



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio de la fibrilarina mediante mutagénesis

Tesis que presenta

Andrea Bayona Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular

Mérida, Yucatán, México

2019

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: _____

Andrea Bayona Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Estudio Funcional de la fibrilarina en la progresión viral en plantas no.1572 en el que participe bajo la dirección del Dr Enrique Castaño de la Serna.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) y a la dirección adjunta de Posgrado y becas, por haberme otorgado la beca nacional con el numero de becario 634339 gracias a la cual me fue posible completar mis estudios de posgrado. Asi como a las becas de movilidad otorgadas en los periodos de abril a julio del 2018 y de marzo a junio del 2019.

Al Centro de Investigacion Cientifica de Yucatán por las instalaciones y recursos prestados para realizar mi trabajo de tesis de maestría, asi como al Institute of molecular genetics of the Czech Academy of Sciences en el departamento de Biología del núcleo celular por la oportunidad de realizar 2 estancias de investigacion cruciales en las que se realizaron experimentos fundamentales para concretar mi trabajo de tesis. En especial el trabajo con células humanas y las imagenes de microscopía 3.2 a la 3.16 incluidas en esta tesis.

A mi asesor de tesis, el Dr. Enrique Castaño de la Serna por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su guía y asesoramiento constante a lo largo de la maestría y en general en mi formación profesional. Por la paciencia hacia mi forma de trabajar y la ayuda a crecer y madurar poco a poco en mi carrera científica. La ciencia también es una forma de arte.

A la Dra. Ileana Echevarria Machado y la Dra Ana Ly Arroyo Herrera por ser un comite siempre tan propositivo y paciente, asi como su disposición a revisar y atender mis dudas para darle forma a este proyecto y a disfrutar de cada tutorial como una oportunidad para mejorar mi trabajo y contribuir de forma tan grande a mi formación.

A la Dra. Luisa Lopez Ochoa y al Dr. Luis J. Figueroa Yañez por su paciencia y dedicación a la revisión de mi tesis de maestría, pues sus correcciones fueron indispensables para la culminación de este trabajo.

A la Ing. Wilma Gonzalez Kantún por su apoyo técnico y paciencia durante el tiempo que trabajé en el laboratorio. A la M. en C. Ángela Kú González, por su ayuda y apoyo técnico en el microscopio confocal, asi como los consejos brindados que fueron muy útiles.

Al Dr. Pavel Hozák y a todo su equipo de trabajo, por la oportunidad de realizar mis estancias en su laboratorio. Por el aporte académico y los consejos que recibí a lo largo del tiempo que estuve en ella, sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible. Sobre todo por la hospitalidad que me brindaron y las parrilladas despues de seminarios.

A la Dra. Margarita Sobol por inspirarme a ver el lado artístico de la microscopía y toda la información que esta puede aportar, asi como a trabajar de forma inteligente en la labor científica.

A la M. en C. Cecilia Aquino Pérez por su invaluable ayuda y consejos en el trabajo con células humanas y las tardes dedicadas a la toma de café e imagenes en el microscopio, pero sobre todo el apoyo y amistad en los momentos indicados, por eso y mas mi agradecimiento infinito.

A Jana y Rossie por su apoyo y amistad a pesar de las barreras del idioma, gracias por los ratos amenos y los paseos en el parque.

A los integrantes del laboratorio 23 de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular en plantas por su disposición a la realización de proyectos conjuntos y a las tardes de café.

A los amigos en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, que se encuentran repartidos en las diferentes unidades, gracias por su apoyo y ánimo en los buenos y malos momentos y por su sincera amistad.

DEDICATORIAS

Le dedico esta tesis y todo el trabajo realizado dentro y fuera de ella a mi familia, por el apoyo incondicional y su disposición para escuchar, por estar tan cerca a pesar de la distancia.

A mi madre Candelaria Hernández y padre Arnulfo Bayona por su infinita paciencia y comprensión en los momentos de separación, por creer en mi y motivarme a seguir andando. Ante todo por enseñarme que se aspira en la vida a ser útil y buena persona, en guiarme con honradez y gratitud ante Dios y ante la vida. Gracias por siempre hacerme sentir amada y bienvenida.

A mis hermanos, Leonardo Bayona Hernández por todo tu apoyo en los momentos más oscuros y muy a tu manera dandome los animos que no sabia que necesitaba y a José Bayona Hernández por tus animos constantes y sentido del humor sin importar la situación. Gracias por hacerme tan divertido volver a casa.

A Germán, por ser el amigo que siempre soñé tener. Por tu estoicismo ante todo y buena voluntad que inspira y contagia. Gracias por creer en mi y alegrarte de mis exitos, mi agradecimiento infinito.

A menina, por tu compañía en la vida y los desvelos.

A Gina y Mia, nos veremos mas allá del jardin.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.1.1 El Nucléolo.....	2
1.1.2 Influencia de fibrilarina en la morfología nuclear.....	5
1.1.3 La Fibrilarina.....	6
1.1.4 Estructura de fibrilarina y sus dominios.....	8
1.1.5 Mutantes de fibrilarina.....	10
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	12
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	12
1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	13
CAPÍTULO II.....	14
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1.1 Selección de sitios de mutación.....	14
2.1.2 Método de mutagénesis por plásmido completo.....	14
2.1.3 Transformación por choque térmico de células de <i>E. coli</i>	16
2.1.4 Expresión de proteínas.....	16
2.1.5 Extracción y purificación de proteínas.....	16
2.1.6 Inmunodetección de HsFib y mutantes.....	17
2.1.7 Extracción de RNA.....	18

2.1.8 Ensayos de actividad RNasa en geles de agarosa	18
2.1.9 Cultivo de células de mamíferos	18
2.1.10 Transfección transitoria de células U2OS con el vector pSTR-Fibrilarina_GFP y sus derivados mutantes.....	18
2.1.11 Ensayos de estrés por temperatura en células U2OS transfectadas con mutantes de fibrilarina.....	19
2.1.12 Generación de líneas celulares estables.....	19
2.1.13 Sistema de inmunofluorescencia indirecta con vector pSNAPf con el inserto de fibrilarina.....	19
CAPITULO III.....	20
3.1 RESULTADOS.....	20
3.1.1 Alineamiento entre fibrilarina.....	21
3.1.2 Oligos para generar mutantes de HsFib.....	21
3.1.3 Estandarización de condiciones de reacción de PCR para mutagénesis	22
3.1.4 Recircularización de plásmido y transformación en <i>E. coli</i>	22
3.1.5 Generación de líneas celulares estables.....	23
3.1.6 Análisis de fibrilarina silvestre	25
3.1.7 Transfecciones transitorias de mutantes de fibrilarina con etiqueta de GFP en líneas celulares estables Fib-SNAP	29
3.1.8 Mutante T208A	30
3.1.9 Mutante D216N.....	34
3.1.10 Ensayos de estrés por temperatura en mutantes de Fib-GFP en líneas celulares estables Fib-SNAP	37
3.1.11 Análisis de mutante GVF95AAA	37
3.1.12 Análisis de mutante K131E, A250P.....	42
3.2 DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES.....	48

BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXOS.....	1
Verificación de obtención de inserto de las células transformadas.....	1
Oligonucleotidos para generar mutantes de Hsfib.....	2
Estandarización de condiciones de reacción de PCR para mutagénesis	4
Recircularización de plásmido y transformación en <i>E. coli</i>	6
Inducción de proteínas.....	8
Purificación de proteínas recombinantes	8
Extracción de RNA de inflorescencias de brócoli.....	9
Ensayo de actividad RNAsa con HsFib.....	10
Mutantes de fibrilarina en vector de expresión en bacterias.....	11
Análisis del tamaño de núcleos de mutantes de fibrilarina y silvestre	13

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Organización nucleolar bajo condiciones fisiológicas en células de mamíferos..	3
Figura 1. 2 Células HeLa con depleción de fibrilarina por siRNA muestran una morfología nuclear anormal	5
Figura 1. 3 A) Polarización de la lámina nuclear A/C junto con fibrilarina.....	6
Figura 1. 4 Estructura secundaria de la caja C/D.....	7
Figura 1. 5 Representación de la estructura primaria de fibrilarina.....	9
Figura 1. 6 Estructura de AtFib2.....	10
Figura 3. 1 Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre fibrilarina en humanos (HsFib), fibrilarina 1 (AtFib1) y fibrilarina 2 (AtFib2) de <i>Arabidopsis thaliana</i> , de <i>Mus musculus</i> (MmFib), y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ScFib).	21
Figura 3. 2 Transfecciones en líneas celulares estables Fibrilarina-SNAP.....	25
Figura 3. 3 Fibrilarina WT con etiqueta de SNAP y etiqueta de GFP. Imagen de súper resolución	27
Figura 3. 4 Análisis de intensidad de pixel en Fibrilarina WT.	28
Figura 3. 5 Análisis de intensidad de pixel en fibrilarina silvestre en condiciones de estrés a 45°C.....	29
Figura 3. 6 Transfección transitoria de la mutante T208A en línea estable de Fib-SNAP en diferentes campos, mostrando los canales de DAPI, GFP, SNAP y un acercamiento.....	31
Figura 3. 7 Porcentaje de la cantidad de nucléolos en células transfectadas con T208A y tamaño promedio de los nucléolos en células transfectadas con la mutante.	32
Figura 3. 8 Análisis de intensidad de pixel en nucléolos transfectados con mutante T208A utilizando ImageJ Fiji..	34
Figura 3. 9 Transfección transitoria de la mutante D216N en condiciones normales de crecimiento co localiza con Fib-SNAP por lo que no se aprecian cambios significativos en su localización.	35
Figura 3. 10 Análisis de intensidad de pixel en mutante D216N.....	36
Figura 3. 11 Transfección transitoria de la mutante GVF95AAA (G95A, V96A, F97A) en condiciones normales de crecimiento y en condiciones de estrés por temperatura a 45°C.	39

Figura 3. 12 Análisis de intensidad de pixel de la mutante GVF95AAA en condiciones de crecimiento normales a 37°C y 5% de CO2.	40
Figura 3. 13 Análisis de intensidad de pixel de la mutante GVF95AAA en condiciones de estrés a 45°C Y 5 % de CO2.	41
Figura 3. 14 Transfección transitoria de la mutante K131E, A250P en condiciones normales de crecimiento y en condiciones de estrés por temperatura.	43
Figura 3. 15 Análisis de intensidad de pixel de la mutante K131E, A250P en condiciones de crecimiento.	44
Figura 3. 16 Análisis de intensidad de pixel de la mutante K131E, A250P en condiciones de estrés.....	45

Anexo 1 Vectores a utilizar a) Vector pet42b de expresión en bacteria b)vector de expresión en bacteria pET15b con inserto de fibrilarina entre BamHI y XhoI c)Vector de expresión en células de mamíferos con etiqueta de GFP d)Vector de expresión en células de mamíferos con etiqueta de fluorescencia indirecta SNAP.	1
Anexo 2 Listado de oligos diseñados para mutagénesis por plásmido completo.	4
Anexo 3 Pruebas con dos diferentes polimerasas	5
Anexo 4 Producto de pcr de mutagénesis con Hot start polimerasa. Gel de agarosa al 1% teñido con red safe.	6
Anexo 5 Miniprep de células E. coli transformadas con producto de PCR recircularizado. Gel de agarosa al 1% teñido con red safe.	7
Anexo 6 Lista de mutantes de fibrilarina confirmadas por secuenciación en el vector pSTR GFP para transfección.	7
Anexo 7 Purificación e inmunodetección de HsFib..	8
Anexo 8 Purificación de HsFib con dos resinas.	9
Anexo 9 Purificación de RNA. Realizado con kit innu prep plant RNA en la que se pueden ver las bandas correspondientes a 28S y 18S Gel de agarosaal 1% teñido con bromuro de etidio.....	10
Anexo 10 Ensayo de actividad RNAsa de HsFib.....	11
Anexo 11 Miniprep de células E. coli transformadas con producto de PCR recircularizado. Gel de agarosa al % teñido con red safe..	12

Anexo 12 Oligos para amplificar fragmento de fibrilarina y fragmento amplificado. Los oligos fueron diseñados para flanquear fibrilarina y en el gel se puede observar una banda cercana a mil pb.	13
Anexo 13 Análisis de tamaño de núcleos de fibrilarina silvestre en condiciones fisiológicas de crecimiento, ejemplo del tipo de células que se analizaron para el estudio.	13
Anexo 14 Análisis de tamaño de núcleos de fibrilarina silvestre en condiciones de estrés a 45°C, ejemplo del tipo de células que se analizaron para el estudio.	14
Anexo 15 Análisis de tamaño de núcleos en transfecciones de la mutante T208A.	15
Anexo 16 Análisis de tamaño de núcleos en transfixiones de la mutante D216N.	16
Anexo 17 Mediciones de tamaño de núcleos para el análisis del área promedio de los núcleos en la mutante GVF95AAA en condiciones fisiológicas y condiciones de estrés a 45°C.	17
Anexo 18 Análisis del tamaño promedio de núcleos transfectados con la mutante K131E, A250P en condiciones de crecimiento fisiológicas y en condiciones de estrés a 45°C.	18

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de elementos para la reacción de pcr con Phusion hot start taq polimerasa	15
Cuadro 2. Condiciones del programa del termociclador para pcr para mutagénesis	15
Cuadro 3. Listado de oligos diseñados para mutagénesis por plásmido completo.	22
Cuadro 4. Mutantes de fibrilarina confirmadas por secuenciación.	23

ABREVIATURAS

ADN Acido Desoxirribonucleico

ADNr Acido Desoxirribonucleico ribosomal

AGT O6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa

ARN Ácido Ribonucleico

DFC Componente fibrilar denso

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

FC Componente fibrilar

GC Componente granular

GFP Green fluorescent protein

HsFib Fibrilarina de *Homo sapiens*

IPTG isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PEi Polyethylenimine

PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PtdIns Fosfatidil inositol

RNP Ribonucleoprotein

rRNA Ácido Ribonucleico ribosomal

siRNA small interfering RNA/ pequeño ARN de interferencia

snoRNAs small nucleolar RNA/ pequeños ARN nucleolares

snoRNP Small nucleolar RNA

snRNP Small nuclear RNA

μ l Microlitros

μ m Micrómetro

RESUMEN

Este trabajo se centra en la generación de mutaciones en fibrilarina y mediante su análisis dilucidar sitios de importancia para su correcto funcionamiento y localización. Para poder realizar la determinación de fenotipos o características de las mutantes se utilizó un sistema de células U2OS que expresan de forma estable fibrilarina silvestre con una etiqueta de SNAP. Este sistema permite hacer una comparación entre ambas, mutante y silvestre, y permitirá utilizar la proteína silvestre Fib-SNAP como sensor de estrés y determinar la influencia de las mutaciones realizadas en la secuencia de fibrilarina.

ABSTRACT

This work focuses on the generation of fibrillar mutants and the analysis of relevant sites in the sequence for the proper function and localization in the cell. To determine the phenotypes and characteristics of the mutants have been used a stable U2OS cell culture expressing WT fibrillar with a SNAP label. This system allows a comparison between the mutant and the WT fibrillar as a stress sensor and determines the influence of the mutations in the fibrillar sequence.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El nucléolo es la mayor estructura nuclear, así mismo este puede variar en número y dependiendo de cada célula. Es también considerado un sensor de estrés debido a que bajo condiciones de estrés se produce una redistribución de proteínas ribosomales en el nucleoplasma. Este orgánulo sin membrana tiene como función principal la síntesis del pre ARN ribosomal y la biogénesis de los ribosomas, esto se refleja en las estructuras que lo conforman, el componente fibrilar, componente fibrilar denso y componente granular (Boulon, Westman, Hutten, Boisvert, & Lamond, 2010; Kalinina, Makarova, Makhotenko, & Love, 2018; Sirri, Urcuqui-Inchima, Roussel, & Hernandez-Verdun, 2008).

La fibrilarina es una proteína nucleolar esencial para la vida y se encuentra altamente conservada a través de la evolución. Está encargada de procesos clave como la biogénesis ribosomal y en modificaciones postranscripcionales del ARN ribosomal como la metilación y la pseudouridilación (Rodriguez-Corona, Sobol, Rodriguez-Zapata, Hozak, & Castano, 2015). Se ha demostrado que es una proteína clave para el desarrollo. Experimentos realizados en embriones de ratones a los que se les realizó una depleción de esta proteína de forma homocigota no pudieron continuar su división más adelante de la fase de mórula a diferencia de los que la conservaron (Newton, Petfalski, Tollervey, & Cáceres, 2003). Una de las funciones más importantes de fibrilarina es la metilación sitio específica de rRNA, snRNA y la metilación de la histona H2A. Para esto es necesaria la formación de complejos con otros elementos como las proteínas nucleolares Nop56, Nop58, 15.5k y snoRNAs (Deogharia & Majumder, 2018; Loza-Muller et al., 2015; Rakitina, Taliansky, Brown, & Kalinina, 2011)

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 El Nucléolo

El nucléolo es la estructura de mayor tamaño y es considerado un dominio multifuncional dentro del núcleo que desempeña funciones cruciales como la biogénesis ribosomal, incluyendo los procesos de transcripción del rDNA, procesamiento del rRNA y el ensamble de ribosomas. En las células de mamíferos se pueden distinguir tres componentes principales: El componente fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD), y el componente granular (CG), estos compartimientos subnucleolares se pueden observar en la figura 1.1. Este es un elemento crucial en el núcleo celular pues también se encuentra ligado a procesos de estrés debido a la redistribución de las proteínas ribosómicas en el nucleoplasma por la disrupción de nucléolos y está relacionado en el proceso de infección viral, ya que los virus interactúan con el nucléolo reclutando proteínas nucleolares para facilitar la replicación del virus (Rajamaki & Valkonen, 2009; Sirri et al., 2008).

La morfología y el tamaño de este organéolo están ligadas a su actividad y esta del crecimiento celular y el metabolismo. Dentro del nucléolo se le atribuyen regiones específicas a funciones como el procesamiento de pre rRNA en el CF o en el límite entre el CF y el CFD que son ricos en componentes de la maquinaria de ARN Pol I, al CFD por componentes de procesamiento del pre rRNA como snoRNAs y snoRNP como fibrilarina y Nop58. El CG además de contener al CF y CFD se conoce como el lugar donde se realiza el ensamble de las subunidades ribosomales (Boulon et al., 2010).

CAPÍTULO I

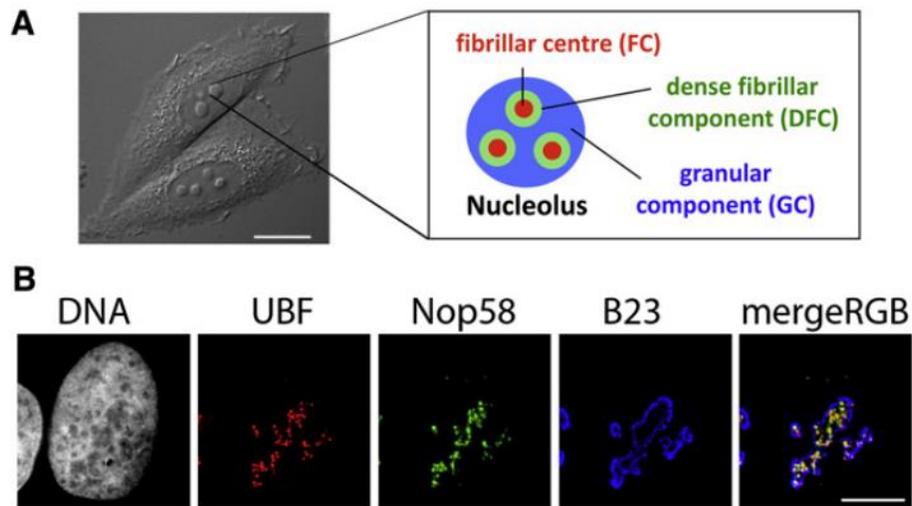


Figura1. 1 Organización nucleolar bajo condiciones fisiológicas en células de mamíferos. A) Célula HeLa con una representación de los componentes del nucléolo. B) Microscopía de fluorescencia en la que se muestran los compartimientos subnucleolares en células humanas U2OS. Visualizando en CF usando anticuerpos contra UBF, el CFD con anticuerpos contra Nop58 y el CG con anticuerpos contra B23. Escala 10um (Boulon et al., 2010).

Entre las proteínas nucleolares destaca fibrilarina, la cual es una proteína que ha sido conservada en su estructura y función a través de la evolución y se localiza principalmente en la región FC y DFC del nucléolo así como en los cuerpos cajales, donde está directamente implicada en varios pasos de la biogénesis ribosomal, por lo que también es utilizado como marcador para nucléolos activos (Rodríguez-Corona et al., 2015).

El nucléolo es clave en la respuesta a estrés celular al detectar y reaccionar a diferentes estímulos. Los cambios o perturbaciones en la estructura y función del nucléolo afectan la biogénesis ribosomal, los efectos sobre este proceso y el crecimiento celular inducido por diferentes tipos de estrés a menudo se acompañan de cambios de organización y composición del nucléolo. Un mecanismo clave consiste en la liberación de proteínas ribosómicas al nucleoplasma, otros efectos se observan en diferentes tipos de estrés, como la disrupción de nucléolos con estrés

CAPÍTULO I

por altas temperaturas y la segregación de los mismos en presencia de UV (Boulon et al., 2010; Pfister, 2019).

CAPÍTULO I

1.1.2 Influencia de fibrilarina en la morfología nuclear

Fibrilarina es esencial para la morfología de los núcleos, pues los ensayos con siRNA para atenuar la expresión de fibrilarina demuestran una morfología anormal, por otro lado, un ensayo de inmunofluorescencia con B23 muestra que los nucléolos no sufren cambios como en el núcleo. Se piensa que puede tener un rol en la matriz nuclear por la interacción con otras proteínas nucleares y elementos como la lámina nuclear. Una depleción de fibrilarina realizada por Amin y colaboradores en 2007 demuestra como la ausencia de esta proteína produce una morfología anormal en los núcleos celulares, lo que puede observarse en la figura 1. 2.

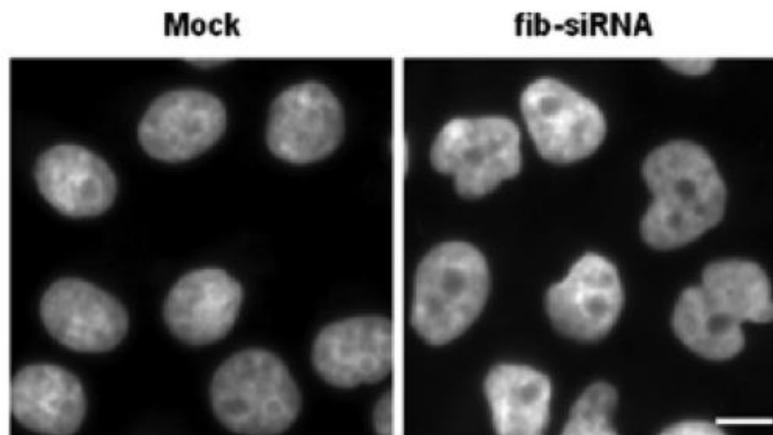


Figura1. 2 Células HeLa con depleción de fibrilarina por siRNA muestran una morfología nuclear anormal (Amin et al., 2007)

Previamente se determinó que la heterocromatina tiende a localizarse cerca de la lámina nuclear, este experimento utilizó a fibrilarina como un marcador para el componente fibrilar denso, en el que se transcribe activamente el RNA ribosomal. Fibrilarina, se encuentra polarizada hacia la parte superior del núcleo celular, donde se encuentra la mayor concentración de lámina A/C, formando una capucha o domo de actina. Cuando esta capucha de actina es degradada se produce la relocalización tanto de la lámina A/C como de fibrilarina como puede observarse en la figura 1.3. Este estudio muestra que existe una organización radial específica para la lámina A/C que causan la polarización de dominios de transcripción como el componente fibrilar (D. Kim & Wirtz, 2015).

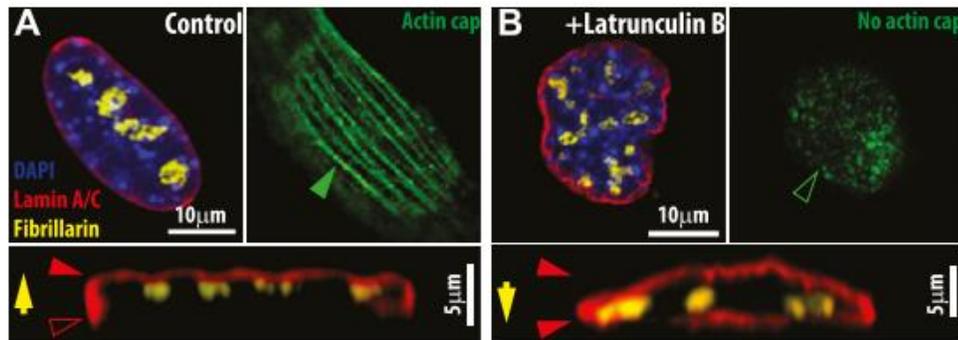


Figura1. 3 A) Polarización de la lámina nuclear A/C junto con fibrilarina B) Tratamiento para eliminar la capucha de actina promueve la relocalización de componentes del núcleo (D. Kim & Wirtz, 2015).

1.1.3 La Fibrilarina

La fibrilarina es una de las proteínas nucleolares más estudiadas e importantes, que se ha demostrado es esencial para la vida. Sus principales funciones son la metilación y el procesamiento de pre-rRNA y es requerida en el proceso de biogénesis ribosomal. Además de ser una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución. La conservación de la estructura de la fibrilarina podría deberse no solo a que el dominio de la metiltransferasa sea altamente conservado, sino también al hecho de que la fibrilarina funciona en el contenido de un complejo macromolecular altamente conservado (Jansen et al., 1991; Rodríguez-Corona et al., 2015; Shubina, Musinova, & Sheval, 2016).

Dentro de las moléculas estudiadas que están involucradas en la regulación y expresión génica se consideran al RNA, DNA, algunas proteínas como fibrilarina y recientemente a los fosfolípidos que tienen un papel importante en la arquitectura y función nuclear (Rodríguez-Corona et al., 2017; Sobol et al., 2013).

Los snoRNA están involucrados en el procesamiento del pre rRNA en el nucléolo, funcionan como ARN de guía mediante el emparejamiento de bases con sitios específicos del pre rRNA y están involucrados en la metilación y la pseudouridilación de los rRNA estos se encuentran asociados a las proteínas nucleolares 15.5kD, Nop56, Nop58 y la fibrilarina. La mayor parte de las actividades postranscripcionales en la síntesis ribosomal, procesamiento del pre rRNA, modificaciones en el rRNA y el ensamblaje ribosomal son

CAPÍTULO I

dependientes de fibrilarina (Lechertier, Grob, Hernandez-Verdun, & Roussel, 2009; Tollervey, Lehtonen, Jansen, Kern, & Hurt, 1993).

En el RNA la metilación y la conversión de las uridinas en pseudouridinas son dos de las modificaciones post transcripcionales de mayor prevalencia. En las células eucariotas los snoRNA son un grupo de RNA no codificantes que sirven de guía para estas modificaciones, las cuales son necesarias para la unión de proteínas con dominios de unión RNA. Estos RNA guías tienen secuencias específicas que permiten, por complementariedad, la formación del complejo, en la figura 1.4 se puede apreciar una representación de como estos RNA forman parte esencial para la formación del complejo entre proteínas (Deogharia & Majumder, 2018).

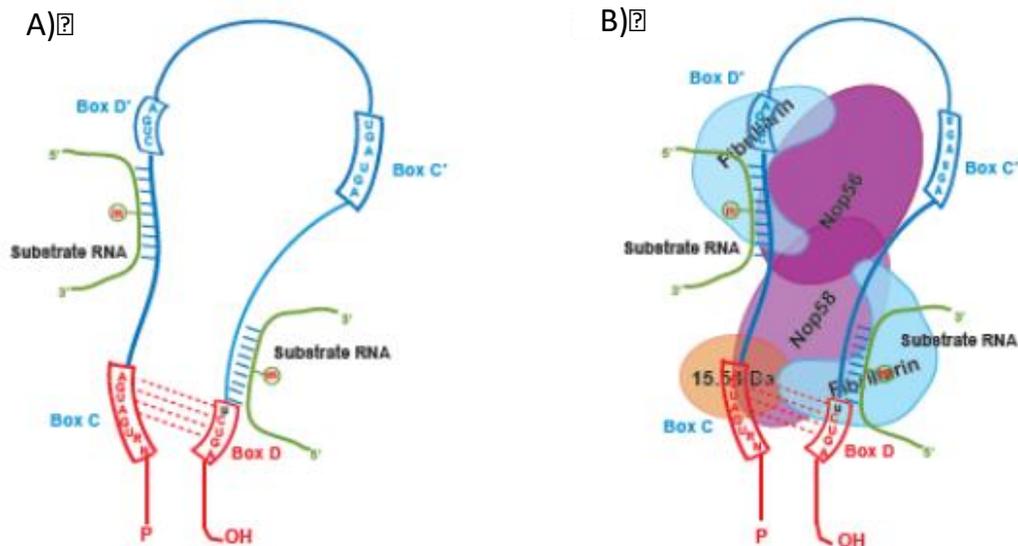


Figura1. 4 Estructura secundaria de la caja C/D A) Representación de la caja C en rojo y D en azul de la estructura RNA guía B) Caja C/D con las proteínas que conforman el complejo de metilación. Fibrilarina (azul), Nop58 (morado), Nop56 (violeta oscuro), 15.5k (naranja) (Deogharia & Majumder, 2018).

En plantas la fibrilarina se une directamente a un RNA guía junto con Nop56, Nop58, y 15.5ka para formar un complejo snoRNP que selecciona los sitios que deben ser metilados en el procesamiento del RNA ribosomal. También se determinó que NOP1 en levadura metilaba la histona H2A en las regiones nucleolares (Loza-Muller et al., 2015).

CAPÍTULO I

Se ha estudiado a la fibrilarina como un componente importante para el desarrollo en células animales. Se analizó el efecto de la depleción de fibrilarina en embriones de ratón, en forma heterocigota y homocigota, se demostró que las células con depleciones homocigotas de fibrilarina se truncaron en la etapa de mórula, conduciendo a la letalidad embrionaria, sugiriendo que esta proteína es esencial para el desarrollo (Newton et al., 2003).

Estudios en fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* han mostrado que la fibrilarina 1 y la fibrilarina 2 tienen un perfil de unión a fosfolípidos diferente, pues mientras AtFib1 interactúa con PtdIns (4) P AtFib2 se une a todos los fosfolípidos, así como a ácido fosfatídico (PA). En este estudio también se demostró que AtFib2 posee la capacidad de degradar ARN a diferencia de AtFib1 (Rodríguez-Corona et al., 2017)

La fibrilarina es esencial en los RNPs virales y pueden estar relacionados en la progresión de virus de plantas y animales que interactúan con el nucléolo. Se ha demostrado que la fibrilarina está involucrada en al menos dos procesos del ciclo de vida del virus de roseta del maní, pues funciona en la formación de partículas virales de RNP que son capaces de moverse a larga distancia y causar infección viral sistémica (S. H. Kim et al., 2007; Rakitina et al., 2011).

En las células de cáncer de mama, la desregulación de la fibrilarina causada por la reducción del nivel de p53 produce un aumento del nivel de fibrilarina y un mayor nivel de metilaciones aberrantes en el rRNA que conduce a una actividad ribosómica alterada, lo que lleva al deterioro en la fidelidad de la traducción y aumento del sitio de entrada al ribosoma de genes clave del cáncer (Marcel et al., 2013).

1.1.4 Estructura de fibrilarina y sus dominios

La secuencia de fibrilarina puede ser dividida en dos grandes dominios: uno N-terminal y un dominio MTasa. La secuencia de fibrilarina se puede dividir en cuatro regiones: el dominio GAR, la región espaciadora (BCO), el dominio central con la región de unión al ARN y un dominio rico en la hélice alfa. El dominio GAR es típicamente el menos conservado y contiene un motivo no estructural que está metilado en células humanas (Loza-Muller et al., 2015; Rodríguez-Corona et al., 2015).

CAPÍTULO I

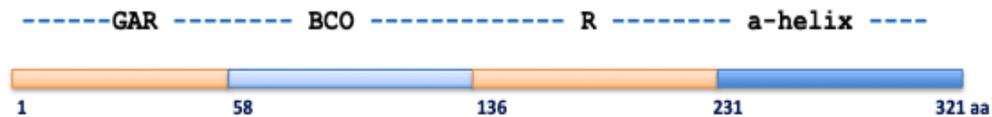


Figura1. 5 Representación de la estructura primaria de fibrilarina. La secuencia de fibrilarina se encuentra dividida en 4 regiones: Dominio Gar que es rico en glicinas y argininas, BCO una secuencia de actividad indefinida en el dominio N-Terminal, un dominio metiltransferasa que tiene una secuencia conservada de unión a RNA (dominio R) y una región α -hélice que se conoce interactúa con Nop56/58 (a-helix).

El dominio GAR de fibrilarina ubicado en el extremo N-terminal se encuentra en eucariotas, pero es un dominio ausente en arqueas. Este dominio se caracteriza por ser rico en glicinas y argininas formando múltiples repeticiones RGG y RG que lo vuelven blanco de metilación para las metiltransferasas como la PMRT1 que metilan a fibrilarina dando lugar a la formación de metil-argininas. Algunos datos sugieren que este dominio no es requerido para la localización de fibrilarina en el nucleólo o en los cuerpos cajales, mientras que otros sugieren que le provee localización nucleolar en células de plantas y animales (Ai, Lin, Hsieh, & Li, 1999; Lin, Huang, Hsieh, Pollard, & Li, 2002; Shubina et al., 2016).

En fibrilarina se han identificado dos regiones adicionales de unión a RNA además del octámero GCVYAVEF. Una localizada en el dominio MTasa aminoácidos 138-179 y en la región C terminal del 225-281. Posee también un motivo conservado de unión a SAM que se ha encontrado en varias especies.

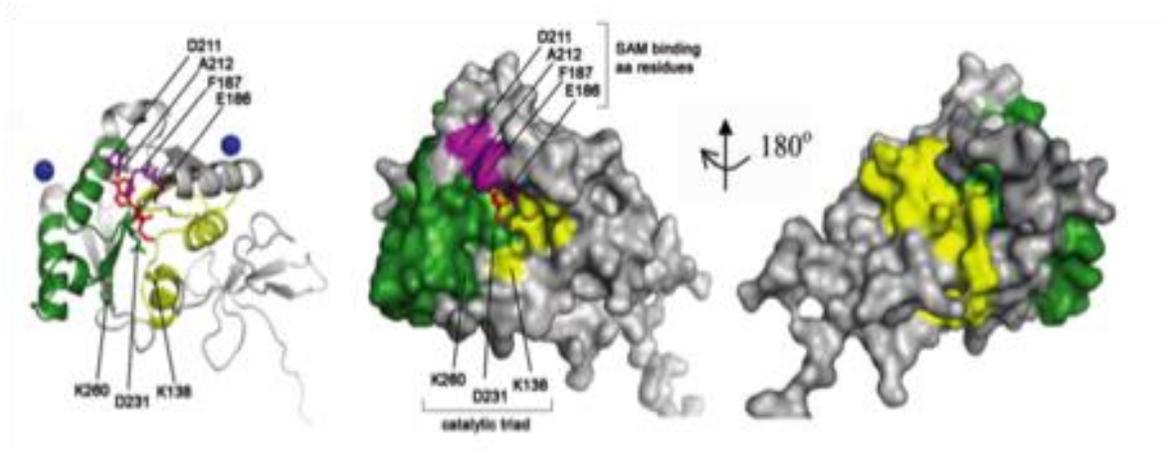


Figura1. 6 Estructura de AtFib2. Los residuos de aminoácidos que interactúan con el análogo de SAM en fibrilarina humana (E186-F187 y D211-A212) se muestran en color morado. Los residuos de aminoácidos de la tríada catalítica MTasa de AtFib2, K138 / D231 / K260 también están marcados. Se indican dos iones Ca^{2+} como esferas azules y el análogo SAM se muestra como una estructura en barras rojas (Rakitina et al., 2011).

Los residuos de aminoácidos que se demostró que interactúan con el análogo de SAM en fibrilarina humana corresponden al E186 y F187 y D211 y A212 están localizados fuera de los sitios de unión a ARN, pero muy cerca de ellos. Además, los aminoácidos del sitio catalítico MTasa de AtFib2 corresponden al K138 / D231 / K260 y residen dentro de los sitios de unión a ARN R- (K138) y rico en α -hélices (D231 y K260), representado en la figura 1.6 (Rakitina et al., 2011).

1.1.5 Mutantes de fibrilarina

El estudio de fibrilarina mediante mutagénesis ha sido utilizado para tratar de determinar los dominios que intervienen en su localización celular, los aminoácidos involucrados con su interacción del RNA, entre otras funciones, tanto mediante depleciones de los dominios como realizando mutaciones puntuales para evaluar los efectos en la funcionalidad de esta proteína. Utilizando fibrilarina silvestre (WT) y mutantes de fibrilarina con depleciones fusionados con GFP para demostrar que se requieren dominios específicos para la correcta localización intranuclear de fibrilarina en nucléolo y los cuerpos cajales. Llegando a la conclusión que el dominio GAR

CAPÍTULO I

incrementa la eficiencia de la localización de fibrilarina en nucléolo y dirige a la proteína al núcleo y está involucrado en la retención nucleolar. Este estudio por medio de deleciones en fibrilarina mostró que el dominio RNP y el dominio α hélice es necesario para su correcta localización (Rodríguez-Corona et al., 2015; Snaar, Wiesmeijer, Jochemsen, Tanke, & Dirks, 2000).

Fueron generadas mutantes puntuales en fibrilarina en sitios al azar y se estudió el efecto de dichas mutaciones en procesos como el procesamiento de pre rRNA, la metilación de rRNA, así como el ensamblaje de los ribosomas, dichas mutantes sensibles a temperatura tenían deficiencias para cumplir una función adecuada. Por lo que se llegó a la conclusión que además de que fibrilarina es esencial para la vida, que la mayor parte de las actividades postranscripcionales en la síntesis ribosomal como el pre-procesamiento del rRNA, la pre-modificación y el ensamblaje del ribosoma son dependientes de esta proteína (Tollervey et al., 1993)

1.2 JUSTIFICACIÓN

La fibrilarina es una proteína clave en el proceso de la biogénesis ribosomal, indispensable para el desarrollo celular, la morfología nuclear y la respuesta a estrés. El estudio de esta proteína por medio de la generación de mutantes permitirá realizar un análisis de los sitios que estén implicados en la localización y respuesta a estrés de fibrilarina en la célula.

1.3 OBJETIVO GENERAL

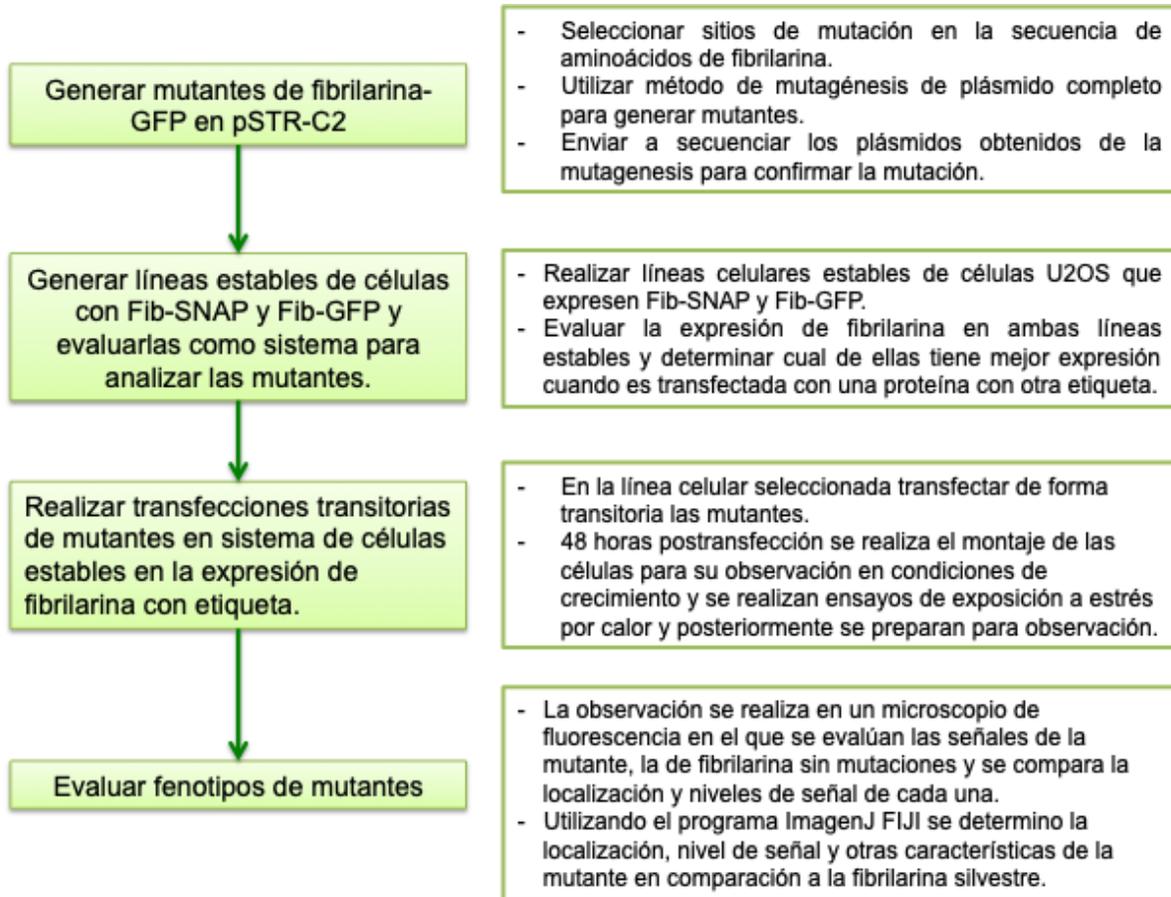
Analizar mutantes de fibrilarina humana con alteraciones de localización en la célula.

1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar mutantes de fibrilarina humana
2. Establecer un sistema para analizar fibrilarina silvestre como sensor de estrés y mutantes de fibrilarina humana
3. Analizar fenotipos y localización dentro de la célula por medio de software de análisis de imagen.

CAPÍTULO I

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II**2.1 MATERIALES Y MÉTODOS****2.1.1 Selección de sitios de mutación**

Los sitios elegidos para realizar las mutantes se seleccionaron en base a sitios conservados en la proteína, este análisis fue realizado por medio de un alineamiento de secuencias entre fibrilarina en humanos (HsFib), fibrilarina 1 y fibrilarina 2 de *Arabidopsis thaliana* (AtFib1 y AtFib2), *Mus musculus* (MmFib), y *Saccharomyces cerevisiae* (ScFib). Así también, ayudándose del programa CD3D para ubicar estos sitios en la estructura tridimensional estimada de la proteína.

Se tomaron en consideración sitios clave para el funcionamiento de esta proteína, como sitios de interacción con calcio, sitios de interacción con SAM y de actividad catalítica señalados en el estudio de Rakitina *et al.*, 2011.

Para realizar mutantes incapaces de ser metiladas, se seleccionaron sitios que fuesen sustrato para metiltransferasas como la PMRT1 cambiando las argininas que son posibles blancos de metilación, por aminoácidos que no cambiaran la carga y que además no pudieran ser metiladas por las metiltransferasas, en este caso se eligieron lisinas (Ai *et al.*, 1999).

2.1.2 Método de mutagénesis por plásmido completo

En este método se diseñaron dos oligonucleotivos para cada sitio de mutación, detallados mas adelante en el cuadro 2.3 y el anexo 2, en caso de mutantes con un solo un aminoácido a cambiar solo uno de ellos contiene la mutación, pero en caso de mutantes con cambios de 3 aminoácidos consecutivos las modificaciones fueron divididas en los 2 oligonucleotidos, todos se diseñaron para no sobrelaparse, esto se realizó con la ayuda del programa NEBaseChanger disponible en el sitio de New England Biolabs. La reacción en cadena de la polimerasa, siendo utilizada una PCR punto final, se usa para amplificar el plásmido circular para crear un templado lineal que contiene la secuencia sustituida, el plásmido utilizado como DNA templado fue el pSTR-GFP-HsFib. Este fragmento se recirculariza mediante ligación y el plásmido resultante se transforma utilizando células competentes *E. coli* DH5 α por choque térmico. Para este método se requiere de la

CAPÍTULO II

eliminación la cadena vieja o templado con una enzima DpnI y se recircularizó con la combinación de las enzimas kinasa T4 PNK de Thermo Scientific™ y T4 ligasa de Thermo Scientific™ siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante.

2.1.2.1 Condiciones de la reacción de pcr para mutagénesis.

Las condiciones para la reacción de PCR se basaron en las condiciones propuestas por Thermo Scientific™ Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polimerasa la junto a modificaciones que se consideraron en el proceso de estandarización para una reacción de 50 µl, especificadas en el cuadro 1 y 2.

Cuadro 2.1. Concentración de elementos para la reacción de pcr con Phusion hot start taq polimerasa

	Cantidad	Concentración final
10X Hot start buffer	5 µl	1X
dNTPs (2.5mM/u)	4 µl	0.20 mM
Primer Fw	4 µl	0.8 µM
Primer Rv	4 µl	0.8 µM
50mM de MgCl ₂	2 µl	2mM
Phusion Hot start taq	0.5 µl	
DNA templado	1 µl	0.01 µg
Agua	29.5 µl	

Cuadro 2.2. Condiciones del programa del termociclador para pcr para mutagénesis

	Temperatura	Tiempo
--	-------------	--------

Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos
25 Ciclos	98°C	10 segundos
	50-72°C	30 segundos
	72°C	6:30 minutos
Extensión final	72°C	10 minutos
Hold	4°C	-

2.1.3 Transformación por choque térmico de células de *E. coli*

Para la transformación de células de *E. Coli* DH5α se utilizaron células competentes obtenidas por el método de cloruro de calcio. Para esto se utilizaron 2 μl del plásmido en 200 μl de células competentes, se incubaron en hielo por 30 minutos y después se colocaron a 42°C por 90 segundos y se regresó al hielo. Se adicionaron 800 μl de LB y se agitó 45 minutos a 37 °C a 200 rpm y se plaquearon 200 μl en cajas con LB medio LB sólido con kanamicina como antibiótico de selección. Se incubó por 12 horas a 37°C y se seleccionó una la colonia de las que crecieron y se dejó en crecimiento para continuar con la sobreexpresión de proteínas en medio líquido y extracción de plásmido.

2.1.4 Expresión de proteínas

A partir de células de *E. coli* transformadas con el vector pET15b y pET42b con el inserto de HsFib se iniciaron cultivos, con una incubación de 12 horas a 37°C con agitación constante a 200 rpm en 3 ml de medio LB con ampicilina. Posteriormente se escaló a 100 ml de medio LB/Kan y se incubó en agitación constante hasta alcanzar 0.5 de densidad óptica. Al alcanzar la DO adecuada se adicionó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M para obtener una concentración final de 1 mM y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante a 200rpm.

2.1.5 Extracción y purificación de proteínas

La inducción de proteínas en el cultivo de bacterias se centrifugó a 4200 rpm por 20 minutos. Las bacterias se resuspendieron en 5 ml de amortiguador de extracción (Tris 20 mM, glicerol 5 %, NaCl 50 mM, 1Mm de β- mercaptoetanol) con inhibidor de proteasas

CAPÍTULO II

(1mM de PMSF y 10mM de EDTA). Posteriormente las inducciones de bacterias fueron sonicadas en periodos de tiempo de 20 segundos y se alicuotaron en tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

La purificación de las proteínas se realizó con la fracción soluble del extracto de bacterias, el cual se colocó e interacción con 100 µl de una resina de afinidad de níquel previamente equilibrada con amortiguador de extracción y se mantuvo en un agitador durante dos horas y esto se pasó a través de una columna en la que se lavó con amortiguador de extracción y se hicieron eluciones con un amortiguador de elución con 250mM de imidazol. Este proceso se repitió con 100 µl de una resina de Glutation Sefarosa 4B, posteriormente se lavó con amortiguador de extracción y se hicieron eluciones con glutatión a una concentración de 30 mM. Este proceso se llevó a cabo de la misma forma para todas las proteínas expresadas. El uso de dos resinas diferentes de debe a que el plásmido utilizado posee 2 etiquetas y para obtener una mejor purificación de la proteína, se hizo uso de ambas.

Para analizar la calidad de la purificación las eluciones y las fracciones no purificadas de cada proteína se corrieron en un gel de acrilamida al 12% por medio de electroforesis a 120 V por una hora 20 minutos y fueron teñidos con una solución de azul de coomasie.

2.1.6 Inmunodetección de HsFib y mutantes

Se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección en el cual se hicieron geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y posteriormente una electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a 45V y 15W durante 40 minutos.

Se bloqueó la membrana con PBS-T 0.1 % + leche 3 % por una hora posteriormente se incubaron con una solución de PBS-T 0.1 % + leche 3 % con el anticuerpo contra la proteína en la membrana como anticuerpo primario en concentración 1:4000 toda la noche y con anticuerpo secundario durante dos horas, para los anticuerpos generados en conejo se utilizó el anticuerpo anti-conejo a concentración 1:4000 en una solución de PBS-T 0.1 % + leche 3 % y para los producidos en gallinas se utilizó el anticuerpo anti-gallina a concentración 1:4000 en una solución de PBS-T 0.1 % + leche 3 % . Las membranas fueron reveladas con un kit de detección Amersham ECL Western Blotting.

2.1.7 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit miniprep plant RNA de analytik jena utilizando como material inflorescencias de brócoli.

2.1.8 Ensayos de actividad RNasa en geles de agarosa

Para evaluar la actividad RNasa de la proteína, se realizaron ensayos en los que se utilizó una relación de RNA y amortiguador en una misma concentración, se dispuso de un control negativo que no tuviera proteína, otras muestras en las que adiccionaran cantidades diferentes de la proteína y el mismo número de muestras, pero con CaCl 1mM. Las muestras se incubaron una hora a 37°C y se cargaron en un gel de agarosa.

2.1.9 Cultivo de células de mamíferos

Las células U2OS fueron incubadas 24 horas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich®) enriquecido con 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO₂. Después fueron sometidas a un tratamiento con tripsina para resembrarlas en cajas de Petri para su mantenimiento. Las células se cambian de plato una vez que este ha alcanzado del 80-90% de confluencia.

Para los ensayos de microscopia en células que serían transfectadas, se colocaron cubreobjetos de vidrio para permitir que las células crecieran sobre ellos en una mono capa.

2.1.10 Transfección transitoria de células U2OS con el vector pSTR-Fibrilarina_GFP y sus derivados mutantes

La transfección se llevó a cabo empleando el vector de expresión en mamíferos con el gen de fibrilarina humana acoplado a GFP (pSTR-fibrilarina_GFP) y sus derivados mutantes, las posiciones de las mutaciones se muestran en la tabla 3.

La composición de la mezcla de transfección consiste en 1 µg de DNA plasmídico y 6 µl de PEi en 300 µl de medio optiMEM por cada caja de 35mm. La mezcla de transfección se preparó en dos tubos eppendorf con 150 µl de optiMEM cada uno para diluir el DNA y PEi en tubos separados, se mezclan ambos tubos, se pipetea suavemente para mezclar y se incuba a temperatura ambiente(25°C) 15 minutos y permitir la formación de los complejos.

CAPÍTULO II

Las células U2OS, previamente tratadas con tripsina, después de por lo menos 24 horas, fueron colocadas en cajas de Petri con cubreobjetos redondos en el fondo y se les adicionó la mezcla de PEi con el vector pSTR-fibrilarina_GFP por goteo. Los cultivos de células en transfección fueron incubados durante 48 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂.

2.1.11 Ensayos de estrés por temperatura en células U2OS transfectadas con mutantes de fibrilarina

Se realizaron ensayos de exposición a estrés a una temperatura de 45°C y 5% de CO₂. En una caja petri se colocaron 4 cubreobjetos para que las células crecieran sobre ellos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se colocaron dos cubreobjetos en medio optiMEM con suero a 45°C y 5% por 2.5 horas y las otras 2 en condiciones normales de crecimiento.

2.1.12 Generación de líneas celulares estables

En una caja de 60mm con un 80% de confluencia de células U2OS se realizó la transfección con 2 µg de DNA plasmídico y 12 µl de PEi. Transcurridas 48 horas post transfección se les adicionó 5 ml de medio con 1000 µg/ml de Geneticina G-418 de Sigma-Aldrich® y se incubó por 9 días y se evaluó la cantidad de colonias positivas. Se lavó la caja de Petri con PBS y se tripsinaron las células y se cambió a otra caja con medio nuevo con antibiótico en la misma concentración utilizada para la selección.

2.1.13 Sistema de inmunofluorescencia indirecta con vector pSNAPf con el inserto de fibrilarina

El vector pSNAPf es un plásmido de expresión de mamíferos destinado a la clonación y la expresión estable o transitoria de fusiones de proteínas SNAP-tag® en células de mamíferos. La etiqueta SNAP es una proteína basada en O⁶-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) de mamíferos. Los sustratos de etiqueta SNAP son derivados de bencil purinas y bencil pirimidinas. En la reacción de etiquetado, el grupo bencilo sustituido del sustrato se une covalentemente a la etiqueta SNAP. Para la señal roja (555nm) se utilizó el reactivo rojo fluorescente SNAP-Cell® TMR-Star.

CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Alineamiento entre fibrilarinas

Se realizó un alineamiento de la fibrilarina de distintos organismos, contemplando plantas, mamíferos y levaduras y se puede observar que a excepción del dominio GAR (1-58 aa en humanos) existe una gran similitud. El alineamiento se realizó con ayuda del programa Clustal Omega y utilizando las secuencias de aminoácidos de la fibrilarina en humanos, fibrilarina 1 y fibrilarina 2 de Arabidopsis thaliana, de Mus musculus, y de Saccharomyces cerevisiae encontradas en la base de datos del NCBI.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ScFib	MSFRPGSRGGSR--GSRGGFGRRGGSRGGARGGSRGGFGRRGGG----RGG--ARGGSRG	53
Atfib2	--MRPPLTSGGGFSGRRGRG---YSGG-R--GDGGFSGRRGGG-----RGGGR	43
AtFib1	--MRPPVTG-----G-R--GGGFRGGRDGG-----RFGGG	27
MmFib	--MKPGFRPRGGGFGRRGGFGDRGGRRGG--RG--GRGGFGGRRGG--FGGGRRGGGGG	53
HsFIB	--MKPGFSPRGGGFGRRGGFGDRGGRG-----GRGGFGGRRGGGFRGRGRGGGG--	50
	::* . *** * *	
ScFib	GFGG-----RGGSRGGARGGSRG--GRGGAAGGARGGAKVVI EPHRHAGVYI	98
Atfib2	GFS-----RGGRRGRGPPRRGGARG--GRGPAGRGGMKGGSKVIEPHRHAGVFI	92
AtFib1	GRSFGGRSGDRGRSGPRGRGRGAP----R--GRGGPPRGGMKGGSKVIEPHRHAGVFI	81
MmFib	GFRGR-----GGGGVRRGGGFQSGGNRRGGRRGGKRGNSGKNVMVEPHRHAGVFI	104
HsFIB	-GGG-----GGGRRGGGGFHSGGNRGR--GRGGKRGNSGKNVMVEPHRHAGVFI	98
	. * * :. * :*:***** :*:*	
ScFib	ARGKEDLLVTKNM PGE SVYGEKRISVEEPSKEDGVPPTKVEYRWN PFRSKLAAGIMGG	158
Atfib2	AKGKEDALVTKNLVPGEAVYNEKRISVQNE-----GKTEYRWN PFRSKLAAAILGG	146
AtFib1	AKGKEDALVTKNLVPGEAVYNEKRISVQNE-----GKVEYRWN PFRSKLAAAILGG	135
MmFib	CRGKEDALFTKNLVPGESVYGEKRVSISEG-----DTIEYRWN PFRSKLAAAILGG	157
HsFIB	CRGKEDALVTKNLVPGESVYGEKRVSISEG-----DKIEYRWN PFRSKLAAAILGG	151
	.:**** *.***:*****.***:*.:. . *** :*****.***:	
ScFib	LDELFIAPGKVLVYLGAASGTSVSHVSDVVGPEGVVYAVEF SHRSGRELISMAKRPNI I	218
Atfib2	VDNIWIKPGAKVLVYLGAASGTTVSHVSDLVGPEGCVYAVEF SHRSGRDLVNM AKRRTNVI	206
AtFib1	VDNIWIKPGAKVLVYLGAASGTTVSHVSDLVGPEGCVYAVEF SHRSGRDLVNM AKRRTNVI	195
MmFib	VDQIHIKPGAKVLVYLGAASGTTVSHVSDIVGPDGLVYAVEF SHRSGRDLINLAKRRTNI I	217
HsFIB	VDQIHIKPGAKVLVYLGAASGTTVSHVSDIVGPDGLVYAVEF SHRSGRDLINLAKRRTNI I	211
	:*:* * ** *****:*****:***:* ***** ***:*.:**** *:*	
ScFib	PIIEDARHPQKYRMLIGMVDVIFADVAQPDQARI IALNSHMFLKDQGGVVVISIKANCIDS	278
Atfib2	PIIEDARHPAKYRMLVGMVDVIFSDVAQPDQARILALNASYFLKSGGHFVISIKANCIDS	266
AtFib1	PIIEDARHPAKYRMLVGMVDVIFSDVAQPDQARILALNASFFLKTGGHFVISIKANCIDS	255
MmFib	PVIEDARHPHKYRMLIAMVDVIFADVAQPDQTRIVALNAHTFLRNGGHFVISIKANCIDS	277
HsFIB	PVIEDARHPHKYRMLIAMVDVIFADVAQPDQTRIVALNAHTFLRNGGHFVISIKANCIDS	271
	*:***** ***:*.:**** *:* :*****:***:***: ***: * .*****	
ScFib	TVDAETVFAREVQKLR EERIKPLEQLTLEPYERDHCIVVGRYMRSGLKK-----	327
Atfib2	TVPAEAVFQTEVKKLQEQFKPAEQV TLEPFERDHACVVGGRYMPKPKKAATAA	320
AtFib1	TVAAEAVFQSEVKKLQEQFKPAEQV TLEPFERDHACVVGGRYMPKPKKQTPAS-	308
MmFib	TASAEAVFQSEVKKMQQENMKPQEQLTLEPYERDHAVVGVYRPPPKVKN----	327
HsFIB	TASAEAVFQSEVKKMQQENMKPQEQLTLEPYERDHAVVGVYRPPPKVKN----	321
	*. **:* ***:*.:**** *:* :*****:***:***: ***: * .*****	

CAPÍTULO III

Figura 3. 1 Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre fibrilarina en humanos (HsFib), fibrilarina 1 (AtFib1 y fibrilarina 2 (AtFib2) de *Arabidopsis thaliana*, de *Mus musculus* (MmFib), y *Saccharomyces cerevisiae* (ScFib).

Este alineamiento mostró los aminoácidos conservados entre las fibrilarinas de estos organismos y se tomaron en cuenta algunos de estos, marcados en un recuadro naranja en el alineamiento, para realizar mutaciones triples en la fibrilarina de humanos, la cual sera objeto de estudio en este trabajo.

3.1.2 Oligonucleótidos para generar mutantes de HsFib

Se utilizó en programa NEBasechanger de New England Biolabs como base para diseñar los oligonucleótidos correspondientes a las mutaciones. Se diseñaron para diversos sitios en la secuencia de fibrilarina pero se tomaron en cuenta para su evaluación unicamente los siguientes presentados en el cuadro 3. Para ver la lista completa de oligonucleótidos diseñados para realizar mutaciones en fibrilarina humana pasar a anexo 2.

	Posición	Secuencia
Sitios de interacción con calcio	T208A FW	caagaagagggcaaacatcattcc
	T208A RV	gccaagttaatgaggtcac
Mutante 1.5 equivalente en humanos (Tollervey et al., 1993)	K131E FW	aggagatgacgaaattgagtacc
	K131RV	tccgaaatcgagactctc
	A250P FW	ggccctgaatcctcacacctcc
	A250P RV	acaatccgggtctggtctgg
Mutante 1.2 equivalente en humanos (Tollervey et al., 1993)	D179G FW	ccatgtctctggcatcgttggtc
	D179G RV	gagaccgtggtgcccagag
	D216N FW	tgtgatcgagaacgctcgacacc
	D216N RV	ggaatgatgttggctctc
Mutantes en	GVF95AAA FW	tgctatttgcgaggaaaggaagatgc

sitios conservados	GVF95AAA RV	gcagcctcatgccgatgaggctc
---------------------------	-------------	-------------------------

Cuadro 2.3. Listado de oligos diseñados para mutagénesis por plásmido completo.

3.1.3 Estandarización de condiciones de reacción de PCR para mutagénesis

Para estandarizar la reacción de PCR para mutagénesis se analizaron dos diferentes polimerasas para evaluar con cual se tendría un producto amplificado. Las cantidades y condiciones para la mezcla de reacción (master mix) fueron de acuerdo al protocolo sugerido para cada polimerasa utilizada, ambas se sometieron al mismo programa en el termociclador y se seleccionó la enzima Hot start polimerasa sobre la Dream Taq polimerasa, pues se observó una banda mejor definida a diferencia de esta última (ver anexo 3 y 4).

3.1.4 Recircularización de plásmido y transformación en *E. coli*

Para comprobar si la mutación se realizó exitosamente se recircularizó el producto de PCR para transformarlo en células *Escherichia coli* (*E. coli*) para realizar una extracción de plásmido y enviarlo a secuenciar (Anexo 5).

Para esto se eliminó la cadena vieja o templado con una enzima DpnI y se recircularizó con la combinación de las enzimas kinasa y ligasa. Dicho producto se transformó en células competentes de *E. coli* y se puso a crecer en placas de medio LB agar con kanamicina, a la que el plásmido original tiene resistencia. Las colonias que crecieron se picaron y pusieron a crecer en medio LB líquido con kanamicina y posteriormente se realizó un miniprep para observar si el producto correspondía con el tamaño esperado. Los plásmidos con las construcciones esperadas se secuenciaron con el oligonucleótido RvHsFib-GGATCCTCAGTTCTTACCT. Las mutantes confirmadas por secuenciación se utilizaron para los análisis por medio de la transfección de células de mamíferos, las que se seleccionaron para analizar se muestran en el cuadro 4 (ver anexo 6 para la lista del total de mutantes confirmadas por secuenciación).

CAPÍTULO III

	Mutante
Sitios de interacción con calcio	T208A
Mutante 1.5 equivalente en humanos (tollervey et al., 1993)	K131E, A250P
Mutante 1.2 equivalente en humanos (tollervey et al., 1993)	D216N
Mutantes en sitios conservados	GVF95AAA

Cuadro 4. Mutantes de fibrilarina confirmadas por secuenciación.

3.1.5 Generación de líneas celulares estables

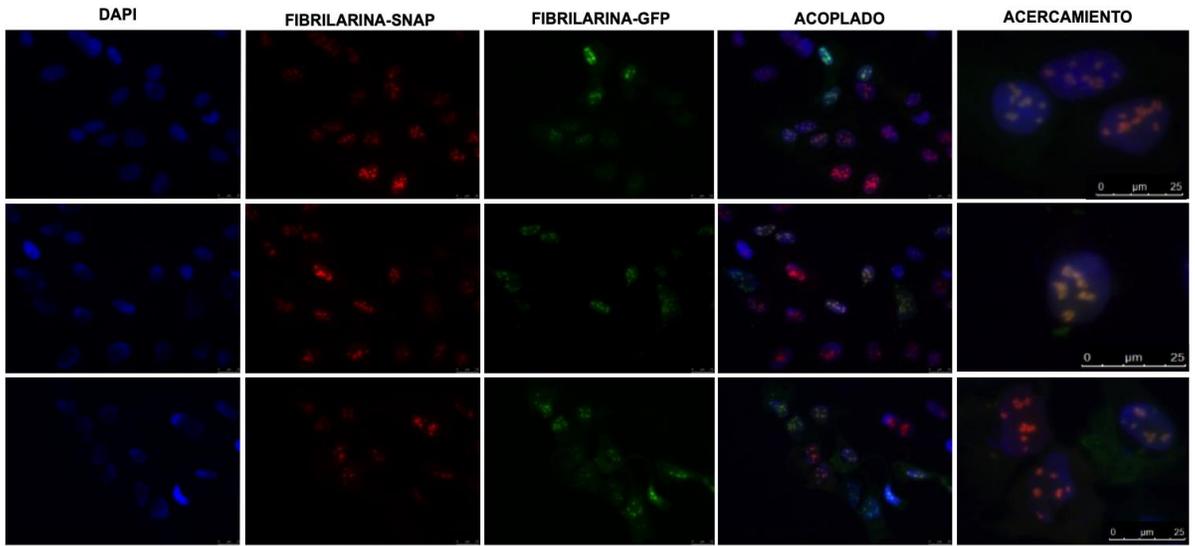
Las líneas estables realizadas tanto de Fib-GFP y Fib-SNAP fueron analizadas para determinar cuál de estas es mejor como control de fibrilarina silvestre y ser usada como modelo en las transfecciones con mutantes, así también las co transfecciones permitirán saber si la transfección transitoria es un modelo representativo para evaluar mutantes de fibrilarina.

La línea celular de Fib-SNAP estable (rojo) muestra un perfil normal en la distribución de fibrilarina y la transfectada transitoriamente (verde) colocaliza con esta señal, generando una señal color naranja uniforme (panel superior figura 3.2).

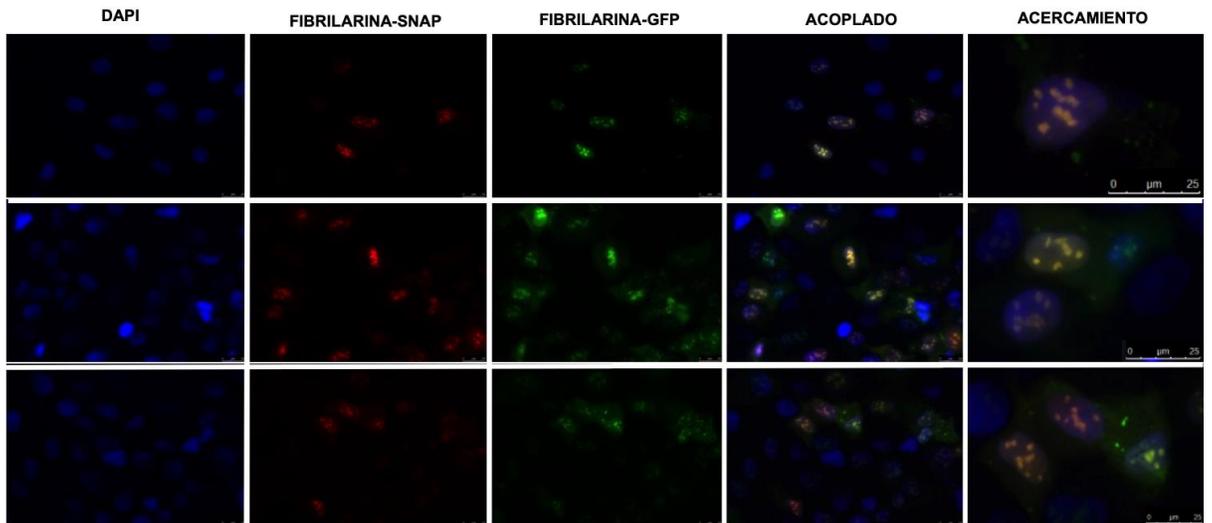
Las cotransfecciones realizadas en células U2OS presentan colocalización de la señal de ambas etiquetas, pero en el caso de GFP se muestra una gran cantidad de acumulaciones que no son propias de la localización normal de fibrilarina en la célula. Por esta razón se descarta al sistema por cotransfección como modelo para la evaluación de mutantes (panel intermedio figura 3.2).

El sistema de células estables con Fib-GFP muestra una señal más estable con esta etiqueta, pero la transfección transitoria con Fib-SNAP está en un bajo número de células y pocas de ellas muestran una señal combinada de ambas etiquetas (panel inferior figura 3.2). Debido a esto se concluye que el mejor sistema para realizar la evaluación de las mutantes es la línea estable de Fibrilarina con etiqueta de SNAP.

Transfecciones con SNAP estable y GFP transitorio



Co-transfecciones con SNAP y GFP



CAPÍTULO III

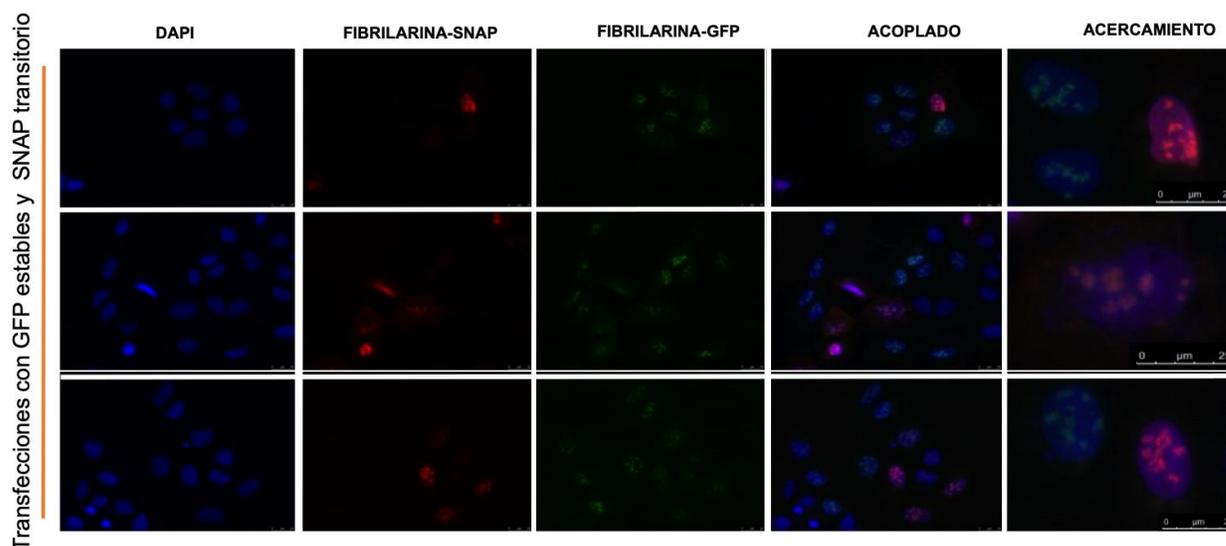


Figura 3. 2 Transfecciones en líneas celulares estables Fibrilarina-SNAP (panel superior), Co-transfecciones transitorias de Fib-SNAP y Fib-GFP (panel intermedio) y transfecciones transitorias de Fib-SNAP en líneas estables Fib-GFP (panel inferior).

3.1.6 Análisis de fibrilarina silvestre

Se tomaron imágenes en un microscopio de súper resolución para observar la distribución de ambas fibrilarinas y determinar si se encontraban distribuidas de forma similar en el nucléolo, lo que se pudo observar es que, si bien se encuentran ambos en el nucléolo formando estructuras, no comparten el mismo sitio dentro de las mismas (Figura 3.3)

CAPÍTULO III

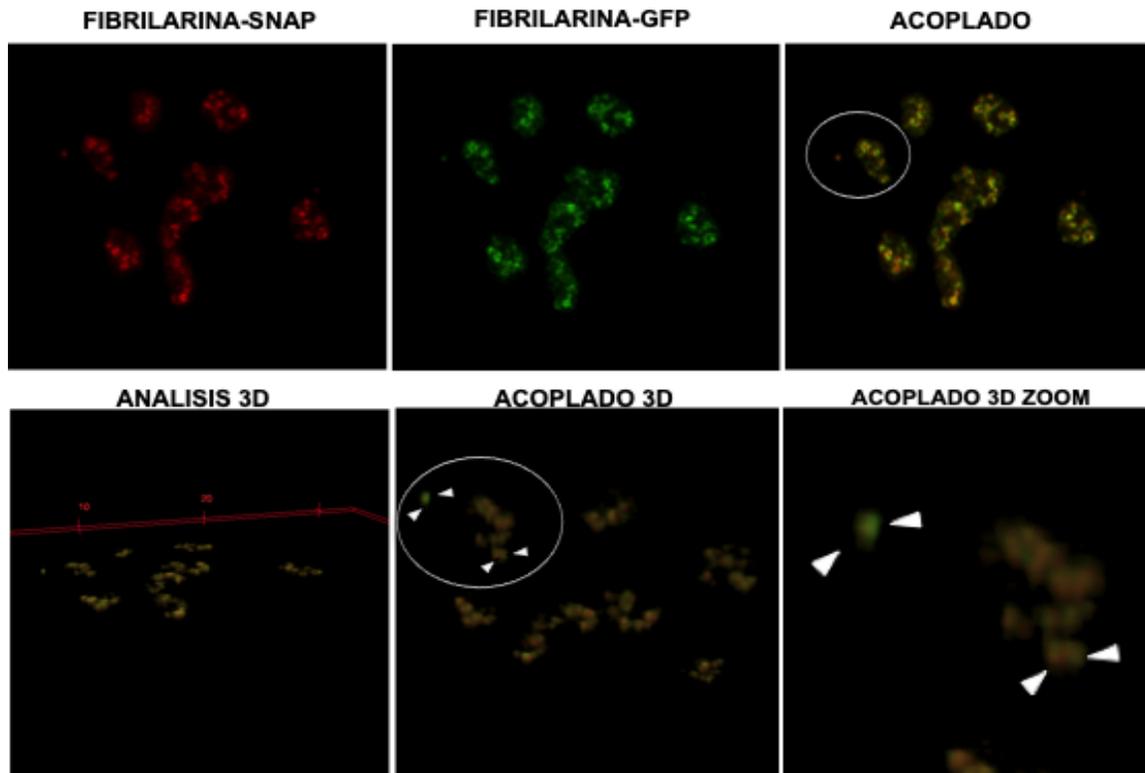


Figura 3. 3 Fibrilarina WT con etiqueta de SNAP y etiqueta de GFP. Imagen de súper resolución

La señal correspondiente a la combinación de la señal las etiquetas de GFP y SNAP es usualmente color naranja, lo cual se observa en los nucléolos, la imagen en súper resolución logra hacer la distinción entre ellas, como se muestra en la figura 3.3. Un análisis 3D de los nucléolos muestra que hay fibrilarina de ambas etiquetas en las estructuras del nucléolo y en lo que parecen ser cuerpos cajales.

Se realizó un análisis de intensidad de señal y localización de fibrilarina tomando en cuenta a una célula y utilizando un programa de análisis de imagen, para esto se trazó una línea que atravesara los componentes nucleares y que pudiesen ser medidos estos parámetros.

El perfil de intensidad y localización de las señales correspondientes a la mutante y la fibrilarina WT-SNAP es equiparable a la transfección de Fib-GFP como se puede ver en la imagen 3.4 en el que ambos picos correspondientes a los nucléolos tienen un

comportamiento similar, aunque la intensidad de pixel sea distinta, el tamaño de los nucléolos es de 7.44 y 17.17 y el área total del núcleo es 311.18 μm^2 , siendo similar a la media de 332.47 μm^2 de 25 células usadas en la medición (Anexo 13).

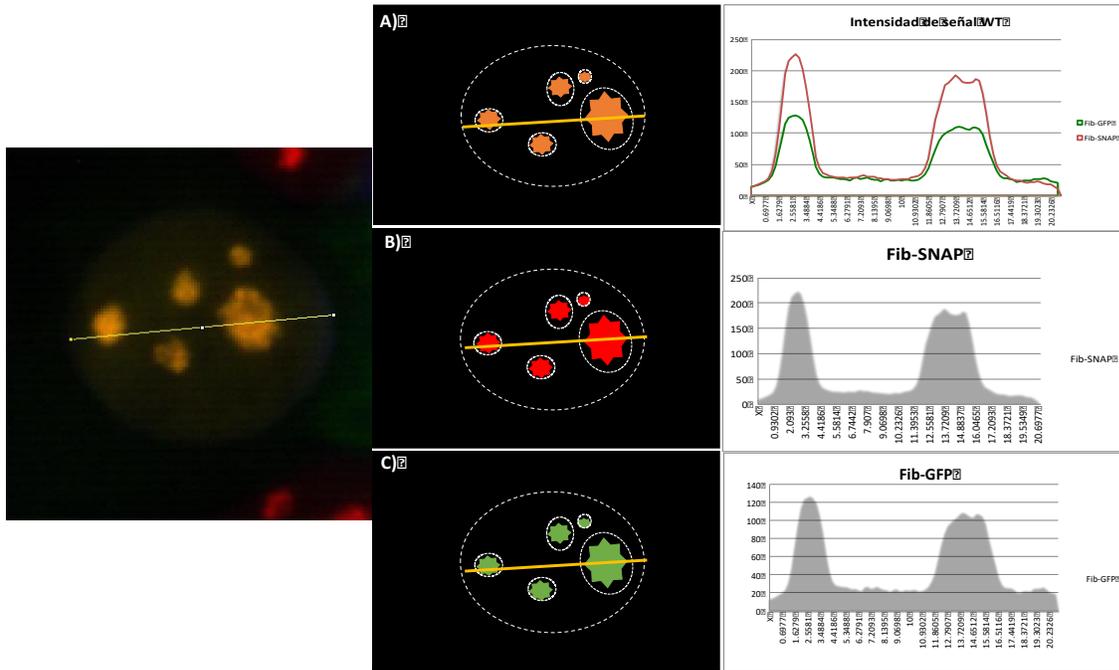


Figura 3. 4 Análisis de intensidad de pixel en Fibrilarina WT. Analizando intensidad de pixel (eje Y) por área en μm (eje X), el análisis es en base a la línea amarilla que atraviesa el núcleo como se ve en la imagen de la izquierda.

Para evaluar el comportamiento de fibrilarina silvestre bajo condiciones de estrés, se evaluó el comportamiento utilizando células con Fib-SNAP estable transfectadas con Fib-GFP silvestre. Los efectos en los nucléolos son los esperados para el estrés por temperatura, la clara disrupción de los nucléolos liberando a fibrilarina hacia el nucleoplasma y al citoplasma. Ambas señales se observan co localizando, por lo que a simple vista puede inferirse que se comportan de forma similar. También se realizó un análisis del tamaño promedio de los núcleos en condiciones de estrés, los resultados arrojaron una considerable disminución en el tamaño promedio de 274.041 (Anexo 14).

CAPÍTULO III

Los análisis de intensidad de pixel reafirman la co localización de ambas proteínas, cuando se sobreponen las gráficas que representan la señal, el comportamiento de la gráfica es similar, aunque la intensidad de señal sea distinta. La mayoría de los picos más marcados son similares y coinciden en las distancias marcadas por el eje X (Figura 3.5). Esto demuestra que incluso en condiciones de estrés, el sistema de transfección de proteínas con etiqueta de GFP se comporta de la misma forma de Fib-SNAP y puede usarse como control para la evaluación de mutantes.

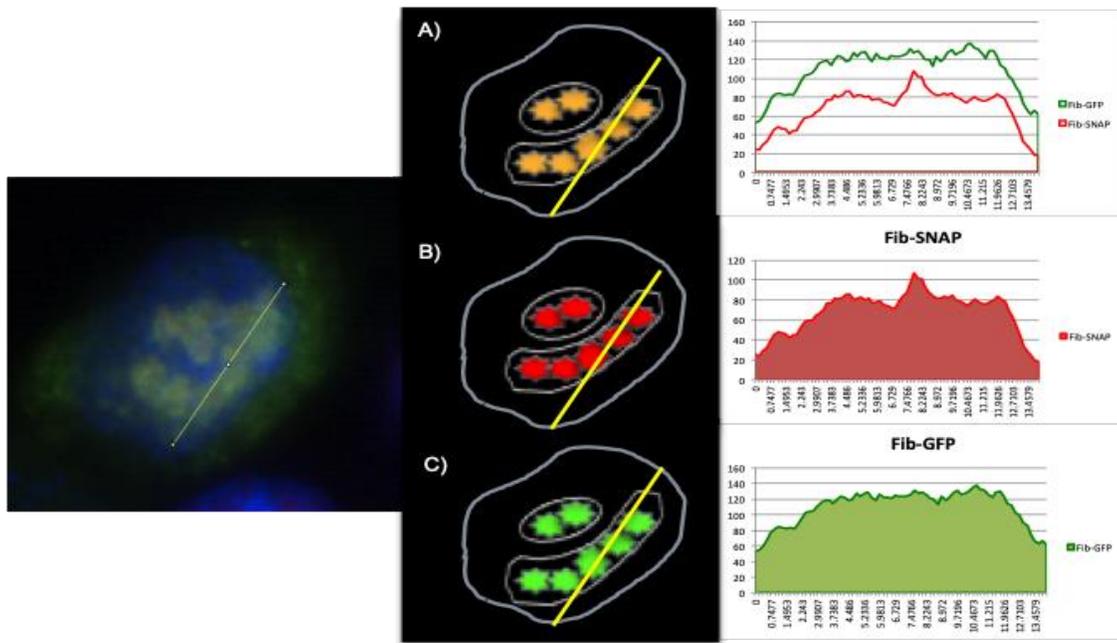


Figura 3. 5 Análisis de intensidad de pixel en fibrilarina silvestre en condiciones de estrés a 45°C. Analizando intensidad de pixel (eje y) por área en μm (eje x), el análisis es en base a la línea amarilla que atraviesa el núcleo.

3.1.7 Transfecciones transitorias de mutantes de fibrilarina con etiqueta de GFP en líneas celulares estables Fib-SNAP

En el sistema de transfección transitoria de mutantes, se encontraron fenotipos diferentes a la proteína silvestre y otras que se comportaban de la misma forma, el crecimiento de los cultivos de células fue similar en todos los casos pues se adicionó una cantidad de células que correspondían aproximadamente el 70% de confluencia y después de 24 horas se realizó la transfección. Las muestras analizadas son posteriores a las 48 horas

de transfección con la mutante y la tinción de SNAP con TMR star se realizó 30 min antes de fijar las células para su análisis o los ensayos de estrés correspondientes.

Para este trabajo se seleccionaron 4 mutantes, las cuales fueron procesadas con el software de análisis de imagen ImageJ FIJI.

3.1.8 Mutante T208A

Dentro de las mutantes analizadas se seleccionó a la mutante T208A que está implicada en la interacción con calcio cambiando una treonina en la posición 208 por una alanina, eliminando así la interacción de la proteína con calcio en este sitio, lo que implica que esta mutante solo tendrá un sitio en la posición 289 según se reporta en la bibliografía (Rakitina et al., 2011). El fenotipo que reside en la mutante T208A presenta la pérdida de la capacidad de formar estructuras en el nucléolo, contrastando con la señal de Fib silvestre (rojo), la mutante se localiza con mayor intensidad de señal en nucléolos en forma de un barrido uniforme.

En los ensayos de transfección de esta mutante, a pesar de que la cantidad de DNA plasmídico fue la misma, el porcentaje de transfección en un nivel que permitiera ver la localización con la proteína silvestre fue bajo, encontrándose alrededor de un 22% en relación al total de 172 células evaluadas en diferentes campos.

Para el análisis de los núcleos, en total se observaron 25 células transfectadas y todas ellas presentaban una forma y tamaño normal en sus núcleos, pero la señal de ambas fibrilarinas era distinta y la mutante correspondía a esta distribución anormal. Lo que corresponde a la fibrilarina silvestre con etiqueta de SNAP parecía ser más intensa en la mayoría de las células observadas, lo que podría deberse a que esta línea celular expresa dicha proteína de forma estable, la señal correspondiente a la mutante con etiqueta de GFP tiende a variar de intensidad entre una célula y otra pero la distribución es la misma, presencia en citoplasma, nucleoplasma y principalmente nucléolos distribuyéndose de forma uniforme, esto se puede apreciar con mayor claridad en la columna que corresponde a GFP en la figura 3.6 en la que solo se aprecia a la mutante. En estas células la señal nucleolar de GFP es intensa y forma estructuras, en su mayoría circulares, cuyo número parece ser menor que en las células con solo Fib-SNAP, en las que el tamaño de las estructuras es considerablemente más grande, por lo que se realizó

CAPÍTULO III

un análisis del tamaño y forma de los núcleos. El tamaño promedio de los núcleos se encuentra en 337.55 μm de un total de 25 núcleos de células transfectadas con la mutante T208A evaluados, lo que es similar al tamaño promedio de los núcleos en células con fibrilarina silvestre, es decir que la mutación T208A aparentemente no afecta el tamaño o forma de los núcleos (Anexo 15).

En los diferentes campos, las células que tienen la señal de Fib-SNAP y Fib-GFP se repiten las mismas características de localización, el fenotipo consiste en que la mutante en los nucléolos forma un barrido uniforme, a diferencia de Fib-SNAP que se encuentra en formas características del FC y DFC. Si bien la morfología nuclear no parece verse afectada, la de los nucléolos parece mostrar cambios en comparación a los que únicamente expresan la silvestre, pues se observa un efecto similar a la segregación de los nucléolos en gran parte de las células observadas. Este efecto es observado en ciertas condiciones de estrés, esto podría indicar que la mutante está estresando a la célula afectando el funcionamiento o que esté implicada en la morfología de los nucléolos (Figura 3. 7).

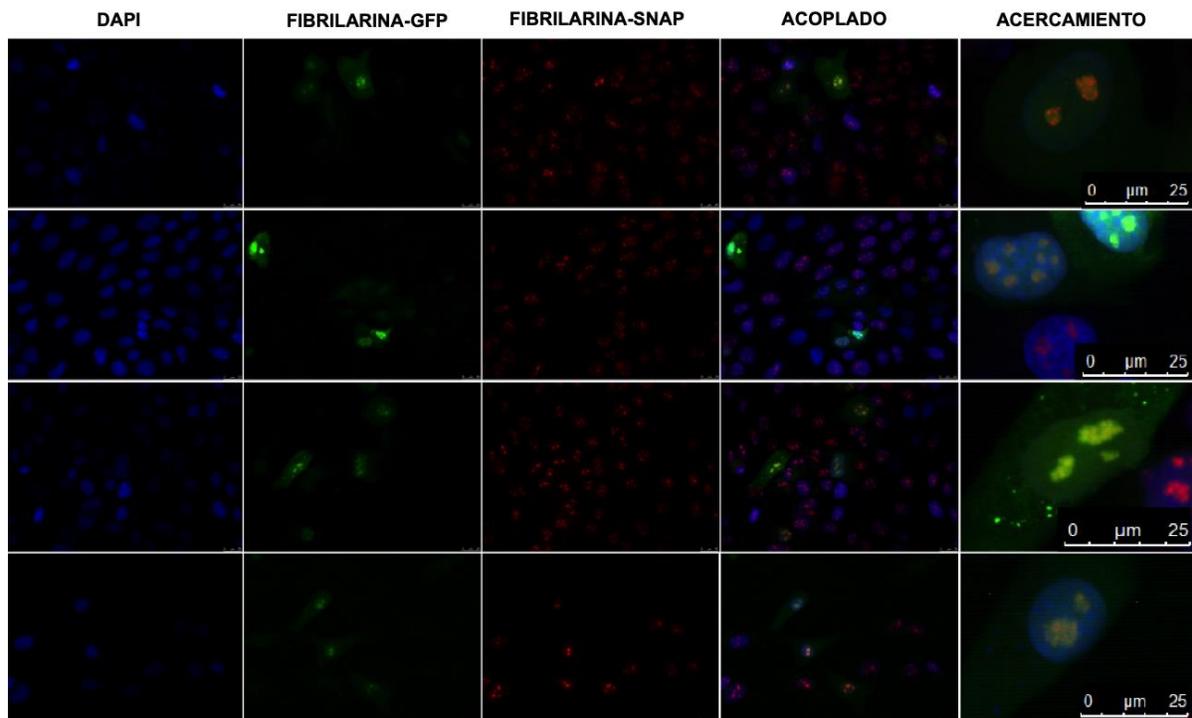


Figura 3. 6 Transfección transitoria de la mutante T208A en línea estable de Fib-SNAP en diferentes campos, mostrando los canales de DAPI, GFP, SNAP y un acercamiento. Microscopio

Leica DM6000 aumento de 60X. Campos correspondientes a DAPI, 488nm, 555nm y acoplamiento.

Se realizó un análisis del tamaño y número de nucléolos por célula, tomando en cuenta únicamente las que estuvieran transfectadas por la mutante T208-GFP y Fib-SNAP. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.7, lo que sugiere que el número de nucléolos se reduce como efecto de dicha mutante, haciendo que la mayor parte de los núcleos analizados contengan entre 2 y 3 nucléolos, en general de gran tamaño, a diferencia de los únicamente transfectados por Fib-SNAP usualmente entre 4 y 6.

Fibrilarina es esencial para la morfología y crecimiento de células de mamíferos como mencionan Amin y colaboradores en el 2007, por lo cual este sitio de interacción con calcio podría influir en la formación de estructuras nucleolares o su localización en el CF o CFD. En base al análisis se puede decir que el tamaño de los nucléolos también se ve afectado, pues en las células que solo tienen la proteína silvestre estas estructuras son más pequeñas, encontrándose aproximadamente en 7.99 μm a diferencia de los transfectados con la mutante con un promedio de 17.102 (figura 3.7), lo cual es una diferencia considerable. Estos resultados apoyan la hipótesis que esta mutante cambia la morfología y tamaño nucleolar e induce estrés en la célula.

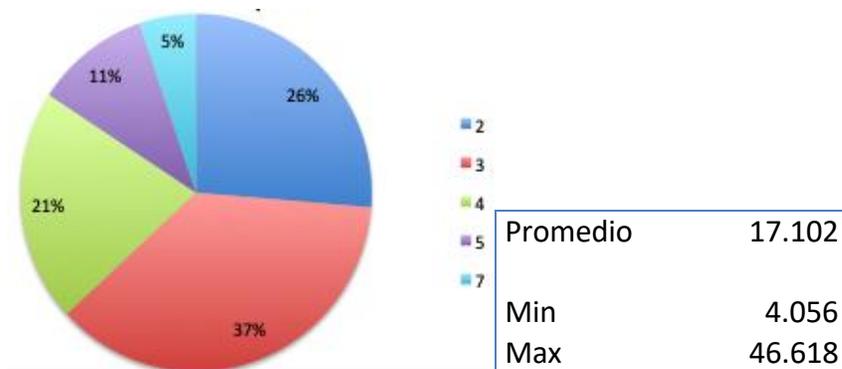


Figura 3. 7 Porcentaje de la cantidad de nucléolos en células transfectadas con T208A y tamaño promedio de los nucléolos en células transfectadas con la mutante.

Para medir la intensidad de señal en núcleo y nucléolos de ambas señales se utilizó el programa ImageJ Fiji para medir la intensidad de pixel y calcular de área de estas

CAPÍTULO III

estructuras (Figura 3.8). Para esto se tomó como objeto de estudio a uno de los núcleos en los que se encontraba la señal de fibrilarina silvestre y la mutante.

El área total del núcleo de la célula analizada es de 338.33 μm^2 y de 29.7 y 22.7 para los nucléolos. Se realizó el establecimiento respectivo de escala y se tomó una línea recta que atravesara dichos campos para que el programa realizara el cálculo de las zonas sobre las que se dibujó. Los datos arrojaron que existe una diferencia entre la señal e GFP en nucleoplasma y nucléolos, representados por 2 picos de señal en áreas de 5.5 μm a 9.7 μm y de 15.3 a 20.9 correspondientes a los nucléolos, confirmando las observaciones previas (Figura 3.8).

Para evaluar la distribución de la señal se evaluó la forma de los picos de señal de ambas fibrilarinas. El eje X corresponde a la distancia trazada por el programa, representada por la línea amarilla que atraviesa el núcleo. Se puede apreciar que los picos de ambas etiquetas comienzan en la misma área entre los 4 y 10 μm para el 1 pico y entre 15 y 21 para el segundo, correspondiente a los nucléolos.

Algo característico de la señal de GFP es que forma una especie de meseta, con una intensidad máxima por encima de 60, en cambio fibrilarina silvestre se distingue por la formación de picos de señal dentro de esta área, Fib-SNAP tiene estos picos de intensidad alta en los que la señal se encuentra entre 60 siendo la más baja y la más alta en 140, en la imagen se puede apreciar que la línea atraviesa las zonas correspondientes CF y CFD, zonas habituales para la localización de fibrilarina silvestre y es lo que puede explicar estos picos de alta intensidad de señal en zonas dentro del nucléolo.

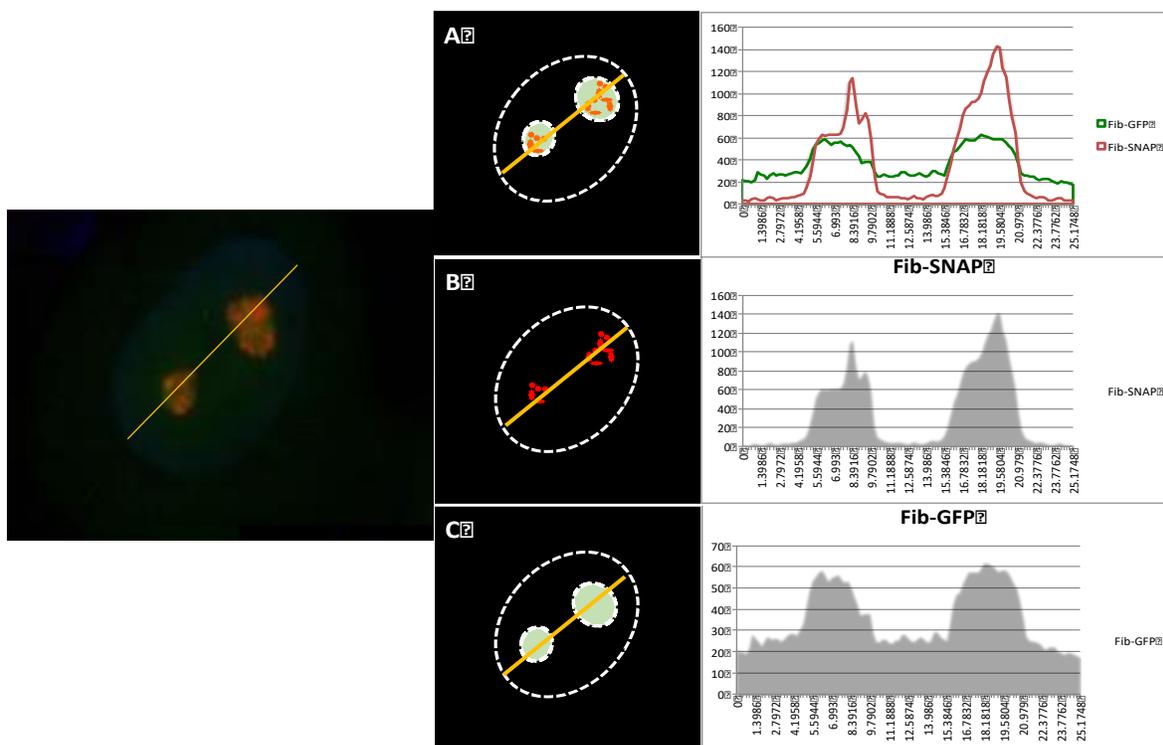


Figura 3. 8 Análisis de intensidad de pixel en nucléolos transfectados con mutante T208A utilizando ImageJ Fiji. Analizando intensidad de pixel (eje Y) por área en μm (eje X) A) Intensidad de señal acoplada de Fib-SNAP y la mutante T208A-GFP B) Intensidad de señal y localización de Fib-SNAP C) Intensidad de señal y localización de la mutante T208A-GFP.

3.1.9 Mutante D216N

La mutante D216N, está implicada en una región encargada de la interacción con SAM que es el sustrato utilizado para que fibrilarina lleve a cabo la metilación, por lo que se considera dentro de los sitios esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína, los sitios implicados en la interacción con este sustrato están en las posiciones 216,217 y 191,192 de fibrilarina (Rakitina et al., 2011). Este sitio se encuentra implicado en el procesamiento de pre ARN ribosomal, en un estudio realizado en levaduras se contempla a este sitio dentro de las mutaciones realizadas como necesarios para el correcto procesamiento de este RNA, esta mutante D216N es equivalente en humanos de uno de los sitios de las mutantes contempladas en ese estudio (Toiiervey et al., 1993).

CAPÍTULO III

La eficiencia de transfección de esta mutante en líneas estables de Fib-SNAP fue buena, considerando únicamente la señal correspondiente a la mutante, pero aquellas células que presentan la señal de la fibrilarina silvestre también son menores, aproximadamente 24% de un total de 168 células contabilizadas. Aun así, estas células no muestran una morfología o tamaño anormales en núcleos o nucléolos comparado a las células que únicamente expresan fibrilarina silvestre.

A simple vista, la mutante se localiza en los nucléolos de forma normal, localizando con la proteína silvestre, parecen existir 2 poblaciones; una en la que la mutante se acumula en citoplasma y nucleoplasma, pero aún conserva una localización normal en nucléolos y otra en la que la mutante se localiza como lo haría la silvestre y co-localiza con ella. Debido a que la señal en la población que se acumula en otros lugares además del nucléolo es más intensa, podría ser que se deba a la cantidad que expresa la célula y no necesariamente a un fenotipo diferente.

Para realizar los estudios posteriores se seleccionó la población con menor intensidad. Al realizar un análisis de la intensidad de pixel no muestra diferencias cuando las señales de ambas etiquetas colocarían pues se observan las estructuras en nucléolo propias de fibrilarina silvestre y de un color naranja uniforme en estas, propio de la señal sobrelavada de ambas.

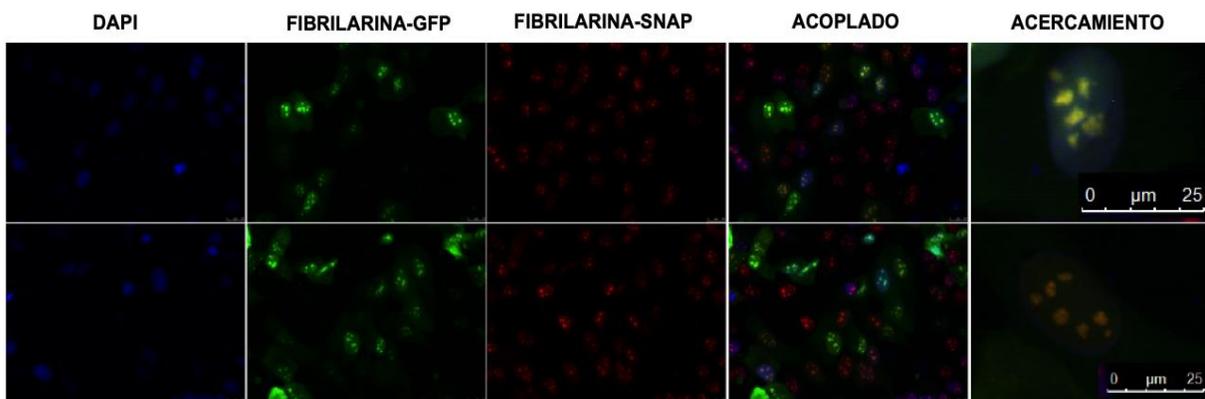


Figura 3. 9 Transfección transitoria de la mutante D216N en condiciones normales de crecimiento co-localiza con Fib-SNAP por lo que no se aprecian cambios significativos en su localización.

El tamaño promedio de los núcleos de las células transfectadas con la mutante y Fib-SNAP fue de 387.32µm de un total de 25 células contempladas en el conteo, lo cual no dista mucho del promedio en las células con fibrilarina silvestre únicamente (anexo 16).

En las gráficas de las señales sobrelapadas se observa que la mutante se comporta ligeramente diferente a la silvestre, la intensidad de señal en el núcleo es mayor en la mutante, aun así, los picos de señal que corresponden a los nucléolos son respetados por ambas proteínas. Las señales más fuertes para ambas son de 4 a 7 µm, de 11 a 16 µm y de 18 a 22µm indicando que la localización de la mayor parte de la proteína se encuentra en el mismo lugar.

Si bien la intensidad de los picos más altos no es la misma, la forma en que se presentan dichos picos es muy similar, mimetizando la forma de proteína silvestre. Esto sugiere que tienden a localizarse de la misma forma en los componentes nucleolares. Ambas proteínas no son completamente iguales pero la similitud entre ellas sugiere que la mutante podría ser una proteína funcional a pesar de la importancia del sitio mutado.

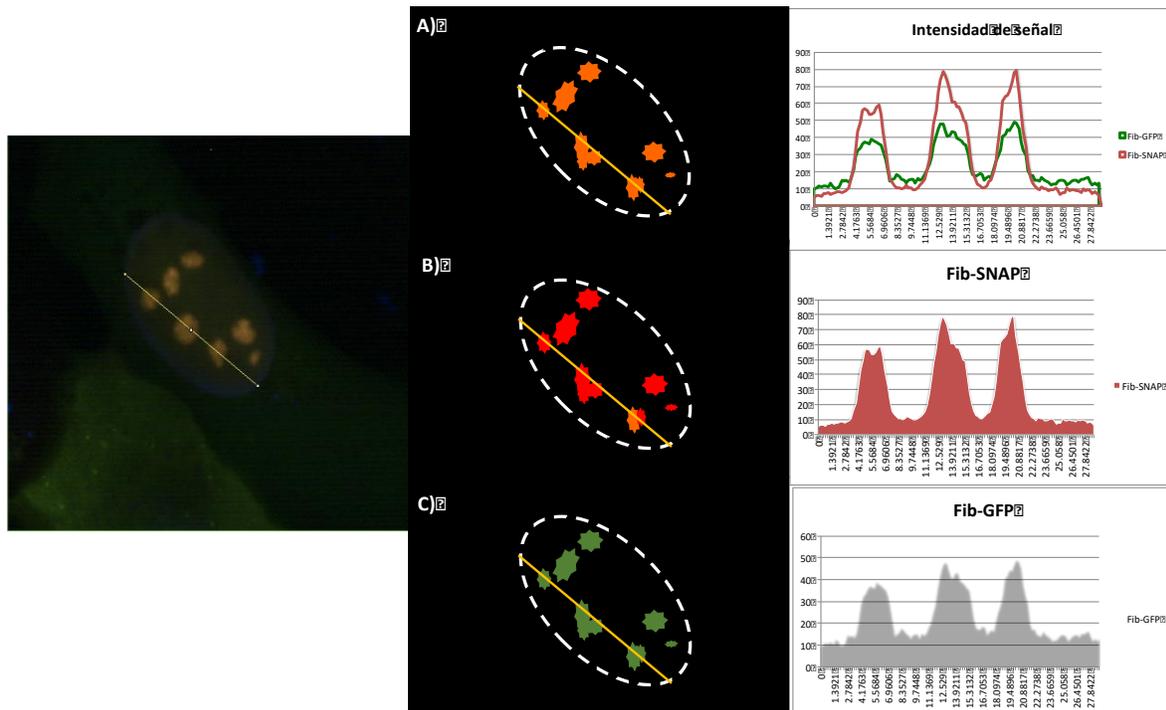


Figura 3. 10 Análisis de intensidad de pixel en mutante D216N. Analizando intensidad de pixel (eje Y) por área en µm (eje X).

CAPÍTULO III

3.1.10 Ensayos de estrés por temperatura en mutantes de Fib-GFP en líneas celulares estables Fib-SNAP

Para estos ensayos se comparó el comportamiento y localización de fibrilarina tanto en condiciones fisiológicas de crecimiento, a 37°C y 5% de CO₂, como bajo condiciones de estrés. Se utilizó un sistema de células con fibrilarina estable etiqueta de SNAP teñido con el compuesto TMR-star que se observa a una longitud de onda de 555 nm para poder utilizar a la proteína silvestre como sensor de estrés y método de comparación para la identificación de fenotipos en las mutantes. Para esto se realizó una exposición a condiciones de estrés de 2.5 horas a 45°C y 5% de CO₂.

3.1.11 Análisis de mutante GVF95AAA

Una de las mutantes analizadas se encuentra en un sitio conservado en diversas especies, para la selección de esta mutante se realizó un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos entre HsFib, AtFib1, AtFib2, MmFib, y ScFib. De forma adicional se localizaron estos sitios conservados en el programa CD3D, disponible en la página del NCBI, para ubicar sitios en estructuras como horquillas que pudiesen ser esenciales para el correcto plegamiento de la proteína. La mutante GVF95AAA, es una mutación en la que se cambiaron los aminoácidos en las posiciones 95, 96 y 97 por alaninas con la intención de afectar este sitio de aparente importancia en la estructura de fibrilarina.

Los análisis realizados bajo condiciones de crecimiento fisiológicas muestran que esta proteína se localiza en su mayor parte en el citoplasma, caracterizándose por la formación de estructuras o agregados. También se logra observar, por el color naranja en los nucléolos, que existe co localización de las señales de la proteína mutante y fibrilarina silvestre, así como cierto grado de señal en el nucleoplasma con menor intensidad (Figura 3.11).

De diferentes campos de la muestra se realizó una estimación de la cantidad de núcleos transfectados de 184 células contabilizadas, obteniendo un porcentaje aproximado de transfección de 13.5% y de este un 64% mostraba una morfología anormal a la esperada en células sanas y con crecimiento bajo condiciones fisiológicas. Tomando en cuenta un total de 11 núcleos transfectados se obtuvo un promedio de área de 432.17 μm^2 y

respecto a los nucléolos un promedio de 13.23 μm^2 de 23 nucléolos evaluados (Anexo 17).

En el caso de los campos analizados de las células en condiciones de estrés el patrón de distribución de la mutante es principalmente en el citoplasma y nucleoplasma a diferencia de la fibrilarina silvestre que se puede observar en los nucléolos y estos a su vez tienen un comportamiento esperado de disrupción nucleolar, este efecto es producido por diversos tipos de estrés entre los cuales se encuentra la temperatura alta. Este efecto se caracteriza por la liberación de proteínas nucleolares de este organelo y que pasen al nucleoplasma.

La calidad de transfección de la mutante en comparación con las 2 mutantes anteriores fue más alta como un 36% de células que expresan la proteína mutante y de las cuales en todas ellas se observa el mismo fenotipo en relación a la localización de la proteína. Un análisis de diferentes campos de la muestra que el promedio de área de las células transfectadas es de 229.08 μm^2 , una observación respecto a las células transfectadas es que estas muestran un núcleo más pequeño que las no transfectadas con la mutante. Para esto se realizó un análisis de área de los núcleos que no expresan la mutante, los cuales presentaron en promedio un área de 326.37 μm^2 , lo cual sugiere que la mutante puede estar influyendo en el tamaño nuclear.

CAPÍTULO III

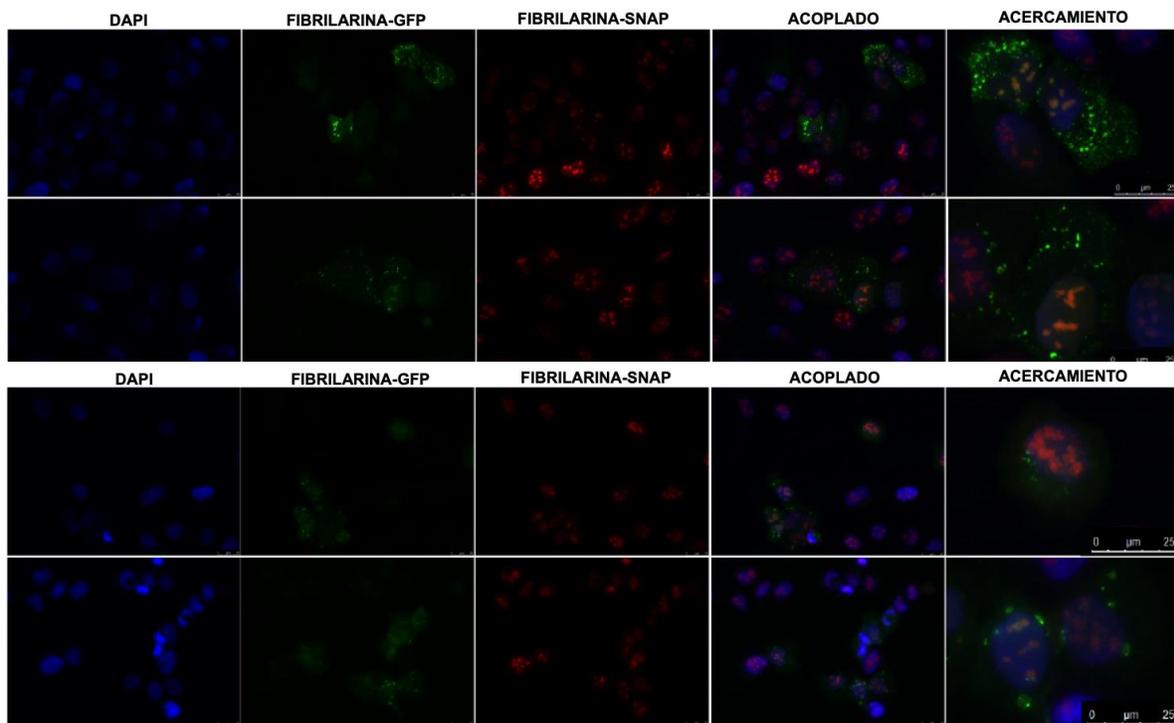


Figura 3. 11 Transfección transitoria de la mutante GVF95AAA (G95A, V96A, F97A) en condiciones normales de crecimiento (panel superior) y en condiciones de estrés por temperatura a 45°C (panel inferior).

Se realizó un análisis de intensidad de pixel en las células en condiciones fisiológicas en las cuales se utilizó una de las células que tenían un fenotipo similar a la mayoría de las células que expresaban la mutante y Fib silvestre. El tamaño de este es de 294.7 μm^2 , siendo algo más pequeño que el promedio, pero se observa una deformación en los núcleos pues en lugar de ser una elipse muestra hendiduras en la periferia. En el caso de los nucléolos no se observan cambios en el tamaño o morfología con respecto a las células que únicamente tienen fibrilarina silvestre, el tamaño promedio de los nucléolos en esta célula es de 11.2 μm^2 , cercano al promedio de los nucléolos evaluados en este experimento.

La localización de fibrilarina silvestre se encuentra principalmente en los nucléolos, los cuales son definidos por los picos de señal de SNAP, la mutante también se encuentra con un incremento de señal en la misma longitud, de aproximadamente 1.1 a 4.5 μm y de 6.5 a 13 μm como los 2 picos de más alta intensidad. Dentro de estas señales de alta intensidad se forman picos que representan la acumulación de las proteínas en

estructuras del nucléolo y aunque la mutante presenta mayor concentración en nucléolos como la silvestre, la localización dentro de los mismos es distinta y se aprecia gracias a que las formas de los picos de alta intensidad de la mutante no tienen la misma forma. Este comportamiento se repite en ambos nucléolos sobre los que pasa la línea de medición. Esto puede indicar que la señal de fibrilarina no forma un barrido uniforme en nucléolos y en cambio se forman estructuras diferentes. La intensidad más alta en Fib-SNAP se encuentra cercana a 120 mientras que la más alta para la mutante es alrededor de 70 (Figura 3.12).

Tomando en cuenta la cantidad de proteína mutante en la célula, se puede observar una gran cantidad en el citoplasma, lo que puede indicar que la mutación produce un cambio en la localización de la proteína o bien ser defectuosa y por lo tanto inducir un cambio de morfología nuclear.

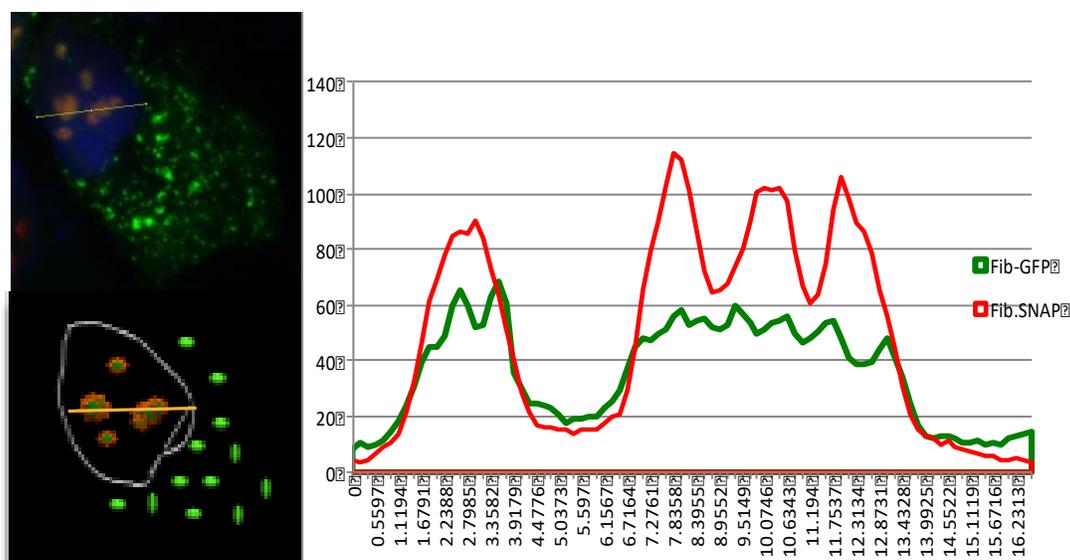


Figura 3. 12 Análisis de intensidad de pixel de la mutante GVF95AAA en condiciones de crecimiento normales a 37°C y 5% de CO₂.

Se realizó un análisis de intensidad de pixel en una de las células que expresan la mutante GVF95AAA en condiciones de estrés por temperatura tomando como base una de las células con el fenotipo más común en los diferentes campos evaluados. El núcleo tiene un área de 270.93 μm^2 y un tamaño promedio de nucléolos de 11.11 μm^2 .

CAPÍTULO III

En condiciones de estrés, la localización habitual de esta proteína debería ser en núcleos y nucleoplasma, pero en este caso se observa que se acumula en la periferia del núcleo formando agregados de proteína y una señal similar a un barrido en nucleoplasma y citoplasma.

Un análisis de intensidad de pixel en que se hizo pasar la línea de medición sobre 3 estructuras nucleolares se pueden observar los picos de señal correspondientes a nucléolos localizados de 0.9 a 5.5 μm , de 6.5 a 10.5 y de 12 a 15.7 μm , definidos por Fib-SNAP. Esto permite hacer una comparación con la mutante, la cual parece no tener una localización nucleolar, si no pequeños picos de señal en el núcleo y a simple vista parecen encontrarse sin un orden particular en él, además que la cantidad de proteína en poca en comparación a la localizada en la periferia (Figura 3.13).

Si se compara la localización de la mutante entre condiciones fisiológicas y de estrés, se observa que la proteína esta considerablemente en menor cantidad en estrés además de perder la localización marcadamente nucleolar que se observa en condiciones fisiológicas. Al realizar una comparación con la reacción de la proteína silvestre sometida a estrés, se puede decir que esta mutante sale de los nucléolos con una mayor rapidez que la silvestre. Lo que sugiere que es más sensible a estrés para migrar al exterior del nucléolo.

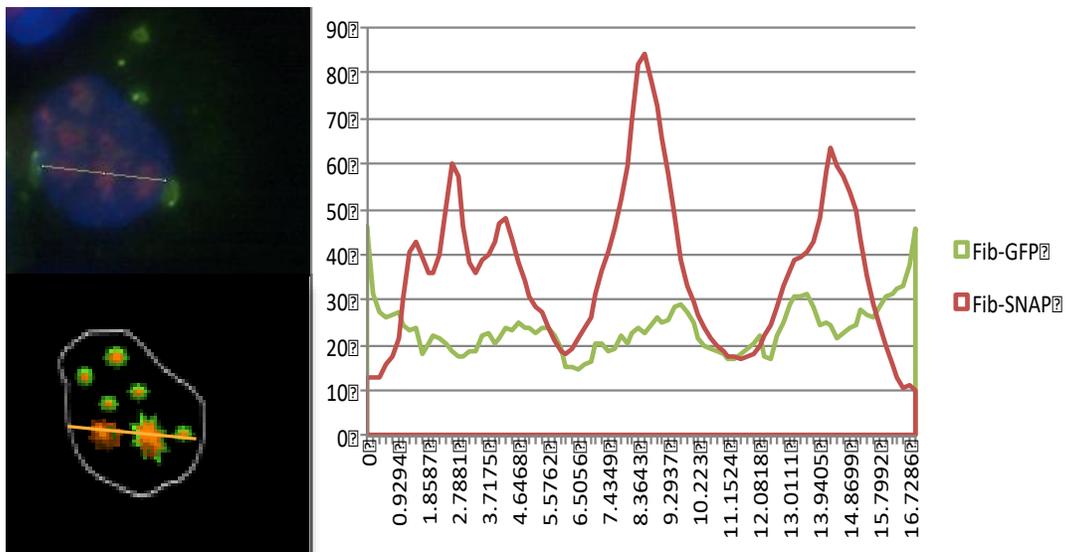


Figura 3. 13 Análisis de intensidad de pixel de la mutante GVF95AAA en condiciones de estrés a 45°C Y 5 % de CO₂.

3.1.12 Análisis de mutante K131E, A250P

Otra mutante que se diseñó para este estudio es la K131E, A250P para la cual se utilizó como base un estudio de mutantes de fibrilarina de levadura en la que estas mutaciones resultaban letales para el crecimiento de las levaduras y generaban problemas para el procesamiento de pre ARN ribosomal (Toiiervey et al., 1993), el objetivo fue dilucidar si estos sitios, que son los equivalentes en la fibrilarina de humanos de dichas mutantes en levadura, tienen el mismo o algún efecto en fibrilarina humana.

Se realizaron ensayos para la evaluación de localización y comportamiento de la mutante tanto en condiciones fisiológicas como de estrés por temperatura a 45°C para evaluar el efecto de la mutante en ambas condiciones y determinar si existe un fenotipo determinado usando la Fib-SNAP como punto comparativo.

Los ensayos realizados en condiciones fisiológicas mostraron aproximadamente un 17% de células transfectadas tomando en cuenta diferentes campos y un total de 75 células. De estas, el 84% tiene características similares por lo cual podría ser el fenotipo que presenta la mutante, contrastando con la localización esperada de la fibrilarina silvestre. Las células presentan un área promedio de 395 μm^2 y la morfología de estos es aparentemente normal, así como el tamaño, estructura y distribución nucleolar en los mismos (Anexo 18).

En condiciones fisiológicas la localización de esta mutante esta principalmente en el citoplasma y se caracteriza por la formación de agregados, lo cual contrasta con la señal de fibrilarina silvestre con etiqueta de SNAP, localizada principalmente en los nucléolos formando estructuras características del CF y CFD y a simple vista no parece estar localizando con la mutante pues en a simple vista no se observa el color naranja típico de la localización.

En condiciones de estrés las muestras analizadas registraron un aproximado del 21% de transfección en células estables, de las cuales el 61 % posee un fenotipo común y un tamaño promedio de los núcleos de 287.26 lo que evidencia una reducción en el tamaño de los núcleos en relación a los experimentos en condiciones fisiológicas (Anexo18).

En fenotipo más común en este ensayo es similar al de condiciones fisiológicas en la acumulación de proteína en citoplasma, con la diferencia que aparentemente la proteína

CAPÍTULO III

se difunde en la célula y la proteína en citoplasma se compacta alrededor del núcleo, formando una especie de anillo. Cabe hacer notar que la fibrilarina silvestre tiene el comportamiento esperado y la disrupción nucleolar propia del estrés por altas temperaturas, esto reafirma que la mutante tiene un fenotipo en condiciones de estrés ligeramente distinto a la de condiciones fisiológicas (Figura 3.14).

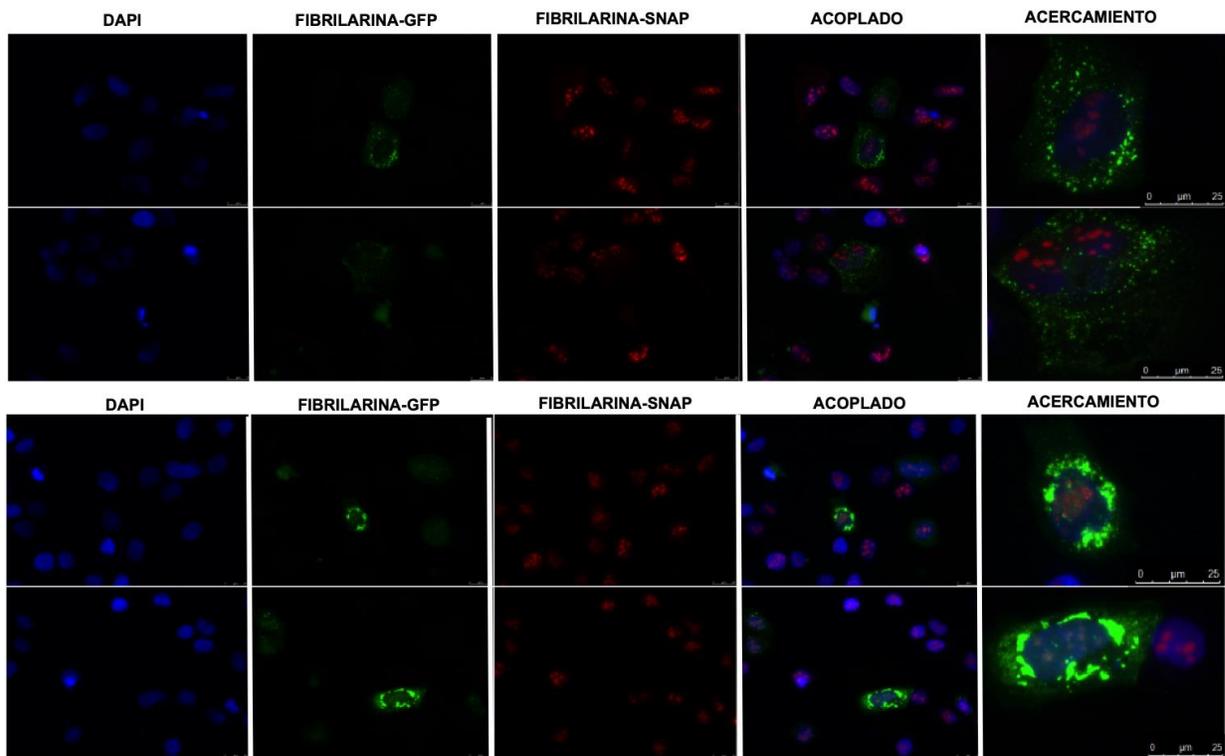


Figura 3. 14 Transfección transitoria de la mutante K131E, A250P en condiciones normales de crecimiento (panel superior) y en condiciones de estrés por temperatura (panel inferior).

Para saber cómo se comporta la mutante, se tomó una célula representativa el fenotipo que se propone siguen la mayoría de las células que expresan esta mutante en el análisis de intensidad de pixel. Lo que se demuestra con discos análisis es la presencia, en condiciones fisiológicas, de un fenotipo muy particular por la ausencia casi absoluta de la mutante dentro del núcleo en condiciones fisiológicas en el cual la intensidad de señal no es mayor a 20 y no corresponde en la forma de los picos de Fib-SNAP que marcan las estructuras nucleolares (Figura 3.15).

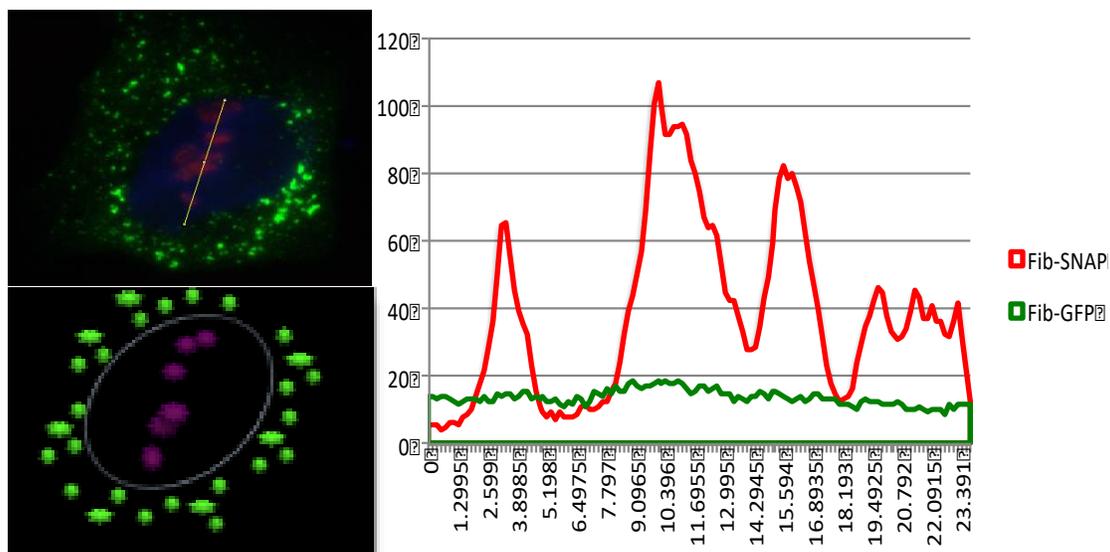


Figura 3. 15 Análisis de intensidad de pixel de la mutante K131E, A250P en condiciones de crecimiento.

En condiciones de estrés se puede apreciar que los núcleos se deforman por efecto de la temperatura como sucede en gran cantidad de células transfectadas únicamente con Fib-SNAP, así como la disrupción de los nucléolos. Un aspecto que vale la pena señalar es la acumulación de la proteína alrededor del núcleo y la aparente difusión de la misma en toda la célula. Según los datos obtenidos en el análisis de intensidad de señal de la mutante unida a GFP es que la señal con Fib-SNAP y de la mutante son equiparables, la localización cambia en gran manera en relación a las realizadas a 37°C, estas células estresadas parecer estar en el área de los nucléolos, pero distan mucho de ser iguales en forma o distribución de la señal con SNAP. Los picos de señal de Fib-SNAP se encuentran de los 3 a 9 μm , de 12 a 16.5 y de 18 a 21 μm de la línea trazada en el núcleo para realizar las mediciones, los picos de señal, que, en comparación a la señal más baja de la mutante, alrededor de 50, no son muy altos, se encuentran entre los 2 y 11 μm , 13 y 17 μm y de 18 a 21 μm lo que se puede apreciar en la figura 3.16. Que la intensidad de señal más baja en la mutante sea tan alta, comparándola con la silvestre, podría sugerir que es debido a que la proteína se difunde en la célula sin localización específica. A diferencia de la silvestre ya no podría ser tomada como sensor de estrés o como marcador de núcleos transcripcionalmente activos pues su localización y probablemente

CAPÍTULO III

su funcionalidad con o sin condiciones de estrés se verían comprometidas por efecto de la mutación.

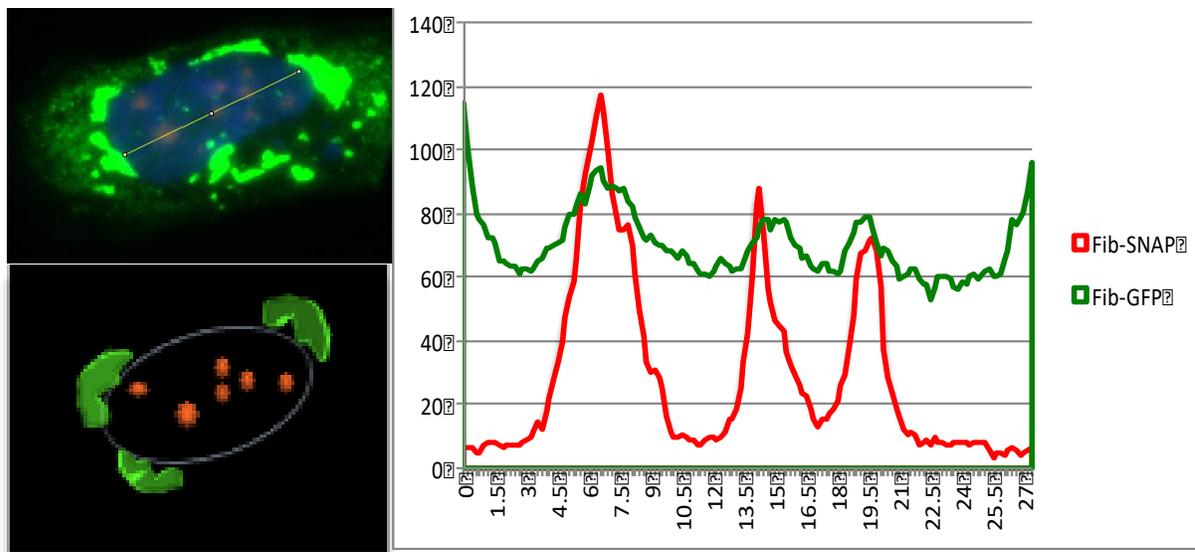


Figura 3. 16 Análisis de intensidad de pixel de la mutante K131E, A250P en condiciones de estrés.

3.2 DISCUSIÓN

Fibrilarina es esencial para la morfología nuclear normal y el crecimiento celular, pues ensayos realizados en los que se realiza la depleción de fibrilarina en células de mamíferos, se observa la deformación de los núcleos pero la morfología nucleolar parece conservarse (Amin et al, 2007). Un efecto relacionado a la morfología se pudo observar en la mutante T208A de fibrilarina humana (HsFIB), en la cual se conserva la estructura nuclear pero no la nucleolar, lo que sugiere que el calcio puede estar implicado en el correcto funcionamiento y localización o tener influencia en la morfología de los nucléolos. Además de la localización anormal, se observa la reducción del número de nucléolos por célula, lo que sugiere que este es un sitio de alta importancia y la mutación produce, por si misma, una condición de estrés a la célula.

Otra mutante que tuvo un efecto considerable en la morfología nuclear fue la GVF95AAA, pues en gran parte de las células transfectadas se pudo apreciar una clara deformación nuclear, al estar mutada una región altamente conservada es posible que la proteína no funcione adecuadamente. Como se pudo ver en el estudio de D. Kim & Wirtz, 2015 la eliminación de actina produce la relocalización de los componentes nucleares y la deformación de núcleos, es posible que esta proteína, mutante de fibrilarina, pierda su funcionalidad o la capacidad de interactuar con otras proteínas y afectar así la estructura nuclear.

Se sabe que fibrilarina está involucrada en el complejo de transcripción entre la RNA Pol I, UBF y PIP2, una mutante de esta proteína que sea incapaz de formar parte de este complejo afectaría el proceso de transcripción y afectaría la división y crecimiento celular (Sobol et al., 2013; Yildirim et al., 2013). En la mutante D216N se observa un porcentaje de células transfectadas (24%) considerablemente mayor que el de la mutante GVF95AAA (13.5%), esto podría deberse no necesariamente a la calidad de transfección, si no a la supervivencia de las células transfectadas con las mutantes. Como se muestra previamente en el análisis de la mutante D216N, parece comportarse de forma similar a fibrilarina silvestre, a diferencia de GVF95AAA que tiene un fenotipo particular diferente de la silvestre.

CAPÍTULO III

La mutante D216N parece comportarse como la fibrilarina silvestre, de acuerdo a la evaluación de cambios en las estructuras celulares parece no generar un gran cambio, esto puede deberse a la sustitución realizada. La mutación realizada es de ácido aspártico por asparagina, que, si bien es una diferencia de cargas, de forma estructural, es similar, lo que recae únicamente en la sustitución de un sitio hidroxilo por un sitio amino.

El nucléolo es considerado un sensor de estrés debido que en estas condiciones se produce la redistribución de proteínas ribosomales en el nucleoplasma por la disrupción de los núcleos (Sirri et al., 2008), una de estas es fibrilarina, que en el caso de las mutantes GVF95AAA que está en un sitio conservado entre diversas especies y se encuentra en un horquilla en la estructura de fibrilarina, podría estar involucrada en el correcto plegamiento y localización de la proteína, el efecto observado sugiere que esta mutante es una proteína defectuosa incapaz de responder de manera normal al estrés ni de localizarse núcleos o nucléolos igual que la proteína silvestre. Pero aun así puede ser que, como producto de la mutación, se volviera más sensible a ser exportada del nucléolo.

La mutante K131E, A250P proviene de la equivalencia en humanos de una mutante en fibrilarina de levadura (Nop1) (Toiiervey et al., 1993) que se decidió realizar para visualizar su comportamiento en células humanas, mostrando ser una proteína aparentemente defectuosa pues se localiza en citoplasma a diferencia de la silvestre (silvestre mostrada en rojo) y tener un comportamiento anormal tanto en ausencia como en presencia de estrés. A diferencia de la mutante GVF95AAA que tiene un bajo porcentaje de células transfectadas, esta muestra una cantidad similar a la D216N, una posibilidad sería que esta al no entrar al núcleo y ser una proteína defectuosa que se queda en citoplasma, no interfiere con las funciones de la proteína silvestre, tanto endógena como la producida por la línea celular con etiqueta de SNAP. Las observaciones realizadas en el estudio de muestran que la mutación es letal y detiene el crecimiento de las levaduras, pero a la fecha no se tenían reportes del perfil de localización de la misma.

CONCLUSIONES

- La línea celular estable Fib-SNAP es efectiva para comparar la fibrilarina mutante con fibrilarina silvestre y establecer fenotipos para las mutantes.
- La mutante GVF95AAA afecta el funcionamiento y la localización de fibrilarina en la célula.
- La mutante GVF95AAA provoca malformación en núcleos y disminuye la supervivencia de la célula.
- La mutante T208A provoca una localización inespecífica dentro del nucléolo.
- La posición 208 es importante para la localización de fibrilarina en el componente fibrilar y fibrilar denso, posiblemente por su interacción con calcio en este sitio.
- La mutante D216N se comporta igual que fibrilarina silvestre.
- La mutante K131E, A250P es una proteína defectuosa, pues en condiciones fisiológicas no entra al núcleo.
- La mutante K131E, A250P sería letal para la célula en caso de ser eliminada la fibrilarina silvestre por completo.

BIBLIOGRAFIA

- Ai, L. S., Lin, C. H., Hsieh, M., & Li, C. (1999). Arginine methylation of a glycine and arginine rich peptide derived from sequences of human FMRP and fibrillarin. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences*, 23(4), 175–180. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518318>
- Amin, M. A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., & Fukui, K. (2007). Fibrillarin , a nucleolar protein , is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells, 360, 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.092>
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell*, 40(2), 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>
- Deogharia, M., & Majumder, M. (2018). Guide snoRNAs: Drivers or Passengers in Human Disease? *Biology*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/biology8010001>
- Jansen, R. P., Hurt, E. C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., & Tollervey, D. (1991). Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 113(4), 715–729. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2288999&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Kalinina, N. O., Makarova, S., Makhotenko, A., & Love, A. J. (2018). The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development , Disease and Stress Responses, 9(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00132>
- Kim, D., & Wirtz, D. (2015). Biomaterials Cytoskeletal tension induces the polarized

architecture of the nucleus. *Biomaterials*, 48, 161–172.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.023>

Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., ... Taliany, M. (2007). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(26), 11115–11120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704632104>

Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D., & Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs.

Experimental Cell Research, 315(6), 928–942.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.01.016>

Lin, C. H., Huang, H. M., Hsieh, M., Pollard, K. M., & Li, C. (2002). Arginine methylation of recombinant murine fibrillarin by protein arginine methyltransferase. *Journal of Protein Chemistry*, 21(7), 447–453.

<https://doi.org/10.1023/A:1021394903025>

Loza-Muller, L., Rodríguez-Corona, U., Sobol, M., Rodríguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in *Brassica oleracea*. *Frontiers in Plant Science*,

6(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00976>

Marcel, V., Ghayad, S. E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A. P., Solano-González, E., ... Diaz, J. J. (2013). P53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer. *Cancer Cell*, 24(3),

318–330. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.013>

Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D., & Cáceres, J. F. (2003). Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. *Molecular and Cellular Biology*,

23(23), 8519–8527. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8519-8527.2003>

-
- Pfister, A. S. (2019). Emerging Role of the Nucleolar Stress Response in Autophagy, *13*(April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00156>
- Rajamaki, M.-L., & Valkonen, J. P. T. (2009). Control of Nuclear and Nucleolar Localization of Nuclear Inclusion Protein a of Picorna-Like Potato virus A in Nicotiana Species. *The Plant Cell Online*, *21*(8), 2485–2502. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064147>
- Rakitina, D. V., Taliansky, M., Brown, J. W. S., & Kalinina, N. O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*, *39*(20), 8869–8880. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr594>
- Rodriguez-Corona, U., Pereira-Santana, A., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2017). Novel Ribonuclease Activity Differs between Fibrillarins from Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, *8*(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01878>
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the Cell*, *107*(6), 159–174. <https://doi.org/10.1111/boc.201400077>
- Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., & Sheval, E. V. (2016). Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin : Evolution of Structure and Functions N terminal domain. *Biochemistry*, *81*(9), 941–950. <https://doi.org/10.1134/S0006297916090030>
- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., & Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: The fascinating nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology*, *129*(1), 13–31. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0359-6>
- Snaar, S., Wiesmeijer, K., Jochemsen, A. G., Tanke, H. J., & Dirks, R. W. (2000). Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells. *Journal of*

Cell Biology, 151(3), 653–662. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.653>

Sobol, M., Yildirim, S., Philimonenko, V. V., Marášek, P., Castaño, E., & Hozák, P. (2013). UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus (United States)*, 4(6). <https://doi.org/10.4161/nucl.27154>

Toiiervey, D., Lehtonen, H., Jansen, F., Kern, H., & Hurt, E. C. (1993). Temperatura-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell Press*, 72, 443–457.

Yildirim, S., Castano, E., Sobol, M., Philimonenko, V. V., Dzijak, R., Venit, T., & Hozak, P. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *Journal of Cell Science*, 126(12), 2730–2739. <https://doi.org/10.1242/jcs.123661>

Oligonucleotidos para generar mutantes de Hsfib

Se utilizó en programa NEBasechanger de New England Biolabs como base para realizar los oligonucleotidos correspondientes a las mutaciones.

	Posición	Secuencia
Sitios de interacción con calcio	T208A FW	caagaagagggcaaacatcattcc
	T208A RV	gccaagttaatgaggtcac
	E289A FW	gatgcaacaggcaaacatgaagcc
	E289A RV	ttttcactcggaggcaaac
Sitios de interacción con SAM	EF191RC FW	ctatgcagtccgatgtcccaccgctctggccg
	EF191RC RV	actagaccatccggacca
	DA216HG FW	tgatgatcgagcatggtcgacaccac
	DA216HG RV	ggaatgatgttggtcctctcttg
Sitio catalítico	K143A FW	cttccgctccgctctagcagcagcaatc
	K143A RV	gggtccaggctcggtac
	K265A FW	gatctttgctgctgtggcccagc
	K265A RV	acatccaccattgcatgag
	D236A FW	gattccattgctgccaactgcattg
	D236A RV	acaaagtgtcctccattac
Mutante 1.5 equivalente en humanos	K131E FW	aggagatgacgaaattgagtacc
	K131RV	tccgaaatcgagactctc

(Tollervey et al., 1993)	A250P FW	ggccctgaatcctcacaccttc
	A250P RV	acaatccgggtctggctgg
Mutante 1.2 equivalente en humanos (Tollervey et al., 1993)	D179G FW	ccatgtctctggcatcgttggtc
	D179G RV	gagaccgtggtgcccagag
	D216N FW	tgtgatcgagaacgctcgacacc
	D216N RV	ggaatgatgttggtcctc
	N256G FW	cttctgcgtggaggaggacactttgtgatttc
	N256G RV	gtgtgggcattcagggccaca
Mutantes para evitar la metilación de fibrilarina	R8K FW	attcagtcccaaagggggtggcttg
	R8K RV	cctggcttcattcagttc
	R15K FW	cttgccggcaaagggggttg
	R15K RV	ccaccccccttgggactgaatcc
	R21K FW	cttggtgacaaaggtggtcgtggaggc
	R21K RV	cccccttgccgcaaagcc
	R24K Y R27K FW	ggcaaagggggttgccgggg
	R24K Y R27K RV	tcctttaccaccttgtcaccaaagccc
	R34K Y R36K FW	taaaggcggaggcttagaggtcgtgg
	R34K Y R36K RV	ccttgcccccgcaaagccc
	R41K Y R43K FW	taaaggacgaggaggaggtggag
	R41K Y R43K RV	ccttaaagcctccgctcgacc
R45K FW	aggtaaaggaaaaggaggaggtg	

	R45KRV	ttaaagcctccgcctcga
	R70K Y R72K FW	taaaggtcggggaggaaaaaga
	R70K Y R72K RV	cctttgttgccaccagaatggaag
	R74K FW	aggtaaaggtaaaggaggaaaaagagg
	R74K RV	ttgttgccaccagaatggaag
	R78K FW	aggaggaaaaaaaggaaaccagtcg
	R78K RV	ttacctttacctttgttgccac
Mutantes en sitios conservados	GVF95AAA FW	tgctattgtcgaggaaaggaagatgc
	GVF95AAA RV	gcagcctcatgccgatgcggctc
	PGE113AAA FW	tgcttcagttatggagagaagag
	PGE113AAA RV	gcagcggaccaggttcttggtgac
	WNP137AAA FW	tgctttccgctccaagctagca
	WNP137AAA RV	gcagcggctcggactcaatttgtc
	SHR193AAA FW	tgcttctggccgtgacctcatt
	SHR193AAA RV	gcagcgaactcgactgcatagactag
	KYR222AAAFW	tgctatgctcatcgcaatggtg
KYR222AAA RV	gcagcgtgtgggtgtcgagcatc	

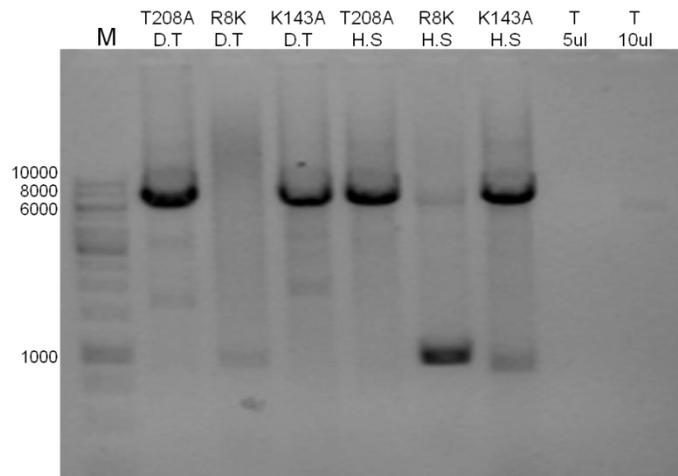
Anexo 2 Listado de oligonucleotidos diseñados para mutagénesis por plásmido completo.

Estandarización de condiciones de reacción de PCR para mutagénesis

Para estandarizar la reacción de PCR para mutagénesis se analizaron 2 diferentes polimerasas para evaluar con cual se tenía un producto amplificado. Las cantidades y condiciones para el master mix fueron de acuerdo al protocolo sugerido para cada polimesa utilizada y se sometieron al mismo programa en termociclador.

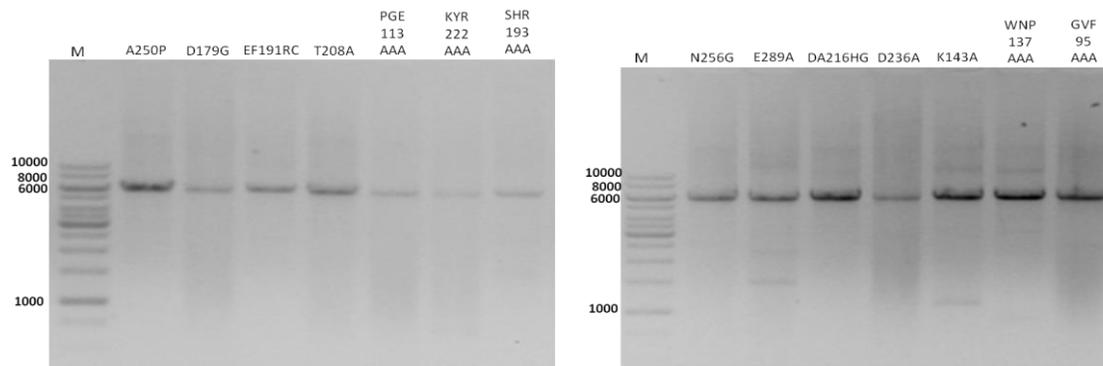
ANEXOS

Se obtuvo en las mutantes T208A y K143A un producto del tamaño similar al esperado para el vector pstr-GFP-Fibrilarina con ambas polimerasas por lo que se decidió continuar bajo estas condiciones y se seleccionó a la enzima Hot start para continuar los experimentos. El proceso de mutagénesis también se probó utilizando el vector pET42b con fibrilarina WT.



Anexo 3 Pruebas con dos diferentes polimerasas. Comparación entre Dream taq polimerasa y Phusion Hot start polimerasa con 3 pares de oligonucleótidos en un gel de agarosa al 1% teñido con safe red. La reacción total fue de 50 ul por lo que se cargaron 5 y 10 ul de templado diluido en 1 en 50 ul de agua para evaluar si lo que se viera en el gel correspondía al producto o al templado inicial.

Se realizó mutagenesis por PCR utilizando la polimerasa Phusion Hot start para las demás mutantes, bajo las condiciones ya mencionadas en materiales y métodos y se obtuvieron tamaños de banda similares cercanos a los 6 mil pb para todas las mutantes (figura 3.3).



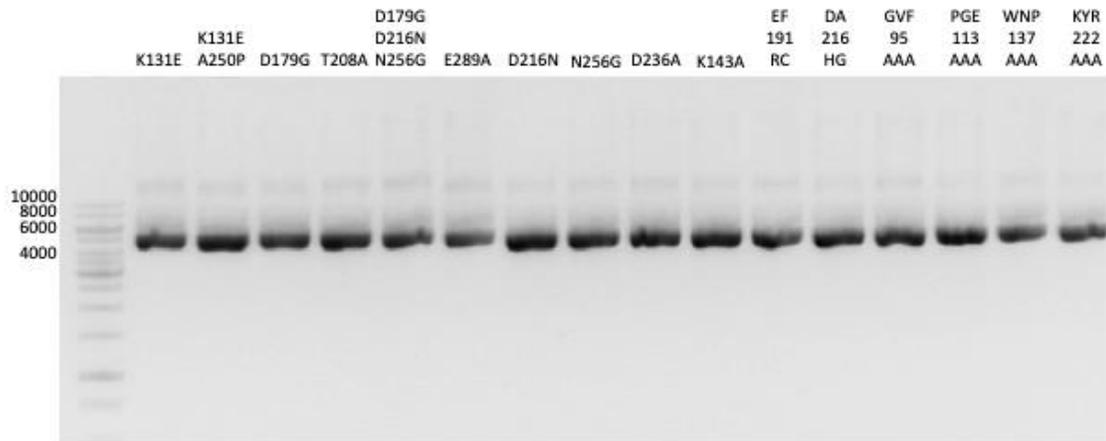
Anexo 4 Producto de pcr de mutagénesis con Hot start polimerasa. Gel de agarosa al 1% teñido con red safe.

Recircularizacion de plasmido y transformacion en *e.coli*

Para comprobar si la mutacion se realizó exitosamente se recircularizo el plásmido para transformarlo en celulas *E. coli* para realizar una extracción de plásmido y enviar a secuenciación.

Para esto se recircularizo y elimino la cadena vieja con la combinación de las enzimas kinasa, ligasa y Dnpl. Dicho producto se transformó en células competentes de *E. coli* y se pusieron a crecer en placas de medio LB agar con kanamicina, a la que el plasmido original tiene resistencia. Las colonias que crecieron se cultivaron en medio LB líquido y se realizó un miniprep para observar si el producto correspondía con el tamaño esperado, al confirmarse, el ADN plasmídico se secuenció.

ANEXOS



Anexo 5 Miniprep de células *E. coli* transformadas con producto de PCR recircularizado. Gel de agarosa al 1% teñido con red safe. Las mutantes se encuentran en el plásmido pstr-GFP con el inserto de fibrilarina coincidiendo con el peso estimado de este vector de entre 4 mil y 5 mil pb.

El producto de la extracción de plásmido de la mutagénesis se envió a secuenciar obteniendo los resultados especificados en el anexo 6.

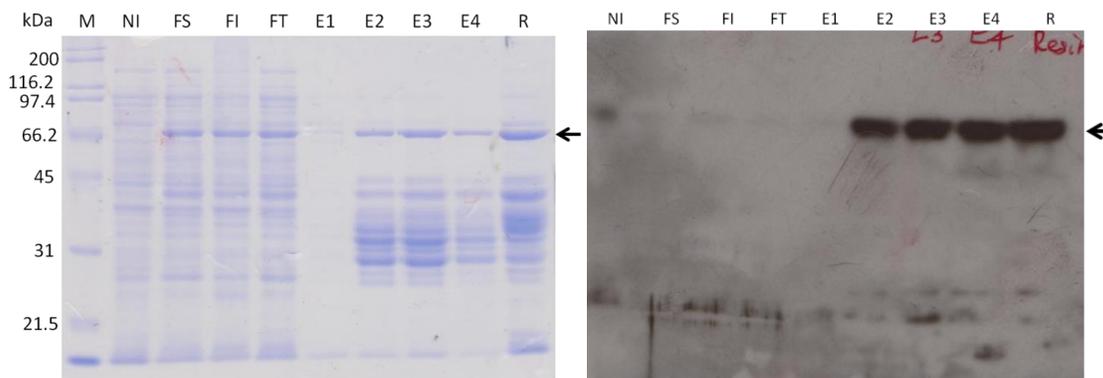
		Posicion			Posicion			Posicion
Interaccion con calcio	1	T208A	Sitios de metilacion	8	R15K	Sitios cataliticos	19	K143A
		E289A		9	R15K, R21K		20	D236A
	Sitios conservados	3		WNP137AAA	10		R24K, R27K	Procesamiento de pre rARN
PGE113AAA				11	R34K, R36K	22	K131E	
GVF95AAA				12	R41K, R43K	23	A250P	
SHR193AAA				13	R41K, R43K, R45K	24	K131E, A250P	
KYR222AAA				14	R70K, R72K	25	N256G	
Interaccion con SAM	7			15	R70K, R72K, R74K	26	D179G	
				16	R70K, R72K, R74K, R78K	27	D216N	
				17	HG191RC	28	D179G,D216N	
			18	DA216HG	29	D179G,D216N, N256G		

Anexo 6 Lista de mutantes de fibrilarina confirmadas por secuenciación en el vector pSTR GFP para transfección.

Inducción de proteínas

El tamaño de banda esperado es de 66 kDa debido a que la proteína se encuentra acoplada a una etiqueta de GST de 29kDa. Se realizaron geles de acrilamida SDS-PAGE al 12%. En gel se pueden ver una banda aumentada entre la columna de inducido y no inducido a la altura por encima del marcador de 66.2, banda que se conserva en la fracción soluble y no soluble de la muestra inducida. La purificación realizada con resina de glutatión sefarosa muestra, en las columnas correspondientes a las eluciones de la 2 a la 4 una banda conservada por encima de los 66.2, así como otras bandas por debajo de 45 kDa.

Se realizó un western blot con las mismas muestras incubado con anticuerpo contra HsFib y el film resultante muestra una señal que corresponde a la banda por encima de los 66.2 en los carriles correspondientes a la elusión 2, 3, 4 y la resina, porque podemos asumir que es la correspondiente a fibrilarina.



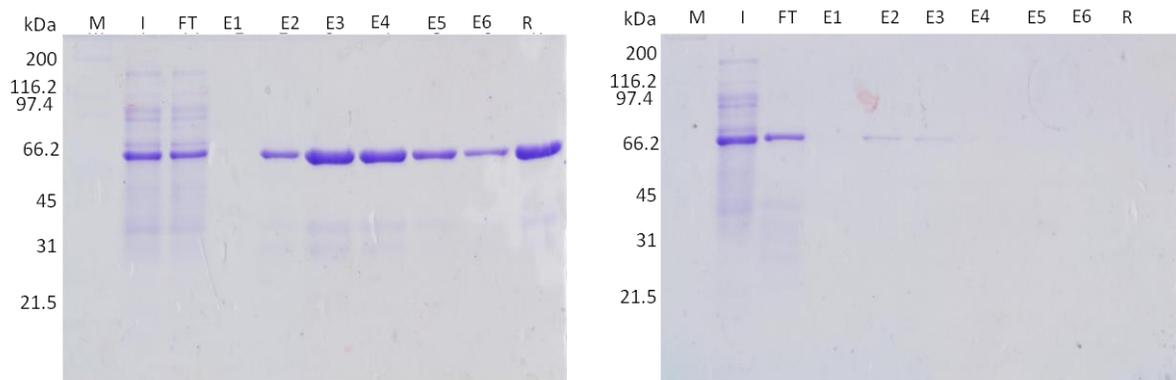
Anexo 7 Purificación e inmunodetección de HsFib. Izquierda. Se muestra la purificación de HsFib en orden de NI (o inducido), FS (fracción soluble de inducido), FI (Fracción insoluble), FT (flow through) y las eluciones correspondientes de 1 a la 4 y la resina. Purificación con resina de Glutation sefarosa. Derecha. Western blot de la purificación vista a la izquierda. Se señala con una flecha la banda correspondiente a HsFib.

Purificación de proteínas recombinantes

Debido a que la proteína cuenta con dos etiquetas de histidinas adicional a la etiqueta de GST se utilizó una resina con afinidad de Ni. En el gel de la izquierda se aprecia un patrón de bandeado en la que sobresale una banda por encima de los 66.2 kDa en la columna correspondiente a la muestra inducida y el flow through, en las columnas

ANEXOS

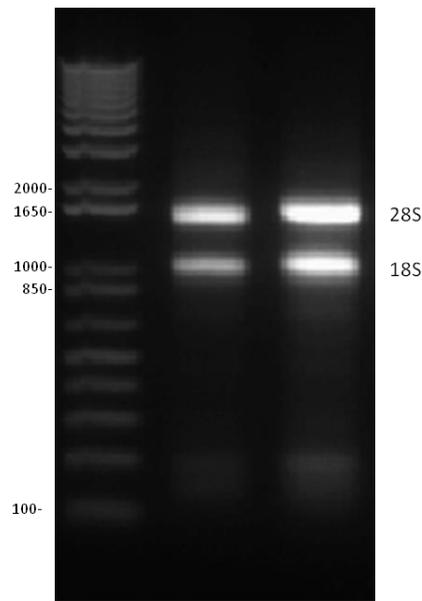
correspondientes a las eluciones de la purificación esta banda se conserva, a diferencia de la purificación con glutation, en esta se aprecia una menor cantidad de bandas adicionales a esta y de menor intensidad entre 31 y 45 kDa. A partir de la elusion numero 3, que fue la banda más intensa, se realizó una purificación con resina de glutation sefarosa (gel a la derecha) en que se observan las eluciones producto de la purificacion tienen menor intensidad que la purificación anterior pero las bandas adicionales a la esperada arriba de 66.2 kDa ya no se aprecian.



Anexo 8 Purificación de HsFib con dos resinas. Izquierda Purificación de HsFib con resina de afinidad a Niquel con fracción soluble de cultivo inducido, flowtrhu y las eluciones correspondientes de la 1 a la elusión 6 y la resina. Derecha. Purificación con resina de glutation sefarosa de HsFib a partir de la elusión 3 de la purificación con resina de Níquel.

Extraccion de RNA de inflorescencias de brocoli

La extracción de RNA se visualizó en un gel de agarosa al 1% y se realizaron por duplicado, en este se puede observar las bandas correspondientes a 18S y 28S con intensidad y una señal arriba de 100 kb que se estima corresponde a 5S.

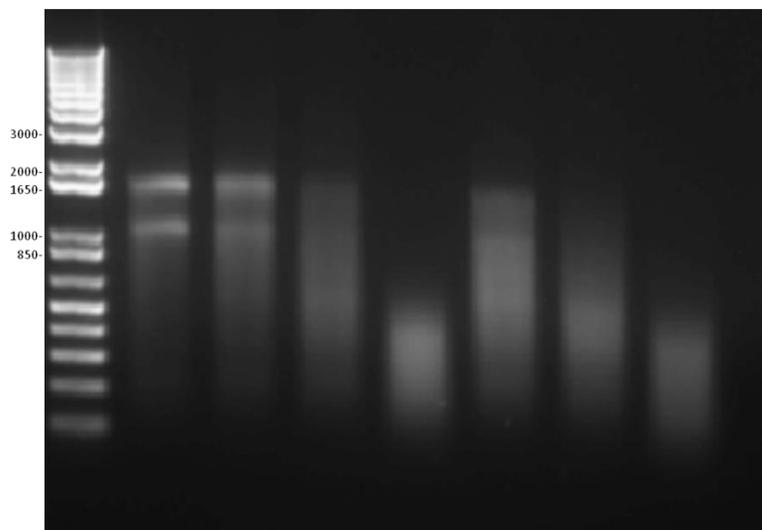


Anexo 9 Purificación de RNA. Realizado con kit innu prep plant RNA en la que se pueden ver las bandas correspondientes a 28S y 18S Gel de agarosaal 1% teñido con bromuro de etidio.

Ensayo de actividad RNasa con HsFib

Se realizó un ensayo de actividad RNasa con la proteína HsFib en la que se compraron condiciones en ausencia y presencia de calcio. En el carril correspondiente al control no se incluyó la proteína y en esta aún se aprecian las bandas 18S y 28S, en los siguientes 3 carriles se adicionaron cantidades crecientes de la proteína en ausencia de calcio, en las se observa que la actividad RNasa aumenta. En los últimos 3 carriles se adicionaron cantidades crecientes de HsFib en presencia de calcio. Se puede apreciar que en los 3 últimos carriles la actividad degradativa es mayor, por lo que podemos pensar que la presencia de calcio aumenta la actividad RNasa de fibrilarina.

RNA/Buffer	10	10	10	10	10	10	10
Fib	-	2	4	6	2	4	6
1mM Ca	-	-	-	-	2	2	2
Buffer	10	8	6	4	6	4	2

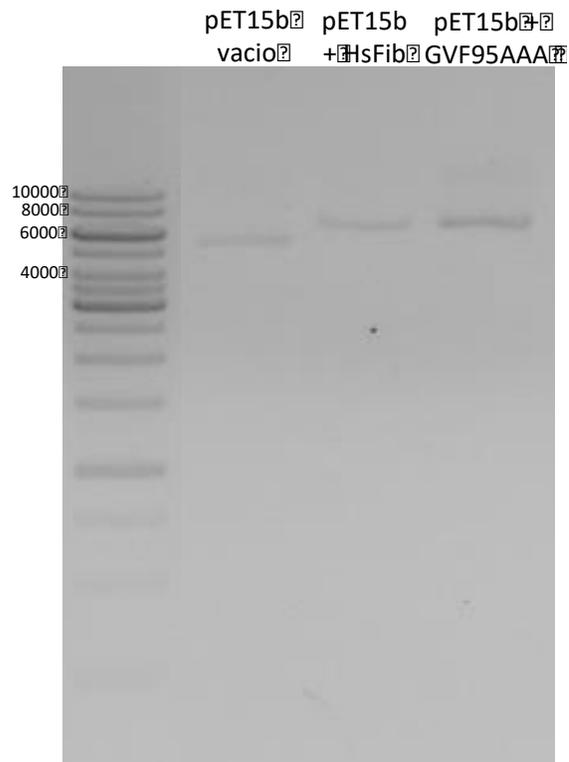


Anexo 10 Ensayo de actividad RNAsa de HsFib. Utilizando cantidades crecientes de la proteína y en condiciones con ausencia y presencia de calcio y utilizando un control sin la proteína.

Mutantes de fibrilarina en vector de expresión en bacterias

Se realizaron ensayos para la obtención de mutantes en un vector de expresión en bacteria, para esto se tomaron en cuenta 2 alternativas, las cuales son la técnica de plásmido completo y la amplificación del fragmento correspondiente a la proteína de las mutantes previamente obtenidas y su posterior subclonación.

El producto del método de plásmido completo se observa en el anexo 7, con la comparación del plásmido pet15b+fib y la mutante GVF95AAA en vector de expresión en bacteria.

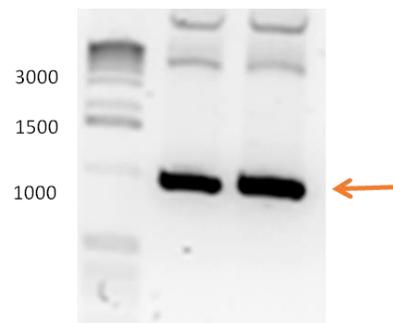


Anexo 11 Miniprep de células *E. coli* transformadas con producto de PCR recircularizado. Gel de agarosa al % teñido con red safe. Las bandas más abundantes se encuentran entre los 6 mil y 8 mil pH lo cual coincide con el tamaño esperado para el plásmido pET15b.

Para la expresión en bacteria se consideró también el plásmido pet15b para el cual se tomaron 2 estrategias posibles, la mutagénesis por plásmido completo y la subclonación del vector para transfección EGFP al vector de expresión pet15b para el que se diseñaron oligos para amplificar el fragmento y utilizar las enzimas BamHI y XhoI como se muestra en el anexo 11 y 12.

Primers para amplificación de fibrilarina

Primer	Secuencia 5' -> 3'
fwfib	GGATCCATGAAGCCAGGATT
rvfib	CTCGAGTCAGTTCTTCACCT

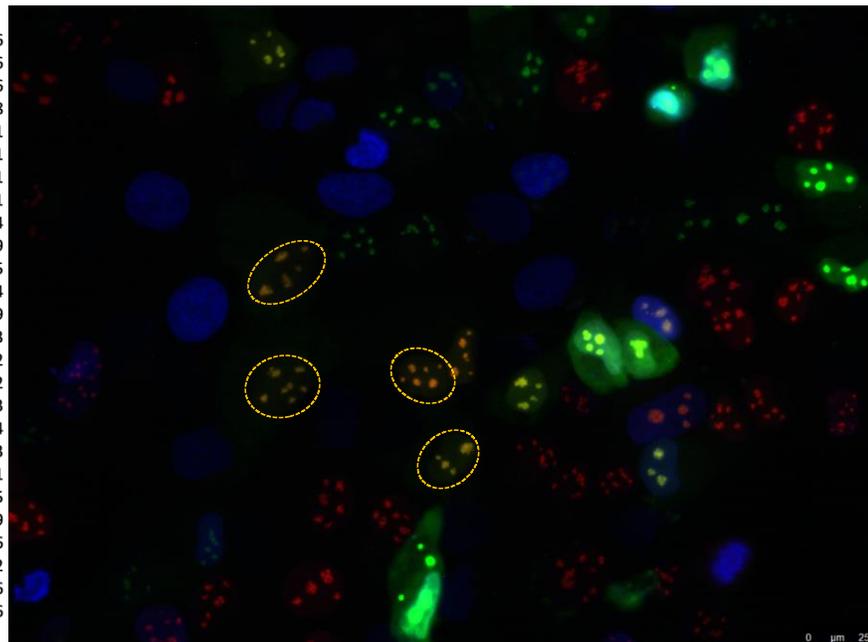


Anexo 12 Oligonucleótidos para amplificar el fragmento de fibrilarina y fragmento amplificado. Los oligos fueron diseñados para flanquear fibrilarina y en el gel se puede observar una banda cercana a mil pb. Ambas bandas corresponden a HsFib. Gel de agarosa al % teñido con red safe.

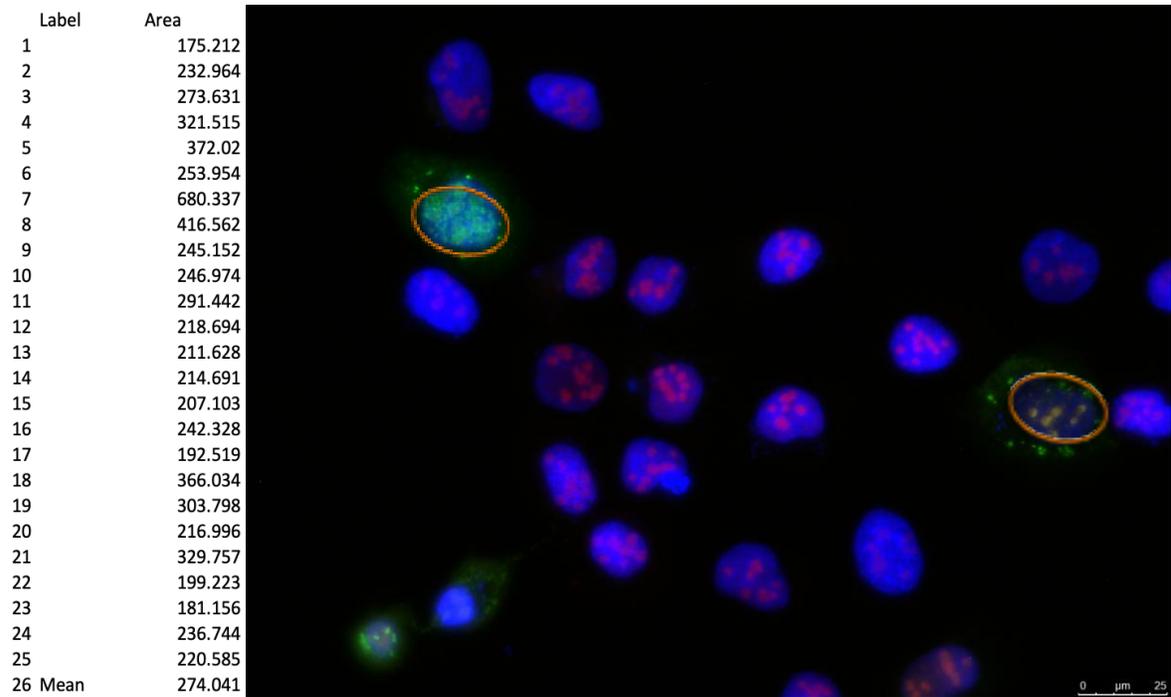
Análisis del tamaño de núcleos de mutantes de fibrilarina y silvestre

Para la obtención de mutantes en el vector de expresión en bacteria, se implementó de forma adicional el método de mutagénesis por plásmido completo.

Label	Area
1	155.726
2	191.696
3	293.956
4	343.728
5	311.181
6	385.481
7	450.21
8	288.441
9	456.854
10	379.69
11	341.65
12	247.884
13	399.39
14	350.793
15	492.252
16	372.72
17	272.383
18	267.584
19	271.143
20	532.151
21	500.125
22	240.789
23	292.346
24	220.402
25	253.326
26 Mean	332.476

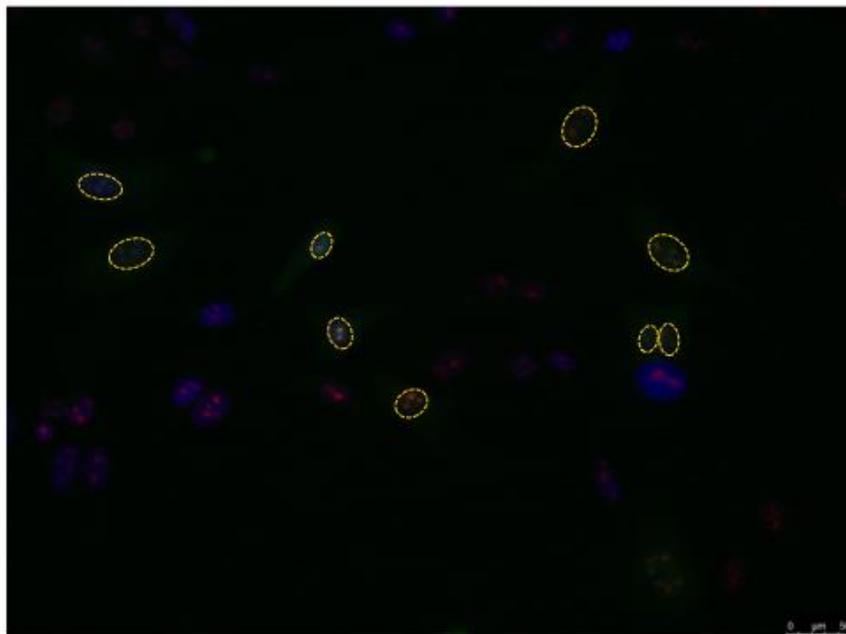


Anexo 13 Análisis de tamaño de núcleos de fibrilarina silvestre en condiciones fisiológicas de crecimiento, ejemplo del tipo de células que se analizaron para el estudio.



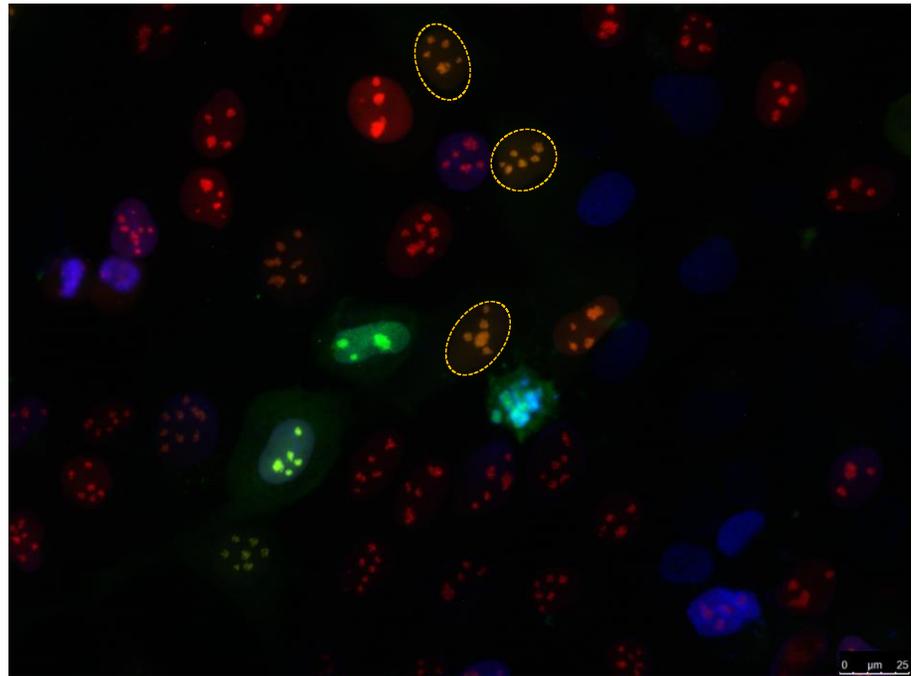
Anexo 14 Análisis de tamaño de núcleos de fibrilarina silvestre en condiciones de estrés a 45°C, ejemplo del tipo de células que se analizaron para el estudio.

Label	Area
1	469.636
2	433.299
3	234.979
4	318.373
5	265.643
6	249.63
7	419.036
8	388.75
9	280.151
10	158.355
11	552.73
12	561.167
13	344.618
14	236.452
15	238.182
16	519.198
17	534.125
18	258.419
19	273.138
20	236.529
21	316.069
22	328.926
23	328.221
24	213.761
25	280.246
26 Mean	337.585



Anexo 15 Análisis de tamaño de núcleos en transfecciones de la mutante T208A. Se tomaron en cuenta núcleos completos utilizando el programa ImageJ que realizó en cálculo de forma automática tomando en cuenta la escala correspondiente y una delimitación de área manual.

Label	Area
1	521.188
2	541.401
3	349.053
4	229.079
5	227.341
6	446.857
7	315.365
8	389.913
9	444.901
10	387.561
11	361.493
12	367.604
13	422.607
14	494.913
15	525.254
16	363.33
17	373.065
18	437.802
19	350.458
20	445.211
21	327.959
22	361.058
23	343.968
24	299.577
25	356.208
26 Mean	387.327



Anexo 16 Análisis de tamaño de núcleos en transfixiones de la mutante D216N. Se tomaron en cuenta núcleos completos utilizando el programa ImageJ que realizó el cálculo de forma automática tomando en cuenta la escala correspondiente y una delimitación de área manual

GVF95AAA 37°C		GVF95AAA 45°C	
	Area		Area
1	294.746	1	274.803
2	261.599	2	247.958
3	237.78	3	241.325
4	425.03	4	242.361
5	586.98	5	289.866
6	550.356	6	168.742
7	500.411	7	191.248
8	425.959	8	249.299
9	376.601	9	209.142
10	563.306	10	170.511
11	531.125	11	171.586
		12	245.937
	432.172091	13	247.865
		14	128.906
		15	314.779
		16	265.592
		17	296.674
		18	166.873
			229.081

Anexo 17 Mediciones de tamaño de núcleos para el análisis del área promedio de los núcleos en la mutante GVF95AAA en condiciones fisiológicas y condiciones de estrés a 45°C.

K131E, A250P 37°C		K131E, A250P 45°C	
	Area		Area
1	491.977	1	329.751
2	306.933	2	384.825
3	212.735	3	363.621
4	413.629	4	244.801
5	252.449	5	253.475
6	347.7	6	165.857
7	322.928	7	270
8	485.895	8	226.143
9	1056.366	9	300.735
10	203.009	10	243.547
11	252.898	11	228.44
		12	212.545
		13	194.51
	395.138	14	361.969
		15	183.904
		16	316.806
		17	574.374
		18	315.532
			287.269

Anexo 18 Análisis del tamaño promedio de núcleos transfectados con la mutante K131E, A250P en condiciones de crecimiento fisiológicas y en condiciones de estrés a 45°C.