



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Interacción de la fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* con los fosfolípidos de inositol”**

Tesis que presenta

Ulises Rodríguez Corona

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2013



---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Interacción de la fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* con los fosfolípidos de inositol" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

---

Dr. Felipe Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 11 de noviembre de 2013.

---

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Ulises Rodríguez Corona

---

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado "Estudio funcional de la unión entre fibrilarina y fosfolípidos de inositol involucrados en la síntesis de ARN ribosomal" bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna y con financiamiento del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 176598).



---

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padres por su sacrificio en algún tiempo incompendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, por los valores inculcados, porque sin ustedes estaría lejos de ser la persona que ahora soy, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de esta etapa en mi carrera profesional.

Al CICY por la oportunidad de cursar la maestría en sus instalaciones, particularmente a mi asesor, el Dr. Enrique Castaño de Serna, por sus enseñanzas, consejos y hospitalidad durante estos dos años; a la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por sus sinceros comentarios y enseñanzas que serán recordadas en cada etapa de mi vida profesional. A la maestra Ángela Ku González por su amistad, apoyo y empatía.

A los amigos, compañeros y maestros porque con una palabra, una sonrisa han regresado a mí la fuerza y confianza que sentí desvanecer. Por los momentos, las experiencias, las diferencias y por lo que se espera.

Al CONACYT por la beca otorgada número 265364.

---

---

10

11

12

13

14

15

16

17

---

---

## ÍNDICE

|                          |      |
|--------------------------|------|
| Listado de figuras ..... | xiii |
|--------------------------|------|

|                          |    |
|--------------------------|----|
| Listado de cuadros ..... | xv |
|--------------------------|----|

|                    |   |
|--------------------|---|
| Abreviaturas ..... | 1 |
|--------------------|---|

|              |   |
|--------------|---|
| Resumen..... | 1 |
|--------------|---|

|               |   |
|---------------|---|
| Abstract..... | 1 |
|---------------|---|

|                   |   |
|-------------------|---|
| Introducción..... | 2 |
|-------------------|---|

## CAPÍTULO I

|                   |   |
|-------------------|---|
| Antecedentes..... | 5 |
|-------------------|---|

|                      |   |
|----------------------|---|
| 1.1 El nucléolo..... | 6 |
|----------------------|---|

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| 1.1.1 Estructura del nucléolo ..... | 7 |
|-------------------------------------|---|

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 1.1.2 Funciones del nucléolo ..... | 11 |
|------------------------------------|----|

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| 1.1.3 El nucléolo y el ciclo celular ..... | 13 |
|--------------------------------------------|----|

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 1.2 Generalidades de la fibrilarina ..... | 14 |
|-------------------------------------------|----|

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| 1.2.1 Estructura de la Fibrilarina ..... | 18 |
|------------------------------------------|----|

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1.3 Funciones de la fibrilarina ..... | 19 |
|---------------------------------------|----|

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 1.3.1 Modificación postranscripcional del pre-ARNr..... | 19 |
|---------------------------------------------------------|----|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1.3.2 Desarrollo embriogénico ..... | 21 |
|-------------------------------------|----|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1.3.3 Ensamblaje del nucléolo ..... | 21 |
|-------------------------------------|----|

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.4 Infecciones virales mediadas por la fibrilarina ..... | 23 |
|-------------------------------------------------------------|----|

---

---

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3.5 Ensamblaje de los ribosomas .....                                                       | 24        |
| 1.4 Los fosfolípidos de inositol.....                                                         | 24        |
| 1.5 Funciones de los fosfoinosítidos.....                                                     | 27        |
| 1.5.1 Fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns(3)P).....                                          | 27        |
| 1.5.2 El fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PtdIns(3,5)P <sub>2</sub> ).....                  | 28        |
| 1.5.3 El fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P).....                                       | 28        |
| 1.5.4 El fosfatidilinositol 5-fosfato (PtdIns(5)P).....                                       | 29        |
| 1.5.5 El fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> ).....                  | 29        |
| 1.5.6 El fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> ).....             | 29        |
| 1.5.7 El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> ).....                  | 29        |
| 1.6 Funciones del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en membranas .....                                | 30        |
| 1.7 Funciones del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en el núcleo.....                                 | 32        |
| 1.7.1 El PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> y la síntesis de ADN .....                                 | 33        |
| 1.7.2 El PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> y el procesamiento del ARN.....                            | 34        |
| 1.7.3 El PtdIns(4,5) y la cromatina.....                                                      | 35        |
| 1.7.4 El PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> y la respuesta al estrés .....                             | 36        |
| 1.7.5 Posibles funciones del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> .....                                  | 36        |
| 1.8 Dominios de unión a fosfoinosítidos .....                                                 | 37        |
| 1.9 Interacción del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> con la fibrilarina de <i>Homo sapiens</i> ..... | 38        |
| <b>Justificación .....</b>                                                                    | <b>40</b> |
| <b>Hipótesis.....</b>                                                                         | <b>41</b> |

---



---

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>Objetivo general .....</b>       | <b>41</b> |
| <b>Objetivos específicos.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Estrategia experimental.....</b> | <b>42</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>            | <b>43</b> |

## **CAPITULO II**

|                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Materiales y Métodos .....</b>                                                                               | <b>56</b> |
| 2.1 Identificación del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en el nucléolo de células de <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 56        |
| 2.2 Diseño de iniciadores .....                                                                                 | 57        |
| 2.3 Extracción de ARN .....                                                                                     | 57        |
| 2.4 Obtención del ADNc y amplificación de la secuencia de AtFib2 .....                                          | 58        |
| 2.5 Clonación de AtFib2 .....                                                                                   | 58        |
| 2.6 Sub-Clonación de AtFib2 .....                                                                               | 59        |
| 2.7 Amplificación de los dominios de AtFib2. ....                                                               | 59        |
| 2.8 Expresión de la AtFib2. ....                                                                                | 59        |
| 2.9 Extracción y purificación de AtFib2 .....                                                                   | 60        |
| 2.10 Inmunodetección de la AtFib2 .....                                                                         | 61        |
| 2.11 Interacción de AtFib2 y sus dominios con los fosoinosítidos .....                                          | 62        |
| <b>Bibliografía.....</b>                                                                                        | <b>63</b> |

## **Capitulo III**

|                                        |           |
|----------------------------------------|-----------|
| <b>Resultados .....</b>                | <b>64</b> |
| 3.1 Similitud entre fibrilarinas ..... | 64        |

---

---

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2 Posibles sitios de interacción entre AtFib y los fosfoinosítidos .....          | 66        |
| 3.3 Obtención del vector de expresión pET15b+AtFib2 .....                           | 67        |
| 3.4 Expresión de la AtFib2 .....                                                    | 69        |
| 3.5 Interacción entre la AtFib2 y los fosfoinosítidos .....                         | 72        |
| 3.6 Amplificación y clonación de los dominios de AtFib2 .....                       | 73        |
| 3.7 Expresión y purificación de los dominios de AtFib2 .....                        | 77        |
| 3.8 Amplificación de los dominios de AtFib1 y clonación al vector pET15b .....      | 78        |
| 3.9 Inmunodetección de los dominios AtFib1 expresados .....                         | 79        |
| 3.10 Interacción de los dominios GAR y ALFA de AtFib1 con los fosfoinosítidos ..... | 80        |
| 3.11 Colocalización del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> con la AtFib .....                | 82        |
| <b>Bibliografía .....</b>                                                           | <b>88</b> |
| <br><b>CAPITULO IV</b>                                                              |           |
| <b>Discusión .....</b>                                                              | <b>89</b> |
| <b>Conclusiones .....</b>                                                           | <b>94</b> |
| <b>Perspectivas .....</b>                                                           | <b>95</b> |
| <b>Bibliografía .....</b>                                                           | <b>96</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                                                 | <b>98</b> |

---

## Listado de figuras

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b> Estructura general de los genes ribosomales de <i>H. sapiens</i> y sus transcritos.. | 9  |
| <b>Figura 1.2</b> Metilación del ARNr por la fibrilarina. ....                                         | 15 |
| <b>Figura 1.3</b> Comparación de la estructura primaria de las fibrilarinas .....                      | 17 |
| <b>Figura 1.4</b> Representación de la secuencia de los dominios de la fibrilarina. ....               | 19 |
| <b>Figura 1.5</b> Modelo general del complejo para procesamiento del ARNr. ....                        | 21 |
| <b>Figura 1.6</b> Estructura del fosfatidilinositol. ....                                              | 25 |
| <b>Figura 1.7</b> Esquema general de la ruta de fosforilación del fosfatidilinositol.. ....            | 27 |
| <b>Figura 1.8</b> Colocalización del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> y de la fibrilarina.....                | 39 |
| <b>Figura 1.9</b> Estrategia experimental general .....                                                | 42 |
| <b>Figura 3.1</b> Similitud entre las fibrilarinas AtFib1, AtFib2 y HsFib. ....                        | 65 |
| <b>Figura 3.3</b> Extracción de ARN de plántulas de <i>A. thaliana</i> . ....                          | 68 |
| <b>Figura 3.4</b> Clonación y subclonación de la secuencia de AtFib2. ....                             | 68 |
| <b>Figura 3.5</b> Extracción y purificación de la AtFib2. ....                                         | 69 |
| <b>Figura 3.6</b> Inmunodetección de AtFib2 con distintos anticuerpos.. ....                           | 72 |
| <b>Figura 3.7</b> Interacción entre la AtFib2 con los fosfoinosítidos .....                            | 73 |
| <b>Figura 3.8</b> Amplificación de los dominios de AtFib2.. ....                                       | 74 |
| <b>Figura 3.9</b> Ligación de los dominios de AtFib2 al vector de expresión pET15b.....                | 75 |
| <b>Figura 3.10</b> Amplificación de los regiones N-terminal y metiltransferasa de AtFib2.....          | 76 |



---

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.11</b> Expresión y purificación del dominio $\alpha$ de AtFib2..                                                 | 78 |
| <b>Figura 3.12</b> Ligación de los dominios de AtFib1 al vector de expresión pET15b. ....                                    | 79 |
| <b>Figura 3.14</b> Interacción entre el dominio GAR y del dominio $\alpha$ con los fosfoinosítidos. ....                     | 81 |
| <b>Figura 3.15</b> Identificación del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en el nucléolo de una célula de <i>A. thaliana</i> . .       | 85 |
| <b>Figura 3.16</b> Identificación del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en el nucléolo de dos células de <i>A. thaliana</i> .        | 86 |
| <b>Figura 3.17</b> Identificación del PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en el nucléolo de varias células de <i>A. thaliana</i> ..... | 87 |
| <b>Figura 4.1</b> Modelo de la interacción del AP con la AtFib..                                                             | 92 |

---



**Listado de cuadros**

**Cuadro 1.1** Enzimas de la ruta de los fosfoinosítidos identificadas en el núcleo de células vegetales..... 32

**Cuadro 1.2** Dominios reportados de unión a fosfoinosítidos..... 38

---



## Abreviaturas

5Ptasa: inositol 5-fosfatasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosomal

AF: ácido fosfatídico

ALF: ácido lisofosfatídico

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

AtFbr1: fibrilarina similar 1 de *Arabidopsis thaliana*

AtFib1: fibrilarina 1 de *Arabidopsis thaliana*

AtFib2: fibrilarina 2 de *Arabidopsis thaliana*

AtFib3: fibrilarina 3 de *Arabidopsis thaliana*

ATP: adenosin trifosfato

CBL: cuerpos cajales similares

DAG: diacilglicerol

DAGK: diacilglicerol cinasa

DFC: componente fibrilar denso

---

Dominio PH: dominio homólogo a pleckstrina

Dominio PHD: homeo dominio de plantas

FAPP2: proteína adaptadora fosfatasa 4

FC: centros fibrilares

FCO: fosfatidilcolina

FEA: fosfatidiletanolamida

FS: fosfatidilserina

GAR: región rica en arginina y glicina

GC: componente granular

HsFib: fibrilarina de *Homo sapiens*

IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trisfosfato

IPK: inositol fosfato cinasa

ITPK: inositol 1,3,4-P<sub>3</sub>-5/6 cinasa

KDa: kilo Dalton

LFC: lisofosfatidilcolina

MIPS: mio-inositol sintasa

MTasa: metiltransferasa

NCBI: National Center of Biotechnology Information

NDF: partículas derivadas del nucléolo

---



NMI: miosina nuclear I

NOR: región de organización nucleolar

AFK: ácido fosfatídico cinasa

PBS: amortiguador de fosfato salino

PBST: amortiguador de fosfato salino con tween 20

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa

PI4K: fosfatidilinositol 4-cinasa

PI4P5K: fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinasa

PKC: proteína cinasa C

PLC: fosfolipasa C

PML: cuerpos promeolíticos de leucemia

PNB: cuerpos prenucleolares

pre-ARNm: pre-ácido ribonucleico mensajero

pre-ARNr: pre-ácido ribonucleico ribosomal

PtdIns(3)P: fosfatidilinositol 3-monofosfato

PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>: fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato

PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato

PtdIns(4)P: fosfatidilinositol 4-monofosfato

---

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PtdIns(5)P: fosfatidilinositol 5-monofosfato

PtdIns: fosfatidilinositol

rARN: ácido ribonucleico ribosomal

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

S1F: esfingosina 1-fosfato

SAM: S-adenosilmetionina

snARN: ARN pequeño nuclear

snoARN: ARN pequeño nucleolar

snoRNP: partículas ribonucleares pequeñas del nucléolo

SRP: partícula de detección de señal

tARN: ácido ribonucleico transcripcional

UIM: motivo de interacción con ubiquitina

---

## Resumen

El nucléolo es una compleja estructura intranuclear que tiene la mayor concentración de masa por unidad de volumen en la célula. En el nucléolo se lleva a cabo la transcripción del ADNr y contiene una diversa gama de proteínas y pequeños ARN nucleolares que son mediadores del procesamiento del pre-ARNr así como del ensamblaje de las sub-unidades ribosomales. La proteína mediadora del procesamiento del pre-ARNr es la fibrilarina. La fibrilarina es una proteína con actividad de metiltransferasa que cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina al grupo hidroxilo de la ribosa blanco. En levaduras se ha determinado que la fibrilarina se encuentra directamente involucrada en diversos procesos post-transcripcionales como son el procesamiento del pre-ARNr, la metilación del pre-ARNr y el ensamblaje de los ribosomas. La fibrilarina cuenta con cuatro dominios reportados, el dominio rico en aminoácidos arginina y glicina, el dominio blanco sin función definida, el dominio R el cual se une al ARNr y un dominio con estructura  $\alpha$ -hélice. En este proyecto se determinó que la fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* interactúa con los fosfoinosítidos, con el ácido fosfatídico y con la fosfatidilserina. Así mismo, se logró la expresión separada de dos dominios de la fibrilarina, logrando definir que el dominio que interactúa con los fosfoinosítidos es el dominio con estructura  $\alpha$ -hélice. Este dominio interactúa preferentemente con el fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) y con el ácido fosfatídico. Por otro lado se logró la identificación del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) en el nucléolo de callos de *A. thaliana* colocalizando con la fibrilarina lo cual brinda la primera evidencia de la presencia de los fosfoinosítidos en el nucléolo y no solo en el núcleo celular.

---





**Abstract**

The nucleolus is an intranuclear complex structure with the most concentrated mass per volume inside the cell. In the nucleolus the rDNA transcription takes place and contains a huge diversity of proteins and small nucleolar RNAs that mediates the splicing of the pre-rRNA as well as the assembly of the ribosomal subunits. Fibrillarin is the mediator protein for the splicing of the pre-rRNA. Fibrillarin is a protein with a methyltransferase activity that catalyzes the transfer of the methyl group of the S-adenosyl methionine to the hydroxyl group of the target ribose. In yeasts it was determined that the fibrillarin is directly involved in diverse posttranscriptional processes like the splicing of the pre-rRNA, the pre-rRNA methylation and the ribosome assembly. Fibrillarin has four domains, the glycine-arginine rich domain, a domain without a defined function named white domain, a central domain that interacts with rRNA named R domain, and a domain rich in  $\alpha$ -helix structure. In this project we determined that the *Arabidopsis thaliana* fibrillarin (AtFib) interacts with the phosphoinositides, the phosphatidic acid and the phosphatidylserine. Likewise we obtained the expression of two domains of the fibrillarin and found that the  $\alpha$ -helix rich domain interacts preferably with the phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) and with the phosphatidic acid. On the other hand we identified that the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) colocalizes with the *A. thaliana* fibrillarin in the nucleolus, this brings the first evidence of the phosphoinositides at the nucleolus and not only in the cellular nucleus.



## Introducción

El nucléolo es una estructura dentro del núcleo en donde se lleva a cabo la transcripción, la maduración y el ensamblaje de los ribosomas. Adicionalmente a la síntesis de los ribosomas, el nucléolo es una estructura multifuncional involucrada en respuesta a estrés, la biogénesis de partículas ribonucleoproteicas independientes de las subunidades ribosomales, así como en diversas enfermedades en las que se incluye el cáncer, infecciones virales y malformaciones en el desarrollo (Olson *et al.*, 2000).

Dentro del nucléolo se pueden encontrar diversas proteínas que participan en las funciones descritas anteriormente. La fibrilarina es la proteína más abundante en el nucléolo y tiene una secuencia altamente conservada en los distintos reinos biológicos teniendo entre sus principales funciones el procesamiento del pre-ARNr (Lafontaine y Tollervey, 2000). La fibrilarina es una metiltransferasa que posee una secuencia conservada conocida como caja C/D para formar las partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleolares (snoRNPs) la cual cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa blanco (Keqiong y Ru, 2009). Distintos reportes han evidenciado que el complejo snoRNPs es suficiente para el procesamiento del pre-ARNr, sin embargo, se desconoce cuál es la totalidad de los componentes que llevan a cabo esta función. Moléculas como los fosfoinosítidos también forman parte de la estructura y las funciones del núcleo y nucléolo. Se ha reportado que la fibrilarina de *Homo sapiens* (HsFib) interactúa con el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y con la polimerasa I en el nucléolo regulando su actividad (Yildirim *et al.*, 2013). Sin embargo, resta por entender una amplia gama de funciones que estos fosfolípidos puedan tener en el núcleo y el nucléolo.

Este trabajo busca determinar si la fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* (AtFib) interactúa con los fosfoinosítidos. Como modelo de estudio para este proyecto se

utilizó *A. thaliana* ya que se cuenta con mutantes para la fibrilarina. Estas mutantes serán una importante herramienta para determinar los mecanismos de unión de la fibrilarina y sus dominios.



---

## CAPÍTULO I

### Antecedentes

En 1781 Fontana (Fontana, 1781) describió por primera vez el nucléolo en células de anguila, sin embargo, fue hasta 1835 que se profundizó en su descripción y se le dio el nombre de "keimfleck" en alemán. En plantas el nucléolo fue descrito tres años más tarde, en 1838, y para 1839 se le denominó nucléolo o núcleo del núcleo (Valentin, 1839).

Cien años más tarde, en 1939, se describió la presencia de los fosfolípidos en el núcleo y en la década de los 70's éstos se encontraron en la cromatina unidos a las histonas y proteínas asociadas a cromosomas (Manzoli *et al.*, 1977). Uno de los fosfolípidos más estudiados es el  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  ya que los productos de su hidrólisis mediada por la fosfolipasa C (PLC) son de gran importancia en la señalización celular.

Previo a la década de los 70's la estructura y función del nucléolo era un tema recurrente. Se demostró que el nucléolo es una estructura enriquecida en ARN y ribonucleoproteínas. Debido al alto contenido de estas moléculas, densidad y un índice de refracción considerable con respecto al nucleoplasma que lo rodea, el nucléolo fue claramente observado en distintos organismos inicialmente con microscopia de contraste de fase directa y posteriormente mediante microscopia electrónica.

Debido a que el nucléolo es la mayor estructura dentro del núcleo de células eucariotas este atrajo el interés de distintos grupos de investigación hasta que se describió al nucléolo como sitio de síntesis del ARNr y ensamblaje de los ribosomas. Durante esta época se desarrollaron y estandarizaron diferentes métodos para aislar el nucléolo. Los primeros procedimientos se llevaron a cabo con oocitos de estrella de mar y de hígado de rata utilizando sonicación como método de ruptura.

En esa época el nucléolo se definía como un cuerpo esencialmente compuesto

por fibrillas y gránulos que aparecían, como áreas de manchas oscuras organizadas en una estructura reticular a la cual se le llamó nucleolonema. Esto se confirma con el mejoramiento de la microscopia electrónica la cual hacía posible definir la estructura del nucléolo con mayor detalle comparado con la microscopia de luz. Utilizando la microscopia electrónica y la autoradiografía se logró definir la distribución del ADN y el ARN. En 1970, el nucléolo consistía de cinco componentes: el centro fibrilar, el componente fibrilar, el componente granular, los intersticios nucleolares y la cromatina condensada asociada.

A mediados de la década de los 80's y con la introducción de nuevas técnicas y desarrollo de nueva tecnología para el estudio de los ácidos nucleicos, los cinco componentes del nucléolo se redujeron a cuatro: los centros fibrilares, el componente fibrilar denso, el componente granular y la vacuola nucleolar. Al mismo tiempo se perdió el interés por el estudio del nucléolo ya que la nueva tecnología permitía el estudio de los genes de manera individual.

Por otra parte, se confirmó que el nucléolo contiene ciertas proteínas que funcionan para el ensamblaje de los ribosomas y para mantener su estructura, esto fue revelado gracias a estudios bioquímicos y de microscopia electrónica. Se determinó que gran cantidad de estas proteínas correspondían a la nucleolina, a la proteína B23 y a la fibrilarina. La nucleolina se considera una proteína nucleolar multifuncional y se encuentra altamente conservada. Es capaz de interactuar con ADN y con ARN. Se encuentra involucrada en el procesamiento de los ARNr's, la biogénesis de los ribosomas, la citocinesis, la replicación, la proliferación y crecimiento celular. La proteína B23 es una fosfoproteína que también se considera multifuncional involucrada principalmente como el factor de ensamblaje de los ribosomas involucrado en el procesamiento del ARNr 28S.

Una de las principales proteínas del nucléolo y la cual se considera tiene la mayor concentración dentro de este compartimento celular es la fibrilarina. Esta proteína procesa el pre-rARN y se encuentra altamente conservada tanto en secuencia como en función. Fue identificada por primera vez en humanos que padecían la enfermedad esclerodermia utilizando anticuerpos específicos (Aris y Blobel, 1991),



posteriormente fue descrita en el moho *Physarum polycephalum*, y con mayor detalle en *Methanococcus jannaschii*

A partir de la década de los 90's, se estudiaron proteínas homólogas a la fibrilarina tanto en eucariontes como en procariontes (Amiri, 1994; Turley, 1993; Aris y Blobel, 1991; Lapeyre, 1990). En esta década se ubicó a la fibrilarina en las regiones fibrilares del nucléolo de células eucariontes en donde se da el procesamiento del pre-ARNr (Warner, 1990). Para 1995 se definió que la fibrilarina es una proteína que sirve de complemento para ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas, las cuales actúan durante la maduración del ARNr, y en el ensamblaje de proteínas ribosómicas a las subunidades ribosomales (Maxwell y Fournier, 1995).

En los años 90's se identificaron distintas proteínas nucleares involucradas en procesos como el procesamiento y el transporte del ARNm al citoplasma. En esta década también se localizó al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el núcleo junto con las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, las cuales llevan a cabo este procesamiento del pre-ARNm (Boronenkov *et al.*, 1998).

Para el año 2001 se confirmó que los elementos encargados del procesamiento del pre-ARNm interactúan directamente con el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Ensayos bioquímicos demostraron que esta interacción es esencial para la maduración del pre-ARNm. En este año también se identificó al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo (Osborne *et al.*, 2001).

En el 2013 se determinó que la fibrilarina de *H. sapiens* (HsFib) interactúa con los fosfoinosítidos y con parte de la maquinaria transcripcional mediada por la polimerasa I modulando su actividad hasta en un 80% (Yildirim *et al.*, 2013).

## 1.1 El nucléolo

El nucléolo es una larga y visible estructura que se encuentra dentro del núcleo celular y tiene la mayor concentración de masa por unidad de volumen dentro de la célula (Thoru y Joan, 2000). Existe como una estructura generada por las

moléculas que lo conforman y se unen al ADNr formando un complejo estable y dinámico. El nucléolo se encuentra en continuo intercambio de componentes con el nucleoplasma por lo tanto representa una estructura dinámica en equilibrio con el nucleoplasma (Raska, 2003).

El nucléolo es el sitio donde se lleva a cabo el procesamiento del pre-ARNr y la biogénesis de los ribosomas. También ha sido involucrado en procesos tales como el silenciamiento génico, la progresión del ciclo celular, la senescencia, la biosíntesis de la partícula de detección de señal (SRP) y la biogénesis de algunos snARNs y tARNs (Cockell y Gasser 1999; García y Pillus, 1999; Jacobson y Pederson, 1998).

### **1.1.1 Estructura del nucléolo**

El nucléolo se encuentra organizado en un arreglo concéntrico de cuatro tipos de componentes los cuales definen su organización como se describe a continuación:

1. Las estructuras de los compuestos mayormente envueltos se llaman centros fibrilares (FC).
2. El componente fibrilar denso (DFC), el cual rodea casi por completo a los FC. En este componente se lleva a cabo la transcripción del ARNr.
3. El componente granular (GC), el cual se encuentra en la región periférica del nucléolo. Aquí se lleva a cabo la maduración de las sub-unidades ribosomales.
4. La vacuola nucleolar

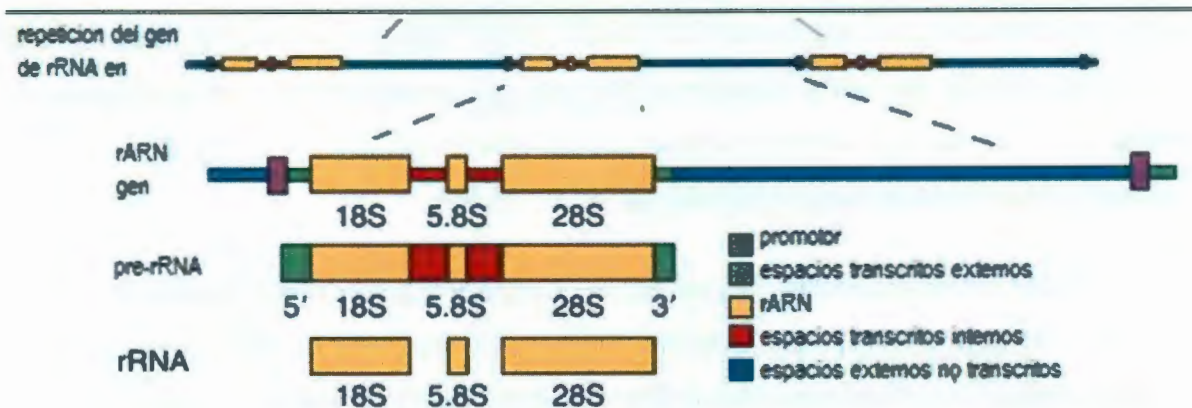
Generalmente en un nucléolo de células animales la región GC ocupa el 75% del volumen, el DFC el 17% y el FC un 8%. Un nucléolo típico de plantas tiene una proporción de DFC mayor al 70% y de FC alrededor del 1% (Jordan y McGovern, 1981). La descripción de los componentes del nucléolo ha sido complicada ya que parece ocurrir una transición gradual entre el DFC y el GC. Algunos estudios con dextranos de diferente peso molecular muestran que el nucléolo es permeable



para macromoléculas de hasta 2000 kDa. Esto sugiere un modelo esponja en donde el interior de cada subcompartimento es penetrado por el nucleoplasma formando una red de canales nucleolares de diferentes tamaños que proveen fácil acceso a macromoléculas (Handwerger *et al.*, 2005).

Además del nucléolo, dentro del núcleo se han identificado otras estructuras como son los cuerpos cajales, las manchas nucleares y los cuerpos PML (promielóticos de leucemia). El nucléolo se encuentra vinculado específicamente con los cuerpos cajales. Los cuerpos cajales se encuentran altamente conservados tanto en plantas como en humanos (Beven *et al.*, 1995), y fueron descubiertos por primera vez en 1903 por Ramon y Cajal los cuales los llamaron como cuerpos de accesorio nucleolares. Desde aquel entonces su estudio ha revelado que son estructuras de entre 0.2 – 1.5  $\mu\text{m}$  que contienen a la proteína coilina p80. La baja expresión en mutantes de la proteína p80 resulta en la pérdida de cuerpos cajales así como en la pérdida de la actividad de la ARN polimerasa I y en la descomposición de la arquitectura del nucléolo (Bohmann *et al.*, 1995). Los cuerpos cajales están involucrados en la maduración y el reciclaje de las snRNPs, en el ensamblaje, procesamiento y transporte al nucléolo de las snoRNPs y el procesamiento de los ARNm de las histonas (Sleeman y Lamond, 1999). Los cuerpos cajales se han encontrado tanto en los alrededores como dentro del nucléolo unido a los componentes NAP57, Nopp140 y a la fibrilarina.

En células animales el nucléolo se forma alrededor de los loci genéticos, en los autosomas, llamados regiones de organización nucleolar (NOR). Estas regiones consisten en genes repetidos en tándem codificantes de ARNr, llamados genes de ADNr o genes-r. En la mayoría de las especies estas repeticiones en tándem son las secuencias que codifican para las sub-unidades 18S, 5.8S y 28S (Figura 1.1). En células humanas, por ejemplo, estas regiones de organización se encuentran en el brazo corto de los autosomas 13, 14, 15, 21 y 22. En eucariotas cada NOR está separado por una secuencia no codificante llamada ADN espaciador (Hadjiolov, 1985).



**Figura 1.1** Estructura general de los genes ribosomales de *H. sapiens* y sus transcritos. Esta imagen describe el policistron dentro del cual se encuentran los genes ribosomales marcados en amarillo. Una vez que es transcrito, tiene un primer corte de los espacios externos generando el pre-ARNr. Posteriormente el pre-ARNr es modificado retirando los espacios internos y externos para producir los ARNr maduros 18S, 5.8S y 28S (modificado de Raska, 2004).

La expresión de los genes-r se encuentra asociada a regiones fibrilares en el nucléolo. En estas regiones es donde inicia la transcripción dependiente de la polimerasa I (Biggiogera *et al.*, 2001). La transcripción en eucariotas esta mediada por tres ARN polimerasas: la polimerasa I, la polimerasa II y la polimerasa III. Las plantas tienen dos polimerasas adicionales que están involucradas en mecanismos de silenciamiento (Herr *et al.*, 2005).

El producto de la transcripción de la polimerasa I es un largo precursor (pre-ARNr) que abarca a los genes-r, a los espacios transcritos internos y a los espacios no transcritos externos (figura 1.1). Este precursor lleva a cabo un proceso de maduración el cual incluye la metilación de la ribosa y de bases nitrogenadas, la conversión de la uridina en pseudouridina y el corte para obtener los tres tipos de ARN incluidos en el transcrito de pre-ARN. Cada una de estas modificaciones es específica a un ARN guía el cual se une al pre-ARNr. Este ARN guía lleva unida una enzima la cual modifica al pre-ARNr. Estos ARN guía son parte de una clase de ARN llamados ARN pequeños nucleolares (snoARNs) (Eliceiri, 1999).

Otros estudios han revelado que la topoisomerasa I (topo I) es un regulador clave en la transcripción. La enzima topo I está asociada con la polimerasa I durante



todo el ciclo celular y es necesaria para la organización del nucléolo y la re-iniciación de la transcripción después de la mitosis (Eliceiri, 1999). Otras moléculas que se encuentran en el nucléolo son la proteína ribosomal S6, componente de la subunidad 40s y la Nopp140 la cual une al nucléolo con los cuerpos cajales (Thiry, 1999). La topoisomerasa I también interactúa con la subunidad larga de la ARN polimerasa I para llevar a cabo la transcripción de los genes ribosomales (Chen *et al.*, 1999), la transcripción del snoARN U3, involucrado en el procesamiento del ARNr, la transcripción de la proteína NAP57 que es miembro de la caja H/ACA de los snoRNPs e interviene en las pseudouridilaciones del ARNr (Lafontaine *et al.*, 1998), y la transcripción fibrilarina, la cual podría tener funciones similares a las de Nopp140.

Otras moléculas importantes en la maquinaria transcripcional son la actina y una isoforma de la miosina nuclear I (NMI). Algunos reportes concluyen que la NMI es importante en la iniciación de la transcripción, mientras que la actina está involucrada tanto en la iniciación como en la elongación (Philimonenko *et al.*, 2004).

Dentro del nucléolo existe una diversa gama de proteínas. Un estudio bioinformático ha demostrado que las proteínas en el nucléolo están favorecidas en su secuencia por aminoácidos con carga como el glutamato, el aspartato, la lisina y la arginina comparadas con las proteínas del núcleo (Leung *et al.*, 2003). El nucléolo contiene la maquinaria para la transcripción de la ARN polimerasa I y un amplio rango de snoRNPs requeridos para la modificación de las bases, el corte y procesamiento del pre-ARN como lo son los snoARN U3, U8, U14, U18, U22. También contiene las proteínas ribosomales o proteínas-r que son factores requeridos para la biogénesis de los ribosomas y a los factores requeridos para exportar las sub-unidades ribosomales a través de los poros nucleares al citoplasma como Crm1P (Fatica y Tollervey, 2002).

En un análisis proteómico de *A. thaliana* se identificaron 271 proteínas con las cuales se modela una explicación sobre la evolución del nucléolo (Staub *et al.*, 2004). A la fecha se conocen 700 proteínas nucleolares en *Homo sapiens* (Herr *et*

*al.*, 2005). En *A. thaliana* el proteoma nucleolar revela que la mayor parte de las proteínas tienen uno de los siete dominios siguientes:

1. Dominio de reconocimiento a ARN
2. Caja helicasa DEAD/DEAH
3. Dominio C-terminal conservado de la helicasa
4. Dominio WD
5. Intermediarios de filamentos proteicos
6. Cola de miosina
7. Dominio de unión a GTP del factor de elongación Tu

Sin embargo, a pesar que se conocen los dominios que están presentes en una proteína, es difícil predecir su actividad, ya que muchas de éstas forman sitios de interacción al plegarse en su estructura secundaria, los cuales no están presentes en la estructura primaria. Así mismo, se debe tener en cuenta que las proteínas nucleolares tienen múltiples funciones; por ejemplo, la nucleolina, ayuda al ensamblaje de los ribosomas y promueve la replicación de ciertos virus; la proteína Nopp140 se sugiere está involucrada en la regulación de la transcripción del ADNr y en el mantenimiento de la morfología del nucléolo; o la fibrilarina, con funciones post-transcripcionales e involucrada en el desarrollo (Newton *et al.*, 2003)

### **1.1.2 Funciones del nucléolo**

Una de las principales funciones del nucléolo es el procesamiento del pre-ARNr. El producto de la transcripción de la polimerasa I es un largo precursor de pre-ARNr, el cual contiene las regiones codificantes y no codificantes de los genes ribosomales. Este precursor es modificado aproximadamente cada 200 bases por metilaciones y pseudouridilaciones antes de que el ARNr maduro sea producido por el corte del pre-ARNr. Cada modificación y corte se da en posiciones



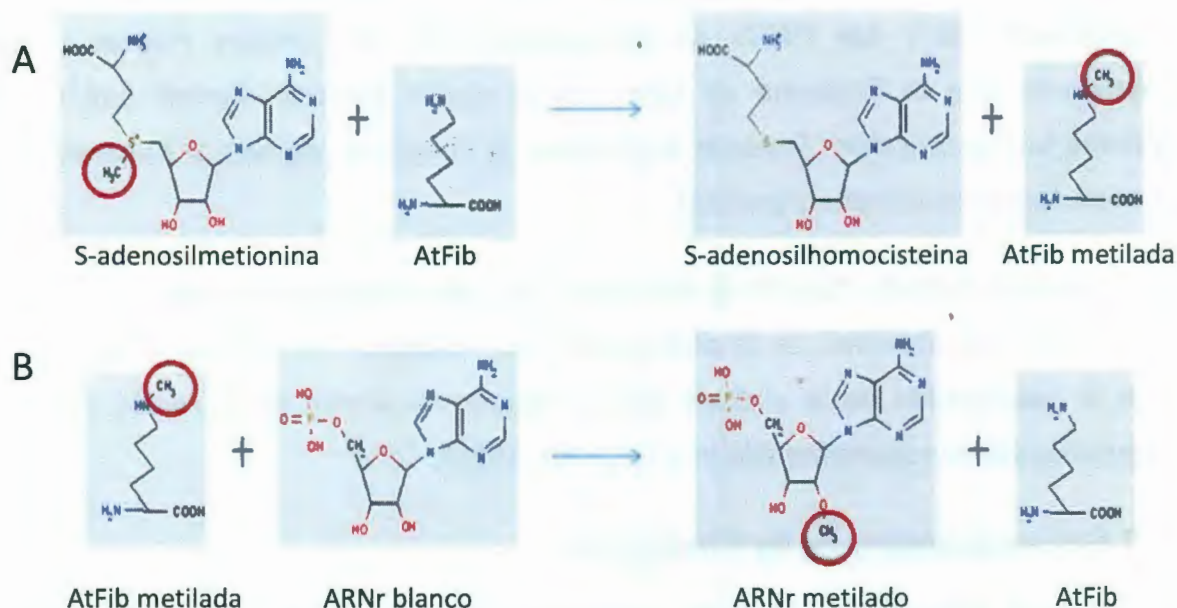
la distribución del material nucleolar esparcido entre los NOR, la región pericromosomal y los PNBs se divide para las dos células nuevas. Cabe mencionar que la fibrilarina se ubica en la región pericromosomal cuando se detiene la transcripción. Durante la telofase, la fibrilarina regresa al nucléolo y se reinicia la actividad transcripcional.

Al final de la mitosis, durante la telofase, inicia nuevamente el ensamblaje de los ribosomas y la actividad de la polimerasa I se restaura. Sin embargo, se sugiere que la reactivación de la síntesis de los ribosomas ocurre en múltiples pasos y regulados diferencialmente (Klein y Grummt, 1999).

## 1.2 Generalidades de la fibrilarina

El nucléolo contiene un elevado número de proteínas que se utilizan para el ensamblaje de los ribosomas, así como para mantener la estructura del mismo. La fibrilarina es la proteína más abundante en el componente fibrilar denso del nucléolo, en donde se lleva a cabo el procesamiento del pre-ARNr (Ochs *et al.*, 1985).

La fibrilarina es una metiltransferasa la cual cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa blanco (Keqiong y Ru, 2009) (figura 1.2). En *H. sapiens* la fibrilarina es el auto antígeno de la enfermedad escleroderma. Es una proteína con peso molecular de entre 34 - 38 kDa, dependiendo el organismo del cual sea aislada y fue originalmente identificada en el nucléolo de *Physarum polycephalu* (Christense *et al.*, 1977). Se encuentra asociada con los snoRNA U3, U8 y U14. Su secuencia de aminoácidos y estructura secundaria se encuentran altamente conservadas y una de sus principales características es que cuenta con un dominio rico en arginina y glicina y un motivo de unión a ARN. En levaduras, por ejemplo, la fibrilarina se llama Nop1p y su función es esencial para el desarrollo celular y la modificación y procesamiento del pre-ARNr (Schimmang *et al.*, 1989).



**Figura 1.2** Metilación del ARNr por la fibrilarina A) La lisina del sitio catalítico de la fibrilarina utiliza la S-adenosilmetionina (SAM) como sustrato dando lugar a la S-adenosilhomocisteína y a la AtFib metilada. B) Posteriormente el grupo metilo unido a la AtFib es transferido al grupo 2-hidroxilo del ARNr blanco generando el ARNr metilado.

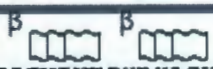
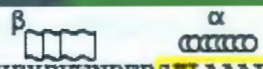
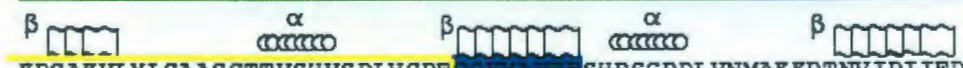
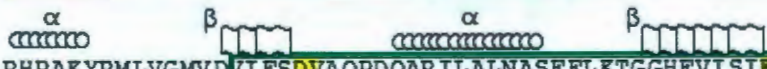
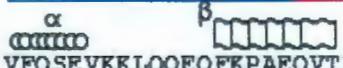
Dentro del proteoma nucleolar de *A. thaliana* se encuentran presentes dos enzimas SAM sintetasas, las cuales catalizan la conversión de la L-metionina y el ATP a la S-adenosil-L-metionina. El genoma de *A. thaliana* contiene cinco genes que codifican para la proteína SAM sintetasa y al menos dos de sus productos se ubican en el nucléolo (Leung *et al.*, 2003). Además de la transferencia del grupo metilo, la fibrilarina es componente de los snoRNP los cuales durante la maduración del ARNr son mediadores post-traduccionales de actividades como el corte del pre-ARNr y el ensamblaje de las proteínas ribosomales y el ARNr para formar las subunidades ribosomales

Uno de los principales modelos de estudio utilizados para comprender el funcionamiento de la fibrilarina es *Arabidopsis thaliana*. Para la AtFib se ha determinado su secuencia, el sitio catalítico, los sitios de unión a ARN y los sitios en donde se forman estructuras como  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$  (Rakitina *et al.*, 2011). En *A. thaliana* se han identificado tres genes que codifican para distintas



fibrilarinas (Barneche *et al.*, 2000). Estos genes se conocen como AtFib1, AtFib2 y AtFib3 y se ubican en los cromosomas 4 y 5. De estos tres genes solo el AtFib1 y el AtFib2 se expresan, cada uno tiene una copia que codifica para proteínas con una similitud del 80% y de 309 aminoácidos de largo para AtFib1 y 320 aminoácidos de largo para AtFib2. Estos genes están constituidos por seis intrones, siete exones y su ADNc tiene una longitud de 906 pb y 960 pb para AtFib1 y AtFib2 respectivamente. Un homólogo a la fibrilarina en *A. thaliana* ha sido amplificado, tiene una secuencia de 333 pb y codifica para una proteína con las características similares, como lo son la región rica en arginina y glicina y el motivo de unión a ARN presente a la mitad de la proteína. Esta proteína llamada AtFbr1 comparte una similitud del 88%, 69% y 67.5% con las fibrilarinas de *A. thaliana*, de *H. sapiens* y de *Xenopus* respectivamente, lo cual sugiere que es una proteína homóloga funcional (Kyoung *et al.*, 2003) (figura 1.3).



|                                                                                      |                                                                 |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----|
| AtFib1                                                                               | --MRPPVTG-----GRGGGGFRGGRDGGGRGFGGGRSFGGGRSGDRG                 | 40  |
| AtFib2                                                                               | --MRPPLTGSG-----GGFSGGRGRGGYSGGRGD--GFSGGRG-GGGRGGGRG           | 44  |
| HsFib                                                                                | --MKPGFSPRG--GGFGGRRGGFGDRGGRRGGGGFGGGRRG--GGFRGRGRGGGGGGGGG    | 54  |
| XeFib                                                                                | --MRPGFSPRGGRGGYGDRGGFGDRGGRRGGGFRGRGGGGDRGGFGGRGGFGGRGGFGD     | 58  |
| Nop1                                                                                 | MSFRPGSRGGS-----RGGSRGGFGGRGSGRGARGSGRGGFGGRGSGRGARGGS          | 51  |
|   |                                                                 |     |
| AtFib1                                                                               | RS--GPRGRG-----RGAPRG--RGG--PP-RGGMKGGSKVIVEPHRHAGVFIAGKED      | 87  |
| AtFib2                                                                               | FSDRGGRRG-----RGP PRGGARGRRGPAGRGGMKGGSKVIVEPHRHAGVFIAGKED      | 98  |
| HsFib                                                                                | GG--GGRGGGGFHS---GGNRGRGRGG-----KRGNQSGKNVMVEPHRHAGVFIAGKED     | 104 |
| XeFib                                                                                | RG--GFRGG--FKSPGRGGPRG--GRGG-----RGGFGAGRKVIVEPHRHAGVFIAGKED    | 108 |
| Nop1                                                                                 | RGGFGGRGGS-----RGGARGGSRGGR--GGAAGGARGGAKVIEPHRHAGVFIAGKED      | 104 |
|    |                                                                 |     |
| AtFib1                                                                               | ALVTRKNLVPGEAVYNEKRI SVQNE DG-----TKVEYRVWNPFRSKLAAAILGGVDNIWI  | 141 |
| AtFib2                                                                               | ALVTRKNLVPGEAVYNEKRI SVQNE DG-----TKTEYRVWNPFRSKLAAAILGGVDNIWI  | 152 |
| HsFib                                                                                | ALVTRKNLVPGESVYGEKRVSI SEGD-----DKIEYRAWNPFRSKLAAAILGGVDQIHI    | 157 |
| XeFib                                                                                | ALVTRKNLVPGESVYGEKRI SVEDE-----VKTEYRAWNPFRSKIAAAILGGVDQIHI     | 161 |
| Nop1                                                                                 | LLVTRKNMAPGESVYGEKRI SVEEP SKEDGVPPTKVEYRVWNPFRSKLAAGIMGGLDELFI | 164 |
|  |                                                                 |     |
| AtFib1                                                                               | KPGAKVLYLGAASGTTVSHVSDLVGPEGLVYAVEFSHRSGRDLVNMAKRTNVIPI IEDA    | 201 |
| AtFib2                                                                               | KPGAKVLYLGAASGTTVSHVSDLVGPEGLVYAVEFSHRSGRDLVNMAKRTNVIPI IEDA    | 212 |
| HsFib                                                                                | KPGAKVLYLGAASGTTVSHVSDIVGPDGLVYAVEFSHRSGRDLINLAKRTNI IPV IEDA   | 217 |
| XeFib                                                                                | KPGAKVLYLGAASGTTVSHVSDVVGPEGLVYAVEFSHRSGRDLINVAKRTNI IPV IEDA   | 221 |
| Nop1                                                                                 | APGKKVLYLGAASGTSVSHVSDVVGPEGLVYAVEFSHRPGRELISMAKRPNI IPV IEDA   | 224 |
|  |                                                                 |     |
| AtFib1                                                                               | RHPAKYRMLVGMVDVIFSDVAQPDQARILALNASFFLKTGGHFVVISIKANCIDSTVAAEA   | 261 |
| AtFib2                                                                               | RHPAKYRMLVGMVDVIFSDVAQPDQARILALNASYFLKSGGHFVVISIKANCIDSTVPAEA   | 272 |
| HsFib                                                                                | RHPHKYRMLIAMVDVIFADVAQPDQTRIVALNAHTFLRNGGHFVVISIKANCIDSTASAEA   | 277 |
| XeFib                                                                                | RHPHKYRMLVGMVDVIFADVAQPDQTRIVALNAHNFLKNGGHFVVISIKANCIDSTAAPAE   | 281 |
| Nop1                                                                                 | RHPQKYRMLIGMVDVIFADVAQPDQARIIALNSHMF LKQGGVVISIKANCIDSTVDAET    | 284 |
|   |                                                                 |     |
| AtFib1                                                                               | VFQSEVKKLQQEQFKPAEQVTLEP FERDHACVVGGRMPKQKTPAS-                 | 308 |
| AtFib2                                                                               | VFQTEVKKLQQEQFKPAEQVTLEP FERDHACVVGGRMPKPKAATAA                 | 320 |
| HsFib                                                                                | VFASEVKKMQQENMKPQEQLTLEPYERDHAVVVGVRPPPQVKN----                 | 321 |
| XeFib                                                                                | VFAAEVKKMQQENMKPQEQLTLEPYERDHAVVVGIRPPAKQKK----                 | 325 |
| Nop1                                                                                 | VFAREVQKLREERIKPLEQLTLEPYERDHCIVVGGRYMRSLKK----                 | 327 |

**Figura 1.3** Comparación de la estructura primaria de la fibrilarina de *A. thaliana* (AtFib1, AtFib2), de *H. sapiens* (HsFib), de *Xenopus* (XeFib) y de *S. cerevisiae* (Nop1). La AtFib1 tiene el número de acceso NP\_568772.3, la de AtFib2 tiene el número de acceso NP\_567724.1, la de HsFib tiene el número de acceso NP\_001427.2, la de XsFib tiene el número de acceso NP\_989101 y la Nop1 tiene el número de acceso NP\_010270.1. Los



cuatro dominios están delineados como se indica: GAR: gris; BCO: verde; R: azul; alfa: rosa. Los recuadros color amarillo y verde en las secuencias de la fibrilarina de *A. thaliana* corresponden a sitios de unión a ARN. Las secuencias conservadas en azul indican el octámero de aminoácidos que interactúan con ARN. Los aminoácidos lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, ácido aspártico y alanina enmarcados en color amarillo corresponden al sitio catalítico. Las estructuras tipo B y alfa que se forman a lo largo de la proteína se indican en cada sitio (modificado de Rakitina *et al.*, 2011).

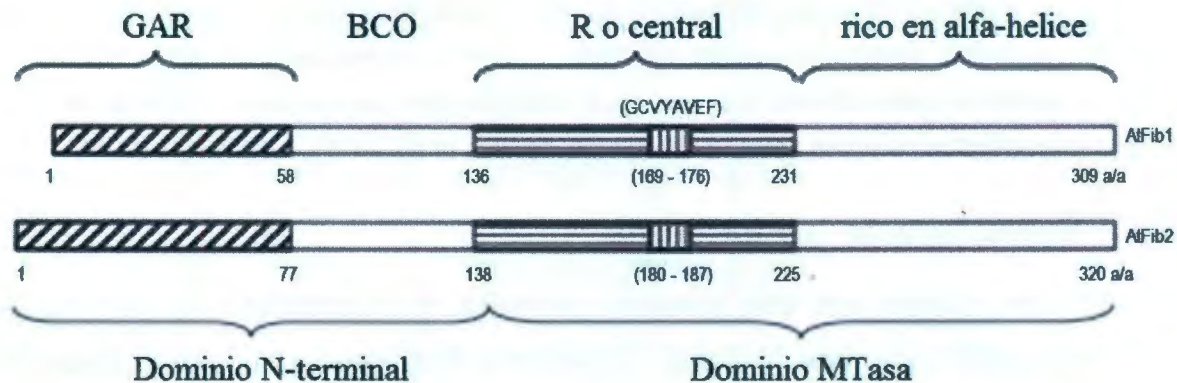
### 1.2.1 Estructura de la Fibrilarina

La fibrilarina cuenta con dos grandes dominios, el N-terminal y el dominio de actividad metiltransferasa (MTasa). El extremo N-terminal a su vez se divide en dos regiones: 1) la región GAR (rica en arginina y glicina) con un largo de 77 aminoácidos y 2) una región "blanco" con 61 aminoácidos. El dominio GAR es el responsable de la interacción con distintas proteínas celulares y virales y contiene la señal para ubicar a la fibrilarina en el nucléolo. Este dominio se encuentra metilado en los residuos arginina (Lischwe *et al.*, 1985). Para la región "blanco" no se ha atribuido una función específica. Este extremo N-terminal contiene las secuencias consenso GGR(G/D/S)(G/F), la cual se encuentra repetida cinco veces.

El dominio MTasa a su vez se divide en la "región-R" con un largo de 87 aminoácidos y la región rica en  $\alpha$ -hélices con 95 aminoácidos. Dentro de la región-R se ubica el motivo de unión al ARN y tiene la secuencia GCVYAVCF. A demás de esta región de unión a ARN, se han reportado dos sitios de unión adicionales para la fibrilarina de *A. thaliana* que pudieran estar involucrados en distintos procesos celulares. Uno de estos sitios de tiene la secuencia GCVYAVCF y el otro se encuentra localizado en la región rica en  $\alpha$ -hélice (figura 1.3). La región C-terminal de fibrilarina contiene una secuencia de 33 aminoácidos que forman la estructura  $\alpha$ -hélice (Rakitina *et al.*, 2011)

Tanto la AtFib1 como la AtFib2 tienen una composición similar, la única diferencia radica en el largo de los dominios (figura 1.4). Dentro de los dominios de la fibrilarina se tienen numerosas estructuras secundarias, como hojas  $\beta$  o alfa

hélices. Los aminoácidos que conforman el sitio catalítico de la proteína son la lisina 138 y 260, y el ácido aspártico 231 (Rakitina *et al.*, 2011).



**Figura 1.4** Representación de la secuencia de los dominios de la fibrilarina. GAR: región rica en arginina y glicina. BCO: dominio sin actividad definida; "R": dominio central; Alfa-hélice: región rica en estructuras  $\alpha$ -hélice. GCVYAVEF: octámero de aminoácidos conservados sugeridos para la unión a ARN. Dominio N-terminal: comprende las regiones GAR y BCO y tiene un largo de 138 aminoácidos. Dominio MTasa: dominio que comprende las regiones R y alfa, es el dominio que tiene la actividad de metiltransferasa (modificado de Rakitina *et al.*, 2011).

### 1.3 Funciones de la fibrilarina

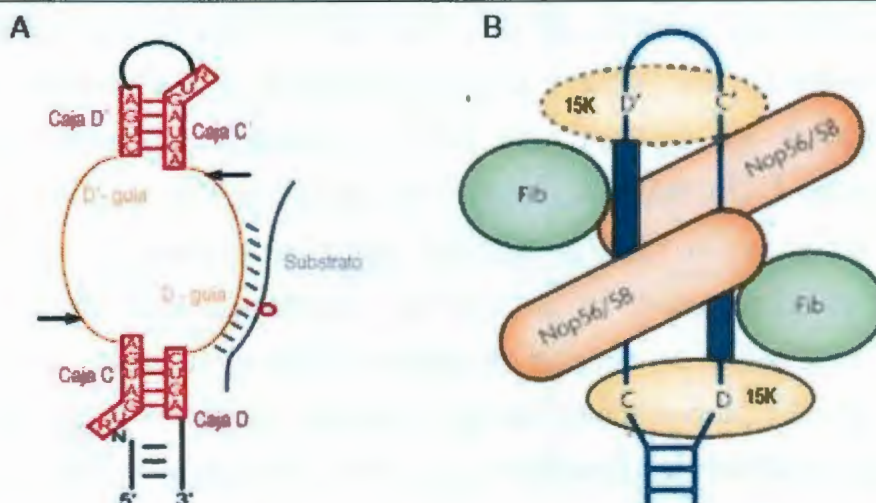
#### 1.3.1 Modificación postranscripcional del pre-ARNr

La fibrilarina se encuentra directamente involucrada en diversos procesos postranscripcionales como son el procesamiento del pre-ARNr, la metilación del pre-ARNr y el ensamblaje de los ribosomas (Tollervey *et al.*, 1993). La principal función conocida de la fibrilarina es la metilación de la 2'-O-ribosa blanco del ARNr y de los ARN pequeños nucleares (snARN), sin embargo debido a que la fibrilarina tienen una baja afinidad por el ARN se sugiere que forma complejos con otras proteínas formando así un snoRNP específico para llevar a cabo la metilación (Lechertier *et al.*, 2009; Reichow *et al.*, 2007; Dunbar *et al.*, 2000). Dicho complejo es dirigido por un snoARN guía que tiene la secuencia de la caja H/ACA, la cual determina la especificidad por el ARN a modificar. Cada snoRNP contiene un snoRNA de entre 70 a 600 nucleótidos y proteínas asociadas.



Existen dos tipos de snoARN, los que contienen la caja C/D en su secuencia y dirigen la metilación del ARNr y los que contienen la caja H/ACA y dirigen la pseudouridilación. El snoRNA guía para la metilación contiene la secuencia consenso o caja C (RUGAUGA, donde R es una purina) cerca al extremo 5', una secuencia consenso o caja D (CUGA) cerca al extremo 3', así como las secuencias relacionadas C' y D' internas. Dentro de este snoARN guía, se encuentran una o dos secuencias complementarias al sustrato que forman un dúplex de 10 a 21 pb seleccionando así el quinto nucleótido río arriba de la caja D/D' para su modificación (Cavaille *et al.*, 1996; Kiss-Laszlo, 1996). A su vez las cajas C y D se doblan formando el motivo estructural kink-turn (figura 1.5). Los snoARN generalmente se encuentran codificados en los intrones de los genes que codifican para proteínas nucleolares relacionadas con la biogénesis de los ribosomas como lo son la nucleolina o la fibrilarina.

El complejo de unión a ARN se compone por las proteínas fibrilarina, Nop5 (también conocida como Nop56/58) y L7Ae en arqueas. En eucariotas las proteínas parálogas Nop56 y Nop58 reemplazan a la Nop5 y la proteína L7Ae es reemplazada por su equivalente la proteína 15.5K también. La proteína 15.5K es la primera que se une al ARN guía reconociendo el motivo K-turn. Posteriormente, la proteína Nop5 se une a la fibrilarina. Esta unión forma el dominio C-terminal o dominio Nop, el cual se une a la proteína 15K, ya en complejo con el ARN (Aittaleb *et al.*, 2003; Vidovic *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2000). De esta forma es como la fibrilarina se une al snoRNP (figura 1.5) (Keqiong y Ru, 2009).



**Figura 1.5** Modelo general del complejo para procesamiento del ARNr. A) Modelo general de un ARN guía. El ARN guía se pliega formando una horquilla complementaria al ARNr a metilar. En esta imagen se puede observar un ARN sustrato el cual es modificado en la quinto ribonucleotido (Kerjiong y Ru, 2009). B) Modelo de la partícula ribonucleotidica pequeña nucleolar (snoRNP) que lleva a cabo para la metilación del ARNr. Este complejo se compone por un ARN guía (línea azul), la proteína 15K la cual estabiliza al ARN guía y la proteína NOP56/58 la cual une a la fibrilarina al complejo de fibrilarina (Matera *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Desarrollo embrigénico

Otra función en la que la fibrilarina ha sido involucrada es en el desarrollo celular. Esta función fue demostrada en ratones con mutaciones en el gen de la fibrilarina el cual carecía del dominio metiltransferasa. Los animales que eran homocigotos para la mutación no se desarrollaban y se podía observar una apoptosis masiva en el embrión. Los ratones que eran heterocigotos para la mutación no mostraron defecto aparente. Sin embargo, en una segunda generación de ratones descendientes de heterocigotos la proporción de ratones homocigotos sin la mutación fue mayor, ya que los heterocigotos murieron en el útero (Newton *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Ensamblaje del nucléolo

Uno de los sitios donde se localizan los complejos nucleares durante la mitosis, etapa en la cual el nucléolo se desintegra, es la capa pericromosomal también



denominada superficie de los cromosomas. En las células en mitosis esta capa es un sitio específico donde proteínas nucleolares como la nucleolina, la fibrilarina y algunos snoRNAs como U3 y U14 se encuentran.

Durante la interfase la fibrilarina se localiza en el DFC del nucléolo, pero durante la fase G2 la fibrilarina migra del nucléolo a la periferia del núcleo formando junto con otras proteínas una capa alrededor de los cromosomas que están en proceso de condensarse. Durante el inicio de la anafase la fibrilarina se asocia a los cromosomas de una forma uniforme. Al final de la anafase la fibrilarina se detecta en los NOR, permaneciendo asociada a la capa pericromosomal. Durante la telofase la fibrilarina se encuentra asociada con las partes condensadas de los cromosomas y se acumula en los PNBs. Al final de la mitosis la fibrilarina y los snoRNAs se han detectado PNBs dispersos en el núcleo. Estos PNBs se fusionan con los NOR cuando la síntesis del ARNr se reanuda, por lo tanto se piensa que los PNBs funcionan como sitios en donde se forman inicialmente los complejos nucleolares involucrados en los primeros pasos del procesamiento del ARNr asociado al inicio de la transcripción y a la formación del nuevo nucléolo.

Por otro lado se ha evidenciado, a través de experimentos de micro inyección de anticuerpos anti-fibrilarina en células PtK1, que la fibrilarina está involucrada en la formación del nucléolo. En estas células se observaron cambios en la morfología nuclear, el 40% de las células presentaban una condensación de la cromatina distinta a las células testigo. Así mismo, estas células no progresaban a la fase G1. De acuerdo a estos resultados se tiene la hipótesis de que el bloqueo de la fibrilarina impide la correcta formación del nucléolo e inhibe la actividad transcripcional de la RNA polimerasa I (Fomproix *et al.*, 1998).

En otro estudio de manera similar se utilizó ARNi contra el ARNm de la fibrilarina. Con esto disminuyeron la expresión de la fibrilarina en un 70% en células HeLa, dando como resultado malformaciones en el núcleo de entre el 30% y el 45% de las células después de 72 horas. Con esto concluyeron que la fibrilarina podría contribuir al mantenimiento y a la correcta arquitectura del núcleo (Amin *et al.*, 2007).



### 1.3.4 Infecciones virales mediadas por la fibrilarina

Los virus que tienen una fase nucleolar dependen de la interacción de sus proteínas con los cuerpos cajales y el nucléolo para replicarse y transportarse. Los cuerpos cajales contienen distintas proteínas como lo son la coilina o la fibrilarina y se encuentran involucrados en la maduración de las snRNPs y las snoRNPs. Como ejemplo, el virus de la roseta de cacahuete, el cual pertenece a la familia de los umbravirus, codifica proteínas como la ORF3 que interactúa con los cuerpos cajales y con el nucléolo. Este tipo de proteínas contienen dos dominios conservados, uno de ellos rico en residuos de arginina y el otro en residuos de leucina. El dominio rico en arginina está involucrado en la importación nuclear y el dominio rico en leucina está involucrado en la exportación nuclear, lo cual sugiere que este tipo de proteínas se trasladan a través del núcleo y del citoplasma de células infectadas (Kim *et al.*, 2007). Al introducirse la proteína ORF3 al núcleo se une a los cuerpos cajales reorganizándolos en pequeñas estructuras denominadas cuerpos cajales similares (CBLs).

Se ha demostrado que la proteína ORF3 interactúa con la fibrilarina por lo que se sugiere que la fibrilarina está involucrada en por lo menos dos etapas del ciclo de vida de los umbravirus: 1) la fusión de los CBLs con el nucléolo es mediada con la interacción de la proteína ORF3 y la fibrilarina a través del dominio rico en lisina de la ORF3 y el dominio GAR\* de la fibrilarina y 2) la proteína ORF3 redistribuye a la fibrilarina al citoplasma en donde participa en la formación de las ribonucleoproteínas virales que son capaces de moverse a través del floema de la planta causando una infección en su totalidad (Kim *et al.*, 2007).

Los virus que no pertenecen a la familia de los umbravirus y no tienen en su ciclo celular una fase nucleolar, como el virus del mosaico del tabaco o el virus X de la papa, son capaces de distribuirse en la planta aun cuando ésta tenga a la fibrilarina silenciada. Estudios *in vitro* han demostrado que la fibrilarina en combinación con la proteína ORF3 y el ARN viral forman partículas con arquitectura tipo hélice y estructura similar a las ribonucleoproteínas virales

formadas *in vivo*. Estas ribonucleoproteínas virales son infecciosas y protegen al ARN viral de ARNasas, lo cual sugiere que la proteína ORF3 y la fibrilarina son suficientes para encapsidar al ARN viral para su distribución en la planta (Kim *et al.*, 2007).

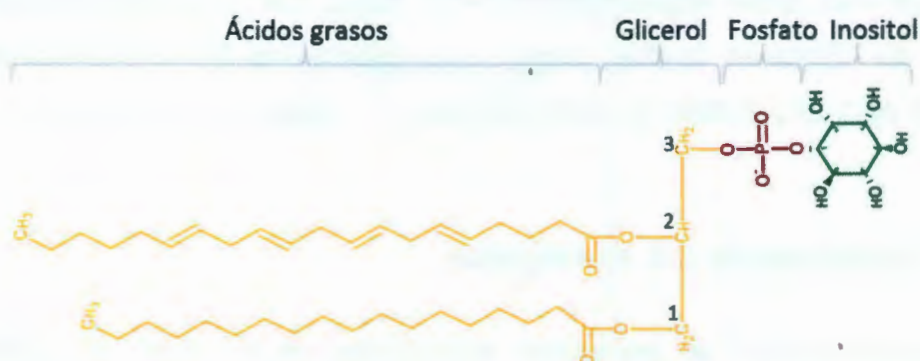
### 1.3.5 Ensamblaje de los ribosomas

Un estudio en el cual se generaron mutaciones en la fibrilarina de levaduras demostró que el ensamblaje de los ribosomas es dependiente de la fibrilarina. Las mutaciones realizadas y analizadas previenen la síntesis de los ribosomas de diferente forma. Algunas de estas mutaciones inhiben la correcta síntesis de las subunidades 18S y 25S (Tollervey, 1993).

### 1.4 Los fosfolípidos de inositol

Los fosfolípidos de inositol son los principales componentes lipídicos en la mayor parte de las membranas celulares. Estos lípidos están compuestos por una cadena principal de glicerol, dos colas de ácido graso, un grupo fosfato y un grupo polar. Una de las principales clases de fosfolípidos son los fosfoglicéridos que derivan del ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es un compuesto formado por una molécula de glicerol con dos hidroxilos esterificados por ácidos grasos, el primero por ácido esteárico saturado y el segundo por el ácido araquidónico no saturado. El tercer hidroxilo se encuentra esterificado por el ácido fosfórico y uno de sus grupos -OH generalmente se une la colina, la etanolamina o el inositol dando lugar a la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina fosfatidilinositol respectivamente (figura 1.6).





**Figura 1.6** Estructura del fosfatidilinositol. Cuenta con una molécula de glicerol con dos hidroxilos esterificados uno con un ácido graso saturado (el ácido esteárico) y otro con un ácido graso no saturado (el ácido araquidónico). La composición de ácidos grasos puede variar dependiendo la ubicación del fosfatidilinositol en la célula. El tercer hidroxilo del glicerol se encuentra esterificado por el ácido fosfórico el cual une al grupo inositol.

El inositol es un ciclohexanohehexol, es decir un carbohidrato cíclico con seis grupos hidroxilo, uno en cada uno de los carbonos que conforman el anillo. Los fosfatos de inositol, los fosfatidilinositoles y los glucosilfosfatidilinositoles, abarcan un grupo de inositoles que contienen una variedad de compuestos (Irvine y Schell, 2001; Bernfield *et al.*, 1999). Particularmente, en los fosfatidilinositoles, también llamados fosfoinosítidos, existe una gran heterogeneidad estructural. Esta heterogeneidad incluye variaciones en los ácidos grasos esterificados en las posiciones 1 y 2 del glicerol, la presencia de inositoles isoméricos como cabeza polar y variantes en la posición y el grado de fosforilación del anillo de inositol.

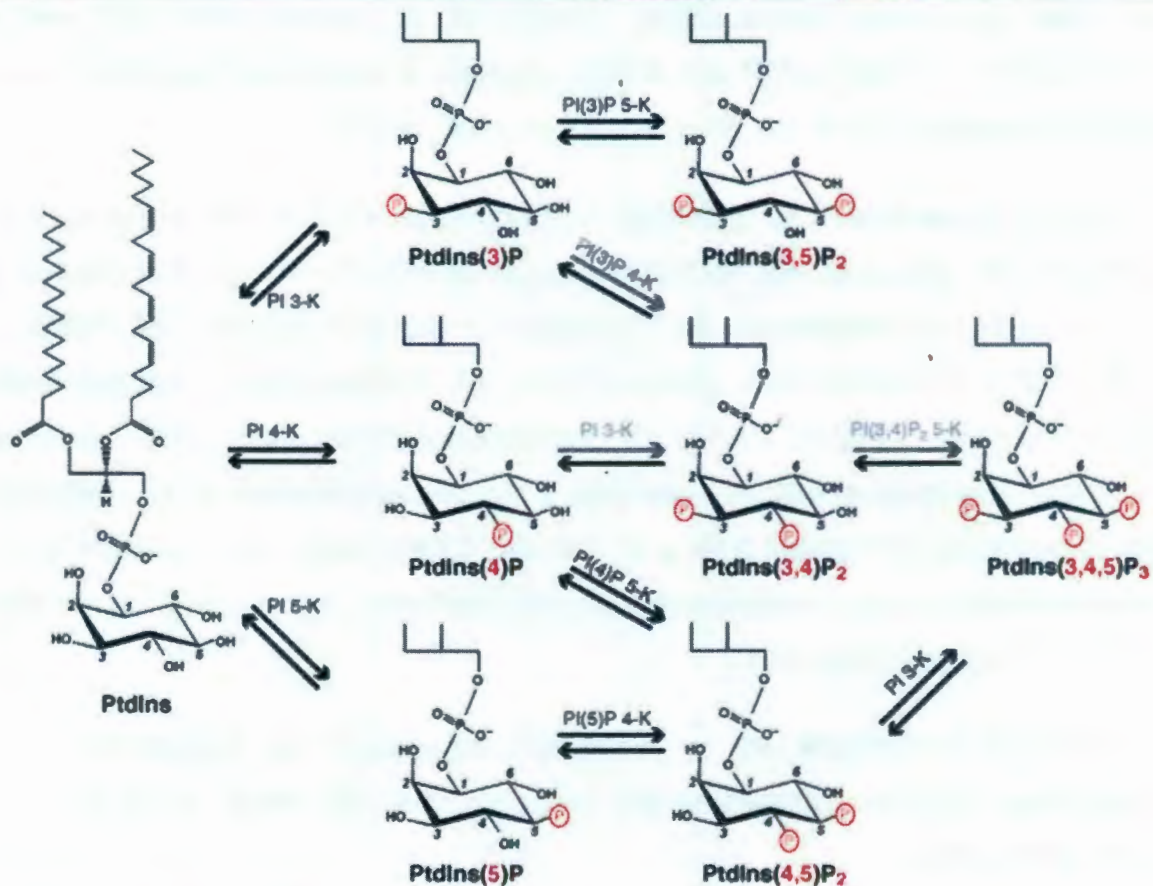
El fosfatidilinositol (PtdIns) es la molécula base de la mayor parte de los fosfoinosítidos, de ésta, los cinco grupos  $-OH$  libres pueden ser fosforilados dando lugar a tres fosfoinosítidos monofosfato los cuales son el fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns(3)), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)) y el fosfatidilinositol 5-fosfato (PtdIns(5)). Así mismo puede dar lugar a tres fosfoinosítidos bisfosfato como lo son el fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>), el fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) y el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>); y un fosfoinosítido trisfosfato el cual es el fosfatidilinositol 1,3,4-trisfosfato (PtdIns(1,3,4)P<sub>3</sub>). El PtdIns es el fosfoinosítido más abundante en las células, constituye alrededor del 90% de los lípidos de inositol en las membranas



celulares. Los otros fosfoinosítidos constituyen el restante 10% del cual el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y el PtdIns(4)P son el 9%, variando el porcentaje dependiendo del tejido (Vanhaesebroek *et al.*, 2001, Stephens *et al.*, 2000).

Cuando el grupo inositol es fosforilado en la posición 4 por la PI4-kinasa da lugar al PtdIns(4)P, que a su vez es fosforilado por la PI(4)P5-kinasa para obtener al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. La fosforilación en la posición 3 por la PI3-kinasa del PtdIns, el PtdIns(4)P y el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> genera PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> y PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> respectivamente (Figura 1.7). El fosfatidilinositol-3-fosfato está presente constitutivamente en la células eucariotes y sus concentraciones no se modifican, por el contrario, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> están casi ausentes en las células en reposo y su concentración aumenta de forma importante al estimularlos con una variedad de ligandos.

Además de encontrarse en la membrana plasmática los fosfoinosítidos se encuentran en otros compartimentos celulares que van desde los endosomas hasta el nucléolo.



**Figura 1.7** Esquema general de la ruta de fosforilación del fosfatidilinositol. El fosfatidilinositol es fosforilado en las posiciones 3-, 4- y 5- dando lugar a tres fosfoinosítidos monofosfato. A partir de estos tres fosfoinosítidos monofosfato se lleva a cabo una segunda fosforilación dando lugar a tres fosfoinosítidos bisfosfato. En una última fosforilación se obtiene un fosfoinosítido trisfosfato. Las flechas en color negro indican la ruta de fosforilación conocida. Cada una de las fosforilación son llevadas a cabo por cinasas específicas para cada de fosfoinosítido. Las flechas en color gris indican posibles rutas de fosforilación aún desconocidas (Lemmon, 2003).

## 1.5 Funciones de los fosfoinosítidos

### 1.5.1 Fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns(3)P)

Este fosfoinosítido es producido por la PI3-cinasa y se encuentra enriquecido en las membranas de los endosomas y en las vesículas. El principal dominio proteico que interactúa con este fosfoinosítido es el dominio FYVE (Fab1p-YOPB-Vps27p-EEA1). Se ha identificado un gran número de proteínas que contienen este



dominio y la mayoría de ellas está involucrada en la regulación del tráfico membranal durante la endocitosis. Dos importantes proteínas que contienen el dominio FYVE son la EEA1 y la proteína asociada a endosomas Hrs. La proteína EEA1 es un efector tipo Rab5 la cual promueve la fusión de las vesículas con las proteínas SNARE. La proteína Hrs es una proteína que contiene dos motivos de interacción con ubiquitina (UIM), los cuales interactúan con clatrina. Estas proteínas se localizan en regiones separadas en la formación de los endosomas. Además de su función en el tráfico membranal este fosfoinosítido también está involucrado en la autofagia. El PtdIns(3)P está involucrado en la formación de la membrana para la autofagia reclutando a la proteína Alf que en condiciones de estrés metabólico promueve la supervivencia de células tumorales (Sasaki *et al.*, 2007).

### 1.5.2 El fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>)

Este fosfoinosítido es generado principalmente por la fosforilación del PtdIns(3)P y constituye menos del 0.1% de los fosfoinosítidos. Algunas de las proteínas que se unen a él son la mVps24p, la Svp1p y la Ent3p. Este fosfoinosítido se encuentra predominantemente en los lisosomas de las células eucariotes. Dependiendo del organismo y del tipo de célula el PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> está involucrado en funciones que van desde la morfología de los lisosomas, la autofagia, la respuesta a estrés y la actividad de canales iónicos (Ho *et al.*, 2012).

### 1.5.3 El fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P)

Durante mucho tiempo este fosfoinosítido fue únicamente considerado como precursor del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>; sin embargo, se sabe que también cumple otras funciones. Se encuentra principalmente en el aparato de golgi. La generación de este fosfolípido la lleva a cabo la cinasa PI4-cinasa y es reconocido como un adaptador del complejo proteico AP-1 promoviendo su función en la formación de vesículas recubiertas por clatrina. Si se inhibe la formación del PtdIns(4)P, el aparato de golgi se expande y la asociación de éste con el complejo AP-1 se bloquea. Adicionalmente, proteínas que contienen el dominio homólogo a



pleckstrina (PH) como la FAPP (proteína adaptadora fosfatasa cuatro) y la FAPP2 interactúan con el PtdIns(4)P. Estas proteínas se encuentran involucradas en el tráfico vesicular desde el aparato de golgi a la membrana plasmática (Godi *et al.*, 2004).

#### **1.5.4 El fosfatidilinositol 5-fosfato (PtdIns(5)P)**

La síntesis de este fosfoinosítido está asociada a la acción de una fosfatasa que tienen por sustrato al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. El PtdIns(5)P se une al dominio de plantas PHD de la proteína inhibidora de crecimiento ING2 la cual también se considera como supresora de tumores. Esta enzima acetila a la proteína p53 induciendo la acción de la proteína p21 y a la muerte celular en respuesta a un daño en el ADN (Gozani *et al.*, 2003). Se sugiere que la generación de PtdIns(5)P activa a la ING2 previniendo así el desarrollo de tumores.

#### **1.5.5 El fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>)**

Este fosfoinosítido es producido principalmente por la desfosforilación del PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> por acción de la fosfatasa 5. Algunas de las proteínas que se unen a este fosfolípido son las que contienen en su secuencia el dominio PH o el dominio PX. Proteínas como la TAPP1 y la TAPP2 cuentan con el dominio PH y son las únicas proteínas identificadas a las que se unen a este fosfoinosítido.

#### **1.5.6 El fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>)**

Este fosfoinosítido es producido por la cinasa del tipo I PI3K. Está involucrado en vías de señalización que participan en la proliferación celular, la apoptosis y la respuesta inmune. Distintas proteínas entre las cuales se encuentran cinasas, proteínas GAP y GEF y GTPasas se unen específicamente al PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, lo cual sugiere se encuentra involucrado en una amplia gama de procesos celulares.

#### **1.5.7 El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)**

El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> regula numerosas actividades celulares, como la modulación de

la actina del citoesqueleto, el transporte membranal y eventos nucleares. Para lograr una correcta regulación, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> debe ser sintetizado o transportado a los diferentes compartimentos celulares donde ejercerá su acción (Doughman *et al.*, 2003). Las enzimas que producen al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> son las fosfatidilinositol fosfato cinasas (cinasas PI) y son una familia de cinasas lipídicas que contienen un dominio cinasa con residuos catalíticos que se unen a ATP y a Mg<sup>2+</sup>. Estos residuos son similares a los residuos en otras cinasas de lípidos y de proteínas, lo cual sugiere un mecanismo similar de transferencia del grupo fosfato (Orth *et al.*, 2002). Estas cinasas se encuentran divididas de acuerdo a su especificidad en tres familias, las tipo I, II y III. Las de tipo I y II incluyen tres isoformas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Boronenkov *et al.*, 1998; Ishihara *et al.*, 1996). La mayor diferencia entre cada familia es el sustrato y el blanco celular. Las cinasas tipo I y II producen al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> por un único mecanismo el cual involucra la fosforilación de PtdIns(4)P (Anderson *et al.*, 1999). De forma alternativa, la cinasa del tipo II fosforila al PtdIns(5)P para dar al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Rameh *et al.*, 1997). Las cinasas PI han sido localizadas en la membrana plasmática, en las adhesiones focales, en el núcleo y en el aparato de golgi (Di Paolo *et al.*, 2002; Godi *et al.*, 1999), por lo tanto cada uno de estos compartimentos tiene la capacidad para regular y sintetizar al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y otros fosfoinosítidos.

En los diferentes organelos celulares la acumulación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> no solo se debe a su síntesis local, también puede darse por interacciones proteicas que lo trasladen. Este traslado sugiere que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se une por interacciones electrostáticas con distintas proteínas permitiendo su movilidad en compartimentos como el núcleo y el nucléolo (McLaughlin *et al.*, 2002). Para que esto se lleve a cabo, y tomando en cuenta que el grupo inositol tiene carga negativa, las proteínas que lo unen deben tener una región rica en aminoácidos básicos disponibles para unirlos. Se sugiere que este mecanismo ocurre para acarrear al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de un compartimento a otro así como para regular su acción.

## 1.6 Funciones del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en membranas

Se ha encontrado que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> modula el funcionamiento de varias



proteínas como la fosfolipasa D (Liscovith *et al.*, 1994), la  $\mu$ -calpaina, responsable de la proteólisis neutra calcio-dependiente (Saido *et al.*, 1993), la proteína cinasa C (PKC), la cual potencializa su función al unirse al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> o a Ca<sup>+</sup> (Steinberg, 2008) y el factor 1 de ADP-ribosilación que regula el tráfico membranaral (Randazzo y Kahn, 1994). Así mismo, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se une y regula proteínas como la cofilina (Yonezawa *et al.*, 1991), la profilina (Lassing y Lindberg, 1985), la gCap y la  $\alpha$ -actina.

En la membrana plasmática tanto el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> como los demás fosfoinosítidos se unen a distintas proteínas a través del grupo inositol y las fosfatos en su estructura. Generalmente la unión de proteínas a los fosfoinosítidos se da por interacciones electrostáticas de las cargas negativas de los grupos fosfato del anillo inositol con regiones básicas en las proteínas. En otros casos, aminoácidos hidrofóbicos adyacentes a los unidos al anillo inositol fortalecen la unión a la membrana penetrando parcialmente a la misma (Balla, 2005; Lemmon, 2003), como es el caso para la formación de canales de calcio, sodio, potasio y otros iones (Hilgermann *et al.*, 2001). Este tipo de regulación mediada por el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> representa un mecanismo para que puedan llevarse a cabo diversas funciones en la membrana plasmática.

El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> también participa en el reclutamiento hacia la membrana plasmática y en la activación de una variedad de proteínas reguladoras de actina. El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> facilita la elongación de los filamentos de actina en los extremos positivos, promoviendo la disociación de proteínas como la gelsolina y la CapZ (Choquette *et al.*, 1984). La unión al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> es crítica para la función de las proteínas que actúan como adaptadores entre la membrana plasmática y los sitios de actina en el citoesqueleto de la matriz celular. Estos adaptadores incluyen proteínas como la moesina que contienen el dominio FERM.

La endocitosis es otra de las funciones en la cual se involucra al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. En los pasos iniciales en la endocitosis se requiere que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> reclute diferentes proteínas las cuales son necesarias para este proceso. Estas proteínas incluyen adaptadores de clatrina (AP-2, AP18, epsina) y a otros factores



endocíticos como lo es la dinamina la cual controla la fisión (Gaidarov y Kenn 1999). La retención del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en la membrana plasmática y la rápida disociación de los factores endocíticos a través de su internalización requieren que se remueva al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrana. Esta función la cumple la inositol-5-fosfatasa.

### 1.7 Funciones del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el núcleo

Las plantas así como los animales tienen una compleja estructura nuclear la cual es sitio de almacenaje y síntesis de los diferentes fosfoinosítidos. Esta estructura comprende la envoltura interna y externa del núcleo, los poros nucleares, el nucleoplasma, la matriz nuclear, la cromatina y el retículo nucleoplasmático. Es posible que distintas funciones nucleares sean reguladas por los fosfoinosítidos.

La mayoría del conocimiento que se tiene acerca de las funciones de los fosfoinosítidos se deriva de las vías de señalización entre la membrana plasmática y el citoplasma; sin embargo, ha surgido evidencia que establece la existencia de los fosfoinosítidos en el núcleo. Parte de esta evidencia radica en el hecho de que se han identificado distintas enzimas de la ruta de síntesis de los fosfoinosítidos en el núcleo tanto de plantas como de animales. En el cuadro 1.1 se especifican aquellas enzimas que han sido identificadas en el núcleo de las plantas. La función que tienen los fosfoinosítidos en el núcleo no es aun del todo clara pero algunos de los aspectos de señalización en el núcleo son diferentes a los de la membrana plasmática (Divecha *et al.*, 1991). Así mismo se ha evidenciado que los fosfoinosítidos no solo se encuentran presentes en la membrana nuclear sino también en compartimientos separados (Irvine, 2002; Boronenkov *et al.*, 1998).

**Cuadro 1.1** Enzimas de la ruta de los fosfoinosítidos identificadas en el núcleo de células vegetales.

| Enzima                      |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| Mio-inositol sintasa (MIPS) | Diacilglicerol cinasa (DAGK) |

|                                               |                                                    |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)            | Ácido fosfatídico cinasa (AFK)                     |
| Fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K)            | Inositol fosfato cinasa (IPK)                      |
| Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinasa (PIP5K) | Inositol-(1,3,4)-P <sub>3</sub> -5/6 cinasa (ITPK) |
| Fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC)     | Inositol-5-fosfatasa (5Ptasa)                      |

Dentro del núcleo de células vegetales la fosfatidilcolina es el fosfolípido con mayor concentración, seguido de la fosfatidiletanolamina, los fosfoinosítidos y la fosfatidilserina. Los fosfoinosítidos componen entre el 8 y el 15 % de total de los fosfolípidos en las distintas fracciones nucleares que se han medido en cebolla, tabaco, trigo. Las funciones del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el núcleo giran en torno a la generación del mismo en este compartimento celular por la acción de las PtdIns cinasas. Las PtdIns cinasas tipo I y II también se encuentran en las llamadas manchas nucleares. Estas manchas nucleares se encuentran en el nucleoplasma en donde el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ha sido identificado. Estas regiones están enriquecidas de pre-ARNm lo que sugiere que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> está involucrado en la maduración del pre-ARNm (Boronenkov *et al.*, 1998).

### 1.7.1 El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la síntesis de ADN

Tanto el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> nuclear como el membranal tienen la misma estructura, en cuanto a su composición en ácidos grasos, y son blanco de la fosfolipasa C. La reacción catalizada por la fosfolipasa C produce al diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>). Sin embargo, debido a que la concentración del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> es limitada, su re-síntesis es necesaria. Esta acción es catalizada por la PI(4)P5-cinasa a partir del PtdIns(4)P. El DAG es requerido para la activación de diferentes isoformas de la PKC en el núcleo. A su vez, la PKC modula el funcionamiento de la ADN polimerasa, la topoisomerasa y las histonas mediante fosforilaciones (D'Santos *et al.*, 1998). Por otro lado, el IP<sub>3</sub> participa en la homeostasis nuclear de calcio, la cual ha sido implicada en procesos fisiológicos



como la síntesis de ADN, la modulación de la transcripción, la apoptosis y en la condensación de la cromatina. Se ha reportado en cultivos de soya que la inhibición de la actividad de la PLC provoca una disminución en la síntesis de ADN de hasta un 30% debido a la reducción de la concentración de  $IP_3$ .

En respuesta al daño oxidativo, las células generan al  $PtdIns(5)P$ , al  $PtdIns(3,5)P_2$  o al  $PtdIns(3,4,5)P_3$ . La PI cinasa del tipo II y su sustrato el  $PtdIns(5)P$  ha sido ligada a vías de respuesta al estrés nuclear, ya que conecta al  $PtdIns(5)P$  y a la  $PtdInsP_2$  4-fosfatasa con el mediador de la respuesta al estrés p38 (Jones *et al.*, 2006). Esto se lleva a cabo de la siguiente manera, la PI cinasa tipo II es fosforilada por la proteína cinasa p38 (MAPK). Esta fosforilación inhibe a la  $PtdIns$  cinasa, resultando en la acumulación de  $PtdIns(5)P$ . Esta acumulación induce la translocación de la fosfatasa-4 al núcleo, generando al  $PtdIns(5)P$  al desfosforilar al  $PtdIns(4,5)P_2$ . Como consecuencia el aumento del  $PtdIns(5)P$  trasloca a la proteína ING2, la cual se acumula en la cromatina. La ING2 se asocia y modula la actividad de las acetilasas y desacetilasas de histonas, induciendo la apoptosis al acetilar a p53. Por lo tanto, la regulación en la acumulación del precursor del  $PtdIns(4,5)P_2$ , el  $PtdIns(5)P$ , vía la acción sinérgica de la fosfatasa-4 y la PI cinasa tipo II facilita la interacción de ING2 y p53 modulando la apoptosis (Zou *et al.*, 2007).

### 1.7.2 El $PtdIns(4,5)P_2$ y el procesamiento del ARN

Los fosfolípidos de inositol afectan el procesamiento del ARNm desde el momento de su transcripción hasta su exportación al citoplasma. Estudios *in vitro* demuestran que los fosfoinosítidos disminuyen la síntesis de ARNm mientras que otros fosfolípidos como la fosfatidilserina incrementan la síntesis (Manzoli *et al.*, 1981).

Dentro del núcleo también se ha establecido una interacción entre el extremo 3' del pre-ARN y el  $PtdIns(4,5)P_2$ . Como se mencionó, la  $PtdIns$  cinasa del tipo I y el  $PtdIns(4,5)P_2$  se han localizado en las manchas nucleares y se ha sugerido que interactúa con la polimerasa poli A Star-PAP regulando el procesamiento del pre-



mARN. La función que tiene el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en esta interacción es estimular la iniciación y la elongación en la poliadenilación, es decir, estimula la actividad de Star-PAP para incrementar el largo de la cola de poli A (Mellman *et al.*, 2008). La actividad de Star-PAP es específicamente regulada por el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> así como un número reducido de proteínas en el núcleo tales como la ING2, la histona H1, el complejo BAF, el factor de exportación nuclear Aly y los receptores nucleares SF-1 y LRH-1. El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se une a las histonas H1 y H3 disminuyendo la inhibición de la ARN polimerasa hasta en un 15% contribuyendo al despliegue del ADN y a la transcripción (Yu *et al.*, 1998). Los receptores SF-1 y LRH-1 requieren del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> para maximizar su actividad (Krylova *et al.*, 2005).

### 1.7.3 El PtdIns(4,5) y la cromatina

El funcionamiento de los fosfoinosítidos en el remodelamiento de la cromatina no se conoce sin embargo en plantas se ha descrito su efecto en la actividad de la enzima ATX1. Esta enzima es una histona trimetiltransferasa y su localización es afectada por los fosfoinosítidos principalmente por el PtdIns(5)P el cual aumenta en concentración a partir del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> o del PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

Una de las funciones del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el núcleo está ligada a la actina. La actina tanto G- como F- ha sido identificada como un componente central de la matriz nuclear (Rando *et al.*, 2000) y ha sido implicada en la transcripción, el remodelamiento de la cromatina, el procesamiento del pre-mARN y la regulación de factores de transcripción. En el citoplasma los fosfoinosítidos son reguladores claves en la dinámica de la actina, por lo que se especula que la actina nuclear se une a proteínas que a su vez interactúan con el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Vartiainen, 2008). Por ejemplo, la proteína profilina I componente de la organización de actina en el núcleo, es requerida para la síntesis del mARN y es regulada por el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Otros complejos como el BAF (Brahma related gene association factor) y el INO80 que contienen β-actina son regulados por PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> por lo cual el remodelamiento de la cromatina también es regulado por este fosfoinosítido. En otras palabras, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> puede estabilizar los complejos de actina en la

---

matriz nuclear y contribuir a la expresión de ciertos genes (Olave *et al.*, 2002).

#### **1.7.4 El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la respuesta al estrés**

Algunas de las enzimas nucleares involucradas en la ruta de síntesis de los fosfoinosítidos son importantes en la respuesta a estrés lo cual sugiere una cascada de señalizaciones en este compartimento celular.

La producción del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se incrementa hasta seis veces cuando la planta es expuesta a un estrés térmico, ya sea por choque térmico o por temperaturas alrededor de 40 °C durante 30 minutos. El incremento en los niveles del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> puede ser resultado de la activación de la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinasa o de la disminución del catabolismo del fosfolípido. Esta variación de temperatura afecta la dinámica de la membrana nuclear incrementando la asociación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> a esta.

#### **1.7.5 Posibles funciones del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>**

La mayoría de las funciones del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el núcleo no se encuentran vinculadas a la membrana nuclear, es decir, debe existir algún mecanismo que proteja las cadenas hidrofóbicas permitiendo un movimiento libre del fosfoinosítido dentro del núcleo. Un posible mecanismo de protección sería que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> forme estructuras con otros lípidos presentes en el núcleo como lo son la fosfatidilcolina (Hunt *et al.*, 2001). Otro posible mecanismo es que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se asocie a diversas proteínas que contengan una estructura tipo bolsillo en donde se una la región no polar del fosfolípido. Estas proteínas podrían moverse libremente a través del núcleo transportando al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> específicamente a donde sea requerido. Para levaduras se ha determinado la estructura de la proteína PITP Sec 14p la cual tiene un "bolsillo" para el fosfoinosítido (Sha *et al.*, 1998). La existencia de un sistema similar en plantas y animales proveerá la solución a la funcionalidad de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el núcleo apartado de la membrana nuclear.



---

## 1.8 Dominios de unión a fosfoinosítidos

En los últimos años se ha determinado que los fosfoinosítidos activan o regulan una amplia gama de proteínas mediante su unión a ellas. El mecanismo de unión aun no es del todo claro, sin embargo, se ha demostrado que residuos con carga positiva como la lisina o la arginina y otros tipos de residuos como la histidina, la leucina y la isoleucina interactúan con los fosfoinosítidos (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007).

Actualmente se cuenta con la cristalografía de dominios proteicos unidos a fosfoinosítidos. Dentro de esos se encuentra el dominio PH de distintas proteínas como la fosfolipasa C, el dominio ENTH de la epsina, el dominio en la región terminal NH<sub>2</sub> de la CALM, el dominio PTB de la proteína Dab1, el dominio PX y el dominio tubby de las proteínas p40phox y las cinasas IP33K e IP56K respectivamente. Al hacer una comparación de los dominios que se unen a los fosfoinosítidos se determinó que en la mayoría de los casos los sitios de unión tienen residuos con carga positiva entre los cuales se encuentra una lisina y una arginina. Entre estos aminoácidos de unión también se encuentra por lo menos uno que tenga un anillo aromático ya sea la histidina o la tirosina. La fenilalanina y el triptófano también han sido encontrados en los sitios de interacción pero en una menor cantidad. Adicionalmente otros aminoácidos como la asparagina y la serina están presentes en los sitios de unión. Por lo menos cinco de estos aminoácidos llevan a cabo la unión a los fosfoinosítidos de los cuales dos tienen carga positiva y uno tiene un anillo aromático (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007).

Algunos de los dominios de unión a fosfoinosítidos y ejemplos de las proteínas en las cuales se encuentran se puede observar en cuadro 1.2

| Dominio | Especificidad               | Ej. proteínas                 |
|---------|-----------------------------|-------------------------------|
| A/ENTH  | PtdIns(4)P                  | EpsinR                        |
|         | PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>   | Ent3p, Ent5p                  |
|         | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | AP180, CALM, epsin, HIP       |
| C2      | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | Synaptotagmin                 |
| FERM    | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | Ezrin, moesin, radixin, talin |
| FYVE    | PtdIns(3)P                  | EEA1, Hrs, SARA, PIKfyve      |
| GRAM    | PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>   | Myotubularin                  |
| PDZ     | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | Syntenin                      |
| PH      | PtdIns(4)P                  | FAPP1/2, OSBP                 |
|         | PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>   | AKT/PKB, TAPP1,2              |
|         | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | PLCδ1, dynamin                |
|         | PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> | BTK, AKT/PKB, ARNO, GRP1      |
| PHD     | PtdIns(5)P                  | ING2                          |
| PTB     | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | Dab1, ARH, SHC                |
|         | PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> | SHC                           |
| PX      | PtdIns(3)P                  | SNX2,3,7,13                   |
|         | PtdIns(5)P                  | SNX13                         |
|         | PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>   | p47PHOX                       |
|         | PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>   | Class II PI(3)kinase          |
|         | PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> | CISK                          |

**Cuadro 1.2** Dominios reportados de unión a fosfoinosítidos. En la primera columna se encuentran los nombres de los dominios que interactúan con los fosfoinosítidos. En la segunda columna se mencionan los fosfoinosítidos con los cuales interactúan. En la tercera columna se mencionan algunos ejemplos de proteínas que contienen estos dominios de interacción.

### 1.9 Interacción del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> con la fibrilarina de *Homo sapiens*

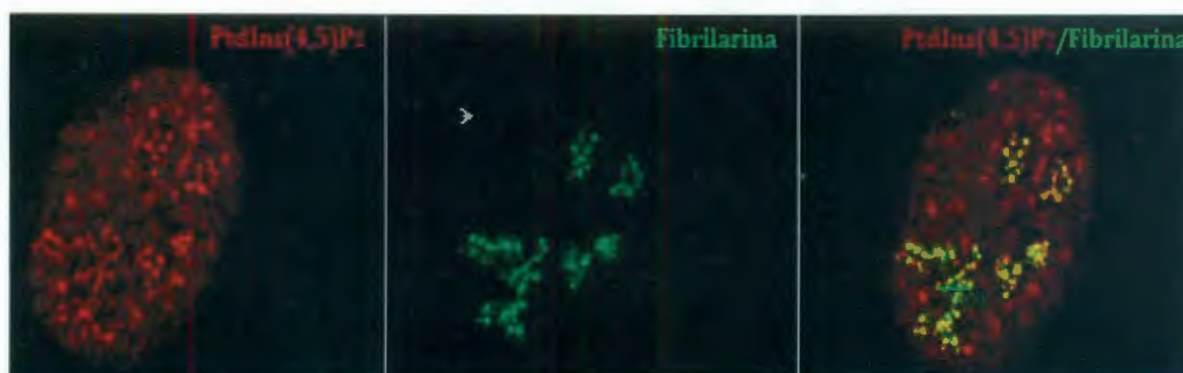
Actualmente no hay reportes que demuestren la interacción del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> con la fibrilarina de *A. thaliana*. De igual forma, no hay evidencia que ubique al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y a la fibrilarina en el nucléolo en plantas.

Para que las dos moléculas de estudio interactúen, en primera instancia es necesario que en algún momento o bajo alguna condición se ubiquen en un mismo compartimento. La fibrilarina es una de las proteínas de mayor concentración en el nucléolo, por lo tanto en caso de interacción, se debe ubicar al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en este compartimento.

Recientemente en el nucléolo de células HeLa se colocizó al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y a la



HsFib. Esto se logró mediante anticuerpos específicos contra el dominio PH, el cual interactúa con el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y anticuerpos específicos para la fibrilarina (Yildirim *et al.*, 2013) (Figura 1.8). Como se puede observar los puntos amarillos muestran la colocalización entre la fibrilarina y el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.



**Figura 1.8** Colocalización del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y de la fibrilarina en el nucléolo de células HeLa. En color rojo se observa al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> el cual se identificó mediante el anticuerpo específico para el dominio homólogo a pleckstrina utilizando un anticuerpo secundario con un fluoróforo (555 nm). La fibrilarina fue identificada mediante el anticuerpo específico y utilizando posteriormente un anticuerpo secundario (647 nm). En color amarillo se observa la colocalización del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la fibrilarina en regiones específicas del núcleo celular, las cuales corresponden a los nucléolos. Las células fueron tratadas con tritón a una concentración del 0.05%. Tomada de Yildirim *et al.*, 2013.

Una vez demostrado que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se ubica en el nucléolo con la fibrilarina, la siguiente pregunta a responder es si estas dos moléculas poseen la capacidad para interactuar. Esta pregunta se respondió mediante un ensayo fat-blot. Este ensayo es específico para determinar la interacción lípido-proteína. Con este ensayo se demostró que la HsFib interactúa con todos los fosfoinosítidos así como con el ácido fosfatídico y la fosfatidilserina (Yildirim *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta lo anterior es posible especular que los fosfoinosítidos y la fibrilarina también interactúan en células vegetales. Para demostrar esta teoría se utilizó la fibrilarina de *A. thaliana*.

---

## Justificación

Dentro del nucléolo de las plantas se lleva a cabo la síntesis de los ARNr's 25S, 26S, 18S y 5S, Para completar la maduración de estos ARN's es necesario que sean procesados. Los procesos de maduración incluyen cortes en su secuencia además de modificaciones postranscripcionales principalmente metilaciones y pseudirilaciones. La metilación del ARNr la lleva a cabo la fibrilarina. La fibrilarina en complejo con otras proteínas y con un ARN guía complementario al ARNr a modificar es esencial para el desarrollo del organismo. La fibrilarina tiene actividad de metiltransferasa siendo esta función la mejor caracterizada sin embargo el hecho que se tenga evidencia de su participación en procesos como el desarrollo celular, la formación del nucléolo y la maduración de los ribosomas, sugiere el planteamiento de nuevas hipótesis acerca de su actividad.

Además de proteínas dentro del núcleo y del nucléolo se pueden encontrar a los fosfoinosítidos. En el núcleo, los fosfoinosítidos están involucrados en distintas funciones como son la regulación de la polimerasa II, el procesamiento del ARNm, el rompimiento de la envoltura nuclear y en la formación de la matriz nuclear. Dentro del nucléolo se ha determinado que los fosfoinosítidos, en particular el  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  regula la actividad de la polimerasa I.

Por otro lado se ha determinado que la HsFib interactúa con los fosfoinosítidos así como con el ácido fosfatídico (AF) y con la fosfatidilserina (FS), sin embargo aún no se sabe cuál es la importancia funcional de cada fosfoinosítido. A la fecha no se ha descrito la unión entre la fibrilarina de *A. thaliana* y los fosfoinosítidos, por lo que este trabajo busca definir si existe alguna región de interacción entre estas dos moléculas.



## **Hipótesis**

Si la fibrilarina es una proteína conservada y su interacción con el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ha sido demostrada en *H. sapiens*, es probable que en la secuencia de la fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* existe al menos un dominio específico de unión con los fosfoinosítidos.

## **Objetivo general**

Determinar si la fibrilarina de *A. thaliana* interactúa con los fosfoinosítidos.

## **Objetivos específicos**

- Identificar si el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la fibrilarina colocalizan en el nucléolo de células de *A. thaliana*.
- Obtener la fibrilarina de *A. thaliana* recombinante.
- Determinar si la fibrilarina de *A. thaliana* interactúa con los fosfoinosítidos *in vitro*.
- Definir el dominio de interacción de la fibrilarina de *A. thaliana* con los fosfoinosítidos.

---

**Estrategia experimental**

**Figura 1.9** Estrategia experimental general utilizada para el cumplimiento de los objetivos.



---

**Bibliografía**

- Aittaleb M., Rashid R., Chen Q., Palmer J.R., Daniels C.J. and Li H. (2003) Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nat. Struct. Biol.* 10, 256-263.
- Amin M.A., Matsunaga S., Ma N., Takata H., Yokoyama M., Uchiyama S., and Fukui K. (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 320-326.
- Amiri K.A. (1994) Fibrillarin-like proteins occur in the domain. *Archea. J. Bacteriol.*, 176, 2124-2127.
- Anderson R.A., Boronenkov I.V., Doughman S.D., Kunz J. and Loijens J.C. (1999). Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J. Biol. Chem.* 274, 9907-9910.
- Angelier N., Tramier M., Louvet E., Coppey-Moisán M., Savino T.M., De Mey J.R., and Hernandez-Verdun D. (2005). Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 2862-2871.
- Aris, J.P. and Blobel, G. (1991) cADN cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 931-935.
- Balla T. (2005) Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein—lipid and protein—protein interactions. *J. Cell Sci.* 118, 2093-2104.
- Barneche F., Steinmetz F., and Echeverría M. (2000). Fibrillarin genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar ARN involved in ribosomal ARN methylation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol.*

---

Chem. 275, 27212-27220.

- Bernfield M., Götte M., Park P.W., Reizes O., Fitzgerald M.L., Lincecum J., and Zako M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729-777.
- Beven A.F., Simpson G.G., Brown J.W.S., and Shaw P.J. (1995). The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. *J. Cell Sci.* 108, 509-518
- Biggiogera M., Malatesta M., Abolhassani-Dadras, S., Amalric F., Rothblum L. I., and Fakan S. (2001). Revealing the unseen: The organizer region of the nucleolus. *J. Cell Sci.* 114, 3199-3205.
- Bohmann, K., Ferreira J.A. and Lamond A.I. (1995). Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J. Cell Biol.* 131, 817-831.
- Boronenkov I.V., Loijens J.C., Umeda M. and Anderson R.A. (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell.* 9, 3547-3560.
- Cahill N.M., Friend K., Speckmann W., Li Z.W., Terns R.M and Steitz J.A. (2002). Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP. *EMBO J.* 21, 3816-3828.
- Cavaille J., Nicoloso M. and Bachellerie J.P. (1996) Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 383, 732-735.
- Chen D., Dundr M., Wang C., Leung A., Lamond A., Misteli T. and Huang S. (2005). Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J. Cell Biol.* 168, 41-54.



- Chen H.K., Pai C.Y., Huang J.Y., and Yeh N.H. (1999). Human Nopp140, which interacts with ARN polymerase I: implications for rARN gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8536-8546.
- Choquette D., Hakim G., Filoteo A.G., Plishker G.A., Bostwick J.R. and Penniston J.T. (1984). Regulation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases by lipids of the phosphatidylinositol cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 908-915.
- Christensen M.E., Beyer A.L., Walker B. and LeStourgeon W.M. (1977). Identification of N'-N'-dimethylarginine in a nuclear protein from the lower eukaryote *Physarum polycephalum* homologous to the major proteins of mammalian 40S ribonucleoprotein particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 621-629.
- Cockell, M.M. and Gasser S.M. (1999). The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Curr. Biol.* 9, 575-576.
- D'Santos C.S., Clarke J.H. and Divecha N. (1998). Phospholipid signalling in the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 201-232.
- Dechampsme A. M., Koroleva O., Leger-Silvestre I., Gas N. and Camier, S. (1999). Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre- rRNA processing pathway. *J. Cell Biol.* 145, 1369-1380.
- Di Paolo G., Pellegrini L., Letinic K., Cestra G., Zoncu R., Voronov S., Chang S., and DiMario P.J. (2004). Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int. Rev. Cytol.* 239, 99-178.
- Divecha N., Banfic H. and Irvine R.F. (1991). The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *Embo J* 10,3207-3214.

- 
- Doughman R.L., Firestone A.J. and Anderson R.A. (2003) Phosphatidylinositol Phosphate Kinases Put PI4,5P2 in Its Place. *J. Membrane Biol.* 194, 77-89.
- Dunbar D.A., Wormsley S., Lowe T.M. and Baserga S.J. (2000). Fibrillarin-associated box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. Sequence conservation and implications for 2-O-ribose methylation of rRNA. *J. Biol. Chem.*, 275, 14767-14776.
- Dundr M. and Olson M.O. (1998). Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus derived foci during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 9, 2407-2422.
- Eliceiri, G. L. (1999). Small nucleolar RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 22-31.
- Fatica A. and Tollervey D. (2002). Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 313-318.
- Fomproix N., Gébrane-Younès J. and Hernandez-Verdun D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *J. Cell Sci.* 111, 359-372.
- Fontana F. (1781). "Traite sur le Venin de la Viper, sur les Poisons Americains, sur le Laurier-Cerise et sur quelques autres Poisons Vegetaux," Gibelin, Florence.
- Gaidarov I. and Keen J.H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 146, 755-764.
- Garcia S.N. and Pillus L. (1999). Net results of nucleolar dynamics. *Cell.* 97, 825-828.
- Gautier T., Dauphin-Villemant C., Andre C., Masson C., Arnoult J. and Hernandez-Verdun D. (1992). Identification and characterization of a new set of nucleolar ribo-nucleoproteins which line the chromosomes during mitosis.
-



---

Exp. Cell Res. 200, 5-15.

- Godi A., Di Campli A., Konstantakopoulos A., Di Tullio G., Alessi D.R., Kular G.S., Daniele T., Marra P., Lucocq J.M. and De Matteis M.A. (2004) FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.*, 6, 393-404.
- Godi A., Pertile P., Meyers R., Marra P., Di Tullio G., Lurisci C., Lùini A., Corda D. and De Matteis M.A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280-287.
- Gozani O., Karuman P., Jones D.R., Ivanov D., Cha J., Lugovskoy A.A., Baird C.L., Zhu H., Field S.J., Lessnick S.L., Villasenor J., Mehrotra B., Chen J., Rao V.R., Brugge J.S., Ferguson C.G., Payrastre B., Myszka D.G., Cantley L.C., Wagner G., Divecha N., Prestwich G.D. and Yuan J. (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.
- Hadjiolov AA (1985) The nucleolus and ribosome biosynthesis. In M Alfert, W Bermann, L Goldstein, KR Porter, P Sitte, eds, *Cell Biology Monographs*, Vol 12. Springer Verlag, New York, pp 1-268
- Handwerger K.E., Cordero J.A. and Gall J.G. (2005). Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low density, sponge like structure. *Mol. Biol. Cell* 16, 202-211.
- Henras A. K., Dez C. and Henry Y. (2004). RNA structure and function in C/D and H/ACA snoRNPs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 335-343.
- Herr A.J., Jensen M.B., Dalmay T. and Baulcombe D.C. (2005). ARN polymerase IV directs silencing of endogenous ADN. *Science* 308, 118-120.
- Hilgemann D. W., Feng S. and Nasuhoglu C. (2001) The complex and intriguing lives of PIP 2 with ion channels and transporters. *Sci. STKE* RE19.

- Ho C.Y., Alghamdi T.A. and Botelho R.J. (2012). Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphate: No Longer the Poor PIP2. *Traffic* 13, 1–8.
- Hunt A.N., Clark G.T., Attard G.S. and Postle A.D. (2001). Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and collocated with CDP-choline pathway enzymes. *J Biol Chem* 276, 8492-8499.
- Irvine R. F. (2002). Nuclear lipid signaling. *Sci STKE* 150, re13
- Irvine R.F. and Schell M.J. (2001) Back in the water: The return of the inositol phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 327-338.
- Ishihara H., Shibasaki Y., Kizuki N., Katagiri H., Yazaki Y., Asano T. and Oka Y. (1996). Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 23611-23614
- Jacobson M.R. and Pederson T. (1998). A 7-methylguanosine cap commits U3 and U8 small nuclear RNAs to the nucleolar localization pathway. *Nucleic Acids Res.* 26, 756-760.
- Jones D.R., Bultsma Y., Keune W.J., Halstead J.R., Elouarrat D., Mohammed S., Heck A.J., D'Santos C.S., and Divecha N. (2006). Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an in vivo role for PIP4Kbeta. *Mol. Cell* 23, 685-695.
- Jordan E.G. and McGovern J.H. (1981). The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured diploid human fibroblasts (strain MRC-5). *J. Cell Sci.* 52, 373-389.
- Keqiong Y. and Ru J. (2009). Structural organization of box C/D ARN-guided ARN methyltransferase *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13808-13813.
- Kim S., MacFarlane S., Kalinina N.O., Rakitina D.V., Ryabov E.V., Gillespie T.,





- Haupt S., Brown J.W. and Taliany M. (2007). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *PNAS* 104, 26, 11115-11120.
- Kiss-Laszlo Z. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.
- Klein J. and Grummt I. (1999). Cell cycle dependent regulation of RNA polymerase I transcription: The nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6096-6101.
- Krylova I.N., Sablin E.P., Moore J, Xu R.X., Waitt G.M., MacKay J.A., Juzumiene D., Bynum J.M., Madauss K., Montana V., Lebedeva L., Suzawa M., Williams J.D., Williams S.P., Guy R.K., Thornton J.W., Fletterick R.J., Willson T.M. and Ingraham H.A. (2005). Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120, 343-355.
- Kyoung T.P., Min J.Y., Ying S.L., Bong J.S., Moo J.C., Inhwan H. and Daeyoung S (2003) Molecular Cloning and Targeting of a Fibrillarin Homolog from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 123, 51-58.
- Lafontaine D. L. and Tollervey D. (2000) Synthesis and Assembly of the Box C+D Small Nucleolar RNPs. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2650-2659
- Lafontaine D.L., Bousquet-Antonelli C., Henry Y., Caizergues-Ferrer M and Tollervey D. (1998). The box H + ACA snoARNs carry Cbf5b, the putative rARN pseudouridine synthase. *Genes Dev.* 12, 527-537.
- Lapeyre, B. (1990) Molecular cloning of *Xenopus* fibrillarin, a conserved U3 small nuclear ribonucleoprotein recognized by antisera from humans with autoimmune disease. *Mol. Cell. Biol.* 10, 430-434.
- Lassing I. and Lindberg U. (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin, *Nature* 314, 472-474.



- Lechertier T., Grob A., Hernandez-Verdun D. and Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Exp. Cell Res.* 315, 928-942.
- Lemmon M. A. (2003) Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4, 201-213.
- Leung A.K., Andersen J.S., Mann M., and Lamond A.L. (2003). Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem. J.* 376, 553-569.
- Lischwe M. A, Ochs R. L., Reddy R., Cook R.G., Yeoman L.C., Tan E.M., Reichlin M. and Busch H. (1985). Purification and Partial Characterization of a Nucleolar Scleroderma Antigen (Mr = 34,000; PI, 8.5) Rich in NG, NG-Dimethylarginine. *J. Biol. Chem.* 15, 14304-14310.
- Liscovitch M., Chalifa V., Pertile P., Chen C.S. and Cantley L.C. (1994). Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D, *J. Biol. Chem.* 269, 21403-21406.
- Manzoli F.A., Capitani S., Mazzotti G., Barnabei O. and Maraldi N.M. (1981). Role of chromatin phospholipids on template availability and ultrastructure of isolated nuclei. *Adv. Enzyme Regul.* 20, 247-262.
- Manzoli, F. A., Maraldi, N. M., Cocco, L., Capitani, S. and Facchini, A. (1977). Chromatin phospholipids in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Cancer Res.* 37, 843-849.
- Matera A.G., Terns R.M. and Terns M.P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Biol.* 8, 209-20.
- Mattick J. S. and Makunin I. V. (2005). Small regulatory ARNs in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 14, 121-132.
- Maxwell E.S. and Fournier M.J. (1995) The small nucleolar ARNs. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 897-034.

- McLaughlin S., Wang J., Gambhir A. and Murray D. (2002). PI4,5P2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 151-175.
- Mellman D.L., Gonzales M.L., Song C., Barlow C.A., Wang P., Kendzierski C., and Anderson R.A. (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature*. 451, 1013-1017.
- Newton K., Petfalski E., Tollervey D. and Cáceres J.F. (2003) Fibrillarin Is Essential for Early Development and Required for Accumulation of an Intron-Encoded Small Nucleolar RNA in the Mouse. *Mol. Cell Biol.* 23, 8519-8527.
- Ochs R.L., Lischwe M.A., Spohn W.H. and Busch H. (1985) Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol. Cell* 54, 123-134.
- Olave I.A., Reck-Peterson S.L. and Crabtree G.R. (2002). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 755-781
- Olson M.O.J., Dundr M., and Szebeni A. (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10, 189-96
- Orth J.D., Krueger E.W., Cao H. and McNiven M.A. (2002). The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 167-172.
- Osborne S.L., Thomas C.L., Gschmeissner S. and Schiavo G. (2001) Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mARN splicing. *J. Cell. Sci.* 114, 2501-2511.
- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingova, H., Kysela K., Kahle, M., Zentgraf H., Hofmann W. A., de Lanerolle P., Hozak P. and Grummt, I. (2004). Nuclear actin and myosin I are required for ARN polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 6, 1165-1172.



- Rakitina D.V., Taliansky M., Brown J.W., and Kalinina N.O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research* 1-12.
- Rameh L.E., Tolias K.F., Duckworth B.C. and Cantley L.C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*. 390, 192-196.
- Randazzo P. A. and Kahn R. A. (1994) GTP hydrolysis by ADP-ribosylation factor is dependent on both an ADP-ribosylation factor. GTPase-activating protein and acid phospholipids, *J. Biol. Chem.* 269, 10758-10763.
- Rando O.J., Zhao K. and Crabtree G.R. (2000). Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 10, 92-97.
- Raska, I. (2003). Oldies but goldies: Searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13, 517-525.
- Raska, I. (2004). Searching for active ribosomal genes. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 35, 23-56.
- Raué, H. A. (2004). Pre-ribosome ARN processing and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. The machine that makes the machine. In "The Nucleolus" (M. O. J. Olson, Ed.), p. 199-222. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Reichow S.L., Hamma T., Ferré-D'Amaré A.R. and Varani G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 35, 1452-1464.
- Rosenhouse-Dantsker A. and Logothetis D.E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Eur. J. Physiol.* 455, 45-53
- Saido T.C., Suzuki H., Yamazaki H., Tanoue K. and Suzuki, K. (1993). In situ capture of  $\mu$ -calpain activation in platelets, *J. Biol. Chem.* 268, 7422-7426.

- Sasaki T., Sasaki J., Sakai T., Takasuga S. and Suzuki A. (2007). The Physiology of Phosphoinositides. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1599-1604.
- Schimmang T., Tollervey D., Kern H., Frank R. and Hurt E.C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J.* 8, 4015-4024.
- Sha B., Phillips S.E., Bankaitis V.A. and Luo M. (1998) Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature.* 391, 506-510
- Sleeman, J. E. and Lamond, A. I. (1999). Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.* 9, 1065-1074.
- Staub E., Fiziev P., Rosenthal A. and Hinzmann B. (2004). Insights into the evolution of the nucleolus by an analysis of its protein domain repertoire. *Bioessays.* 26, 567-81.
- Steinberg S.F. (2008). Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function, *Physiol. Rev.* 88,1341-1378.
- Stephens L., McGregor A. and Hawkins P., (2000) Phosphoinositide 3-kinases: Regulation by cell-surface receptors and function of 3-phosphorylated lipids. *Frontiers in Molecular Biology*, 27, 32-108.
- Thiry M., (2009) Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and mitosis. *Histochem. Cell Biol.* 132(2), 129-40.
- Thoru P. and Joan C. (2000). The Nucleolus and the Four Ribonucleoproteins of Translation. *JCB.* 148, 1091-1095
- Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H. and Hurt E.C. (1993). Temperature sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rARN processing, pre-rARN methylation, and ribosome assembly. *Cell.* 72, 443-



---

457.

- Turley, S.J. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of U3 snoARN-associated mouse fibrillarin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1216, 119-122.
- Valentin, G. (1839). *Repertorium für Anatomie und Physiologie* 4, 1–275. Verlag von Huber und Comp. Bern, St. Gallen.
- Van Hooser, A.A., Yuh P. and Heald R. (2005). The perichromosomal layer. *Chromosoma*. 114, 377-388
- Vanhaesebroek B., Leervers S., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J. and Waterfield M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 535–602.
- Vartiainen M.K. (2008) Nuclear actin dynamics--from form to function. *FEBS Lett* 582, 2033–2040.
- Vidovic I., Nottrott S., Hartmuth K., Lührmann R. and Ficner R. (2000). Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol. Cell* 6, 1331-1342.
- Warner, J.R. (1990) The nucleolus and ribosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2, 521-527.
- Watkins N.J., Segault V., Charpentier B., Nottrott S., Fabrizio P., Bachi A., Wilm M., Rosbash M., Branlant C. and Luhrmann R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* 103, 457-466.
- Yildirim S., Castano E., Sobol M., Philimonenko V., Dzajak R., Venit T. and Hozák P. (2013) Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *J. Cell Sci.* 126, 2730-9

- 
- Yonezawa N., Homma Y., Yahara I., Sakai H. and Nishida E. (1991). A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin, *J. Biol. Chem.* 266, 17218-17221.
- Yu H., Fukami K., Watanabe Y., Ozaki C. and Takenawa T. (1998). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1. *Eur. J. Biochem.* 251, 281-287.
- Zou J., Marjanovic J., Kisseleva M.V., Wilson M. and Majerus P.W. (2007). Type I phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase regulates stress-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16834-16839.



---

## CAPITULO II

### Materiales y Métodos

#### 2.1 Identificación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo de células de *Arabidopsis thaliana*

La identificación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo se realizó utilizando callos de *A. thaliana*. Inicialmente los callos fueron fijados en FAA (Formaldehído 10%, ácido acético 5% y etanol 50 %, v/v) durante 24 horas. Posteriormente los callos fueron deshidratados con una serie de lavados en etanol a diferentes porcentajes (100%, 100%, 95%, 70%, 30%, v/v) por una hora. Al finalizar los lavados se incubaron en butanol durante 24 horas. Al paso de las 24 horas la solución de butanol se saturó con parafina y se hicieron cambios de ésta cuatro veces cada 12 horas a 65°C. Posteriormente los callos se colocaron en el molde de plástico para histología con parafina y se incubaron 10 minutos a 65°C. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas en silica. A las 24 horas la muestra en parafina sólida se sacó del molde y se hicieron cortes de 3 y 4 micras.

Para identificar al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en los callos éstos fueron desparafinados con cuatro lavados en xileno grado biología molecular por dos minutos cada uno seguido en dos lavados en etanol absoluto durante un minuto, un lavado en etanol al 95 % v/v durante 30 segundos, un lavado en etanol al 70 % v/v durante 45 segundos y un último lavado en agua durante un minuto.

Una vez desparafinados los callos se incubaron con el amortiguador de fosfato salino (PBS) con 0.05% de tritón durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario específico para la fibrilarina de humanos y el anticuerpo primario para el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durante 12 horas a 4°C. El anticuerpo para la fibrilarina es de isotipo IgG de conejo y se utilizó a una dilución de 1:400. El anticuerpo para el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> es de isotipo IgM de ratón y se utilizó a una dilución de 1:200. Posteriormente los callos fueron lavados tres veces con PBST al 0.05% y se incubaron durante dos horas con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo para la fibrilarina y anti IgM de ratón para el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> a una dilución

1:400 a temperatura ambiente y en oscuridad. Estos anticuerpos llevan unido un fluoróforo que al excitarse bajo el espectro de luz infrarroja entre 600 y 800 nm emiten la señal a detectar. Posteriormente los callos se lavaron nuevamente tres veces con PBST y se incubaron con DAPI/MoWIoL a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 horas.

Por último, los callos fueron analizados mediante microscopia confocal de fluorescencia utilizando el microscopio Leica DM 6000B (LEICA TCS SP5 AOBS tándem, Germany) a 100X (NA 1.4) con el objetivo de inmersión.

## 2.2 Diseño de iniciadores

Los iniciadores para amplificar la secuencia de AtFib2 fueron diseñados en base a la secuencia cds, que se encuentra en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) con número de acceso NM\_118695.3. Los iniciadores y la longitud de amplicones se describen en el anexo I.

Para amplificar los dominios de AtFib2 se diseñaron iniciadores a partir del vector pet15b+AtFib2 (anexo I)

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo con la herramienta "primer designing tool" ubicada en el sitio web del NCBI

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=3702&INPUT\\_SEQUENCE=NM\\_124626.4&LINK\\_LOC=nucore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=3702&INPUT_SEQUENCE=NM_124626.4&LINK_LOC=nucore)).

A cada iniciador dirección 5'-3' de AtFib2 y de los dominios se le adicionó la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI, así mismo, a los iniciadores dirección 3'-5' se les adicionó la secuencia de reconocimiento de la enzima BamHI (anexo I).

## 2.3 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizaron plántulas de *A. thaliana* con un promedio



de 15 días de edad, cultivadas en tierra. Se utilizó el paquete comercial de extracción RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland 20874). Este paquete está basado en la lisis celular con sales de tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). Seguido a la lisis se adiciona etanol para limpiar el lisado y crear las condiciones adecuadas para la unión selectiva del ARN a la columna de donde posteriormente será eluido con agua.

## 2.4 Obtención del ADNc y amplificación de la secuencia de AtFib2

La conversión de ARN a cADN se realizó con el paquete comercial SuperScript™ One-Step RT-PCR for long templates (Invitrogen, cat. No. 11922-010, Carlsbad, CA). Este sistema está basado en una mezcla de la taq ADN polimerasa y la enzima super-script RT. La actividad de la taq polimerasa es nula a temperatura ambiente y menor a 60 °C, sin embargo, es activa a una temperatura de 94 °C y esto ocurre al elevar la temperatura para desnaturalizar la cadena híbrida de ARN-ADNc. La síntesis de ADNc la lleva a cabo la enzima superscript RT a una temperatura óptima de 50° C durante 30 minutos. A partir del ADNc se amplificó la secuencia de AtFib2 bajo las siguientes concentraciones: dNTP's 0.3 µM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, iniciadores (10 µM) 0.2 µM, taq ADN polimerasa 0.01 U/µl con un templado de ADN de 50 ng/µl y a las condiciones de (95°C\_5min ((95°C\_1 min, 60°C\_1 min, 72°C\_1min) x30) 72°C\_5min).

## 2.5 Clonación de AtFib2

La secuencia de AtFib2 fue ligada al vector pGEM-T Easy vector (3015bp) de promega (anexo II) (5 µl del amortiguador de reacción 2X, 1 µl del vector pGEM-T Easy vector (50 ng), 1 µl del producto de PCR, 1 µl de la T4 ADN ligasa (3 u/µl), 2 µl de agua) para posteriormente transformar células competentes (Cohen *et al.*, 1987) de *E. coli* cepa DH5α (anexo III) las cuales fueron sembradas por extensión con varilla en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C durante 14 horas. Para corroborar que la secuencia de AtFib2 fue correctamente ligada al vector se seleccionaron colonias de la caja petri y se transfirieron a un tubo con 3 ml de medio LB con ampicilina, se incubaron a 37°C

durante 12 horas con agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, se hizo la extracción del vector (Birnboim y Doly, 1979).

## 2.6 Sub-Clonación de AtFib2

La subclonación se llevó a cabo en el vector pET15b (5708 pb) de Novagen (anexo V). El vector pGEM-AtFib2 fue digerido con las enzimas de restricción NdeI y BamHI liberando así la secuencia de AtFib2. Previo a la sub-clonación el fragmento de ADN liberado de pGEM fue purificado. Por otro lado, el vector de expresión pET15b fue digerido con las mismas enzimas de restricción. Con la secuencia de AtFib2 y el vector pET15b se llevó a cabo la reacción de ligación (1 µl de T4 ADN ligasa BioLabs, 1 µl del amortiguador de reacción 10X, 2 µl del vector pET15b, 5 µl del ADN de AtFib, 1 µl de agua). Una vez ligado el vector fue clonado en células competentes (Cohen *et al.*, 1972) de *E. coli* cepa BL21 para la expresión de la proteína.

## 2.7 Amplificación de los dominios de AtFib2

A partir del vector pET15b+AtFib2 se amplificó la secuencia de los dominios para posteriormente clonarlos y subclonarlos generando así los vectores pET15b+GB, pET15b+R-α, pET15b+GAR, pET15b+BCO, pET15b+R, pET15b+α-hélice bajo las siguientes concentraciones: dNTP's 200 µM, MgSO<sub>4</sub> 1.5 mM, iniciadores 0.5 µM, taq ADN polimerasa 0.02 U/µl con un templado de ADN de 10 ng/µl y a las condiciones de (95°C\_30 s ((95°C\_1 s, 66°C\_30 s, 72°C\_4 min) x30)72°C\_10 min).

## 2.8 Expresión de la AtFib2

A partir de células BL21 transformadas (Cohen *et al.*, 1987) con el vector pET15+AtFib2 se inició un cultivo durante 14 horas a 25°C con agitación constante de 200 rpm en 50 ml de medio LB con ampicilina. Posteriormente se escaló 0.3 L de medio LB/amp y se incubó a 25°C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una DO de 0.6. Al alcanzar la DO adecuada se adicionó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M para una concentración final de 1 mM y se incubó



durante cinco horas a 25 °C con agitación constante de 200 rpm.

Por otro lado, se expresó el dominio homólogo a pleckstrina (PH) de la PLC- $\delta$ 1. A partir de células BL21 transformadas con el vector pGEX+PH se inició un cultivo durante 12 horas a 37 °C con agitación constante de 200 rpm en 50 ml de medio LB con ampicilina. Posteriormente se escaló a 0.3 L de medio LB/amp y se incubó a 37 °C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una DO de 0.6. Al alcanzar la DO adecuada se adicionó IPTG 1 M para una concentración final de 1 mM y se incubó durante dos horas a 37 °C con agitación constante de 200 rpm.

La expresión de los dominios se llevó a cabo de la misma a 25 °C durante dos horas y con una concentración final de IPTG de 1mM.

## **2.9 Extracción y purificación de AtFib2**

El cultivo de bacterias en inducción fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos. Las bacterias fueron resuspendidas en 30 ml de amortiguador de extracción y lavado (300 mM NaCl, 10% glicerol, 25 mM tris-HCl pH 8, 20 mM imidazol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM AEBSF, 0.1% tritón). Posteriormente fueron sonicadas en hielo por periodos cortos de tiempo hasta perder por completo la viscosidad. Se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm durante 10 min a 4 °C.

La purificación se llevó a cabo de la fracción no soluble. Esta fracción fue lavada dos veces en el amortiguador que contenía 5mM de imidazol, 0.5 M de NaCl, 20 mM de NaHPO<sub>4</sub>, 0.5 % de tritón (v/v), pH 7.4. Se centrifugó nuevamente a 17 400 g por 15 minutos. Posteriormente, se resuspendió en el amortiguador que contenía 8 M de urea, 0.5 M de NaCl 20 mM de NaHPO<sub>4</sub>, pH 8 y se sonicó. Se centrifugó nuevamente a 17 400 g por 15 minutos.

El extracto total se pasó a través de una columna que contenía 300  $\mu$ l de la resina Q-Ni. Posteriormente, la columna se lavó con el amortiguador que contenía 10mM de imidazol, 8 M de urea 0.5 M de NaCl, 20 mM de NaHPO<sub>4</sub>, pH 8. Posteriormente se hicieron lavados con el mismo amortiguador pero con concentraciones de urea que disminuían en 1M cada ocasión hasta retirarla por completo. Posteriormente

se hizo la elución con el amortiguador que contenía 300mM de imidazol, 0.5 M de NaCl, 20 mM de NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.4

La extracción y purificación se llevó a cabo de la misma forma para todos los dominios expresados.

## 2.10 Inmunodetección de la AtFib2

Para confirmar que la proteína purificada era AtFib2 se hizo un gel de poliacrilamida tipo SDS-PAGE al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 150 mA durante 40 minutos. Posteriormente la membrana fue incubada en PBST con 5% de leche (p/v) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBST y se incubó con el anticuerpo primario durante 12 horas a 4 °C. Al paso de las 12 horas se lavó nuevamente tres veces con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente. Terminando la incubación con el anticuerpo secundario la membrana se lavó nuevamente tres veces para ser revelada.

Para identificar a la AtFib2 se utilizó el anticuerpo primario H-140 de la compañía Santa Cruz Biotechnology, INC. Este anticuerpo es policlonal y específico para la fibrilarina de humanos, el cual reconoce la secuencia que abarca desde el aminoácido 61 al 200. Es de isotipo conejo tipo IgG y se utilizó a una dilución 1:2000. El anticuerpo secundario fue el IRDye 800 anti-IgG conejo. El anticuerpo secundario esta acoplado a un fluoróforo, el cual es excitado a una longitud de onda de 800 nm para poder revelar la presencia de la proteína. Las membranas fueron reveladas en el equipo ODYSSEY de la empresa LI-COR.

Para identificar a los dominios se utilizó el anticuerpo primario específico para la etiqueta de histidinas. Este anticuerpo es monoclonal isotipo IgG1 de ratón. Se utilizó en una dilución de 1/1000. El anticuerpo secundario lleva unido un fluoróforo el cual es excitado a una longitud de onda de 800 nm para poder revelar la presencia de la proteína. Las membranas fueron reveladas en el equipo ODYSSEY de la empresa LI-COR.



---

### 2.11 Interacción de AtFib2 y sus dominios con los fosfoinosítidos

Para determinar la unión de las proteínas recombinantes a los fosfoinosítidos se llevó a cabo el ensayo fat-blot (Dowler *et al.*, 2002) utilizando las membranas PIP-Strips de la compañía Echelon. Estas membranas tienen unidas una concentración de 100 pmol de diferentes fosfolípidos.

Inicialmente, la membrana fue bloqueada con BSA al 3% en PBST durante 1 hora. Después del bloqueo se lavó 3 veces con PBST. Posteriormente se agregó la AtFib2 diluida en PBST a una concentración final de 1.53 pmol y se incubó durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente se lavó la membrana con PBST tres veces y se incubó con el anticuerpo primario H-140 durante 14 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se lavó nuevamente tres veces con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario IRDye 800 anti-IgG conejo. La membrana fue lavada nuevamente y revelada.

---

**Bibliografía**

Birnboim H. C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid. Res. 7, 1513-23.

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-159.

Cohen S.N., Chang A.C.Y., and Hsu I. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 2110-2114.

Dowler S., Kular G., and Alessi D.R. (2002) Protein lipid overlay assay. Sci STKE 129, 6

Ni-NTA Agarose Purification of 6xHis-tagged Proteins from *E. coli* under Native Conditions. Qiagen, Sample and assay technologies. Venlo, Netherlands 2011

pET-15b Vector. Merck Millipore. Darmstadt, German. Cat number: 69661

pGEM<sup>®</sup> -T and pGEM<sup>®</sup> -T Easy Vector Systems. Promega. Madison, WI, USA 2010. Cat number: A3610.

SuperScript<sup>®</sup> One-Step RT-PCR for Long Templates. Invitrogen life technologies. Carlsbad, CA, USA 2010. Cat number: 1922-010



---

## CAPITULO III

### Resultados

#### 3.1 Similitud entre fibrilarinas

Para determinar las diferencias en la estructura primaria de las proteínas y las regiones conservadas que pudieran ser sitios de interacción con los fosfoinosítidos se determinó el porcentaje de similitud entre la HsFib y las fibrilarinas de *A. thaliana*. Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las fibrilarinas con el software en línea de libre acceso clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se determinó que la AtFib1 y la AtFib2 tienen una similitud del 88%. Así mismo AtFib1 y AtFib2 tienen una similitud del 70% con la HsFib. De igual forma se determinó la similitud entre los diferentes dominios de las fibrilarinas. Entre la AtFib1 y la AtFib2 se encontró que la similitud entre los dominios es decreciente iniciando con el dominio R>BCO> $\alpha$ -hélice>GAR. El dominio R tiene una similitud del 100%, el dominio BCO tiene una similitud del 93%, el dominio alfa tiene una similitud del 89% y el dominio GAR tiene una similitud del 59% (figura 3.1)

Por otra lado cada uno de los dominios de las fibrilarinas de *A. thaliana* comparado con la HsFib fue decreciente en el orden R> $\alpha$ -hélice>BCO>GAR (figura 3.1).

En general el dominio que tiene una mayor similitud entre las fibrilarinas es el R con un 86%. Este resultado se esperaba debido a que en este dominio se encuentra presente una secuencia de reconocimiento a ARN conservada entre especies.

|        |                                                                                                                     |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| AtFib1 | M E V - - - - L A G G C F V S D N R T P Q S F S S D I P S A                                                         | 51  |
| AtFib2 | L G S G S G R A Y S A D - - I S M G S G F D R S P                                                                   | 57  |
| HsFib  | K G F S P R G K L F D G W R G F G R G R G F - - G L G G G G                                                         | 57  |
| <hr/>  |                                                                                                                     |     |
| AtFib1 | D H - - - - S - - P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -                                                         | 100 |
| AtFib2 | D H A - - - M R G A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -                                                         | 111 |
| HsFib  | G N G G F H S N R G R K R N Q S K N M - - - E V J C R - - - - - S                                                   | 117 |
| <hr/>  |                                                                                                                     |     |
| AtFib1 | Y N E K R I S V O N E D L I V Y P V W N F R S K L A A A I L G G V D N I W I K P G A K V L Y G A A S E T T V S H     | 160 |
| AtFib2 | Y N E K R I S V O N E D G T I E Y P V W N F R S K L A A A I L G G V D N I W I K P G A K V L Y G A A S E T T V S H   | 171 |
| HsFib  | N G E K I V I I S - E G D D I E Y P A W N F R S K L A A A I L G G V D Q T H I K P G A K V L Y G A A S E T T V S H   | 176 |
| <hr/>  |                                                                                                                     |     |
| AtFib1 | V S D L V G P E G C V Y A V E F S H R S G R D L V N M A K K R T N V I P I E D A R H P A K Y R M L V G M V D V F S   | 220 |
| AtFib2 | V S D L V G P E G C V Y A V E F S H R S G R D L V N M A K K R T N V I P I E D A R H P A K Y R M L V G M V D V I F S | 231 |
| HsFib  | V S D L V G P D G L V A V E F S H R S G R D I L N L A K K R T N I I P V L E D A R G H H Y R M I A K V D V I A       | 236 |
| <hr/>  |                                                                                                                     |     |
| AtFib1 | - - - - - P A T I L A M F P T D T V T A M A - - - - -                                                               | 280 |
| AtFib2 | - - - - - P A T I L A M Y L S D T V T A M P S F T - - - - -                                                         | 291 |
| HsFib  | - - - - - T I V N T H T L R N - - - - - A S - - - - - M - - - - - Q                                                 | 296 |
| <hr/>  |                                                                                                                     |     |
| AtFib1 | - - - - - E P P E R N F V Y V I W N Q T P A S -                                                                     | 308 |
| AtFib2 | - - - - - E P P E R N F V Y V I W N P A A T A A                                                                     | 320 |
| HsFib  | L G E Y R D E V V V I P V N - - - -                                                                                 | 321 |

|                  | AtFib1/AtFib2 | AtFib1/HsFib | AtFib2/HsFib |
|------------------|---------------|--------------|--------------|
| GAR              | 59%           | 50%          | 49%          |
| BCO              | 93%           | 66%          | 66%          |
| R                | 100%          | 86%          | 86%          |
| $\alpha$ -hélice | 89%           | 75%          | 74%          |

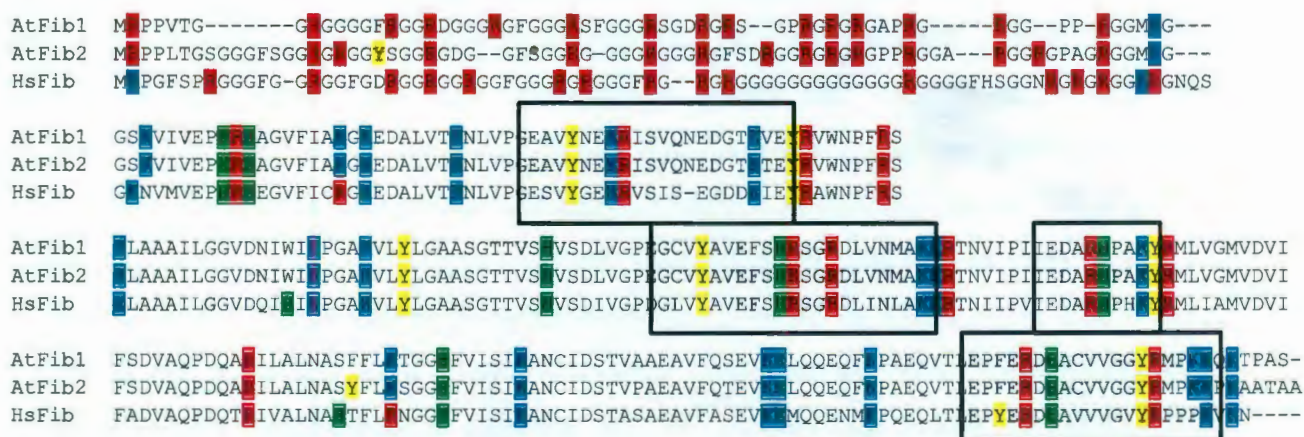
65



### 3.2 Posibles sitios de interacción entre AtFib y los fosfoinosítidos

Para determinar cuáles serían posibles sitios de unión de la AtFib con los fosfoinosítidos se realizó un análisis *in silico*. En este análisis se buscaron en las secuencias de la AtFib1, la AtFib2 y la HsFib regiones compuestas por los aminoácidos Y, K, R, H los cuales se han reportado constituyen las regiones proteicas que interactúan con los fosfoinosítidos (Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007). Estas regiones deberían tener entre tres a cinco aminoácidos de los cuales dos deben tener carga positiva y al menos uno con un residuo aromático.

Se encontraron cuatro regiones que cumplen con el criterio de búsqueda, estas se enmarcan en los recuadros color negro (figura 3.2). Se observa que cada uno de los dominios, salvo el dominio GAR, el cual además se ha reportado es metilado postraduccionalmente, tienen al menos un posible sitio de interacción con los fosfoinosítidos. Particularmente, los posibles sitios de interacción del dominio R sean los de mayor importancia, ya que es el dominio que se encuentra más conservado. Es posible que si cada región identificada interactúa con los fosfoinosítidos se dé cierto efecto de cooperatividad al llevar a cabo la unión lípido-proteína.



**Figura 3.2** Posibles sitios de interacción entre la AtFib y la HsFib con los fosfoinosítidos. En los recuadros color negro se enmarca la región que podría interactuar con los fosfoinosítidos, basado en lo reportado por Rosenhouse-Dantsker y Logothetis, 2007. Los

recuadros color rojo corresponden a la arginina (R); color azul a la lisina (K); color amarillo a la tirosina (Y); color verde a la histidina (H), cada párrafo corresponde a un dominio, el primero es el GAR, el segundo es el BCO, el tercero es el R y el cuarto es el alfa.

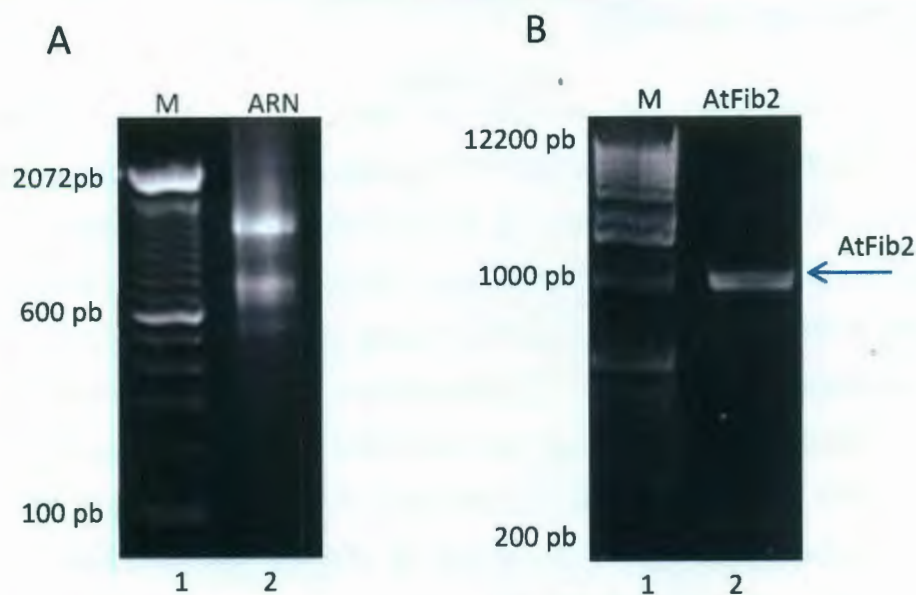
### 3.3 Obtención del vector de expresión pET15b+AtFib2

Para obtener la secuencia de ADN de AtFib2 se realizó la extracción de ARN total de plántulas de *A. thaliana* (figura 3.3A) como se indica en la metodología. A partir de este ARN se sintetizó el ADNc para la posterior amplificación de la secuencia completa de AtFib2. La secuencia de AtFib2 tiene un largo de 960 pb. En la figura 3.3B se puede observar una banda cercana a las 1000 pb, la cual parece corresponde a la AtFib2.

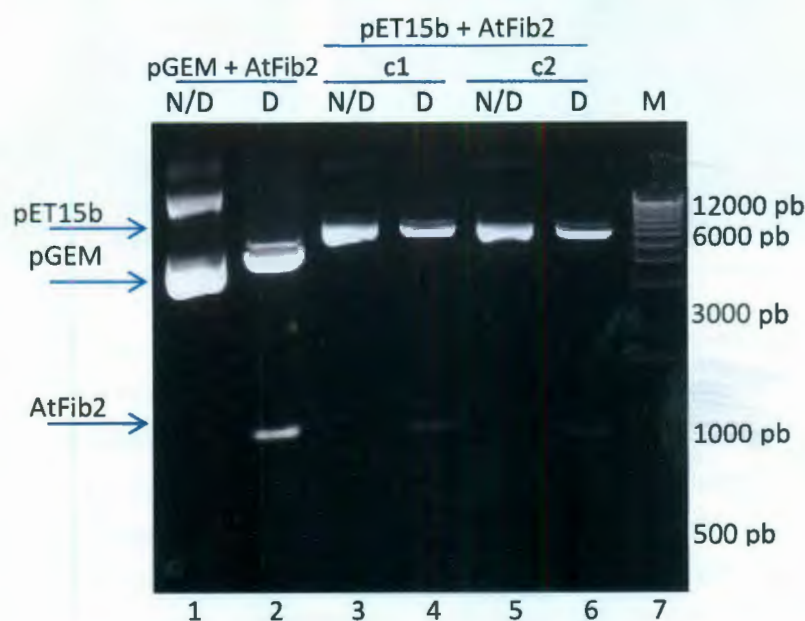
Una vez amplificada la secuencia de AtFib2 ésta fue ligada al vector de clonación pGEMT easy vector y con esta construcción se transformaron células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se hizo la extracción del vector el cual para corroborar la correcta ligación fue digerido con la enzima EcoRI. Los fragmentos obtenidos son uno con 3000 pb de largo, correspondiente al vector pGEM y otro de aproximadamente 1000 pb de largo, correspondiente a la secuencia de AtFib2 (figura 3.4).

Posteriormente, la secuencia de AtFib2 fue liberada de pGEM con las enzimas de restricción NdeI y BamHI para poder ser ligada al vector de expresión pET15b, el cual fue digerido con las mismas enzimas. Con la nueva construcción (pET15b+AtFib2) se transformaron bacterias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se hizo la extracción del vector, el cual fue digerido con las enzimas NdeI y BamHI para confirmar la correcta ligación. Las bandas obtenidas fueron dos, una de aproximadamente 6000 pb de largo, correspondiente al vector pET15b y otra de aproximadamente 1000 pb de largo, correspondiente a la secuencia de AtFib2 (figura 3.4). El vector pET15b+AtFib2 fue enviado a secuenciar, con esto se confirmó que se tenía la secuencia de AtFib2 en la dirección correcta y sin mutaciones.





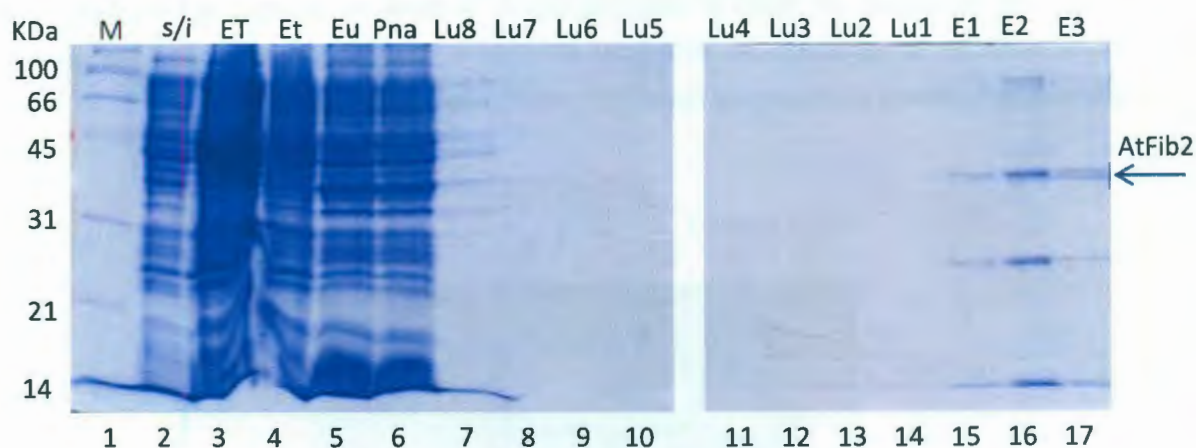
**Figura 3.3** Extracción de ARN de plántulas de *A. thaliana* de 15 días de desarrollo y amplificación de la secuencia de AtFib2. A) ARN de *A. thaliana*. La extracción fue de la totalidad de la planta; B) Secuencia de AtFib2 amplificada a partir del ADNc.



**Figura 3.4** Clonación y subclonación de la secuencia de AtFib2 en los vectores pGEM y pET15b. Carril 1: plásmido pGEM+AtFib2 no digerido; Carril 2: plásmido pGEM+AtFib2 digerido con las enzimas NdeI y BamHI; Carril 3 y 5: plásmido pET15b+AtFib2 de dos colonias diferentes no digerido; Carril 4 y 6: plásmido pET15b+AtFib2 de dos colonias diferentes digerido con las enzimas NdeI y BamHI; Carril 7: marcador de peso molecular de 1 kb. N/D: no digerido; D: digerido.

### 3.4 Expresión de la AtFib2

El vector pet15b+AtFib2 fue clonado en células *E. coli* cepa BL21 para su expresión, la cual se llevó a cabo a 25 °C durante cinco horas y una concentración final de IPTG de 1 mM. La extracción y purificación de la proteína se llevaron a cabo como se menciona en la metodología. Al hacer el lavado de la fracción no soluble con el amortiguador que contiene urea a una concentración de 8 M se obtuvo una banda enriquecida de 36 KDa la cual parece corresponder a la AtFib2 (figura 3.5). Los posteriores lavados con una concentración decreciente de urea se llevaron a cabo para permitir el plegamiento de la proteína mientras ésta se encontraba anclada a la resina de Ni por la etiqueta de histidinas. Al hacer la elución la banda enriquecida de 36 KDa correspondiente a la AtFib2 se mantiene.



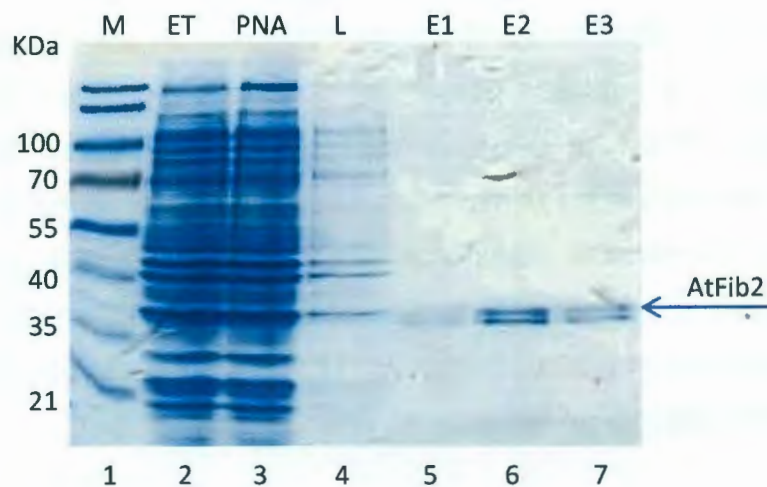
**Figura 3.5** Extracción y purificación de la AtFib2. Se puede observar que a partir del carril número 5 se obtiene una banda mayoritaria. Al hacer las eluciones esta banda se mantiene en la masa esperada (36 KDa), lo cual indica que es la AtFib2. s/i: extracto proteico total de bacterias que no fueron inducidas para la expresión de AtFib2; ET: extracto proteico total de bacterias que fueron inducidas para la expresión de AtFib2; Et: Extracto proteico de la fracción no soluble utilizando tritón al 0.5%; Eu: extracto total de la fracción no soluble con urea a una concentración de 8M posterior a la extracción con tritón; Pna: proteínas no adheridas a la resina de níquel-agarosa; Lu8: lavado con urea a una concentración de 8M; Lu7: lavado con urea a una concentración de 7M; Lu6: lavado con urea a una concentración de 6M; Lu5: lavado con urea a una concentración de 5M; Lu4: lavado con urea a una concentración de 4M. Lu3: lavado con urea a una concentración de 3M; Lu2: lavado con urea a una concentración de 2M; Lu1: lavado con urea a una concentración de 1M; E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3.



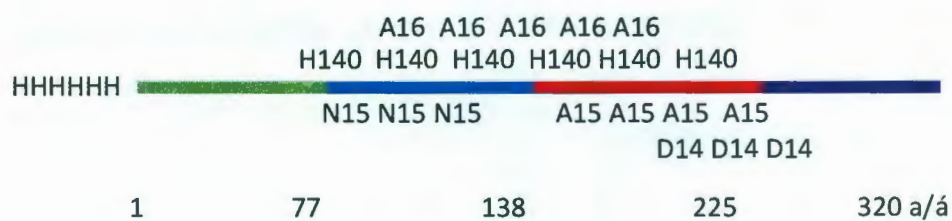
De la misma forma, se llevó a cabo la purificación de la fracción soluble (figura 3.6). A diferencia de la proteína purificada de la fracción no soluble no se observan otras proteínas en la elución, por lo tanto para determinar que la banda correspondía a la AtFib2 se prosiguió con la inmunodetección. Para esto, se contaba con cinco anticuerpos comerciales específicos para la HsFib, por lo tanto era necesario determinar cuál de estos era capaz de identificar a la AtFib2. Cada uno de los anticuerpos reconocen la secuencia de la fibrilarina en sitios diferentes, sin embargo, todos tienen cierta afinidad. En la figura 3.6 se observa cada uno de los sitios de reconocimiento de los distintos anticuerpos.

El anticuerpo que mostró una mejor señal fue el H140 (figura 3.6). Este anticuerpo es policlonal y reconoce la región que va del aminoácido 61 al 200. Esta región pertenece al dominio central de la AtFib2 la cual es similar a la misma región de la fibrilarina de humano en un 86%. Posteriormente, se determinó si la AtFib2 interactúa con los fosfoinosítidos.

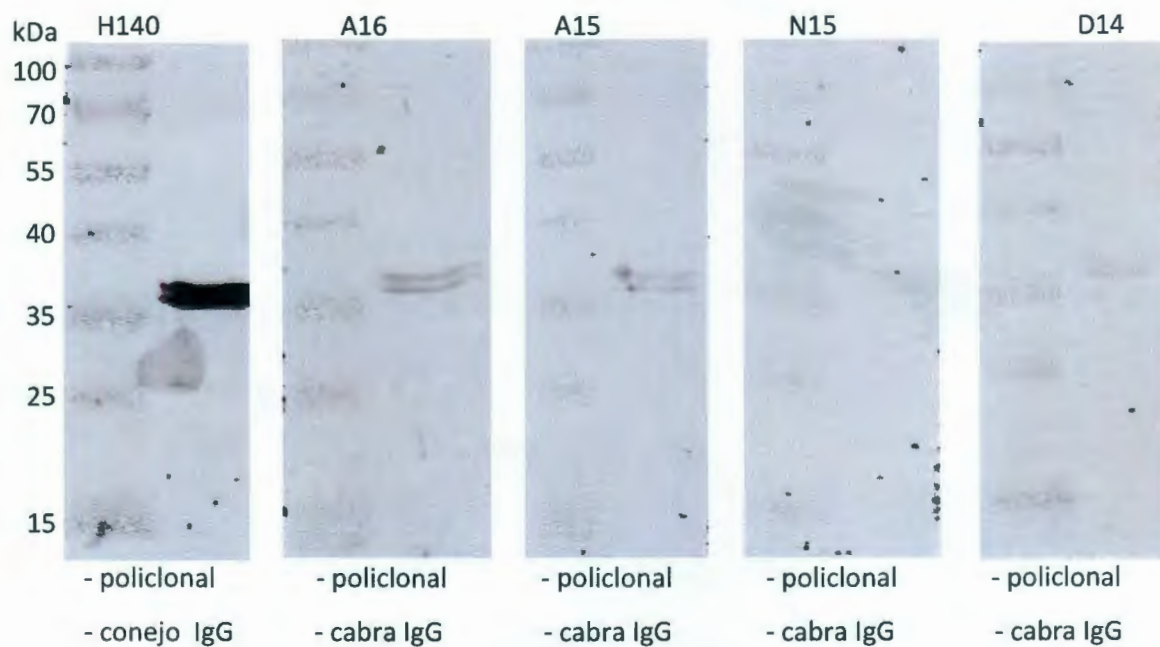
A



B



C



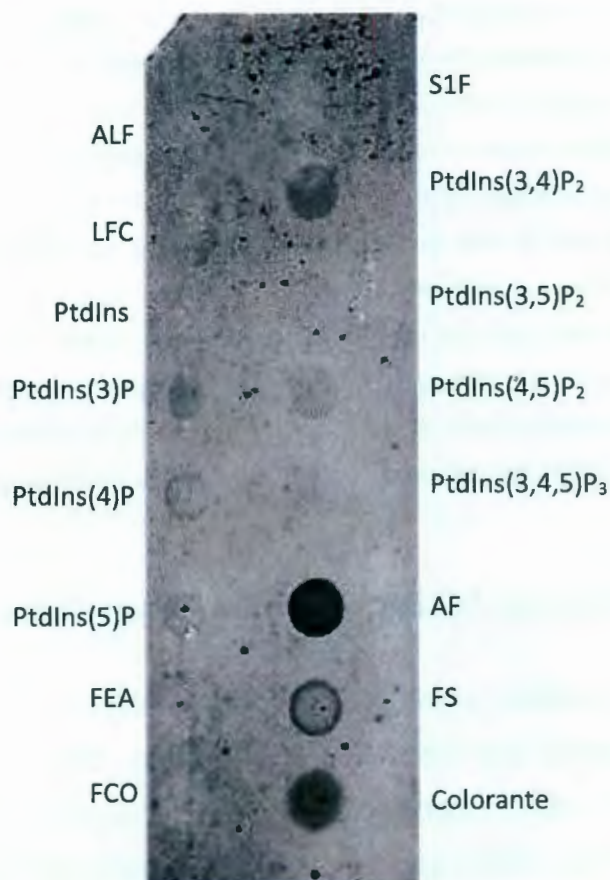


**Figura 3.6** Inmunodetección de AtFib2 con distintos anticuerpos. A) Purificación de AtFib2. Concentración de proteína purificada = 6.9 µg. ET: extracto proteico total de bacterias que fueron inducidas para la expresión de AtFib2, Pna: proteínas no adheridas a la resina de níquel-agarosa, L: lavado, E1: elución 1, E2: elución 2, E3: elución 3. B) Esquema del sitio de reconocimiento de los distintos anticuerpos específicos para la fibrilarina de *H. sapiens* utilizados en la inmunodetección de la AtFib2. El anticuerpo H140 reconoce la región que va del aminoácido 61 al 200, el A16 reconoce la región que va del aminoácido 100 al 150, el A15 reconoce la región que va del aminoácido 120 al 180; el N15 reconoce la región que va del aminoácido 80 al 130 y el D14 reconoce la región que va del aminoácido 200 al 225. Cada color representa un dominio, gris: dominio rico en arginina y glicina; verde: dominio blanco; azul: dominio central y rosa: dominio con estructura de  $\alpha$ -hélice. C) Inmunodetección de AtFib2 con los distintos anticuerpos, la concentración de proteína en cada caso fue de 6.9 µg.

### 3.5 Interacción entre la AtFib2 y los fosfoinosítidos

Para determinar si la AtFib2 y los fosfoinosítidos interactúan se llevó a cabo el ensayo fat-blot utilizando las membranas PIP-strips. Estas membranas son de nitrocelulosa y tienen una concentración de cada uno de los fosfolípidos de 100 pM. La concentración de AtFib2 que se utilizó para determinar si interactúa con los fosfoinosítidos fue de 1.53 pM. El resultado se observa en la figura 3.7. Los fosfoinosítidos con los que la AtFib2 interactúa son los tres fosfoinosítidos monofosfato, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, y el PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, no interactúa con el PtdIns, con el PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> ni con el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Así mismo se puede observar que la AtFib2 interactúa con otros fosfolípidos como lo son el ácido fosfatídico (AF) y la fosfatidilserina (FS) y no interactúa con el ácido lisofosfatídico (ALF), la lisofosfatidilcolina (LFC), la esfingosina 1-fosfato (S1F), la fosfatidiletanolamida (FEA) y la fosfatidilcolina (FCO).

De todos los fosfolípidos en la membrana, la AtFib2 parece interactuar con una mayor afinidad con el ácido fosfatídico.



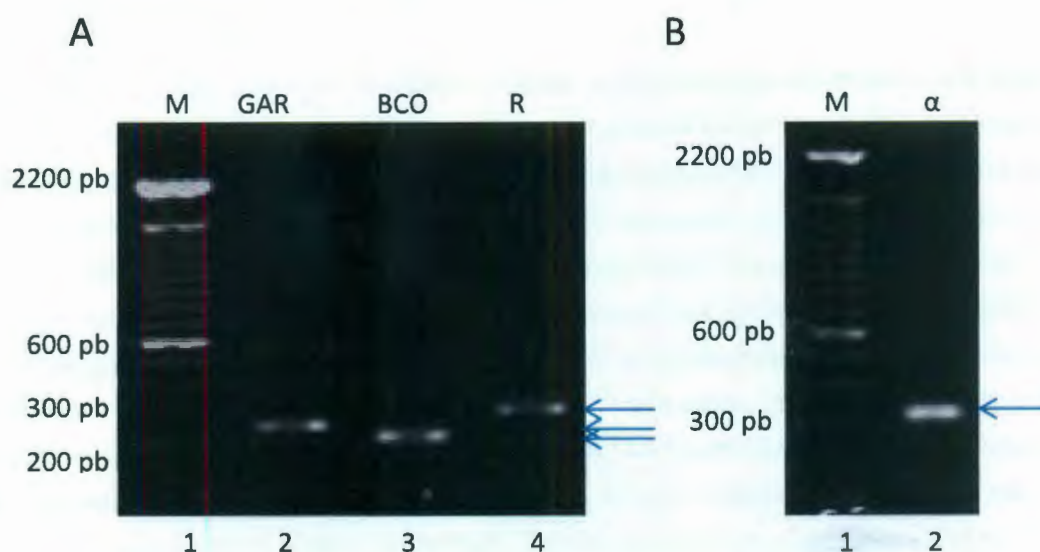
**Figura 3.7** Interacción entre la AtFib2 con los fosfoinosítidos mediante el ensayo fat-blot. La membrana tiene una concentración de los fosfolípidos de 100 pM y la concentración de AtFib2 utilizada fue de 1.53 pM. La AtFib2 interactúa con el PtdIns(3)P, con el PtdIns(4)P, con el PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, el ácido fosfatídico y la fosfatidilserina. La AtFib2 no interactúa con el PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, con el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, el ácido lisofosfatídico, la lisofosfatidilserina, la fosfatidiletanolamida, la fosfatidilcolina y la esfingosina 1-fosfato.

### 3.6 Amplificación y clonación de los dominios de AtFib2

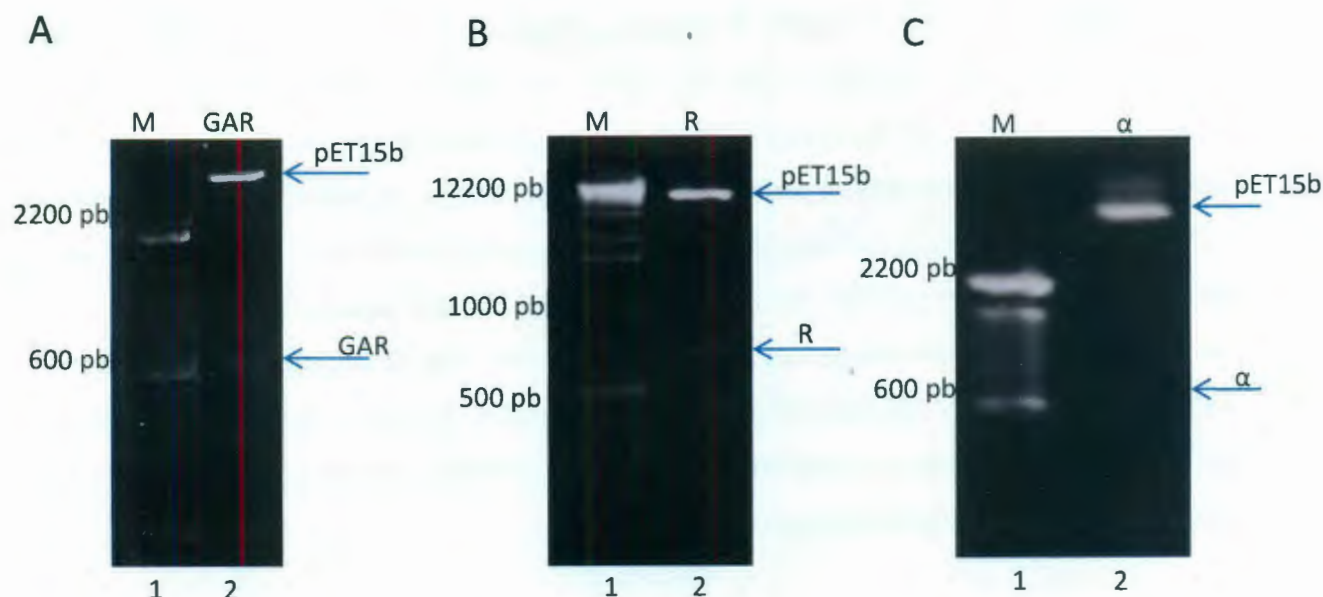
Para determinar cuál es el dominio específico de la AtFib que interactúa con los fosfoinosítidos, se realizó la expresión de cada uno por separado. La estrategia fue la misma que para la expresión de la AtFib2. Inicialmente la secuencia de ADN de los dominios de AtFib2 fueron amplificados a partir del vector pET15b+AtFib2 con iniciadores específicos. El largo de la secuencia de los dominios es de 250, 200, 300 y 300 pb para GAR, BCO, R y  $\alpha$  respectivamente (figura 3.8).



Posteriormente la secuencia de cada uno de los dominios de AtFib2 fue ligada al vector pGEM, liberada y ligada al vector expresión pET15b. Para confirmar las ligaciones al vector pET15b, éste se digirió con las enzimas XbaI y HindIII. En caso de que la ligación no fuera exitosa estas enzimas liberarían un fragmento de 400 pb, correspondientes al vector pET15b. Cuando la ligación entre el dominio GAR y el vector resultó exitosa, al digerir éste se observaron dos bandas, una con un largo aproximado de 650 pb, correspondiente a la secuencia del dominio y otra de 5000 pb, correspondiente al vector linearizado. De la misma forma para los vector pET15b+R y pET15+alfa se observan dos bandas, una con un largo aproximado de 700 pb, correspondiente a las secuencias de los dominios y otra de 5000 pb, correspondiente al vector (figura 3.9).



**Figura 3.8** Amplificación de los dominios de AtFib2. A) Amplificación de los dominios GAR, BCO y R de AtFib2 a partir del vector pET15b+AtFib2. Los dominios GAR, BCO y R tienen un largo de 290, 200 y 300 pb respectivamente. B) Amplificación del dominio α a partir del vector pET15b+AtFib2. El dominio α tiene un largo de 300 pb.

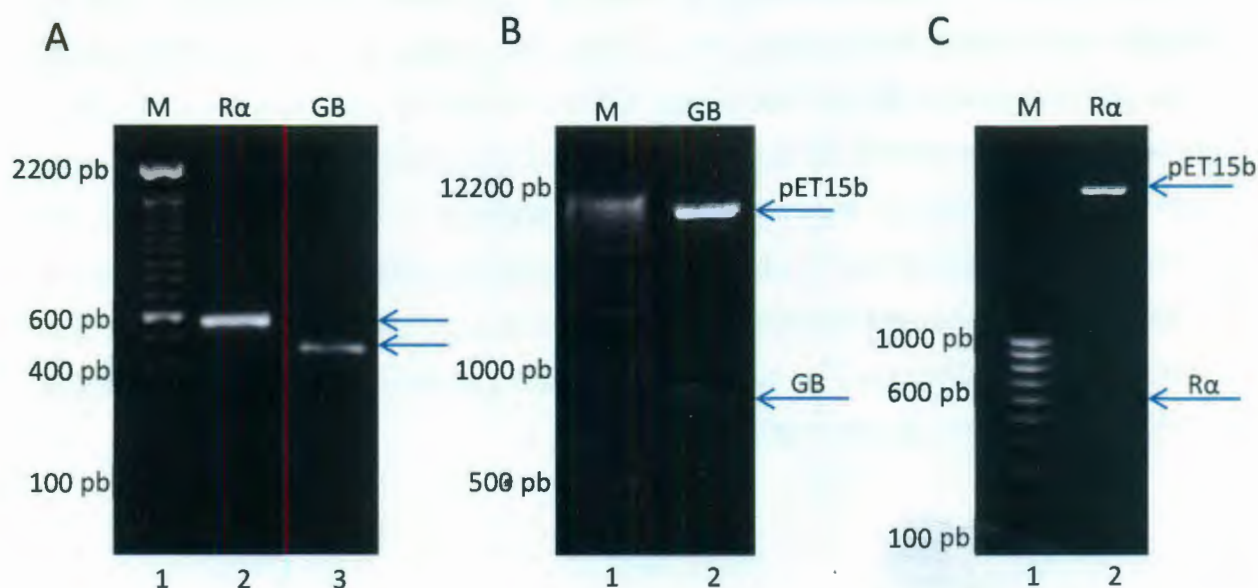


**Figura 3.9** Ligación de los dominios de AtFib2 al vector de expresión pET15b. A) Ligación del dominio GAR de AtFib2 al vector pET15b. El vector pET15b+GAR fue digerido con las enzimas XbaI y HindIII. Se observan dos fragmentos uno de aproximadamente 600 pb de largo correspondiente a la secuencia del dominio GAR y otro de 5780 aproximadamente correspondiente al vector pET15b linearizado. B) Ligación del dominio R de AtFib2 al vector pET15b. El vector pET15b+R fue digerido con las enzimas XbaI y HindIII. Se observan dos fragmentos uno de aproximadamente 700 pb de largo correspondiente a la secuencia del dominio R y otro de 5780 aproximadamente correspondiente al vector pET15b linearizado. C) Ligación del dominio alfa de AtFib2 al vector pET15b. El vector pET15b+alfa fue digerido con las enzimas XbaI y HindIII. Se observan dos fragmentos uno de aproximadamente 700 pb de largo correspondiente a la secuencia del dominio  $\alpha$  y otro de 5780 aproximadamente correspondiente al vector pET15b linearizado.

Para determinar si es necesario para la unión a fosfoinosítidos más de un dominio de la AtFib se realizaron dos construcciones adicionales. Éstas dividen a la proteína por la mitad, de tal forma que se exprese únicamente el dominio con actividad metiltransferasa, el cual incluye a los dominios R y ALFA, y por otro lado al dominio N-terminal, el cual incluye los dominios GAR y BCO. A partir del vector pET15b+AtFib2 se amplificó la secuencia de las regiones MTasa y N-terminal y se ligaron al vector de clonación pGEM y al vector de expresión pET15b. Los fragmentos esperados al amplificar la región N-terminal (GB) y la región MTasa



(R $\alpha$ ) son de aproximadamente 450 y 600 pb respectivamente. Posteriormente, se clonaron y subclonaron en los vectores pGEM y pET15b. Para corroborar la ligación al vector de expresión se hizo una digestión utilizando las enzimas de restricción HindIII y XbaI. Para el caso del vector pET15b+GB las enzimas liberaron dos fragmentos, uno de aproximadamente 850 pb de la secuencia de GB y otro de aproximadamente 5700 del vector. Para el caso de la región R $\alpha$  se observaron tres fragmentos, esto es debido a que para este fragmento la enzima HindIII tiene dos sitios de reconocimiento en la secuencia del dominio y uno más en la secuencia del vector (figura 3.10). Todos los vectores pET15b fueron enviados a secuenciar. El resultado es idéntico a la secuencia de la AtFib2 en cada región.



**Figura 3.10** Amplificación de los regiones N-terminal (GB) y metiltransferasa (R $\alpha$ ) de la AtFib2 y su ligación al vector de expresión pET15b. A) Amplificación de GB y R $\alpha$  de AtFib2 a partir del vector pET15b+AtFib2. La región GB tiene un largo de 400 pb y la región R $\alpha$  tiene un largo de 600 pb. B) Ligación de la región GB de AtFib2 al vector pET15b. El vector pET15b+GB fue digerido con las enzimas XbaI y HindIII liberando un fragmento de aproximadamente 800 pb de largo que corresponde al dominio GB y otro de 5780 aproximadamente que corresponde al vector pET15b linearizado. C) Ligación de la región R $\alpha$  de AtFib2 al vector pET15b. El vector pET15b+R $\alpha$  fue digerido con las enzimas XbaI y HindIII liberando tres fragmentos, de 600, de 500 y de 5780 pb aproximadamente. Las

---

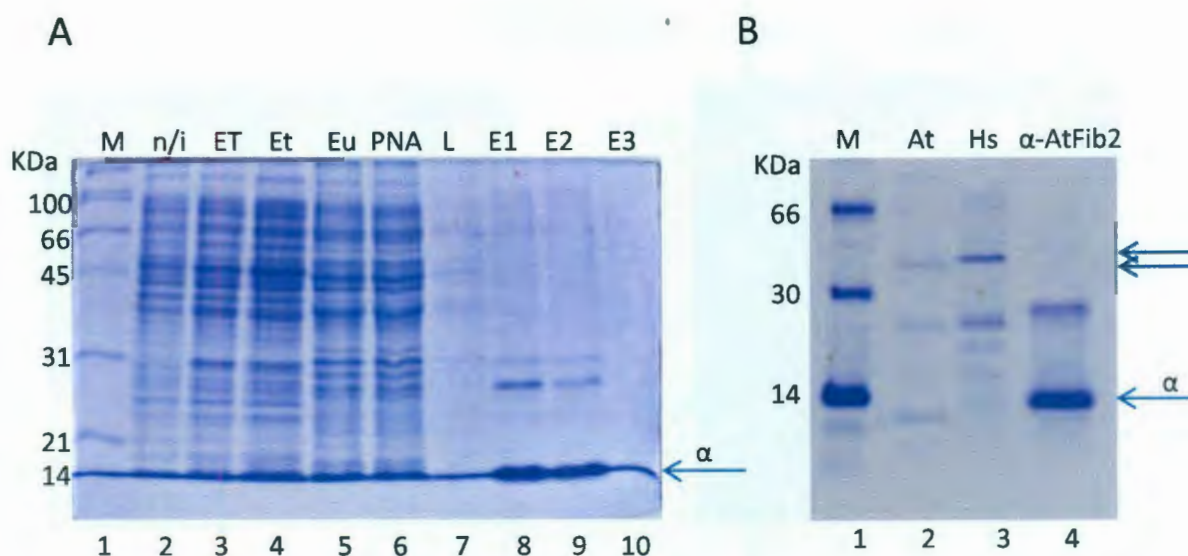
fragmentos de 600 y 500 pb se deben a que la secuencia del dominio  $\alpha$  cuenta con dos sitios de restricción para la enzima HindIII. El fragmento de 5780 pb corresponde al vector pET15b linearizado.

### 3.7 Expresión y purificación de los dominios de AtFib2

La expresión y purificación de los dominios se llevó a cabo de la misma forma que para la AtFib2, sin embargo, solo se logró la expresión del dominio  $\alpha$ . En la figura 3.11 se observa todo el proceso que abarca desde la extracción proteica total de bacterias inducidas y transformadas con el vector pET15b+ $\alpha$ -AtFib2 para la expresión del dominio, hasta la purificación.

Debido a que la masa del dominio  $\alpha$  es de 14 KDa no es posible identificar a partir de que fracción es que se extrae la proteína. Fue hasta la purificación, que se observó una banda enriquecida en el frente de corrida del gel tipo SDS-PAGE 12%, particularmente en las fracciones eluidas de la columna (figura 3.11). Para determinar que se trataba de la proteína se hizo un gel de acrilamida al 16% en el cual se aplicó la misma muestra, también se aplicó a la AtFib2 y a la HsFib. Se puede observar que la banda ubicada en el frente de corrida anteriormente, ahora se ubica ligeramente por debajo de los 14 KDa lo cual sugiere, por la masa, que corresponde al dominio  $\alpha$ . Por otro lado, la AtFib2 y la HsFib se observan por arriba de los 30 KDa como se esperaba (figura 3.11).

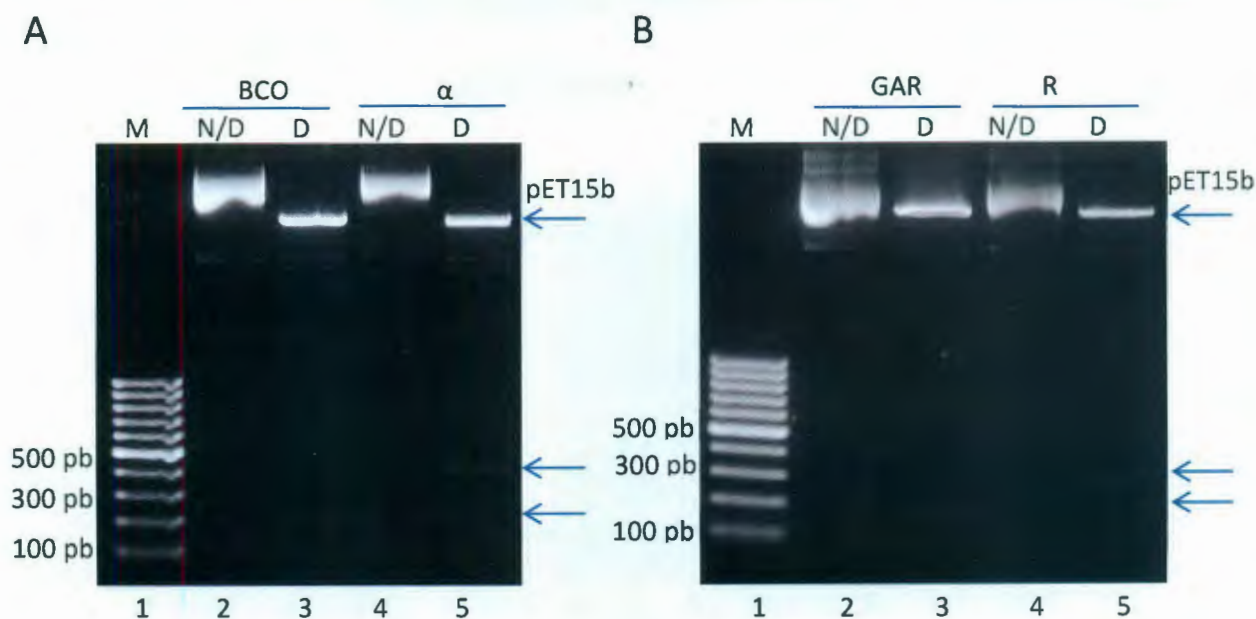




**Figura 3.11** Expresión y purificación del dominio  $\alpha$  de AtFib2. A) gel de acrilamida al 12 % con la extracción proteica de la fracción no soluble. M: marcador, n/i: extracto proteico de bacterias no inducidas, ET: extracto proteico total de bacterias que fueron inducidas para la expresión de  $\alpha$ -AtFib2; Et: Extracto proteico de la fracción no soluble utilizando tritón al 0.5%; Eu: extracto total de la fracción no soluble con urea a una concentración de 8M posterior a la extracción con tritón; Pna: proteínas no adheridas a la resina de níquel-agarosa; L: lavado, E1: elución 1, E2: elución 2, E3: elución 3. B) Gel acrilamida al 16 % con las fracciones eluidas de las proteínas AtFib2, HsFib y  $\alpha$ -AtFib2.

### 3.8 Amplificación de los dominios de AtFib1 y clonación al vector pET15b

La secuencia de los dominios de AtFib1 fue amplificada a partir del ADNc generado del ARN extraído inicialmente. Una vez amplificados las secuencias se ligaron al vector de clonación pGEMT-easy y, posteriormente, al vector pET15b. Para confirmar la ligación de los dominios al vector de expresión se realizó la extracción del plásmido y se digirió con las enzimas NdeI y BamHI, liberando de esta forma fragmentos de 200, 300 y 400 pb correspondientes al largo de la secuencia de cada dominio (figura 3.12). Una vez obtenido el vector, el siguiente paso fue expresar cada dominio por separado.

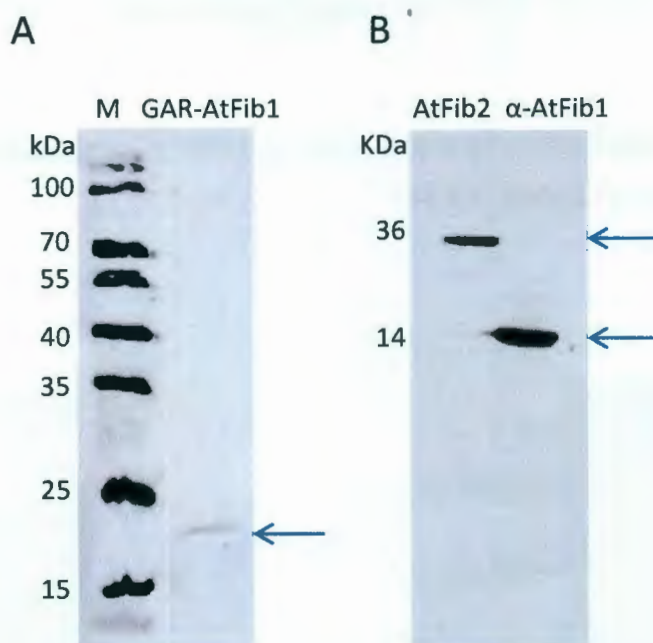


**Figura 3.12** Ligación de los dominios de AtFib1 al vector de expresión pET15b. A) Ligación de los dominios BCO y  $\alpha$  de AtFib1 al vector pET15b. Los vectores pET15b+BCO y pET15b+ $\alpha$  fueron digeridos con las enzimas NdeI y BamHI liberando fragmentos de 200 y 400 pb correspondientes a cada dominio respectivamente. B) Ligación de los dominios GAR y R de AtFib1 al vector pET15b. Los vectores pET15b+GAR y pET15b+R fueron digeridos con las enzimas NdeI y BamHI liberando fragmentos de 180 y 400 pb correspondientes a cada dominio respectivamente. M: marcador; N/D: vector no digerido; D: vector digerido.

### 3.9 Inmunodetección de los dominios AtFib1 expresados

Para determinar que los dominios expresados de AtFib1 eran los esperados se llevó a cabo la inmunodetección. Para este caso, se utilizó un anticuerpo que reconoce la etiqueta de histidinas que se le adiciona a los procesos al expresarlos con el vector pET15b. Como testigo para el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas, también se hizo la inmunodetección de AtFib2 la cual tiene la misma etiqueta que los dominios. Para el caso de la AtFib1 se lograron expresar los dominios, GAR y  $\alpha$ . La expresión se llevó a cabo usando una concentración final de IPTG de 1 mM y dos horas de inducción a 25 °C. La purificación se realizó utilizando la resina de níquel-sefarosa afín a la etiqueta de histidinas. El dominio GAR tiene una masa de aproximadamente 20 KDa y el dominio  $\alpha$  una de 14 KDa (figura 3.13).





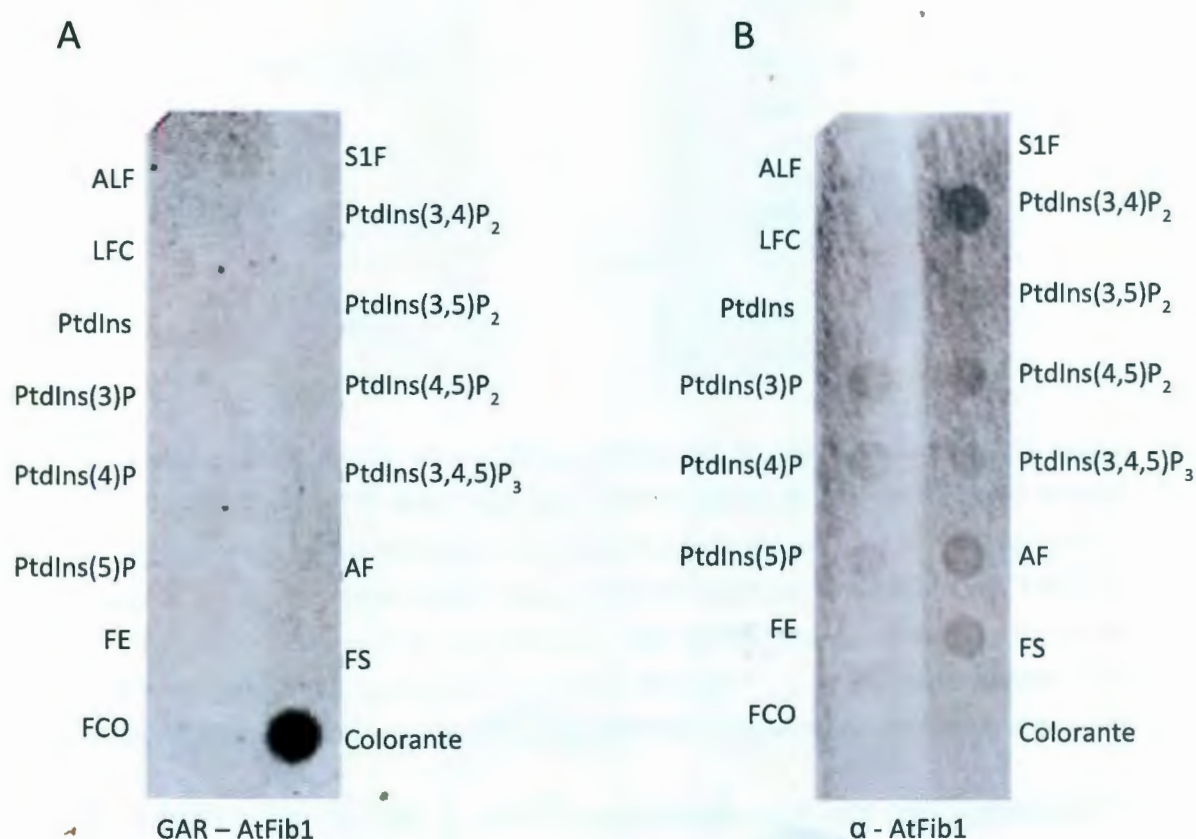
**Figura 3.13** Inmunodetección de los dominios GAR y  $\alpha$  de AtFib1. A) Inmunodetección de dominio GAR de AtFib1. El dominio GAR tiene una masa aproximada de 20 KDa, La concentración de la proteína fue de 0.5  $\mu$ g B) Inmunodetección de la AtFib2 y del dominio  $\alpha$  de AtFib1. La AtFib2 tiene una masa de 36 KDa y la concentración para la inmunodetección fue de 6.9  $\mu$ g. El dominio  $\alpha$  de AtFib1 tiene una masa de 14 KDa y la concentración para la inmunodetección fue de 20  $\mu$ g. Todas las proteínas en este caso fueron identificadas con el anticuerpo que reconoce la cola de histidinas agregada por el vector de expresión pET15b.

### 3.10 Interacción de los dominios GAR y ALFA de AtFib1 con los fosfoinosítidos

Para determinar si los dominios GAR y  $\alpha$  de AtFib1 interactúan con los fosfoinosítidos se llevó a cabo el ensayo fat-blot utilizando las membranas PIP-strips. Al igual que en el ensayo fat-blot de AtFib2, estas membranas son de nitrocelulosa y tienen una concentración de cada uno de los fosfolípidos de 100 pM. El resultado se observa en la figura 3.14. El dominio GAR no interactúa con ninguno de los fosfolípidos y fosfoinosítidos analizados. Por el contrario el dominio  $\alpha$  interactúa con los tres fosfoinosítidos monofosfato, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, el PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, y el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> y no interactúa con el PtdIns ni con el

PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Así mismo se puede observar que el dominio  $\alpha$  interactúa con otros fosfolípidos, como lo son el AF y la FS y no interactúa con el ALF, la LFC, la S1F, la FEA y la FCO.

De todos los fosfolípidos en la membrana el dominio  $\alpha$  parece interactuar con una mayor afinidad con el PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>.



**Figura 3.14** Interacción entre el dominio GAR y del dominio  $\alpha$  de AtFib1 con los fosfolípidos mediante el ensayo fat-blot. La membrana tiene una concentración de los fosfolípidos de 100 pM. A) Interacción del dominio GAR de AtFib1 con distintos fosfolípidos. Este dominio no interactúa con ningún fosfolípido de los analizados con este ensayo. B) Interacción del dominio  $\alpha$  de AtFib1 con distintos fosfolípidos. Este dominio interactúa con el PtdIns(3)P, con el PtdIns(4)P, con el PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, el ácido fosfatídico y la fosfatidilserina. No interactúa con el PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, con, el ácido lisofosfatídico, la lisofosfatidilserina, la fosfatidiletanolamida, la fosfatidilcolina y la esfingosina 1-fosfato.



### 3.11 Colocalización del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> con la AtFib

Para la identificación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se hizo un análisis mediante microscopia confocal de fluorescencia a núcleos de callos de *A. thaliana* tratados con los anticuerpos específicos que reconocen a este fosoinositido. De la misma forma utilizando anticuerpos específicos se identificó a la fibrilarina dentro del núcleo y nucléolo de los callos. Este análisis se llevó a cabo callos debido a la homogeneidad de núcleos, los cuales tienen un tamaño más grande, lo que permite diferenciar al nucléolo con mayor facilidad. Así mismo, los callos carecen de clorofila lo cual es una ventaja ya que con esto se evita la autofluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.15, 3.16 y 3.17.

El anticuerpo utilizado para el reconocimiento de la fibrilarina (Hc-140, Santacruz Biotechnology, Inc.) tiene la desventaja de que no es totalmente afín a una sola de las fibrilinas de las dos que se expresan en *A. thaliana*. Por lo tanto la señal que se observa en color rojo, por el fluoróforo del anticuerpo secundario, podría tratarse de AtFib1, de AtFib2 o de las dos a la vez. Por otro lado, el anticuerpo utilizado para reconocer al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> es específico y éste fue visualizado con un anticuerpo secundario con fluorescencia de color verde. Cuando las señales de los anticuerpos secundarios de la fibrilarina y del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se localizan en un mismo punto indica que las moléculas colocalizan, es decir, se encuentran en el mismo sitio. Esto genera un color amarillo. Por otro lado, se tiñó al ADN con DAPI, el cual genera una señal en color azul.

En la figura 3.15 se puede observar que la fibrilarina se concentra en regiones específicas de la célula. Estas regiones podrían comprender principalmente las regiones fibrilares de los nucléolos. Por el contrario de la fibrilarina, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se encuentra prácticamente en todo el núcleo celular, concentrándose principalmente en ciertas regiones al centro. El PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> que se puede observar es aquel remanente después de un tratamiento con 0.1% de tritón para eliminar el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrana nuclear, por lo tanto el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> es aquel que se encuentra formando un complejo diferente al

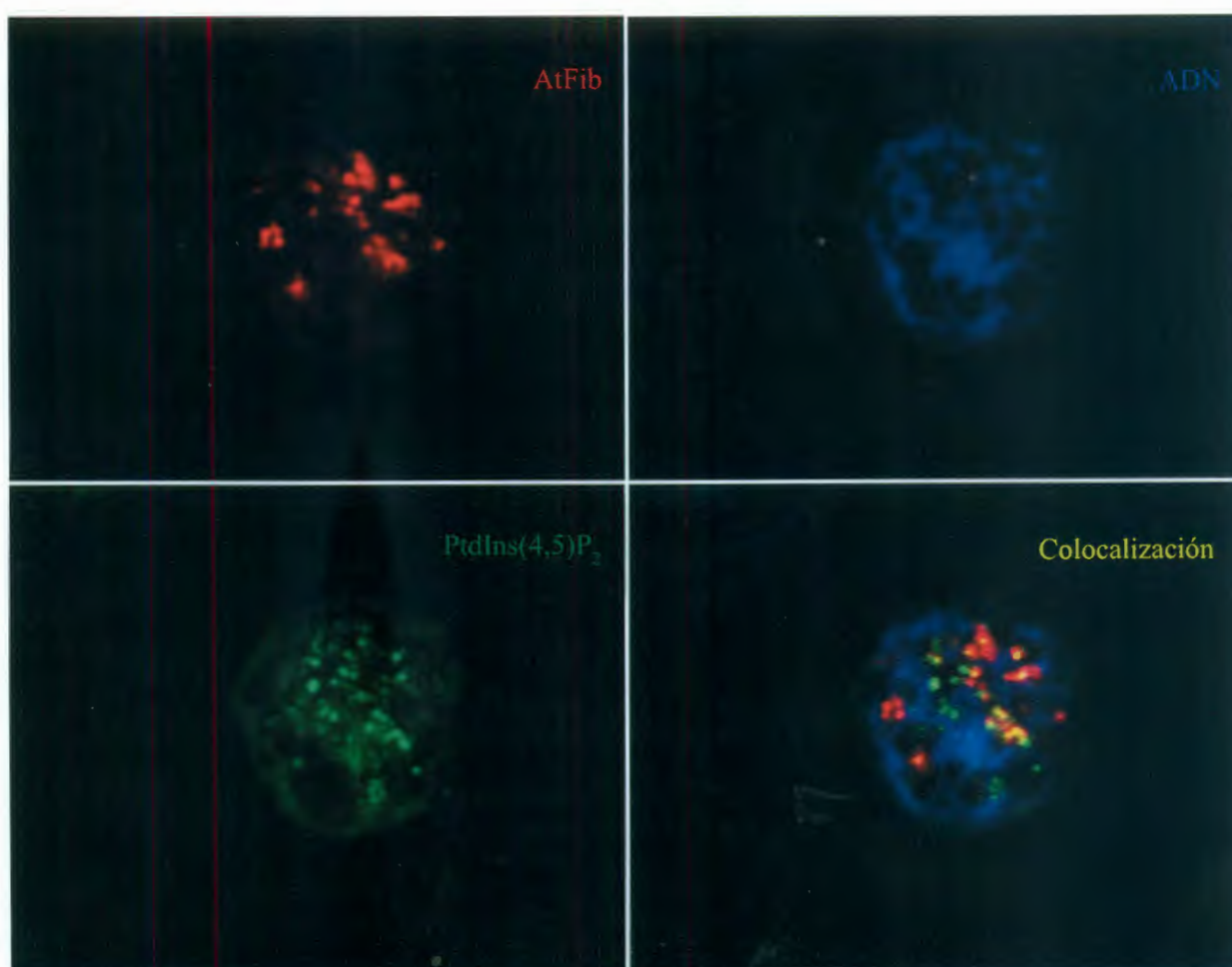
membranal. Este complejo puede estar constituido por proteínas u otros lípidos que le permita estar en el ambiente nuclear de la célula. Como consecuencia podrá ejercer algún tipo de actividad como regulador o potenciador de la síntesis de ADN y/o transcripción del mismo, o contribuyendo a la estructura nuclear y nucleolar. Por otro lado, se puede observar al ADN en todo el núcleo celular. Particularmente, en esta esta foto del ADN en el núcleo se observan regiones oscuras. Estas regiones podrían tratarse de complejos proteicos asociados a la cromatina, de los nucléolos de la célula y de regiones de ADN que tienen una baja concentración de los nucleótidos adenina y timina a los cuales se une el colorante DAPI. Por último, se tiene la colocalización de la fibrilarina y el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Ésta se observa claramente en color amarillo en distintos puntos de la célula. Con esto se tiene una evidencia visible que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se encuentra en el núcleo y nucléolo de células de *A. thaliana*.

En la figura 3.16 se observan dos células de *A. thaliana*. Al igual que en la figura anterior, se puede observar a la fibrilarina en el núcleo y nucléolo de ambas células, sin embargo, en una concentración diferente entre éstas dos, siendo este patrón repetido para el caso del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Por el contrario, el ADN se observa en todo el núcleo de ambas células. En este caso la colocalización entre la fibrilarina y el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> parece que solo se da en la célula de arriba, esto es debido a la diferencia de las concentraciones de las moléculas en ambas células. La diferencia de concentración puede ser causada en una etapa diferente en el ciclo celular de cada célula, ya que éstas no fueron sincronizadas en este experimento.

En la figura 3.17 se describe el mismo experimento que en las dos anteriores, sin embargo el panorama en que se tomó la fotografía fue más amplio. En esta imagen se pueden observar varias células las cuales varían en tamaño y en concentración, tanto de la fibrilarina como del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. En algunas de estas células se aprecia claramente la colocalización. En este caso, el tamaño de la célula y la concentración de las dos moléculas varía debido a que las células no se encuentran sincronizadas en una misma etapa del ciclo celular. Sin embargo, esto

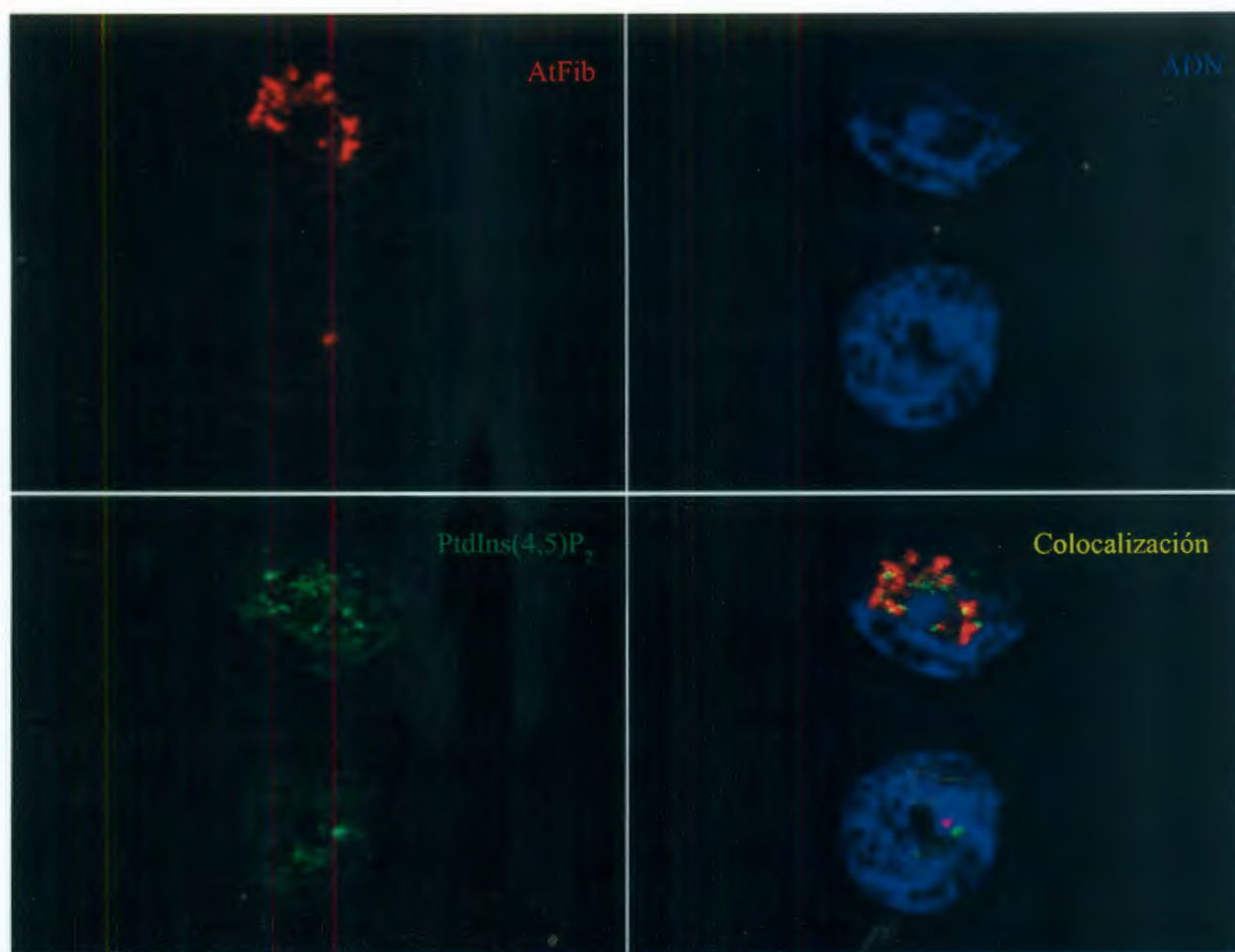


no quiere decir que en cada una de estas células no se lleve a cabo la colocación entre la fibrilarina y el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, solo están en una etapa de desarrollo en la cual no es posible apreciarla.

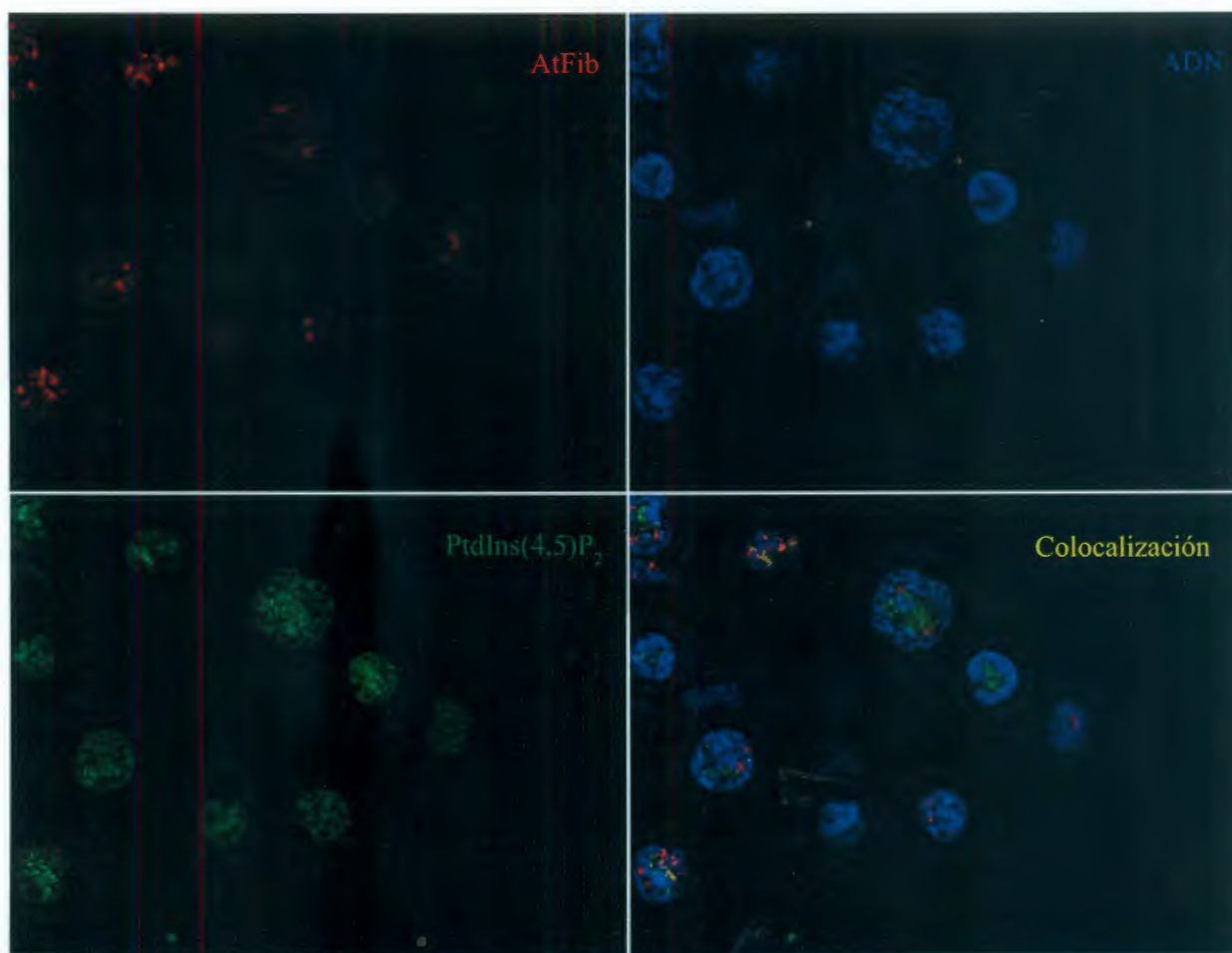


**Figura 3.15** Identificación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo de una célula de *A. thaliana*. En la figura se observa el núcleo de un callo de *A. thaliana* dentro del cual se idéntico con anticuerpos específicos al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (color verde) y a la AtFib (color rojo). El color azul corresponde al ADN teñido con DAPI. Las regiones amarillas corresponden a la colocalización entre el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la AtFib.





**Figura 3.16** Identificación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo de dos células de *A. thaliana*. En la figura se observa el núcleo de dos callos de *A. thaliana* dentro del cual se idéntico con anticuerpos específicos al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (color verde) y a la AtFib (color rojo). El color azul corresponde al ADN teñido con DAPI. Las regiones amarillas corresponden a la colocalización entre el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la AtFib.



**Figura 3.17** Identificación del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo de varias células de *A. thaliana*. En la figura se observa el núcleo de varios callos de *A. thaliana* dentro del cual se idéntico con anticuerpos específicos al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (color verde) y a la AtFib (color rojo). El color azul corresponde al ADN teñido con DAPI. Las regiones amarillas corresponden a la colocalización entre el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y la AtFib.



---

**Bibliografía**

Rosenhouse-Dantsker A. and Logothetis D.E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Eur J Physiol* 455,45-53





---

## CAPITULO IV

### Discusión

Desde la década de los 90 se sabe que dentro del núcleo se encuentran las enzimas necesarias para la síntesis de los fosfoinosítidos de una ruta alterna a la de la membrana celular (Pfaffmann *et al.*, 1987). Para el 2001 se logró visualizar al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo de células HeLa (Osborne *et al.*, 2001). En este trabajo se identificó al PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en el nucléolo de callos de *A. thaliana*, demostrando por primera ocasión la colocalización de un fosfoinosítido y una proteína nucleolar en células vegetales. Es posible que dentro del núcleo y nucléolo los fosfoinosítidos se encuentren formando complejos con otros lípidos y proteínas. Esto les permitirá mantener su estructura en un medio diferente al membranal, logrando así ejercer su función. Por otro lado también sería importante determinar la concentración de los fosfoinosítidos que se encuentran en el núcleo celular.

La presencia de los fosfoinosítidos en el núcleo de células eucariotas ha sido reportada en distintas ocasiones (Dieck *et al.*, 2012; Albi y Viola, 2004; Tamiya-Koizumi, 2002), sin embargo, en el nucléolo poco se sabe de estas moléculas. Así mismo, se han reportado distintos dominios proteicos que interaccionan con los fosfoinosítidos, pero ninguno de éstos se encuentra en la secuencia de la fibrilarina (Balla, 2005; Lemmon, 2003). A pesar que no ha sido reportado un dominio de unión a los fosfoinosítidos en la fibrilarina, se ha determinado que la HsFib interactúa con los fosfoinosítidos (Yildirim *et al.*, 2013).

Comparado a lo reportado por Yildirim *et al.*, 2013, se observa que la AtFib2 interactúa con la mayoría de los fosfoinosítidos con los que interactúa la HsFib. La AtFib2 y la HsFib interactúan con los tres fosfoinosítidos monofosfato, el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, el PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, y a diferencia de la HsFib, la AtFib no interactúa con el PtdIns, el PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> y el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Posiblemente, la diferencia en la estructura primaria entre cada fibrilarina, la cual es del 30%, determine los

aminoácidos y el número de ellos expuestos en la estructura terciaria que puedan interactuar con los fosfoinosítidos.

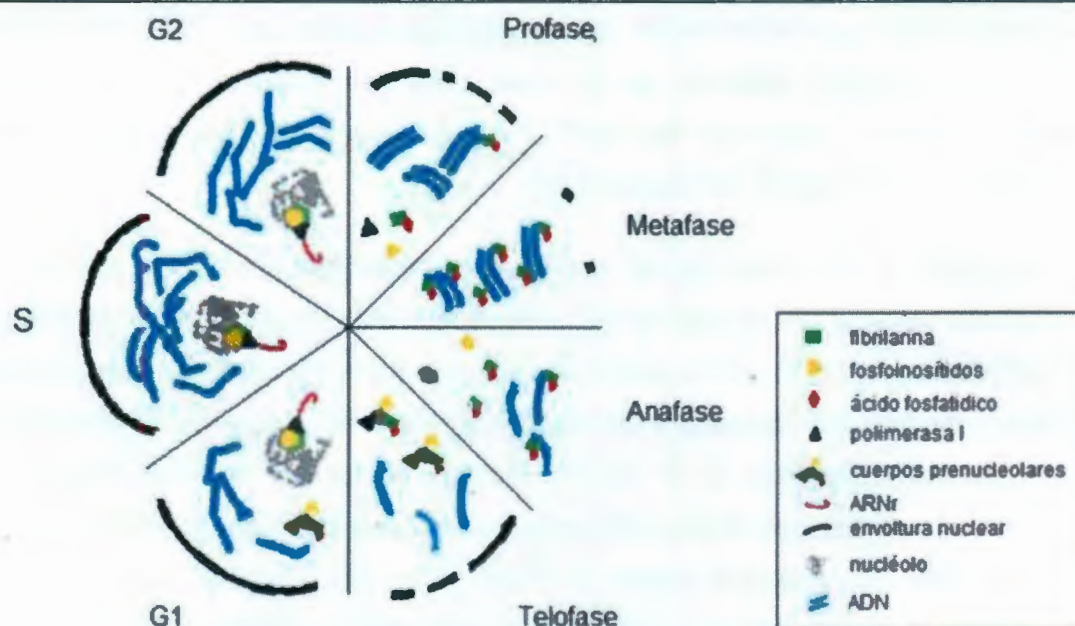
La presencia de cada uno de los fosfolípidos en el núcleo celular se conoce (Dieck *et al.*, 2012), sin embargo, poco se sabe de la función que cumple cada uno. Al determinar que la AtFib interactúa con los mismos fosfoinosítidos que la HsFib, es posible que la función de cada uno de ellos sea conservada entre especies. Así como la FS y la FCO los cuales son fosfolípidos estructurales de gran importancia en la matriz nuclear y se encuentran involucrados en procesos como la transcripción, es posible que los fosfoinosítidos tengan roles similares. Éstos podrían ir desde estructurales, como adaptadores proteicos o como moléculas señalizadoras. Para comprender con exactitud cuál es la función de cada fosfoinosítido en el núcleo celular, es importante determinar cuáles son las moléculas con las que interactúa, bajo qué condiciones o en que etapas del ciclo celular. Para este objetivo son necesarias nuevas metodologías y herramientas que permitan diferir entre un fosfoinosítido y otro para lograr, en primera instancia identificarlo y visualizarlo y posteriormente analizar su entorno. En éste trabajo se determinó que la AtFib interactúa con cinco de los siete fosfoinosítidos, pero no está en alcance para determinar si esta interacción se debe solamente a la estructura de las dos moléculas o por alguna función específica.

De la misma forma, la HsFib y la AtFib2 interactúan con el AF y la FS y no interactúan con la FCO, la S1F, la LFC y el ALF. El motivo por el cual la fibrilarina no interactúa con la LFC y el ALF podría ser estructural, sin embargo, es posible que dichos fosfolípidos no se encuentren en el nucléolo de las células. Por el contrario, si llegaran a estar presentes en el nucléolo celular es posible que formen parte de la ruta de síntesis del AF, fosfolípido con el cual si interactúa la fibrilarina. La síntesis del ácido fosfatídico se lleva a cabo de dos formas. La primera es a partir de la LFC, que es convertida por la acción de la autotaxina D en ALF el cual mediante una transferencia del grupo acilo es convertido al AF. La segunda vía es la conversión del glicerol 3-fosfato mediante dos transferencias del grupo acilo. En la primera ocurre la formación del ALF y en la segunda la formación del AF. Existe



una tercera ruta para la formación del AF, esta es a partir de la FCO, fosfolípido que si se encuentra presente en el núcleo. Sin embargo, es posible que la fibrilarina tampoco interactúe con el FCO debido a que ésta es hidrolizada por acción de la fosfolipasa D, formando el AF.

Por otro lado, la interacción del AF con las fibrilarinas podría ser evidencia de un mecanismo de señalización dentro del núcleo y nucléolo celular. Anteriormente, se ha descrito que el AF es un fosfolípido involucrado en la señalización celular y sus niveles aumentan en respuesta a distintos tipos de estrés, y durante el crecimiento y el desarrollo (Testerink *et al.*, 2011). Durante la fase S del ciclo celular se incrementa la cantidad de DAG y AF provenientes de la hidrólisis del  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  y fosfolípidos estructurales como la FCO y la FS. Durante esta fase, el  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  forma complejo con la polimerasa I y con la fibrilarina en el nucléolo promoviendo la transcripción del ARNr. Este proceso puede llevarse a cabo al mismo tiempo que el DAG promueve el movimiento de la PKC al núcleo. Al final de la fase G2 y al inicio de la mitosis la PKC fosforila a la lámina B iniciando el rompimiento de la envoltura nuclear (Tamiya-Koizumi, 2002). En este trabajo se propone que durante las etapas tempranas de la mitosis, el AF se podría traslocar al nucléolo e interactuar con la fibrilarina. A través de esta interacción se liberaría la fibrilarina de la interacción con los fosfoinosítidos, terminando así su acción en el procesamiento transcripcional (figura 4.1). Así mismo, es posible que esta interacción participe en la inhibición de la transcripción durante esta etapa del ciclo celular. La interacción de AF con la fibrilarina sería semejante a la de los fosfoinosítidos, involucrando aminoácidos con carga positiva. Hasta el momento no se cuenta con evidencias que identifiquen la presencia del AF en el nucléolo.



**Figura 4.1** Modelo de la interacción del AP con la AtFib. Durante la mitosis el AP interactúa con la fibrilarina deteniendo el procesamiento del ARNr. En la profase el ácido fosfatídico interactúa con la fibrilarina y la envoltura nuclear comienza a romperse. En la metafase la fibrilarina unida al ácido fosfatídico se asocia a la capa pericromosomal, la envoltura nuclear a desaparecido casi en su totalidad. En la anafase inicia la formación de los cuerpos prenucleolares, no hay envoltura nuclear. En la telofase los cuerpos prenucleolares se encuentran totalmente formados y la envoltura nuclear comienza a regenerarse. En la fase G1 el nucléolo se ha formado por completo y la transcripción se restaura. Durante la fase S y G2 la transcripción del ARNr se encuentra activa.

Por otro lado, se determinó que el dominio  $\alpha$ -hélice de la AtFib1 interactúa prácticamente con los mismos fosfoinosítidos y fosfolípidos que la AtFib2. Al hacer el análisis *in silico* se propuso que cada dominio, excepto el dominio GAR, tienen una región de unión a los fosfoinosítidos. El único dominio que se comprobó fue el dominio ALFA, por lo tanto se sugiere que este dominio sea el de interacción con los fosfoinosítidos. Aunado a esto, también interactúa con el AF. Se han descrito proteínas que interactúan en el mismo sitio con los fosfoinosítidos así como con el AF por ejemplo la AtPDK1 (Deak *et al.*, 1999) y la p47 (Karathanassis *et al.*, 2003), por lo tanto es posible que para la fibrilarina sea el mismo caso. De ser el mismo



caso, apoya la teoría en la que el AF se trasloca al nucléolo y evita la interacción de los fosfoinosítidos con la fibrilarina, lo cual lo convierte en una molécula señalizadora entre el núcleo y nucléolo.

---

**Conclusiones**

- Se demostró que en células tratadas con 0.1% de tritón se observa el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> remanente en el núcleo y nucléolo colocalizando con la fibrilarina. Ésta es la primera evidencia de la presencia de los fosfoinosítidos en el nucléolo de células vegetales
- Con el ensayo fat-blot se demostró que la AtFib2 interactúa de forma específica con los fosfolípidos de inositol, en particular, con el PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>.
- De los dominios de la AtFib1 analizados el  $\alpha$ -hélice interactúa con los fosfoinosítidos de manera similar a la AtFib2 y la HsFib. Así mismo, interactúa con la fosfatidilserina y con el ácido fosfatídico.
- La AtFib2 interactúa con el ácido fosfatídico en el mismo dominio alfa de AtFib1 con lo cual se aumenta la probabilidad que este dominio sea el de interacción con fosfoinosítidos.



---

## Perspectivas

- Expresar y determinar la posible interacción de otro dominio de AtFib con los fosfoinosítidos
- Mutar el dominio de unión a los fosfoinosítidos y determinar su función y afinidad.
- Determinar si la fibrilarina y los fosfoinosítidos interactúan en complejo con el snoARN U3 o por separado
- Definir cuál es el efecto que tiene la interacción de la fibrilarina y los fosfoinosítidos con la metilación del pre-ARN
- Identificar cual es el fosfoinosítido que tiene un mayor efecto sobre función de la fibrilarina

---

**Bibliografia**

- Albi E. and Viola Magni M.P. (2004) The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell.* 8, 657-67.
- Balla T. (2005) Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein—lipid and protein—protein interactions. *J. Cell Sci.* 118, 2093-2104.
- Deak M., Casamayor A., Currie R.A., Downes C.P. and Alessi D.R. (1999). Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Letters* 451, 220-226.
- Dieck C.B., Boss W.F. and Perera I.Y. (2012). A role for phosphoinositides in regulating plant nuclear functions. *Front. Plant Sci.* 3, 50.
- Karathanassis D., Stahelin R.V., Bravo J., Perisic O., Pacold C.M., Cho W., and Williams R.L. (2002). Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO Journal* 21, 5057-5068.
- Lemmon M. A. (2003) Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4, 201-213.
- Osborne S.L., Thomas C.L., Gschmeissner S. and Schiavo G. (2001) Nuclear PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mARN splicing. *J. Cell Sci.* 114, 2501-2511.
- Pfaffmann H., Hartmann E., Brightman A.O., and Morré, D.J. (1987). Phosphatidylinositol specific phospholipase C of plant stems 1. *Plant Physiol.* 85, 1151-1155.
- Tamiya-Koizumi K. (2002). Nuclear Lipid Metabolism and Signaling. *J. Biochem.* 132, 13-22.



- Testerink C. and Munnik T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2349-61.
- Yildirim S., Castano E., Sobol M., Philimonenko V., Dzajak R., Venit T. and Hozák P. (2013) Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *J Cell Sci.* 126, 2730-9





## Anexos

### Anexo I. Iniciadores utilizados

| NM 124626.4_Fib1_ADNc |                                        |            |
|-----------------------|----------------------------------------|------------|
| Nombre                | 5'-3'                                  | Largo (pb) |
| 1_F1                  | <b>CATATGATGAGACCCCCAGTTACAGGA</b>     | 21         |
| 1_R1                  | <b>GGATCCCGAGGCGCACCACGTCCTCTG</b>     | 21         |
| 1_F2                  | <b>CATATGCTCGCGGCAGAGGACGTGGTG</b>     | 21         |
| 1_R2                  | <b>GGATCCTGTAAACAGCTTCACCAGGAACCA</b>  | 24         |
| 1_F3                  | <b>CATATGTTTGGTTCCTGGTGAAGCTGTTT</b>   | 23         |
| 1_R3                  | <b>GGATCCGTTCTCTTCTTGGCCAT GTTCACC</b> | 24         |
| 1_F4                  | <b>CATATGAACATGGCCAAGAAGAGAACTAACG</b> | 25         |
| 1_R4                  | <b>GGATCCCTATGAGGCTGGGGTCTTTTG</b>     | 21         |

Dominios de la fibrilarina 1 que amplifica cada par de iniciadores:



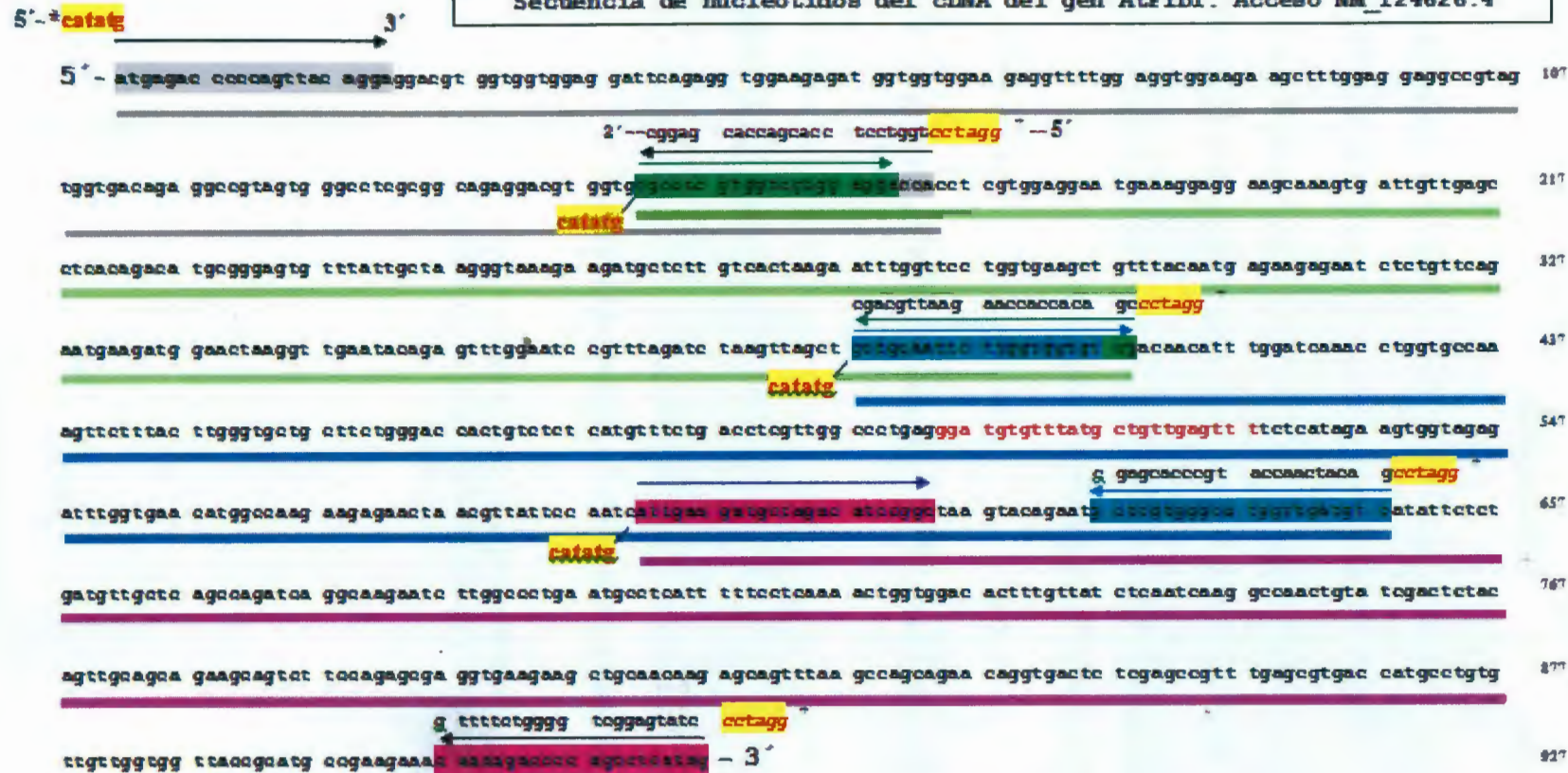
| NM 118695.3_Fib2_cADN |                                       |            |
|-----------------------|---------------------------------------|------------|
| Nombre                | 5'-3'                                 | Largo (pb) |
| 2_F1                  | <b>CATATGATGAGACCTCCTCTAACTGGAAG</b>  | 24         |
| 2_R4                  | <b>GGATCCTCTAAGCAGCAGTAGCAGCCTTTG</b> | 24         |

Los iniciadores para la fibrilarina 2 amplifican el gen en su totalidad.

5'- **CATATG**= secuencia de reconocimiento de la enzima NdeI

5'- **GGATCC**= secuencia de reconocimiento de la enzima BamHI

Secuencia de nucleótidos del cDNA del gen AtFib1. Acceso NM\_124626.4

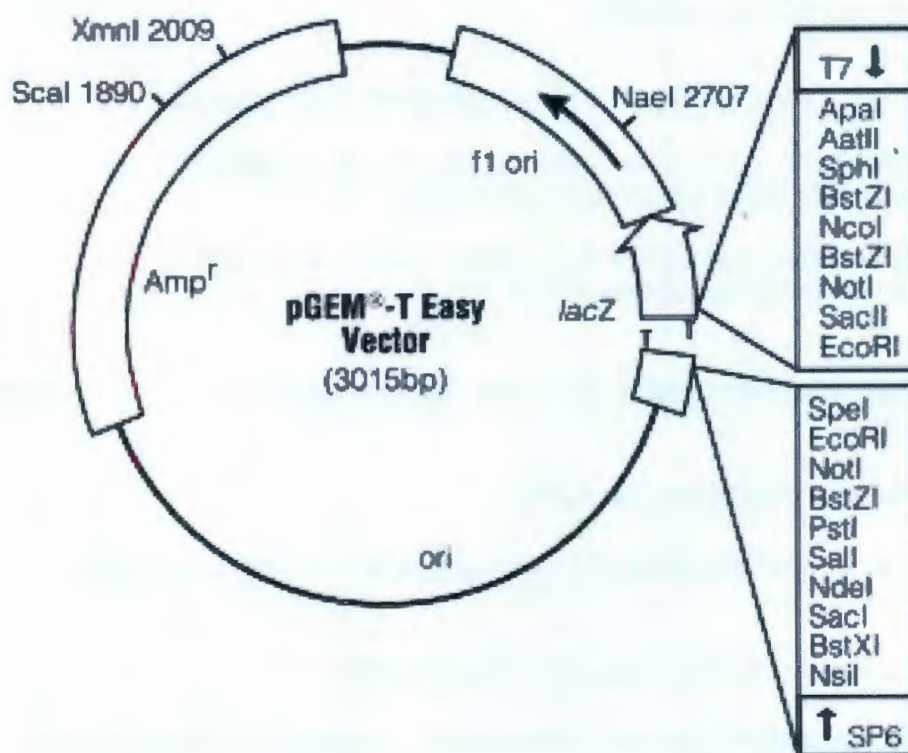


gga tgtgtttatg ctgttgagttt Secuencia que codifica para los aminoácidos que se unen a RNA

- \* secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Mde I unida a todos los oligonucleótidos forward
- + secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BamH I unida a todos los oligonucleótidos reverse
- Indica oligonucleótido forward dirección 5' - 3'
- ← Indica oligonucleótido reverse dirección 5' - 3'
- Dominio DAR (rico en arginina y glicina) - largo de 174 nt - 58 aminoácidos
- Dominio blanco - largo de 288 nt - 96 aminoácidos
- Dominio central ( 2 ) - largo de 261 nt - 87 aminoácidos
- Dominio rico en e-helices - largo de 226 nt - 112 aminoácidos



## Anexo II. pGEM-T Easy vector de promega (3015 pb)



Es un vector linealizado con una timidina unida a cada uno de los extremos terminales 3'. Esta timidina maximiza la ligación de los productos de PCR previniendo la re-circularización del vector. Como se observa en la figura contiene numerosos sitios de restricción flanqueando la región de clonación permitiendo liberar el inserto fácilmente. La reacción de ligación puede llevarse a cabo en una hora, sin embargo al incubarlo a 4°C durante toda la noche el rendimiento es mayor. Este vector permite la selección de las células transformadas utilizando como agente selectivo a la ampicilina. Este vector cuenta también con sitios de inicio de la transcripción para la ARN polimerasa T7 y para la SP6. Así mismo cuenta con sitios de reconocimiento para los iniciadores universales M13, para el promotor SP6 y para el promotor T7 con los cuales se puede secuenciar el inserto.

---

### Anexo III. Células competentes (DH5alpha, TOP10, BL21)

La obtención de células competentes es un paso crucial ya sea para amplificar plásmidos o la expresión de proteínas de interés. El método utilizado en este estudio es por cloruro de calcio.

1. Incubar *E. coli* a 37°C por 16 horas en placas de agar LB
2. Transferir una colonia a 3 ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación constante a 200 rpm toda la noche (12-16 h).
3. Transferir 0.5 ml del cultivo a 50 ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación, hasta que la densidad óptica a 590 nm sea de 0.3 a 0.4 (aproximadamente 3-4 horas)
4. Transferir 50 ml de células a un tubo de propileno frío y estéril y mantenerlo por 10 min a 4°C.
5. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min
6. Decantar el sobrenadante y re suspender el paquete celular en 25 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril y frío (0.1 M)
8. Incubar el tubo en hielo durante 10 min a 4°C.
9. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min a 4°C, decantar el sobrenadante
11. Resuspender el paquete celular en 1-2 mL de CaCl<sub>2</sub> estéril y frío (0.1 M).
12. Las células competentes pueden ser usadas inmediatamente o almacenadas por 24-48 h a 4°C.
13. Para periodos de almacenamiento más largos hacer células competentes nuevas de preferencia.



---

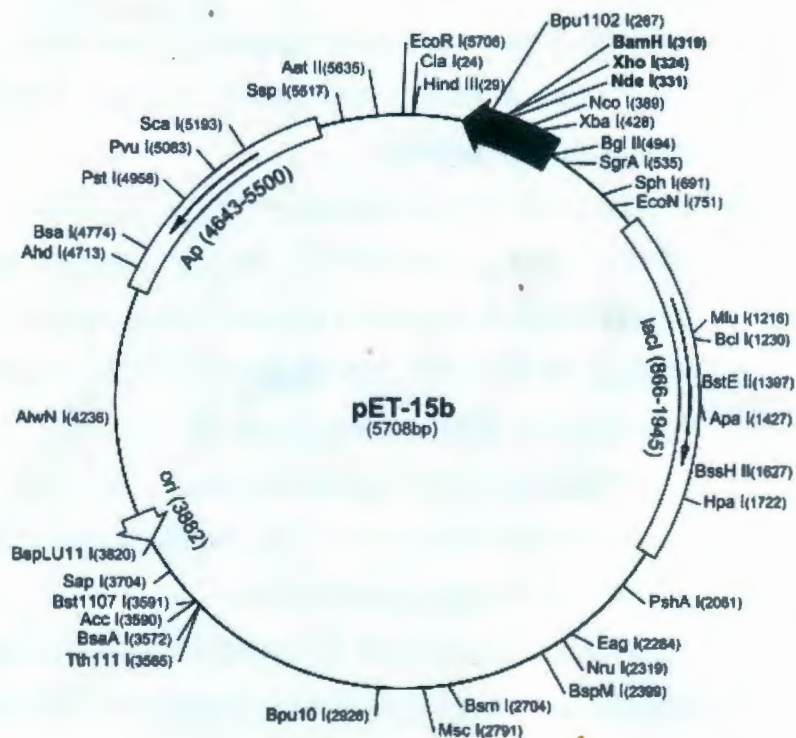
Anexo VI. Extracción de plásmido

1. Partir de 2 ml de cultivo incubado toda la noche en LB-ampicilina
2. Centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos. Remover el sobrenadante por aspiración con pipeta.
3. Resuspender el precipitado en 100 µl solución I + 1 µl ARNsa (10 mg/ml) .
4. Agregar 100 µl solución II fresca. Mezclar por inversión de tubos (15 veces). Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 300 µl solución III. Mezclar por inversión de tubos (15 veces), y dejar 5 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 rpm 5 minutos.
7. Transferir sobrenadante a tubo nuevo agregar 100 µl de fenol y 100 µl de cloroformo. Mezclar por inversión.
8. Centrifugar a 12000 rpm 5 minutos. Tomar el sobrenadante con pipeta.
9. Agregar 2.5 veces el volumen de etanol al 100% he incubar durante 2 horas a -20 °C
10. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos, decantar.
11. Lavar el precipitado con 100 µl de etanol 75%. Centrifugar brevemente y retirar el sobrenadante con pipeta.
12. Dejar secar el precipitado y resuspender en 30 µl de H<sub>2</sub>O.

## Anexo V. Vector pET-15b

**pET-15b sequence landmarks**

|                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------|------------|
| T7 promoter                                               | 453-469    |
| T7 transcription start                                    | 452        |
| His-Tag coding sequence                                   | 362-380    |
| Multiple cloning sites<br>( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI) | 319-335    |
| T7 terminator                                             | 213-259    |
| <i>lac</i> I coding sequence                              | (886-1945) |
| pBR322 origin                                             | 3882       |
| <i>bla</i> coding sequence                                | 4643-5500  |



El vector pET-15b cuenta con una secuencia N-terminal His-Tag seguida de 3 sitios de clonación. Con esto al expresar la proteína de interés su purificación se facilitara ya que se une a iones cobalto o níquel y se puede eluir con imidazol. La región de expresión se encuentra flanqueada por el promotor y el terminador T7 lo cual lo hace una excelente opción para utilizarlo en células BL21 que expresan la polimerasa T7, así mismo tiene la secuencia de unión a ribosoma. Se puede usar con ampicilina como agente selectivo.