 0.1% metionina, 0.6% fenilalanina, 0.5% treonina y 0.4% triptófano

El genotipo de las cepas utilizadas en este trabajo se encuentra en el Anexo 10.2 .

5.4 Métodos generales de Biología Molecular

5.4.1 Extracción de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

Se centrifugaron 1.5 mL de un cultivo saturado de *S. cerevisiae* BCY123 por 5 min a 12,000 rpm. El paquete celular se re-suspendió en 200 µL de la solución amortiguadora Harju (Harju, *et al.*, 2004). Las células se lisaron mediante dos ciclos de congelación y descongelación que se llevaron a cabo de la siguiente manera: 2 min en nitrógeno líquido seguido de 1 min en un baño de agua a 92°C. Una vez lisadas las células se adicionaron 2 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó por 1 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló por 2 min en vórtex. La mezcla se centrifugó 8 min a 12,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio al cual se le adicionaron 400 µL de etanol 100% frío y se incubó por 2 horas a -20°C. Terminado el tiempo de incubación, la solución se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm y el paquete obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70% tres veces, se eliminó el etanol por decantación posterior a una centrifugación de 3 min a 12,000 rpm y los tubos se incubaron en una estufa a 37°C por 30 min para eliminar las trazas de etanol. Finalmente, la pastilla con el ADN se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas.

5.4.2 Amplificación de las secuencias codificantes

Las secuencias codificantes de las proteínas Lsg1, Nmd3, Sqt1 y Rpl10 se amplificaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para este proceso se utilizaron diversas ADN polimerasas por lo que a continuación se indican las condiciones utilizadas para cada ADN polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran en el Anexo 10.3, mientras que los plásmidos utilizados se localizan en el Anexo 10.4.

1) ADN polimerasa Phusion® High-Fidelity (NEB):

Esta ADN polimerasa tiene las siguientes características:

- Enzima de alta fidelidad (50X mayor a la *Taq* polimerasa), de alta velocidad (10X mayor que *Pfu*). Versátil y útil para amplificar secuencias largas (muy procesiva) o difíciles (ricas en CG).

Con esta ADN polimerasa se amplificaron las secuencias codificantes de las proteínas Nmd3, Sqt1, Lsg1 y el dominio G de Lsg1 con y sin señal de localización nuclear (NLS), siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 7 y 8.

Tabla 7. Composición de la reacción de PCR realizada con la DNA polimerasa Phusion® High-Fidelity.

Componente	Cantidad (µL)
Oligonucleótido sentido (10 µM)	2.5
Oligonucleótido reverso (10 µM)	2.5
Molde: ADN genómico (0.5 µg)	2
Phusion ADN polimerasa (2 U/µL)	0.5
Amortiguador 5X Phusion GC	5
dNTPs (2 mM cada uno)	1
DMSO 100%	1.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.5
Agua	25.5
Volumen total	50

Tabla 8. Condiciones del termociclador utilizadas en las amplificaciones por PCR con la ADN polimerasa Phusion® High-Fidelity.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	98 °C	30 s
30	98 °C	10 s
	60 °C	30 s
	72 °C	45 s
1	72 °C	10 min

2) ADN polimerasa KOD XL (Millipore):

Está ADN polimerasa tiene las siguientes características:

- ✓ Alta fidelidad, muy procesiva (15kpb) capaz de amplificar secuencias ricas en CG e incorporar dNTP's derivados.

Con esta ADN polimerasa se amplificó la secuencia codificante de la proteína Lsg1 con NLS siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 9 y 10.

Tabla 9. Composición de la reacción de PCR utilizada para amplificar la secuencia codificante de la proteína Lsg1 con señal de localización nuclear.

Componente	Cantidad (µL)
Oligonucleótido sentido (10 µM)	1.5
Oligonucleótido reverso (10 µM)	1.5
Molde: ADN genómico (514 ng)	1
KOD XL ADN polimerasa (2.5 U/µL)	1
Amortiguador 10X KOD	5
dNTPs (2 mM cada uno)	5
DMSO 100%	1.5
Agua	33.5
Volumen total	50

Tabla 10. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación de la secuencia codificante de la proteína Lsg1 con señal de localización nuclear.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
30	94 °C	30 s
	60 °C	5 s
	72 °C	60 s
1	72 °C	10 min

Esta ADN polimerasa también se utilizó para amplificar la secuencia codificante de la proteína Nmd3 que fue clonado con el método de In-Fusion® siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 11 y 12.

Tabla 11. Composición de la reacción de PCR utilizada en la amplificación de la secuencia codificante de Nmd3.

Componente	Cantidad (μL)
Oligonucleótido sentido (10 μM)	1.5
Oligonucleótido reverso (10 μM)	1.5
Molde: ADN plásmido pAJ1318 (100 ng/μL)	1
KOD XL ADN polimerasa (2.5 U/μL)	1
Amortiguador 10X KOD	5
dNTPs (2 mM cada uno)	2
DMSO 100%	1.5
Agua	36.5
Volumen total	50

Tabla 12. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Nmd3.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
35	94 °C	30 s
	60 °C	5 s
	72 °C	60 s
1	72 °C	10min

3) PCR Master mix (2X) (Thermo scientific):

Las características de esta ADN polimerasa son:

- ✓ Es una mezcla lista para usarse con *Taq* polimerasa.
- ✓ Termoestable, produce extremos 3' dA e incorpora nucleótidos modificados.

Con el PCR Master mix se amplificaron las secuencias codificantes de las proteínas Sqt1, Rpl10, Lsg1 y el dominio G con y sin NLS de Lsg1, siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 13 y 14.

Tabla 13. Composición de la reacción de PCR utilizada con la ADN polimerasa *Taq*.

Componente	Cantidad (μL)
Oligonucleótido sentido (10 μM)	1.25
Oligonucleótido reverso (10 μM)	1.25
Molde: ADN genómico (514ng)	1
Master mix	25
Agua	21.5
Volumen total	50

Tabla 14. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación por PCR con la ADN polimerasa *Taq*.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	1 min 30s
35	95 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	3 min
1	72 °C	10 min

4) Dream Taq Green PCR Master mix (2X) (Thermo scientific):

Las características de esta ADN polimerasa son:

- ✓ Mezcla lista para usarse con Dream *Taq* polimerasa (*Taq* Hot Star).
- ✓ Alta sensibilidad y procesividad (hasta 20kbp con ADN molde viral).
- ✓ Genera productos con extremos 3' dA.

Con el Dream Taq Green PCR Master mix se amplificó la secuencia codificante de la proteína Nmd3 siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 15 y 16.

Tabla 15. Composición de la reacción de PCR utilizada con la ADN polimerasa Dream Green *Taq*.

Componente	Cantidad (μL)
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.5
Oligonucleótido reverso (10 μM)	0.5
Molde: ADN genómico (514 ng)	1
Master mix (2X)	10
Agua	8
Volumen total	20

Tabla 16. Condiciones del termociclador utilizadas en la amplificación de la secuencia codificante del gen *Nmd3* con la ADN polimerasa Dream Green *Taq*.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	1 min 30s
35	95 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	1 min
1	72 °C	10 min

5.4.3 Digestión con enzimas de restricción y purificación de ADN

Los productos de PCR y los vectores (pEG202 y pACT2 AD) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI (Fermentas) y *Xho*I (New England Biolabs) en una doble digestión utilizando el amortiguador *Bam*HI (fermentas) por 3 h a 37°C. Un ejemplo de la composición de las reacciones de restricción se muestra en la Tabla 17 y 18.

Tabla 17. Composición de la reacción de restricción para la digestión de ADN plasmídico.

Componente	Volumen (µL)
Amortiguador <i>Bam</i> HI (10X)	2
<i>Bam</i> HI (10 U/µL)	1
<i>Xho</i> I (20U/µL)	1
Vector (2-3µg)	10
Agua libre de nucleasas	6

Tabla 18. Composición de la reacción de restricción para la digestión de productos de PCR.

Componente	Volumen (µL)
Amortiguador <i>Bam</i> HI (10X)	5
<i>Bam</i> HI (10U/µL)	1
<i>Xho</i> I (20U/µL)	1
Productos de PCR (2-3µg)	25
Agua libre de nucleasas	18

Cada reacción de restricción se resolvió en un gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed® (Biotium) y posteriormente los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Jena Bioscience) siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.4.4 Ligación de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 10 µL utilizando la ADN 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:

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

Las reacciones se incubaron durante 18 h a 4°C y la composición de las reacciones de ligación se muestra a continuación:

Tabla 19. Composición de la reacción de ligación utilizando la ADN ligasa T4.

Reactivos	Ligación con inserto (μL)	Control: Ligación sin inserto (μL)
Amortiguador T4 (10x)	1	1
Inserto PCR (30 ng/μL)	3	----
Vector (30 ng/μL)	5	3
Ligasa T4 (400 U/μL)	1	1
H ₂ O	-----	5
Volumen final	10	10

Para las ligaciones que se llevaron a cabo para el sistema T/A (vector pGEM-T-Easy® (Promega)) se siguieron las instrucciones del proveedor.

5.4.5 Transformación bacteriana con ADN plasmídico mediante choque térmico

Se mezclaron 2 μL de ADN plasmídico o 10 μL de reacción de ligación con 50 μL de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH10B y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se les dió un choque térmico a 42 °C durante 45 s seguido de 2 min en hielo. Después, se agregaron 500 μL medio LB a cada tubo de células y se incubaron a 37 °C durante 1 h con agitación constante (200 rpm). Finalmente, cada reacción de transformación fue sembrada en medio LB sólido con ampicilina y se incubó durante 18 h a 37 °C.

5.4.6 Aislamiento de ADN plasmídico

5.4.6.1 Método de lisis alcalina

Una colonia transformante se re-estrío en medio sólido con el antibiótico correspondiente y se tomó una colonia aislada para inocular 5 mL de medio LB con antibiótico. El cultivo se incubó durante 18 h a 37°C con agitación constante (200rpm). Se centrifugó el cultivo celular a 10,000 rpm por 5 min y se obtuvo el paquete celular, el cual se trató de la siguiente manera: se resuspendió en 100µL de la solución de P1 con ayuda del vórtex, después se adicionaron 200 µL de la solución P2 y se mezcló por inversión hasta que la disolución se tornó translúcida y finalmente se agregaron 150 µL de la solución P3. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min para eliminar los residuos celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se le agregaron 400 µL de isopropanol frío (4°C). Se incubó por 30 min a 4°C. Después la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm 15 min y el paquete celular se lavó con 500 µL de una solución de etanol al 70 % v/v. Finalmente, las trazas de etanol se eliminaron por evaporación y el ADN se resuspendió en 25 µL de agua libre de nucleasas. La composición de las soluciones utilizadas en esta sección se encuentra descrita en la sección de soluciones y amortiguadores de pH.

5.4.6.2 Método de EasyPrep

Con una colonia transformante se inocularon 5 mL de medio LB + ampicilina y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, el paquete celular fue obtenido mediante centrifugación (2 min, 10,000 rpm) y se resuspendió en 100 µL de solución E usando vórtex. Cada una de las mezclas fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos y posteriormente se sometió a un calentamiento a 94 °C durante 1 min y se enfrió en hielo durante 4 min. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min para eliminar los escombros celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo.

5.4.7 Precipitación de ADN con etanol absoluto

Dependiendo del volumen de muestra, se adicionó al tubo un décimo de la solución P3 y se mezcló mediante el uso de vórtex. Posteriormente, se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (Sigma) y se incubó a -20 °C durante 30 min. La

mezcla se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó con una solución de etanol al 70% v/v. La mezcla se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se eliminó por decantación y sus trazas por evaporación. Finalmente, el ADN se resuspendió en 25 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C.

5.4.8 Identificación de las construcciones por patrón de restricción

La correcta construcción de las secuencias en el vector pGEM-T-Easy se verificó mediante restricción con la enzima *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific), mientras que para las construcciones en el vector pACT2 AD y pEG202 se utilizaron las enzimas *BglII*, *XbaI* y *HindIII*. Las reacciones de restricción se incubaron 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 que se obtuvo con el programa Serial Cloner 2.1. Las construcciones que mostraron un patrón de restricción correcto se purificaron con el kit *Plasmid Mini-Prep* de Jena Bioscience siguiendo las instrucciones del proveedor y se secuenciaron con la compañía GENSCRIPT.

5.4.9 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

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. Los fragmentos de ADN se visualizaron en geles de agarosa al 1% con el amortiguador TAE 1X o TBE 1X. Después se cargaron las muestras y se corrieron a 90 V por 45 minutos. La visualización del ADN se realizó mediante tinción con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) o GelRed® (Biotium) y se observaron las muestras en un transiluminador (Gel Doc™XR de BIO RAD).

5.4.10 Preparación de las células quimiocompetentes de levadura

Se inocularon 10 mL de medio YEPD con *Saccharomyces cerevisiae* CTY10-5d y se incubó a 30 °C durante toda la noche con agitación constante (250 rpm). Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio YEPD con la cantidad de pre-inóculo necesaria para alcanzar un DO₆₀₀ inicial de 0.1. Este cultivo se incubó a 30 °C con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (DO₆₀₀ 0.6 - 0.8). Se obtuvo

el paquete celular por centrifugación (5000 rpm, 2 min, 21 °C) y se resuspendió en 10 mL de agua estéril para eliminar las trazas de medio. Posteriormente se volvió a centrifugar a 5,000 rpm por 2 min a 21°C y se re-suspendió en 1 mL de la solución L1 preparada el mismo día y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Para finalmente ser repartidas en alícuotas de 100 µL.

5.4.11 Transformación del ADN plasmídico en levadura

Se mezclaron 200 ng de cada ADN plasmídico con 20 µL (100 µg) de acarreador de ADN (Invitrogen) y se agregaron a 100 µL de células competentes de levadura. A cada tubo se le adicionaron 600 µL de la solución L2, los tubos se mezclaron por inversión y se mantuvieron a 30 °C durante 2 h con agitación constante (250 rpm). Posteriormente, se agregó 70 µL de DMSO (Sigma) a cada tubo y se les dió un choque térmico a 42 °C por 15 min. Para eliminar el sobrenadante, cada tubo se centrifugó a 5,000 rpm durante 1 min. Cada botón celular se resuspendió en 100 µL de amortiguador TE y se plaqueó en medio de selección YM1 –Leu –His. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 3 días.

5.5 Métodos generales de Bioquímica de proteínas

5.5.1 Métodos de lisis de células de levadura

5.5.1.1 Choque térmico

Los botones celulares se resuspendieron en 300 µL de amortiguador Z con 1mM de PMFS. Después se transfirieron 100 µL de esta suspensión a un tubo nuevo y las células se lisaron por ciclos de congelación/descongelación utilizando nitrógeno líquido y un baño maría a 37 °C.

5.5.1.2 Lisado con perlas de vidrio

Los botones celulares se resuspendieron en 750 µL de amortiguador Z con 1mM de PMFS y se adicionaron 0.420 g de perlas de vidrio. Las células se lisaron con el homogenizador FastPreP®-24 de MP Biomedicals por 6 ciclos: 30 s ON y 5 min OFF a una velocidad de 4.5.

5.5.2 Electroforesis de proteína SDS-PAGE

Para evaluar la expresión de las proteínas híbridas se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE. 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 100 V durante hora y media. Posteriormente el gel se colocó en el amortiguador de transferencia por 15 min para transferir las proteínas a una membrana de PVDF y analizarlas mediante western blot.

5.5.3 Western blot

Para cada una de las muestras se tomaron 20 µg de proteína total y se resolvieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. En seguida, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) durante 30 min a 25 V en una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad). Para verificar que la transferencia de las proteínas fue exitosa, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau. Posteriormente, la membrana se destiñó y se bloqueó en amortiguador TBST + 1% BSA durante 3 h a temperatura ambiente. La detección de las proteínas Lsg1 fusionadas al dominio de unión a DNA de la proteína Lex A se realizó con el anticuerpo α -LexA (1:500 TBST+ 0.1% BSA, Santa Cruz®). Para detectar el control de carga, se usó el anticuerpo α -GAPDH (1:15000 TBST + 0.1% BSA, Invitrogen) que se incubó por 18h en agitación constante a 4 °C. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con el amortiguador TBST y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario α -ratón acoplado a HRP (dilución 1:500 TBST + 0.1% BSA, m-IgGk BP-HRP de Santa Cruz®) durante 3 h a temperatura ambiente. La membrana se volvió a lavar con amortiguador TBST tres veces y finalmente se incubó con el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific) para revelarse en el equipo de detección quimioluminiscente Azure c300 de Azure Biosystems.

5.5.4 Ensayo de interacción proteína-proteína mediante doble híbrido

Se inocularon 5 mL de medio YM1 –Leu –His con una de las colonias de levadura obtenidas de cada co-transformación y se incubaron a 30 °C por 18h con agitación de 250 rpm. Posteriormente, se inocularon 10 mL de medio YM1 –Leu –His con la cantidad de pre-inóculo necesaria para alcanzar un DO_{600} inicial de 0.1. Este cultivo se incubó a 30 °C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica (DO_{600} 0.6 - 0.8). Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento logarítmica se transfirieron 1.5 mL del cultivo a un tubo limpio y se centrifugaron a 14,000 rpm 2 min para obtener el botón celular posterior a la eliminación del medio de cultivo. El botón celular se resuspendió en 300 μ L de Buffer Z de los cuales se transfirieron 100 μ L de esta suspensión a un tubo nuevo y las células fueron lisadas por diferentes métodos indicados en la sección 5.5.2. Posterior a la lisis celular se les agregó 700 μ L de amortiguador Z con β -mercaptoetanol y 160 μ L de amortiguador Z con ONPG, se mezcló por inversión y se incubó a 30 °C hasta observar el desarrollo de color amarillo. Una vez desarrollado el color, se agregaron 400 μ L de una solución de Na_2CO_3 para detener la reacción, se registró el tiempo de incubación y los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se cuantificó su absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Las unidades de β -galactosidasa (cantidad hidrolizada a partir de 1 μ M de ONPG a *o*-nitrofenol por minuto por célula) se calcularon empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades de } \beta \text{ - galactosidasa} = \frac{(1000)(OD_{405nm})}{(t)(V)(Fc)(OD_{600nm})}$$

En donde:

t es el tiempo de incubación.

V es el volumen de suspensión celular utilizado para el ensayo.

OD_{405nm} es la absorbancia del *O*-nitrofenol a una $\lambda_{405 nm}$.

OD_{600nm} es la absorbancia de las células en fase logarítmica de crecimiento.

Fc es el factor de concentración.

6 RESULTADOS

6.1 Obtención de las construcciones de ADN para el ensayo de doble híbrido

Para realizar el ensayo de doble híbrido en levadura se realizaron las siguientes construcciones:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------|
| I. Lsg1-pEG202 | IV. Nmd3-pACT2-AD |
| II. Dominio G de Lsg1-pEG202 | V. Rpl10- pACT2-AD |
| III. Dominio G de Lsg1 con NLS-pEG202 | VI. Sqt1- pACT2-AD |

6.1.1 Amplificación de las secuencias codificantes

Se extrajo ADN genómico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCY123 utilizando el protocolo (Harju, *et al.*, 2004) y se obtuvieron 100µL de ADN genómico con una concentración de 1.1 µg/µL. Este ADN se utilizó como ADN molde para la amplificación de las secuencias codificantes de las proteínas de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Utilizando a la ADN polimerasa Phusion y las condiciones de las Tablas 7 y 8, se amplificaron las secuencias codificantes de las proteínas Nmd3, Sqt1, Lsg1 y el dominio G de la proteína Lsg1 (ver Figura 9), pero no así para las secuencias de las proteínas Lsg1 con NLS, el dominio G con NLS ni Rpl10, por lo cual se probaron nuevas condiciones que a continuación se describen.

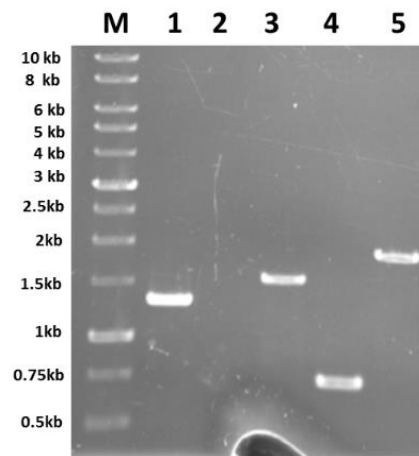


Figura 9. Amplificación de secuencias codificantes con la ADN polimerasa Pushion. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular; 1: Amplicón de Sqt1 (1293pb); 2: Rpl10 (No amplificó); 3: Amplicón de Nmd3 (1553pb); 4: Amplicón del dominio GTPasa de la proteína Lsg1 (708pb);5) Amplicón de Lsg1 (1963pb).

Para el caso de la proteína Rpl10 (663pb) se probó:

- ✓ Variar la cantidad de ADN molde de 0.5 μg y se probaron 0.25 μg , 0.75 μg y 1 μg . En ninguno de los casos hubo amplificación como se muestra en la Figura 10A.
- ✓ Modificar la temperatura de alineamiento desde 51.6 $^{\circ}\text{C}$, hasta 68.4 $^{\circ}\text{C}$. Con estas condiciones se observó la amplificación de bandas de alrededor de 2000 pb que no corresponde con el tamaño del amplicón esperado que es de 663pb (Figura 10B).

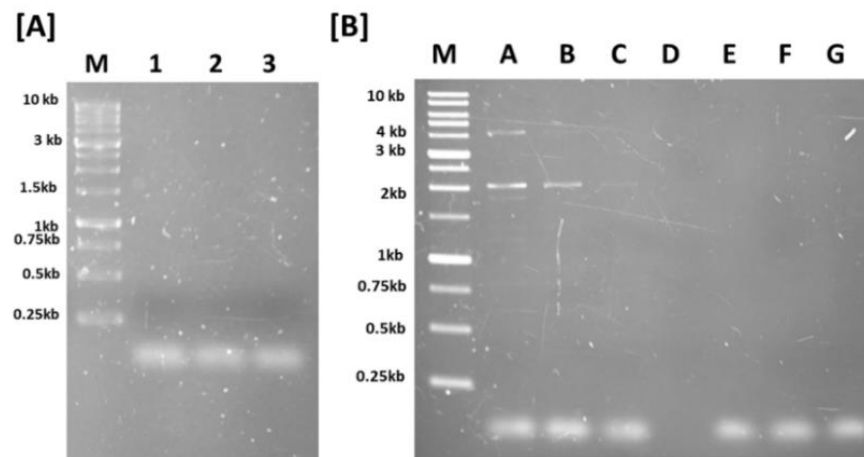


Figura10. Condiciones probadas para amplificar la secuencia codificante de la proteína Rpl10. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular. [A] Diferentes concentraciones de ADN molde: 1) 0.25 μg ; 2) 0.75 μg ;3) 1 μg . [B] Diferentes temperaturas de alineamiento: A) 51.6 $^{\circ}\text{C}$; B) 54.3 $^{\circ}\text{C}$; C) 57.5 $^{\circ}\text{C}$; D) control negativo; E) 60.7 $^{\circ}\text{C}$; F) 64.3 $^{\circ}\text{C}$; G) 68.4 $^{\circ}\text{C}$.

Otras condiciones que se probaron fueron amplificar utilizando a la ADN polimerasa KOD XL y la *Taq* platinum sin embargo no se tuvo éxito por lo cual se decidió diseñar un nuevo par de oligonucleótidos para la secuencia de Rpl10. Mientras que la secuencia de la proteína Lsg1 con NLS se logró amplificar utilizando a la ADN polimerasa KOD XL y las condiciones indicadas en la Tabla 9 y 10. Cómo se observa en la Figura 11, la banda obtenida tiene un tamaño de alrededor de 2 kpb que corresponde con el tamaño del amplicón esperado que es de 1950 pb y también

obtiene una banda de aproximadamente 500 pb que corresponde a un producto inespecífico de amplificación.

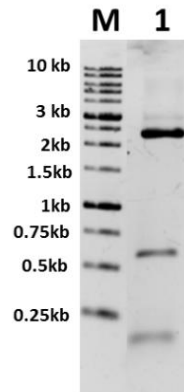


Figura 11. Amplificación de la secuencia codificante de la proteína Lsg1-NLS. Con la ADN polimerasa KOD XL. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 1: Amplicon Lsg1-NLS.

Con los amplicones obtenidos se continuó el proceso de clonación.

6.1.2 Clonación por digestión con enzimas de restricción y ligación

Durante el proceso de clonación, un paso muy importante es la digestión de los amplicones y vectores. En este trabajo todas las construcciones se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI (Fermentas) y *Xho*I (NEB) excepto para la construcción Nmd3-pACT2-AD, previo a la reacción de ligación. Puesto que las enzimas provenían de diferentes proveedores se utilizó el procedimiento ejemplificado de la Figura 12.

Con este procedimiento se tenían rendimientos muy bajos de alrededor de 5ng/ μ L a 15 ng/ μ L, lo cual repercutía en el proceso de ligación, por lo cual se decidió probar condiciones que permitieran trabajar sin requerir el paso de precipitación (pp) de ADN ya que en este paso se tenían las mayores pérdidas de ADN.

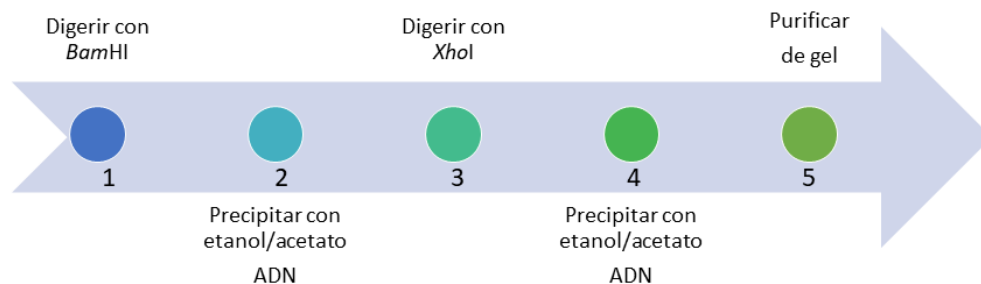


Figura 12. Procedimiento para la restricción y purificación de los insertos. Este proceso se realizó para la clonación mediante el método de digestión con enzimas de restricción y ligación

Se evaluó la actividad de las enzimas en los amortiguadores indicados por su proveedor y se comparó respecto a su actividad en el amortiguador de la segunda enzima. Esto con el objetivo de verificar que la enzima mantuviera su especificidad y no presentará actividad estrella por encontrarse en condiciones de reacción no óptimas, y así poder utilizar estas enzimas en reacciones de doble digestión. Lo anterior se llevó a cabo mediante la restricción del plásmido pEG202, donde cada enzima solo corta en un sitio del plásmido por lo cual se observa una sola banda de alrededor de 10 kpb (ver Figura 13A).

Los resultados demostraron que ambas enzimas funcionan adecuadamente aún al usar amortiguadores que según lo reportado no son los óptimos y no cortan en lugares inespecíficos. Lo anterior era importante demostrar ya que para la enzima *Bam*HI está ampliamente documentado que presenta actividad estrella en condiciones no óptimas de reacción (Kolesnikov, *et al.*, 1981; Wei, *et al.*, 2008).

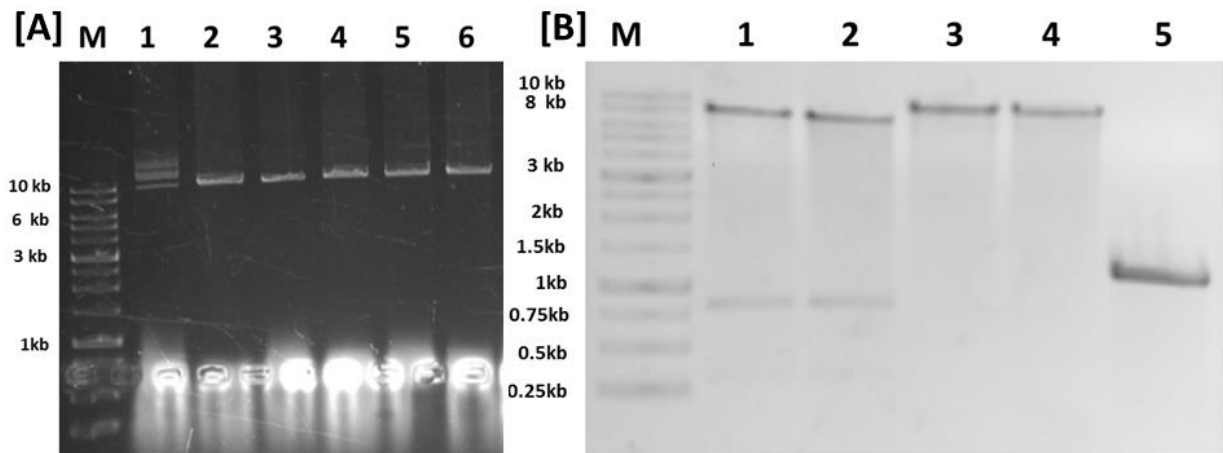


Figura13. Digestión control del plásmido pEG202 para establecer las condiciones óptimas de restricción. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. [A] Restricciones en un solo amortiguador. M: Marcador de peso molecular, 1: Muestra sin digerir, 2: digestión con *Xho*I (NEB) en amortiguador Fermentas, 3: digestión con *Xho*I (NEB) en amortiguador 3.1 NEB, 4: digestión con *Bam*HI (Fermentas) en amortiguador 3.1 NEB, 5: digestión con *Bam*HI (Fermentas) en amortiguador Fermentas 6: digestión con *Nco*I (NEB) en amortiguador 3.1 NEB. [B] Doble digestión en un amortiguador. M) Marcador de peso molecular, 1-2; vector control pACT2-AD-EFL1, 3-4) pEG202, 5) Amplicon Sqt1.

Basado en los resultados anteriores se llevaron a cabo las reacciones de doble digestión en el amortiguador *Bam*HI de fermentas (ver Figura 13B), obteniéndose los fragmentos esperados. Los fragmentos se purificaron de gel, se ligaron y posteriormente se transformaron en células de *E.coli* DH10 β .

Se probaron dos métodos de purificación de ADN plasmídico para determinar cuál método era el óptimo para esta etapa. La purificación de ADN utilizando el método Easy prep se muestran en la Figura 14A, donde se observa que de las 15 clonas evaluadas solo de dos se obtuvieron ADN y en baja concentración.

Por lo que a pesar de que este método tiene la ventaja de ser muy rápido no fue el más eficiente. Por el contrario, la purificación de ADN plasmídico con el método de lisis alcalina (Figura 14B) mostró ser el más eficiente a pesar de que requiere más pasos de purificación, ya que de las 14 muestras evaluadas se obtuvo ADN de todas y en una concentración mayor que la obtenida en comparación con el método Easy prep. Por lo cual se utilizó el método de lisis alcalina como el método para purificar plásmidos en este trabajo.

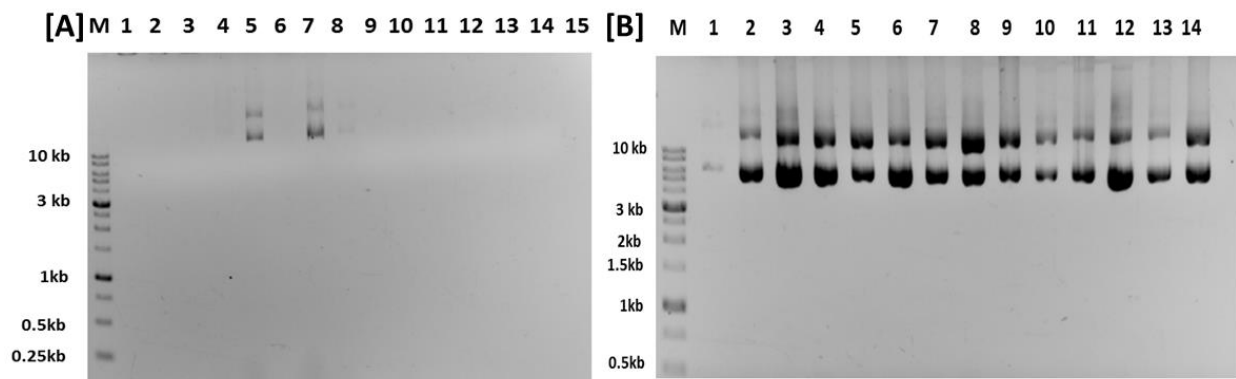


Figura 14. Purificación de plásmidos. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. [A] Plásmidos purificado por el método Easy Prep. M: Marcador de peso molecular 1-7: clonas de Lsg1 ensayadas, 8-15: clonas de Sqt1 ensayadas. [B] Plásmidos purificado por el método de lisis alcalina. M: Marcador de peso molecular, 1-7: clonas de Lsg1 ensayadas, 8-14: clonas de Sqt1 ensayadas.

Con los plásmidos purificados de las clonas, se llevó acabo el escrutinio para la identificación de aquellas que tuvieran el inserto esperado mediante restricción con la enzima *Bgl*II. El patrón de restricción teórico para cada construcción se comparó con el patrón experimental (Figura 15).

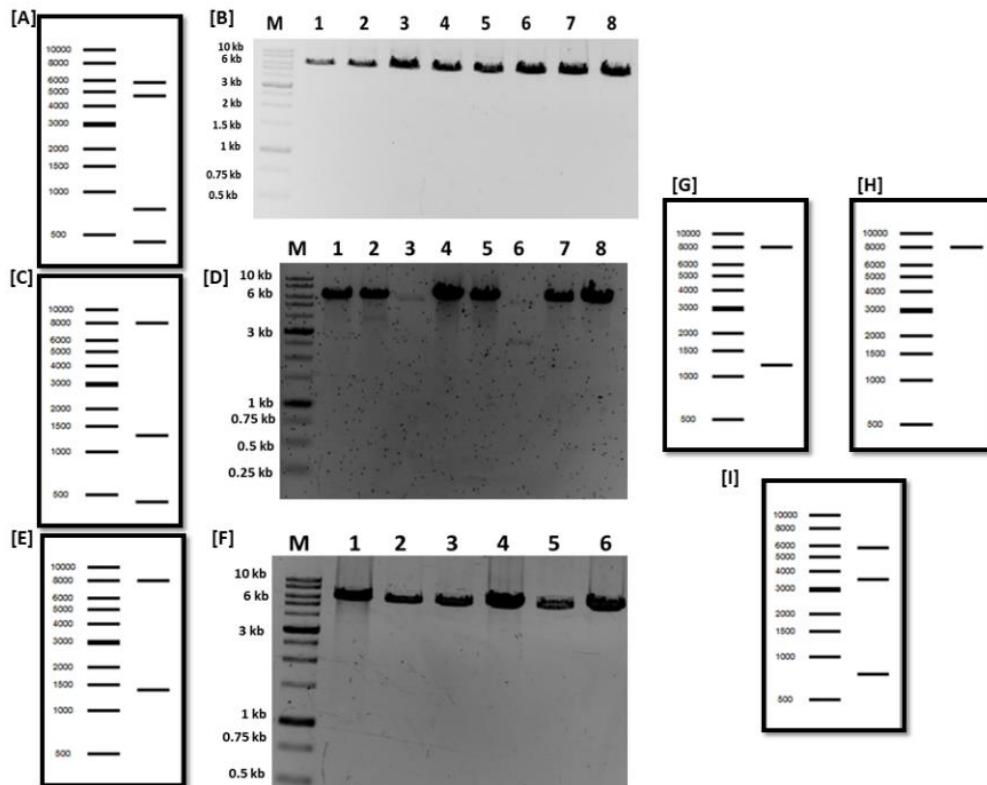


Figura 15. Patrones de restricción de las diferentes construcciones en estudio con la enzima *Bgl*II. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. [A-B] Patrón de restricción teórico y escrutinio de las posibles clonas resultantes de la construcción pEG202-Lsg1-NLS. [C-D] Patrón de restricción teórico y escrutinio de las posibles clonas resultantes de la construcción pACT2-Nmd3. [E-F] Patrón de restricción teórico y escrutinio de las posibles clonas resultantes de la construcción pACT2-Sqt1. [G] Patrón de restricción teórico pACT2-D1-Efl1 (vector parental). [H] Patrón de restricción teórico pACT2. [I] Patrón de restricción teórico pEG202.

En todos los casos se obtuvieron patrones que no corresponden con el patrón de restricción teórico de las construcciones o de los vectores vacíos, a pesar de que se utilizaron las condiciones adecuadas para la restricción del material genético en el proceso de escrutinio. En todos los ensayos se obtuvieron bandas de un tamaño aproximado de 6kb a pesar de que se tratan de construcciones diferentes, por lo cual se sospechó de una posible contaminación.

Con la sospecha de la contaminación, se verificó que las enzimas de restricción utilizadas para el escrutinio funcionaran correctamente y se mandó a secuenciar una de las construcciones que daban el patrón de una banda de 6 kpb. La secuencia obtenida se analizó mediante la herramienta BLAST y se encontró que correspondía

al vector pcDNA con la secuencia codificante de la proteasa romboide de *Entamoeba histolítica* insertada en él. Este vector cuenta con el marcador de selección en bacteria del gen que codifica para la enzima β -lactamasa, la cual le proporciona la resistencia al antibiótico ampicilina, mismo marcador que poseen los vectores de expresión en el sistema de doble híbrido, lo cual explica su propagación, además su tamaño coincide con la banda encontrada.

Lo anterior, identificó la contaminación más no la fuente por lo que se procede a buscarla. Para ello se evaluaron todas las soluciones usadas a lo largo del proceso de clonación, incluyendo los amortiguadores de las enzimas de restricción, de la ADN polimerasa usada en las amplificaciones por PCR y el de la ADN ligasa, así como el agua y las células competentes; entre los cuales no se encontró la fuente de contaminación.

Por último, se sustituyó el bromuro de etidio por el Redgel®, como colorante para la tinción de los fragmentos ADN durante la purificación de gel y con ello ya no se observó más la presencia de la banda de 6kpb en el proceso de clonación con lo cual se concluye que el bromuro de etidio fue la fuente de contaminación. Una vez identificada la fuente de contaminación se realizó el proceso de clonación con la modificación y si bien se obtienen clones en el escrutinio con los patrones que corresponden a los vectores vacíos y ya no a la contaminación.

El proceso de clonación no fue eficiente, por lo tanto, se buscó una alternativa que permitiera hacer este proceso más eficaz considerando que el paso limitante se sugiere fue la restricción de los insertos los cuales no se digieren adecuadamente para dar lugar a los extremos cohesivos que permitan el proceso de ligación, por lo cual se utilizó como alternativa el sistema de clonación T/A.

6.1.3 Clonación T/A utilizando el vector pGEM-T-Easy

Para aumentar la eficiencia de la clonación se utilizó el vector de tránsito pGEM-T-Easy que contiene extremos 3' de timina en ambos lados del DNA lineal y donde se puede aparear un inserto que contenga extremos 3' de adenina por

complementariedad de bases. Este tipo de insertos se obtienen de amplificar con ADN polimerasas que carecen de la actividad exonucleasa 3'→ 5' como la *Taq* ADN polimerasa. Con esta polimerasa se logró amplificar las secuencias codificantes de Rpl10, Sqt1, Lsg1 y el dominio G con y sin señal NLS (Figura 16).

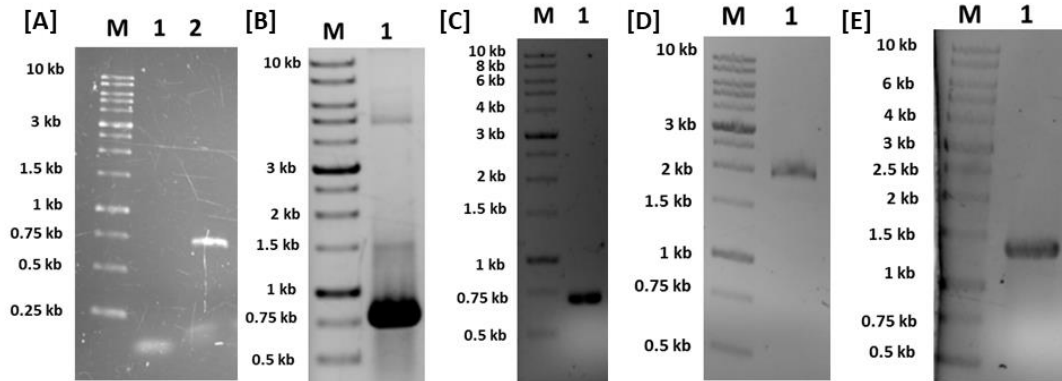


Figura16. Amplificación de las secuencias Rpl10, Sqt1, Lsg1 y del dominio G con y sin señal de NLS usando la polimerasa *Taq*. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. [A] Amplicón dominio G con NLS (725 pb). [B] Amplicón dominio G (705 pb). [C] Amplicón Rpl10 (663 pb). [D] Amplicón Lsg1 (1993 pb). [E] Amplicón Sqt1 (1293 pb).

Sin embargo, las secuencias codificantes de las proteínas Lsg1 con NLS y Nmd3 no se amplificaron con las condiciones mencionadas en las Tablas 14 y 15. Por lo que se probó incrementar la concentración de $MgCl_2$ presente en la reacción de PCR. Lo anterior mejoró la eficiencia con la que la enzima amplificó la secuencia de la proteína Lsg1 con NLS (Figura 17) pero no para la amplificación del inserto Nmd3. Se eligió usar una concentración de 3.5 mM de iones Mg^{2+} para la amplificación del inserto Lsg1 con NLS.

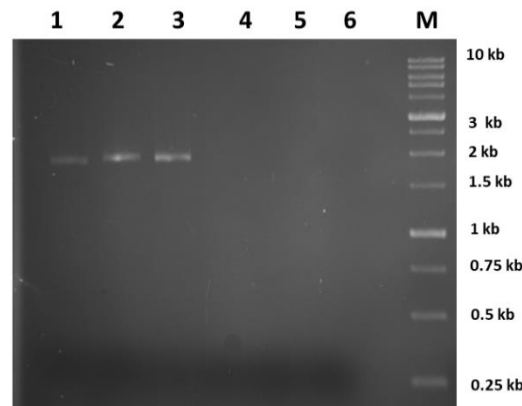


Figura 17. Impacto de la concentración de iones Mg^{2+} en la reacción de PCR para la amplificación de la secuencia Lsg1-NLS y Nmd3. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. 1) Lsg1-NLS con 2.5 mM de $MgCl_2$, 2) Lsg1-NLS con 3 mM de $MgCl_2$, 3) Lsg1-NLS con 3.5 mM de $MgCl_2$, 4) Nmd3 con 2.5 mM de $MgCl_2$, 5) Nmd3 con 3 mM de $MgCl_2$, 6) Nmd3 con 3.5 mM de $MgCl_2$.

Después de varios ciclos de optimización de las condiciones de PCR, una combinación de alta concentración de iones Mg^{2+} (3.5 mM) y el uso de ADN plasmídico (pET28-Lsg1) en lugar de ADN genómico en la reacción de PCR resultó en un mayor rendimiento en la cantidad de amplicón obtenido para Lsg1-NLS, más no para Nmd3 (ver Figura 18).

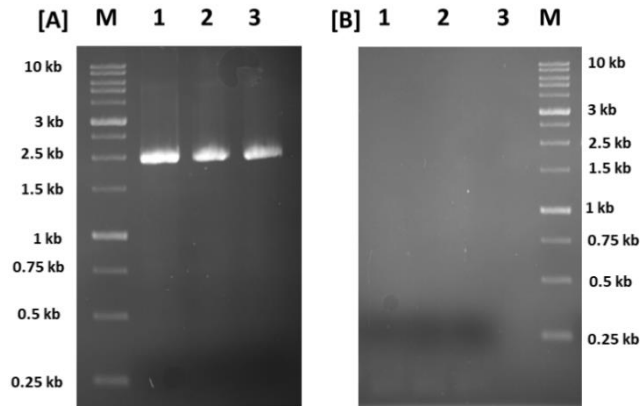


Figura 18. Impacto de la fuente de ADN molde en la amplificación por PCR de la secuencia codificante de [A] Lsg1-NLS y [B] Nmd3. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Para la amplificación de Lsg1-NLS se utilizó el plásmido pET28b-Lsg1 como ADN molde, y el plásmido pAJ1381 como ADN molde para la amplificación de Nmd3. 1) 2.5mM $MgCl_2$, 2) 3mM $MgCl_2$, 3) 3.5mM de $MgCl_2$.

Finalmente, la secuencia codificante de Nmd3 se logró amplificar con ADN polimerasa Dream *Taq* utilizando las condiciones indicadas de la Tabla 15 y Tabla 16 sin que la concentración de Mg^{2+} represente una variable crítica en la amplificación (Figura 19).

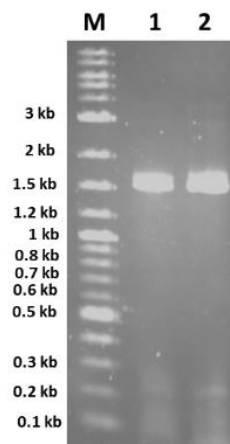


Figura 19. Amplificación de la secuencia codificante de la proteína Nmd3 con la ADN polimerasa DreamTaq con diferentes concentraciones de iones Mg^{2+} . Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M) Marcador de peso molecular, 1) 2mM de $MgCl_2$, 2) 2.5mM de $MgCl_2$.

Los productos de PCR de los insertos se ligaron en el vector de tránsito pGEM-T-Easy, seguido de la transformación en células competentes de *Escherichia coli* DH10 β . El ADN plasmídico obtenido de las transformantes se evaluó mediante escrutinio por patrón de restricción con la enzima *Eco*RI (ver Figura 20).

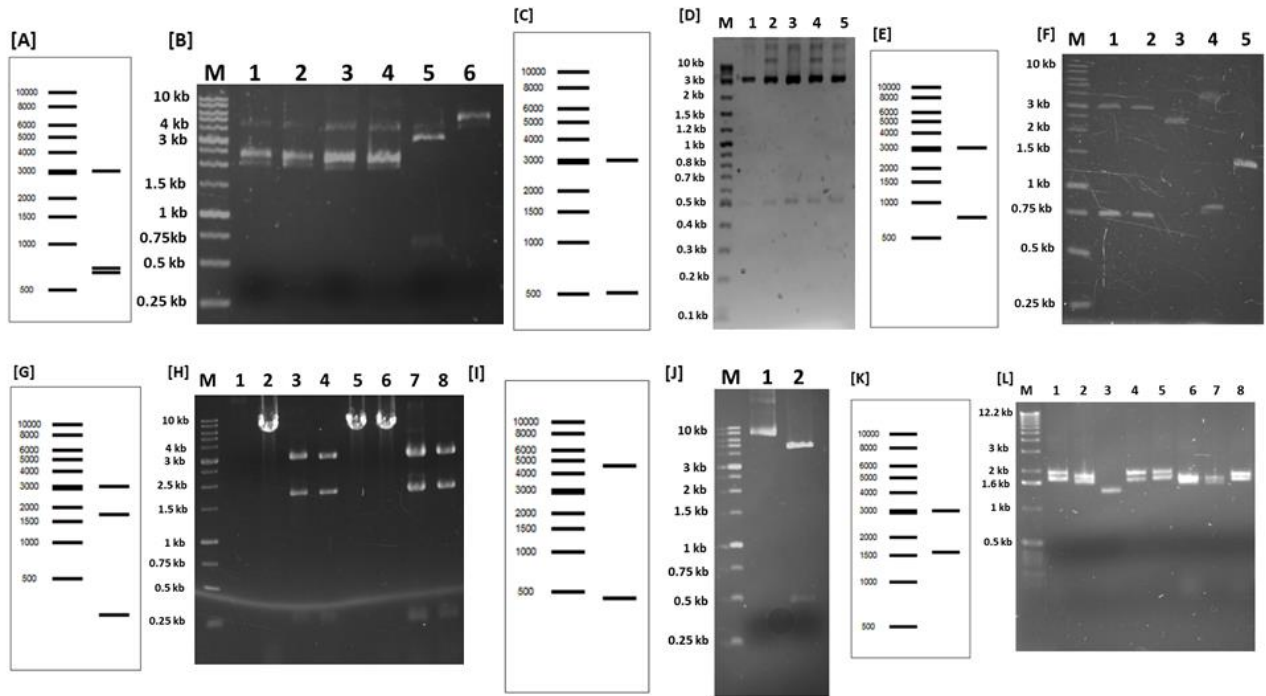


Figura 20. Escrutinio de las construcciones en el vector pGEM-T-Easy. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. [A], [C], [E], [G], [I], [K]: Patrones de restricción teórico de las construcciones con la enzima *Eco*RI. [B] Patrón de restricción de la construcción pGEM-T-Easy-Sqt1 donde carril 1,3 y 6 corresponden a clonas sin digerir, carriles 2 y 4 corresponden a clonas (-) y carril 5 corresponde a la clona (+). [D] Patrón de restricción de la construcción pGEM-T-Easy-Rpl10 donde carriles 1-5 corresponden a las clonas (+). [F] Patrón de resticción de la construcción pGEM-T-Easy-DomG y pGEM-T-Easy-DomG-NLS, carriles 1-2: clona (+) de la construcción Dom G, carril 3: clona (-), carril 4: clona (+) de la construcción DomG-NLS. [H] Patrón de restricción de la construcción pGEM-T-Easy-Lsg1 carriles 3,4,7,8: clonas (+). [J] Patrón de restricción de la construcción pGEM-T-Easy-Lsg1-NLS con la enzima *Bgl*II, carril 1: clona sin digerir, carril 2: clona (+). [L] Patrón de restricción de la construcción pGEM-T-Easy-Nmd3, carriles 1-8: clonas(-).

Se encontraron clonas positivas para todas las construcciones, excepto para la construcción pGEM-T-Easy-Nmd3, donde ninguna de las clonas obtenidas dio el patrón esperado por lo cual se desecharon y se buscó un nuevo método para clonar esta secuencia. Las clonas positivas se mandaron a secuenciar a la compañía GENSCRIPT.

El resultado de la reacción de Sanger mostró la secuencia correcta de (ver Anexo 10.5):

- El dominio G de la proteína Lsg1
- Lsg1
- El dominio G con NLS de la proteína Lsg1
- Sqt1
- Rpl10

Mientras que el inserto Lsg1 con NLS presentó diversas mutaciones que probablemente se originaron como resultado del incremento en la concentración de Mg^{2+} , por lo cual se optó por descartarlas y buscar una nueva metodología para clonar esta secuencia. Los insertos que no presentaron mutaciones, se sub-clonaron en los vectores de expresión. Posteriormente se confirmó la obtención de las construcciones en el vector de expresión por medio de patrón de restricción (ver Figura 21).

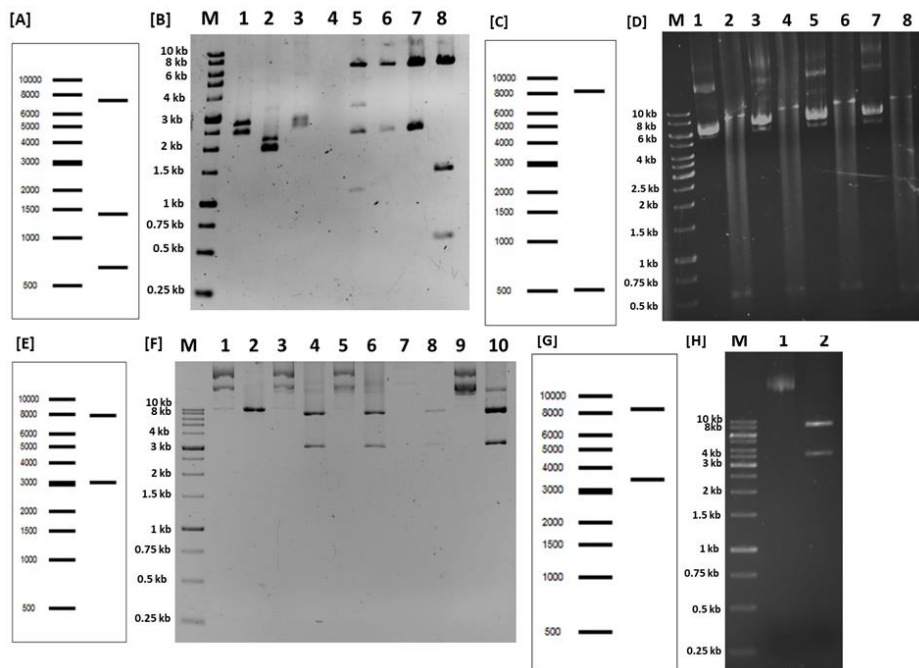


Figura 21. Escrutinio de las construcciones subclonas en los vectores de doble híbrido. Geles al 1% de agarosa teñidos con bromuro de etidio. [A], [C], [E], [G]: Patrones de restricción teóricos. [B] Escrutinio de la construcción Sqt1-pACT2 con *Hind*III, 1-6: clonas (-), 7: clona sin digerir, 8: clona (+). [D] Escrutinio de la construcción Rpl10-pACT2 con *Eco*RI, carril 1,3,5 y 7: clonas sin digerir, carril 2,4,6 y 8: clona (+). [F] Escrutinio de la construcción DomG-pEG202 y DomG-NLS-pEG202 con *Sac*I. Carril 1,3,5,7 y 9: clonas sin digerir, carril 2: pEG202 digerido, carril 4 y 6: clona (+) DomG, carril 8 y 10: clonas (+) DomG-NLS. [H] Escrutinio de la construcción Lsg1-pEG202 con *Sac*I, carril 1: clona sin digerir, carril 2: clona (+).

6.1.4 Clonación por el método de In-Fusion®

Para la clonación de las secuencias Nmd3 y Lsg1 con NLS se optó por el método de clonación In-Fusion®. Este es un método de clonación independiente de ADN ligasa, que garantiza la direccionalidad y que se lleva a cabo en un solo paso, con lo cual se ahorra tiempo y recursos, además de que su diseño permite la continuidad del marco de lectura sin dejar ninguna secuencia interferente o "cicatriz". Este método se basa en la actividad exonucleasa (3'-5') de la ADN polimerasa del virus Vaccinia (VVpol) (Irwin, Farmer, Willer, & Evans, 2012). La enzima VVpol degrada ADN de doble cadena a cadena sencilla en pequeñas regiones de los extremos tanto del vector como del inserto, permitiendo el traslape de los fragmentos. Esta superposición se logra a través de un producto de PCR al cual se le adicionan al menos 15 pb homólogos a los extremos del vector.

El protocolo de esta metodología consta de 4 pasos: 1) obtener el producto de PCR con las 15 pb homólogas al vector de interés, 2) linealizar el vector con alguna enzima de restricción y purificar, 3) reacción con la enzima VVpol y 4) transformación en bacteria (ver Figura 22).

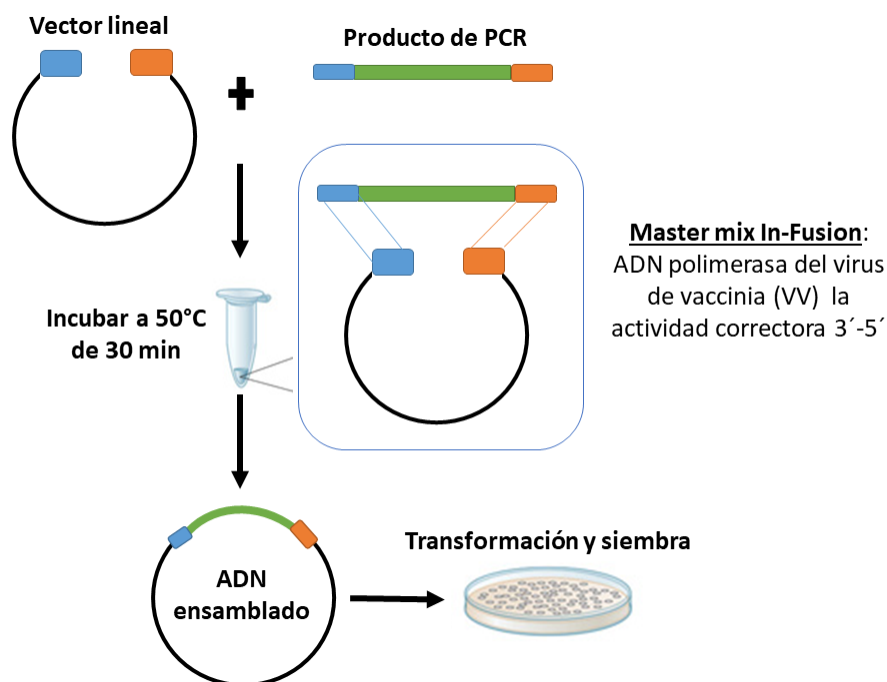


Figura 22. Proceso de clonación por el método de clonación In-Fusion®.

Para la clonación de la secuencia de Nmd3 se diseñaron nuevos oligonucleótidos a los que se les adicionó 15 pb homólogas al vector pACT2-AD. El resultado de la amplificación de esta secuencia se observa en la Figura 23.

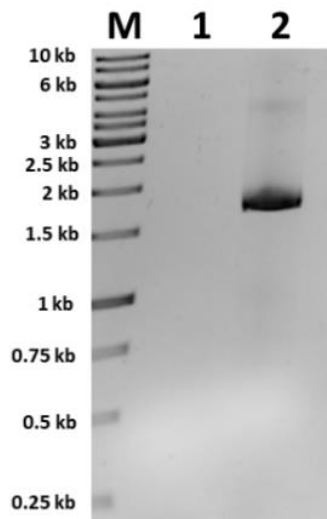


Figura 23. Amplificación de la secuencia Nmd3 para su clonación en el vector pACT2 mediante la técnica de In-Fusion. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M) Marcador de peso molecular, 1) Nmd3 amplificado con la ADN polimerasa Phusion, 2) Nmd3 amplificado con ADN polimerasa KOD XL.

La construcción de Lsg1-NLS no se pudo amplificar por lo que se descartó esta construcción pues ya se tenía una con la secuencia de Lsg1. Para el proceso clonación con esta técnica por un lado se purificó el amplicon del gel y se cuantificó mientras que el plásmido se digirió con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, para su linearización y se purificó de gel. Con el inserto y el vector purificado se llevó a cabo la reacción de fusión con el kit CloneEZ® PCR Cloning (GenScript) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Finalmente las reacciones se transformaron en células de *E.coli* DH10β. Con las clonas obtenidas, se realizó la búsqueda de las clonas con la construcción Nmd3-pACT2-AD por medio de reacciones de restricción con la enzima *XbaI*. Como se observa en la Figura 24 donde de las 6 clonas evaluadas una muestra el patrón de restricción esperado por lo cual se mandó a secuenciar esta construcción y se corroboró la correcta secuencia del inserto en la construcción (ver Anexo 10.5).

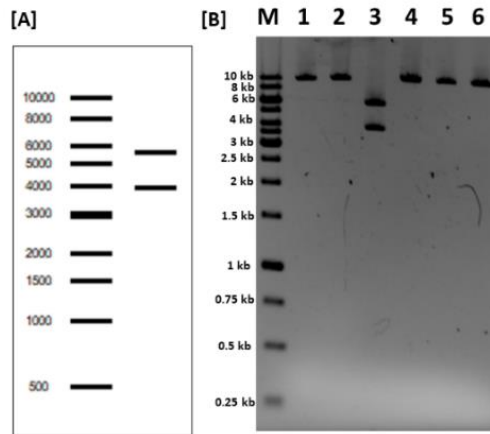


Figura 24. Escrutinio de clonas para la construcción Nmd3-pACT2 por patrón de restricción. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. [A] Patrón teórico con *Xba*I (5,626 pb, 3,934pb, 93pb). [B] Patrón experimental, M: Marcador de peso molecular, 1-2: clonas (-), 3: clona (+), 4-6: clona (-).

Al final de los diferentes enfoques de clonación se obtuvieron las siguientes construcciones:

- Lsg1 en el vector pEG202
- Dominio G de Lsg1 en el vector pEG202
- Dominio G de Lsg1 con NLS en el vector pEG202
- Sqt1 en el vector pACT2-AD
- Rpl10 en el vector pACT2-AD
- Nmd3 en el vector pACT2-AD

Posteriormente las construcciones se co-transformaron en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* CTY10-5D para evaluar las interacciones proteína-proteína. La co-transformación se realizó con los dos tipos de construcciones obtenidas por un lado las construcciones del vector pEG202 y por otro las construcciones del vector pACT2-AD, así como la mezcla de los vectores vacíos que se utilizaron como controles negativos del ensayo de interacción, con lo cual se obtuvieron 16 combinaciones que fueron evaluadas.

6.2 Verificación de la expresión de las proteínas por medio de Western Blot

Antes de evaluar las interacciones entre proteínas se verificó la expresión de las proteínas híbridas por medio de un ensayo de Western Blot. Lo anterior se llevó a cabo como control para asegurar que las proteínas se produjeran antes de realizar los ensayos de doble híbrido y asegurar que una interacción negativa no era debido a falta de expresión. Se evaluó la expresión mediante la detección del dominio de unión a ADN de la proteína híbrida Lex A que se expresa en el vector pEG202. Como se muestra en la Figura 25, el dominio de unión a ADN de LexA fusionada a la proteína Lsg1 se expresa en todas las mezclas realizadas, por lo cual se continuó con los ensayos de doble híbrido.



Figura 25. Detección de la expresión del dominio de unión a ADN de la proteína Lex A fusionado a la proteína Lsg1. 1) Control negativo (Extracto proteico de la levadura *S. cerevisiae* CTY10-5d sin plásmidos), 2) Lsg1-DUD-LexA con Sqt1, 3) Lsg1-DUD-LexA con Nmd3, 4) Lsg1-DUD-LexA con Rpl10, 5) Lsg1-DUD-LexA con pACT2, Control de carga

6.3 Métodos de lisado celular

Para el ensayo de doble híbrido es necesario lisar las células de manera eficiente. Por lo cual se probaron dos métodos de ruptura celular (por choque térmico y con perlas de vidrio) y se comparó la cantidad de proteína total obtenida en cada método

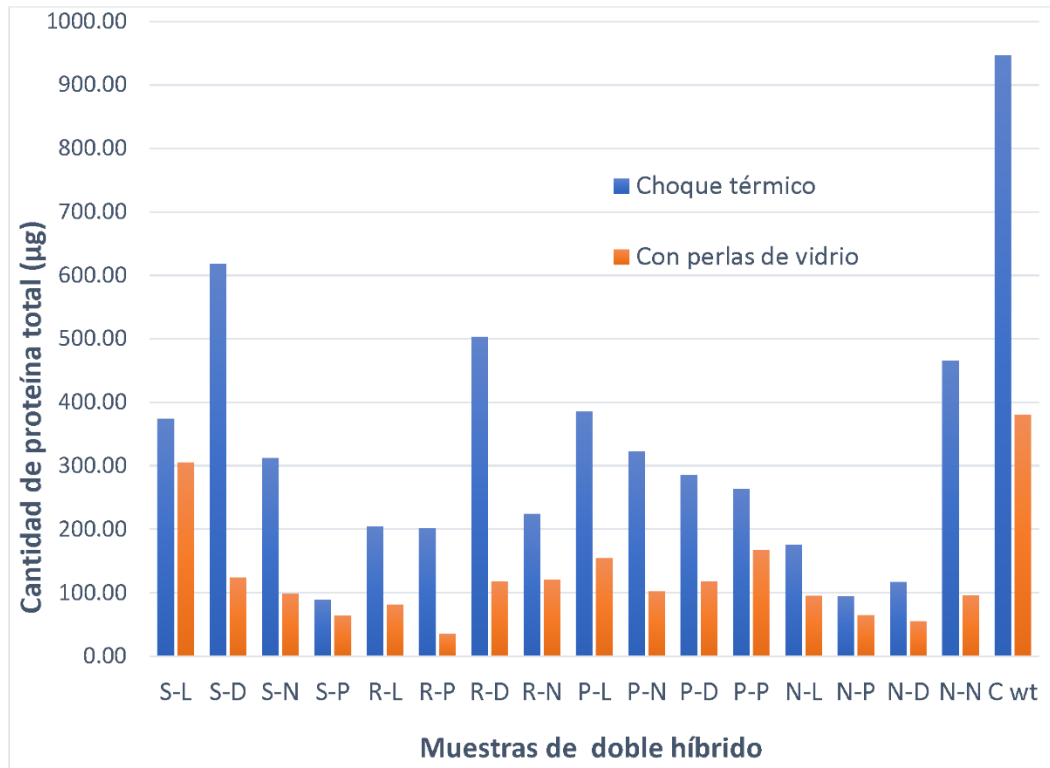


Figura 26. Comparación de la cantidad de proteína total obtenida de dos diferentes métodos de ruptura celular para los ensayos de doble híbrido. S-L: construcción Sqt1-pACT2-AD con Lsg1-pEG202. S-D: construcción Sqt1-pACT2-AD con DomG-pEG202. S-N: construcción Sqt1-pACT2-AD con Dominio G-NLS-pEG202. S-P: construcción Sqt1-pACT2-AD con pEG202. R-L: construcción Rpl10-pACT2-AD con Lsg1-pEG202. R-P: construcción Rpl10-pACT2-AD con pEG202. R-D: construcción Rpl10-pACT2-AD con DominioG-pEG202. R-N: construcción Rpl10-pACT2-AD con Domino G-NLS-pEG202. P-L: vector pACT2-AD con Lsg1-pEG202. P-N: vector pACT2-AD con Dominio G-NLS-pEG202. P-D: vector pACT2-AD con Dominio G-pEG202. P-P: vector pACT2-AD con pEG202. N-L: Nmd3-pACT2-AD con Lsg1-pEG202. N-P: Nmd3-pACT2-AD con pEG202. N-D: Nmd3-pACT2-AD con Dominio G-pEG202. N-N: Nmd3-pACT2-AD con Dominio G-NLS-pEG202. Cwt: Células sin vectores.

Como se observa en la Figura 26 en ambos métodos de lisado observamos variabilidad en la cantidad de proteína obtenido entre las diferentes muestras analizadas lo cual podría deberse a diversos factores que afectan el proceso de lisado como son la cantidad de células ($O.D_{600}$ 0.6-0.8), la edad del cultivo (fase de crecimiento) o el medio en que crecieron (rico o mínimo) que tienen repercusión en el desarrollo de la pared celular (Kushnirov, 2000; Middelberg, 1995) y por consecuencia

en el proceso de ruptura celular, así como condiciones de estrés (temperatura, pH o expresión de proteínas recombinantes) (Von der Haar, 2007; Mattnovich, *et al.*, 2004) que afectan en la cantidad de proteína obtenida.

Por otro lado, el método de lisado por choque térmico permitió obtener mayor cantidad de proteína total en comparación con el lisado con perlas de vidrio. Debido a las condiciones de este método, era importante asegurar que la enzima reportera del ensayo de doble híbrido, β -galactosidasa no se viese afectada por el cambio de temperatura por lo cual se encontró en la literatura, que han estudiado el efecto del cambio de temperatura en la actividad de la enzima y se encontró que no se ve afectada a bajas temperaturas por tiempo menor a 9 horas después del lisado (Putnam & Koch, 1975) así como a temperaturas de 37°C se mantiene su actividad máxima (Kwapiszewska, *et al.*, 2013), por lo cual el choque térmico parece no afectar el ensayo debido a que no se afecta a la enzima reportera, por lo que se utilizó este método para la lisis celular en los ensayos de doble híbrido.

6.4 Ensayo de interacción proteína–proteína mediante doble híbrido

Se evaluaron las interacciones entre las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 con la enzima Lsg1 y con su dominio G mediante un ensayo de doble híbrido en levadura. Las proteínas fusionadas al dominio de unión a ADN (Lsg1 completa y su dominio GTPasa expresado independientemente) se emplearon como señuelos por su habilidad para reconocer la secuencia promotora de la proteína LexA y controlar la expresión del gen reportero *Lac Z*. Mientras que las proteínas fusionadas al dominio de trans-activación (Nmd3, Rpl10 y Sqt1) fungieron como presas, tal que, al existir una interacción física entre ambas proteínas, este dominio es capaz de reclutar a la maquinaria de transcripción y expresar a la enzima β -galactosidasa (ver Figura 27). Esta enzima hidroliza el ONPG (o-nitrofenil- β -galactósido) liberando como productos galactosa y o-nitrofenol; este último es un compuesto soluble de color amarillo cuya absorbancia se puede cuantificar en un intervalo de longitud de onda de 405 - 420 nm. La absorbancia obtenida permite calcular las unidades de β -galactosidasa y este su valor se relaciona indirectamente con la interacción entre dos macromoléculas.

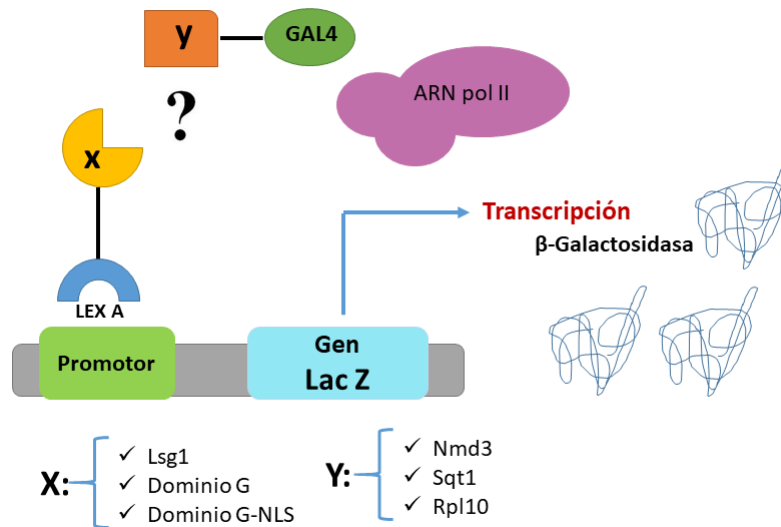


Figura 27. Sistema de doble híbrido utilizado con las proteínas de estudios.

El ensayo con los vectores pEG202 y pACT2-AD vacíos se utilizó como control negativo. Este control corresponde a la absorbancia producida por la hidrólisis espontánea del ONPG en agua, así como la ligera auto-activación producida por el péptido en el vector pEG202 que no fue interrumpido por la ausencia de inserto (Crickinge & Beyaert, 1999). Un segundo control comprendió el vector pEG202 vacío co-transformado con cada una de las construcciones presa para descartar la posible auto-activación de cada par.

En la Figura 28 se muestran los resultados de la interacción proteína-proteína evaluada mediante doble híbrido. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos factores que mostró diferencia significativa entre los datos obtenidos por cada proteína presa ensayada mientras que no hay diferencia entre el dominio G y Lsg1. Por lo cual solo se consideraron como interacciones verdaderas aquellas cuya señal se encontraba por encima de la correspondiente a ambos controles. Se encontró que solo Lsg1 o el dominio G de Lsg1 mostró interacción con la proteína Nmd3, lo que sugiere que solo estas dos proteínas presentan una interacción directa, y que el dominio de GTPasa de Lsg1 está involucrado en la interacción; sin que por ello se puedan descartar otras regiones de la proteína. La señal de unidades de β -galactosidasa fue mayor en el ensayo con el dominio de GTPasa de Lsg1 que con la proteína completa lo que sugiere una interacción más favorable con este dominio.

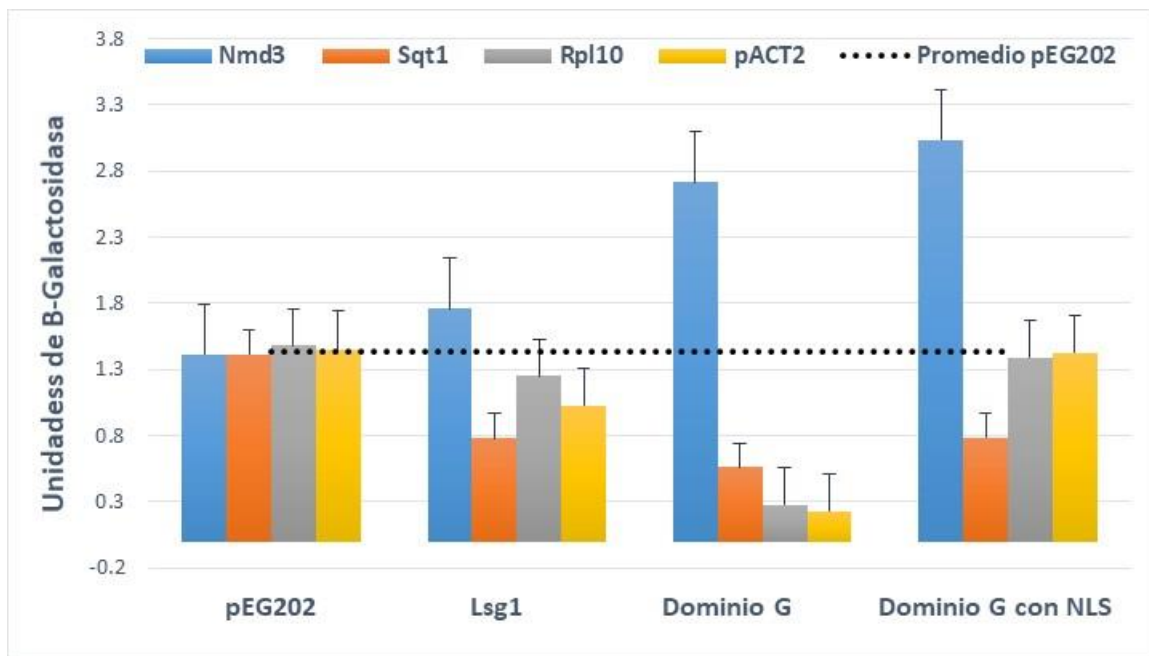


Figura 28. Ensayos de interacción mediante doble híbrido entre las proteínas Nmd3, Sqt1, Rpl10 con la proteína Lsg1 y su dominio G con y sin señal de localización nuclear (NLS).

Mientras que se observa que la señal mostrada para las interacciones con Lsg1 y el dominio GTPasa con y sin NLS con las proteínas Sqt1, Rpl10 y con el vector vacío pACT2-DA da una señal más baja con respecto a los controles. Esto se explica ya que los valores de los controles muestran la activación dada por el vector pEG202 y sin embargo en estas interacciones no se observa este efecto y solo se aprecia la interacción propia de cada sistema que es muy baja.

Por otro lado, contrario a lo que se pensaba, la adición de la señal de localización nuclear en el vector señuelo no incremento la señal obtenida de β -galactosidasa. Lo anterior sugiere que mientras se presente la interacción la señal de localización nuclear presente en el vector presa es suficiente para dirigir al complejo al núcleo. Por lo que no es necesario adicionar una segunda señal de localización nuclear para asegurar tener ambas proteínas en el sub-compartimento celular, ya que la interacción proteína-proteína ocasiona la relocalización.

7 DISCUSIÓN

Ensayos genéticos y de alta densidad han mostrado que la proteína Lsg1 es necesaria para liberación de Nmd3 quien funge como adaptador en la exportación de la subunidad pre-60S al citoplasma. En esta etapa, también participan las proteínas Rpl10 y Sqt1. Por lo anterior se planteó llevar a cabo el ensayo de doble híbrido para evaluar si las proteínas Rpl10, Sqt1 y Nmd3 interactúan con la GTPasa Lsg1 y si en específico esta interacción se lleva a cabo en el dominio G, y por ende potencialmente podrían modular su actividad.

Se realizaron las diferentes construcciones de ADN recombinante necesarias para la evaluación de las interacciones proteína-proteína mediante doble híbrido. Para ello, se utilizaron diferentes métodos de clonación que mostraron diversas ventajas y desventajas con respecto al proceso tradicional de clonación mediante restricción-ligación. La técnica de clonación T/A es un método que explota la actividad transferasa terminal de ciertas ADN polimerasa para adicionar una única adenina al extremo 3' de ADN de doble cadena independiente del molde. Mediante el uso de vectores lineales con una timina sobresaliente en el extremo 3' es posible ligar por complementariedad un fragmento de PCR con un extremo sobresaliente 3'-A y extremo 3'-T del vector de forma eficiente (Zhou, *et al.*, 2000). Lo anterior lo hace un método muy sencillo y rápido para unir fragmentos de ADN mediante el uso de ADN ligasas. Sin embargo, su principal desventaja radica en el uso de ADN polimerasas de baja fidelidad que carecen de la actividad de exonucleasa para corregir pero que debido a esto adicionan estos extremos 3'-A. El uso de estas polimerasas para la amplificación de fragmentos con tamaños de más de 2000 pb no resulta adecuado debido a la posible introducción de mutaciones puntuales. Por otro lado, la tecnología In-Fusion es un método independiente de ligación basado en el empalme de extremos complementarios presentes en el fragmento de PCR y en el vector linearizado. Su principal ventaja es la unión de uno o más fragmentos de PCR en un solo paso en un vector de interés. No tiene especificación alguna respecto a la naturaleza de la polimerasa a usar mientras esta pueda amplificar el fragmento por PCR por lo que se pueden usar ADN polimerasas de alta fidelidad. Sin embargo, es necesario sintetizar oligonucleótidos

que contengan extremos para el empalme de entre 15-20 pb, lo que resulta en oligonucleótidos de tamaño grande (al menos 40 pb) (Gibson, *et al.*, 2009). En general, el método de clonación T/A es laborioso, involucra una mayor cantidad de pasos y por ende más tiempo, además del uso de una mayor cantidad de insumos de biología molecular. Si bien, la tecnología In-Fusion requiere de la adquisición de un kit que es costoso resulta en un mayor beneficio al considerar el costo que se ahorra en tiempo y consumibles. Además, de que al involucrar menos pasos la probabilidad de fallo es menor. Por todo lo anterior, In-Fusion representa una tecnología con potencial para implementarse rutinariamente en la producción de ADN recombinante.

Antes de realizar el ensayo de interacción con las proteínas en estudio se evaluó la expresión de las proteínas híbridas por medio de la técnica de Western Blot. Una de las desventajas de los ensayos de doble híbrido se relaciona con la presencia de posibles resultados falsos negativos. Es decir, catalogar una interacción entre dos proteínas como negativa por falta de expresión y no por falta de interacción. Lo anterior debido a que en el sistema de doble híbrido las proteínas de interés se expresan como proteínas de fusión y esto podría afectar su plegamiento repercutiendo negativamente en su expresión. La detección mediante inmunoblot se realizó contra el dominio de unión a ADN de la proteína LexA con el que se fusionó a la proteína Lsg1 y se comprobó una expresión positiva.

Debido a que las proteínas se expresen de forma intra-celular se evaluó el método de lisado más adecuado para el ensayo de doble híbrido con la finalidad de liberar la mayor cantidad de la proteína. Los métodos más utilizados para la lisis celular de levadura es la ruptura por fricción usando perlas de vidrio y por choque térmico. Ambos métodos se probaron y se cuantificó la cantidad de proteína total obtenida por medio de Bradford. El método con el cual se extrajo la mayor cantidad de proteína total fue por choque térmico donde a pesar de los cambios de temperatura la proteína se conservó activa. Si bien el método de lisado con perlas de vidrio tiene por lo general mayor eficiencia con respecto a otros métodos de lisado, factores como el tratamiento previo de la muestra (congelado/descongelado) pudieron afectar la eficiencia del método. Ya que se ha reportado que muestras que han sido congeladas y descongeladas

aumentan su resistencia al lisado para este método (Milburn & Dunnill, 1994). La cantidad de proteína total obtenida mostró que la ruptura no es homogénea lo cual tiene un efecto positivo o negativo en el ensayo, según la efectividad con la que haya ocurrido la lisis. Para el cálculo de las unidades de β -galactosidas, la ecuación correspondiente considera el volumen de células utilizado y la densidad óptica del cultivo, lo anterior como una forma de correlacionar el número de células utilizadas y, por ende, la cantidad de proteína. Sin embargo, sí la lisis no es homogénea, la cantidad de células no es proporcional a la cantidad de proteína liberada y esto impacta en la señal observada. Esto aunado a otros factores como impedimentos estéricos de los complejos formados que debido a su tamaño puedan impedir la reconstitución del factor de transcripción, hacen que el ensayo de doble híbrido sea un método semi-cuantitativo.

Por otro lado, para que una interacción ocurra en los ensayos de doble híbrido y se vea reflejado en la actividad de un gen reportero, es necesario que ambas proteínas sean transportadas al núcleo. Nmd3 es una proteína citosólica que constantemente se transporta dentro y fuera del núcleo (Zemp & Kutay, 2007), mientras que Lsg1 es una proteína estrictamente citoplasmática por lo cual se probó adicionarle una señal de localización nuclear (NLS) encargada de transportarla al núcleo después de la traducción. Las proteínas Nmd3, Rpl10 y Sqt1 expresadas a partir del vector pACT2-AD se traducen fusionadas a una NLS en su N-terminal lo que les permite ser exportada al núcleo. De esta forma ambas proteínas, señuelo y presa, presentaban una señal de localización nuclear y podrían ser exportadas al núcleo de forma independiente. Sin embargo, la adición de esta señal a la proteína Lsg1 pareció no tener un efecto significativo en el ensayo, ya que las unidades de β -galactosidasa obtenidas para la interacción entre Lsg1 con y sin señal de localización nuclear y Nmd3 fueron iguales dentro del error experimental. Por lo que la presencia de la señal de localización nuclear en la proteína señuelo es suficiente para poder detectar la actividad del gen reportero si es que hay interacción entre las proteínas. Así, la interacción entre ambas proteínas es suficiente para que aquella que carece de la señal sea transporta al núcleo como parte del complejo.

Finalmente, los resultados obtenidos en el ensayo de doble híbrido mostraron que hay interacción entre el dominio G de la proteína Lsg1 y Nmd3 y que dicha interacción es significativa con respecto a los controles, mientras que las interacciones con las proteínas Rpl10 y Sqt1 no lo son. Si bien en trabajos recientes se ha obtenido información de la liberación de Nmd3 de la subunidad 60S, esta ha sido con respecto a la participación de la proteína Rpl10, donde han encontrado que compiten por el sitio cercano a la hélice 38, lo cual causa un cambio conformacional en Nmd3 que favorece su disociación del ribosoma (Kargas, *et al.*, 2019) sin embargo, el papel de Lsg1 en este proceso, así como su activación no se describe, por lo cual con los resultados obtenidos en este proyecto podemos inferir lo siguiente sobre este proceso:

- Las unidades de β -galactosidasa obtenidas de la interacción con Nmd3 fueron mayores con el dominio G lo cual nos indica que la interacción entre el adaptador y Lsg1 ocurre con su dominio GTPasa. Lo cual nos habla del probable efecto de Nmd3 sobre la actividad enzimática de Lsg1 se debe a una posible interacción entre estas dos proteínas cuando ambas se encuentran sobre la superficie de la subunidad 60S. Lo anterior concuerda con lo obtenido por Malyutin, *et al.*, 2017, donde demostraron que la actividad de GTPasa de la proteína Lsg1 es intrínsecamente baja y en presencia de la subunidad 60S y la proteína Nmd3 esta actividad aumenta significativamente.
- En el estudio de Kargas *et al.*, 2019, se ubica el sitio de unión de Lsg1 sobre la subunidad 60S, así como la de Nmd3 la cual es congruente con nuestros resultados en donde se comprueba que hay interacción física entre estas dos proteínas con el aporte de indicar el probable sitio de interacción que es el dominio G de Lsg1, en contraste, la interacción entre Lsg1 y las proteínas Sqt1 y Rpl10 fue negativa, lo cual sugiere que estas proteínas si bien se encuentran en la misma vía celular no interactúan físicamente con la GTPasa Lsg1.

8 CONCLUSIONES

En el proceso de maduración citoplasmática de la subunidad 60S un paso esencial es la liberación del adaptador Nmd3 de la subunidad 60S, en este proceso participan las proteínas Rpl10, Sqt1, pero que de acuerdo a nuestros resultados solo se observó interacción física entre las proteínas Lsg1 y Nmd3. La señal de unidades de β -galactosidasa fue mayor en el ensayo con el dominio de GTPasa de Lsg1 que con la proteína completa lo que sugiere una interacción más favorable con este dominio, sin que por ello se puedan descartar otras regiones de la proteína. Mientras que las proteínas Rpl10 y Sqt1 no interaccionan directamente con la GTPasa Lsg1.

Por otro lado, se observó que la adicción de la señal de localización nuclear en las proteínas señuelo no tiene un efecto en la señal detectada para establecer una interacción entre dos proteínas mediante la técnica de doble híbrido.

9. 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),2196–2205.
- Aquist, J., & Kamerlin, S. (2015). The conformation of a catalytic loop is central to TPase activity on the ribosome. *Biochemistry*,54(2), 546-556.
- Babler, J., Grandi, P., Gadai, O., Lebmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., Hurt, E., (2001). Identification of a 60S pre-ribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Molecular Cell*,8(3) ,517-529.
- Baserga, S. J., & Woolford, J. L. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643–681.
- Blombach, F., Brouns, S. J., & van der Oost, J. (2011). Assembling the archaeal ribosome: roles for. *Biochemical Society Transactions* , 39(1), 45-50.
- Bos, J. I., Rehnmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 129(5),865-877.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*,349(6305), 117-126.
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs,. *American Physiological Society*,93(1), 269-309.
- Clementi, N., & Polacek, N. (2010). Ribosome-associated GTPAases The role of RNA for GTPase activation. *RNA Biology*,7(5),521-527.
- Crieckinge, W. V., & Beyaert, R. (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online*,2:1-38.

- De las Rivas, J., & Fontanillo, C. (2010). Protein-protein interactions essentials: Key concepts to building and analyzing interactome network. *PLoS Comput Biol.*, 6:1-9.
- Ferro, E., & Trabalzini, L. (2013). The yeast two-hybrid and related methods as powerful tools to study plant cell signalling. *Plant Molecular Biology.*,83(4-5), 287-301.
- Fields, S. (2005). High-throughput two-hybrid analysis: The promise and the peril. *FEBS Journal.*,272(21), 5391-5399.
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*,340:245-246.
- Finch, A. J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L. F., Goyenechea, B., Menne, T. F., González, A., Simpson, P., D'Santos, C., Arends, M., Donadieu, J., Bellanné-Chantelot, C., Costanzo, M., Boone, C., McKenzie, A. N., Freund, S. M., Warren, A. J. (2011). Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes & development*, 25(9)917-929.
- Fuentes, J. L., Datta, K., Sullivan, S. M., Walker, A., Maddock, J. R. (2007). In vivo functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* 60S biogenesis GTPase Nog1. *Molecular Genetic Genomics*, 278(1)105-123.
- García-Márquez, A., Gijsbers, A., de la Mora, E., Sánchez-Puig, N., (2015). Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-like1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(29), 17669-17678.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*,6(5),343-345.

- Goto, S., Akira, M., & Himero, H. (2013). GTPases involved in bacterial ribosome maturation. *The Journal of Biochemistry*, 153(5) 403-414.
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 4(8),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*, 24(3),567-579.
- Henras, A. K., Soudet, J., G erus , M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mouglin, A., & Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*,65(15), 2334-2359.
- Irwin, C. R., Farmer, A., Willer, D. O., & Evans, D. H. (2012). In Fusion Cloning with Vaccinia virus DNA polymerase. *Methodos Molecular Biology*, 890:23-35.
- 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*, 23(12),4344-4355.
- Karbtein, K. (2007). Role of GTPases in Ribosome Assembly. *Biopolymers*,87(1),1-11.
- Kargas,V.,Castro-Hartmann,P.,Escudero-Urquijo,N.,Dent,K.,Hilcenko,C.,Sailer, C., Zisser,G., Marques-Carvalho, M.J, Pellegrino, S., Wawi orka, L., Freud, S.MV., Wagstaff, J.L., Andreeva, A., Faille, A., Chen, E., Stengel, F., Bergler, H. & Warren, A.J,(2019).Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *eLife*,8:1-26.

- Kolesnikov, V. A., Zinoviev, V. V., Yashina, L. N., Karginov, V. A., Baclonov, M. M., & Malygin, E. G. (1981). Relaxed specificity of endonuclease BamHI as determined by identification of recognition sites in SV40 and pBR322 DNAs. *FEBS Letters*, 132(1), 101-104.
- Kressler, D., Hurt E., & Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(6), 673-683.
- Kushnirov, V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16(9), 857-860.
- Kwapiszewska, R., Szezudlowska, J., Kwapiszewska, K., Chudy, M., & Brzozka, Z. (2013). Determination of acid b-galactosidase activity: Methodology and perspectives. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(1), 57-62.
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2003). Classification and Evolution of P-loop GTPases and Related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, 17(1), 41-72.
- Li, G. & Zhang, X. C. (2002). GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases. *Journal Molecular Biology*, 340(5), 1-5.
- Malyutin, A. G., Mulsalgaonkar, S., Patchett, S., & Frank, J. (2017). Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 36(7), 1-15.
- Mattnovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H., & Sauer, M. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3), 121-135.
- Méndez Godoy, A. (2015). Estudios de interacción entre las proteínas EFL1 y SDO1 mediante doble híbrido en levadura. *Facultad de Química, UNAM*, 1-52.

- Méndez-Godoy, A., Gijbers, A., & Sánchez-Puig, N. (2016). Biogénesis ribosomal y ribosomopatías. *Taller de Actualización Bioquímica* (1-25). México: Facultad de Medicina, UNAM.
- Menne, T. F., Goyenechea, B., Sánchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P.J., Brost,R.L., Constanzo,M., Boone,C.,Warren, A. J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nature Genetics*,39(4), 486-495.
- Middelberg, A. P. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*,13(3), 491-551.
- Milburn, P. T., & Dunnill, P. (1994). The release of virus-like particles from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*:Effect of freezing and thawing on homogenization and bead milling. *Biotechnology and Bioengineering*,44(6) 736-744.
- Nakhoul, H., Ke, J., Zhou, X., Liao, W., Zeng, S. X., & Lu, H. (2014). Ribosomopathies: Mechanisms of Disease. *Clinical Medicine Insights-Blood Disorders*, 7:7-16.
- Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies:human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*,115(6) 3196-3205.
- Panse, V., & Johnson, A. (2010). Maturation of Eukaryotic Ribosomes Acquisition of Functionality. *Trends in Biochemical Sciences*.,35(5), 260–266.
- Putnam, S. L., & Koch, A. L. (1975). Complications in the simplest cellular enzyme assay:lysis of *Escherichia coli* for the assay of beta-galactosidase. *Analytical Biochemistry*, 63:350-360.
- Reynaud, E. G., Andrade , M. A., Bonneau, F., Ly,T.B., Knop,M., Scheffzek,K.,Pepperkok, R., (2005). Human Lsg1 defines a family of essential

GTPases that correlates with the evolution of compartmentalization. *BMC Biology*, 3-14.

- Saveanu , C., Bienveno, D., Namane, A., Gleizes, P. E., Gas, N., Jacquier, A., & Fromont-Racine, M. (2001). Nog2 a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *The EMBO Journal*, 20(22),6475-6484.
- Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttecher, B., Aebi, U., & Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*, 441(7093),651-655.
- Senger , B., Lafontaine, D. L., Graindorge, J. S., Gadai, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J. M., Breitenbach, M., Hurt, E., Fasiolo, F. (2001). The nucleolar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Molecular Cell*, 8(6), 1363-1373.
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 126: 4815-4821.
- Tschochner, H., & Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biology*, 13(5), 255-263.
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The Guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545),1299-1304.
- Vidalain, P. O., Boxem, M., Ge, H., Li, S., & Vidal, M. (2004). Increasing specificity in highthroughput yeast two-hybrid experiments. *Methods*, 32(4),636-370.
- Von der Haar, T. (2007). Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeast. *Plos one*, 2(10),1-8.

- Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., & Ramakrishnan, V. (2010). The Mechanism for Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Science*, 330:835-838.
- Wegierski, T., Billy, E., Nasr, F., & Filipowicz, W. (2001). Bm1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *RNA*, 7(9), 1254-1267. 61
- Wei, H., Therrien, C., Blanchard, A., Guan, S., & Zhu, Z. (2008). The fidelity index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 36(9), 1-10.
- West, M., Hedges, J. B., Chen, A., & Johnson, A. W. (2005). Defining the order in which Nmd3 and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), 3802-3818.
- Westermarck, J., Ivaska, J., & Corthals, G. L. (2013). Identification of protein interactions involved in cellular signaling. *Molecular Cell Proteomics*, 12(7), 1752-1763.
- Wittinghofer, A., & Vetter, I. R. (2011). Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *The Annual Review of Biochemistry*, 80:943-971.
- Yelick, P. C., & Trainor, P. A. (2015). Ribosomopathies: Global process, tissue specific defects. *Rare Diseases*, 3(1), 1-11.
- Zemp, I., & Kutay, U. (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Letters*, 581(15), 2783-2793.
- Zhou, M. Y., & Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current Issues in Molecular Biology*, 2(1), 1-7.

10. ANEXOS

10.1- Ribosomopatías

La disfunción ribosómica dada por alteraciones en el proceso de ensamblaje ribosomal, en su estructura o su función (Yelick & Trainor, 2015), puede causar una amplia gama de signos y síntomas, e incluso la presentación y gravedad pueden diferir dramáticamente incluso entre pacientes con el mismo diagnóstico (Nakhoul, *et al.*, 2014). Dentro de las principales características clínicas de las ribosomopatías se encuentran fallas en la médula ósea, anomalías óseas y un mayor riesgo de desarrollar cáncer (ver Tabla 20) (Méndez-Godoy, *et al.*, 2016).

Tabla 20. Algunas ribosomopatías y sus principales características.

Enfermedad	Manifestaciones clínicas	Gen(es) mutado	Función en la biogénesis ribosomal
Autosómica dominante			
Anemia de Blackfan-Diamond	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia • Crecimiento retardado • Anormalidades congénitas 	RPS19, RPS24, RPS26 (≈15 proteínas estructurales)	Proteína estructural del ribosoma
Síndrome de Treacher-Collins	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Retraso psicomotor y mental ✓ Anormalidades craneofaciales 	TCOF1	Transcripción de los ARNr
Autosómica recesiva			
Síndrome de Shwachman-Diamond	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia pancreática exocrina • Anormalidades esqueléticas • Falla medular • Neutropenia 	SBDS	Remoción de eIF6 de la subunidad 60S
Síndrome de Bowen-Conradi	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Retraso severo en el crecimiento ✓ Microcefalia ✓ Mandíbula pequeña ✓ Retraso psicomotor 	EMG1	Metilación específica de una pseudouridina en el ARNr 18S
Hipoplasia cartilago-cabello	<ul style="list-style-type: none"> • Baja estatura • Cabello escaso • Deformaciones óseas 	RMRP	Procesamiento del pre-ARNr
Cirrosis infantil en niños indios norteamericanos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cirrosis biliar ✓ Hipertensión portal 	CIRH1A	Procesamiento del pre-ARNr
Recesiva ligada al cromosoma X			
Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X	<ul style="list-style-type: none"> • Pigmentación anormal de la piel • Distrofia en uñas • Falla medular • Baja estatura 	DKC1	Pseudouridin-sintasa
Esporádica			
Síndrome 5q-	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Anemia macrocítica 	RPS14	Proteína estructural del ribosomal

10.2 Genotipos

Tabla 21. Genotipo de los microorganismos empleados.

Cepa	Genotipo relevante
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ <i>endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> Δ(<i>lac</i>)X74 φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Str ^R λ ⁻
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CTY10-5D	<i>MATa ade2 trp1-901 leu2-3,112 his3-200 gal4</i> <i>URA3::lexA-lacZ</i>

10.3 Oligonucleótidos

Oligonucleótidos empleados para amplificar las secuencias codificantes de las proteínas de interés en este proyecto.

Tabla 22, Oligonucleótidos de la proteína Lsg1 y su dominio G con y sin señal NLS.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Sitio de restricción
Lsg1-F	CGCGGATCCGGATGCCACCAAAAGAAGCTCCC	<i>Bam</i> HI
Lsg1-R	CCGCTCGAGCTAATTATTTTCAATGCTAAAACTTTGCTTTTCGC	<i>Xho</i> I
Lsg1-NLS-R	CCGCTCGAGTTACACCTTTCTCTTTTTCTTGGGGGCCAAATTATT TTCAATGCTAAAACTTTGCTTTTC	<i>Xho</i> I
Lsg1-GTPase-F	CGCGGATCCTAGAAGTTTGGAAACAGTTATGGAGAGTTG	<i>Bam</i> HI
Lsg1-GTPase-R	CCGCTCGAGTTATGCTGGACCAATATAATCACGTAATTG	<i>Xho</i> I
Lsg1-GTPase-NLS-R	CCGCTCGAGTTACACCTTTCTCTTTTTCTTGGGGGCCAATGCTGG ACCAATATAATCACGTAATTG	<i>Xho</i> I

Tabla 23. Oligonucleótidos de la proteína Nmd3, Sqt1 y Rpl10.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Sitio de restricción
Nmd3-F	CATGCCATGGAATTCACACCTATAGATCCGCACC	<i>Nco</i> I
Nmd3-R	CCGCTCGAGTTACTGCTGAGATTC AACGGGTGTG	<i>Xho</i> I
Sqt1-F	CGCGGATCCGTATGGAACCTCAAGAAGAGTTTATAAC	<i>Bam</i> HI
Sqt1-R	CCGCTCGAGTCAGTTTGGTACCTCGAACACCAG	<i>Xho</i> I
Rpl10-F	CGCGGATCCGTATGGCTAGAAGACCAGCTAGATG	<i>Bam</i> HI
Rpl10-R	AGACATCTCTCGAGTTAAGCTTGAGCAGCAAAGTATTCTGG	<i>Xho</i> I

Tabla 24. Oligonucleótidos de la proteína Nmd3 y Rpl10 para clonar por el método de clonación In-Fusion®.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Sitio de restricción
Nmd3-Fg	CTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAATTCACACCTATAGATC CGCA	<i>NcoI</i>
Nmd3-Rg	CAGTATCTACGATTCATAGATCTCTCGAGTTACTGCTGAGATTCA ACGGGTGTG	<i>XhoI</i>
Lsg1-NLS-Fg	GACTGGCTGGAATTCCTCGGGGATCCGGATGCCACCAAAGAAGCT CCC	<i>BamHI</i>
Lsg1-NLS-Rg	GTATCTACGATTCATAGATCTCTCGAGTTACTGCTGAGATTCAAC GGGTGTG	<i>XhoI</i>

10.4 Plásmidos

Tabla 25 Características del vector de expresión pEG202.

Tamaño	Marcador de selección bacteriano	Marcador de selección en levadura	Característica: Doble híbrido
10,166 pb	Resistencia a ampicilina	Complementación de la auxotrofia a histidina	Expresa a la proteína de interés fusionada en su extremo N-terminal al dominio de unión a DNA del represor bacteriano LexA

Tabla 26. Características del vector de expresión pACT2 AD.

Tamaño	Marcador de selección bacteriano	Marcador de selección en levadura	Característica: Doble híbrido
8,117 pb	Resistencia a ampicilina	Complementación de la auxotrofia a leucina	Expresa a la proteína de interés fusionada en su extremo N-terminal al dominio de activación del factor transcripcional Gal4 así como a una señal de localización nuclear (NLS)

10.5 Secuenciación

Todas las construcciones obtenidas, fueron secuenciadas por la empresa GenScript y el análisis de las secuencias se realizó de la siguiente manera:

- Las secuencias obtenidas con el oligonucleótido en sentido o forward se alinearon con la secuencia reportada en el NCBI para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* S288C, posteriormente se buscó el marco de lectura y se compararon
- Mientras que para las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos en contrasentido o reverse, previamente obtuvo su secuencia anti paralela (reversa y complementaria) y posteriormente se alinearon con la secuencia reportada en el NCBI para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* S288C.

A continuación, se muestran los alineamientos de la secuencia teórica con la obtenida de la fracción que incluye el sitio de restricción de las enzimas utilizadas en el sitio 5' con el inicio de cada gen, así como el electroferograma de esa misma región.

Sqt1-pGEM-T-Easy

- Sitio de restricción de la enzima *Bam*HI: **ggATCC**
- Inicio de la secuencia de Sqt1: **ATGGGAA**

			G R I G P D V A C S R P P W R P R	
Secuencia teórica	-----	GGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGG		51
Secuencia obtenida		ATCATATAGGGCG-ATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGG		59
		I I * G R L G P T S H A P G R H G G R G		
		E F D S R I R M E P Q E E F I T T E E V		
Seq_1	52	GAATTCGATtCg ggATCC g TATGGAACCTCAAGAAGAGTTTATAACTACCGAAGAAGTT		111
Seq_2	60	GAATTCGAT--GCGGATCCGTATGGAACCTCAAGAAGAGTTTATAACTACCGAAGAAGTT		117
		N S M R I R M E P Q E E F I T T E E V		
		E Q E I V P T V E V E Q D V P V D I E G		
Seq_1	112	GAGCAGGAGATTGTGCCCACTGTGGAGGTCGAACAAGACGTTCCCGTTGATATTGAAGGA		171
Seq_2	118	GAGCAGGAGATTGTGCCCACTGTGGAGGTCGAACAAGACGTTCCCGTTGATATTGAAGGA		177
		E Q E I V P T V E V E Q D V P V D I E G		
		E N D D D D E M M N D D E E A L E V D M		
Seq_1	172	GAGAATGACGACGATGATGAAATGATGAATGATGATGAGGAAGCTTTGGAGGTCGACATG		231
Seq_2	178	GAGAATGACGACGATGATGAAATGATGAATGATGATGAGGAAGCTTTGGAGGTCGACATG		237
		E N D D D D E M M N D D E E A L E V D M		

```

Seq_1 232 S N N S L T Y F D K H T D S V F A I G H
TCCAACAACCTCGCTTACCTATTTTCGATAAGCACACAGACTCCGTGTTTGCCATTGGCCAT 291
Seq_2 238 TCCAACAACCTCGCTTACCTATTTTCGATAAGCACACAGACTCCGTGTTTGCCATTGGCCAT 297
S N N S L T Y F D K H T D S V F A I G H

Seq_1 292 H P N L P L V C T G G G D N L A H L W T
CATCCTAACCTGCCGCTAGTATGTACCGGTGGGGGTGATAACTTGGCACATCTTTGGACA 351
Seq_2 298 H P N L P L V C T G G G D N L A H L W T
CATCCTAACCTGCCGCTAGTATGTACCGGTGGGGGTGATAACTTGGCACATCTTTGGACA 357
H P N L P L V C T G G G D N L A H L W TKKKKKKKKK

```

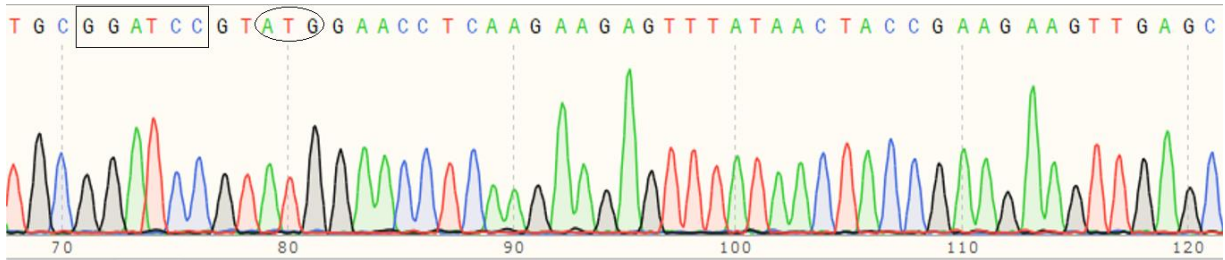


Figura 29. Electroferograma de la secuencia de la proteína Sqt1

Lsg1-pGEM-T-Easy

- Sitio de restricción de la enzima *Bam*HI: **ggATCC**
- Inicio de la secuencia de Lsg1: **ATGCCA...**

```

          G R I G P D V A C S R P P W R P
Secuencia teórica -----GGGCGAATT-GGGCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCC 47
          || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Secuencia obtenida GGCCTATGGGGGGCGGAATTGGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCC 60
          P Y G G A E L G P D V A C S R P P W R P

Seq_1 48 R E F D S R I R M P P K E A P K K W K A
GCGGGAATTTCGATtCGCGGATCCGATGCCACCAAAGAAGCTCCCAAGAAATGGAAGGC 107
Seq_2 61 GCGGGAATTTCGATTCGCGGATCCGATGCCACCAAAGAAGCTCCCAAGAAATGGAAGGC 120
R E F D S R I R M P P K E A P K K W K A

Seq_1 108 P K G P K P T H R K N K N K L E L G R A
GCCAAAAGGCCAAAACCTACCCACCGTAAAAATAAAAATAAGCTTGAATTAGGCAGAGC 167
Seq_2 121 P K G P K P T H R K N K N K L E L G R A
GCCAAAAGGCCAAAACCTACCCACCGTAAAAATAAAAATAAGCTTGAATTAGGCAGAGC 180
P K G P K P T H R K N K N K L E L G R A

Seq_1 168 I K Y A R Q K E N A I E Y L P D G E M R
TATTAATATGCACGTCAAAAAGAAAATGCCATCGAGTATTTACCTGATGGTGAAATGAG 227
Seq_2 181 I K Y A R Q K E N A I E Y L P D G E M R
TATTAATATGCACGTCAAAAAGAAAATGCCATCGAGTATTTACCTGATGGCGAAATGAG 240
I K Y A R Q K E N A I E Y L P D G E M R

Seq_1 228 F T T D K H E A N W V K L R S V T Q E S
GTTCACTACCGATAAGCATGAGGCCAACTGGGTTAAATTAAGATCTGTAACCTCAAGAATC 287
Seq_2 241 F T T D K H E A N W V K L R S V T Q E S
GTTCACTACCGATAAGCATGAGGCCAACTGGGTTAAATTAAGATCTGTAACCTCAAGAATC 300
F T T D K H E A N W V K L R S V T Q E S

```

```

A L D E F L S T A A L A D K D F T A D R
Seq_1 288 AGCTTTAGATGAATTCTTGAGTACAGCTGCACTGGCAGACAAAGATTTACGGCCGATAG 347
|
|
|
Seq_2 301 AGCTTTAGATGAATTCTTGAGTACAGCTGCACTGGCAGACAAAGATTTACGGCCGATAG 360
A L D E F L S T A A L A D K D F T A D R

```

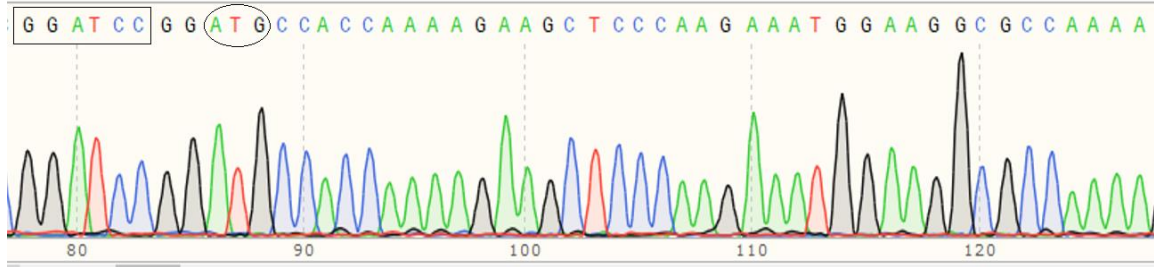


Figura 20. Electroferograma de la secuencia de la proteína Lsg1.

Lsg1-GTP-pGEM-T-Easy

- Sitio de restricción de la enzima *Bam*HI: **ggATCC**
- Inicio de la secuencia de Lsg1-GTP: **ATGCCA...**

```

Secuencia teórica ----- 0
CGGATCATATGGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCG 60
Secuencia obtenida G S Y G A I G P D V A C S R P P W R P R
-----
R I L E V W K Q L W R V V E R S
Seq_1 1 -----CgCggATCCTAGAAGTTTGGAAACAGTTATGGAGAGTTGTTGAAAGATC 49
|
|
|
Seq_2 61 GGAATTCGATTGCGGGATCCTAGAAGTTTGGAAACAGTTATGGAGAGTTGTTGAAAGATC 120
E F D S R I L E V W K Q L W R V V E R S
-----
D L V V Q I V D A R N P L L F R S V D L
Seq_1 50 AGATTTAGTTGTTCAAATGTAGATGCGAGGAATCCGTTGCTGTTTAGATCTGTGCGATTT 109
|
|
|
Seq_2 121 AGATTTAGTTGTTCAAATGTAGATGCGAGGAATCCGTTGCTGTTTAGATCTGTGCGATTT 180
D L V V Q I V D A R N P L L F R S V D L
-----
E R Y V K E S D D R K A N L L V N K A
Seq_1 110 AGAAAGATATGTAAGAGAGTCAGATGACAGAAAAGCAAACCTACTGCTAGTTAATAAAGC 169
|
|
|
Seq_2 181 AGAAAGATATGTAAGAGAGTCAGATAACAGAAAAGCAAACCTACTGCTAGTTAATAAAGC 240
E R Y V K E S D N R K A N L L V N K A
-----
D L L T K K Q R I A W A K Y F I S K N I
Seq_1 170 AGATTTATTGACCAAAAAGCAACGTATCGCTTGGGCAAAGTACTTTATCTCCAAGAATAT 229
|
|
|
Seq_2 241 AGATTTATTGACCAAAAAGCAACGTATCGCTTGGGCAAAGTACTTTATCTCCAAGAATAT 300
D L L T K K Q R I A W A K Y F I S K N I
-----
S F T F Y S A L R A N Q L L E K Q K E M
Seq_1 230 TTCGTTACGTTTTTACTCTGCATTGAGAGCTAATCAATTATTGGAGAAAACAAAAGGAAAT 289
|
|
|
Seq_2 301 TTCGTTACGTTTTTACTCTGCATTGAGAGCTAATCAATTATTGGAGAAAACAAAAGGAAAT 360
S F T F Y S A L R A N Q L L E K Q K E M

```

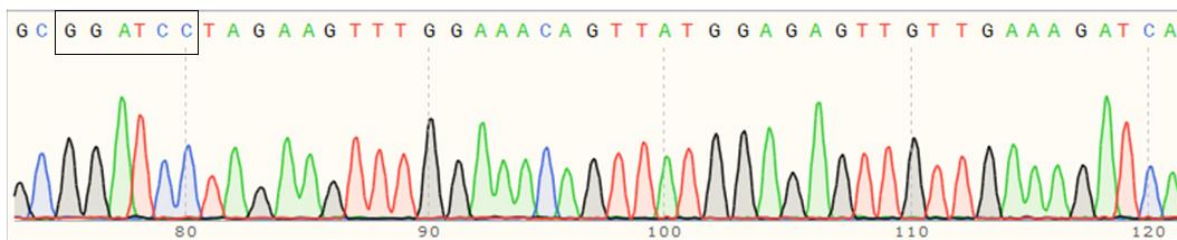


Figura 31. Electroferograma de la secuencia del dominio G de la proteína Lsg1.

Lsg1-GTP-NLS-pGEM-T-Easy

- Sitio de restricción de la enzima *Xho*I: **CTCGAG**
- Final de la secuencia de Lsg1-GTP-NLS: **AATGTAGGTAAA**
- Secuencia de la señal de localización nuclear (NLS): **ttggccccaag**
- Codón de paro: **TAA**

Secuencia teórica	N V G K S S T I N S L V G A K K V S V S	
	AATGTAGGTAAATCCTCCACTATTAATTCGCTCGTGGGTGCCAAGAAAGTTTCTGTTTCA	551
Secuencia obtenida	AATGTAGGTAAATCCTCCACTATTAATTCGCTCGTGGGTGCCAAGAAAGTTTCTGTTTCA	317
Seq_1	S T P G K T K H F Q T I K L S D S V M L	
552	TCCACGCCTGGTAAAACAAAACACTTCCAAACTATTAAGTTATCTGATTCTGTCTATGCTT	611
Seq_2	TCCACGCCTGGTAAAACAAAACACTTCCAAACTATTAAGTTATCTGATTCTGTCTATGCTT	257
Seq_1	C D C P G L V F P N F A Y N K G E L V C	
612	TGTGACTGTCCCGGTCTTGTCTTCCCAAACCTTTGCATATAACAAGGGTGAGCTCGTGTGT	671
Seq_2	TGTGACTGTCCCGGTCTTGTCTTCCCAAACCTTTGCATATAACAAGGGTGAGCTCGTGTGT	197
Seq_1	N G V L P I D Q L R D Y I G P A L A P K	
672	AATGGTGTTTTACCTATTGATCAATTACGTGATTATATTTGGTCCAGCA ttggccccaag	731
Seq_2	AATGGTGTTTTACCTATTGATCAATTACGTGATTATATTTGGTCCAGCATTGGCCCCAAG	137
Seq_1	K K R K V * L E R	
732	aaaaagagaaagggtTAACTCGAG CGG-----	758
Seq_2	AAAAAGAGAAAGGTGTAACCTCGAGCGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTC	77

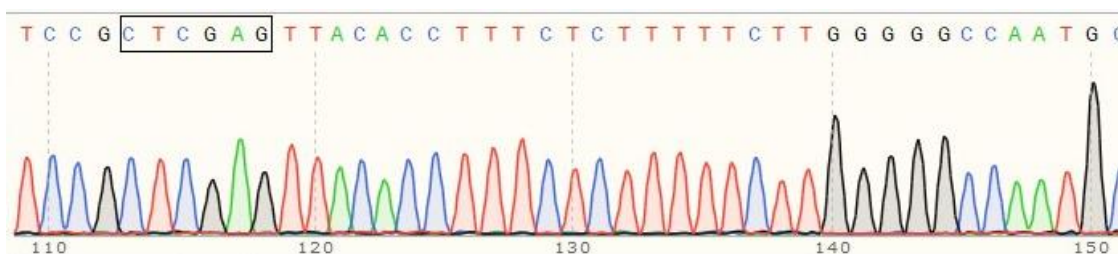


Figura 32. Electroferograma de la secuencia final del NLS del dominio G de la proteína Lsg1

Rpl10- pGEM-T-Easy

- Sitio de restricción de la enzima *Bam*HI: **ggATCC**
- Inicio de la secuencia de Lsg1-GTP: **ATGGCTAGA...**

		R I R M A R R P A R C Y R Y Q K	
Secuencia teórica	-----	gc ggatcc gt ATGGCTAGAAGACCAGCTAGATGTTACAGATACCAA	48
Secuencia obtenida		GCGGGAATTTCGATGCGGATCCGTATGGCTAGAAGACCAGCTAGATGTTACAGATACCAA	120
		G N S M R I R M A R R P A R C Y R Y Q K	
		N K P Y P K S R Y N R A V P D S K I R I	
Seq_1	49	AGAACAAGCCTTACCCAAAGTCTAGATACAACAGAGCTGTTCCAGACTCCAAGATCAGAA	108
Seq_2	121	AGAACAAGCCTTACCCAAAGTCTAGATACAACAGAGCTGTTCCAGACTCCAAGATCAGAA	180
		N K P Y P K S R Y N R A V P D S K I R I	
		Y D L G K K K A T V D E F P L C V H L V	
Seq_1	109	TCTACGATTTGGGTAAGAAGAAGGCTACCGTCGATGAATTCCCATTTGTGTCCATTTGG	168
Seq_2	181	TCTACGATTTGGGTAAGAAGAAGGCTACCGTCGATGAATTCCCATTTGTGTCCATTTGG	240
		Y D L G K K K A T V D E F P L C V H L V	
		S N E L E Q L S S E A L E A A R I C A N	
Seq_1	169	TTTCCAACGAATTGGAACAATTGTCTTCTGAAGCTTTGGAAGCTGCTCGTATCTGTGCCA	228
Seq_2	241	TTTCCAACGAATTGGAACAATTGTCTTCTGAAGCTTTGGAAGCTGCTCGTATCTGTGCCA	300
		S N E L E Q L S S E A L E A A R I C A N	
		K Y M T T V S G R D A F H L R V R V H P	
Seq_1	229	ACAAGTACATGACTACTGTCTCCGGTAGAGATGCTTTCCTTAAGAGTCAGAGTCCATC	288
Seq_2	301	ACAAGTACATGACTACTGTCTCCGGTAGAGATGCTTTCCTTAAGAGTCAGAGTCCATC	360
		K Y M T T V S G R D A F H L R V R V H P	
		F H V L R I N K M L S C A G A D R L Q Q	
Seq_1	289	CTTTCCATGTCTTGAGAATCAACAAGATGTTGTCTTGTGCCGGTGCGGATAGATTGCAAC	348
Seq_2	361	CTTTCCATGTCTTGAGAATCAACAAGATGTTGTCTTGTGCCGGTGCGGATAGATTGCAAC	420
		F H V L R I N K M L S C A G A D R L Q Q	

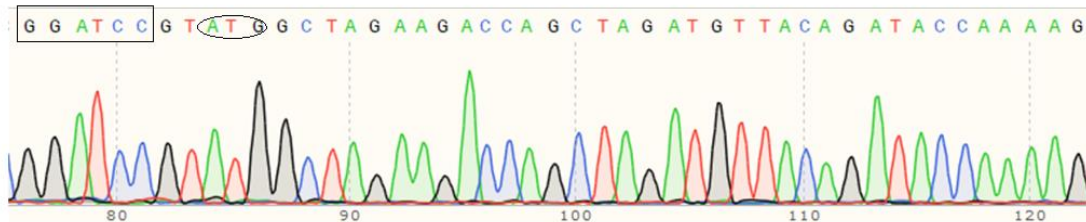


Figura 33 . Electroferograma de la secuencia de la proteína Rpl10

Nmd3-pACT2/AD

- Sitio de restricción de la enzima NcoI: **CCATGG**
- Inicio de la secuencia de Nmd3: **AATT...**

Secuencia teórica		H		A M E F	
		-----CAT-----		g CCATGG AATT	14
Secuencia obtenida		GGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGGAATT			120
		A Y P Y D V P D Y A S L G G H M A M E F			
		T P I D P H Q H Q N A A T L L C C N C G			
Seq_1	15	CACACCTATAGATCCGCACCAGCACCAAAATGCTGCTACTCTTCTATGTTGTAACCTGTGG			74
Seq_2	121	CACACCTATAGATCCGCACCAGCACCAAAATGCTGCTACTCTTCTATGTTGTAACCTGTGG			180
		T P I D P H Q H Q N A A T L L C C N C G			
		T P I D G S T G L V M C Y D C I K L T V			
Seq_1	75	TACCCCAATCGATGGGTCCACTGGGCTGGTTATGTGTTATGACTGTATCAAACCTGACTGT			134
Seq_2	181	TACCCCAATCGATGGGTCCACTGGGCTGGTTATGTGTTATGACTGTATCAAACCTGACTGT			240
		T P I D G S T G L V M C Y D C I K L T V			
		D I T Q G I P R E A N I S F C R N C E R			
Seq_1	135	GGACATTACTCAAGGTATTCCAAGAGAAGCGAACATTTCATTTTGCAGAACTGTGAAAG			194
Seq_2	241	GGACATTACTCAAGGTATTCCAAGAGAAGCGAACATTTCATTTTGCAGAACTGTGAAAG			300
		D I T Q G I P R E A N I S F C R N C E R			

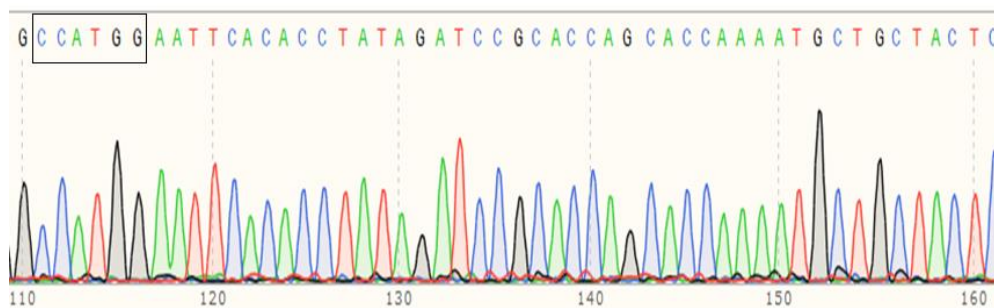


Figura 34. Electroferograma de la secuencia de la proteína Nmd3

10.6 Análisis de varianza

Se realizó el análisis de varianza de los datos obtenidos utilizando un análisis de varianza de dos factores. En la tabla x se muestran el promedio de los datos utilizados para el ANOVA, así como en la tabla xx se puede observar el resultado del análisis de varianza.

Tabla 27. Datos de unidades de β -galactosidasa del ensayo de doble híbrido

	pEG202	LSG1	DomG	DomG NLS
Nmd3	1.415	1.759	2.713	3.033
Sqt1	1.413	0.781	0.56	0.786
Rpl10	1.48	1.25	0.281	1.34
pACT2/AD	1.454	1.026	0.229	1.427

Tabla 28. Análisis de varianza de dos factores.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	6.2129	3	2.0709	9.2705	0.0114	4.7571
Columnas	1.0047	2	0.5024	2.2488	0.1867	5.1433
Error	1.3404	6	0.2234			
Total	8.5580	11				