



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SAN LUIS POTOSÍ  
Instituto de Física



# **Utilización de proteínas de fusión en el estudio de la localización subcelular de la GTPasa Parcs/Gpn3**

Proyecto de Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Física)

Presenta

**Letty Leslie Ann Salas Estrada**

Septiembre 2012

*A mis papás y a mi hermana,  
quienes me enseñaron que tengo derecho  
al bovarismo y también a saltarme páginas.*

## Agradecimientos

Al Dr. Roberto Sánchez Olea y a la Dra. Mónica Calera Medina por el apoyo y la confianza que me proporcionaron durante la realización de este proyecto. Su paciencia y motivación me condujeron en momentos de angustiante incertidumbre.

A mis papás y a mi hermana, que jamás han objetado profusamente ninguno de mis intentos imprecisos por categorizar eso que no tiene nombre.

A Angélica Robledo y a mis compañeros de laboratorio –Humberto, Adán, Sergio, Moisés, Ana, Gris, Gema, Gehenna, Carlos, Rogelio, Alberto, Jorge, Bárbara, Bere, Mayra, Esmeralda y Karely– que me brindaron consejos valiosos en cada oportunidad e hicieron de estos meses una experiencia muy agradable.

A Griselda Peña por la construcción hGpn3-Ha-pMSCVpuro y la versión doble mutante de hGpn3-EYFP (*hGpn3-MUT-K181A, K182A, K209A, K210A*).

A mis profesores de licenciatura y maestría, por su interés y orientación; así como a la generación que me acompañó durante estas etapas, cuya amistad sempiterna me mostró una versión diferente de las cosas.

Al Dr. Bulmaro Cisneros por proporcionarnos las construcciones ptetraEGFP, ptetraEGFP-NLS-SV40 y ds-Red-RANQ69L.

Y, finalmente, a los apoyos económicos *Proyecto de Ciencia Básica CONACyT No. 83751* y *Fondo de Recursos Concurrentes de la UASLP No. C11-FRC-09-39-39*, extendidos al Dr. Roberto Sánchez Olea; y los apoyos *Proyecto de Ciencia Básica CONACyT No. 106139* y *Fondo de Recursos Concurrentes de la UASLP No. C11-FRC-09-25-25*, otorgados a la Dr. Mónica Calera Medina.

## Resumen

La ARN polimerasa II (ARNP II), un complejo enzimático de 12 subunidades polipeptídicas, se encarga de transcribir los genes que codifican para proteínas en el núcleo de las células eucariontes; sin embargo, el mecanismo mediante el cual la ARNP II es transportada al interior del núcleo en células de mamífero, aún es desconocido. Recientemente se demostró que Parcs/Gpn3, una pequeña GTPasa de la familia de proteínas GPN, es requerida para la acumulación nuclear de la ARN polimerasa II [8]. En el presente trabajo, se consideró la posibilidad de que Parcs/Gpn3 pudiese estar involucrada de forma directa en la importación nuclear de la ARNP II y se buscó identificar una señal de localización nuclear (NLS) funcional en Parcs/Gpn3 de *Homo sapiens*, hGpn3. Para tal efecto, se analizó la secuencia primaria de la proteína por inspección visual y, mediante servidores de predicción, se encontraron cuatro regiones de aminoácidos que se ajustan a NLS consenso; las cuales se introdujeron en el sitio de clonación múltiple del vector ptetraEGFP. Las construcciones moleculares resultantes se transfectoron en células HEK 293T/17 y su localización subcelular fue determinada por medio de microscopía de fluorescencia. Dos secuencias monopartitas y una bipartita en hGpn3 fueron suficientes para dirigir el transporte nuclear de la proteína reportera tetraEGFP al núcleo de las células. Por otro lado, mutaciones puntuales en los residuos básicos que conforman a estas tres posibles señales de localización nuclear en el contexto del polipéptido híbrido hGpn3-EYFP no tuvieron ningún efecto sobre su distribución. La perturbación de la vía de transporte activo entre el núcleo y el citoplasma mediante una versión mutante dominante negativa de Ran, RanQ69L, que es incapaz de hidrolizar GTP y que además inhibe el funcionamiento de la proteína endógena, sugirió que hGpn3-EYFP se localiza en el núcleo pero no lo hace por transporte activo. De forma paralela, se observó que la co-transfección de hGpn3-EYFP y mXab1/Gpn1 ocasiona la acumulación citosólica de la primera y se planteó la posibilidad de que Gpn1 lleve a cabo alguna función intracelular que promueva la retención citoplásmica de hGpn3-EYFP, la cual se ve sobrepasada por niveles altos en la expresión del polipéptido híbrido generados por la transfección transitoria. Con el fin de constatar esta idea, se desarrolló una línea celular que expresa establemente a hGpn3-EYFP; en este sistema, la proteína se encuentra exclusivamente en el citoplasma y parece presentar una distribución localizada, como agregados perinucleares. La semejanza de este arreglo con el de otras proteínas que están involucradas en la vía secretoria como  $\beta$ -COP, adaptina  $\delta$  y ERGIC 53, abre una nueva interrogante en cuanto a la posible participación de hGpn3 en esta ruta. Durante el desarrollo de este proyecto, se examinaron algunos escenarios plausibles que contemplan esta probabilidad; se realizaron diversos tratamientos con fármacos dirigidos y se desarrolló una nueva línea celular que expresa establemente a la proteína hGpn3-Ha, con el fin de contrastar la localización subcelular del polipéptido híbrido hGpn3-EYFP con aquella de una proteína que posee un marcador molecular más pequeño, como es el caso de Ha, y niveles de expresión más parecidos a los del polipéptido endógeno.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades de la GTPasa Gpn3	1
1.1.1. Parcs/Gpn3 es esencial para la proliferación de células de mamífero	2
1.2. Existe una interacción física entre Parcs/Gpn3 y la ARN polimerasa II	3
1.2.1. La inhibición del ortólogo de Parcs/Gpn3 en levadura tiene un efecto similar al del silenciamiento de una subunidad de ARNP II	4
1.2.2. La actividad de transcripción disminuye al inhibir la expresión de Parcs/Gpn3 en células MCF-12A y MDA-MB-648	5
1.2.3. Parcs/Gpn3 es requerida para la acumulación nuclear de la ARN polimerasa II	6
1.3. Mecanismos de transporte nuclear	7
1.3.1. Estructura y características de los complejos de poro nuclear	7
1.3.2. El transporte activo es mediado por la GTPasa Ran y un gradiente de GTP/GDP	9
1.3.3. Factores de transporte núcleo-citoplásmico	10
1.3.4. Señales de localización nuclear	11
<b>2. Objetivos y justificación</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivo general	14
2.1.1. Objetivos particulares	14
2.2. Justificación	15
<b>3. Metodología experimental</b>	<b>16</b>
3.1. Identificación de señales de localización nuclear probables en hGpn3	16
3.2. Evaluación de la condición <i>suficiente</i>	17
3.2.1. Construcciones moleculares	17
3.2.1.1. Sistema reportero ptetraEGFP	17
3.2.1.2. Diseño de oligonucleótidos	18
3.2.1.3. Apareamiento de oligonucleótidos	20
3.2.1.4. Reacción de restricción	20
3.2.1.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	21
3.2.1.6. Reacción de ligación	23
3.2.1.7. Transformación de bacterias competentes	24
3.2.1.8. Reacción en cadena de la polimerasa	25
3.2.1.9. Extracción y cuantificación de ADN	28
3.2.2. Cultivo celular	28
3.2.2.1. Protocolo de resiembra	28
3.2.2.2. Transfección transitoria de células HEK293 T/17 por fosfato de calcio	29
3.2.3. Microscopía de fluorescencia	31
3.3. Evaluación de la condición <i>necesaria</i>	31
3.3.1. Mutagénesis sitio-dirigida usando PCR	31
3.4. Perturbación de la ruta de importación nuclear	34
3.5. Creación de líneas celulares estables en células MCF-12A por transducción	35
3.5.1. Transducción	35
3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	39
3.5.3. Western blot	41
3.5.4. Tratamiento con leptomicina B, nocodazol, brefeldina A, lectina AB y timidina	42
3.5.5. Inmunofluorescencia	44

<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>46</b>
4.1. Identificación de cuatro posibles señales de localización nuclear en hGpn3 . . . . .	46
4.2. Clonación del ADN que codifica para cuatro posibles NLS identificadas en hGpn3 en el vector ptetraEGFP . . . . .	48
4.3. Ensayo de efectividad de la PCR para los productos de ligación en el vector ptetraEGFP . . . . .	48
4.4. Dos secuencias monopartitas y una bipartita en hGpn3 son suficientes para dirigir el transporte de un reportero originalmente citoplásmico al núcleo celular . . . . .	49
4.5. Mutaciones en las secuencias identificadas como posibles NLS en hGpn3 no tienen efecto sobre la localización subcelular de hGpn3-EYFP . . . . .	51
4.6. La proteína fusión hGpn3-EYFP entra al núcleo de las células por difusión pasiva . . .	52
4.7. Un gradiente de mXab1/Gpn1 provoca la acumulación citoplásmica de hGpn3-EYFP.	54
4.8. La localización subcelular de hGpn3-EYFP expresada desde un plásmido es diferente a la de la proteína expresada desde un vector retroviral . . . . .	55
4.9. hGpn3 podría estar involucrada en la vía secretoria . . . . .	57
<b>5. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>60</b>
5.1. Conclusiones . . . . .	60
5.2. Perspectivas . . . . .	61
<b>6. Fuentes consultadas</b>	<b>63</b>

# Índice de figuras

## 1. Introducción

Figura 1-1. Alineamiento de las proteínas Gpn1, Gpn2 y Gpn3 de humano . . . . .	2
Figura 1-2. Parcs/Gpn3 es esencial para la proliferación de la línea celular MCF-12A . . . . .	2
Figura 1-3. La ARN polimerasa II co-inmunoprecipita con Parcs/Gpn3 . . . . .	3
Figura 1-4. El silenciamiento de YLR243W tiene un efecto similar al de la inhibición de RPB11, una subunidad de la ARN polimerasa II. . . . .	4
Figura 1-5. El silenciamiento de Parcs/GPN3 produce una disminución global en la actividad de transcripción . . . . .	5
Figura 1-6. La expresión de Parcs/Gpn3 es necesaria para la localización nuclear de la ARN polimerasa II . . . . .	6
Figura 1-7. El complejo del poro nuclear regula el tráfico de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma . . . . .	8
Figura 1-8. Representación esquemática de la formación y disociación del complejo Imp-β/ Imp-α/NLS . . . . .	10
Figura 1-9. Representación esquemática del modelo de transporte activo regulado por Ran . . . . .	11

## 3. Metodología experimental

Figura 3-1. Localización subcelular de mono-, bi-, tri- y tetraEGFP. . . . .	17
Figura 3-2. Mapa de restricción del vector ptetraEGFP . . . . .	18
Figura 3-3. Representación esquemática del proceso de electroforesis de ADN en geles de agarosa . . . . .	21
Figura 3-4. Vector ptetraEGFP cortado con EcoRI y BamHI . . . . .	22
Figura 3-5. Digestión enzimática de ptetraEGFP y ligación del vector con los oligonucleótidos hibridizados . . . . .	23
Figura 3-6. Representación esquemática de los tres primeros ciclos de una PCR . . . . .	26
Figura 3-7. Método de transfección transitoria por precipitados de fosfato de calcio . . . . .	30
Figura 3-8. Mapa de restricción del plásmido pEYFP . . . . .	32
Figura 3-9. Mutagénesis sitio-dirigida <i>in vitro</i> . . . . .	34
Figura 3-10. Mapa de restricción del vector pMSCVpuro . . . . .	35
Figura 3-11. Electroforesis de ADN de los constructos hGpn1-EYFP, hGpn3-EYFP, EYFP, hGpn3-Ha en el vector retroviral pMSCVpuro . . . . .	37
Figura 3-12. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) . . . . .	39
Figura 3-13. Representación esquemática del proceso de transferencia electroforética . . . . .	41

## 4. Resultados y discusión

Figura 4-1. Alineamiento y conservación de cuatro posibles NLS identificadas en hGpn3 con y en otras especies de mamíferos . . . . .	47
Figura 4-2. Electroforesis de ADN que muestra los fragmentos generados por una PCR de colonia para verificar la inserción de cuatro secuencias que codifican para posibles NLS en el vector ptetraEGFP . . . . .	48
Figura 4-3. Ensayo de efectividad de la PCR que amplifica el MCS de ptetraEGFP . . . . .	48
Figura 4-4. Las secuencias de aminoácidos <i>hGpn3-NLS-Parte A</i> , <i>hGpn3-NLS-Parte B</i> y <i>hGpn3-NLS-Bipartita</i> son capaces de dirigir a la proteína reportera tetraEGFP al núcleo celular . . . . .	50
Figura 4-5. Mutaciones puntuales sobre aminoácidos pertenecientes a cuatro posibles NLS en hGpn3, no tienen efectos significativos sobre la localización subcelular de la proteína de fusión hGpn3-EYFP . . . . .	51
Figura 4-6. Localización subcelular de la versión doble mutante de hGpn3-EYFP . . . . .	52
Figura 4-7. Localización subcelular de la proteína híbrida hGpn3-EYFP en presencia de	

una versión dominante negativa de Ran .....	53
Figura 4-8. Localización subcelular de la proteína híbrida hGpn3-EYFP en presencia de un gradiente de mXab1/Gpn1 .....	54
Figura 4-9. Expresión de las proteínas de fusión hGpn3-EYFP y hGpn3-Ha .....	55
Figura 4-10. Localización subcelular de la proteína de fusión hGpn3-EYFP .....	56
Figura 4-11. La leptomicina B ocasiona la acumulación nuclear de hGpn1-EYFP, pero no tiene efecto sobre hGpn3-EYFP .....	57
Figura 4-12. La lectina de <i>Agaricus bisporus</i> no tiene ningún efecto sobre la localización subcelular de hGpn3-EYFP .....	57
Figura 4-13. Efecto de la brefeldina A y el nocodazol en la localización subcelular de hGpn3-EYFP .....	58
Figura 4-14. Sincronización de <i>MCF-12A/hGpn3-EYFP</i> mediante un doble bloqueo con timidina 2 mM .....	59
Figura 4-15. Localización subcelular de la proteína hGpn3-Ha .....	59



# Índice de tablas

## 1. Introducción

Tabla 1-1. Ejemplos de algunos tipos de señales de localización nuclear . . . . .	12
---	----

## 3. Metodología experimental

Tabla 3-1. Reacción de apareamiento de oligonucleótidos . . . . .	20
Tabla 3-2. Mezcla para la reacción de digestión . . . . .	20
Tabla 3-3. Mezcla para la reacción de ligación de un oligonucleótido híbrido que codifica para una de las cuatro posibles NLS y el vector ptetraEGFP . . . . .	23
Tabla 3-4. Protocolo de temperaturas para la PCR de colonia de la tabla 3-5 . . . . .	26
Tabla 3.5. Reactivos y proporciones utilizadas en una PCR de colonia para comprobar la presencia de la secuencia que codifica para una posible NLS en el vector ptetraEGFP . . . . .	27
Tabla 3-6. Reactivos y proporciones utilizadas en la mutagénesis sitio-dirigida por PCR . . . . .	33
Tabla 3-7. Protocolo de temperaturas para la PCR de la tabla 3-6 . . . . .	33

## 4. Resultados y discusión

Tabla 4-1. Cuatro posibles NLS se localizan hacia el extremo C-terminal de hGpn3 . . . . .	46
--	----

## Tabla de abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNPII	ARN polimerasa II
ATP	Adenosin trifosfato
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
BFA	Brefeldina A
BrEt	Bromuro de etidio (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )
BSA	Albúmina de suero bovino
cADN	ADN complementario
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. lupus familiaris</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>
cNLS	Señal de localización nuclear clásica
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Dario rerio</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO)
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EYFP	Proteína fluorescente amarilla mejorada
FBS	Suero bovino fetal
GDP	Guanosin difosfato
GFP	Proteína fluorescente verde de <i>Aequorea victoria</i>
GTP	Guanosin trifosfato
GTPasa	Trifosfatasa de guanosina
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HBS	Solución salina de HEPES
HEK	Células embrionarias de riñón humano
HEK-293 T/17	Células embrionarias de riñón humano 293 T/17
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanesulfónico
hGpn3	Proteína Gpn3 de humano
hPY	Señal de localización nuclear tipo PY con una región homofóbica
IBB	Dominio de unión a importina β
<i>i.e.</i>	<i>Id est, esto es</i>
Impα	Importina α
Impα/β	Complejo Importinaα/Importinaβ
Impβ	Importina β
IN Ty1	Integrasa del retrotransposón Ty1
Kapβ2	Carioferina β2
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Caldo de lisogenia de Luria-Bertani

LMB	Leptomicina B
<i>M. mulatta</i>	Macaca mulatta
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>M. putorius furo</i>	<i>Mustela putorius furo</i>
MBD2	Proteína de unión a guaninas metiladas 2
MBDin	Proteína de interacción con MBD2
MCS	Sitio de clonación múltiple
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDZ	Nocodazol
NEB	New England Biolabs
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NPC	Complejo de poro nuclear
nt	Nucleótidos
nt/s	Nucleótidos por segundo
ORI	Origen del replicación
Parcs/Gpn3	Proteína pro-apoptótica requerida para la supervivencia celular
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PDB	Protein Data Bank
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEH	Paraplejía Espástica Hereditaria
pEYFP	Plásmido de la proteína fluorescente amarilla mejorado
Pfu polimerasa	ADN polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
RanGAP1	Proteína activadora de la GTPasa Ran
RB	Región básica
RFP	Proteína fluorescente roja
RPAP4	Proteína 4 asociada a la ARN polimerasa II
RPB1/POLR2A	Subunidad 1 de la ARN polimerasa II
RPB2/POLR2B	Subunidad 2 de la ARN polimerasa II
RPB11/POLR2J	Subunidad 11 de la ARN polimerasa II
RT	Temperatura ambiente
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SOC	Medio súper óptimo con represión catabólica
Taq polimerasa	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
Luz UV	Luz ultravioleta
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
XPA	Proteína del grupo A de Xeroderma pigmentosum
YFP	Proteína fluorescente amarilla

# Capítulo 1

## Introducción

El flujo de información de ADN a ARN se lleva a cabo por medio de la transcripción genética. En el núcleo de las células eucariontes, este proceso está regulado por la actividad de tres complejos enzimáticos conocidos como ARN polimerasa I (ARNPI), ARN polimerasa II (ARNPII) y ARN polimerasa III (ARNPIII) [1].

Mientras que las ARN polimerasas I y III sintetizan, mayoritariamente, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr) y otros ARN pequeños, la ARN polimerasa II se encarga, principalmente, de transcribir todos los genes que codifican para proteínas (ARNm), las cuales son largas cadenas de aminoácidos involucradas en una gran variedad de procesos biológicos, como transducción de señales, reacciones inmunológicas, organización estructural, entre otros [62].

Aunque su estructura y función ha sido extensivamente estudiada [15, 16, 17], el mecanismo por el cual la ARNPII es transportada al núcleo, para realizar su función, aún se desconoce en células de mamífero. Publicaciones recientes han revelado una serie de intermediarios putativos y de factores requeridos para la importación nuclear de la enzima; entre ellos, el complejo CCT (componentes de la red de microtúbulos) el complejo R2TP, la proteína Iwr1 y las GTPasas Gpn1, Gpn2 y Gpn3 [19, 23]. Sin embargo, la extensión de la relevancia que tienen estas interacciones en la importación de la ARNPII es esencialmente incierta.

En el presente trabajo se discuten varios aspectos de la relación que existe entre la proteína Gpn3 y la ARNPII y se plantea una posible vía de entrada al núcleo para esta última que involucra a esta pequeña GTPasa.

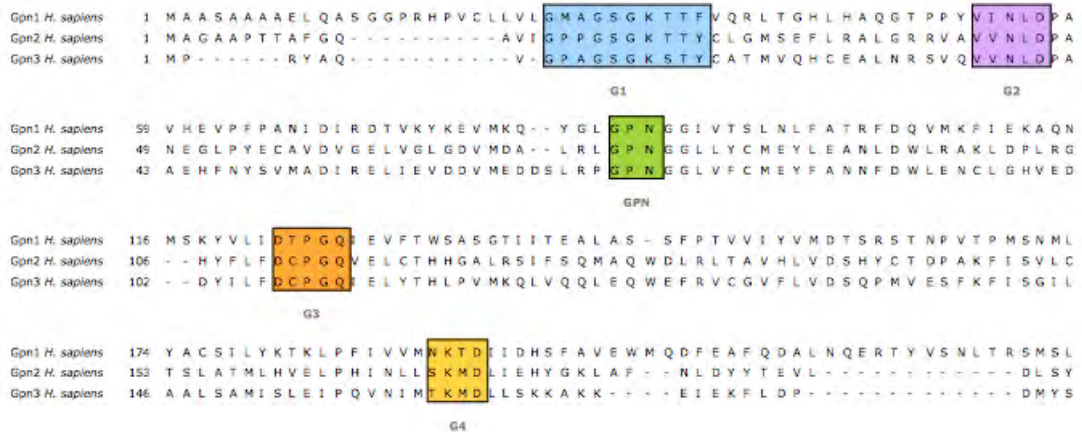
### 1.1. Generalidades de la GTPasa Gpn3

Gpn3 fue descrita inicialmente por su capacidad para interactuar con el dominio de oligomerización de Apaf-1, una proteína central en el proceso de apoptosis que media la activación de la caspasa-9 en respuesta a la adición del citocromo *c* y dATP, al apoptosoma [5]. Sánchez-Olea *et al.* [78] demostraron que Gpn3 regula la competencia de Apaf-1 y que desempeña un papel crítico asociado con la progresión del ciclo celular en células no cancerígenas; por este motivo, la proteína adquirió el nombre de Parcs, pro-apoptotic protein required for cell survival [8].

Parcs/Gpn3 pertenece a la familia GPN de GTPasas, la cual se caracteriza por tener un asa estructural distintiva entre los dominios G2 y G3, que está conformada por el tripéptido glicina (**G**), prolina (**P**) y asparagina (**N**). La familia GPN se compone de tres miembros, XAB1/Gpn1, Gpn2 y Parcs/Gpn3, que sólo poseen cuatro de los cinco dominios de las GTPasas (véase figura 1-1). Estas proteínas se asocian físicamente entre sí [68] y tienen un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos [29, 56]; este hecho, aunado a que sólo existe el ortólogo de Gpn1 y no de Gpn2 y Gpn3 en Arquea, sugiere que estas proteínas surgieron de un ancestro común cercano a Gpn1.

La proteína Gpn3 está altamente conservada en células eucariontes, ya que se encuentra presente desde levadura hasta humano, por lo que se le atribuye una función fundamental en las células aún desconocida. En este sentido, se ha reportado que el gen que codifica para esta proteína es esencial en *Saccharomyces cerevisiae* [25] y que la inactivación de su ortólogo en *Caenorhabditis elegans* mediante técnicas de ARN de interferencia resulta letal en etapas tempranas del desarrollo [78, 26].

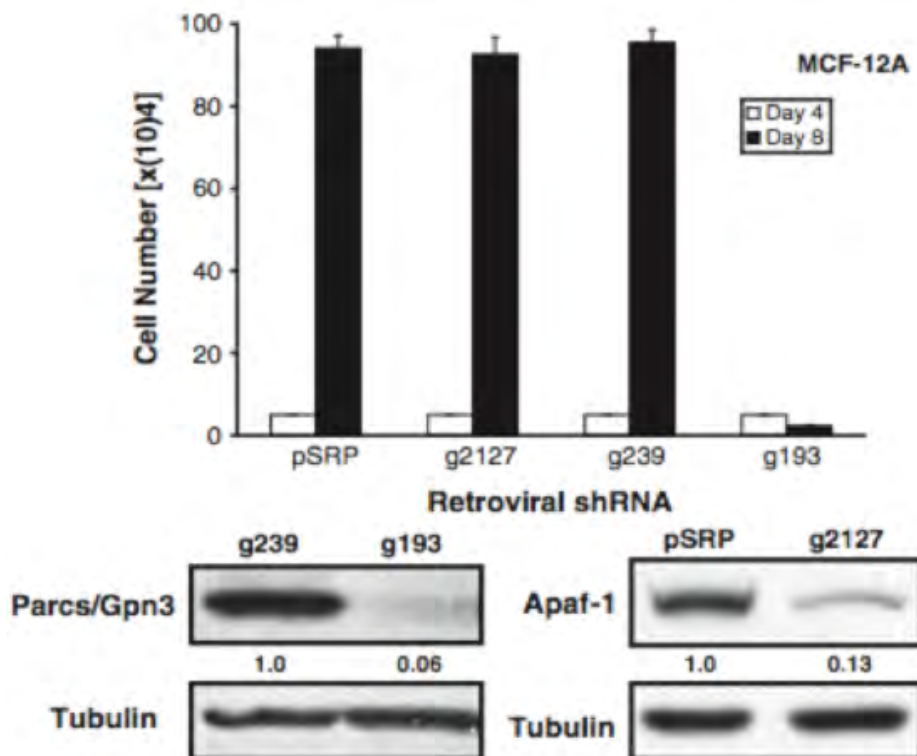
Parcs/Gpn3 es, además, el miembro más pequeño de la familia. Tiene una cadena primaria de 284 aminoácidos y su peso molecular es de alrededor de 33 kDa.



**Figura 1-1. Alineamiento de las proteínas Gpn1, Gpn2 y Gpn3 de humano.** El dominio GPN (verde) está altamente conservado entre los miembros de la familia. Cuatro de los cinco dominios de GTPasas se identifican en las secuencias: G1, azul; G2, morado; G3, anaranjado; y G4, amarillo.

### 1.1.1. Parcs/Gpn3 es esencial para la proliferación de células de mamífero

Para determinar el efecto que tiene suprimir la expresión de Parcs/Gpn3 en la proliferación de células de tejido epitelial humano de mama no-tumorogénicas (MCF-12A), Calera *et al.* disminuyeron los niveles de la proteína endógena, mediante una técnica conocida como *knockdown* (el gen que codifica para Parcs/Gpn3 es esencial, por lo que inhibir su expresión por completo es inviable), infectando a las células con un retrovirus codificante para un ARNhp (g193, véase figura 1-2) diseñado para silenciar selectivamente la expresión de la proteína [8].

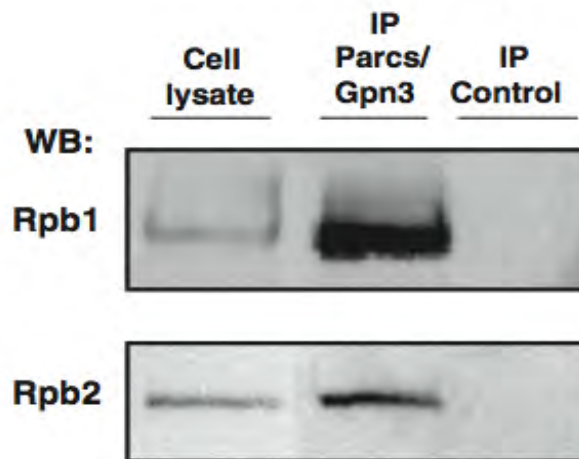


**Figura 1-2. Parcs/Gpn3 es esencial para la proliferación de la línea celular MCF-12A [8].** Empleando técnicas de ARN de interferencia, se redujeron exitosamente los niveles de expresión de la proteína Parcs/Gpn3 en células epiteliales humanas de mama, para evaluar el efecto del silenciamiento sobre la proliferación. La progresión celular disminuyó drásticamente luego de 4 días de cultivo, debido a la ausencia de la proteína. Para comprobar la especificidad del efecto, las células se infectaron con (1) el vector vacío (pSRP), (2) un ARNhp para reducir los niveles de Apaf-1 (g2127) y (3) un ARNhp inefectivo para inhibir la expresión de Parcs/Gpn3 (g239); no se observaron diferencias significativas en la proliferación celular bajo estas tres condiciones.

Las células MCF-12A infectadas con el vector retroviral vacío (pSRP), un ARNhp efectivo para abatir los niveles de Apaf-1 (g2127) o un ARNhp inefectivo para silenciar la expresión de Parcs/Gpn3 (g239) (véase primeras tres columnas de la gráfica en la figura 1-2), incrementaron significativamente su número al comparar los conteos del día 4 (barras blancas), con aquellos del día 8 (barras negras) correspondientes a cada condición. Por otro lado, la proliferación de las células en las que se redujeron efectivamente los niveles de expresión de Parcs/Gpn3 (g193), se inhibió por completo e, incluso, se observó una disminución en el número de células durante este mismo periodo de tiempo [8].

El resultado anterior demuestra que la proliferación de células MCF-12A depende por completo de la presencia de Parcs/Gpn3 y es, además, consistente con los hallazgos hechos anteriormente sobre esta proteína en *C. elegans* [26]. Otras líneas celulares derivadas también de tejido epitelial humano de mama tumorigénicas, como MDA-MB-231, BT-474 y MDA-MB-468, presentaron un decremento acentuado en su proliferación (datos no mostrados), apoyando estas conclusiones.

## 1.2. Existe una interacción física entre Parcs/Gpn3 y la ARN polimerasa II



**Figura 1-3. La ARN polimerasa II co-inmunoprecipita con Parcs/Gpn3 [8].** Extractos solubles de la línea MDA-MB-468 de células de epiteliales humanas de mama, se inmunoprecipitaron con un anticuerpo policlonal de conejo específico para Parcs/Gpn3. Un análisis mediante western blot con anticuerpos contra Rpb1 y Rpb2, las dos subunidades más grandes de la ARN polimerasa II, mostró que ambas subunidades interactúan físicamente con Parcs/Gpn3.

En estudios globales de interacción de proteínas [56, 23], se ha reportado que existe una asociación entre Parcs/Gpn3 y la ARN polimerasa II. En el pasado, este tipo de análisis ha resultado fundamental para identificar numerosas proteínas que se asocian de forma estable con alguna de las subunidades de este complejo enzimático, como fue el caso de Xab1/Gpn1 [4], la cual se encuentra en la parte central de su red de interacciones.

Con el objetivo de confirmar esta interacción de forma específica y de descartar la posibilidad de un falso positivo, Calera *et al.* inmunoprecipitaron a Parcs/Gpn3 a partir de extractos solubles de células MDA-MB-468 (células humanas de tejido epitelial de mama), con un anticuerpo policlonal de conejo. Las proteínas que se encontraron en el precipitado, fueron separadas por tamaño mediante la técnica de SDS-PAGE (véase sección 3.6.2) y transferidas a una membrana de PVDF para, posteriormente, realizarles un western blot (véase sección 3.6.3) con anticuerpos específicos para Rpb1 y Rpb2, las dos subunidades más grandes de la ARN polimerasa II.

Señales correspondientes a Rpb1 y Rpb2 se encontraron en el inmunoprecipitado de Parcs/Gpn3, no así en el control, lo que demuestra que esta asociación es específica (véase figura 1-3). Estos resultados comprueban que existe una interacción física entre Parcs/Gpn3 y la ARN polimerasa II [8], pero, además, podrían conducir al mecanismo que

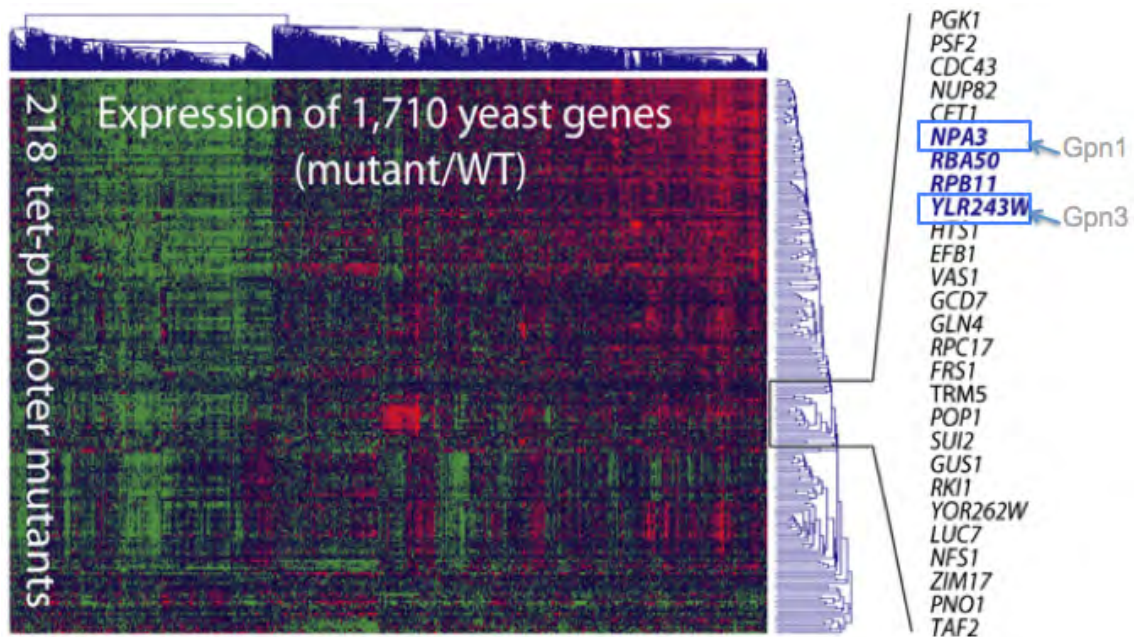
explique por qué la expresión de *Parcs/Gpn3* resulta esencial para la proliferación celular, como se vio en la sección 1.1.1.

**1.2.1. La inhibición del homólogo de *Parcs/Gpn3* en levadura tiene un efecto similar al del silenciamiento de una subunidad de la ARNP II**

Con el fin de evaluar el efecto que produce el silenciamiento de 218 genes particulares en levadura, Jerónimo *et al.* [40] utilizaron un microarreglo en donde fue posible medir los perfiles de expresión de ARNm de otros 1710 genes ante la inhibición de cada gen con promotores condicionales (véase figura 1-4); el color rojo representa un aumento en la expresión, mientras que el verde una disminución. Para su análisis, los 218 genes silenciados se acomodaron por la similitud de los perfiles que su inhibición ocasionó en la expresión de los otros 1710 genes; en la figura 1-4, la columna de la derecha es a penas un extracto y muestra algunos de los genes de interés que fueron silenciados.

Bajo estas condiciones, *NPA3* y *YLR243W*, los ortólogos respectivos de *XAB1/GPN1* y *Parcs/GPN3* en levadura, se ubican en posiciones relativamente cercanas (véase figura 1-4); lo que sugiere, en principio, que el silenciamiento de estos genes en levadura tiene un efecto similar. Este resultado es consistente con el hecho de que ambos son esenciales para el crecimiento celular y que, se sabe, interaccionan físicamente en levadura [40].

Por otro lado, su efecto global en la expresión génica de *S. cerevisiae* es comparable a aquel que produce el silenciamiento de *RPB11*, el cual codifica para una de la subunidades de la ARN polimerasa II, y *RBA50*, el homólogo más cercano a *RPAP1* – una proteína asociada a ARNP II– en levadura, los cuales están situados justo arriba de *YLR243W* [71].



**Figura 1-4. El silenciamiento de *YLR243W* tiene un efecto similar al de la inhibición de *RPB11*, una subunidad de la ARN polimerasa II [40].** Microarreglo que muestra los efectos que tiene el silenciamiento iterado de 218 genes sobre la expresión génica de otros 1710 en *S. cerevisiae*. Una coloración roja en el entramado del microarreglo representa un aumento en los niveles de expresión de un gen, mientras que una tonalidad verde indica una disminución. Los 218 genes que fueron silenciado, se acomodaron por similitud de efecto; *YLR243W*, el ortólogo de *Parcs/Gpn3* en levadura, se encuentra justo abajo de *RPB11*, una de las subunidades de la ARN polimerasa II, lo que sugiere que el resultado que tiene inhibir la expresión de *Parcs/Gpn3* es muy similar al del silenciamiento de *RPB11*.

A partir de estos hallazgos, y por su posición en la interfase de los complejos regulatorios en la red de interacciones de la ARN polimerasa II, Jerónimo *et al.* proponen

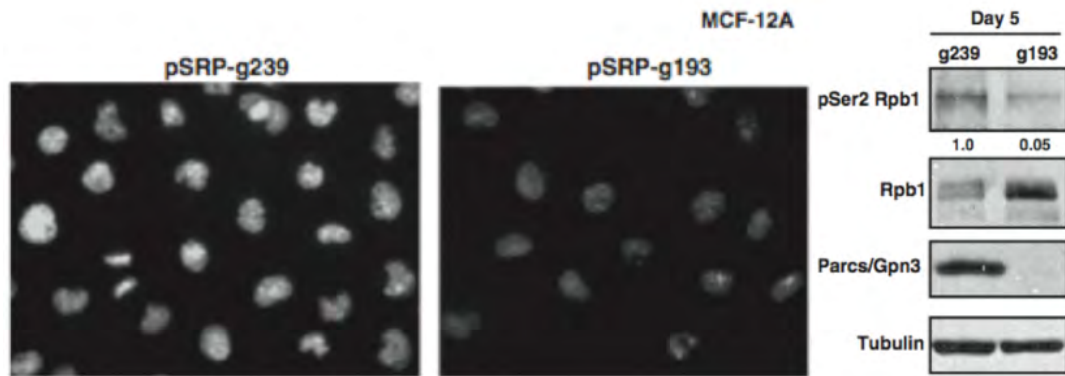
un papel para XAB1/Gpn1 en la formación de complejos transcripcionales [40]; sin embargo, es posible que otra función crucial conjunta involucre a las proteínas GPN y a la ARNP II.

### 1.2.2. La actividad de transcripción disminuye al inhibir la expresión de Parcs/Gpn3 en células MCF-12A y MDA-MB-648

Para investigar si los resultados arrojados por el análisis del microarreglo estudiado por Jerónimo *et al.* [40] en levadura podían ser extrapolados a células de mamífero, dado el alto grado de conservación de Parcs/Gpn3 en la evolución, Calera *et al.* investigaron el efecto del silenciamiento en la expresión de esta proteína sobre la transcripción, razonando una posible actividad cooperativa entre Parcs/Gpn3 y la ARN polimerasa II [8].

Distintas líneas celulares derivadas de tejido epitelial humano de mama, entre ellas MDA-MB-648 y MCF-12A, fueron infectadas con partículas retrovirales codificantes para un ARNhp (g193) que reduce exitosamente los niveles de expresión de Parcs/Gpn3 ó un ARNhp (g239) que los deja inalterados, el cual se utilizó como control (véase el tercer panel de la derecha en la figura 1-5 y la sección 1.1.1). Posteriormente, se incorporó 5-etiniluridina (EU), un análogo de uridina, a los productos sintetizados de ARN (por las ARN polimerasas I, II y III) y se evaluó la actividad de transcripción mediante un marcador de EU, conocido como azida de fluoresceína.

La señal fluorescente en células deficientes de Parcs/Gpn3 disminuyó considerablemente en aquellas líneas celulares cuya proliferación celular se había visto alterada por la ausencia de dicha proteína (véase sección 1.1.1); por lo que los niveles de expresión de Parcs/Gpn3 tienen un efecto importante en la actividad transcripcional. Lo anterior sugiere que el mecanismo controlado por Parcs/Gpn3 en las células podría ser a nivel transcripcional [8] y, además, proporciona una nueva perspectiva para abordar la relación entre esta proteína y la ARN polimerasa II.



**Figura 1-5. El silenciamiento de Parcs/GPN3 produce una disminución global en la actividad de transcripción [8].** La señal fluorescente en células MCF-12A infectadas con g193, un ARNhp que suprime efectivamente la expresión de Parcs/Gpn3, es significativamente menor que aquella de la condición control. En los paneles de la derecha se muestran los resultados del análisis por western blot para las proteínas indicadas a la izquierda de cada recuadro.

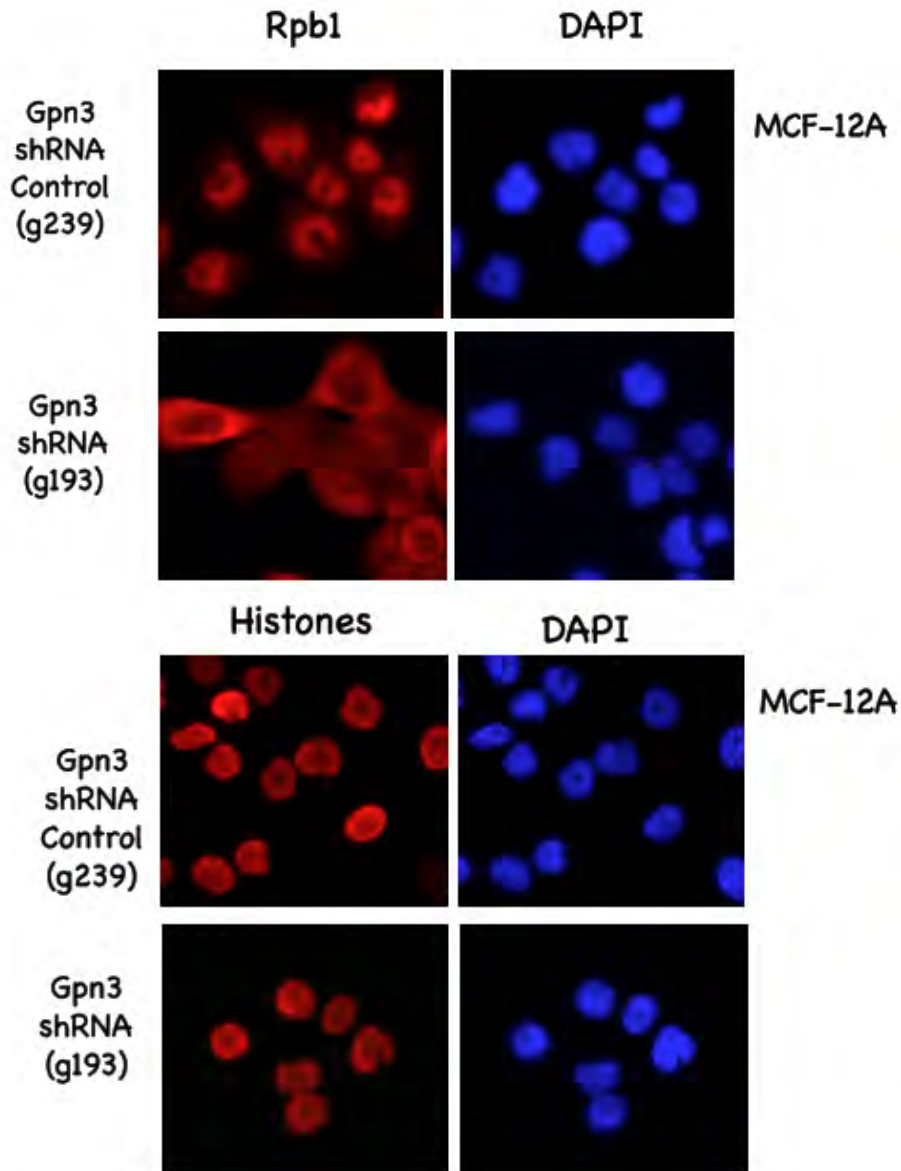
En este sentido, el estado de fosforilación de Rpb1, la subunidad más grande de la ARNP II, se utilizó en este estudio como un indicador entre fases específicas del ciclo de transcripción de la ARN polimerasa II. La fosforilación en la serina2 es un evento que ocurre en las etapas finales del proceso de elongación; en extractos totales obtenidos de células deficientes en Parcs/Gpn3 y analizados por western blot se observó una disminución en los niveles de Rpb1, utilizando un anticuerpo que reconoce a la serina2 fosforilada (pSer2). Por otro lado, los niveles totales de Rpb1 mostraron un aumento inesperado que, de acuerdo con Calera *et al.*, podría deberse a un mecanismo compensatorio para equilibrar, en cierta forma, la actividad transcripcional requerida por las células [8]. Estas consideraciones demuestran, de manera convincente, que



Parcs/Gpn3 tiene un papel fundamental en la regulación de la actividad transcripcional de la ARN polimerasa II.

### 1.2.3. Parcs/Gpn3 es requerida para la acumulación nuclear de la ARN polimerasa II

Ninguna de las 12 subunidades de la ARN polimerasa II parece contener una señal de localización nuclear clásica (véase sección 1.3.4) o, para tal efecto, de cualquier otro tipo, que permita su entrada al núcleo de las células; por lo que el mecanismo por el cual esta proteína es transportada a través del complejo del poro nuclear (véase sección 1.3.1) para realizar su función, es aún un misterio.



**Figura 1-6. La expresión de Parcs/GPN3 es necesaria para la localización nuclear de la ARN polimerasa II [8].** Los 4 paneles superiores muestran la localización subcelular de Rpb1, la subunidad más grande de la ARNP II, en presencia (panel superior) o ausencia (panel inferior) de Parcs/Gpn3. En células deficientes de Parcs/Gpn3, Rpb1 se acumula en el citoplasma. En los 4 paneles inferiores, un control para los 5 tipos de histonas evidencia la especificidad del efecto, así como, el correcto funcionamiento de la maquinaria de importación nuclear.

Forget *et al.* reportaron que el silenciamiento de XAB1/GPN1 mediante ARN de interferencia, produce la acumulación de ARNP II en el citoplasma [23]. Debido al nivel de similitud en su secuencia primaria y a las conclusiones obtenidas a partir del microarreglo

realizado por Jerónimo *et al.* [40], Calera *et al.* [8] propusieron que Parcs/Gpn3 podría tener un papel semejante en la localización de la ARNP II en el núcleo celular.

En células MCF-12A deficientes en Parcs/Gpn3 por ARN de interferencia (g193), Rpb1 fue encontrada exclusivamente en el citoplasma (véase figura 1-6). Este cambio dramático en la localización subcelular en la proteína no se observa en la condición control (g239) y es, además, específico; la ubicación inalterada de los 5 tipos de historias, muestra que estos resultados no se debieron a una perturbación en los mecanismos de importación, ni a una pérdida de selectividad en la membrana nuclear [8].

Estos hallazgos son consistentes con la existencia de una interacción física entre Parcs/Gpn3 y la ARNP II y, al mismo tiempo, explicarían por qué la reducción en los niveles de Parcs/Gpn3 ocasiona una disminución en la actividad de transcripción e inhibe la proliferación celular. Finalmente, Calera *et al.* sugieren que Parcs/Gpn3 puede estar involucrada en el proceso de ensamblaje (como una proteína chaperona) o, directamente, en la importación nuclear de la ARN polimerasa II. El presente trabajo, así como la siguiente sección, se enfoca, precisamente, en desarrollar esta última idea.

### 1.3. Mecanismos de transporte nuclear

Un evento prominente en la evolución de las células eucariontes, fue la adquisición de la envoltura nuclear (NE) y una inherente compartimentalización del núcleo. La envoltura nuclear está formada por dos bicapas lipídicas que tienen una composición bioquímica distintiva de lípidos y proteínas, las cuales se encuentran separadas por el espacio o cisterna perinuclear (30-50 nm) y reciben el nombre de membrana interna y membrana externa [35, 82].

Como interfase entre el núcleo y el citoplasma, la envoltura nuclear es esencial para mantener la identidad de cada compartimiento; por lo que tiene un papel imperante en la regulación del flujo bidireccional de macromoléculas que los comunica [1]. Las células eucariontes necesitan transportar la maquinaria de replicación y transcripción del ADN y redistribuir los productos de la transcripción nuclear hacia el citoplasma; para tal efecto, la membrana interna y la membrana externa se unen en un patrón discreto a lo largo de toda la superficie de la envoltura nuclear para formar canales de tránsito conocidos como complejos del poro nuclear (NPC).

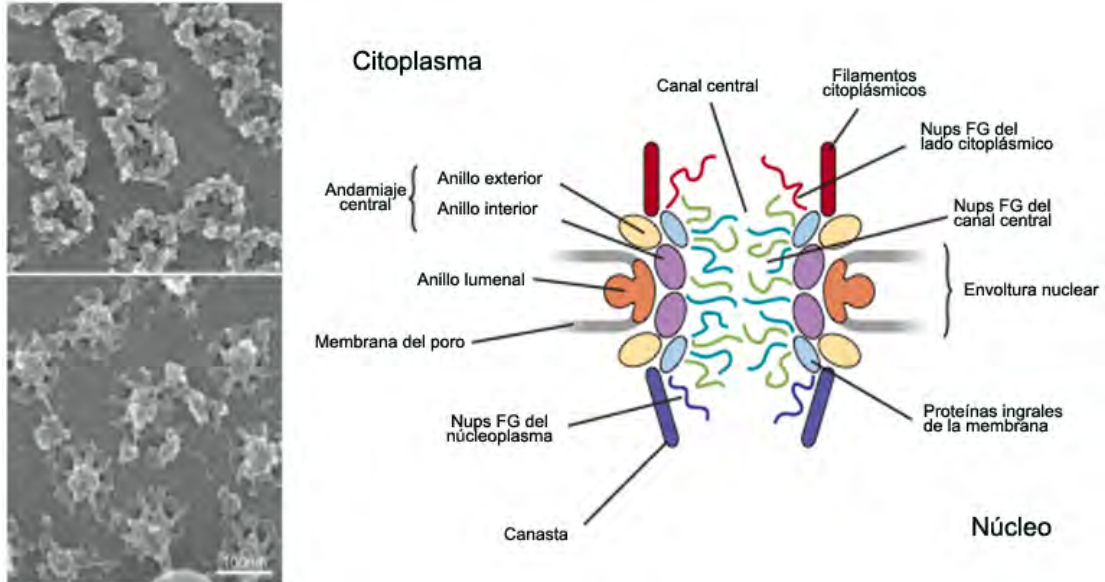
Moléculas pequeñas como iones, metabolitos y proteínas globulares de hasta ~40 kDa, pueden atravesar los poros de forma relativamente libre, en un proceso conocido como difusión pasiva, el cual no requiere energía y se realiza en favor del gradiente electroquímico que mantiene la envoltura nuclear [82]. El transporte activo, por otro lado, requiere energía química, factores de transporte y señales específicas que dicten la selectividad de la vía a través del complejo del poro nuclear. Algunas generalidades sobre estos elementos se discuten a continuación.

#### 1.3.1. Estructura y características del complejo del poro nuclear

La densidad y la distribución de los poros nucleares varía extensivamente en distintos tipos de células y tejidos (~14.6 NPC/ $\mu\text{m}^2$  en *S. cerevisiae* y ~50 NPC/ $\mu\text{m}^2$  en ovocitos de *Xenopus laevis*). De acuerdo con estudios realizados anteriormente en levadura y en células extraídas de riñón de ratón, su disposición en la superficie de la envoltura nuclear tampoco es aleatoria e, incluso, sostiene una relación notable con la progresión del ciclo celular [35, 101] para satisfacer las necesidades de transporte núcleo-citoplásmico de las células.

A pesar de la gran diversidad en la cantidad y localización de los poros embebidos en la envoltura nuclear, sus principales características se encuentran conservadas en la

evolución [35]. Proteínas integrales de membrana específicas del poro (Poms) forman parte del andamiaje del complejo y se encuentran generalmente alrededor del punto de fusión entre la membrana interna y la membrana externa (membrana del poro); estos polipéptidos facilitan el anclaje de otras proteínas periféricas a la estructura del poro, conocidas como nucleoporinas (Nups), las cuales cumplen actividades precisas en el ensamblaje y función del NPC.



**Figura 1-7. El complejo del poro nuclear regula el tráfico de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma [46, 98].** Los paneles de la izquierda, se muestran micrografías electrónicas de barrido de la arquitectura del complejo del poro nuclear visto desde el citoplasma (panel superior) y desde el interior del núcleo (panel inferior) de una ovocito de *X. laevis*. A la derecha, se encuentran señalados, de forma esquemática los elementos principales de la estructura del complejo del poro nuclear basados en el mapa organizacional de Alber *et al.* [98].

Existen, al menos, 30 tipos distintos de nucleoporinas que parecen estar presentes en un número de copias que es, frecuentemente, un múltiplo de 8; esta observación no es, sin embargo, incidental y es consistente con la notable simetría octagonal del complejo del poro nuclear. Así, se ha reportado que hay alrededor de 16 duplicados de cada Nup en los poros, formando un complicado entramado dinámico de unas 456 proteínas individuales. Wentz *et al.* muestran una lista puntual de sus homólogos en levadura y en vertebrados [98].

Arquitectónicamente, los NPC son estructuras cilíndricas que contienen 8 proyecciones que rodean al canal central, conocidas como filamentos citoplásmicos. Adoptando conformaciones extendidas y flexibles hacia el lado citoplásmico del poro, el canal central o el nucleoplasma, se encuentra una clase de nucleoporinas denominadas FG; las cuales tienen dominios discretos con repeticiones de fenilalanina (**E**) y glicina (**G**) (FG, GLFG, FxFG, donde L corresponde a leucina y x puede ser cualquier otro aminoácido) [98, 35] y se encuentran ancladas a los anillos del andamiaje central. Las repeticiones FG proveen sitios de unión para receptores de la vía de transporte núcleo-citoplásmico [82], cuyas interacciones pueden ser transitorias o estar reguladas por factores como proteínas activadoras o intercambiadoras de nucleótidos (p. ej. las GTPasas) que le dan direccionalidad al proceso. Finalmente, se encuentran los filamentos del nucleoplasma, los cuales conforman el esqueleto de la canasta. El complejo resultante tiene un peso molecular de ~60 MDa y mide unos 200 nm desde la punta de los filamentos citoplásmicos hasta la canasta (véase figura 1-7).

Con todos estos elementos, el complejo del poro nuclear constituye una barrera de permeabilidad para el intercambio de material entre el núcleo y el citoplasma. Su funcionamiento, aunque poco entendido, se ha intentado describir mediante tres principales modelos.

Como una red física, se ha propuesto que el canal central del NPC no es un conducto enteramente acuoso; Rout *et al.* insisten en que las Nups de ambos lados del poro forman un entramado que evita la difusión de macromoléculas de gran tamaño y en que los complejos de receptores y proteínas cargo podrían congregarse en la vecindad de los poros nucleares por periodos extensivos de tiempo, aumentando su probabilidad de transporte [24].

Ribbeck y Gorlich argumentan que son las nucleoporinas FG las que establecen un límite superior en los procesos de difusión pasiva, creando una malla hidrofóbica de consistencia gelatinosa que permite el tránsito de moléculas pequeñas. En este modelo, el transporte activo puede llevarse a cabo sólo si los receptores de importación o exportación, respectivamente, son capaces de interactuar con los dominios FG, disolviendo la red de manera local.

Energéticamente, también es posible que el filtrado de moléculas esté gobernado por asociaciones electrostáticas entre receptores y proteínas del poro que regulen las tasas de traslocación [14]. En particular, se ha reportado que la afinidad entre factores de transporte y motivos FG aumenta de forma progresiva del citoplasma al núcleo. De acuerdo con Ben-Efraim y Gerace, la interacción simultánea de los complejos de importación (*i.e.* molécula cargo/receptor) con dos nucleoporinas podría promover una serie de procesos de disociación/asociación para facilitar el tránsito de macromoléculas de una repetición FG a la siguiente [24].

Encontrar nueva evidencia experimental para elucidar el verdadero mecanismo que rige el funcionamiento de los complejos de poro nuclear es uno de los retos actuales y más fascinantes de la Biología Celular.

### **1.3.2. El transporte activo es mediado por la GTPasa Ran y un gradiente de GTP/GDP**

El transporte activo se lleva a cabo en contra del gradiente electroquímico establecido por la envoltura nuclear. La importación de moléculas a través de los complejos de poro nuclear concentra un número importante de proteínas en el núcleo que deben, de algún modo, sortear esta barrera entrópica; por lo que no es sorprendente que este proceso esté altamente regulado y que consuma energía.

Una GTPasa monomérica, Ran, que se encuentra distribuida de forma asimétrica entre el núcleo y el citoplasma en diferentes estados de activación, es requerida tanto para la importación como para la exportación nuclear y aporta energía química mediante la hidrólisis de GTP.

En su papel como interruptor molecular, Ran presenta dos estados conformacionales dependiendo de si está unida a GTP o a GDP; los cuales están gobernados por dos proteínas regulatorias: (1) Ran-GAP, que se encuentra principalmente en el citoplasma y favorece la hidrólisis de GTP, convirtiendo a Ran-GTP en Ran-GDP; y, (2) Ran-GEF (RCC1), que se localiza en el núcleo y promueve el intercambio de GDP por GTP, regresando a Ran a su estado activo [1].

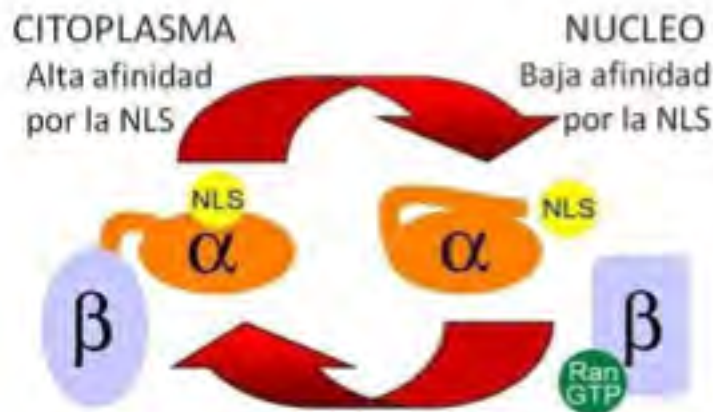
Así, el citoplasma contiene principalmente moléculas de Ran-GDP, mientras que en el núcleo hay grandes cantidades de Ran-GTP. Es, precisamente, el gradiente generado por Ran-GTP y Ran-GDP, lo que le confiere direccionalidad al intercambio de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma de las células. El transporte nuclear de Ran-GDP, regulado por el factor de importación NTF2, también juega un papel importante en el mantenimiento de esta asimetría [24].

### 1.3.3. Factores de transporte núcleo-citoplásmico

La mayoría de las macromoléculas que atraviesan los poros nucleares mediante una vía dependiente de energía porque no pueden entrar al núcleo por difusión pasiva o, bien, porque requieren acceso particular para satisfacer las necesidades de las células (p. ej. ARN no-codificantes, histonas entre otros), interactúan con receptores de transporte solubles que pertenecen a una familia de proteínas llamadas  $\beta$ -carioferinas [24]. Dichas asociaciones se producen por el reconocimiento de motivos peptídicos específicos en los cargos que se conocen como señales de importación nuclear (NLS) (véase sección 1.3.4) o señales de exportación nuclear (NES).

En las células eucariontes, se han identificado por lo menos 20 tipos de  $\beta$ -carioferinas, que se han caracterizado, principalmente, por estar conformadas por dominios HEAT (también presentes en la **H**untingtina, **E**F3, la subunidad **A** de PP2A y **T**OR1) y, también, por su habilidad para interactuar con Ran y con las repeticiones FG de las nucleoporinas.

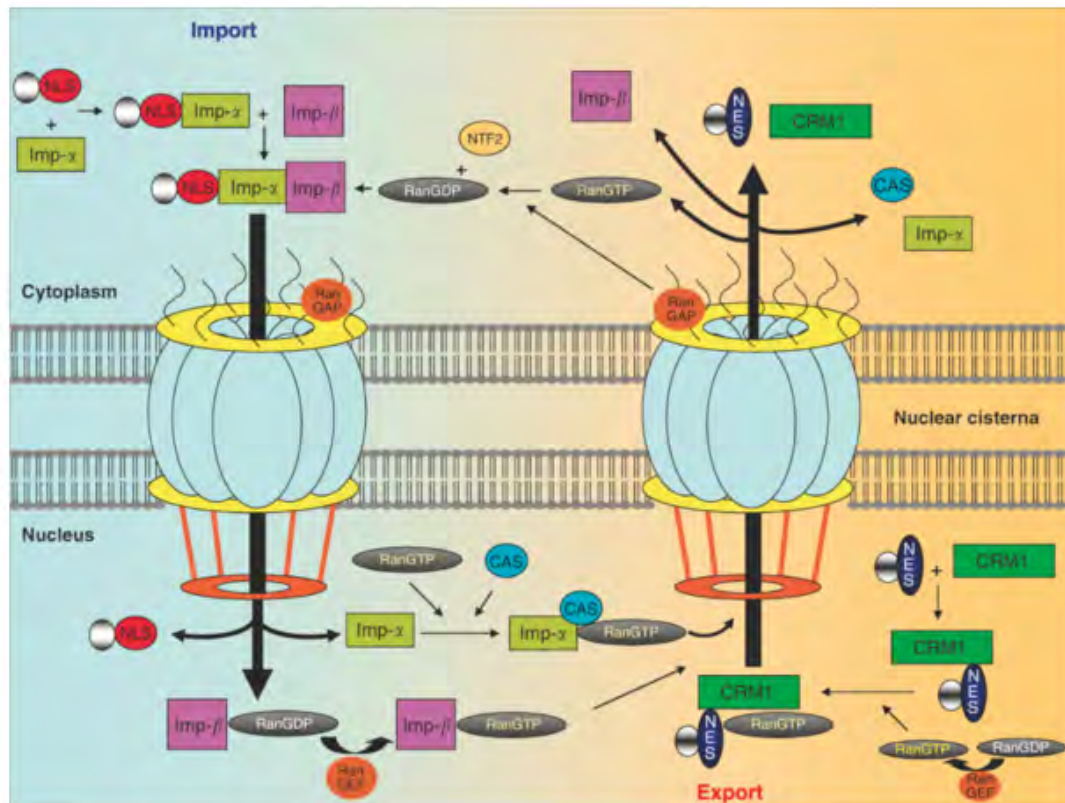
Las vías de importación nuclear mejor caracterizadas son aquellas que involucran la participación de la importina- $\beta$  (Imp- $\beta$  o carioferina- $\beta$ 1) y proteínas cargo con señales de localización nuclear clásicas (cNLS) (véase sección 1.3.4). Generalmente, la interacción entre la importina- $\beta$  y la secuencia de aminoácidos de la NLS está mediada por una proteína adaptadora, la importina- $\alpha$ , que contiene 10 dominios armadillo o ARM (**m**otivos **r**icos en **a**rgininas), los cuales forman dos sitios de unión para la señal de localización nuclear: el sitio mayor y el sitio menor. Esta conformación resulta enteramente conveniente cuando se considera la existencia de secuencias que requieren dos regiones básicas de aminoácidos para su funcionamiento, *i.e.* NLS bipartitas (véase sección 1.3.4). Otras carioferinas, como es el caso de la carioferina- $\beta$ 2 (Kap- $\beta$ 2), no requieren polipéptidos asociados (véase sección 1.3.4) [44].



**Figura 1-8. Representación esquemática de la formación y disociación del complejo Imp- $\beta$ /Imp- $\alpha$ /NLS [44].** Cuando la Importina- $\beta$ , se une al dominio IBB de la Importina- $\alpha$ , en el citoplasma, una proteína con una señal de localización nuclear puede ser reconocida por este complejo de receptores y transportada hacia el núcleo a través de los poros nucleares. En el núcleo, Ran-GTP se une a la Importina- $\beta$  ocasionando un cambio conformacional que libera el dominio de unión a Imp- $\beta$ ; éste último compite por el sitio de unión con la proteína cargo que es, finalmente, liberada por tener una menor afinidad.

La importina- $\alpha$  tiene un dominio N-terminal de unión a la Imp- $\beta$ , o IBB, que al asociarse con ésta última produce un cambio conformacional en la Imp- $\alpha$ , el cual deja al descubierto el sitio mayor e incrementa su afinidad por el cargo. El dominio IBB es una región auto-inhibitoria, por lo que el reconocimiento de una señal de localización nuclear clásica, es comúnmente precedido por la formación del heterodímero Imp- $\beta$ /Imp- $\alpha$ . Con el sitio de unión vacante, el resultado final de esta interacción es un complejo trimérico (Imp- $\beta$ /Imp- $\alpha$ /NLS-de-la-proteína-cargo (véase figura 1-8)), que puede ser transportado a través de los poros nucleares [46, 44].

Una vez dentro del núcleo, la unión de Ran-GTP a la importina-β ocasiona un cambio conformacional que libera al dominio IBB. La región auto-inhibitoria, cuya secuencia es sorprendentemente semejante a una cNLS, compite con la señal de localización nuclear; así, la afinidad de la importina-α por el cargo disminuye y la proteína alcanza su destino final. Posteriormente, Imp-α/Ran-GTP e Imp-β/Ran-GTP son exportadas por CAS de vuelta al citoplasma, en donde los complejos se disocian después de la hidrólisis de GTP y están listos para iniciar un nuevo ciclo de transporte (véase figura 1-9).



**Figura 1-9. Representación esquemática del modelo de transporte activo regulado por Ran [46].** Una señal de localización nuclear clásica es reconocida por los dominios armadillo de la importina-α en complejo con la importina-β (o bien, directamente por la importina-β). La interacción de Imp-β con las repeticiones FG de las nucleoporinas, median el tránsito del complejo trimérico a través del poro. En el interior del núcleo, Ran-GTP se asocia con la importina-β causando un cambio conformacional que disocia el complejo y deja libre al dominio IBB, el cual compite con la NLS de la proteína cargo y facilita su liberación. Los complejos Ran-GTP/Imp-β y Ran-GTP/Imp-α son exportados del núcleo por CAS. En el citoplasma, Ran-GAP, Ran-BP1 y RanBP2 estimulan la hidrólisis de GTP de Ran-GTP y los complejos de exportación se separan para comenzar un nuevo ciclo.

### 1.3.4. Señales de localización nuclear

Una señal de importación nuclear está definida como una porción perteneciente a una molécula, esencialmente una proteína, que es necesaria para la localización nuclear de la misma. Esta región aislada, debe ser suficiente para promover la importación de otra proteína citosólica no relacionada y debe ser capaz de interactuar con factores de transporte nuclear de manera directa, tal que se inhiba su entrada al núcleo de las células si se secuestra a su receptor de transporte [68].

La primera señal de localización nuclear identificada a nivel molecular fue la del antígeno T-grande de SV40 (<sup>126</sup>PKKKRK<sup>132</sup>), una secuencia rica en aminoácidos básicos que es necesaria y suficiente para promover el transporte nuclear de una proteína citoplásmica. La segunda, fue encontrada en el extremo C-terminal de la nucleoplasmina de *X. laevis* (<sup>155</sup>KRPAATKKAGQAKKK<sup>170</sup>), un complejo proteínico que funciona como

chaperona en el ensamblaje del nucleosoma de este organismo [24]. Ambas secuencias son consideradas prototipos de NLS sometidas a la vía de importación nuclear clásica y contienen una (monopartita) o dos (bipartita) regiones pobladas de residuos positivos, generalmente arginina (R) o lisina (K).

**Tabla 1-1. Ejemplos de algunos tipos de señales de localización nuclear [24].** La diversidad y la complejidad de las señales reconocidas por las importinas han obstaculizado la predicción de sustratos; sin embargo, en el pasado se ha hecho un esfuerzo notable por clasificar y estudiar a las NLS, así como a sus receptores de transporte respectivos. Caracterizar el mecanismo de importe de una proteína, así como su localización subcelular basal, podría ayudar a predecir su función y a evaluar el efecto que tiene en otros procesos relevantes que ocurren dentro de las células.

Tipo de NLS	Proteína	Secuencia
NLS clásicas monopartitas	Antígeno T-grande de SV40	125PKKKRKV132
	Antígeno T-grande de polioma	189VSRKRPRP196
	Antígeno del virus de la hepatitis D	68EGAPPAKRAR75
	p53 de murino	311PPQPKKKPLDGE322
	NF-κB p50	367QRKRQK372
	NF-κB p65	281EEKRKR286
NLS clásicas bipartitas	c-myc de humano	320PAAKRVKLD328 / 364RQRRNELKRSF374
	Nucleoplasmina de <i>X. Laevis</i>	154KRPAATKKAGQAKKKLD171
Secuencias ricas en arginina	RCC1	1MSPKRIAKRRSPPADAIPKSKKVKVSHR28
	Proteína Rex de HTLV-1	1MPKTRRRPRRSQKRKRPPT18
NLS atípicas	Proteína Rev de HIV-1	24RQARRNRRRRWR48
	Mato2	1MNKIPIKDKKNPQ113/144VRILESWFAKNI158
	Antígeno del virus de la hepatitis B	21SKCLGWLWG29
	rpL23a de humano	32VHSHKKKKIRTSPFTTTPKTLRLRRQPKYPR-KSAPRRNKLDHY74
	hnRNP A1 de humano	328NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGYPYGGGGQ-YFAKPRNQGGY385
	SREBP2	349RSSINDKIIELKDLVMGTDAKMHHKSGVLRK-AIDYIKYLOQVNHKLRQENMVLKLANQKNKL409

Otras señales verificadas experimentalmente, como la de la proteína humana c-myc (<sup>320</sup>PAAKRVKLD<sup>328</sup>), difieren ligeramente del consenso y presentan un menor número de residuos básicos. La NLS de la proteína hnRNP A1, M9, consta de 38 aminoácidos esenciales para su importación y exportación nuclear; mientras que los factores de transcripción STAT1 y STAT2 forman homodímeros (STAT1/STAT1) y heterodímeros (STAT1/STAT2) cuyo transporte depende de elementos ricos en lisina y arginina que se localizan en el dominio de unión a ADN de cada subunidad [24].

Lee *et al.* describen tres criterios esenciales para el reconocimiento de sustratos por la carioferina-β2, que, como se mencionó anteriormente (véase sección 1.3.3), no requiere de una proteína adaptadora para transportar proteínas cargo. Las señales de localización nuclear que interactúan con esta carioferina (1) no poseen una estructura secundaria ordenada (p. ej. se encuentran en regiones que forman asas); (2) tienen un carácter global básico, debido a que la interfase de Kap-β2 está cargada negativamente; y (3) presentan dos regiones conservadas: un motivo central hidrofóbico o básico, seguido por una secuencia consenso localizada hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína que tiene la forma (R/H/K)-X<sub>2-5</sub>-PY y favorece energéticamente la interacción del sustrato con Kap-β2 [47].

Los tres puntos anteriores sugieren que este tipo de NLS son difíciles de predecir sólo a partir del análisis de la cadena primaria de aminoácidos de un polipéptido, pues, en general, presentan poca homología; sin embargo, se espera que la señal de importación se presente como un sitio de reconocimiento lineal, debido a la falta de estructura secundaria determinada.

Finalmente, numerosos estudios apuntan a que algunas proteínas que no contienen señales de localización nuclear pueden entrar al núcleo por mecanismos que no requieren la formación de complejos con receptores de transporte; es posible que estos procesos estén mediados por interacciones directas con los motivos FG de las nucleoporinas, o bien, que se den debido a la asociación con otro polipéptido con una NLS funcional; esta vía de importación, conocida como *co-transporte* o *piggyback*, parece contribuir a la localización nuclear de una mutante defectiva del antígeno del virus de la hepatitis D [24]. En el presente estudio se considera la posibilidad de que la ARN polimerasa II, utilice precisamente esta ruta para transportarse al núcleo de las células y, con base a la evidencia experimental antes presentadas, se propone a Parcs/Gpn3 como un candidato para llevar a cabo esta función.



## Capítulo 2

### Objetivos y justificación

#### 2.1. Objetivo general

Determinar si la GTPasa Parcs/Gpn3 de *Homo sapiens* (hGpn3) tiene una señal de localización nuclear funcional que medie su importe al núcleo de las células.

##### 2.1.1. Objetivos particulares

Con el propósito de satisfacer el objetivo general planteado en este proyecto, se propusieron los siguientes objetivos particulares como lineamientos para la estructuración del estudio.

1. Identificar regiones de aminoácidos en hGpn3 que se ajusten a secuencias de localización nuclear consenso reportadas con anterioridad.
2. Evaluar la condición *suficiente* de las secuencias encontradas mediante construcciones que codifiquen para una proteína híbrida con el polipéptido reportero tetra-EGFP.
3. Determinar la condición *necesaria* de estos fragmentos realizando mutaciones puntuales en el contexto de la proteína hGpn3 completa y analizando sus efectos.

#### 2.2. Justificación

La evidencia presentada hasta ahora señala que Parcs/Gpn3 y la ARN polimerasa II interactúan físicamente [8] y que están involucradas en un mecanismo celular crucial, el cual es aún desconocido.

La ARNP II, un complejo de 12 subunidades con un peso molecular de ~550 kDa, debe ser importada al núcleo de las células eucariontes para realizar su función [15]; sin embargo, en ninguna de las doce subunidades de esta enzima se ha podido identificar una señal de localización nuclear hasta la fecha. Lo anterior, sugiere que la ARN polimerasa II podría asociarse a algún factor que contenga una NLS funcional para mediar su transporte nuclear.

Se ha demostrado, anteriormente, que Parcs/Gpn3 es esencial para la acumulación nuclear de la ARNP II [8]; por lo que podría ser esta pequeña GTPasa la que le confiera a la ARN polimerasa II la capacidad de entrar al núcleo de las células. En el presente estudio, se consideró la posibilidad de que la secuencia de Parcs/Gpn3 pudiera contener una señal de localización nuclear funcional que se encargara de cumplir con este trabajo. Proponiendo, al mismo tiempo, un mecanismo razonado por medio del cual esta proteína y la ARNP II podrían estar involucradas; el cual, asimismo, es consistente con las observaciones realizadas en torno a esta asociación.

Como una proteína novel, reportada por primera vez en el 2008 [78], la información que existe en las bases de datos sobre Parcs/Gpn3 es exigua; por esta razón, también resulta de especial interés para los fines este proyecto, elucubrar estrategias que contribuyan a dilucidar la relevancia funcional y biológica de esta proteína. El conocer su localización basal dentro de las células, por ejemplo, podría revelar información importante no sólo sobre su posible función, sino también, sobre los procesos intra- y extra-celulares en los que pueda estar involucrada.

## Capítulo 3

### Metodología experimental

En *Molecular basis for the specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization*, Marfori *et al.* discuten cuatro criterios básicos para confirmar experimentalmente la funcionalidad de una señal de localización nuclear: (1) la secuencia debe ser *suficiente* para dirigir el importe de una proteína reportera –originalmente citoplasmática– al núcleo celular; (2) debe ser *necesaria*, es decir, la delección o alteración de la probable NLS, en el contexto del péptido completo, tendrá como resultado el bloqueo total o parcial del transporte; (3) la perturbación de la ruta de transporte debe paralizar total o parcialmente el importe de la proteína; y, finalmente, (4) la señal tiene que interactuar directamente con un receptor de la vía de importe nuclear [44, 50]. La estrategia diseñada para verificar la hipótesis planteada en este estudio, está basada en estas pautas y consistió en *obtener construcciones moleculares que permitieran evaluar si la GTPasa hGpn3 contiene una señal de localización nuclear funcional en su secuencia primaria de aminoácidos*.

El desarrollo del proyecto está sustentado, entonces, en tres fases dirigidas a satisfacer el objetivo general, así como los objetivos específicos, descritos en el capítulo anterior:

1. Identificación de regiones de aminoácidos en hGpn3 que se ajusten a secuencias consenso de localización nuclear reportadas con anterioridad.
2. Obtención de construcciones moleculares que permitan sobre-exresar proteínas de fusión, las cuales contengan una posible NLS unida a un reportero originalmente citoplasmático (ptetraEGFP), en células HEK 293T/17.
3. Realización de mutaciones puntuales dirigidas sobre residuos específicos dentro de los dominios que contienen a las secuencias probables en el contexto de la proteína completa para evaluar si la secuencia propuesta es necesaria.
4. Análisis del efecto que tiene la perturbación de la ruta de importación nuclear en la localización subcelular de una proteína fusión entre hGpn3 y EYFP.

Sobre estos puntos se disertará detalladamente a lo largo del capítulo.

#### **3.1. Identificación de señales de localización nuclear probables en hGpn3**

Con el propósito de determinar si hGpn3 es importada o no al núcleo de la célula, fue menester partir de la información disponible en bases de datos integrativas, como *HomoloGene* y *Protein* de NCBI [55]; como ocurre con muchas otras proteínas que han sido reportadas recientemente (ver sección 1.1), aún son insuficientes las anotaciones que pueden rescatarse de las bases de datos con respecto a la localización subcelular, estructura secundaria y motivos funcionales de hGpn3. Así, para encontrar regiones en el péptido que se ajustaran a señales de localización nuclear consenso, de acuerdo con los objetivos de este trabajo, se recurrió al uso de servidores de predicción y a una cuidadosa inspección visual.

En relación al análisis *in silico* que se hizo de la cadena proteica, se enumeran a continuación los programas empleados y se describen, brevemente, los métodos de predicción en los que se apoyan.

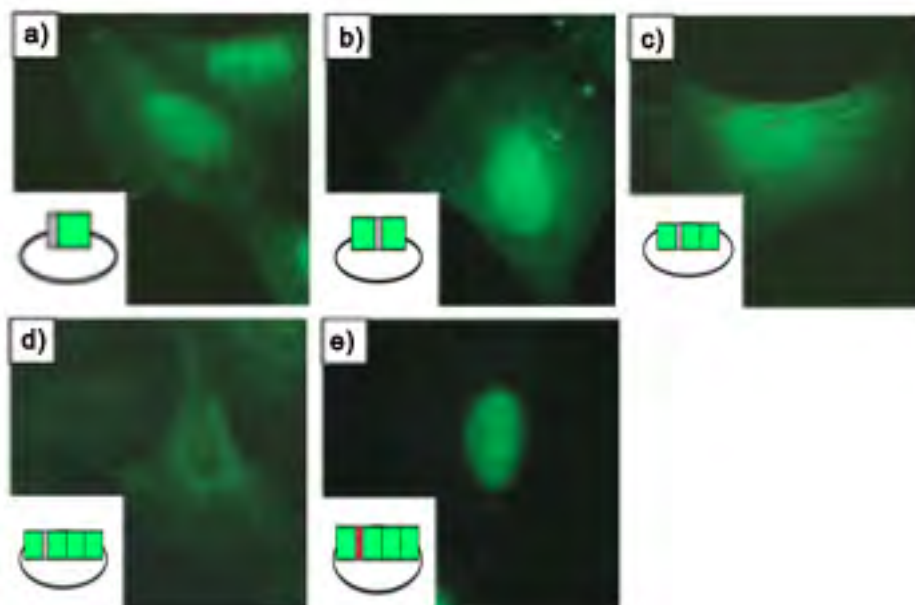
- *PSORTII* y *WoLF PSORT* [54, 67]. Para la detección de NLS clásicas, el servidor procesa las secuencias comparándolas con tres patrones: (1) 'pat4' que consiste en una región de cuatro residuos básicos (lisina o arginina) o tres aminoácidos básicos acompañados por histidina o prolina; (2) 'pat7' que tiene la forma P-(K/R)<sub>3/4</sub>; y (3) 'bipartite' cuya configuración es (K/R)-(K/R)-X<sub>10</sub>-(K/R)<sub>3/5</sub>.
- *cNLS Mapper* [13]. Predice señales de localización nuclear que son reconocidas específicamente por el complejo Imp- $\alpha$ /Imp- $\beta$  (ver sección 1.3.3), asignando coeficientes de funcionalidad a cada aminoácido dentro de una región particular y calculando la contribución por residuo a la actividad de NLS global del fragmento de secuencia estudiado.
- *PredictProtein* [53, 65]. Utiliza motivos asociados a señales de localización nuclear *bona fide* que han sido probados experimentalmente y que se encuentran reportados en bases de datos como PDB y SWISS-PROT/TrEMBL, para determinar el porcentaje de identidad de cada uno con la proteína de interés. *PredictProtein* emplea además una lista extendida de NLS posibles que está basada en un proceso sistemático de 'mutagénesis *in silico*', en el cual se reemplaza un residuo y el servidor monitorea el resultado de la sustitución incorporándolo u no al catálogo, según sea el caso.

### 3.2. Evaluación de la condición *suficiente*

Se dice que una señal de localización nuclear es *suficiente* si al ser fusionada, por medio de tecnologías de ADN recombinante, a una proteína originalmente citoplasmática, es capaz de dirigir el tránsito facilitado de la misma a través de los poros nucleares, ocasionando su acumulación en el núcleo de las células [1]. En el presente proyecto se diseñaron cuatro construcciones moleculares que permitieron sobre-exresar a proteínas de fusión entre NLS probables de hGpn3 y un polipéptido citosólico, cuyo un peso molecular (100 kDa) supera con un amplio margen el límite de difusión pasiva entre el núcleo y el citoplasma.

#### 3.2.1. Construcciones moleculares

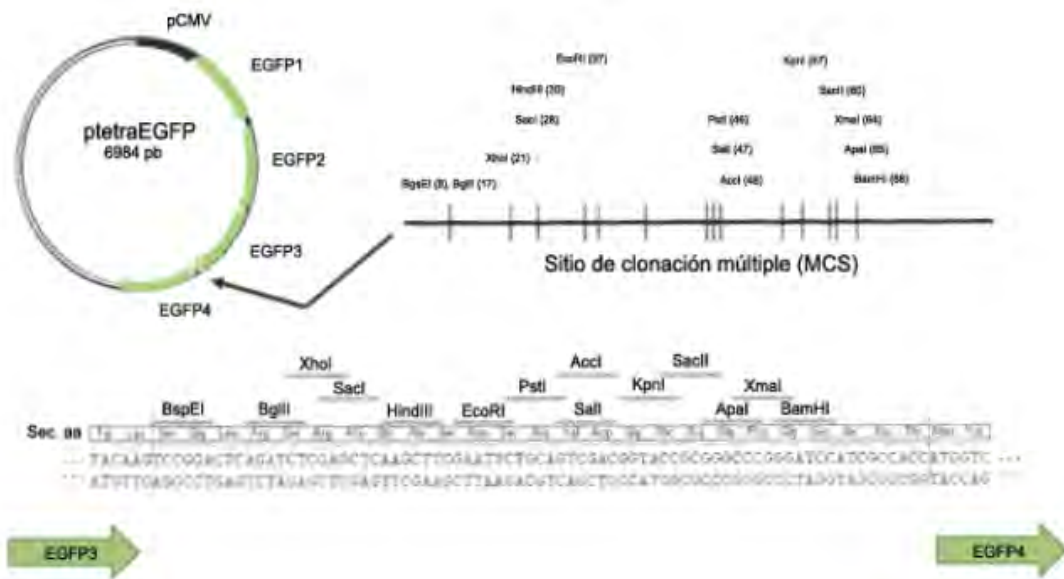
##### 3.2.1.1. Sistema reportero ptetraEGFP



**Figura 3-1. Localización subcelular de mono-, bi-, tri- y tetraEGFP [6].** a) pmonoEGFP (25kDa), b) pbiEGFP (50 kDa) y c) ptriEGFP (75kDa) se localizan en el núcleo y el citoplasma, entran al núcleo por difusión

pasiva; d) ptetraEGFP (100 kDa) es un reportero citoplasmático; e) la NLS de SV40 (rectángulo rojo), una secuencia de localización funcional, insertada en el sitio de clonación múltiple (rectángulo gris) de ptetraEGFP es capaz de dirigir la importación del vector al núcleo de las células.

Para probar la funcionalidad de las secuencias localización nuclear encontradas en la espastina, una proteína codificada por el gen SPG4 que está asociado con la forma clínica más frecuente de PEH (Paraplejía Espástica Hereditaria), Beetz *et al.* [6] desarrollaron un sistema reportero basado en la fusión de cuatro unidades de la proteína fluorescente verde; este constructo logra prevenir de forma eficiente la difusión pasiva del reportero convencional EGFP al núcleo de las células, incrementando su peso molecular (véase figura 3-1). El vector ptetraEGFP (véase figura 3-2), que codifica para este polipéptido, se utilizó en este estudio con el fin de evaluar la condición suficiente de las cuatro posibles señales de localización nuclear que fueron identificadas en la secuencia de hGpn3. La obtención de las construcciones moleculares que emplearon para tal efecto, requirió el uso de diversas técnicas de biología molecular, las cuales se describen a continuación.



**Figura 3-2.** Mapa de restricción del vector ptetraEGFP [6]. ptetraEGFP codifica para una un reportero citoplasmático (100 kDa) formado por cuatro proteínas fluorescentes verdes; el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector se encuentra entre la tercera y la cuarta EGFP.

### 3.2.1.2. Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de introducir los fragmentos de ADN codificantes para las regiones de aminoácidos identificadas como posibles NLS (véase sección 4.1) en el vector reportero ptetraEGFP, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos con la ayuda del programa *CLC Sequence Viewer* de CLC bio [12] y, por supuesto, la secuencia primaria de la proteína hGpn3, que se obtuvo de la base de datos *Protein* de NCBI [55]. Los péptidos respectivos para los que codifica cada par de oligonucleótidos se indican también.

- **hGpn3-NLS-Bipartita:**

*Oligonucleótido 5'*: AATTCTCTGCTGAGTAAAAAGCAAAAAGGAAATTGAGAA  
ATTTTTAGATCCAGACATGTATTCTTTATTAGAAGATTCTACA  
AGTGACTTAAGAAGCAAAAATTCAAGAACTGACTAAAGCT  
G

*Oligonucleótido 3'*: GATCCAGCTTTAGTCAGTTTCTTGAATTTTTGCTTCTTAAG  
TCACTTGTAGAATCTTCTAATAAAGAATACATGTCTGGATCT  
AAAAATTTCTCAATTTCTTTTTGCTTTTTTACTCAGCAGA

G

*Péptido:* <sup>178</sup>LLSKKAKKEIEKFLDPDMYSLLEDSTSDLRSKKFKKLTKA<sup>217</sup>

- **hGpn3-NLS-Parte A:**

*Oligonucleótido 5':* AATTCTCTGCTGAGTAAAAAGCAAAAAGGAAATTGAGAA  
AG

*Oligonucleótido 3':* GATCCTTTCTCAATTCCTTTTTTGCTTTTTTACTCAGCAGA  
G

*Péptido:* <sup>178</sup>LLSKKAKKEIEK<sup>189</sup>

- **hGpn3-NLS-Parte B:**

*Oligonucleótido 5':* AATTCTAGTGACTTAAGAAGCAAAAATTCAAGAACTGACT  
AAAGCTG

*Oligonucleótido 3':* GATCCAGCTTTAGTCAGTTTCTTGAATTTTTTGCTTCTTAAG  
TCACTAG

*Péptido:* <sup>203</sup>SDLRSKKFKKLTKA<sup>217</sup>

- **hGpn3-NLS-hPY:**

*Oligonucleótido 5':* AATTCTCTGACTAAAGCTATATGTGGACTGATTGATGACTA  
CAGCATGGTTTCGATTTTTACCTTACGATCAGTCAGATGAAG  
AAG

*Oligonucleótido 3':* GATCCTTCTTCATCTGACTGATCGTAAGGTAAAATCGAAC  
CATGCTGTAGTCATCAATCAGTCCACATATAGCTTTAGTCA  
GAG

*Péptido:* <sup>214</sup>LTKAICGLIDDYSMVRFLPYDQSDEE<sup>239</sup>

Los cinco primeros nucleótidos de cada secuencia, marcados en verde y azul, corresponden a los sitios de reconocimiento de las enzimas EcoRI y BamHI, respectivamente; mismos con los que los fragmentos serán introducidos en el vector ptetraEGFP.

Se han señalado, en los péptidos, los aminoácidos de las NLS propuestas que se ajustan a las secuencias consenso reportadas con anterioridad [43, 50, 102]. En este punto y con respecto al diseño de los oligonucleótidos, se puso especial atención a que, de acuerdo con Fontes *et al.*, los residuos anteriores y posteriores a los aminoácidos consenso pueden contribuir significativamente a la eficiencia de una señal de localización nuclear [22, 47] y, así, se incluyeron cuatro o cinco residuos adicionales en cada extremo de las secuencias.

### 3.2.1.3. Apareamiento de oligonucleótidos complementarios

Una vez diseñados, los oligonucleótidos fueron sintetizados por SIGMA-ALDRICH y se recibieron desalados y liofilizados. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 minuto y se resuspendieron en TE 1x (10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA) a una concentración final de 250 pmol/μl.

Previo a su inserción en el vector ptetraEGFP, cada par de oligonucleótidos fue hibridado para asegurar la asociación complementaria y antiparalela de las hebras simples mediante puentes de hidrógeno [74, 89]; la reacción de apareamiento se muestra en la tabla 3-1.

**Tabla 3-1. Reacción de apareamiento de oligonucleótidos.** Izquierda, mezcla 1:1 para la hibridación de los oligonucleótidos que codifican para las posibles NLS identificadas en hGpn3; derecha, control de apareamiento.

177.5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O desionizada	177.5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O desionizada
2.5 $\mu$ l	NaCl 4M	2.5 $\mu$ l	NaCl 4M
10.0 $\mu$ l	Oligonucleótido 5'	20.0 $\mu$ l	TE 1x
10.0 $\mu$ l	Oligonucleótido 3'	200.0 $\mu$ l	
<u>200.0 <math>\mu</math>l</u>			

La mezcla se incubó a 95°C durante 5 minutos en un baño de agua para remover estructuras secundarias y, posteriormente, se dejó enfriar hasta que el baño alcanzó la temperatura ambiente; se espera que los oligonucleótidos se apareen en este último paso y, por ello, se procura una razón pequeña en el descenso de la temperatura para aumentar la eficiencia de hibridación.

#### 3.2.1.4. Reacción de restricción

El fragmento, ahora de doble hebra, codificante para las posibles NLS identificadas en la sección 4.1, se introdujo en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector reportero ptetraEGFP (véase figura 3-2), el cual consiste en una secuencia de nucleótidos que es específicamente reconocida por algunas endonucleasas, conocidas también como enzimas de restricción tipo II; bajo ciertas condiciones experimentales, dichas enzimas son capaces de cortar la doble cadena del ADN hidrolizando los enlaces fosfodiéster que unen a los nucleótidos, dejando extremos complementarios (cohesivos) o romos (desoxinucleoridil transferasa terminal) [1].

El plásmido ptetraEGFP se digirió enzimáticamente con EcoRI hacia el extremo 5' y BamHI hacia el extremo 3', incubando la reacción en un baño de agua a 37°C durante 3 horas; la temperatura y el tiempo empleados durante la restricción, son necesarios para la actividad óptima de las enzimas y están de acuerdo con las recomendaciones del protocolo sugerido por el fabricante (*New England BioLabs, NEB*). Igualmente, se verificó que ambos sitios de reconocimiento fuesen únicos, para evitar cortes inespecíficos. Los reactivos utilizados para la reacción de restricción, así como las cantidades utilizadas, se muestran en la tabla 3-2.

**Tabla 3-2. Mezcla para la reacción de digestión.** Proporciones y reactivos requeridos la doble digestión enzimática del vector ptetraEGFP con las endonucleasas EcoRI y BamHI. La etiqueta HF en las enzimas indica que se han utilizado las versiones respectivas de alta fidelidad, que evitan cortes inespecíficos bajo condiciones no estándar de restricción (p.H. elevado, altas concentraciones de glicerol).

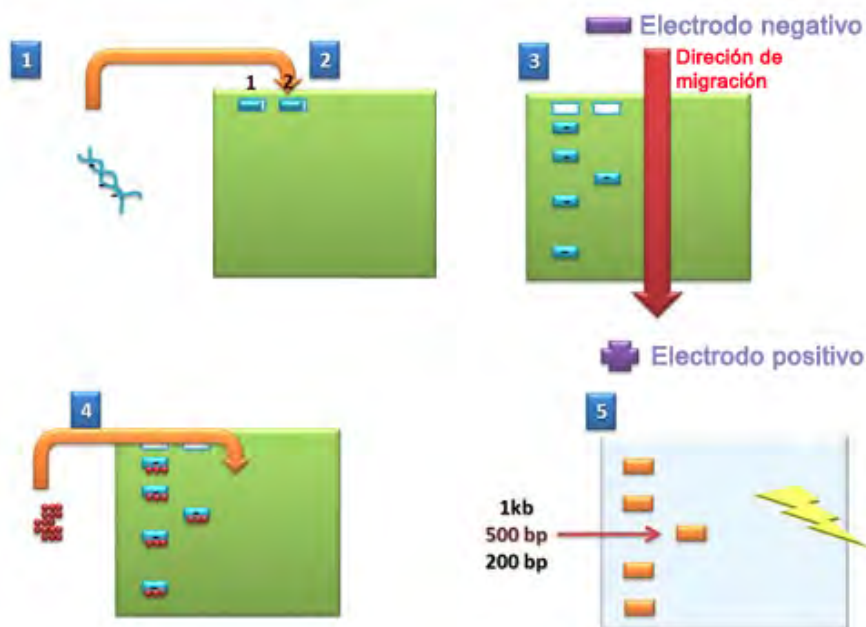
16.0 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O desionizada
2.0 $\mu$ l	Buffer 4 10x (NEB)
1.0 $\mu$ l	ptetraEGFP (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
0.5 $\mu$ l	EcoRI-HF (NEB)
0.5 $\mu$ l	BamHI-HF (NEB)
<u>20.0 <math>\mu</math>l</u>	

### 3.2.1.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Esencialmente, la estructura general de un nucleótido, unidad monomérica de los ácidos nucleicos (ADN, ARN), consiste en una base nitrogenada, un azúcar (desoxirribosa, ribosa) y un grupo fosfato que le confiere una carga negativa; una cadena de ADN poseerá, entonces, una carga negativa neta proporcional al número de bloques fundamentales del que esté compuesto. La electroforesis de ADN es un método no-desnaturalizante que aprovecha esta propiedad para analizar y caracterizar fragmentos lineales de ácidos nucleicos mediante una diferencia de potencial [1].

Ahora bien, ya que la carga de una secuencia se supone aproximadamente proporcional al número de nucleótidos o, en el caso de una doble hebra, de pares de bases, el coeficiente carga/masa será independiente de su longitud. Para fragmentos de ADN de doble cadena, que no formen apareamientos intramoleculares como podría ocurrir en el caso de ARN o ADN de cadena sencilla, la velocidad de migración de cualquier segmento ocasionada por la presencia de un campo eléctrico entre dos electrodos sería la misma sin un medio adecuado [75, 76]. En vista de esta cuestión, se requiere también de una red porosa que retarde el paso de las moléculas de acuerdo a su tamaño.

La matriz, conocida también como soporte electroforético, consta de un gel con una dimensión de poro definida con respecto al rango de pares de bases en el que se encuentre la muestra. Comúnmente, y en el caso particular de este estudio, el material empleado para discriminar fragmentos de ADN de acuerdo a su peso molecular es agarosa, un polisacárido aislado originalmente de algas marinas, disuelto en TAE 1x (40 mM Tris Acetato, 1 mM EDTA pH=8.0) [1]. A temperatura ambiente, este polímero orgánico es insoluble; sin embargo, si se calienta por arriba de 50°C se solubiliza y, al enfriarse, toma la forma de una trama tridimensional de consistencia semi-sólida. Interesantemente, la concentración de la disolución determina el grado de compactación de la red, *i.e.* el tamaño de los poros: una mayor concentración implica una mayor compactación de la red (poros más pequeños) y, por lo tanto, una menor velocidad de migración, capaz de separar eficientemente segmentos pequeños de ADN.



**Figura 3-3. Representación esquemática del proceso de electroforesis de ADN en geles de agarosa [2].** El tamaño de un fragmento linealizado de ADN (1) puede determinarse corriendo la muestra en un gel de agarosa del porcentaje adecuado (2). Las cadenas de ADN tienen una carga neta negativa que es proporcional a su longitud; de esta forma, cuando el sistema se somete a una diferencia de potencial y la muestra pasa por la red porosa del gel, los segmentos migran como bandas diferenciadas (3). Marcadores de peso molecular con fragmentos de ADN de tamaños conocidos se utiliza comúnmente para estimar la longitud de la muestra;

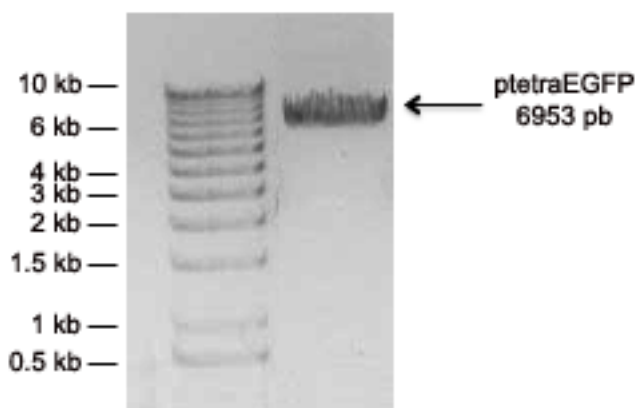


mientras que un agente intercalante (4), como bromuro de etidio, le confiere fluorescencia al exponerla a la luz ultravioleta para su observación (5).

Un agente intercalante que se une a los ácidos nucleicos, como el bromuro de etidio (BrEt) que es fluorescente cuando es expuesto a la luz ultravioleta, puede emplearse para la observación de los segmentos diferenciados, si el gel se ilumina con una lámpara de luz UV al término del proceso de electroforesis. Asimismo, se utilizan marcadores de peso molecular estándar para estimar el número de bases del ADN de interés; un buffer de carga con azul de bromofenol, un colorante con carga negativa que facilita el seguimiento de la muestra a lo largo del gel; y, finalmente, un buffer electroforético (TAE 1x) en el que se sumerge la matriz porosa para cerrar el circuito.

En la figura 3-2, se presentan de forma simplificada los pasos que se llevan a cabo durante la electroforesis de ADN en geles de agarosa. Una muestra lineal de doble cadena (1) se deposita en un pozo del gel (segundo carril), junto a los marcadores de peso molecular (primer carril) (2); después, una diferencial de potencial ocasiona la migración de los fragmentos de ADN, que se separan por tamaño debido a las porosidades de la red (3); una etiqueta molecular fluorescente, se intercala entre las bases nitrogenadas de las hebras (4) y emite luz cuando se hace incidir un haz ultravioleta sobre el soporte electroforético, permitiendo la visualización de bandas con diferentes pesos moleculares (5).

El vector ptetraEGFP, cortado previamente con las endonucleasas EcoRI y BamHI, se corrió, paralelo a los marcadores de peso molecular de 1 kb (*1 kb DNA Ladder* de NEB), en un gel de agarosa al 1% (0.4 g de agarosa diluidos en 40 ml de TAE 1x y 1 µl de bromuro de etidio) en 300 ml de buffer de electroforesis (TAE 1x) a una diferencia de potencial de 80 V durante un tiempo aproximado de 70 min. El tamaño del plásmido linealizado se comprobó con la ayuda de un fotodocumentador (*Gel Doc XR System* de BIORAD) y el software *Quantity One* (véase figura 3-4); y se purificó, posteriormente, siguiendo el protocolo sugerido por QIAGEN con el kit de extracción de ADN en gel (*QIAquick Gel Extraction Kit*).

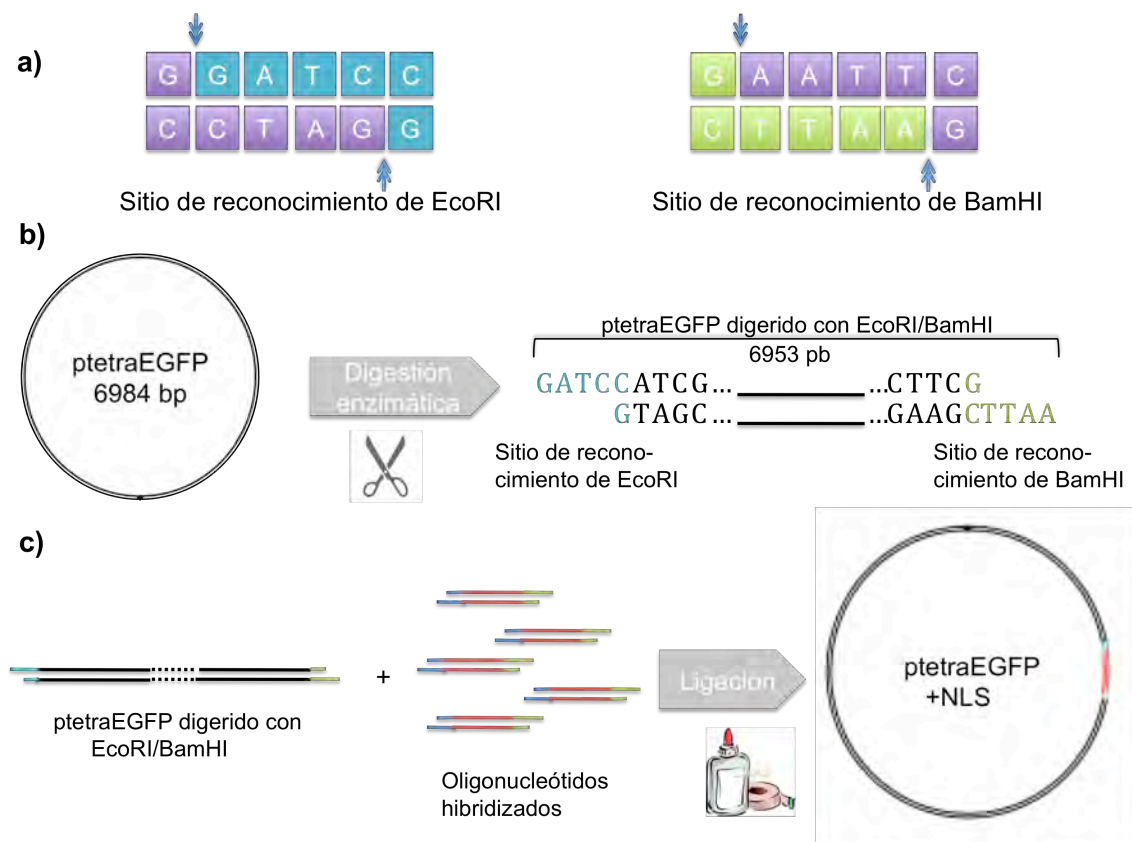


**Figura 3-4. Vector ptetraEGFP cortado con EcoRI y BamHI.** El plásmido circular tiene 6984 pb: sin embargo, después de la restricción enzimática se libera el fragmento de 31 pb que se encuentra entre los sitios de corte de EcoRI y BamHI (véase figura 311-1), de tal forma que el vector linealizado tiene sólo 6953 pb.

### 3.2.1.6. Reacción de ligación

Las ligasas son enzimas cuya función es unir fragmentos de ADN durante los procesos de reparación, replicación y recombinación, utilizando ATP como cofactor para fosforilar los extremos 5' de las cadenas de nucleótidos y catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el 3', uniéndolos así de forma covalente [1].

En condiciones *in vitro*, es posible generar cadenas de ADN recombinantes ligando fragmentos de interés con extremos compatibles. Los oligonucleótidos codificantes para las posibles NLS identificadas en hGpn3 fueron diseñados de tal forma que, una vez apareados, tuvieran cuatro nucleótidos sobresalientes que coincidieran con los extremos cohesivos del vector ptetraEGFP linealizado (véase figura 3-5).



**Figura 3-5. Digestión enzimática de ptetraEGFP y ligación del vector con los oligonucleótidos hibridados.** a) Sitios de restricción de las endonucleasas EcoRI y BamHI; los oligonucleótidos que codifican para las secuencias identificadas fueron diseñados con extremos que son compatibles con estos sitios. Las flechas azules indican el sitio de corte de la enzima. b) El vector ptetraEGFP codifica para una proteína reportera citoplasmática; para insertar el fragmento en este plásmido circular, es necesario digerirlo enzimáticamente. c) Se requiere una reacción de ligación con una razón molar vector-inserto de 1:5 para unir el oligonucleótido al vector.

La reacción de ligación de estas secuencias se llevó a cabo en un baño de agua a 16°C por un tiempo aproximado de 16 h, de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante de la ligasa utilizada, *T4 DNA Ligase (NEB)*. La temperatura óptima de actividad para la enzima es de 25°C [66]; sin embargo, se puede mejorar la eficiencia de la ligación si se considera que, de excederse la temperatura de desnaturalización de los extremos cohesivos (12-16°C para cuatro nucleótidos), el apareamiento inestable de las bases sería una limitante para la reacción [87].

**Tabla 3-3. Mezcla para la reacción de ligación de un oligonucleótido híbrido que codifica para una de las cuatro posibles NLS y el vector ptetraEGFP.** En el control de ligación se utilizan las mismas proporciones en los reactivos, pero el inserto es reemplazado por agua desionizada o TE 1x.

7.5 µl	Oligonucleótido hibridado (inserto)
1.5 µl	Vector ptetraEGFP digerido con EcoRI/BamHI
1.0 µl	Buffer T4 DNA Ligase (NEB)
0.5 µl	T4 DNA Ligase (NEB)
10.0 µl	

La mezcla (véase tabla 3-3) se preparó en hielo debido a que el buffer o tampón de la ligasa contiene ATP, el cual, como se mencionó anteriormente, es esencial para su actividad y se degrada rápidamente con fluctuaciones en la temperatura. Además, se añadió un control para verificar la efectividad de la ligación y de la posterior transformación en bacterias competentes (véase sección 3.2.1.7), en el cual los oligonucleótidos hibridados se reemplazaron por agua desionizada o TE 1x. Finalmente, se eligió un volumen de reacción pequeño en el que la razón vector/inserto 1:5 pudiese favorecer la función de la enzima.

### 3.2.1.7. Transformación de bacterias competentes

Aún cuando se optimice el protocolo de la reacción, el producto típico de una ligación es menor a 0.1 ng de ADN circular efectivamente cerrado [41]. Para extraer grandes cantidades de un vector particular es necesario, entonces, amplificarlo mediante la *transformación genética de bacterias competentes*. Los plásmidos utilizados durante el desarrollo de este proyecto contienen tres elementos principales que sirven a este propósito: (1) un marcador selectivo, que confiere resistencia a un antibiótico específico; (2) un origen de replicación (ORI), el cual marca el punto de partida para que la maquinaria genética haga copias de la cadena de ADN y, finalmente, (3) un sitio de clonación múltiple (MSC), en el que se puede insertar una secuencia de interés (véase sección 3.2.1.4 y figura 3-2).

La *transformación genética* es la alteración que sufre una célula como resultado de la incorporación de ADN exógeno a través de la membrana plasmática, desde el medio extracelular [81]; es un proceso que ocurre de forma natural, como en el caso de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, pero que también puede producirse en condiciones controladas aprovechando las características de los plásmidos que han sido mencionadas con anterioridad.

Debido a que el ADN es una molécula hidrofílica, es altamente improbable que atraviese la envoltura plasmática de una célula no-competente (*i.e.* que no puede transformarse espontáneamente); sin embargo, es posible llevar a un microorganismo a un estado de competencia mediante un procedimiento físico, como la electroporación, o por medio de agentes químicos que perturben temporalmente la permeabilidad de la membrana.

En este estudio se utilizaron dos cepas bacterianas (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* DH10 $\beta$ ), cuya capacidad de transformarse fue inducida de manera artificial en su fase logarítmica de crecimiento mediante un tratamiento con soluciones salinas (CaCl<sub>2</sub>) que altera la membrana de las células de tal manera que las prepara para incorporar el ADN del medio. Este tipo de bacterias, en particular, se caracterizan por tener una alta eficiencia de transformación y una tasa de crecimiento de una generación cada 20 minutos en condiciones normales de cultivo [96].

Para amplificar el plásmido deseado, se agregaron 2  $\mu$ l de la reacción de ligación (véase sección 3.2.1.5) a 100  $\mu$ l de bacterias competentes en presencia de CaCl<sub>2</sub> (0.1M CaCl<sub>2</sub> y glicerol al 15%); la mezcla se dejó reposar en hielo por 20 minutos para permitir que el ADN se adhiriera a la pared celular y, después, se le dio un choque térmico en un baño de agua a 42°C durante 1 minuto. Es en este paso en el que el material genético puede entrar a la célula a través de la envoltura plasmática debilitada, cuyo potencial de membrana se ve disminuido por una repentina liberación de lípidos al medio extracelular [58]. Luego, la transformación se incubó en hielo por otros 5 minutos, en los que el potencial de membrana tiene oportunidad de recuperarse, evitando así que el ADN exógeno escape.

Muchas células no sobreviven estos cambios escalonados de temperatura o se deterioran en alguna parte del proceso, por lo que es necesario un período de

recuperación, en el cual se les agregan 400 µl de medio LB/SOC, rico en glucosa, y se les permite dividirse a 37°C en agitación (200 rpm) durante 1 hora.

Finalmente, las bacterias se centrifugaron 1 minuto a 13,000 rpm, se resuspendieron en 60 µl de LB/SOC y se sembraron en un plato que contenía agar, medio LB y antibiótico (kanamicina, en este caso). Al día siguiente, después de haberlas incubado alrededor de 18 h a 37°C, se obtuvieron algunas colonias que fueron analizadas por medio de una PCR (véase sección 3.2.1.8).

Debido a la presencia del antibiótico en la caja en la que fueron sembradas, se espera que sólo sobrevivan aquellas colonias bacterianas que hayan incorporado el ADN exógeno de interés que les confiere resistencia. La ligación del fragmento deseado en el plásmido se examinó como se describe en la siguiente sección.

### 3.2.1.8. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, o bien PCR, es una técnica *in vitro* que permite amplificar una región específica de un fragmento de ADN, aprovechando la actividad enzimática de una ADN polimerasa termoestable para sintetizar ADN [64].

El proceso de replicación del material genético en las células, se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular; en esta etapa, la ADN polimerasa cataliza la polimerización de nucleótidos mediante un mecanismo semi-conservativo, en el cual, la enzima usa una hebra precursora de ADN como templado para hacer una nueva, que es complementaria [1]. Extraordinariamente, las ADN polimerasas aisladas de ciertos organismos pueden realizar esta función de forma cíclica en condiciones artificiales generando alrededor de  $2^{36}$  copias a partir de una sola molécula de ADN [94].

En el procedimiento *in vivo*, las helicasas, que son proteínas motoras, se encargan de separar la doble hélice utilizando energía derivada de la hidrólisis de ATP; sin embargo, la metodología *in vitro* emplea un protocolo automatizado de temperaturas que supe esta función y está basado en la temperatura de desnaturalización y apareamiento del ADN, así como en la temperatura óptima de actividad de una polimerasa termoestable, *i.e.* que no se desnaturaliza a altas temperaturas [94] (véase tabla 3-4).

La figura 3-6 muestra, esquemáticamente, los primeros tres ciclos de una PCR. La reacción inicia con un paso de temperatura a 95°C de 2 minutos que tiene principalmente dos funciones: (1) romper las membranas celulares, en el caso de la PCR de colonia (ver abajo), o, en ocasiones, (2) activar la función enzimática de ciertas polimerasas. Posteriormente, se realizan ciclos iterativos que constan de tres fases:

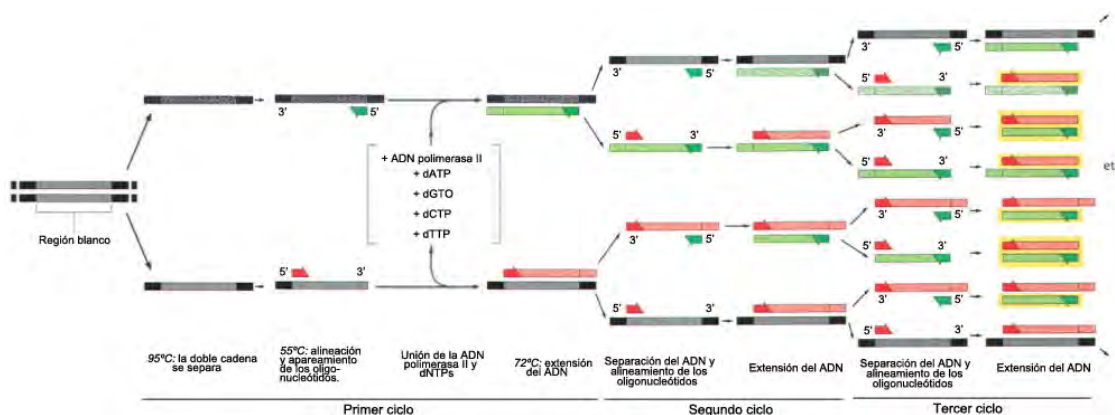
(1) *Desnaturalización del ADN (95°C)*: en este paso se desestabilizan los puentes de hidrógeno que unen a las bases nitrogenadas complementarias y la doble hélice se separa.

(2) *Alineación de los oligonucleótidos (55°C)*: los enlaces entre bases complementarias pueden volver a formarse; la mayoría de estas uniones se darán entre una cadena sencilla, que servirá como templado, y una secuencia corta de nucleótidos, sintetizada artificialmente para aparearse de forma perfecta y flanquear la región de interés. La temperatura a la que esto ocurra dependerá de la longitud y la composición de los oligonucleótidos, además de la rigurosidad del proceso (*i.e.* la especificidad que se busque en los productos sintetizados).

La polimerasa se acopla, entonces, a estos fragmentos 'alineados' de doble cadena y comienza a fabricar una nueva hebra extendiendo la secuencia de oligonucleótidos. La enzima se encarga de unir dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), que son los bloques de construcción del ADN, al extremo 3' de la cadena nueva mediante

la formación de enlaces fosfodiéster, usando como cofactor iones de magnesio que se encuentran en el buffer de la reacción.

(3) *Síntesis de la cadena complementaria (72°C)*: la razón de elongación de la polimerasa utilizada en esta parte del estudio (GoTaq polimerasa de *Thermus aquaticus*) tiene un máximo (60 nt/s) alrededor de 72°C [38], por lo que la mayor parte de la síntesis de ADN se lleva a cabo a esta temperatura.



**Figura 3-6. Representación esquemática de los tres primeros ciclos de una PCR [1].** El protocolo de temperaturas de una PCR cuenta con seis pasos de temperatura (véase tabla 3-4) y un ciclo iterativo de tres etapas (pasos 2, 3 y 4) que se muestra en esta figura. El ADN se desnaturaliza a altas temperaturas (95°C), la doble hélice se separa y cuando la temperatura vuelve a bajar (55°C) los oligonucleótidos (rojo y verde), a una concentración adecuada en la mezcla, pueden aparearse flanqueando los límites de la región de interés. Después, la polimerasa se ensambla sobre el fragmento recién formado de doble hebra y comienza a sintetizar una nueva cadena, uniendo dNTPs del extremo 5' al 3'. La velocidad de elongación de la enzima se optimiza, entonces, a 72°C en una etapa conocida como extensión. Luego, el ciclo se repite.

Después de 30 o 40 ciclos, el producto final contiene un basto número de copias de la región de interés; sin embargo, es necesario un último paso de 10 minutos a 72°C para garantizar que cualquier ADN de cadena simple que pueda quedar en la muestra sea extendido en su totalidad.

Terminada la reacción, la muestra puede conservarse durante un periodo de tiempo corto a 4°C y almacenarse a -20°C hasta volver a ser utilizada.

**Tabla 3-4. Protocolo de temperaturas para la PCR de colonia de la tabla 3-5.** El paso 1 también se incluye en PCRs, no necesariamente de colonia, en las que la activación de la función enzimática de la polimerasa depende la temperatura. Otras PCRs (*hot start*) se llevan a cabo a 80°C para asegurar una alta especificidad en el apareamiento de la reacción.

Paso	Temperatura	Duración	
1	95°C	2 minutos	x 30 ciclos
2	95°C	30 segundos	
3	55°C	45 segundos	
4	72°C	30 segundos	
5	72°C	10 minutos	
6	4°C	∞	

Rompimiento de las membranas celulares  
 Separación de la doble cadena  
 Alineación de los oligonucleótidos  
 Extensión en la dirección 5' → 3'  
 Extensión final  
 Conservación

Con el fin de verificar que las secuencias de nucleótidos que codifican para posibles NLS en hGpn3 se insertaron correcta y respectivamente en el sitio de clonación múltiple del vector ptetraEGFP, se realizó una PCR de colonia para amplificar selectivamente la región situada entre la tercera y la cuarta proteína fluorescente verde, *i.e.* el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector (véase figura 3-2), utilizando un par de oligonucleótidos que flanquean sus extremos 5' y 3':

**ptetraEGFP-MCS:**

*Oligonucleótido 5'*: TACAAGTCCGGACTCAGATCTCG

*Oligonucleótido 3'*: CAGCTTGCCGTAGGCGGCATCGCC

Siguiendo el protocolo sugerido por Sambrook *et al.* [75], la mezcla para la reacción (véase tabla 3-5) se preparó en hielo, agregando la enzima (GoTaq ADN polimerasa de Promega) al final, para evitar amplificaciones indeseadas por la actividad que pueda tener la polimerasa y los apareamientos inespecíficos que lleguen a darse a temperatura ambiente.

**Tabla 3-5. Reactivos y proporciones utilizadas en una PCR de colonia para comprobar la presencia de la secuencia que codifica para una posible NLS en el vector ptetraEGFP.** La mezcla del control es la misma; sin embargo, se omite la adición de la colonia bacteriana y, en su lugar, se adiciona 1µg de ptetraEGFP como templado.

15.6 µl	H <sub>2</sub> O desionizada
2.0 µl	Buffer de reacción de Taq DNA polimerasa 10x (Promega)
0.9 µl	DMSO (Sigma-Aldrich)
0.5 µl	Oligonucleótido 5' (33.33 µM) (Sigma-Aldrich)
0.5 µl	Oligonucleótido 3' (33.33 µM) (Sigma-Aldrich)
0.2 µl	Mezcla de dNTPs (10 mM cada uno) (BioRad)
0.3 µl	GoTaq ADN polimerasa 5 U/µl (Promega)
<u>20.0 µl</u>	

Asimismo, se adicionó DMSO (dimetilsulfóxido) al 4.5% para impedir la formación de estructuras secundarias y facilitar la separación de la doble hélice, especialmente en regiones con un alto contenido de guanina (G) y citosina (C), durante el proceso de desnaturalización.

Se prepararon tantas mezclas para PCR como colonias candidatas se obtuvieron, resultado de la transformación en bacterias competentes (véase sección 3.2.1.7); y, una vez listas, se les adicionó una pequeña porción de la colonia bacteriana a verificar, en condiciones estériles, que sería, evidentemente, la fuente del ADN plasmídico para amplificar. En el caso de la reacción control, se omitió este último paso y se añadió en su lugar 1µg de ptetraEGFP como templado.

Finalmente, y después de la PCR, las muestras fueron analizadas por electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 2.5% (véase secciones 3.2.1.5), el cual permitió observar diferencias de hasta 40 pb de forma cualitativa (véase sección 4.2).

### 3.2.1.9. Extracción y cuantificación de ADN

Las colonias en las que el inserto se introdujo correctamente en el vector de acuerdo al análisis de los productos de la PCR de colonia (véase sección 4.2), se inocularon en condiciones estériles y se cultivaron en 5ml de medio LB con kanamicina (10 µg/ml) a 37°C y 200 rpm durante 16 h. De esta forma, se pudo producir una cantidad considerable del material genético de interés aprovechando la eficiencia proliferativa de las cepas bacterianas utilizadas.

El ADN fue extraído posteriormente siguiendo el protocolo sugerido por QIAGEN con el kit de extracción de ADN por columnas (*QIAprep Spin Miniprep kit (250)*) y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (*SmartSpec Plus* de BioRad). La relación entre la absorbancia de la muestra a dos longitudes de onda distintas (260 nm y 280 nm) se usó para estimar la pureza del ADN obtenido [21]. Nótese que el

blanco de estas mediciones, *i.e.* la preparación empleada como referencia a partir de la cual el espectrofotómetro separa la señal del ruido, fue el mismo buffer en el que se eluyeron las muestras al cabo de la extracción, el cual consiste en una solución de 10 mM Tris-HCl pH=8.5.

Una dilución de cada muestra con 20 ng de ADN se analizó en el secuenciador *Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystems* del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) del IPICYT y, con la ayuda del programa *CLC Sequence Viewer* de CLC bio [12], que permite traducir la secuencia de nucleótidos a una cadena de aminoácidos en el marco de lectura apropiado, se verificó la presencia de los fragmentos de interés en el sitio de clonación múltiple del producto final, ahora listo para ser expresado en células de mamífero.

### 3.2.2. Cultivo celular

El término cultivo primario se refiere a la extracción de células provenientes de tejidos animales o vegetales que se crecen, subsecuentemente, en un ambiente artificial conductivo para su desarrollo, *i.e. in vitro*.

Las condiciones necesarias para el crecimiento son controladas y consisten, brevemente, en un medio de cultivo líquido o semi-sólido, que proporciona nutrientes esenciales como factores de crecimiento, glucosa y un pH adecuado; asimismo, el medio de crecimiento está usualmente suplementado con suero bovino fetal (FBS) o suero de caballo (HS) y antibióticos, como penicilina y estreptomina, para su óptimo rendimiento. Finalmente, una temperatura estable y una atmósfera compuesta por humedad y gases específicos también son requeridos para el mantenimiento continuo del cultivo [72].

#### 3.2.2.1. Protocolo de resiembra

Las líneas celulares utilizadas para el desarrollo de este proyecto (HEK 293T/17 y MCF-12A) son adherentes, por lo que normalmente se propagan como una monocapa unida al fondo del plato de cultivo o a una superficie tratada como un cubreobjetos de vidrio. Una vez que el cultivo alcanza un estado de confluencia, es decir, cuando, en condiciones ideales, las células se han dividido hasta ocupar el área disponible del sustrato de mantenimiento, entran en una fase denominada senescencia que, debido a la falta de espacio y nutrientes, impide su crecimiento y desarrollo posterior, conduciendo así a la muerte del cultivo [63]. Un protocolo rutinario de resiembra, permite realizar un subcultivo de la línea cada dos o tres días para evitar que las células se vuelvan senescentes. A continuación se describe en qué consiste este procedimiento de forma puntualizada.

En primer lugar, las células subconfluentes deben lavarse con PBS 1x (buffer fosfato salino) y removerse gentilmente del sustrato de crecimiento. Existen distintos métodos para llevar a cabo esta tarea de acuerdo a las particularidades de cada línea celular. En este caso, se empleó un método enzimático, conocido como tripsinización, en el cual una enzima proteolítica, tripsina, rompe las proteínas de adhesión secretadas por las células, despegándolas efectivamente del fondo del plato de cultivo. La acción de la tripsina se potenció con EDTA, un agente quelante que forma complejos con cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) que de otra manera impiden la actividad de la enzima [61, 73].

Las células adicionadas con tripsina-EDTA al 0.25% se incuban a 37°C durante 5 minutos (HEK 293T/17) ó 20 minutos (MCF-12A) y se recuperan con medio de cultivo fresco de tal forma que el suero inactive la tripsina; posteriormente, se centrifugan (3 minutos a 900 rpm) y se les retira el medio para eliminar cualquier residuo que pueda prevenir que las células se peguen al nuevo sustrato. Finalmente, se resuspenden en medio fresco y se cuentan en un hemocitómetro. Este último paso permite colocar la cantidad de células deseadas en un nuevo plato de cultivo para el mantenimiento de la línea, o bien, para la realización de experimentos.

### 3.2.2.2. Transfección transitoria de células HEK 293T/17 por fosfato de calcio

La línea celular HEK 293T/17, derivada de células embrionarias de riñón humano, es una variante de HEK 293, modificada en su origen a partir de células HEK transformadas con ADN fragmentado de adenovirus 5 de humano, acción que tuvo como resultado una inserción de 4.5 kb del genoma viral en el cromosoma 19 [33] (véase también sección 3.2.1.7). Presenta una morfología plana y poligonal en monocapa y se caracteriza por su alta eficiencia de transfección y comodidad en el manejo [3]; estos hechos, aunados a su disponibilidad, motivaron su uso en el presente estudio.

De acuerdo con el protocolo sugerido por *The American Type Culture Collection* (ATCC) [7], las células HEK 293T/17 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM de *GIBCO*) como medio de base, adicionado con suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomina, a una concentración final de 10% y 5%, respectivamente; y se crecieron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

20 h antes de la transfección, se sembraron 0.5x10<sup>6</sup> células en cajas de 6 pozos de 35 mm y se cultivaron en condiciones normales hasta que alcanzaron una confluencia de 70-80%. Luego, como preparación para el tratamiento, las células se lavaron con 1 ml de PBS 1x y, después, se les agregaron 2 ml de medio fresco por pozo.

Las técnicas de transfección celular parten del mismo principio que los métodos de transformación bacteriana (véase sección 3.2.1.7), *i.e.* la introducción de material genético exógeno a un organismo [27]. Cuando una cadena de ADN recombinante con una secuencia codificante y un promotor que regula su expresión, es asimilada por una célula, es posible producir una proteína interés ya sea de forma transitoria o estable, para evaluar su función, localización e importancia biológica.

Existen diversas estrategias para transfectar células eucariontes. Los métodos físicos emplean procedimientos mecánicos como microinyección, electropermeabilización, bombardeo de micropartículas recubiertas de ADN, entre otros [103], para introducir el ADN a las células. Los químicos, por otro lado, aprovechan la formación de complejos contenedores del material genético que pueden incorporarse a la vía endocítica (fosfato de calcio, DEAE dextran) o fusionarse con la membrana plasmática (lipofección) [27].

Durante el desarrollo de este proyecto, se transfectaron transitoriamente células HEK 293T/17 por fosfato de calcio, con el objetivo de evaluar la condición suficiente de las cuatro posibles NLS encontradas en hGpn3. Esta técnica se empleó debido a que presenta una eficiencia razonable en esta línea celular, produce niveles mínimos de toxicidad, es sencilla y tiene un bajo costo [49]. A continuación se describe brevemente su origen, así como el protocolo utilizado en esta etapa del estudio.

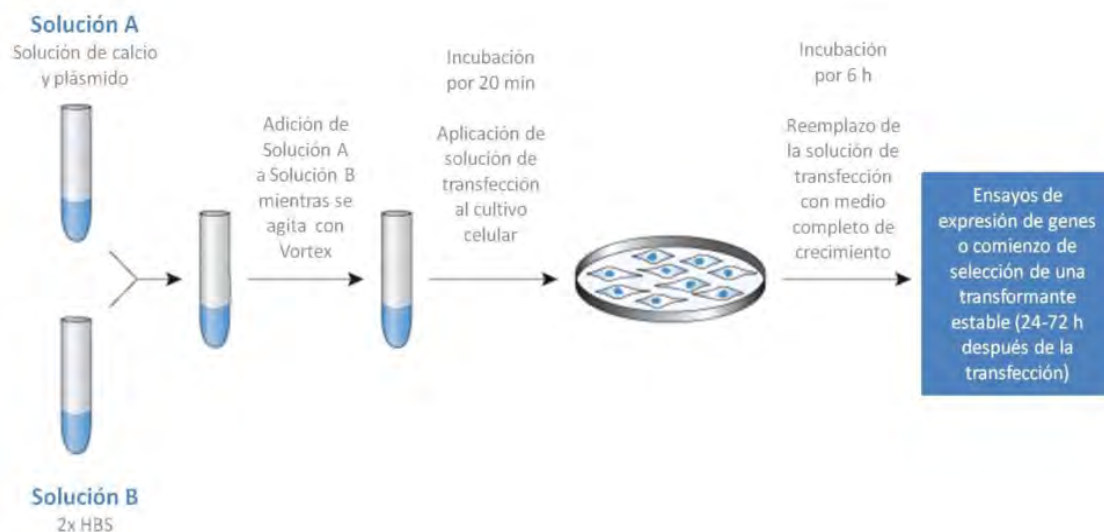
En experimentos conducidos entre 1970 y 1972, Frank Graham observó que la presencia de ciertos cationes divalentes en el proceso de transfección de células eucariontes aumentaba dramáticamente la asimilación de ADN [28]. De forma particular, la adición de CaCl<sub>2</sub> resultaba, curiosamente, en la formación de precipitados. Debido a que las soluciones empleadas para la dilución del material genético exógeno consistían en medio de cultivo tamponado con Tris y contenían iones fosfato, Graham dedujo que el ADN era co-precipitado con fosfato de calcio.

Se ha reportado con anterioridad [7, 105] que los complejos formados por el ADN exógeno y los microprecipitados de fosfato de calcio se unen fuertemente a la superficie de las células y se introducen, probablemente, por endocitosis. Así, una parte del material que atraviesa la membrana es transferido al núcleo, protegido de endonucleasas celulares por los agregados de calcio, mientras que el resto se reincorpora a la vía secretoria [75].

Para implementar esta técnica, se siguió el protocolo propuesto por Sambrook *et al.* [75, 76] y se preparó, para cada transfección, una solución saturada de calcio (Solución



A, véase figura 3-7) con 1 µg del ADN de interés, 15.5 µl de 2M CaCl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O estéril (GIBCO) aforando a un volumen final de 125 µl.



**Figura 3-7. Método de transfección transitoria por precipitados de fosfato de calcio [28].** La solución A, un preparado saturado de calcio con el plásmido de interés, se agrega gota a gota a la solución B, HBS 2x, en agitación. La mezcla se deja en reposo durante 20 minutos y, luego de este tiempo, es adicionada a las células en cultivo. Después de 6 h de incubación a 37°C, el medio de crecimiento que contienen la reacción de transfección es reemplazado. Las células pueden ser analizadas 24 h horas después de la transfección.

La solución B, que consistió en 125 µl de HBS 2x (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH=7.1), se puso en agitación con la ayuda de un *Vortex-Genie 2* de *Scientific Industries*; y se agregó la solución A gota a gota para formar la reacción de transfección. La mezcla se dejó en reposo durante 20 minutos para permitir la formación de los microprecipitados de fosfato de calcio. Y, posteriormente, se adicionó, también gota a gota, a las células HEK 293T/17 sembradas en pozos de 35 mm.

6 h después de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo para eliminar los restos de precipitados; y, luego de 24 h, las células pudieron ser analizadas.

Es importante mencionar que, durante la transfección, fue menester mantener la soluciones empleadas a temperatura ambiente (~23°C), lo cual aumentó sustancialmente la eficiencia del proceso. El método, además, es sensible a la cantidad de plásmido utilizado [7]; varios ensayos (datos no incluidos) mostraron que, en las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento, usar 1 µg de ADN mejoraba los resultados obtenidos.

### 3.2.3. Microscopía de fluorescencia

La implementación de proteínas fluorescentes funcionalmente inertes como etiquetas moleculares [10, 88], ha permitido correlacionar la dinámica de procesos biológicos complejos con la actividad y localización de las proteínas involucradas en ellos.

La proteína fluorescente verde (GFP), extraída de *Aequorea victoria*, y sus variantes, como la EGFP y EYFP utilizadas en este proyecto, poseen un cromóforo formado por un tripéptido dentro de su secuencia primaria de aminoácidos, cuyo plegamiento predispone la reacción que le confiere fotoluminiscencia, *i.e.* la capacidad de emitir luz, de menor longitud de onda, ante la exposición a radiación electromagnética de una longitud de onda específica; debido a que no requiere substratos o cofactores exógenos, como reportó Chalfie *et al.* [10] en 1994, la GFP puede ser empleada para monitorear la expresión génica o la localización de otros polipéptidos blanco en organismos vivos.

El vector reportero ptetraEGFP codifica para una proteína fusión compuesta por cuatro unidades de EGFP que presentan un corrimiento al rojo, con respecto al espectro de GFP, y tienen picos de excitación y emisión alrededor de 488 nm y 509 nm, respectivamente [21].

Las células HEK 293T/17, transfectadas con los constructos ptetraEGFP-hGpn3-NLS (NLS: *Bipartita*, *Parte A*, *Parte B* y *hPY*) (véase sección 3.2.2.2), se irradiaron con una lámpara de vapor de mercurio (*X-Site 120 Series Q EXFQ*) y se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido (*Olympus IX51*), con un filtro para GFP/Alexa 488. Asimismo, se tomaron fotografías con el software *Image-Pro Express 6.3* y una cámara *Evolution MP* de 5 Mega-píxeles, para evaluar su localización. En la sección 4.4 se presentan las imágenes procesadas y se discuten los resultados encontrados.

### 3.3. Evaluación de la condición necesaria

Para determinar la importancia de las posibles NLS identificadas en hGpn3 dentro del contexto de la proteína completa, se llevó a cabo un escaneo de alanina sobre residuos que, de acuerdo a su posición dentro de cada señal, han sido reportados como funcionalmente relevantes para la importación nuclear de otros polipéptidos [36, 44, 47, 85]. Este método permite determinar la contribución específica de los mismos a la integridad de la señal de localización nuclear estudiada, intercambiándolos por alanina –un aminoácido pequeño, químicamente inerte que mantiene la estructura secundaria de las secuencias– mediante mutagénesis sitio-dirigida *in vitro*.

#### 3.3.1. Mutagénesis sitio-dirigida usando PCR

La mutagénesis sitio-dirigida *in vitro* consiste en la extensión de oligonucleótidos diseñados a partir de un templado, en los cuales se han incluido ligeras variaciones específicas en la secuencia (sustitución, delección o adición de nucleótidos), de tal forma que éstas puedan ser incorporadas a la cadena de ADN durante la replicación [97].

En este estudio, en particular, la mutación se efectuó mediante PCR (véase sección 3.2.1.8), empleando una polimerasa de alta fidelidad (*PfuTurbo DNA polymerase* de Stratagene) y siguiendo el protocolo *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene. El templado utilizado fue *hGpn3-EYFP* (véase figura 3-8); los oligonucleótidos diseñados a partir de éste se enumeran a continuación.

- **hGpn3-MUT-Parte A-K181A, K182A:**

*Oligonucleótido 5'*: gacaaaaatggatctgctgagtGCaGCagcaaaaaaggaaattgagaaat

*Oligonucleótido 3'*: atttctcaatttcctttttgctGctGCactcagcagatccattttgtc

*Péptido*: <sup>174</sup>TKMDLLSAAKKEIEK<sup>189</sup>

- **hGpn3-MUT-Parte A-K184A, K185A:**

*Oligonucleótido 5'*: gatctgctgagtaaaaaagcaGCaGCggaaattgagaaatttttagatcc

*Oligonucleótido 3'*: ggatctaaaaatttctcaatttccGctGCtgctttttactcagcagatc

*Péptido*: <sup>177</sup>DLLSKKAAAEIEKFLD<sup>192</sup>

- **hGpn3-MUT-Parte B-K209A, K210A:**

*Oligonucleótido 5'*: gattctacaagtgacttaagaagcGCaGCattcaagaaactgactaaagc

Oligonucleótido 3': gcttagtcagtttctgaat**GctGC**gcttcttaagtcactgtagaatc

Péptido: <sup>201</sup>DSTSDLRSA**AF**FKLTK<sup>216</sup>

- **hGpn3-MUT-Parte B-K212A, K213A:**

Oligonucleótido 5': gtgacttaagaagcaaaaaattc**GCgGC**actgactaaagctatatgcgg

Oligonucleótido 3': ccgcatatagcttttagtcagt**GCcGC**gaatttttgcttcttaagtcac

Péptido: <sup>202</sup>DLRSKK**FA**ALTKAIC<sup>219</sup>

- **hGpn3-MUT-Parte PY-P232A, Y233A:**

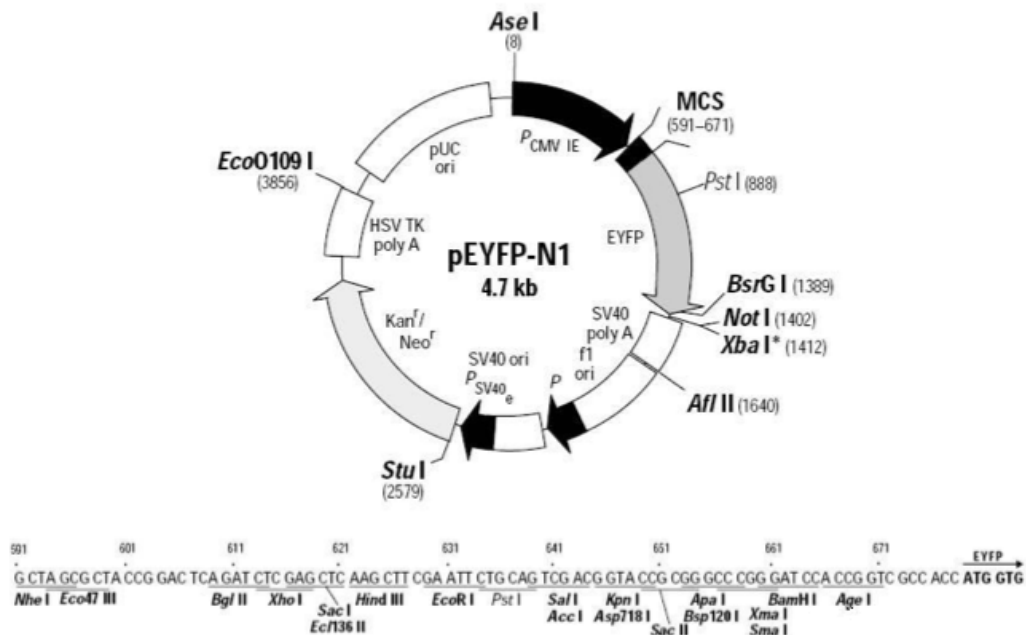
Oligonucleótido 5': ctacagcatggttcgattttta**GctGC**cgatcagtcagatgaagaagc

Oligonucleótido 3': gctttctcatctgactgatcg**GCaGC**taaaaatcgaacctgctgtac

Péptido: <sup>225</sup>YSMVR**FLA**ADQSDEES<sup>240</sup>

En rojo y con mayúsculas, se han resaltado los nucleótidos que han sido alterados en la secuencia original para intercambiar dos residuos consecutivos por alaninas. Mientras que en los péptidos, se han señalado los aminoácidos que estas variaciones esperaban producir.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por SIGMA-ALDRICH; las muestras se centrifugaron por 1 minuto a 13,000 rpm, se resuspendieron en TE 1x (10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA) a una concentración final de 100 µM, se incubaron en un baño de agua a 37°C por 7.5 minutos y, finalmente, se diluyeron 1:100 en H<sub>2</sub>O desionizada.



**Figura 3-8. Mapa de restricción del plásmido pEYFP [68].** El vector de 4.7 kb, posee un gen de resistencia a kanamicina/neomicina y codifica para la proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP). La proteína hGpn3 se insertó en el MCS entre los sitios de restricción de las endonucleasas HindIII y Kpn1.

En la PCR se utilizaron 30ng de ADN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la *PfuTurbo*, y la siguiente mezcla-reacción:

**Tabla 3-6. Reactivos y proporciones utilizadas en la mutagénesis sitio-dirigida por PCR.** La mezcla del control es la misma; sin embargo, se omite la adición de los oligonucleótidos y, en su lugar se agrega H<sub>2</sub>O desionizada.

K181A/ K182A	K184A/ K185A	K209A/ K210A	K212A/ K213A	P232A/ Y233A	H <sub>2</sub> O desionizada
22.32 µl	23.75 µl	23.75 µl	23.42 µl	23.42 µl	
5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	Buffer de la PfuTurbo ADN polimerasa 10x
3.0 µl	3.0 µl	3.0 µl	3.0 µl	3.0 µl	30 ng de hGpn3-EYFP (10 ng/µl)
8.71 µl	8.06 µl	8.10 µl	8.24 µl	8.27 µl	125 ng de Oligonucleótido 5' (1 µM) (SA)
8.96 µl	8.19 µl	8.15 µl	8.34 µl	8.32 µl	125 ng de Oligonucleótido 3' (1 µM) (SA)
1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	Mezcla de dNTPs (10 mM cada uno) (BioRad)
1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	PfuTurbo ADN polimerasa 2.5 U/µl (Stratagene)
50.0 µl	50.0 µl	50.0 µl	50.0 µl	50.0 µl	

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador *MJ Mini Personal Thermal Cycler* de Bio-Rad con el protocolo de temperaturas que se describe a continuación.

**Tabla 3-7. Protocolo de temperaturas para la PCR de la tabla 3-6.** En el paso 4 el tiempo de extensión debe ajustarse de acuerdo al número de kilobases del fragmento que se desea replicar (1 minuto por kilobase); en este caso, la construcción, hGpn3-EYFP tiene aproximadamente 5.6 kb (véase figura 311-8), por lo que el tiempo de extensión en esta etapa fue de 6 minutos.

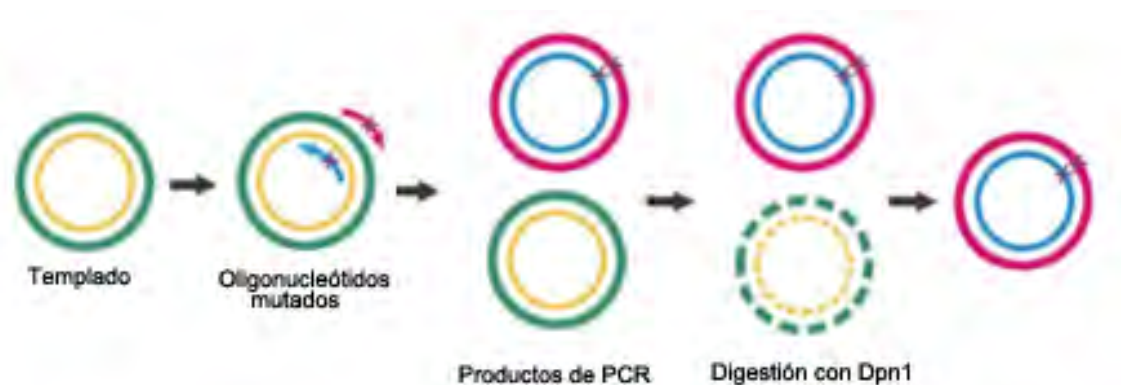
Paso	Temperatura	Duración	
1	95°C	30 segundos	x 20 ciclos
2	95°C	30 segundos	
3	68°C	1 minuto	
4	68°C	6 minutos	
5	68°C	10 minutos	
6	4°C	∞	

Desnaturalización inicial  
Separación de la doble cadena  
Alineación de los oligonucleótidos  
Extensión en la dirección 5' → 3'  
Extensión final  
Conservación

Durante el paso 2 (véase tabla 3-7), los oligonucleótidos que contienen las mutaciones a alanina, se alinean con el templado (nótese que la cantidad de oligonucleótidos en la reacción excede cuantiosamente aquella del templado para favorecer este proceso) y se extiende una nueva hebra (rosa u azul) que ya tiene incorporada la mutación. Después de que el ADN se replica por 20 ciclos, la mayor parte del producto obtenido presenta las substituciones puntuales, pero aún está presente el plásmido original; por este motivo, se hace una digestión *a posteriori* con 1 µl de la enzima de restricción Dpn1 (200 U/ml de NEB) por 2 h a 37°C, que reconoce el ADN metilado usado como templado en la reacción y lo degrada [96]. La figura 3-9 muestra esquemáticamente el proceso de la mutagénesis.

Los productos finales de la reacción, se transformaron en bacterias competentes para su amplificación (véase sección 3.2.1.7). Posteriormente, el ADN fue extraído y cuantificado para su secuenciación (LAMBAMA); lo anterior permitió garantizar la incorporación de las mutaciones deseadas para experimentos subsecuentes.

Las muestras en las que las substituciones fueron exitosas se transfectaron en células HEK 293T/17 (véase sección 3.2.2.2); la localización subcelular de las proteínas híbridas y los efectos de las mutaciones realizadas en el contexto de la proteína completa se analizaron por microscopía de fluorescencia (véase sección 3.2.3) y se reportan en el capítulo de resultados (véase sección 4.5).



**Figura 3-9. Mutagénesis sitio-dirigida *in vitro* [68].** Los oligonucleótidos (rosa y azul) mutantes, agregados en exceso a la reacción, se aparean con el templado a partir del cual fueron diseñados. Una nueva hebra no-metilada es sintetizada incorporando la mutación. Los productos de PCR contienen al ADN de doble cadena mutado y al original. La enzima de restricción Dpn1 degrada a éste último, mientras que el plásmido mutado puede ser transformado en bacterias competentes.

### 3.4. Perturbación de la ruta de importación nuclear

El tercer criterio propuesto por Marfori *et al.* [50] para evaluar la funcionalidad de una probable señal de localización nuclear, consiste en alterar el mecanismo de transporte nuclear. De esta forma, se espera que la importación de la proteína al núcleo se vea abolida, si es que es dependiente de esta vía.

Para este propósito se utilizó una mutante dominante negativa de la GTPasa Ran, RanQ69L, que fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Bulmaro Cisneros del CINVSTAV. Esta versión de la proteína, deficiente en su actividad de GTPasa, secuestra a las importinas (véase sección 1.3.3) en complejos estables que son incapaces de sostener el anclaje de polipéptidos con una NLS, así como, su interacción con otras proteínas que pertenecen al complejo del poro nuclear (NPC).

El día previo al experimento, se sembraron 4 pozos de 35 mm con  $0.5 \times 10^6$  células HEK 293T/17 cada uno y se les adicionó 2 ml de medio de cultivo. Una hora antes de la transfección, se reemplazó el medio y se prepararon 4 mezclas-reacción siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.2.2.

El ADN utilizado en cada una se enlista a continuación: (1) 1  $\mu\text{g}$  de hGpn3-pEYFP; (2) 1  $\mu\text{g}$  de hGpn3-pEYFP y 0.5  $\mu\text{g}$  de RanQ69L; (3) 1  $\mu\text{g}$  de SV40-NLS-ptetraEGFP; y (4) 1  $\mu\text{g}$  de SV40-NLS-ptetraEGFP y 0.5  $\mu\text{g}$  de RanQ69L. 24h después del tratamiento, las células se analizaron por microscopía de fluorescencia utilizando el filtro de 488 nm para observar la señal fluorescente de hGpn3-EYFP y SV40-NLS-tetraEGFP y el de 568 nm para RanQ69L. En el caso de las condiciones (2) y (4), sólo se consideraron aquellas células exitosamente co-transfectadas (*i.e.* con señal fluorescente para ambos filtros).

Los resultados de esta prueba se discuten en la sección 4.6.

### 3.6. Generación de líneas celulares estables de las células MCF-12A por transducción

En la sección 4.7 se consideró la posibilidad de que la localización subcelular observada para hGpn3-EYFP expresada desde el plásmido pEYFP-N1 no correspondiese con la disposición del polipéptido endógeno, debido a los altos niveles de proteína que produce la transfección. Con el fin de verificar tal efecto, se generaron líneas celulares que sobre-expresan establemente a la proteína hGpn3-EYFP como se describe a continuación.

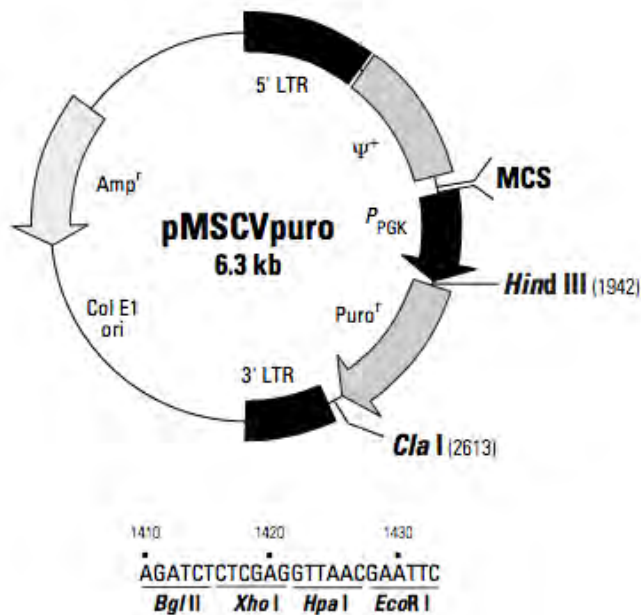
### 3.6.1. Transducción

En la sección 3.2.2.2, se mencionaron dos estrategias utilizadas comúnmente para introducir un gen en un célula eucarionte: transfección por métodos bioquímicos y transfección por métodos físicos. Existe una técnica adicional, la transducción mediada por vectores virales, que se abordará en esta sección.

En 1951, Joshua Lederberg y Norton Zinder observaron que algunas partículas virales son capaces de transferir genes de una bacteria huésped a otra en la que el virus inserta sus contenidos; a este proceso se le denomina transducción [30] y puede darse también cuando se introduce ADN exógeno en el genoma de una célula empleando un vector viral como un elemento móvil.

La introducción de vectores virales y retrovirales dotados de potencial patógeno regulable, los ha hecho atractivos para la transferencia segura y efectiva de genes en células eucariontes [86]. En particular, en los retrovirus, el genoma viral (ARN de cadena sencilla) está encapsulado dentro de una estructura proteica conocida como cápside, en la que también se encuentran las proteínas integrasa y transcriptasa reversa. Cuando un retrovirus se introduce a una célula huésped, la transcriptasa reversa se encarga de sintetizar ADN viral usando el ARN del retrovirus como templado; la maquinaria celular comienza entonces la polimerización del ADN complementario y, posteriormente, se incorpora al genoma del huésped como un elemento móvil [77].

La integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped, es un paso esencial en el ciclo de replicación de los retrovirus y es la integrasa la enzima que se encarga de catalizar este proceso [20]. Finalmente, el ADN viral se transcribe, el ciclo de replicación se completa y la maquinaria de la célula es empleada para sintetizar las proteínas necesarias para producir nuevos retrovirus que serán expulsados al medio extracelular para infectar a otras células.



**Figura 3-10. Mapa de restricción del vector pMSCVpuro [86].** Los vectores MSCV se derivaron del virus MES de células madre de embriones de murina y vectores retrovirales LN. Cuando es transfectado transitoriamente o integrado y expresado de forma estable, el vector pMSCVpuro codifica para un gen que confiere resistencia a puomicina expresado desde el promotor PGK, una señal de empacamiento ( $\psi^+$ ) para la producción de partículas virales y un sitio de clonación múltiple en donde puede introducirse un gen de interés. Las secuencias que codifican para hGpn3-EYFP, hGpn1-EYFP o hGpn3-Ha se insertaron entre los sitios de restricción de las endonucleasas BglII y XhoI.

Durante el desarrollo de este proyecto, se utilizó el vector retroviral pMSCVpuro (véase figura 3-10) para generar 4 líneas celulares estables de las células MCF-12A empleando la técnica de transducción mediada por retrovirus.

En este punto, debe hacerse énfasis en las diferencias categóricas que existen entre la transfección transitoria y la transfección estable. En la primera, el ADN recombinante es introducido en una célula receptora, pero no necesariamente se incorpora al genoma del huésped; mediante este proceso, se pueden lograr niveles de expresión altos, pero únicamente temporales, de un gen particular [77]. Por otro lado, la transfección estable, es utilizada para constituir clonas de líneas celulares, en las que el gen transfectado se integra efectivamente al ADN cromosomal [33]. En general, la eficiencia de este método está, por lo menos, dos órdenes de magnitud por debajo de aquella de la transfección transitoria; sin embargo, es posible seleccionar a las células transfectadas mediante un marcador (p. ej. un gen que confiera resistencia a un antibiótico determinado) que puede incluirse en el vector recombinante que contiene al gen de interés o en uno separado que se introduce a las células por co-transfección [77].

Para el establecimiento de las líneas celulares, las secuencias que codifican para hGpn1-EYFP, hGpn3-EYFP y EYFP incorporadas originalmente en el sitio de clonación múltiple del vector retroviral pLNCX2, se digirieron con las endonucleasas BgIII y Sall siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.1.4.; los productos de la digestión enzimática se corrieron en un gel de agarosa al 0.9% y las bandas correspondientes a cada constructo (~1.9 kb, ~1.6 kb y ~0.85 kb, respectivamente) se purificaron con el kit de extracción de ADN en gel de QUIAGEN.

Posteriormente, se ligaron enzimáticamente en el MCS del vector pMSCVpuro, previamente cortado con BgIII y XhoI, para generar extremos compatibles con aquellos de los constructos. Nótese que los sitios de restricción de las endonucleasas Sall y XhoI son compatibles, por lo que la reacción de ligación puede llevarse a cabo efectivamente y transformarse en bacterias competentes (véase sección 3.2.1.8). El ADN de las colonias resistentes a ampicilina, fue extraído con el kit de extracción de ADN con columnas (QUIAGEN) y digerido enzimáticamente con EcoRI, una endonucleasa que también reconoce un sitio único de restricción en el MCS de pMSCVpuro, y BgIII para comprobar la incorporación exitosa de la clona. En la figura 3-11 se muestran las bandas que corresponden a los constructos que fueron introducidos satisfactoriamente en el sitio de clonación múltiple del vector retroviral.

Para la construcción hGpn3-Ha-pMSCVpuro, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos (*SIGMA-ALDRICH*), con el fin de introducir un marcador molecular diferente y de menor tamaño que EYFP.

- **5'BgIII ATG-hGpn3:**

*Oligonucleótido 5'*: ggg**agatct**ATGCCTCGGTATGCGCAGCTGGTCATGGGC

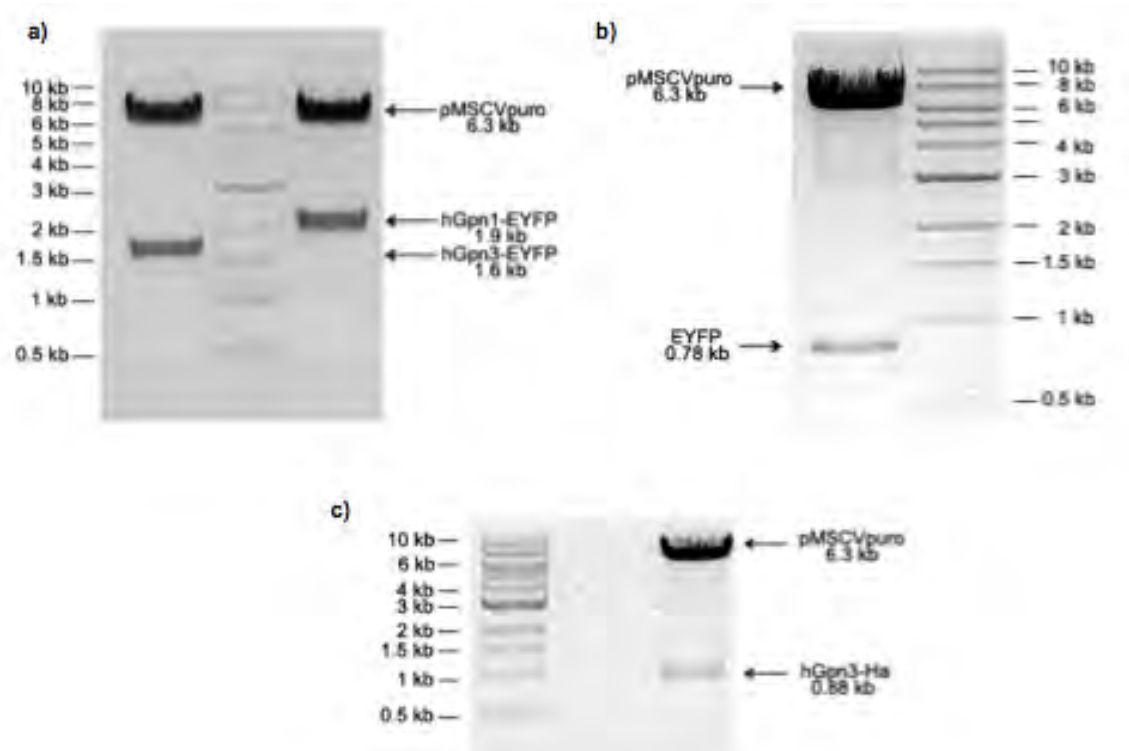
- **3'EcoRI-Ha-STOP-hGpn3:**

*Oligonucleótido 3'*: ggg**gaattc**TCAagcgtagtctgggacgtcgtatgggtaTTCATCCTGG  
CATTCTTGAAAATATTC

*Péptido*: hGpn3-YPYDVPDYA

En rojo se han resaltado los sitios de reconocimiento de las enzimas BgIII (oligonucleótido 5') y EcoRI (oligonucleótido 3'), adicionados a la construcción para permitir su inserción en el MCS del vector pMSCVpuro. El oligonucleótido 5' se diseñó con un *excedente* que consta de 3 guaninas, seguido del sitio de restricción de BgIII y los 10 primeros aminoácidos de hGpn3; en el oligonucleótido 3' también se incluyó un *excedente*

de 3 guaninas, el sitio de restricción de EcoRI, un codón de paro (TGA), los nucleótidos que codifican para el péptido Ha y los 10 residuos finales de hGpn3.



**Figura 3-11. Electroforesis de ADN de los constructos hGpn1-EYFP, hGpn3-EYFP, EYFP, hGpn3-Ha en el vector retroviral pMSCVpuro.** Construcciones moleculares en pMSCVpuro cortadas con las endonucleasas BglIII y EcoRI, para comprobar la incorporación de los insertos a) hGpn1-EYFP y hGpn3-EYFP, b) EYFP y c) hGpn3-Ha, respectivamente, en el sitio de clonación múltiple del vector.

Realizando una PCR con estos oligonucleótidos y empleando a hGpn3-EYFP-pMSCVpuro como templado, se obtuvo el constructo hGpn3-Ha; los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron con el kit de extracción de ADN para productos de PCR de QUIAGEN.

El ADN codificante para hGpn3-Ha se introdujo en el vector pMSCVpuro aprovechando los sitios de reconocimiento de BglIII y EcoRI. El protocolo utilizado en esta etapa sigue los pasos de aquel descrito antes para el resto de las clonas.

Con las construcciones en el vector adecuado, se realizó una transfección en células HEK 293T/17 con el fin de crear las partículas retrovirales que habrían de usarse durante la transducción. Brevemente, 24 h antes de la transfección, se sembraron  $2.5 \times 10^6$  células en platos de 10 cm, uno por cada transfección; 1 h antes del tratamiento, se lavaron con 4 ml PBS 1x y se les agregaron 10 ml de medio fresco. Después, se preparó la siguiente reacción de transfección a temperatura ambiente: (1) 5  $\mu$ g de gag-pol, (2) 5  $\mu$ g de vsv-g, (3) 10  $\mu$ g del ADN de interés, (4) 62.5  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  y, finalmente, (5)  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada aforando a 500  $\mu$ l.

Gag y pol son unidades transcripcionales necesarias para completar el ciclo de replicación de un retrovirus. Las proteínas gag forman la estructura de la cápside, mientras que las proteínas pol codifican para la transcriptasa reversa y la integrasa [312-9]; la proteína fusión gag-pol está constituida por las secuencias de aminoácidos de ambos polipéptidos, su transcripción se lleva a cabo de tal forma que se producen muchas más copias de gag que de pol, atendiendo las necesidades del retrovirus. Vsv-g, la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, reviste a los vectores retrovirales y promueve la fusión viral con la célula huésped, confiriéndole infectabilidad.



Las respectivas reacciones de transfección se agregaron a 500 µl de HBS 2x gota a gota en agitación, para su homogenización y se dejaron en reposo durante 20 minutos para permitir la formación de microprecipitados. Luego de este periodo, la solución se depositó en los platos de 10 cm con células HEK 293T/17 y éstas se incubaron durante 6h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, después de las cuales, el medio fue reemplazado para eliminar el exceso de calcio.

Las partículas retrovirales generadas por la transfección transitoria de hGpn1-EYFP-pMSCVpuro, hGpn3-EYFP-pMSCVpuro, EYFP-pMSCVpuro y hGpn3-Ha-pMSCVpuro, se recolectaron 48 h después; el medio extracelular, en el que las células transfectadas expulsaron a las partículas, se pasó por un filtro de 0.45 µm para remover residuos celulares, se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -80°C.

La infección se llevó a cabo en platos de 6 cm con 3x10<sup>5</sup> células MCF-12A, las cuales se sembraron 24 h antes del tratamiento y se incubaron en condiciones estándar. 1 ml de medio *DMEMF/12+GlutaMax-I* de GIBCO enriquecido con 5% de HS, EGF, hidrocortisona, insulina, toxina del cólera y P/S con 16 µg/ml de polibrina (para obtener una concentración final de 8 µg/ml) se añadió al día siguiente para la transducción.

La polibrina es un polication que permite la introducción transitoria y estable de moléculas de ADN de bajo peso molecular (hasta 9 kb, que es el límite de empacamiento de la cápside) y aumenta la eficiencia de infección, neutralizando la repulsión entre las partículas retrovirales y el ácido siálico en la superficie de las células [77].

1 ml del medio recolectado antes con las partículas retrovirales respectivas, fue añadido posteriormente; en uno de los platos, se obvió este paso y se sustituyó por 1 ml de medio enriquecido, como un control negativo. 6h después se reemplazó el medio en todos los platos.

Al cabo de 48 h, las células se crecieron en presencia de puromicina; un antibiótico que se encarga de inhibir la síntesis de proteínas, interrumpiendo la polimerización de las cadenas polipeptídicas de forma temprana y ocasionando la muerte celular en organismos que no presentan resistencia [77]. La concentración de antibiótico utilizadas en este estudio para impedir el desarrollo de las células sin resistencia fue de 2 µg/ml.

La expresión de las proteínas fusión hGpn1-EYFP, hGpn3-EYFP y hGpn3-Ha se comprobó mediante la técnica de SDS-PAGE acoplada con un Wester blot contra hGpn1 y hGpn3. En la sección 4.8 se discuten estos resultados, así como la localización subcelular observada para ambas proteínas, y en los apartados 3.6.2 y 3.6.3 se detallan los protocolos concernientes a ambos métodos.

### **3.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

La carga neta de una proteína depende de los aminoácidos que componen su estructura primaria. Cuando un polipéptido es sometido a una diferencia de potencial en un soporte electroforético (véase sección 3.2.1.5), la razón a la que migra depende entonces de su carga, forma y tamaño.

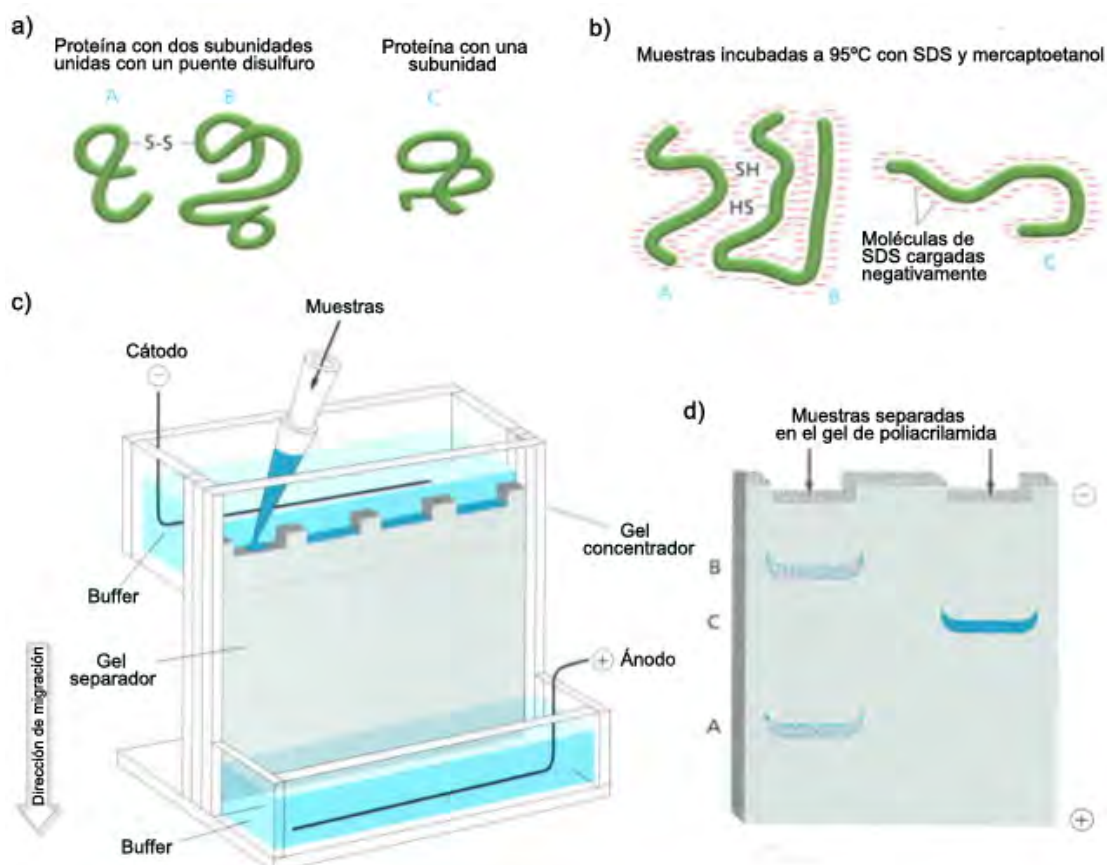
Si una mezcla de proteínas es separada mediante un campo eléctrico sin ser previamente sometida a un proceso de desnaturalización, entonces el proceso electroforético que se lleva a cabo se denomina electroforesis nativa; este método es particularmente útil si es imperante mantener algunas interacciones proteína-proteína, que dependen enteramente de las condiciones de separación (buffer electroforético, detergentes utilizados) [62].

Si, por otro lado, el objetivo es resolver una mezcla de proteínas de acuerdo a sus respectivos pesos moleculares, la técnica se refiere entonces a la electroforesis desnaturalizante. Los polipéptidos son tratados con un detergente fuerte, generalmente

SDS (dodecilsulfato de sodio), el cual tiene una carga negativa neta y se une a regiones hidrofóbicas de las proteínas enmascarando su carga intrínseca; usualmente, las muestras también son calentadas a 95°C, para asegurar la pérdida de su estructura tridimensional. Un agente reductor, como β-mercaptoetanol, se añade para romper enlaces disulfuro entre las moléculas, de tal forma que los complejos proteicos se desensamblan en sus subunidades constituyentes [1] (véase figura 3-12).

El proceso de separación se lleva a cabo en un gel con una matriz de poli(acrilamida) que, tal como en el caso de la agarosa (véase sección 3.2.1.5), actúa como un tamiz molecular, retardando a las moléculas de mayor tamaño. De igual manera, la concentración del gel determina, en este caso, el tamaño de los poros de la matriz electroforética; el SDS-PAGE es una técnica sensible, por lo que se pueden resolver un amplio rango de proteínas, con cantidades del orden de microgramos.

La poli(acrilamida) se forma por la polimerización del monómero de acrilamida y un agente entrecruzador, N,N'-metilen-bis-acrilamida (bisacrilamida) [62]; tiene la ventaja de ser estable, uniforme y químicamente inerte, por lo que no interactúa con las muestras. Otras aminas terciarias como N-N'-tetrametilen-diamina, TEMED, y persulfato de amonio, un agente oxidante, se emplean como catalizador e iniciador de la reacción, respectivamente.



**Figura 3-12. Electroforesis en geles de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE) [1].** a) Proteínas monomérica y complejos multi-subunidad poseen estructuras tridimensionales antes de la adición de detergente. b) Las muestras incubadas a 95°C en un buffer que contiene SDS y β-mercaptoetanol se desnaturalizan; la adición del detergente enmascara la carga de los polipéptidos y les confiere una carga neta negativa que es proporcional a su tamaño. c) Las proteínas se cargan en un gel de poli(acrilamida) y se someten a una diferencia de potencial. Las moléculas, cargadas negativamente, migran hacia el ánodo y se son separadas por tamaño debido que las porosidades de la matriz retrasan el avance de los polipéptidos de mayor tamaño. d) El peso molecular de las proteínas puede estimarse comparando su distancia de migración con la de otra de peso conocido o con un marcador de peso molecular, cargado paralelamente en el gel.

En la figura 3-12c se muestra un esquema del montaje empleado para separar proteínas por electroforesis en geles de poli(acrilamida). Las muestras se cargan en la parte

superior del soporte electroforético y migran de forma vertical de acuerdo a su peso molecular. Un marcador de peso molecular que consiste en una mezcla de proteínas de peso conocido, se utiliza comúnmente para estimar el tamaño de las moléculas separadas.

Durante este estudio, las muestras analizadas por SDS-PAGE consistieron en extractos totales de la línea celular MCF-12A, a menos que se indique lo contrario; en este caso, las células fueron cultivadas en condiciones estándar, lavadas con PBS 1x y tripsinizadas. Una fracción con aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se centrifugó por 3 minutos a 3000 rpm, el pellet celular se lavó con PBS 1x a 4°C, cuya temperatura ayuda a minimizar la proteólisis, desfosforilación y desnaturalización de las proteínas en la misma, y se resuspendió en un buffer de carga que contiene glicerol, azul de bromofenol como colorante, SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol para remover la estructuras de orden superior en los polipéptidos. Finalmente, las muestras se calentaron por 5 minutos a 95°C y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

En un aparato de electroforesis (*BioRad*), se prepararon geles con dos fases diferenciadas, un sistema discontinuo conocido como Laemmli [51]:

(1) Gel concentrador, al 5%: 3 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, 620  $\mu$ l de acrilamida al 40%, 1260  $\mu$ l de Tris 0.5 M pH=6.8, 50  $\mu$ l de SDS al 10%, 50  $\mu$ l de persulfato de amonio y 5  $\mu$ l de TEMED. En esta región, colocada sobre el gel separador, los poros de la matriz son relativamente grandes y no retardan la migración de las moléculas, por lo que las proteínas corren al mismo tiempo.

(2) Gel separador, al 10%: 2.3 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, 2.5 ml de acrilamida al 40%, 5 ml de Tris 0.75 M pH=8.8, 100  $\mu$ l de SDS al 10%, 100  $\mu$ l de persulfato de amonio y 4  $\mu$ l de TEMED. En esta región, las proteínas se resuelven por su peso molecular y se caracteriza por un tamaño de poro mucho más pequeño que aquella del gel concentrador, el cual tiene un efecto retardador sobre las moléculas de mayor tamaño.

Los geles se corrieron sumergidos en un buffer de electroforesis (25 mM Tris-Cl pH=8.0, 250 mM glicina, SDS al 0.1%) en condiciones desnaturalizantes. Los porcentajes del soporte electroforético pueden variar; en particular, una concentración de acrilamida al 10% es suficiente para separar proteínas cuyos pesos moleculares se encuentran entre 15 y 70 kDa, como hGpn3 (33 kDa) y hGpn3-EYFP (59 kDa).

Antes de iniciar el proceso electroforético, las muestras se incubaron a 95°C durante 3 minutos, para facilitar su manipulación; se cargaron 15  $\mu$ l de muestra en cada pozo y 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, *BioRad*). Finalmente, la electroforesis se llevó a cabo a 90 V en el gel concentrador y a 100 V en el separador.

### 3.6.3. Western blot

Cuando se logra conjugar la técnica de SDS-PAGE con un Western blot, es posible determinar la presencia y/o abundancia relativa de una proteína dada.

Una mezcla de proteínas que ha sido separada por medio de una diferencia de potencial, aplicada a un gel de SDS-poliacrilamida, puede ser transferida a un membrana de PVDF (fluoruro de polivinilidino) o de nitrocelulosa y, posteriormente, ser examinada mediante anticuerpos específicos que reconocen alguna región de la proteína blanco [62].

El principio empleado, entonces, es el mismo: una corriente eléctrica se aplica de forma perpendicular al plano del gel y, tanto las proteínas, como los marcadores de peso molecular, migran a la membrana debido al gradiente de potencial vertical [99]. Como es de esperarse, la membrana se coloca entre la superficie del gel (con proteínas cuya carga neta es negativa) y el electrodo positivo; los dos se ensamblan además dentro de un sándwich, cuyas tapas consisten en dos filtros de algodón, que sirven como protección y

que ayudan a asegurar que el contacto entre las superficies del gel y la membrana sea lo más homogéneo posible. Este proceso se conoce como transferencia electroforética, o *blotting*, y tiene como objetivo unir a los polipéptidos de interés a un soporte adecuado para su análisis [51].

En la figura 3-13 se presentan, esquemáticamente, los elementos necesarios para la transferencia.



**Figura 3-13. Representación esquemática del proceso de transferencia electroforética [51].** Después de separar una mezcla de proteínas en un gel de poliacrilamida, éstas son transferidas a una membrana para su posterior análisis mediante un campo eléctrico perpendicular a la superficie del gel. Un par de filtros de algodón adicionales se encargan de proteger al gel y a la membrana. El ensamble se coloca luego entre dos placas metálicas a las cuales se les aplica una diferencia de potencial. En condiciones semi-húmedas, un buffer que contiene metanol ayuda a que las proteínas se unan a la membrana.

En el presente proyecto, la transferencia electroforética se llevó a cabo en condiciones semi-húmedas; para tal efecto, los componentes del ensamble se pasaron previamente por un buffer de transferencia (40 mM Tris base, 39 mM glicina, SDS al 0.37% y metanol al 20%) que favorece la adición de las proteínas al soporte. Antes de sumergirla en la solución acuosa, la membrana de PVDF (*Immobilon*, *Milipore*), originalmente hidrofóbica, se hidrató con metanol durante 30 segundos; luego se incubó con buffer de transferencia y, finalmente, se colocó sobre el filtro inferior del sándwich.

Para geles de acrilamida al 10%, la transferencia se realizó a 15V durante 40 minutos. Después del proceso, el gel puede desecharse y la membrana se conserva en TBST (10 mM Tris-Cl pH=7.4, 150 mM NaCl, Tween 20 al 0.05%) a 4°C [62].

La detección de las proteínas de interés mejora sustancialmente después de bloquear el soporte; este paso es esencial para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo cuando éste se adicione a la membrana. Así, luego de la transferencia, el *blot* se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave, en una solución de TBST y leche deshidratada sin grasa al 0.5%; el volumen empleado en esta etapa debe ser tal que la membrana quede cubierta por completo, para reducir la señal en el fondo.

Posteriormente, el soporte se enjuagó con TBST, agitándolo levemente, pero cuidando que siempre quede sumergido. Después del último lavado, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario que está dirigido contra la proteína blanco y es diluido en TBST por un periodo de 16 h a 4°C en agitación suave; la baja temperatura garantiza la integridad del anticuerpo utilizado, mientras que la agitación asegura la exposición homogénea de la membrana a la solución y la mantiene húmeda durante todo el proceso.

Debido a que la detección de proteínas se realizó de manera indirecta en este estudio, la membrana se lavó con TBST para remover el exceso de anticuerpo primario y

se incubó con un anticuerpo secundario de la especie adecuada, el cual se une al primario de forma específica y está marcado con una enzima, HRP (una peroxidasa extraída del rábano), que permite su identificación produciendo fluorescencia [99]. Este paso de incubación con el anticuerpo secundario se lleva a cabo en agitación leve a temperatura ambiente durante 1 h.

Para observar a la proteína hGpn3 se utilizó el anticuerpo primario 4 (1:4500, diluido en TBST) y el secundario anti-conejo (1:3000); mientras que para hGpn1 se empleó el anticuerpo primario PURE47 (1:2000) y el secundario anti-conejo (1:3000).

Finalmente, la membrana se volvió a enjuagar con TBST y se sometió a una reacción quimioluminiscente, en la que HRP entra en contacto a una solución que contiene luminol, el sustrato de la enzima; en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la oxidación del sustrato produce una señal que puede ser detectada al exponer el Western blot a una película para rayos-X (*Medical X-ray General Purpose Blue, Kodak*) por unos segundos, la cual puede revelarse y fijarse en un cuarto oscuro.

Las bandas correspondientes a las proteínas reconocidas por el anticuerpo primario, aparecen como regiones opacas en el film y su densidad puede estimarse para obtener información de la abundancia relativa del polipéptido de interés en la muestra.

#### 3.6.4. Tratamiento con leptomicina B, nocodazol, brefeldina A, lectina AB y timidina

La generación de líneas celulares que expresan establemente a las proteínas hGpn3-EYFP y hGpn1-EYFP favoreció la composición de distintos ensayos con fármacos dirigidos, cuyos procedimientos se describen brevemente a continuación, y permitieron observaciones cuidadosas en tanto a la localización subcelular de dichos polipéptidos; una discusión referente a esta materia se aborda en la secciones 4.8 y 4.9.

##### a) *Tratamiento con leptomicina B*

La leptomicina B (LMB) es un compuesto derivado de *Streptomyces* sp. ATS1287 que, se ha demostrado, produce elongación celular en *S. pombe* y protuberancias anormales en las hifas de los hongos *Mucor racemosus* y *Mucor rouxianus*, por lo que se considera un poderoso antibiótico fungicida [39]. Además, se ha visto que ocasiona el arresto de células de mamífero en la fase G1 del ciclo celular; estudios en *S. pombe* mostraron que el blanco de la LMB es la proteína Crm1 (exportina 1), la cual es crítica para la exportación nuclear del ARN y de proteínas que contienen una señal de localización nuclear (NES) [31].

Células MCF-12A que expresan establemente a las proteínas fusión hGpn1-EYFP y hGpn3-EYFP se trataron con leptomicina B (10 ng/ml) [23] disuelta en medio enriquecido. La localización subcelular de las proteínas se monitoreó por microscopía de fluorescencia por un periodo de alrededor de 24 h después de la adición del fármaco (1, 3, 6 y 24 h), en el cual las células se incubaron en condiciones estándar excepto durante el tiempo de observación (~15 minutos). Como control negativo, la disolución de LMB se sustituyó por 0.5 µl de etanol 200% puro en medio enriquecido, por ser éste el solvente del fármaco.

##### b) *Tratamiento con nocodazol*

El nocodazol (NDZ) es un agente antimitótico que interfiere con la polimerización de los microtúbulos debido a que su interacción con la β-tubulina previene la formación de enlaces disulfuro [91]. En particular, se ha demostrado que en concentraciones adecuadas, el nocodazol impide la formación del uso mitótico y ocasiona la fragmentación del aparato de Golgi. Adicionalmente, se ha visto que arresta el ciclo celular en la fase G2/M e induce apoptosis en algunas líneas celulares [83].

24 h antes del tratamiento, se sembraron  $0.5 \times 10^5$  células MCF-12A que expresan a las proteínas fusión hGpn1-EYFP y hGpn3-EYFP, respectivamente, en pozos de 35 mm; se añadió nocodazol a una concentración final de 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en medio enriquecido. Como control se agregó 0.5  $\mu\text{l}$  de DMSO en otro de los pozos, pues el nocodazol está, originalmente, diluido en DMSO. Las observaciones de los efectos del fármaco se realizaron después de 1 h de incubación en condiciones estándar.

### c) *Brefeldina A*

La brefeldina A (BFA) es un metabolito de origen fúngico que desestabiliza la estructura del aparato de Golgi e interrumpe su función; el blanco de este fármaco es el factor intercambiador de nucleótidos (GEF) de Arf 1, una pequeña GTPasa que regula el tráfico vesicular retrógrado (*i.e.* que va del aparato de Golgi al retículo endoplásmico); BFA limita la interacción proteína-proteína entre Arf1 y su GEF, lo cual, finalmente ocasiona la disociación de COPI y otras proteínas residentes del Golgi, como las enzimas de glicosilación que se redistribuyen al ER [95]. Este proceso, como el inducido por nocodazol, es reversible si el fármaco se retira de las células.

El protocolo utilizado para monitorear los efectos de este fármaco se realizó de forma paralela al tratamiento con nocodazol. En este caso, la brefeldina A se usó a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en medio enriquecido. El control utilizado fue el mismo que en el caso de la leptomicina B, pues el diluyente del fármaco también es etanol 200% puro.

### d) Lectina de *Agaricus bisporus*

La lectina de *Agaricus bisporus* (ABL), un hongo comestible, tiene un potente efecto anti-proliferativo, también reversible, y no-citotóxico. Se ha demostrado anteriormente que ABL interfiere con la maquinaria de importación de los poros nucleares, bloqueando la vía de transporte activo de macromoléculas al núcleo. De acuerdo con Yu *et al.*, la síntesis de ADN se inhibe casi por completo después de 24 h de incubación con lectina AB; la síntesis de ARN y proteínas, por otro lado, se mantiene activa, por lo que la adición de ABL no ocasiona muerte celular [360-12].

Pozos de 35 mm con  $0.5 \times 10^5$  células MCF-12A que expresan establemente a las proteínas hGpn1-EYFP y hGpn3-EYFP se trataron con ABL y LMB diluidas en 1 ml de medio en diferentes condiciones: (1) Control, 1 ml de medio enriquecido; (2) lectina AB a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diluidos en 1 ml de medio; (3) leptomicina B a una concentración final de 10 ng/ml diluidos en 1 ml de medio; (4) lectina AB (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y leptomicina B (10 ng/ml) diluidos en 1 ml de medio. Los efectos de los fármacos se monitorearon por microscopía de fluorescencia después de 1h.

### e) *Timidina*

Las diferencias en el tiempo de duplicación en una población celular se generan, principalmente, durante la fase G1 del ciclo celular; su periodo variable se suma a la diversidad individual de las células que conforman a una población. Un número importante de estudios citométricos muestran que un doble bloqueo con timidina, uno de los nucleótidos que forman constitutivamente la cadena del ADN, a una concentración final de 2 mM, arresta a la células en el punto que conecta a la fase G1 con la fase S [32, 90].

El efecto de la timidina (2 mM) es inhibir la síntesis de ADN; lo cual, se piensa, es debido a la acción de un mecanismo de retroalimentación positiva que impide la síntesis de nuevos nucleótidos por el desbalance que genera el exceso [32].

Una muestra de células que entran a fase S, la etapa en la que se replica el material genético, no puede continuar su progresión en el ciclo celular y su avance queda suspendido antes de la división. El resto de la población, por otro lado, transitando otras fases del ciclo, no se ve afectada. Así, cuando otras células, originalmente en G1, G2 y M,

alcanzan la fase S, también son detenidas y se acumulan en el límite entre G1 y S; a este proceso se le conoce como *sincronización*.

Como el resto de los fármacos revisados en esta sección, el efecto de la timidina también es reversible; una vez que una población es liberada de un doble bloqueo, puede volver a avanzar a lo largo del ciclo celular, con un patrón de división característico que es compartido por la mayoría de las células. Una población sincronizada puede ser, entonces, utilizada para monitorear procesos intracelulares o moléculas regulados por el ciclo celular [32].

La necesidad de dos exposiciones sucesivas de timidina se debe a que, durante el primer bloqueo, las células son arrestadas no sólo en el punto de transición G1/S, sino también a lo largo de la fase S. Después de remover el exceso de timidina por primera vez, las células arrestadas en G1/S y etapas tempranas de la fase S avanzan a G2/M; mientras que aquellas liberadas de etapas tardías de la fase S entran a G1. Durante la segunda exposición, las células que se encuentran en G2/M avanzan a G1, hasta llegar al punto de restricción, G1/S; el resto de las células, en G1, también se detiene en este sitio. La liberación del segundo bloqueo significa que las células prosiguen desde esta marca en forma sincronizada por un periodo considerable de tiempo.

Células MCF-12A que expresan establemente la proteína fusión hGpn3-EYFP se sincronizaron con un doble bloqueo de timidina en base al protocolo sugerido por Kristian Helin [34]. Debido a que Helin basó el sistema en el tiempo de duplicación de las células HeLa (~23-24 h) [3], fue necesario adaptar los intervalos temporales de acuerdo a la progresión de la línea MCF-12A (~19 h) [3].

24 h antes del tratamiento, se sembraron  $3 \times 10^5$  células en platos de 6 cm. Con una confluencia de alrededor del 25-30%, se realizó el primer bloqueo en timidina 2 mM y el cultivo se incubó en condiciones estándar durante 15 h. Después de este tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se liberaron por 7 h con medio enriquecido libre del fármaco. El segundo bloqueo siguió los mismo lineamientos del primero y, al cabo de 15 h, el exceso de timidina fue removido con PBS 1x y las células se liberaron en medio enriquecido. Observaciones de la progresión del ciclo celular se realizaron cada 2-2.5 h por microscopía de fluorescencia durante 12 h, más un monitoreo final a las 24 h. Un plato adicional de células cultivadas bajo los mismos parámetros, pero en ausencia de timidina, se utilizó como control.

Los resultados obtenidos con este tratamiento se reportan en la sección 4.9.

### 3.6.5. Inmunofluorescencia

Debido a que la proteína hGpn3-Ha no posee un marcaje fluorescente inherente, no es posible visualizar su disposición subcelular mediante microscopía de fluorescencia, sin antes someter a las células que la expresan establemente a un procedimiento conocido como inmunofluorescencia. Esta técnica consiste en una reacción antígeno-anticuerpo, cuyo propósito es detectar la localización y abundancia relativa de una proteína blanco mediante un marcador fluorescente, fluoróforo, que está unido covalentemente a un anticuerpo el cual puede asociarse de forma directa o indirecta con el antígeno.

Un antígeno es, usualmente, una proteína o péptido contra el que está dirigido un anticuerpo. La interacción entre las moléculas se da entre una región limitada del antígeno conocida como epítope y los respectivos sitios de reconocimiento en el anticuerpo. Algunos anticuerpos reconocen secuencias que tienen una conformación tridimensional, la cual se pierde al entrar en contacto con detergentes (p. ej. SDS); mientras que otros epítopes son lineales y permanecen intactos aún después de que la proteína es sometida a procesos de desnaturalización [51].

Para los fines de este proyecto se realizó una inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización subcelular de la proteína hGpn3-Ha, la cual está marcada con una etiqueta molecular, Ha, una pequeña cadena de aminoácidos que suele utilizarse cuando no existen anticuerpos contra la proteína a la que están unidos.

El término inmunofluorescencia indirecta hace referencia a la falta de marcaje del anticuerpo que interactúa de forma directa con el antígeno (anticuerpo primario); un anticuerpo dirigido contra una región específica del anticuerpo primario (anticuerpo secundario) se etiqueta con un marcador fluorescente. La ventaja de esta técnica con respecto a la inmunofluorescencia directa es que posee mayor sensibilidad debido a que más de una molécula de anticuerpo secundario puede unirse al anticuerpo primario amplificando la señal fluorescente [70].

$1 \times 10^5$  células MCF-12A que expresan establemente a la proteína hGpn3-Ha fueron llevadas a una confluencia de 70-80% y se mantuvieron en incubación a 37°C hasta entonces. Después, el cultivo se lavó con PBS 1x como preparación para iniciar el tratamiento.

Posteriormente, las células se fijaron químicamente incubándolas en PBS 1x con formaldehído al 2% durante 15 minutos; este proceso si bien mata a las células, también se encarga de preservar las estructuras celulares permitiendo el analizar la localización subcelular de las proteínas en condiciones cercanas a aquellas de las células vivas, al menos en lo que a su distribución se refiere.

Al cabo de este tiempo, se lavaron 2 veces con PBS 1x y, luego, se permeabilizaron y bloquearon en un procedimiento de un solo paso incubándolas en PBS 1x con Tritón X-100 al 0.2% y suero bovino fetal al 10% por otros 15 minutos a temperatura ambiente. El proceso de permeabilización se lleva a cabo con detergentes, como el Tritón X-100 en este caso, para facilitar la unión de los anticuerpos a sus antígenos intracelulares respectivos, debilitando la membrana plasmática; mientras que el bloqueo evita la unión inespecífica del anticuerpo.

Después, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se incubaron durante 16 h con un anticuerpo monoclonal contra Ha hecho en ratón (200  $\mu\text{g/ml}$ , *sc-7329*, *Santa Cruz Biotechnology*) a 4°C, el cual se diluyó 1:1000 y 1:300 en PBS 1x con Tritón X-100 al 0.1% y FBS al 1%. Luego de remover el anticuerpo primario, las células se incubaron por 3 periodos de 5 minutos con PBS 1x; el anticuerpo secundario se añadió a continuación (*Alexa Flour 568-conjugated anti-mouse*, 2  $\mu\text{g/ml}$ , de *Invitrogen*), diluido 1:1000 en la misma solución que la utilizada para el anticuerpo primario y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Al terminar este periodo, se repitieron los 3 lavados con PBS 1x; las células se tiñeron con DAPI, otro marcador fluorescente que se une a las regiones ricas en adenina y tirosina del ADN, para visualizar el núcleo; y, finalmente, se dejaron en PBS 1x y se analizaron por microscopía de fluorescencia. La figura 4-15 muestra la localización subcelular encontrada para hGpn3-Ha mediante esta técnica.



## Capítulo 4

### Resultados y discusión

Es escasa todavía la información reportada en las bases de datos sobre las posibles funciones asociadas y la localización subcelular de la proteína Gpn3 [55]. Anteriormente, se publicaron múltiples estudios que se encargaron de abordar sus interacciones con otras proteínas como la ARN polimerasa II [40, 8, 9], Apaf-1 [78] y las GTPasas Gpn1 y Gpn2 [62]; sin embargo, la relevancia biológica de esta proteína aún es incierta.

Evidencia experimental diversa sugiere que la proteína Gpn3 es esencial para la proliferación de células de mamífero [8] y para la acumulación nuclear de la ARN polimerasa II de forma específica [8, 9]. Se ha planteado previamente que estas dos ocurrencias podrían no ser independientes, debido al papel crítico que tiene la ARNP II en la transcripción y en el procesamiento del pre-ARNm de los genes, necesario para la proliferación celular [8, 11].

Sorprendentemente, el mecanismo de transporte por medio del cual la ARN polimerasa II se dirige al núcleo para cumplir estas funciones en células de mamífero todavía no ha sido determinado. En el presente trabajo se propuso, tentativamente, que Gpn3 le confiere a la ARN polimerasa II la capacidad de entrar al núcleo celular mediante una señal de localización nuclear que se encuentra en la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína. En este estudio se buscó identificar esta posible NLS, así como comprobar su funcionalidad.

#### 4.1. Identificación de cuatro posibles señales de localización nuclear en hGpn3

Se identificaron cuatro regiones de aminoácidos en la secuencia primaria de hGpn3 por inspección visual que se ajustan a señales de localización nuclear consenso reportadas con anterioridad [50, 102, 43, 47]. Dos posibles NLS clásicas *monopartitas*, ambas ricas en lisinas, se localizan hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína y cumplen con las características de una secuencia consenso óptima del tipo K-(K/R)-X-(K/R) [50]; se denominaron *Gpn3-NLS-Parte A* y *Gpn3-NLS-Parte B*, respectivamente, para los fines de este estudio (véase tabla 4-1).

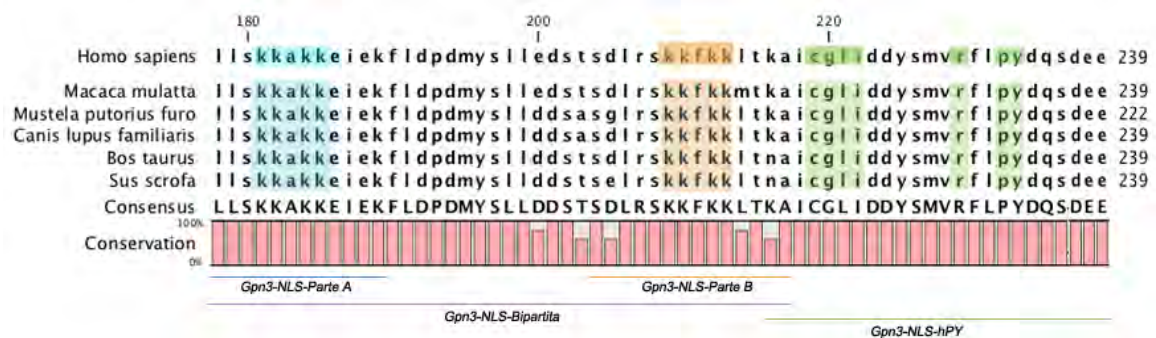
Separadas por una región espaciadora extendida de 23 aminoácidos, las NLS monopartitas *Parte A* y *Parte B* constituyen las regiones básicas de una probable señal de localización nuclear *bipartita* (*Gpn3-NLS-Bipartita*) que tiene la forma (K/R)-(K/R)-X<sub>8-29</sub>-(K/R)<sub>3/5</sub> [43]. Convencionalmente, los péptidos espaciadores de esta clase de secuencias, suelen tener de 8 a 12 aminoácidos de longitud [44]; sin embargo, se ha demostrado que existen señales bipartitas con espaciadores de hasta 29 residuos, como es el caso de la integrasa (IN) del retrotransposón Ty1, una transposasa involucrada en la integración de este elemento genético móvil al genoma de *S. cerevisiae* [52]. Estos hallazgos motivaron el interés de este proyecto en el análisis de esta posible NLS.

Finalmente, se encontró una cadena peptídica que se ajusta a una señal de localización nuclear no-clásica tipo PY (*Gpn3-NLS-hPY*), con cuatro residuos hidrofóbicos que están de acuerdo con la configuración propuesta por Lee *et al.*,  $\phi$ -(G/A/S)- $\phi$ - $\phi$  donde  $\phi$  es un aminoácido hidrofóbico, y un motivo (R/H/K)-X<sub>2-5</sub>-PY río abajo [47].

**Tabla 4-1. Cuatro posibles NLS se localizan hacia el extremo C-terminal de hGpn3.** *Gpn3-NLS-Parte A* y *Gpn3-NLS-Parte B* se ajustan a cNLS monopartitas ricas en lisinas [312-4] y son las regiones básicas de *Gpn3-NLS-Bipartita* aunadas a una región espaciadora extendida de 23 aminoácidos [312-6]. Asimismo, una probable señal de localización nuclear tipo PY, compuesta por una secuencia central de cuatro aminoácidos hidrofóbicos y el motivo R-X<sub>2</sub>-PY, se encuentra en la posición 219 de hGpn3.

NLS	Secuencia en hGpn3	Secuencia consenso	Referencia
Gpn3-NLS-Parte A	<sup>173</sup> LLSKKAKKEIEK <sup>183</sup>	K-(K/R)-X-(K/R)	312-4
Gpn3-NLS-Parte B	<sup>203</sup> SDLRSKFKFKLTKA <sup>217</sup>	K-(K/R)-X-(K/R)	312-4
Gpn3-NLS-Bipartita	<sup>173</sup> LLSKKAKKEIEKFLDPDMYSLLDDSTSDLRSKFKFKLTKA <sup>217</sup>	(K/R) <sub>1</sub> -(K/R)-X <sub>3-23</sub> -(K/R) <sub>35</sub>	312-6
Gpn3-NLS-hPY	<sup>214</sup> LTKAICGLIDDYSMVRFLPYDQSDEE <sup>231</sup>	Región hidrofóbica: $\Phi$ -(G/A/S)- $\Phi$ - $\Phi$ Región consenso: (R/H/K)-X <sub>2-7</sub> -PY	411-2

El alineamiento de hGpn3 con péptidos homólogos de otras especies de mamíferos muestra además que las secuencias descritas tienen un alto grado de conservación (ver figura 4-1); lo cual sugiere, de forma derivativa, que dichos residuos podrían ser importantes en relación a la estructura y función de la proteína [93].



**Figura 4-1. Alineamiento y conservación de cuatro posibles NLS identificadas en hGpn3 con y en otras especies de mamíferos.** Las tres señales de localización nuclear clásicas, dos monopartitas (azul y anaranjado) y una bipartita (morado), y una secuencia no-clásica tipo hPY (verde) probables se encuentran hacia el extremo carboxilo terminal de hGpn3 (284 aa). Nótese que las NLS monopartitas y hPY están altamente conservadas en mamíferos; mientras que las variaciones en la región espaciadora de la bipartita no cambian la carga global de la secuencia.

En el análisis *in silico* que se realizó a la par utilizando tres servidores basados en diferentes métodos de predicción (véase sección 3.1), *cNLS Mapper* [13] y *PredictProtein* [65] arrojaron como resultado una señal bipartita en hGpn3 que se ajusta a *Gpn3-NLS-bipartita* y que tiene un coeficiente de actividad de NLS de 5.7 en una escala 1-10. Por otro lado, *PSORTII* [54] determinó que la localización de la proteína es principalmente citoplasmática con una confiabilidad del 94.1%. Ninguno de los predictores empleados ofrece soporte para secuencias tipo PY y se limitan únicamente a señales de localización nuclear canónicas, debido a la característica falta de consenso que presentan las primeras (véase sección 1.3.4).

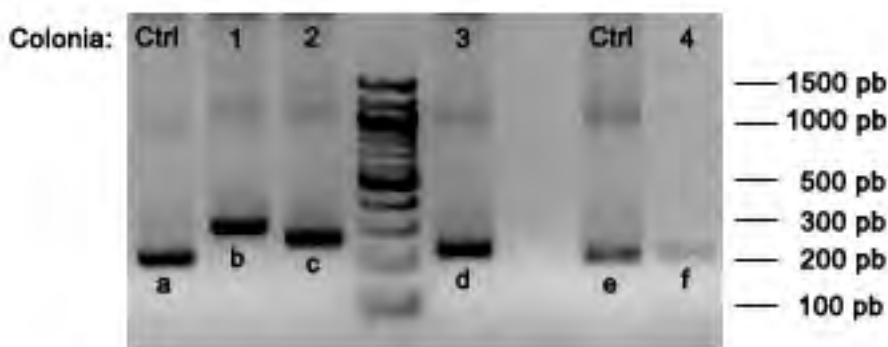
#### 4.2. Clonación del ADN que codifica para cuatro posibles NLS identificadas en hGpn3 en el vector ptetraEGFP

Con la finalidad de evaluar su condición *suficiente* (véase sección 3.2), fragmentos de ADN que codifican para las cuatro posibles NLS encontradas en hGpn3 (véase sección 4.1) se introdujeron en el MCS del vector reportero ptetraEGFP aprovechando los sitios de restricción de las endonucleasas EcoRI y BamHI.

Los oligonucleótidos 5' y 3' que flanquean los extremos del sitio de clonación múltiple del plásmido (véase sección 3.2.1.8), expanden un fragmento de 210 pares de bases cuando el MCS está vacío. El espaciamiento debe variar, entonces, si una

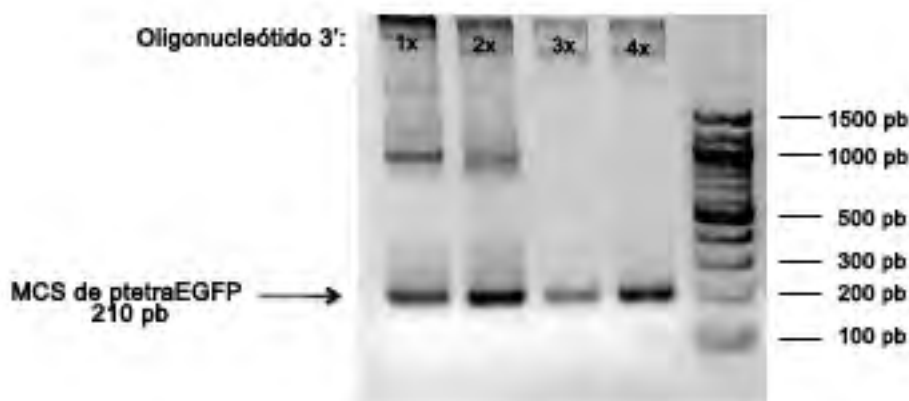
secuencia ha sido clonada correctamente en el vector, aumentando el número de nucleótidos observados de acuerdo a la longitud del inserto.

La clonación de *hGpn3-NLS-Bipartita*, una cadena polinucleótica de 127 pb que codifica para la probable señal bipartita identificada en hGpn3, generó un MCS de 337 pb cuando dicha región fue amplificada por PCR de colonia (véase sección 3.2.1.8); mientras que *hGpn3-NLS-Parte A* de 43 pb, uno de 253 pb; *hGpn3-NLS-Parte B* de 49 pb, uno de 259 pb; y, finalmente, *hGpn3-NLS-hPY* de 85 pb, uno de 295 pb. Estos resultados se analizaron de forma cualitativa mediante la técnica de electroforesis de ADN (véase sección 3.2.1.5 y figura 4-2) y fueron corroborados más rigurosamente por secuenciación en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).



**Figura 4-2. Electroforesis de ADN que muestra los fragmentos generados por una PCR de colonia para verificar la inserción de cuatro secuencias que codifican para posibles NLS en el vector ptetraEGFP.** En un gel de agarosa al 2.5% se corrieron los productos de una PCR de colonia que amplifica el MCS del vector ptetraEGFP. Los carriles marcados con las letras a y e representan la condición control en la cual se expande un fragmento de 210 pb. La colonias 1, 2, 3 y 4 se transformaron con las ligaciones de *hGpn3-NLS-Bipartita* (127 pb, carril b), *hGpn3-NLS-PY* (85 pb, carril c), *hGpn3-NLS-Parte B* (49 pb, carril d) y *hGpn3-NLS-Parte A* (43 pb, carril f) en ptetraEGFP, respectivamente. La longitud del inserto sumada a la del sitio de clonación múltiple vacío (210 pb), da como resultado el número de pares de bases del fragmento generado por la PCR.

#### 4.3. Ensayo de efectividad de la PCR para los productos de ligación en el vector ptetraEGFP



**Figura 4-3. Ensayo de efectividad de la PCR que amplifica el MCS de ptetraEGFP.** En un gel de agarosa al 2.5% se corrieron los productos de una PCR que amplifica el MCS del vector ptetraEGFP a partir del templado (reacción control), variando de forma creciente la proporción de oligonucleótidos 5':3' utilizada; esto es, 1:1, 1:2, 1:3 y, finalmente, 1:4. Los oligonucleótidos empleados expanden un sitio de clonación múltiple de 210 pb., por lo que se espera una banda única alrededor de 200 pb.

El oligonucleótido 5' que flanquea uno de los extremos del sitio de clonación múltiple de

ptetraEGFP, se diseñó a partir de los primeros 23 nt del mismo y, por lo tanto, dado que este segmento no se repite a lo largo de la cadena del plásmido, es específico; por otro lado, el oligonucleótido 3' se aparea 99 nt después del final del MCS, *i.e.* dentro de la secuencia de la cuarta proteína fluorescente verde (véase figura 3-2). El hecho de que el vector esté constituido por cuatro unidades de EGFP ocasiona una inespecificidad cuádruple para el blanco de este oligonucleótido.

Para mejorar la calidad de los productos de PCR obtenidos, se realizó entonces un ensayo de cuantificación, variando la cantidad de oligonucleótido 3' agregada a cada reacción (véase tabla 3-5). En la figura 4-3 se presentan los resultados de esta prueba, analizados mediante electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 2.5%. En el primer carril se empleó una relación 1:1 en la cantidad de los oligonucleótidos 5':3', la cual fue cambiando hasta llegar a una proporción 1:4 en la última línea.

Nótese que en el carril 4x (1:4) aparece una banda única y que el producto de PCR parece, al menos de forma cualitativa, más limpio.

#### **4.4. Dos secuencias monopartitas y una bipartita en hGpn3 son suficientes para dirigir el transporte de un reportero originalmente citoplásmico al núcleo celular**

Las colonias en las que el inserto (*hGpn3-NLS*) se introdujo exitosamente en el MCS del vector se inocularon y el ADN de interés fue extraído y cuantificado (véase sección 3.2.1.9). Los productos finales, *i.e.* las construcciones *ptetraEGFP-hGpn3-NLS*, se transfectaron en células HEK 293/T17 (véase sección 3.2.2.2) y se observaron 24 h después del tratamiento en un microscopio de fluorescencia (véase sección 3.2.3), con el fin de evaluar la localización subcelular de la proteína reportera unida a una posible señal de localización nuclear de hGpn3.

Las secuencias monopartitas (*hGpn3-NLS-Parte A* y *hGpn3-NLS-Parte B*) y la bipartita (*hGpn3-NLS-Bipartita*) fueron capaces de dirigir el transporte de ptetraEGFP al núcleo de las células; mientras que la NLS tipo hPY (*hGpn3-NLS-hPY*) no tuvo ningún efecto sobre la localización de la proteína que, al igual que en la condición control, se encontró exclusivamente en el citoplasma (véase figura 4-4a).

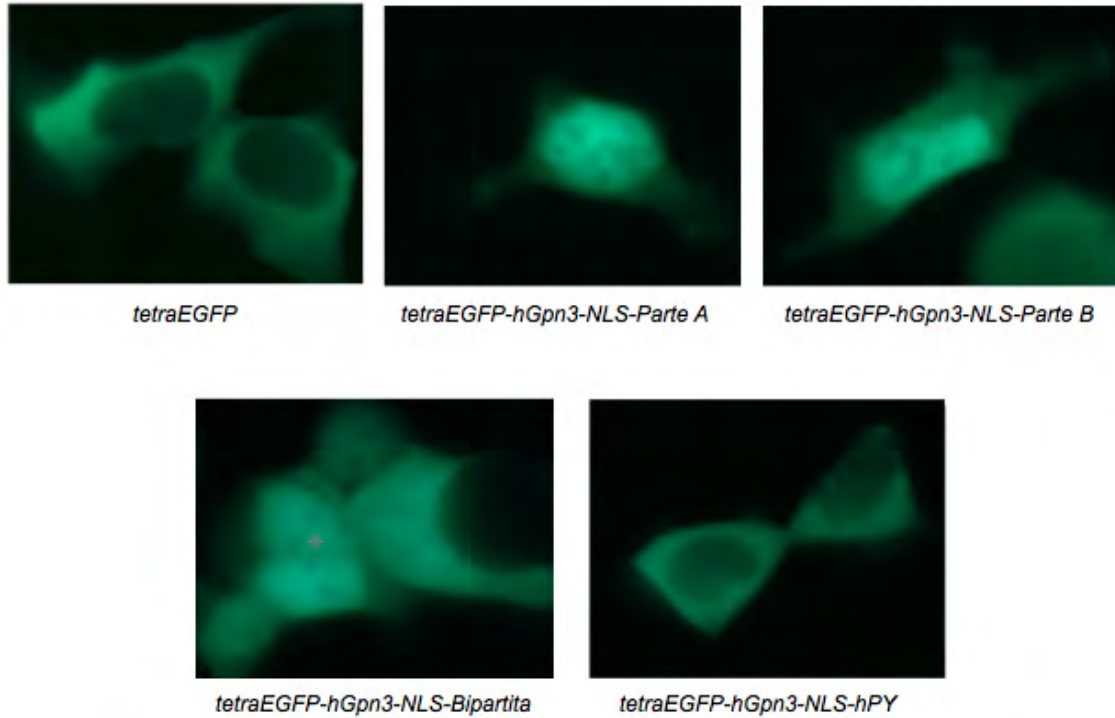
Las observaciones anteriores sugieren que tres de las cuatro NLS probables identificadas en hGpn3 (*hGpn3-NLS-Parte A*, *hGpn3-NLS-Parte B* y *hGpn3-NLS-Bipartita*) son suficientes para mediar la entrada de una proteína al núcleo y satisfacen el primer criterio propuesto por Marfori *et al.* [50] para evaluar la funcionalidad de una posible señal de localización nuclear (véase capítulo 3). Con respecto a este punto, se consideró, entonces, necesario hacer una acotación importante que planteó, finalmente, una interrogante sobre la cualidad *bona fide* de *hGpn3-NLS-Bipartita* como NLS: las dos regiones básicas que constituyen a la señal bipartita, son en realidad, *hGpn3-NLS-Parte A* y *hGpn3-NLS-Parte B*, las cuales cumplen, por otro lado, la condición suficiente de manera independiente y podrían, por lo tanto, por su efecto autónomo producir un falso positivo para *hGpn3-NLS-Bipartita*.

Para abordar esta cuestión, ligeras variaciones observadas en la intensidad de la fluorescencia y en la localización de las construcciones (células en las que la proteína se encontraba en el citoplasma, a pesar de estar unida a una secuencia aparentemente suficiente), orientaron la directiva del estudio a tomar un enfoque más cuantitativo. Para lo cual, se hizo un conteo bi-categorico de 3 poblaciones celulares distintas, en el que 300 células analizadas en cada una se clasificaron como (1) citosólicas o (2) nucleares, de acuerdo a la ubicación de la señal fluorescente (véase figura 4-4b).

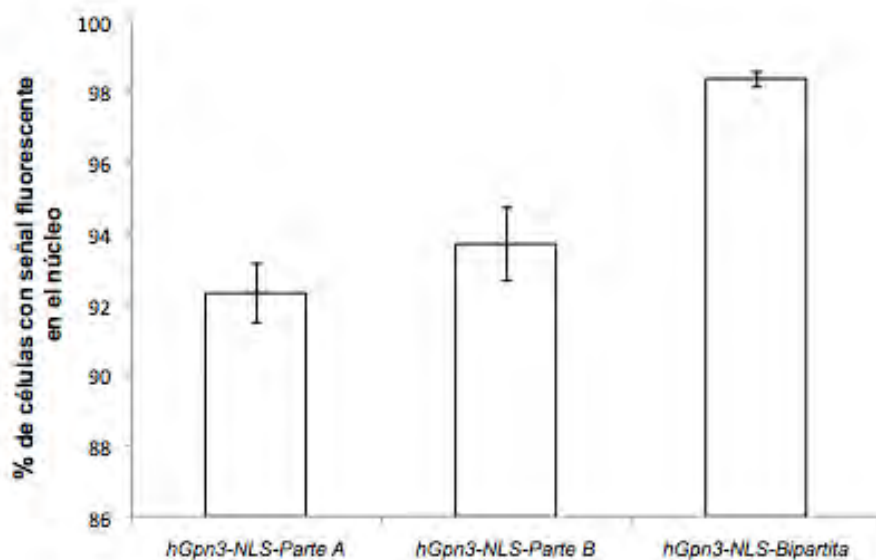
La figura 4-4b, muestra que las diferencias en el conteo del número de células en las que la proteína híbrida se localizó en el núcleo son significativas entre las construcciones *ptetraEGFP-hGpn3-NLS-Parte A* y *ptetraEGFP-hGpn3-NLS-Bipartita* y, también, *ptetraEGFP-hGpn3-NLS-Parte B* y *ptetraEGFP-hGpn3-NLS-Bipartita*

(aproximadamente  $4 \times SE$ , para  $n=3$ ); lo que sugiere que la posible secuencia bipartita, al menos en su condición suficiente, es *bona fide*. Establecer la importancia de cada NLS probable en el contexto de la proteína completa, fue menester para esclarecer más rigurosamente esta interrogante.

a)



b)



**Figura 4-4.** Las secuencias de aminoácidos *hGpn3-NLS-Parte A*, *hGpn3-NLS-Parte B* y *hGpn3-NLS-Bipartita* son capaces de dirigir a la proteína reportera *tetraEGFP* al núcleo celular. a) Localización subcelular de la proteína fusión *tetraEGFP-hGpn3-NLS*, para cuatro posibles NLS identificadas en *hGpn3* y la condición control (*tetraEGFP*), en células HEK 293/T17. El análisis por medio de microscopía de fluorescencia muestra que el vector vacío y la construcción *pteraEGFP-hGpn3-NLS-hPY* codifican para proteínas de fusión que se encuentran exclusivamente en el citoplasma; mientras que *tetraEGFP-hGpn3-NLS-Parte A*, *tetraEGFP-hGpn3-NLS-Parte B* y *tetraEGFP-hGpn3-NLS-Bipartita* se localizan en el núcleo y el citoplasma.

#### 4.5. Mutaciones en las secuencias identificadas como posibles NLS en hGpn3 no tienen efecto sobre la localización subcelular de hGpn3-EYFP

Para examinar la relevancia de los aminoácidos positivos que constituyen a las NLS probables de hGpn3 en la localización subcelular de la proteína fusión hGpn3-EYFP, se mutaron, por pares, los residuos K181 y K182, K184 y K185, K209 y K210, K212 y K213, P232 y Y233, sustituyéndolos por alaninas mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida (véase sección 3.3.1). Las construcciones se transfectaron en células HEK 293T/17 (véase sección 3.2.2.2) y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

En la figura 4-5, se muestran fotografías representativas de cada condición estudiada. En el primer panel superior de la izquierda, se puede observar la señal fluorescente que produce hGpn3-EYFP, la cual se utilizó como control. Se encontró, entonces, que las mutaciones realizadas sobre las NLS propuestas (*hGpn3-NLS-Parte A*, *hGpn3-NLS-Parte B* y *hGpn3-NLS-PY*) en el contexto de la proteína completa, no tienen efecto sobre su localización; de otra forma, se esperaría que el polipéptido se excluyera del núcleo y que se encontrara en el citoplasma, pues la abolición de las señales por medio de la delección o alteración de residuos relevantes, debería bloquear total o parcialmente su transporte [50].

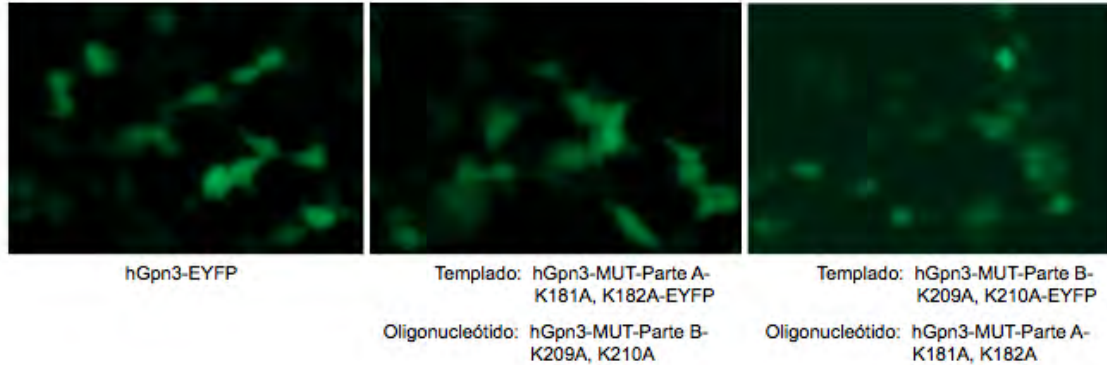


**Figura 4-5. Mutaciones puntuales sobre aminoácidos pertenecientes a cuatro posibles NLS en hGpn3, no tienen efectos significativos sobre la localización subcelular de la proteína de fusión hGpn3-EYFP.** Células HEK 293/T17 transfectadas con 1 µg de ADN para cada construcción, se examinaron 24 h después del tratamiento por microscopía de fluorescencia. Las condiciones evaluadas no presentan diferencias significativas, en tanto a la señal fluorescente, con respecto al control.

El caso de *hGpn3-NLS-Bipartita*, debió tratarse nuevamente por separado. Siguiendo el hilo de discusión de la sección 4.4, era probable que la sustitución de residuos positivos en alguna de las regiones básicas que constituyen la señal, dejando a la otra imperturbada, no fuese capaz de abolir por completo el transporte nuclear de la proteína por el efecto autónomo de cada NLS monopartita.

Una doble mutante, *hGpn3-MUT-Bipartita-K181A, K182A; K209A, K210 A-EYFP*, se obtuvo como solución razonada a este problema, empleando nuevamente la técnica de mutagénesis sitio-dirigida (véase sección 3.3.1), reemplazando en esta ocasión el

templado silvestre (hGpn3-EYFP) por una de las secuencias previamente mutadas (*hGpn3-MUT-Parte A-K181A, K182A-EYFP* ó *hGpn3-MUT-Parte B-K209A, K210A-EYFP*) y usando como cebadores a los oligonucleótidos con la mutación faltante (*hGpn3-MUT-Parte B-K209A, K210A* ó *hGpn3-MUT-Parte A-K181A, K182A*), respectivamente. Los resultados obtenidos para estas construcciones, pueden apreciarse en la figura 4-6.



**Figura 4-6. Localización subcelular de la versión doble mutante de hGpn3-EYFP.** Células HEK 293/T17 transfectadas con 1 µg de la construcción doble mutante hGpn3-MUT-Bipartita-pEYFP, con variaciones en los aminoácidos positivos K181, K182, K209, K210, se examinaron 24 h después del tratamiento por microscopía de fluorescencia. La condiciones evaluadas no presentan diferencias significativas, en tanto a la señal fluorescente, con respecto al control.

El análisis por microscopía de fluorescencia de la localización subcelular de la versión doble mutante, muestra que las sustituciones de aminoácidos básicos no tienen un efecto significativo con respecto a la señal fluorescente de hGpn3-EYP.

Las observaciones anteriores sugieren que las señales de localización nuclear propuestas en la sección 4.1 no son *necesarias* para el transporte nuclear de hGpn3, usando como modelo una proteína híbrida entre hGpn3 y EYFP; pues la alteración de las mismas no tiene como resultado el bloqueo total o parcial de su importación al núcleo de las células [50].

#### 4.6. La proteína fusión hGpn3-EYFP entra al núcleo de las células por difusión pasiva

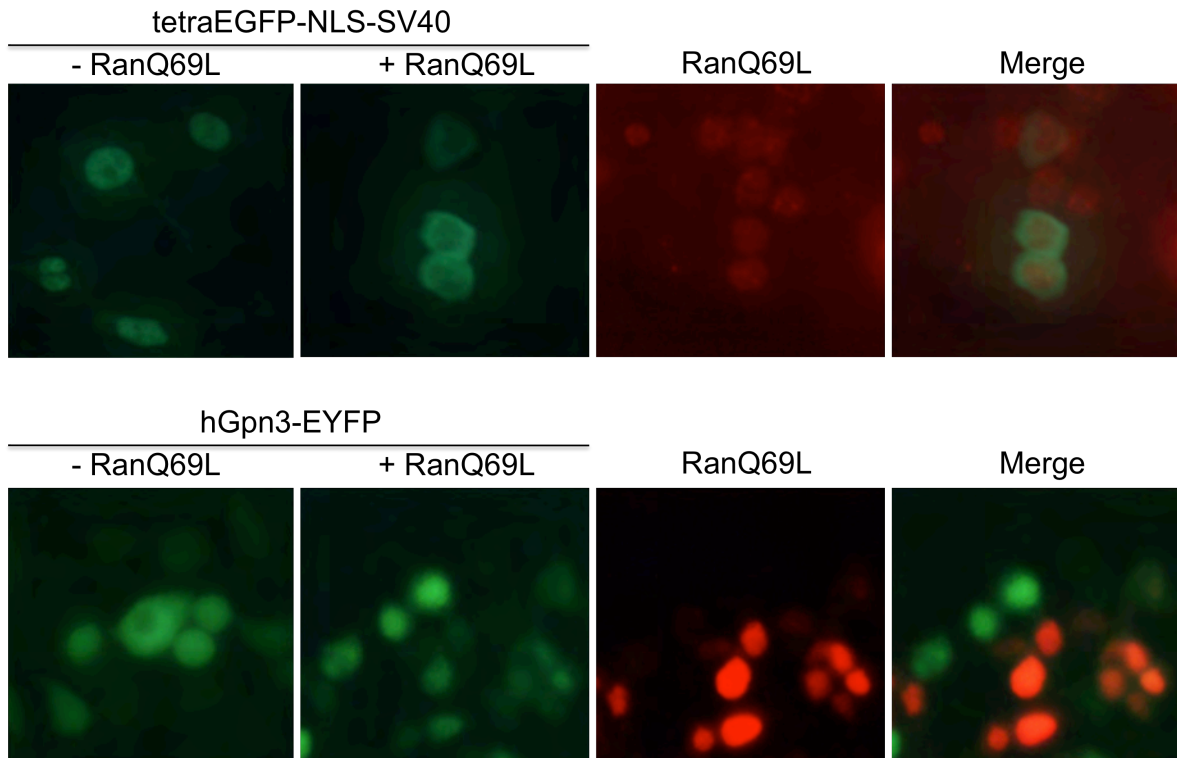
A partir de las conclusiones de los experimentos anteriores, se planteó la posibilidad de que la proteína estuviese entrando al núcleo por difusión pasiva, en lugar de estar sometida a una vía de transporte activo como se había propuesto en un principio; esta premisa explicaría, *per sé*, los resultados de las mutaciones realizadas en hGpn3-EYFP y apuntaría al hecho de que hGpn3 no requiera de ninguna señal específica dentro de su secuencia de aminoácidos para atravesar la membrana nuclear.

El sistema hGpn3-EYFP tiene un peso molecular de aproximadamente 59 kDa; *a priori*, se espera que la proteína fusión necesite de una NLS para atravesar los poros nucleares, que tienen como límite superior alrededor de 40 kDa para la difusión pasiva. En algunos casos, sin embargo, es la forma de los polipéptidos –y no su peso molecular– lo que determina su vía de importación [6].

Para asestar la manera en que hGpn3-EYFP ingresa al núcleo, fue necesario bloquear la ruta de transporte activo. Este mecanismo de entrada es regulado por la GTPasa Ran (véase sección 1.3.2), que le confiere direccionalidad y energía mediante la hidrólisis de GTP [460-1]. Varios estudios han demostrado con anterioridad que RanQ69L, una versión mutante de Ran, es incapaz de hidrolizar GTP; la sobre-expresión de esta proteína también inhibe la función de la GTPasa endógena, por lo que, en estas condiciones, el transporte núcleo-citoplasmático activo no puede sostenerse [312-9, 460-2]. A RanQ69L también se le conoce como una mutante dominante negativa de Ran.

Si hGpn3-EYFP es dirigida al núcleo de forma dependiente de Ran, entonces, la co-expresión de esta construcción con la mutante dominante negativa, debería resultar en una acumulación citosólica de la proteína.

Células HEK 293T/17 se co-transfectaron con 1 µg de hGpn3-EYFP y 0.5 µg de RanQ69L-RFP, una versión fusión de RanQ69L y la proteína fluorescente roja (RFP), empleando el protocolo descrito en la sección 3.2.2.2. 24 h después del tratamiento, se analizaron sólo aquellas células que habían co-expresado exitosamente ambas proteínas, *i.e.* con señal fluorescente en los filtros 488 (verde-amarillo) y 568 (rojo), y se evaluó la localización subcelular de hGpn3-EYFP, como se muestra en la figura 4-7.



**Figura 4-7. Localización subcelular de la proteína híbrida hGpn3-EYFP en presencia de una versión dominante negativa de Ran.** Células HEK 293T/17 transfectadas con 1 µg de NLS-SV40-ptetraEGFP (paneles superiores) y 1 µg hGpn3-pEYFP (paneles inferiores), respectivamente; y co-transfectadas con 0.5 µg de RanQ69L-RFP. El ADN de la construcción NLS-SV40-ptetraEGFP se utilizó como control debido a la extraordinaria eficiencia de la señal de localización nuclear que posee el antígeno T-grande de SV40 [45], cuyo importe nuclear, como se muestra en los paneles superiores, es completamente dependiente de Ran.

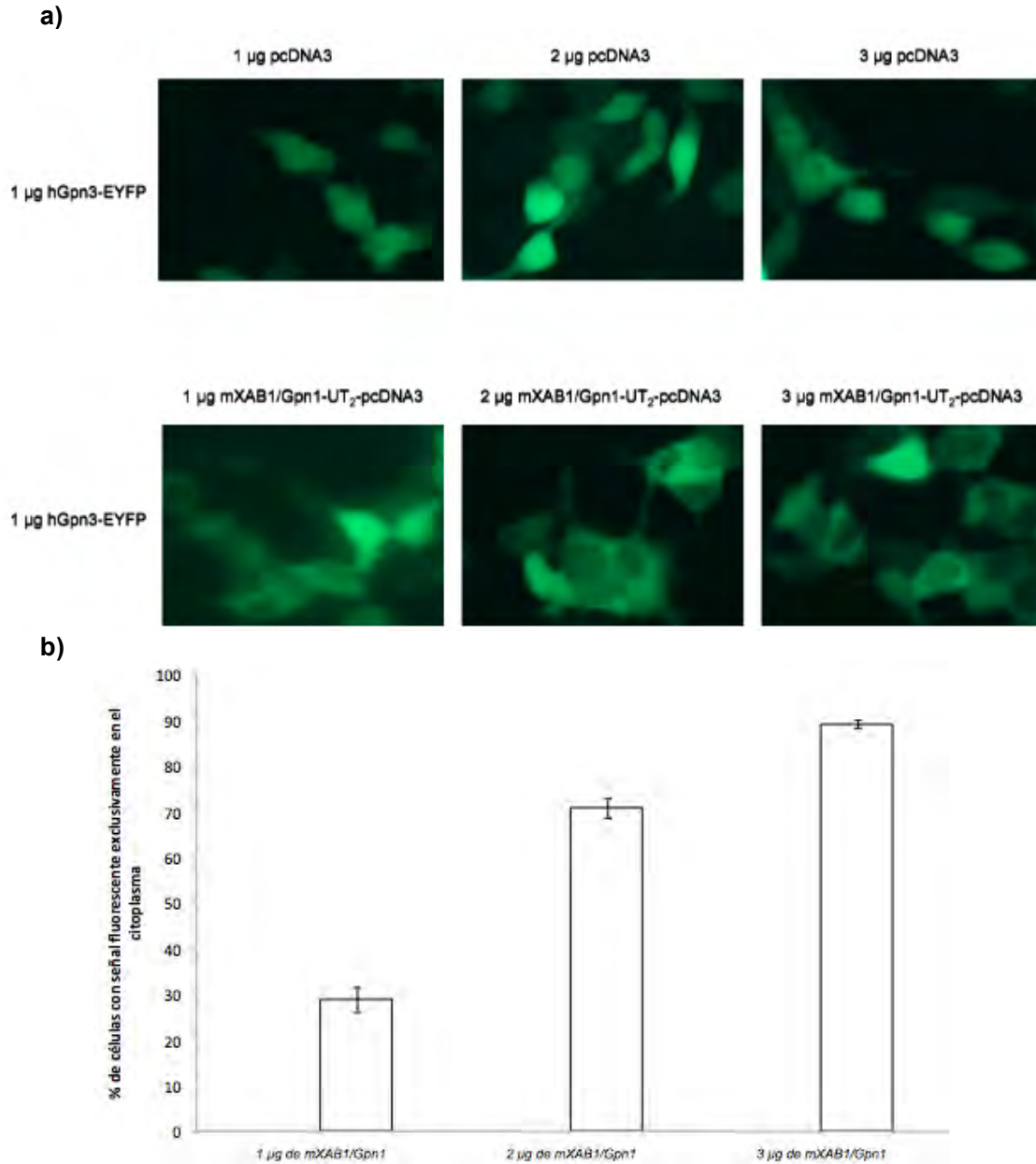
En presencia de la mutante dominante negativa de Ran, RanQ69L, el polipéptido híbrido hGpn3-EYFP se encontró en el núcleo y el citoplasma y no se observaron diferencias significativas con respecto a la condición control, en la que se expresó solamente a la proteína fusión. Estos resultados son consistentes con un mecanismo de importación pasiva de hGpn3-EYFP al núcleo de las células; de tal forma que, al menos utilizando este modelo, la proteína fusión no requiere ninguna señal de localización nuclear para atravesar la membrana nuclear.

#### 4.7. Un gradiente de mXAB1/Gpn1 provoca la acumulación citoplasmática de hGpn3-EYFP

De forma paralela, se investigó el efecto que tiene la sobre-expresión de la proteína mXAB1/Gpn1 desde el vector pcDNA3, sobre la localización subcelular de hGpn3-EYFP. En un estudio de purificación por afinidad en tandem (TAP), Jerónimo *et al.* reportaron que



Xab1/Gpn1 interacciona con MGC1450/Gpn3 [40] y apuntaron que la inhibición alternada de los homólogos de Xab1/Gpn1 y Gpn3 en levadura –NPA3 y YLR243W, respectivamente–, tiene un efecto global similar en la expresión de otros 1710 genes de dicho organismo (véase sección 1.2.1). Estos hallazgos, aunados al hecho de que los genes que codifican para estas proteínas son esenciales en *S. cerevisiae*, sugieren que Gpn1 y Gpn3 participan en un mecanismo celular crucial y que, cualquiera que sea la función de cada una, está estrechamente relacionada con el papel que desempeña la otra.



**Figura 4-8. Localización subcelular de la proteína híbrida hGpn3-EYFP en presencia de un gradiente de mXAB1/Gpn1.** a) Células HEK 293/T17 co-transfectadas con 1 µg de hGpn3–pEYFP y 1 µg, 2 µg y 3 µg de pcDNA3 (paneles superiores), respectivamente; y con 1 µg de hGpn3–pEYFP y 1 µg, 2 µg y 3 µg de mXAB1/Gpn1-UT<sub>2</sub>-pcDNA3 (paneles inferiores). La sobre-expresión de Gpn1 alteró gravemente la localización basal de hGpn3-EYFP, que se encontró excluida del núcleo celular con cantidades crecientes del ADN codificante para mXAB1/Gpn1. b) Para evaluar el efecto del gradiente de mXAB1/Gpn1 en la localización de hGpn3-EYFP se clasificaron 300 células como (1) nucleares ó (2) citosólicas, en 2 experimentos independientes (n=2), y se graficó el número de células en las que la señal fluorescente se encuentra exclusivamente en el citoplasma para cada condición (1 µg, 2 µg y 3 µg de mXAB1/Gpn1-UT<sub>2</sub>-pcDNA3). Las barras de error mostradas corresponden al error estándar (SE).

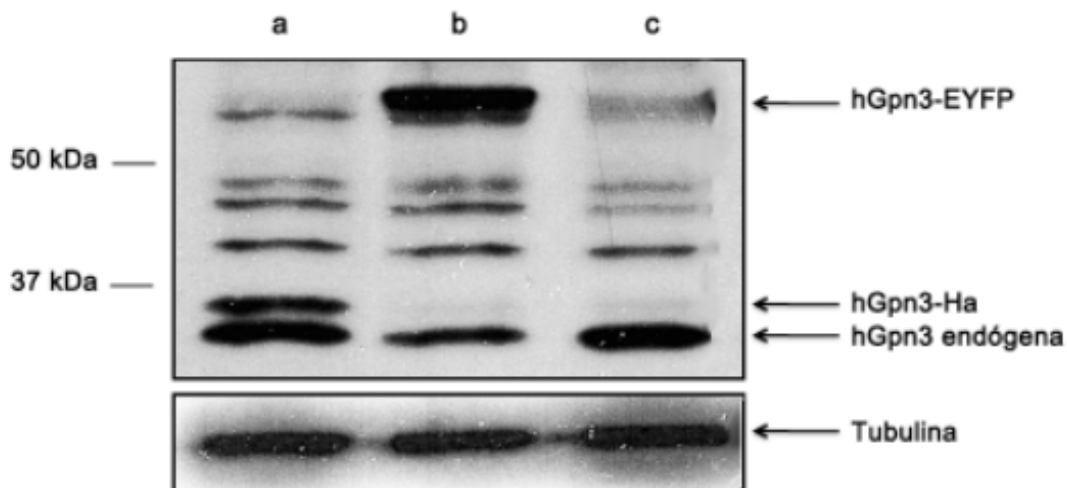
Células HEK 293T/17 co-transfectadas (véase sección 3.2.2.2) con 1 µg de hGpn3-EYFP y 1 µg, 2 µg y 3 µg de mXAB1/Gpn1-UT<sub>2</sub>-pcDNA3 (donde UT, untagged, se refiere a que el péptido no expresa ningún marcaje molecular), se analizaron por microscopía de fluorescencia, para determinar la localización subcelular de la proteína fusión entre hGpn3 y EYFP. Adicionalmente, se realizó una prueba control que reprodujo estas condiciones, reemplazando mXAB1/Gpn1-UT<sub>2</sub>-pcDNA3 por pcDNA3 (vacío) para garantizar que el efecto observado no fuese producido simplemente por la adición del vector. En la figura 4-8a se muestran los resultados obtenidos.

Cantidades crecientes del ADN que codifica para mXAB1/Gpn1, en la reacción de transfección, generaron una acumulación dramática de hGpn3-EYFP en el citoplasma. Para determinar el efecto del gradiente de forma cuantitativa, se realizó un conteo categórico de 300 células, que se clasificaron como (1) nucleares ó (2) citoplásmicas. El experimento se repitió dos veces en igualdad de condiciones para células co-transfectadas con 1 µg, 2 µg y 3 µg de mXAB1/Gpn1-UT<sub>2</sub>-pcDNA3. En la figura 4-8b se aprecia el concentrado del análisis estadístico.

Lo anterior sugiere, en principio, que la presencia en exceso de mXAB1/Gpn1 podría estar involucrada en un mecanismo de retención de hGpn3-EYFP en el citoplasma; y es, además, consistente con la interacción antes documentada de estas proteínas y una posible función conjunta dentro de las células [40, 62]. Por otro lado, la extensión de estas observaciones abre espacio a una nueva dimensión de cuestionamiento, que tiene que ver con los niveles de expresión que se inducen en las células durante la transfección.

Es probable que al sobre-expresar hGpn3, la función de contención de Gpn1 endógena sea sobrepasada por el exceso de proteína y que la localización subcelular observada para el péptido fusión hGpn3-EYFP (véase figura 4-5) no corresponda, por tanto, a la disposición basal de la proteína endógena. Para abordar este punto, se diseñó un sistema para disminuir los niveles de expresados de hGpn3-EYFP (véase sección 3.6), los resultados de estos esfuerzos se discuten en el siguiente apartado.

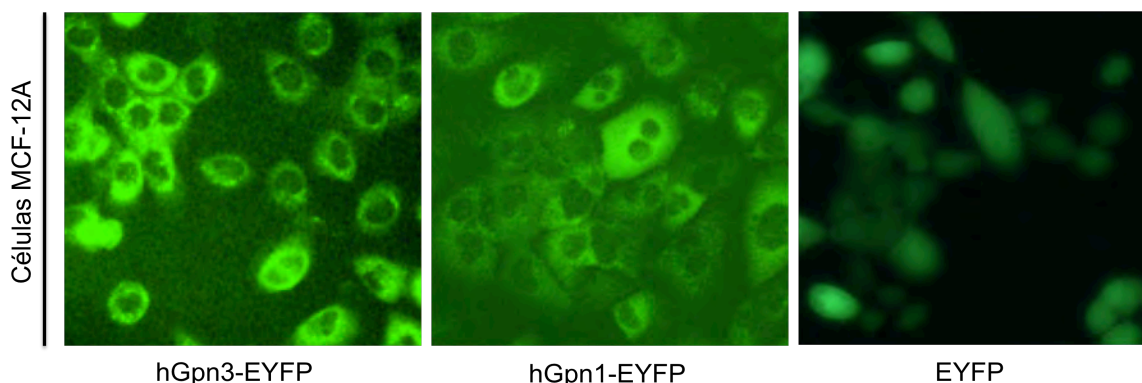
#### 4.8. La localización subcelular de hGpn3-EYFP expresada desde un plásmido es diferente a la de la proteína expresada desde un vector retroviral



**Figura 4-9. Expresión de las proteínas de fusión hGpn3-EYFP y hGpn3-Ha.** Extractos totales de células MCF-12A se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo primario dirigido contra hGpn3. En el carril a, se observa la expresión de la proteína híbrida hGpn3-Ha como un banda de aprox. 35 kDa, justo sobre aquella de hGpn3 endógena; en el carril b, se muestra la expresión de la proteína hGpn3-EYFP, como una banda de ~59 kDa; y en c, el extracto celular del control. Un control con tubulina muestra que se cargaron cantidades similares de proteína en cada carril.

Con el fin de generar un sistema en que los niveles de la proteína fusión hGpn3-EYFP fueran menores a aquellos producidos por su expresión desde un plásmido; el constructo que codifica para este polipéptido híbrido se introdujo en el vector retroviral pMSCVpuro (véase figura 3-10); y, posteriormente, se generó una línea con células MCF-12A (*i.e.* células de tejido epitelial humano de mama no-tumorogénicas) para expresar a la proteína de forma estable (véase sección 3.6). En la figura 4-9, línea b, se pueden observar las bandas de ~33 y ~59 kDa que corresponden a hGpn3 endógena y hGpn3-EYFP, respectivamente.

Sucesivamente, se evaluó la localización subcelular de hGpn3-EYFP mediante microscopía de fluorescencia. Dos líneas celulares que expresan establemente a EYFP y a hGpn1-EYFP, respectivamente, se desarrollaron de forma paralela y se utilizaron como controles para los experimentos posteriores. La figura 4-10 muestra la localización subcelular de estas proteínas fusión.



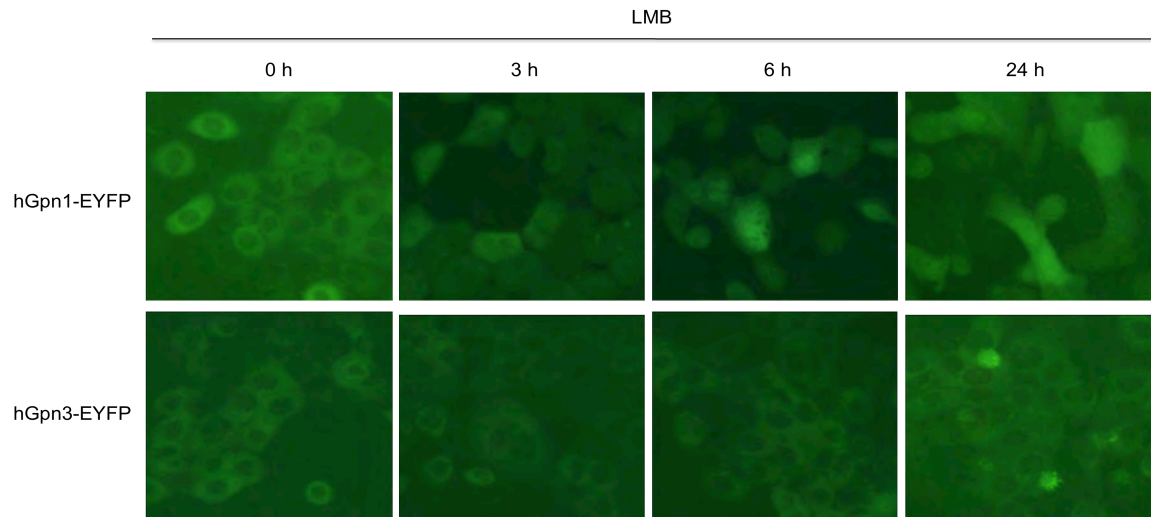
**Figura 4-10. Localización subcelular de la proteína de fusión hGpn3-EYFP.** Células MCF-12A que expresan de forma estable a las proteínas hGpn3-EYFP, hGpn1-EYFP y EYFP, respectivamente, se analizaron por microscopía de fluorescencia. En las primeras dos líneas celulares, las proteínas híbridas muestran una localización distintivamente citosólica; mientras que EYFP se encuentra homogéneamente distribuida en el núcleo y el citoplasma.

Interesantemente, la ubicación de la señal fluorescente de hGpn3-EYFP expresada desde pMSCVpuro es completamente distinta a aquella observada con pEYFP-N1 (véase figura 4.5). En las líneas celulares estables *MCF-12A/hGpn3-EYFP* y *MCF-12A/hGpn1-EYFP*, las proteínas híbridas se encontraron exclusivamente en el citoplasma, con una distribución basal comparable; mientras que la proteína expresada desde el plásmido se encuentra homogéneamente distribuida en el núcleo y el citosol. Las diferencias sustanciales observadas en ambos sistemas, la transfección transitoria con el plásmido pEYFP-N1 y la transfección estable con el vector retroviral pMSCVpuro, podrían tal vez atribuirse a una disparidad en los niveles de proteína que se producen en las células, como se señaló en la sección 4.7. La variación en la eficiencia de los promotores, CMV para pEYFP-N1 y LTR para pMSCVpuro, y la forma estable o transitoria en la que el ADN que codifica para estas proteínas se expresa en las células podrían ser factores relevantes para abordar esta cuestión.

Adicionalmente, para constatar, al menos de forma elemental, la identidad funcional de la línea *MCF-12A/hGpn1-EYFP*, células que expresan esta proteína de forma estable se sometieron a un tratamiento con leptomicina B (LMB) (véase sección 3.6.4). Varios estudios [23, 68, 9] muestran que la LMB produce la acumulación nuclear de la Gpn1. En la figura 4-11 se presenta un curso temporal en donde se reproducen estos resultados.

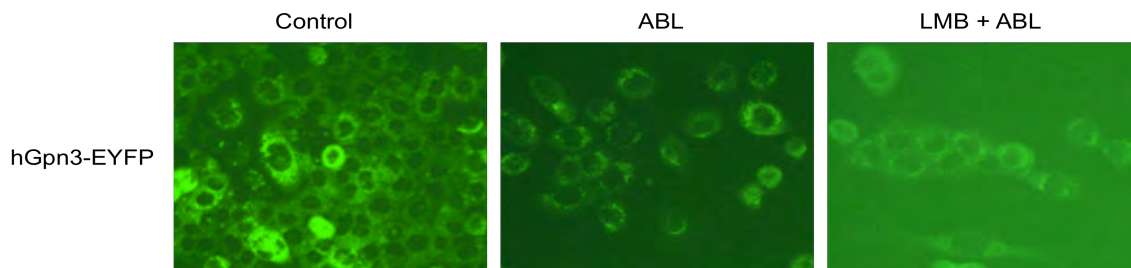
El experimento se llevó a cabo en condiciones similares para la línea *MCF-12A/hGpn3-EYFP*, atendiendo principalmente a dos cuestiones: (1) existe una gran semejanza entre las secuencias de hGpn1 y hGpn3 (27.9% idéntico, 63.3% similar) [68]; (2) la interacción física entre estas proteínas sugiere que la leptomicina B podría tener el

mismo efecto en hGpn3, pues se ha reportado que estas proteínas existen como un complejo dentro de las células [9]. Sin embargo, la localización subcelular de hGpn3-EYFP permaneció inalterada durante las 24 h en las que se realizaron las observaciones. Este desenlace, por otro lado, no es del todo inesperado; en la sección 4.6 se había sugerido ya que la perturbación del transporte núcleo-citoplasmático no altera el emplazamiento de hGpn3-EYFP. Aún así, la inhibición de la vía de salida contribuye, en cierta medida, a evitar posibles ambigüedades en lo que a la importación/exportación de la proteína se refiere.



**Figura 4-11. La leptomicina B ocasiona la acumulación nuclear de hGpn1-EYFP, pero no tiene efecto sobre hGpn3-EYFP.** Células MFC-12A que expresan establemente a las proteínas hGpn1-EYFP y hGpn3-EYFP, respectivamente, se trataron con 10 ng/ml de leptomicina B y se monitorearon por 24 h para determinar la localización subcelular de las proteínas fusión. La inhibición de la exportación nuclear dependiente de Crm-1, causada por la LMB, altera profundamente la distribución de hGpn1-EYFP. Un control con etanol se llevó a cabo de forma paralela para ambas líneas, para constatar que los efectos observados no se debieron al diluyente de la LMB (datos no mostrados).

Por sentido de completez, este estudio se repitió en presencia y ausencia de la lectina de *Agaricus bisporus*, la cual bloquea el transporte activo interfiriendo con la maquinaria de los poros nucleares (véase sección 3.6.4). Y, aunque el fármaco no tuvo ningún efecto en la localización subcelular de hGpn3-EYFP, un análisis cuidadoso de las células sometidas al tratamiento reveló una curiosa distribución puntual de la proteína en el citoplasma; la cual no se debe a la lectina, pues también se observó en la condición control, y que se había pasado por alto en experimentos anteriores (véase figura 4-12).



**Figura 4-12. La lectina de *Agaricus bisporus* no tiene ningún efecto sobre la localización subcelular de hGpn3-EYFP.** Células MCF-12A que expresan de forma estable a la proteína hGpn3-EYFP se sometieron a un tratamiento con ABL a una concentración final de 20 µg/ml y se analizaron por microscopía de fluorescencia durante varias horas después de la adición del fármaco.

Algunas polipéptidos como ERGIC53, adaptina  $\delta$  y  $\beta$ -COP que forman parte del sistema dinámico de membranas del aparato de Golgi presentan una configuración comparable ya sea en su estado basal, o bien, cuando la vía secretoria se interfiere con compuestos como el nocodazol o la brefeldina A [57, 84, 91]. Estos hallazgos *per sé*,

motivaron al presente estudio a investigar una posible participación de Gpn3 en mecanismos de tránsito intracelular que se abordan en el siguiente apartado.

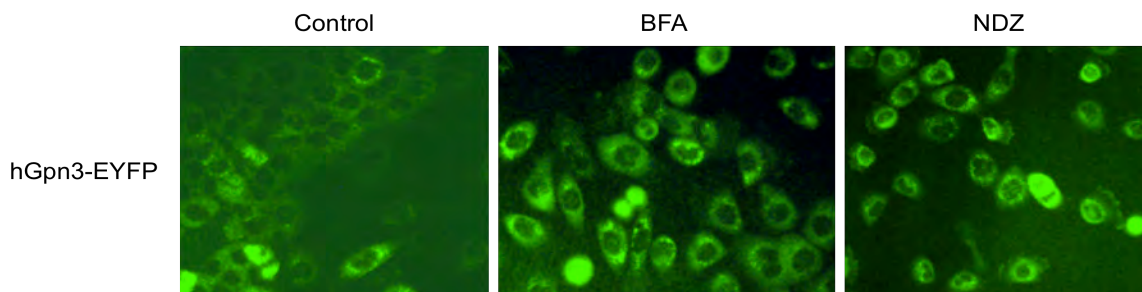
#### 4.9. hGpn3 podría estar involucrada en la vía secretoria

Barbe *et al.* [4] llevaron a cabo un proyecto piloto para determinar la localización subcelular de 466 proteínas en tres líneas celulares humanas mediante anticuerpos específicos para cada polipéptido y el uso de microscopía confocal; estos resultados se encuentran disponibles en *The Human Protein Atlas* [92].

De acuerdo con esta base de datos, hGpn1 y hGpn2 se distribuyen en vesículas en el citoplasma [92]; la localización subcelular de hGpn3, por otro lado, permanece como un misterio. Sin embargo, se ha mencionado antes la gran similitud que existe entre las tres proteínas que pertenecen a la familia GPN, por lo que suponer un papel para hGpn3 en la vía secretoria no es del todo peripatético.

Adicionalmente, una revisión de la secuencia de Ylr243w (el homólogo de hGpn3 en *S. cerevisiae*), hGpn1 y hGpn3 en la herramienta de predicción de segmentos funcionales en proteínas de *Yeast Resource Center* [69], sugirió que las dos primeras podrían tener un péptido señal en el extremo N-terminal, no así para hGpn3. La vinculación de Ylr243w con la vía secretaria, mediante un péptido señal, podría estar relacionada con la interacción que existe entre esta proteína y Rvs167, cuyo homólogo pertenece a una familia conocida como anfifisinas, las cuales participan en procesos de endocitosis [55]; aunque no existe ninguna evidencia al respecto.

En el espíritu de explorar estas nociones, células MCF-12A que expresan establemente a la proteína hGpn3-EYFP se trataron con nocodazol y brefeldina A (véase sección 3.6.4), con el fin de perturbar a la vía secretoria y, en particular, al aparato de Golgi. En la figura 4-13 se muestran los resultados de esta prueba.



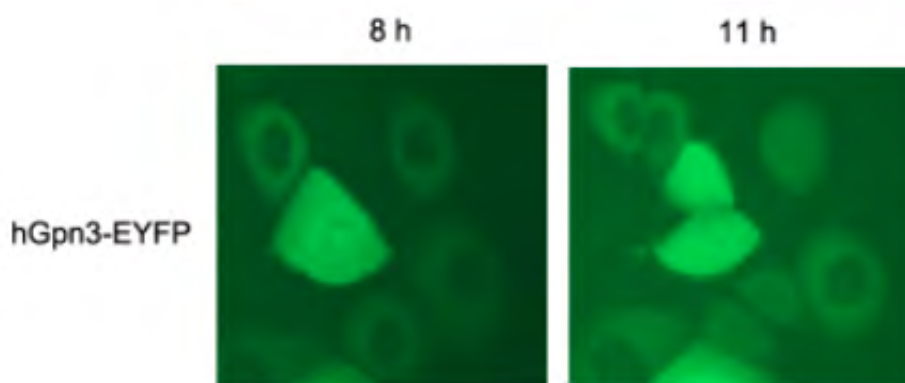
**Figura 4-13. Efecto de la brefeldina A y el nocodazol en la localización subcelular de hGpn3-EYFP.** Células MCF-12A que expresan de forma estable a la proteína hGpn3-EYFP se sometieron a un tratamiento con BFA y nocodazol a una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  y 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, y se analizaron por microscopía de fluorescencia 1 h después de la adición de los fármacos.

En múltiples observaciones de experimentos independientes, se encontró que la localización subcelular de hGpn3-EYFP se presenta de forma heterogénea. Aún en la condición control, existen distribuciones dispares en una misma población, en las que la proteína parece acumularse como un halo perinuclear, en algunas ocasiones, o en configuraciones puntuales dispersas en el citoplasma e, incluso, de forma homogénea en el citosol.

Esta aparente dificultad se abordó, entonces, desde dos perspectivas. En primer lugar, se consideró que las diferencias en la localización subcelular de la proteína podrían tener una relación estrecha con la progresión de ciclo celular o algún otro mecanismo regulador desconocido; por lo cual se llevó a cabo un doble bloqueo con timidina 2 mM para sincronizar a una población de la línea *MCF-12A/hGpn3-EYFP*, con el propósito de monitorear cambios en la distribución de hGpn3-EYFP durante varias horas, después de su liberación en la interfase G1/S (véase sección 3.6.4 y figura 4-14).

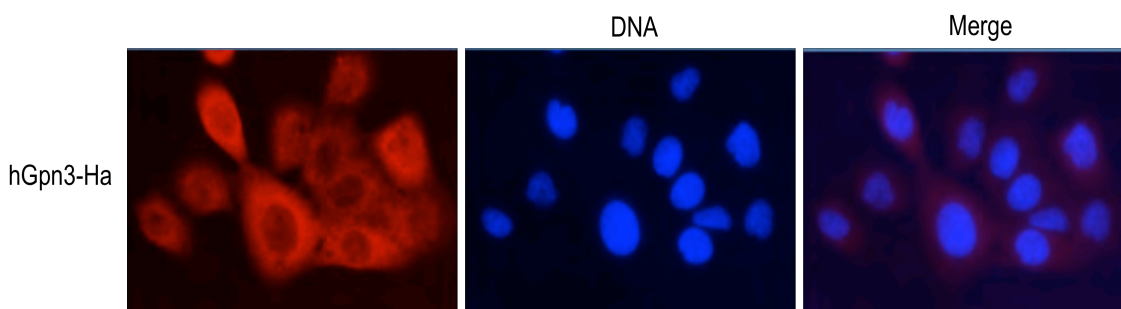
Alternativamente, se planteó la posibilidad de que la adición de una proteína fluorescente de ~26 kDa al extremo C-terminal del polipéptido pudiera ocasionar un artefacto experimental que comprometiera la localización real de hGpn3. Estudios anteriores muestran que éste puede ser el caso cuando estos marcadores moleculares forman homomultímeros en el interior de las células [79]. Como un intento para solventar esta situación, se desarrolló una línea celular estable adicional que expresa a la proteína hGpn3-Ha (véase sección 3.6.1), bajo la suposición de que la añadidura de este epítipo de apenas 9 residuos tendría menos probabilidad de afectar la función intracelular de la proteína y de ocasionar modificaciones en la localización subcelular de la misma.

En la figura 4-14 se muestra dos imágenes del curso temporal de la línea *MCF-12A/hGpn3-EYFP* 8 h y 11 h después de ser sometidas a un doble bloque con timidina. No se observaron cambios significativos en la localización de hGpn3-EYFP.



**Figura 4-14. Sincronización de *MCF-12A/hGpn3-EYFP* mediante un doble bloqueo con timidina 2 mM.** Células *MCF-12A* que expresan de forma estable a la proteína hGpn3-EYFP se sometieron a un tratamiento con timidina 2 mM, cuyo propósito es arrestar a la células en la interfase G1/S. Después de liberadas, las células pueden avanzar nuevamente a lo largo del ciclo celular y proliferar. En el panel de la izquierda se muestran células sincronizadas 8 h después de la liberación del segundo bloqueo; en el panel de la derecha se muestran estas mismas células 11 h luego de la liberación, nótese cómo algunas de ellas están dividiéndose aún de forma sincrónica.

Para observar la distribución de hGpn3-Ha, se realizó una inmunofluorescencia (véase sección 3.6.5) con un anticuerpo primario dirigido contra Ha. En este sistema, la proteína es igualmente citosólica y parece presentar también un patrón puntual heterogéneo; lo cual es consistente con las observaciones realizadas para hGpn3-EYFP.



**Figura 4-15. Localización subcelular de la proteína hGpn3-Ha.** Células *MCF-12A* que expresan de forma estable a la proteína hGpn3-Ha, se fijaron con formaldehído al 2% y, posteriormente se permeabilizaron y bloquearon. Un anticuerpo primario dirigido contra Ha permitió observar la distribución de la proteína dentro de las células. El ADN se marcó con DAPI para identificar el núcleo y acentuar identidad citosólica de la proteína.

La relevancia biológica de esta distribución y su verdadera correlación con la localización subcelular de la proteína endógena sigue siendo un misterio. Sin embargo, estos hallazgos abren una nueva ventana de exploración para determinar la función intracelular de Gpn3.

## Capítulo 5

### Conclusiones y perspectivas

#### 5.1. Conclusiones

La caracterización adecuada de motivos funcionales en las proteínas, así como su respectiva localización subcelular, es esencial para entender y predecir los procesos celulares en los que éstas puedan estar involucradas.

En el presente trabajo se trató de identificar una señal de localización nuclear en la proteína hGpn3. Para tal efecto, se encontraron dos secuencias que se ajustan a NLS consenso clásicas monopartitas (*hGpn3-NLS-Parte A* y *hGpn3-NLS-Parte B*), las cuales están compuestas de residuos positivos como arginina y lisina; una bipartita (*hGpn3-NLS-Bipartita*), que tiene dos regiones de aminoácidos básicos, separadas por un espaciador de menos de 30 residuos; y, finalmente, una NLS atípica tipo PY hidrofóbica (*hGpn3-NLS-hPY*), la cual se distingue por un bipéptido conservado de prolina (**P**) y tirosina (**Y**) y un grupo de cuatro aminoácidos hidrofóbicos río arriba [24, 47].

Estas cuatro secuencias se lograron insertar exitosamente en el sitio de clonación múltiple del vector ptetraEGFP y fueron expresadas transitoriamente en células de mamífero unidas a la proteína reportera tetraEGFP. La dos monopartitas y la bipartita demostraron ser capaces de mediar la importación nuclear de este polipéptido, lo cual implica que son *suficientes* para dirigir la translocación de una proteína al núcleo de las células.

En cuanto a su relevancia en el contexto de la proteína completa, los residuos esenciales que constituyen a estas secuencias, se mutaron de forma puntual en el modelo hGpn3-EYFP para evaluar su contribución a la funcionalidad de las probables NLS; sin embargo, ninguna de las sustituciones produjo un efecto significativo en la localización subcelular de esta proteína fusión, contrario a lo que se había anticipado. Estos resultados indican que aunque *hGpn3-NLS-Parte A*, *hGpn3-NLS-Parte B* y *hGpn3-NLS-Bipartita* son *suficientes* para la acumulación nuclear de una proteína, no son *necesarias* para que hGpn3-EYFP sea importada al núcleo de las células.

La perturbación de la vía de transporte núcleo-citoplásmico mediante una mutante dominante negativa de Ran, que es incapaz de hidrolizar GTP y adicionalmente inhibe la función propia de la proteína endógena [45], reveló que el mecanismo por el cual hGpn3-EYFP se introduce al núcleo de las células se trata, en realidad, de difusión pasiva. A partir de este evento anagnórico se concluye que la proteína hGpn3 contiene algunas regiones en su secuencia primaria que son parecidas a una señal de localización nuclear, pero que, por otro lado, no son necesarias para su importación, al menos en el contexto de la proteína fusión hGpn3-EYFP.

Paralelamente, se observó que un exceso de la proteína Gpn1 en células que expresan transitoriamente a hGpn3-EYFP desde el plásmido pEYFP-N1, promueve la acumulación citoplásmica de ésta última; lo cual sugiere que Gpn1 ejerce una función de retención que es sobrepasada por los altos niveles de hGpn3-EYFP. Para examinar esta noción, se diseñó un sistema en el que la proteína híbrida fue introducida en un vector retroviral, pMSCVpuro, ocasionando una subsecuente disminución en sus niveles de expresión. En este modelo, la localización subcelular de hGpn3-EYFP se ve completamente alterada pues la proteína se encuentra exclusivamente en el citoplasma.

Se ha sugerido anteriormente que un porcentaje de Xab1/Gpn1 y Parcs/Gpn3 podría existir como un complejo dentro de las células. Esta concepción ha sido respaldada por evidencia experimental diversa que incluye la co-inmunoprecipitación de Gpn1 con Gpn3 y una notable interacción proteína-proteína en un ensayo de doble híbrido realizado

en levadura [62]. Los hallazgos reportados en este estudio, concernientes a una señalada alteración en la localización subcelular de hGpn3-EYFP debido a un exceso de Gpn1, parecen sustentar esta idea; sin embargo, la relevancia biológica de esta asociación es aún desconocida.

Adicionalmente, se encontró que la distribución de hGpn3-EYFP en células MCF-12A presenta un patrón más bien localizado, con agregados perinucleares cuya configuración y ubicación relativa evoca a la de algunas proteínas que pertenecen al sistema dinámico del aparato de Golgi o que participan en la vía secretoria. Estas observaciones, si bien deben considerarse con cuidado debido a que el uso de proteínas fluorescentes puede conducir a la obtención de resultados artificiosos [79], abren nuevas e interesantes alternativas a lo que la función biológica de Gpn3 se refiere.

Este estudio se permitió, entonces, examinar la posibilidad de que Gpn3 estuviera involucrada en la vía secretoria. La cuestión se abordó tácticamente mediante el uso de fármacos dirigidos como la brefeldina A y el nocodazol, que ocasionan la fragmentación del Golgi, y de la sincronización celular por un doble bloqueo con timidina 2 mM; sin embargo, la distintiva heterogeneidad en las distribuciones observadas para hGpn3-EYFP en las poblaciones celulares analizadas, no produjo resultados concluyentes.

Con el propósito de sortear esta vicisitud y de atender cualquier reparo en tanto al empleo de proteínas fluorescentes, se desarrolló una línea celular que expresa establemente la proteína hGpn3-Ha, bajo la suposición de que este pequeño marcador de apenas nueve residuos no afecta el plegamiento, función, localización subcelular, modificaciones y transporte intracelular de Parcs/Gpn3. Se ha mostrado, mediante inmunofluorescencia, que esta proteína tiene una localización citosólica, no enteramente homogénea; un análisis más delicado aún es requerido.

## 5.2. Perspectivas

Se ha visto, anteriormente, que Parcs/Gpn3 y Xab1/Gpn1 interaccionan físicamente con la ARN polimerasa II y que el silenciamiento de los genes que codifican para estas proteínas resulta en la acumulación citoplasmática de la enzima [8, 23]. Este hallazgo, *per sé*, podría emplearse como un método demostrativo para comprobar la integridad funcional de las proteínas fusión empleadas en este estudio. Esta prueba demandaría inhibir la expresión de Parcs/Gpn3 y Xab1/Gpn1, respectivamente, mediante ARN de interferencia, lo que ocasionaría una redistribución de la ARNPII al citoplasma; sin embargo, la sobre-expresión paralela de hGpn3-EYFP, hGpn3-Ha o hGpn1-EYFP, según sea el caso, supondría, en teoría, la importación regular de la ARN polimerasa II al núcleo de las células. Determinar la localización subcelular del complejo enzimático o de alguna de sus subunidades en ausencia de las proteínas endógenas, permitiría entonces, evaluar la condición *bona fide* de estas proteínas híbridas.

Complementariamente, se podría explorar desde otras perspectivas la posibilidad de que Gpn3 esté involucrada en la vía secretoria. Como un avance preliminar en esta dirección, células MCF-12A que expresan establemente a la proteína fusión hGpn3-EYFP se llevaron a una subconfluencia de 70-80% en condiciones normales de cultivo; posteriormente, se crecieron durante 24 y 48 h en presencia (control) o ausencia de HS; y, al cabo de este tiempo, el medio extracelular fue recolectado y filtrado. Una muestra del mismo, concentrada mediante una columna *Amicon Ultra - 0.5 ml, 10 K membrane* de *Millipore*, fue separada mediante SDS-PAGE y sometida a un Western blot con un anticuerpo primario dirigido contra hGpn3. Tanto la proteína endógena como la sobre-expresada parecen encontrarse en el medio de cultivo recolectado; lo que podría sugerir que en algún momento son secretadas por las células. No obstante, aún es necesario validar estas observaciones con otros experimentos que puedan sustentar estos resultados.



En este sentido, estudios de co-localización con proteínas cuya participación en la vía secretoria ha sido comprobada previamente –como  $\beta$ -COP, una de las siete subunidades del complejo COPII, ERGIC53 y adaptina  $\delta$  [57, 84]– podrían contribuir a esclarecer un posible papel para hGpn3 en esta ruta.

Asimismo, verificar si la distribución de hGpn3-EYFP permanece localizada en otras líneas celulares como HeLa y expresada desde otros vectores retrovirales como pLNCX2, podría resultar interesante para comprobar su reproducibilidad.

Abordar todas estas posibilidades resulta no sólo atractivo, sino también necesario; pues, de acuerdo con Márfori *et al.*, cuando se intenta caracterizar a una proteína de forma extensiva, debe tenerse en cuenta que los resultados experimentales presentarán, probablemente, una nota de ambigüedad [50]; la complejidad inherente de los mecanismos intracelulares y la parcial efectividad de los métodos experimentales implementados deben poner en tela de juicio cualquier observación, aún si esta es razonada. Será imprescindible continuar cuestionando estos hallazgos y sus implicaciones hasta que se eluciden por completo los procesos celulares en los que participa Parcs/Gpn3.

## Fuentes consultadas

- [1] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland science, Taylor & Francis Group. 5th edition. US, 2008.
- [2] *Agarose Gel Electrophoresis*, [online]. Molecular Station: Molecular Biology Protocols and Bioinformatics. URL: <<http://www.molecularstation.com/agarose-gel-electrophoresis/>> Last updated: 2011. Retrieved: January, 2012.
- [3] ATCC: American Type Culture Collection. *ATCC: 293 [HEK-293]*, [en línea]. URL: <<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1573&Template=cellBiology>> Retrieved: May, 14th, 2012.
- [4] Barbe, L.; Lundberg, E.; Oksvold, P.; Steniust, A.; Lewin, E.; Björling, E.; Asplund, A.; Pontén, F.; Brismar, H.; Uhlén, M.; Andersson-Svahn, H. *Toward a Confocal Subcellular Atlas of the Human Proteome*. *Molecular and Cellular Proteomics*, **7** (3): 499-508, 2008.
- [5] Barondeau, D.; Putnam, C.; Kassmann, C. *Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (21): 12111-12116, 2003.
- [6] Beetz, C.; Brodhun, M.; Moutzouris, K.; Kiehnopf, M.; Berndt, A.; Lehnert, D.; Deufel, T.; Bastmeyer, M.; Schickel, J. *Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP reporter system*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **318**: 1079-1084, 2004.
- [7] *Calcium Phosphate Transfection Method*, [online]. Flemington Lab. URL: <<http://www.flemingtonlab.com/Protocols/CalciumPhosphateTransf.pdf>>. Retrieved: 2012.
- [8] Calera, M. R.; Zamora-Ramos, C.; Araiza-Villanueva, M. G.; Moreno-Aguilar, C. A.; Peña-Gómez, S. G.; Castellanos-Terán, F.; Robledo-Rivera, A. Y.; Sánchez-Olea, R. *Parcs/Gpn3 is required for the nuclear accumulation of RNA polymerase II*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1813** (10): 1708-1716, 2011.
- [9] Carré, C.; Shiekhattar, R. *Human GTPases Associate with RNA Polymerase II To Mediate Its Nuclear Import*. *Molecular and Cellular Biology*, **31** (19): 3953-3962, 2011.
- [10] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.; Prasher, D. *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression*. *Sciences*, **263** (5148): 802-805, 1994.
- [11] Chapman, R.; Conrad, M.; Eick, D. *Role of the Mammalian RNA Polymerase II C-Terminal Domain (CTD) Nonconsensus Repeats in CTD Stability and Cell Proliferation*. *Molecular and Cellular Biology*, **25** (17): 7665-7674, 2005.
- [12] CLC bio. *CLC sequence viewer*, [en línea]. URL: <<http://www.clcbio.com/index.php?id=28>> Retrieved: June, 2011.
- [13] *cNLS Mapper*, [online]. URL: <<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>> Last updated: December 26th, 2010. Retrieved: October 2011. Program based on Kosugi, S.; Hasebe, M.; Tomita, M.; Yanagawa, H. *Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (25): 10171-10176, 2009.

- [14] Colwell, L.; Brenner, M.; Ribbeck, K. *Charge as a Selection Criterion for Translocation through the Nuclear Pore Complex*. PLoS Computational Biology, **6** (4): 1-8, 2010.
- [15] Cramer, P.; Armache, K. J.; Baumli, S.; Benkert, S.; Brueckner, F.; Buchen, C.; Damsma, G.E.; Dengl, S.; Geiger, S. R.; Jasiak, A. J.; Jawhari, A.; Jennebach, S.; Kamenski, T.; Kettenberg, H.; Kuhn, C. D.; Lehmann, E.; Leike, K.; Sydow, J. F.; Vannini, A. *Structure of Eukaryotic RNA Polymerases*. Annual Review of Biophysics, **37**: 337-352, 2008.
- [16] Cramer, P.; Bushnell, D.; Fu, J.; Gnatt, A.; Maier-Davis, B.; Thompson, N.; Burgess, R.; Edwards, A.; David, P.; Kornberg, R. *Architecture of RNA Polymerase II and the Implications for the Transcription Mechanism*. Science, **288** (5466): 640-649, 2000.
- [17] Cramer, P.; Bushnell, D.; Kornberg, R. *Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Angstrom Resolution*. Science, **292** (5523): 1863-1876, 2001.
- [18] Cumming, G.; Fidler, F.; Vaux, D. *Error bars in experimental biology*. The Journal of Cell Biology, **177** (1): 7-11, 2007.
- [19] Czeko, E.; Seizl, M.; Augsberger, C.; Mielke, T.; Cramer, P. *Iwr1 Directs RNA Polymerase II Nuclear Import*. Molecular Cell, **42**: 261-166, 2011.
- [20] Daniel, R.; Greger, J.; Katz, R.; Taganov, K.; Wu, X.; Kappes, J.; Skalka, A. M. *Evidence that Stable Retroviral Transduction and Cell Survival following Integration Depends on Components of the Nonhomologous End Joining Pathway*. Journal of Virology, **78** (16): 8573-8581, 2004.
- [21] *Excitation and Emission of Green Fluorescent Proteins*, [online]. BioTek: Technical notes. URL: <<http://www.biotek.com/resources/articles/green-fluorescent-proteins.html>> Last updated: 2012. Retrieved: 2012.
- [22] Fontes, M. R. M.; Teh, T.; Jans, D.; Brinkworth, R. I.; Kobe, B. *Structural Basis for the Specificity of Bipartite Nuclear Localization Sequence Binding by Importin*. Journal of Biological Chemistry, **278** (30): 27981-27987, 2003
- [23] Forget, D.; Lacombe, A. A.; Cloutier, P.; Al-Khoury, R.; Bouchard, A.; Lavallée-Adam, M.; Faubert, D.; Jeronimo, C.; Blanchette, M.; Coulombe, B. *The Protein Interaction Network of the Human Transcription Machinery Reveals a Role for the Conserved GTPase RPAP4/GPN1 and Microtubule Assembly in Nuclear Import and Biogenesis of RNA Polymerase II*. Molecular and Cellular Proteomics, **9** (12): 2827-2839, 2010.
- [24] Freitas, N.; Cunha, C. *Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins*. Current Genomics, **10** (8): 550-557, 2009.
- [25] Giaever, G.; Chu, A. M.; Ni, L.; Connelly, C.; Riles, L.; Véronneau, S.; Dow, S.; Lucau-Danila, A.; Anderson, K.; André, B.; Arkin, A. P.; Astromoff, A.; El-Bakkoury, M.; Bangham, R.; Benito, R.; Brachat, S.; Campanaro, S.; Curtiss, M.; Davis, K.; Deutschbauer, A.; Entian, K. D.; Flaherty, P.; Foury, F.; Garfinkel, D. J.; Gerstein, M.; Gotte, D.; Güldener, U.; Hegemann, J. H.; Hempel, S.; Herman, Z.; Jaramillo, D. F.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L.; Kotter, P.; LaBonte, D.; Lamb, D. C.; Lan, N.; Liang, H.; Liao, H.; Liu, L.; Luo, C.; Lussier, M.; Mao, R.; Menard, P.; Ooi, S. L.; Revueltas, J. L.; Roberts, C. J.; Rose, M.; Ross-Macdonald, P.; Scherens, B.; Schimmack, G.; Shafer, B.; Shoemaker, D. D.; Sookhai-Mahadeo, S.; Storms, R. K.; Strathern, J. N.; Valle, G.; Voet, M.; Volckaert, G.; Wang, C. Y.; Ward, T. R.; Wilhelmy, J.; Winzeler, E. A.; Yang, Y.; Yen, G.; Youngman, E.; Yu, K.; Bussey, H.; Boeke, J. D.; Snyder, M.; Philippsen, P.; Davis, R. W.; Johnston, M. *Functional Profiling of the Saccharomyces cerevisiae Genome*. Nature, **418** (6896): 387-391, 2002.

- [26] Gönczy, P.; Echeverri, C.; Coulson, A.; Jones, S.; Copley, R.; Duperon, J.; Oegema, J.; Brehm, M.; Cassin, E.; Hannak, E.; Kirkham, M.; Pichler, S.; Flohrs, K.; Goessen, A.; Alleaume, A. M.; Martin, C.; Bork, P.; Hyman, A. *Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III*. *Nature*, **408**: 331-336, 2000.
- [27] González, M.; Vega, A. *How to cross the cellular membrane?* *Revista de Salud Animal*, **29** (1): 253-257. La Habana, 2007.
- [28] Graham, F.; Van Der Eb, A. *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. *Virology*, **52**: 456-461, 1973.
- [29] Gras, S.; Chaumont, V.; Fernandez, B.; Carpentier, P.; Charrier-Savournin, F.; Schmitt, S.; Pineau, C.; Flament, D.; Hecker, A.; Forterre, P.; Armengaud, J.; Housset, D. *Structural Insights into a New Homodimeric Self-activated GTPase Family*. *EMBO Rep.*, **8** (6): 569-575, 2007.
- [30] Griffiths, A.; Miller, J.; Suzuki, D.; Lewontin, R.; Gelbart, W. *An introduction to Genetic Analysis*. 7th Edition. W.H. Freeman and Company. New York, USA, 2000.
- [31] Hamamoto, T.; Gunji, S.; Tsuji, H. *Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics*. *The Journal of Antibiotics*, **36** (6): 639-645, 1983.
- [32] Harper, J. *Synchronization of Cell Populations in G1/S and G2/M Phases of the Cell Cycle*. *Methods in Molecular Biology*, **296** (2): 157-166, 2005.
- [33] *HEK293 Cell Line Origins, Cytogenesis, and Expression*, [online]. URL: <<http://hek293.com/>> Retrieved: 2012.
- [34] Helin, K. *State-of-the-art in human cell synchronization*, [online]. The Diamonds Project, Ghent University, Belgium. URL: <<http://www.sbcellcycle.org/>> Retrieved: April, 2012.
- [35] Hetzer, M.; Wenthe, S. *Border Control at the Nucleus: Biogenesis and Organization of the Nuclear Membrane and Pore Complexes*. *Developmental Cell*, **17**: 606-616, 2009.
- [36] Hodel, M.; Corbett, A.; Hodel, A. *Dissection of a Nuclear Localization signal*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (2): 1317-1325, 2001.
- [37] Hughes, M.; Zhang, C.; Avis, J.; Hutchison, C.; Clarke, P. *The role of the Ran GTPase in nuclear assembly and DNA replication: characterisation of the effects of Ran mutants*. *Journal of Cell Sciences*, **111** (20): 3017-3026, 1998.
- [38] Inns, M.; Myambo, K.; Gelfand, D.; Brown, M. A. *DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Biochemistry*, **85**: 9436-9440, 1998.
- [39] Jang, B. C.; Muñoz-Najar, U.; Paik, J. H.; Claffey, K.; Yoshida, M.; Hla, T. *Leptomycin B, an Inhibitor of the Nuclear Export Receptor CRM1, Inhibits COX-2*. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 2773-2776, 2003.
- [40] Jeronimo, C.; Forget, D.; Bouchard, A.; Li, Q.; Chua, G.; Poitras, C.; Thérien, C.; Bergeron, D.; Bourassa, S.; Greenblatt, J.; Chabot, B.; Poirier, G. G.; Hughes, T. R.; Blanchette, M.; Price, D. H.; Coulombe, B. *Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme*. *Mol. Cell*, **27** (2): 262-274, 2007.

- [41] Kalderon, D. *Topic 2: DNA Cloning and PCR*, [online]. Columbia University. URL: <[http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/w3034/Dan/notes/Biotech\\_Topic2-11.doc](http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/w3034/Dan/notes/Biotech_Topic2-11.doc)> Last updated: 2011. Retrieved: October, 2012.
- [42] Kamps, M. *Vector for gene therapy: Focus on retroviral vector*, [online]. UCSD School of Medicine and the Burnham-Institute. URL: <[http://molpath.ucsd.edu/PDF/Kamps\\_Lecture.pdf](http://molpath.ucsd.edu/PDF/Kamps_Lecture.pdf)> Retrieved: February, 2012.
- [43] Lange, A.; McLane, L. M.; Mills, R. E.; Devine, S. E.; Corbett, A. H. *Expanding the Definition of the Classical Bipartite Nuclear Localization Signal*. *Traffic*, **11** (3): 311-323, 2010.
- [44] Lange, A.; Mills, R. E.; Lange, C. J.; Stewart, M.; Devine, S. E.; Corbett, A. H. *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha*. *Journal of Biological Chemistry*, **282** (8): 5101-5105, 2007.
- [45] Lara-Chacón, B.; Bermúdez-de-León, M.; Leocadio, D.; Gómez, P.; Fuentes-Mera, L.; Martínez-Vieyra, I.; Ortega, A.; Jans, D.; Cisneros, B. *Characterization of an Importin  $\alpha/\beta$ -recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan*. *Journal of Cellular Biochemistry*, **110** (3): 706-717, 2010.
- [46] L Terry, Laura J.; Shows, E.; Wenthe, S. *Crossing the Nuclear Envelope: Hierarchical Regulation of Nucleocytoplasmic Transport*. *Science*, **318**: 1412-1416, 2007.
- [47] Lee, B. J.; Cansizoglu, A.; Süel, K. E.; Louis, T. H.; Zhang, Z.; Chook, Y. M. *Rules for Nuclear Localization Sequence Recognition by Karyopherin  $\beta$ 2*. *Cell*, **126** (3): 543-558, 2006.
- [48] Lembo, F.; Pero, R.; Angrisano, T.; Vitiello, C.; Iuliano, R.; Bruni, C.; Chiariotti, L. *MBDin, a Novel MBD2-Interacting Protein, Relieves MBD2 Repression Potential and Reactivates Transcription from Methylated Promoters*. *Molecular and Cellular Biology*, **23** (5): 1656-1665, 2003.
- [49] Li, S.; Huang, L. *Nonviral gene therapy: promises and challenges*. *Nature: Gene Therapy: Millennium Review*, **7**: 31-34, 2000.
- [50] Marfori, M.; Mynott, A.; Ellis, J. J.; Mehdi, A. M.; Saunders, N. F. W.; Curmi, P.; Forwood, J. K.; Bóden, M.; Kobe, B. *Molecular Basis for Specificity of Nuclear Import and Prediction of Nuclear Localization*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **16295** (9): 16-32, 2010.
- [51] Moore, C. *Introduction to Western Blotting*. Morphosys UK Ltd, Endeavour House, Langford Business Park, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GE, UK, 2009.
- [52] Moore, S. P.; Rinckel, L. A.; Garfinkel, D. J. *A Ty1 Integrase Nuclear Localization Signal Required for Retrotransposition*. *Molecular and Cellular Biology*, **18** (2): 1105-1114, 1998.
- [53] Nair, R.; Carter, P.; Rost, B. *NLSdb: database of nuclear localization signals*. *Nucleic Acids Research*, **31** (1): 397-399, 2003.
- [54] Nakai, K.; Horton, P. *PSORT & PSORTII: Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences*, [online]. Human Genome Center, Institute for Medical Science, University of Tokyo Japan. <<http://psort.hgc.jp/>> Last updated: January 5th, 2007. Retrieved: October, 2011.
- [55] NCBI: National Center for Biotechnology Information. *Database: Protein*, [en línea]. URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Retrieved: June, 2011.

- [56] Nitta, M.; Saijo, M.; Kodo, N.; Matsuda, T.; Nakatsu, Y.; Tamai, H.; Takana, K. *A Novel Cytoplasmic GTPase XAB1 interacts with DNA repair protein XPA*. *Nucleic Acids Research*, **28** (21): 4212-4218, 2000.
- [57] Ohashi, Y.; Iijima, H.; Yamaotsu, N.; Yamazaki, K.; Sato, S.; Okamura, M.; Sugimoto, K.; Dan, S.; Hirono, S.; Yamori, T. *AMF-26, a Novel Inhibitor of the Golgi System, Targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with Potential for Cancer Therapy*. *The Journal of Biological Chemistry*, **287** (6): 3885-3897, 2012.
- [58] Panja, S.; Aich, P.; Jana, B.; Basu, T. *How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation of Escherichia coli?* *Molecular Membrane Biology*, **25** (5): 411-422, 2008.
- [59] Park, K. J.; Kanehisa, M. *Prediction of Nuclear Localization Signals by HMM*. *Japanese Society for Bioinformatics*, **99** (1): 21-22, 2007.
- [60] Patton, R. *Molecular Tool: Electroporation, [online]*. Davidson College. URL: <<http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/mccord/electroporation.htm>> Last updated: 2003. Retrieved: 2012.
- [61] Penno, M. B. *Trypsinization of Adherent Cells, [online]*. John Hopkins University, Genetic Resources Core Facility: The Cell Center. URL: <<http://cellcenter.grcf.jhmi.edu/protocols/trypsinizingadhercells.pdf>> Rev. 6/02. Retrieved: September, 2011.
- [62] Pérez, A. *Estudio de las interacciones entre GTPasas GPN como proteínas recombinantes producidas en bacterias*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, 2010.
- [63] Phela, M. C. *Current Protocols in Molecular Biology: Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture*. John Wiley & Sons, Inc. USA, 2006.
- [64] Powledge, T. *The Polymerase Chain Reaction, [online]*. Breakthroughs in Bioscience. URL: <<http://www.faseb.org/portals/0/pdfs/opa/The%20Polymerase%20Chain%20Reaction.pdf>>. Last Updated: 2012. Retrieved: 2012.
- [65] *PredicProtein & PredictNLS, [online]*. URL: <<https://www.predictprotein.org>> ROSTLAB. Last updated: 2012. Retrieved: October, 2011. Program based on Rost, B.; Yachdav, G.; Liu, J. *The PredictProtein server*. *Nucleic Acids Research*, **32** (2004): W321-W326.
- [66] *Protocol: DNA ligation with T4 DNA Ligase (M0202), NEB, [online]*. New England Biolabs Inc. URL: <<http://www.neb.com/nebecomm/products/protocol658.asp>> Last updated: 2010. Retrieved: August, 2011.
- [67] Reinhardt, A.; Hubbard, T. *Using neural networks for prediction of the subcellular localization of proteins*. *Nucleic Acids Research*, **26** (9): 2230-2236, 1998.
- [68] Reyes, H. *Mecanismos moleculares determinantes de la exportación nuclear de la proteína XAB1/Gpn1*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2012.
- [69] Reynolds, S. Yeast Resorce Center. Informatics Data Public Repository. <<http://www.yeastrc.org/pdr/yeastProteinRedirect.do?acc=YLR243W>>. Retrieved: May, 2012.
- [70] Robinson, P.; Sturjls, J.; Kumar, G. *Immunofluorescence, [online]*. IHC Staining Methods. URL: <[http://www.dako.com/08002\\_03aug09\\_ihc\\_guidebo ok\\_5th\\_ edition\\_chapter\\_10.pdf](http://www.dako.com/08002_03aug09_ihc_guidebo ok_5th_ edition_chapter_10.pdf)> Retrieved: July, 2012.

- [71] *RPAP1 (human)*, [online]. PhosphoSitePlus: a resource for protein phosphorylation and other post-translational modifications by Cell Signaling Technology. URL: <<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=6428&showAllSites=true>>. Retrieved: August, 2012.
- [72] Ryan, J. *Introduction to Animal Cell Culture*, [online]. Corning Incorporated Life Sciences. URL: <[http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/intro\\_animal\\_cell\\_culture.pdf](http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/intro_animal_cell_culture.pdf)>. USA. Last updated: 2008. Retrieved: 2011.
- [73] Ryan, J. *Subculturing Monolayer Cell Culture*, [online]. Corning Incorporated Life Sciences. URL: <[http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/Subculturing\\_protocol.pdf](http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/Subculturing_protocol.pdf)> USA, 2008.
- [74] Rybicki, E. *Molecular Biology Methods Manual: Detection of Nucleic Acids by Hybridisation*, [online]. URL: <<http://www.mcb.uct.ac.za/Manual/hybridn.htm>> Last updated: 1998. Retrieved: June, 2012.
- [75] Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 1*. 3rd Ed. CSHL Press. New York, 2001.
- [76] Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual Vol. 2*. 3rd Ed. CSHL Press. New York, 2001.
- [77] Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual Vol. 3*. 3rd Ed. CSHL Press. New York, 2001.
- [78] Sánchez-Olea, R.; Ortiz, S.; Barreto, O.; Yang, Q.; Xu, C. J.; Zhu, H.; Yuan, Junying. *Parcs Is a Dual Regulator of Cell Proliferation and Apaf-1 Function*. Journal of Biological Chemistry, **283** (36): 24400-24405, 2008.
- [79] Seibel, N.; Eljouni, J.; Nalaskowski, M.; Hampe, W. *Nuclear localization of enhanced green fluorescent proteins homomultimers*. Analytical Biochemistry, **368** (1): 95-99, 2007.
- [80] Seifert, H. *Bacterial genetics*, [online]. Biology Reference. URL: <<http://www.biologyreference.com/Ar-Bi/Bacterial-Genetics.html#b>> Last updated: 2012. Retrieved: March, 2012.
- [81] Slish, D. *Bacterial Transformation*, [online]. Plattsburgh State University of New York. URL: <<http://faculty.plattsburgh.edu/donald.slish/transformation.html>> Last updated: June, 2012. Retrieved: July, 2012.
- [82] Stewart, C.; Roux, K.; Burke, B. *Blurring the Boundary: The Nuclear Envelope Extends Its Reach*. Science, **318**: 1408-1411, 2007.
- [83] Storrie, B.; White, J.; Röttger, S.; Stelzer, E.; Sugauma, T.; Nilsson, T. *Recycling of Golgi-resident Glycosyltransferases through the ER Reveals a Novel Pathway and Provides an Explanation for Nocodazole-induced Golgi Scattering*. The Journal of Cell Biology, **143** (6): 1505-1521, 1998.
- [84] Sugawara, T.; Nakatsu, D.; Kii, H.; Maiya, N.; Adachi, A.; Yamamoto, A.; Kano, F.; Murata, M. *PKC $\delta$  and  $\epsilon$  regulate the morphological integrity of the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) but not the anterograde and retrograde transport via the Golgi apparatus*. Biochimica et Biophysica Acta, **Article in Press**, 2012.
- [85] Sundry, Y.; Takeda, A.; Fontes, M.; Harris, J.; Jans, D.; Kobe, B. *Probing the Specificity of Binding to the Major Nuclear Localization Sequence-binding Site of Importin- $\alpha$  Using Oriented Peptide Library Screening*. The Journal of Biological Chemistry, **285** (26): 19935-19946.

- [86] Swift, S.; Lorens, J.; Achacoso, P.; Nolan, G. *Rapid Production of Retroviruses for Efficient Gene Delivery to Mammalian Cells Using 293T Cell-Based Systems*. *Current Protocols in Immunology*, **10** (17): 14-29, 2001.
- [87] Tabor, S. *DNA ligases: Current Protocols in Molecular Biology, Book 1*. Wiley Interscience. U.S., 2001.
- [88] Tinsley, D. *Profile of Jennifer Lippincott-Schwartz*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (27): 10881-10883, 2009.
- [89] Thermo Scientific. *Anneal complementary pairs of oligonucleotides*, [online]. URL: <<http://www.piercenet.com/files/TR0045-Anneal-oligos.pdf>> Last updated: 2009. Retrieved: August, 2011.
- [90] Tobey, R.; Anderson, E; Petersen, D. *The effect of thymidine on the duration of G1 in chinese hamster cells*. *The Journal of Cell Biology*, **35**: 53-59, 1967.
- [91] Trucco, A.; Polishchuk, R.; Martella, O.; Di Pentima, A.; Fusella, A.; Di Giandomenico, D.; San Pietro, E.; Beznoussenko, G.; Polishchuk, E.; Baldassarre, M.; Buccione, R.; Geerts, W.; Koster, A.; Burger, K.; Mironov, A.; Luini, A. *Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments*. *Nature Cell Biology*, **6** (11): 1071-1081, 2004.
- [92] Uhlen, M.; Ponten, F.; Hober, S.; Kampf, C.; Ottoson, J.; Nilsson, P.; Björling, L.; Lundberg, E.; Navani, S. *The Human Protein Atlas*, [online]. Uppsala Universitet. URL: <<http://www.proteinatlas.org/>> Last updated: November, 2011. Retrieved: March, 2012.
- [93] Valdar, W. *Scoring residue conservation*. *Proteins*, **48** (2): 227-241, 2002.
- [94] Vierstraete, A. *PCR to amplify the requested gene*, [online]. Home Page of Andy Vierstraete from the Department of Biology, Faculty of Science, of the Ghent University. URL: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>. Last updated: August, 1999. Retrieved: November, 2011.
- [95] Ward, T.; Polishchuk, R.; Caplan, S.; Hirschberg, K.; Lippincott-Schwartz, J. *Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export*. *The Journal of Cell Biology*, **15** (4): 557-570, 2001.
- [96] Weaver, R.; Hendrick, P. *Genetics*. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA. U.S., 1989.
- [97] Weiner, M.; Gackstetter, T.; Costa, G.; Bauer, J.; Kretz, K. *Site-directed Mutagenesis using PCR*. From: *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*. Horizon Scientific Press, U.K., 1995.
- [98] Wenthe, S.; Rout, M. *The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**: 1-19, 2010; with data from Alber, F.; Dokudovskaya, S.; Veenhoff, L. M.; Zhang, W.; Kipper, J.; Devos, D.; Suprpto, A.; Karni-Schmidt, O.; Williams, R.; Chain, B. T.; Sali, A.; Rout, M. P. *The molecular architecture of the nuclear pore complex*. *Nature*, **450**: 695-701, 2010.
- [99] *Western Blotting*, [online]. Westernblotting.org. URL: <[http://www.westernblotting.org/THEORY-SDS\\_PAGE.htm](http://www.westernblotting.org/THEORY-SDS_PAGE.htm)> Last updated: 2006. Retrieved: August, 2012.
- [100] Wild, T.; Cramer, P. *Biogenesis of multisubunit RNA polymerases*. *Cell*, **Article in Press**: 1-7, 2012.



- [101] Winey, M.; Yarar, D.; Giffings, T.; Mastronarde, D. *Nuclear Pore Complex Number and Distribution throughout the Saccharomyces cerevisiae Cell Cycle by Three-Dimensional Reconstruction from Electro Micrograph of Nuclear Envelopes*. *Molecular Biology of the Cell*, **8** (11): 2119-2132, 1997.
- [102] Xu, D.; Farmer, A.; Chook, Y. M. *Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- $\beta$  proteins*. *Current Opinion in Structural Biology*, **20** (6): 782-790, 2010.
- [103] Ye, G. N.; Daniell, H.; Sanford, J. *Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts*. *Plant Molecular Biology*, **15** (6): 809-819, 1990.
- [104] Yu, L. G.; Fering, D.; White, M.; Spiller, D.; Appleton, P.; Evans, R.; Grierson, I.; Smith, J.; Davies, H.; Gerasimenko, O.; Petersen, O.; Milton, J.; Rhodes, J. *Edible Mushroom (Agaricus bisporus) Lectin, Which Reversibly Inhibits Epithelial Cell Proliferation, Blocks Nuclear Localization Sequence-dependent Nuclear Protein Import*. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (8): 4890-4899, 1999.
- [105] Z. Jordan, M.; Schallhorn, A.; Wurm, F. *Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-Phosphate Precipitate Formation*. *Nucleic Acids Research*, **24** (4): 596-601, 1996.