



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio de la proteína Fibrilarina Like (FBLL1)

Tesis que presenta

Jany Valdés Martínez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Opción en Bioquímica y Biología Molecular**)

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Jany Valdés Martínez** titulado “**Estudio de la proteína Fibrilarina Like (FBLL1)**”, fue realizado en la unidad de Bioquímica, en la línea de investigación Morfogénesis y Regulación Génica, en el Laboratorio 23 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Enrique Castaño de la Serna**, dentro de la opción Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 21 de noviembre de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 registrarán 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: _____

Nombre: Jany Valdés Martínez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado: Estudio funcional de la Fibrilarina en la progresión viral en plantas, FRONTERAS DE LA CIENCIA, FC 2016-5012, bajo la dirección del Dr. Enrique Cataño de la Serna.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) y a la dirección adjunta de Posgrados y becas, por haberme otorgado la beca nacional gracias a la cual me fue posible completar mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las instalaciones y recursos prestados para realizar mi trabajo de investigación.

A mi asesor de tesis, el Dr. Enrique Castaño de la Serna por haberme guiado y haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, le debo sin dudas gran parte de mi formación profesional.

A la Dra Alma Laura Rodríguez Piña por asesoría técnica y experimental así como su ayuda incondicional, por compartirme sus conocimientos y experiencias, por guiarme e ir junto a mí en cada paso, en cada ensayo.

Al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y al Dr. Víctor Aguilar Hernández por ser parte de mi comité durante estos dos años y contribuir en gran medida a mi formación y a la realización de la presente investigación.

A la Ing. Wilma Aracely González Kantun por su apoyo técnico y paciencia durante mi tiempo en el laboratorio.

A los compañeros del laboratorio 23 de la unidad de Bioquímica y Biología molecular. Laura, Andrea, Angélica, Stefano, Jaime y Susana por su guía, consejos y ayuda durante mi trabajo.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

1. Artículo titulado: Fibrilarina y Cáncer ¿Un nuevo marcador molecular?
Sometido a la Revista Recursos Naturales y Sociedad (Septiembre 2023).

DEDICATORIAS

A mis padres, porque me enseñaron a no rendirme y me guiaron desde siempre por el camino de la superación. Por su apoyo incondicional, ese que no conoce límites. Por acompañarme en este viaje incierto, lejos de nuestras raíces, pero con la satisfacción de estar siempre unidos.

A mi esposo, por su dedicación, su amor incondicional, por sacarme una sonrisa aún en los momentos que pareciera imposible. Gracias por librar conmigo esta batalla y enfrentar conmigo cualquier adversidad.

A mis abuelos: Olga y Jacinto, a ustedes les debo gran parte de mi formación, de la persona que soy hoy en día. Por su apoyo incondicional, su amor sin límites y esa bondad desbordada que iluminará siempre mi camino.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	3
1. 1. Núcleo Celular.....	3
1.1.1. Nucléolo.....	4
1.1.1.1 Estructura del Nucléolo.....	4
1.2. Generalidades de Fibrilarina.....	4
1.2.1 Dominios de la Fibrilarina.....	5
1.2.2. Dinámica de fibrilarina entre el nucleolo y los cuerpos cajales.....	7
1.2.3. Funciones de la Fibrilarina.....	8
1.2.4. Fibrilarina y Cáncer.....	10
1.2.4.1. Fibrilarina y Cáncer de Mama.....	10
1.2.4.2. Fibrilarina y Carcinoma Hepatocelular.....	11
1.2.4.3. Fibrilarina y Cáncer de Próstata.....	11
1.2.5. Filogenética de la Fibrilarina.....	11
1.3. Herramientas para la identificación y caracterización de proteínas.....	14
1.3.1. Producción de anticuerpos específicos.....	14
1.3.2. Localización celular de proteínas mediante microscopía de fluorescencia.....	15

JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Análisis de la secuencia y estructura de Fib y Fib Like.....	21
2.2. Síntesis y disolución de los péptidos HsFib y HsFibLike.....	21
2.3. Inmunización.....	21
2.4. Ensayo de Dot Blot.....	22
2.5. Extracción de ADN y Amplificación del gen de Fibrilarina Like.....	23
2.6. Clonación del fragmento de PCR en el vector pGem-T Easy.....	24
2.7. Sub-clonación al vector de expresión pET-15b.....	24
2.8. Clonación de Fibrilarina Like en el vector pJET1.2.....	25
2.9. Subclonación en el vector de expresión pSNAPf.....	25
2.10. Cultivo de Células de Mamíferos.....	26
2.11. Transfección estable de células U2OS con la construcción Fib-Like-pSNAPf....	26
2.12. Transfección transitoria de células U2OS con la construcción Fib-pEGFP-C2 ...	26
2.13. Análisis Microscópico de las Células U2OS transfectadas.....	27

CÁPITULO III. RESULTADOS.....	28
3.1. Análisis Bioinformático de Fibrilarina y Fibrilarina Like	28
3.2. Obtención y procesamiento de anticuerpos policlonales en conejos.....	34
3.2.1 Ensayo de Dot Blot.....	35
3.3. Obtención de Fibrilarina Like recombinante.....	36
3.4. Generación del vector con Fibrilarina Like y la etiqueta SNAP.....	41
3.5. Localización celular de Fibrilarina Like en células humanas.....	44
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS..	46
4.1. DISCUSIÓN.....	46
4.1.1. Obtención de anticuerpos específicos contra Fibrilarina y Fibrilarina Like.....	46
4.1.2. Obtención de la proteína Fibrilarina Like Recombinante.....	47
4.1.3. Localización de la Fibrilarina en células humanas.....	48
4.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	50
4.3. PERSPECTIVAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de la estructura y dominios de la Fibrilarina....	7
Figura 1.2. Esquema de la dinámica de localización de Fibrilarina entre el nucléolo, los cuerpos de Cajal y otras regiones nucleares.....	8
Figura 1.3. Resumen de los grupos taxonómicos y distribución de secuencias de proteínas FIB a través de los tres dominios de la vida.....	12
Figura 1.4. Análisis de sintenia de proteínas Fib animales.....	13
Figura 3.1. Estructura Tridimensional de Fibrilarina y Fibrilarina Like.....	29
Figura 3.2. Alineamiento de secuencias entre Fibrilarina y Fibrilarina Like.....	30
Figura 3.3. Análisis de las secciones desordenadas en Fibrilarina y Fibrilarina Like.....	31
Figura 3.4. Análisis de los péptidos HsFib y HsFibLike teniendo en cuenta la naturaleza de los aminoácidos que componen la secuencia.....	33
Figura 3.5. Análisis mediante NCBI-Blast de la homología entre los péptidos HsFib y HsFibLike con proteínas humanas.....	34
Figura 3.6. Análisis por SDS-PAGE los sueros obtenidos luego de la inoculación con los péptidos HsFib y HsFibLike.....	35
Figura 3.7. Resultado del ensayo de Dot Blot empleando diferentes concentraciones del péptido HsFibLike.....	36
Figura 3.8. Electroforesis en gel de agarosa de la Reacción de PCR del gen que codifica para Fibrilarina Like empleando los oligonucleótidos con los extremos para las enzimas de restricción XhoI y BamHI.....	37
Figura 3.9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Purificado de Fibrilarina Like con los extremos para las enzimas de restricción XhoI y BamHI.....	38
Figura 3.10. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pGEMT-easy. La construcción con un total de 4034pb. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% correspondientes a ADN plasmídico (pGem-FibLike) extraído.....	39
Figura 3.11. Electroforesis en Gel de agarosa al 1% correspondiente a ADN plasmídico pGem-FibLike antes y después de la digestión con las enzimas de restricción XhoI y BamHI.....	40
Figura 3.12. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pET15-B. La construcción con un total de 6714pb. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1%	

correspondiente a ADN plasmídico pET15B-FibLike antes y después de la digestión con las enzimas de restricción XhoI y BamHI.....41

Figura 3.13. Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pJET1.2.....42

Figura 3.14. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pSNAPf. La construcción con un total de 6845pb. B) Electroforesis en gel de agarosa luego de la extracción de FibLike-pSNAPf en comparación con el plásmido sin el inserto.....43

Figura 3.15. Transfecciones en líneas celulares estables FibLike-pSNAPf con transfecciones transitorias de Fib-pEGFP-C2 luego de 24 h de incubación **(A)** y 48 h de incubación **(B)**.....44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Calendario de Inmunización.....	22
Tabla 2.2. Características de los cebadores específicos para Fibrilarina Like.....	23
Tabla 2.3. Condiciones de PCR para Fibrilarina Like.....	24

ABREVIATURAS

Fib: Fibrilarina

ARNr: ARN Ribosomal

ARNm: ARN Mensajero

GC: Componente Granular

FC: Centro Fibrilar

DFC: Componente Fibrilar Denso

SAM: S-adenosín metionina

RBM: Motivo de Unión al ARN

CB: Cuerpos Cajales

Ac: Anticuerpo

Ig: Inmunoglobulina

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

FCA: Adyuvante Completo de Freund

FIA: Adyuvante Incompleto de Freund

GFP: Proteína Verde Fluorescente

PEi: Polietilenimina

HCC: Carcinoma Hepatocelular

RESUMEN

La Fibrilarina es una proteína nucleolar con actividad de metiltransferasa que está implicada en el procesamiento y maduración del ARN ribosomal, la metilación de histonas, la oncogénesis, el estrés celular y la biogénesis ribosomal. Además, se ha comprobado que esta proteína tiene un rol fundamental en la progresión de las enfermedades infecciosas, interactuando de manera directa con proteínas virales y bacterianas, relacionándose con el movimiento de virus y la infección sistémica en plantas, así como con la resistencia a diferentes patógenos bacterianos.

En el genoma humano se han identificado dos variantes de fibrilarina: Fibrilarina y Fibrilarina Like, expresadas indistintamente y llevando cabo la misma función celular. Sin embargo, poco se conoce acerca de Fibrilarina Like y no existe información que permita determinar en qué circunstancias se expresa cada una de estas variantes. Es por ello que nos proponemos en esta investigación caracterizar estas dos variantes de Fibrilarina, lo cual será una herramienta importante que nos permitirá determinar posteriormente la influencia de su expresión diferencial en la respuesta a los diferentes estímulos celulares.

ABSTRACT

Fibrillarin is a nucleolar protein with methyltransferase activity. That is involved in ribosomal RNA processing and maturation, histone methylation, oncogenesis, cellular stress, and ribosomal biogenesis. In addition, it has been verified that this protein plays a fundamental role in the progression of infectious diseases, interacting directly with viral and bacterial proteins, relating to virus movement and systemic infection in plants, as well as resistance to different bacterial pathogens.

There are two variants of fibrillarin identified in the human genome: Fibrillarin and Fibrillarin Like, expressed interchangeably and carrying out the same cellular function. However, little is known about Fibrillarin Like and there is no information to determine the circumstances in which each of these variants is expressed. In this research we propose to characterize these two Fibrillarin variants, which will be an important tool that will allow us to later determine the influence of its differential expression on the response to different cellular stimuli.

INTRODUCCIÓN

El nucléolo es la estructura más grande dentro de la célula, su función más importante es la biogénesis ribosomal, sin embargo también está involucrado en otros procesos, como el silenciamiento genético, la progresión del ciclo celular y la senescencia (Spector, 1993). La fibrilarina (Fib) es una proteína que se localiza dentro del nucléolo, específicamente dentro del Componente Fibrilar Denso (DFC, de sus siglas en inglés) y en las fronteras que lo separan del Centro Fibrilar (FC, de sus siglas en inglés), donde participa en los primeros pasos de la transcripción del pre-ARN ribosomal (ARNr), formando parte del complejo U3 snoRNP, responsable de la metilación de los sitios específicos 2'-O-ribosa y de su plegamiento (Amin et al., 2007). Fib está presente en todos los organismos eucariotas, presentando en general una secuencia y estructura conservadas. Se divide en dos secciones generales: el extremo N-terminal y el dominio metiltransferasa o C-terminal. Fib está implicada en el procesamiento y maduración del ARNr al igual que en el ensamblaje de ribosomas (Loza-Muller et al., 2015), la metilación de histonas y se ha relacionado con el movimiento del virus y la infección sistémica en las plantas (Li et al., 2017). Se ha demostrado que diferentes proteínas virales interactúan con Fib lo que sugiere que esta puede estar involucrada en el ciclo celular viral (Zheng et al., 2015), así mismo se ha identificado asociación entre Fib y la resistencia a diferentes patógenos bacterianos (Tiku et al., 2018). Esto pudiera resultar relevante en la respuesta a diferentes tipos de estrés en los seres vivos, ya que se ha observado que tanto Fib, como el nucléolo cambian su organización en estrés tanto biótico (ataque de virus, bacterias etc) como abiótico (calor, frío radiación ultravioleta) o inhibidores como la actinomicina D (Boulon et al., 2010).

El estudio del genoma humano ha permitido identificar dos genes que codifican para Fib, los cuales dan lugar a Fib y Fib Like. Ambas metiltransferasas con la misma función biológica y con una homología en su secuencia mayor al 90%. Sin embargo a pesar de que se conoce la existencia de ambas variantes, los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha que hablan de Fib no realizan una distinción entre ambos genes.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. 1. Núcleo Celular

El núcleo es un organelo característico de las células eucariotas, que provee del espacio necesario para la expresión de la mayoría de las funciones genómicas, como lo son el almacenamiento y la replicación del ADN, la transcripción selectiva de genes, el procesamiento del ARN mensajero (ARNm), su exportación, la biogénesis ribosomal, y la regulación del ciclo celular, entre otros (Janota et al., 2020). Estas funciones son básicas para la vida y se llevan a cabo tanto en núcleos de células animales como de células vegetales. Estos procesos tienen lugar en gran parte por medio de interacciones moleculares entre proteínas y moléculas de diversa índole (Mohamad y Boden, 2010).

La organización interna del núcleo es clave para el correcto funcionamiento de la célula. Esta organización consiste en el agrupamiento de moléculas diversas como ADN, ARN, lípidos y proteínas en regiones específicas, de acuerdo a su actividad, conformando las regiones intranucleares (Enyedi et al., 2016). Estas regiones se distinguen con base en su morfología y composición, encontrándose en movimiento constante, cambiando su tamaño y forma, resultado del flujo y recambio de sus moléculas (Mohamad y Boden, 2010). Las actividades que desempeñan las regiones intranucleares se ven determinadas por la naturaleza de las moléculas que entran y salen de ellas. Entender la naturaleza de este flujo de moléculas es fundamental para comprender la actividad del núcleo y es lo que comprende el estudio de la dinámica nuclear (Nagata y Takeyasu, 2007). Las regiones intranucleares se identifican como conjuntos de agregados moleculares, morfológicamente distintos, cuyos componentes se concentran de manera específica de acuerdo a sus funciones dentro del núcleo.

En los años recientes, elucidar la composición molecular de estos dominios ha sido uno de los temas de mayor relevancia en el estudio de la bioquímica y biología molecular de la célula (Spector y Lamond, 2001). Sin embargo, no sólo se busca la descripción de la composición de estos dominios, sino también comprender los mecanismos por los cuales estas regiones interactúan entre sí, abriendo paso al estudio del movimiento y recambio de moléculas en el núcleo (Nagata y Takeyasu, 2007).

1.1. 1 Nucléolo

El nucléolo es la región intranuclear donde se lleva a cabo la síntesis del ARNr, su procesamiento y ensamblaje en las subunidades ribosomales (Spector, 1993), y es también la estructura más prominente dentro del núcleo. La mayoría de las células de mamíferos contiene entre 1 y 5 nucléolos, cada uno con un diámetro entre 0.5 y 5 μm (Fatica et al., 2000).

1.1.1.1 Estructura del Nucléolo

El nucléolo se encuentra organizado en un arreglo concéntrico de cuatro tipos de componentes (Tartakoff et al., 2022), los cuales definen su organización como se describe a continuación:

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

Generalmente en un nucléolo de células animales la región GC ocupa el 75% del volumen, el DFC el 17% y el FC un 8%. Un nucléolo típico de plantas tiene una proporción de DFC mayor al 70% y de FC al rededor del 1%. La descripción de los componentes del nucléolo ha sido complicada ya que parece ocurrir una transición gradual entre el DFC y el GC. Algunos estudios con dextranos de diferente peso molecular muestran que el nucléolo es permeable para macromoléculas de hasta 2000 kDa (Lafontaine et al., 2021). Esto sugiere un modelo esponja en donde el interior de cada sub-compartimento es penetrado por el nucleoplasma formando una red de canales nucleolares de diferentes tamaños que proveen fácil acceso a macromoléculas (Handwerger et al., 2005).

1.2. Generalidades de Fibrilarina

Fib es una metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) al grupo 2'-hidroxi de la ribosa blanco en el pre-ARNr (Lechertier et al., 2009). Dependiendo del organismo, la masa de Fib varía entre 34 y 38

KDa y fue originalmente descrita en el nucléolo de *Physarum polycephalum* (Shubina et al., 2020).

Fib se localiza dentro del nucléolo, específicamente dentro del DFC y en las fronteras que lo separan del FC donde participa en los primeros pasos de la transcripción del pre-ARN ribosomal (Btissame et al., 2019), formando parte del complejo U3 snoRNP (Aittaleb., et al, 2004), responsable de la metilación de los sitios específicos 2'-O- ribosa y de su plegamiento (Amin et al., 2007).

1.2.1 Dominios de la Fibrilarina

Dominio GAR

El extremo N-terminal, compuesto de 80 residuos, comprende un sitio rico en glicina y arginina, conocido como dominio GAR (Shubina et al., 2020). Este dominio es metilado en sus residuos de arginina y es responsable de la interacción con diferentes proteínas (Mei et al., 2021). El dominio GAR está ausente en la Fib de arqueas. En la figura 1.1 se observa que el extremo N-terminal está conformado por el dominio GAR que está delimitado con un bloque azul y la región espaciadora que se muestra en una barra gris.

La función de una proteína se rige por su secuencia de aminoácidos que comprende dominios y motivos. El tipo de dominio(s) que contiene una proteína proporcionará las propiedades inherentes y, por lo tanto, influirá en la ruta a la que pertenece (Pawson y Nash, 2003).

La arginina es un residuo con carga positiva conocido por mediar en los enlaces de hidrógeno y las interacciones amino aromáticas, y se encuentra con frecuencia en motivos proteicos. Además, la arginina está regulada por modificaciones postraduccionales y agrega una complejidad interesante y biológicamente relevante. Varios motivos contienen argininas en repeticiones de secuencias RGG y RG que colectivamente denominamos motivo RGG/RG. Estos motivos de arginina metilados a menudo se denominan regiones ricas en glicina arginina (GAR) (Shubina et al., 2020).

En general, la caja RGG o dominio GAR actúa como un dominio de unión a ácidos nucleicos con afinidad por estructuras de ácidos nucleicos primarias y secundarias y también han demostrado mediar en las interacciones proteína-proteína, en este caso la metilación de la arginina es un regulador bien conocido de estas interacciones (Menon et al., 2004). Las proteínas que contienen dominios GAR están asociadas con varios procesos fisiológicos, como la represión traduccional, la regulación

de la apoptosis, la regulación transcripcional, la señalización de daños en el ADN y el empalme del ARNm precursor (pre-ARNm), muchos de los cuales están regulados, al menos en parte, a través de la metilación en arginina de estos dominios (Nissan et al., 2010).

Fib tiene un dominio GAR, N terminal largo, con diversas combinaciones de repeticiones de arginina-glicina-glicina (RGG) o arginina-glicina (RG) presente en eucariotas, pero no en Archae (Shubina et al., 2020). La metilación de arginina en el dominio GAR puede regular la localización nuclear y nucleolar de Fib (Shubina et al., 2020). Por lo tanto, los dominios GAR largos en Fib eucariotas podrían estar al menos parcialmente correlacionados con nuevos requisitos de sub-compartimentación en células eucariotas.

La Fib puede modular la actividad de otras proteínas que interactúan con ella a través del dominio GAR. Por ejemplo, se demostró que la sirtuina 7 (una proteína que es esencial para la escisión del pre-ARNr 45S) interactúa físicamente con Nop56 y el dominio GAR de Fib (Sirri et al., 2019). Se ha demostrado además que el dominio GAR también está involucrado en la orientación de Fib a núcleos y nucléolos.

Dominio Central o de unión al ARN (RBM, de sus siglas en inglés)

Está localizado en el centro de la proteína, se trata de una secuencia de alrededor de 90 residuos aminoacídicos que asemeja el dominio RBM de varios snRNPs, el cual junto con el dominio C-terminal α -hélice constituyen un dominio similar a metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la SAM. En la figura 1.1 se aprecia que el dominio metiltransferasa está compuesto por el dominio central (R) marcado con un bloque morado y el dominio α -hélice marcado con un bloque amarillo. Dentro del dominio central se encuentra el motivo RBM conformado por el octámero GCVYAVEF; a su vez, las barras rojas marcan las zonas de unión específica al ARN (Wang et al., 2012).

Dominio C-terminal rico en α -hélices

Compuesto por alrededor de 30 residuos, se considera que este dominio es el responsable de la localización de Fib. Sin embargo, el destino final de Fib estará condicionado, en ambos casos, por la presencia de las regiones de unión al ARN. La presencia de las regiones de unión al ARN parecen ser un prerrequisito para que Fib pueda dirigirse a sus regiones intranucleares de manera correcta (Snaar et al., 2000).

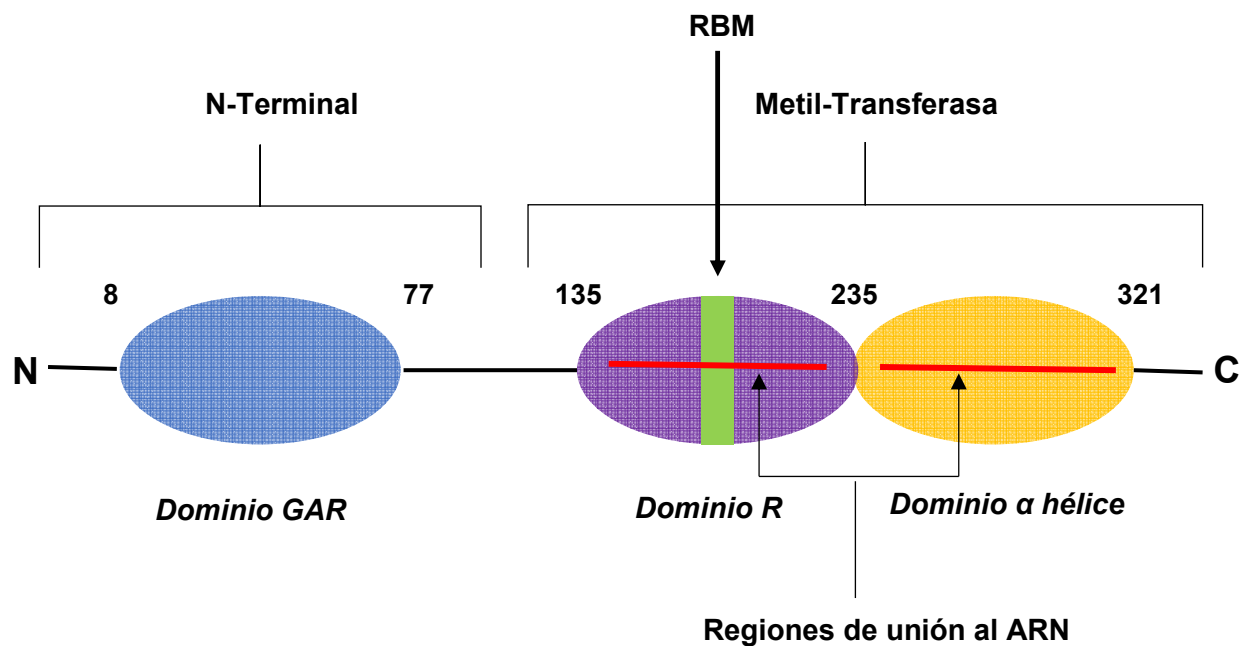


Figura 1.1. Representación esquemática de la estructura y dominios de la Fibrilarina (Modificado de Aquino et al., 2016).

1.2.2. Dinámica de fibrilarina entre el nucleolo y los cuerpos Cajales

Fib así como otras proteínas nucleares es altamente dinámica, debido al flujo de moléculas requeridas para el proceso de la biogénesis ribosomal. El estudio de la dinámica de Fib se ha llevado a cabo marcando la proteína con proteína verde fluorescente siguiendo la recuperación de la fluorescencia después de experimentos de foto-blanqueo (Dierley Keppeke et al., 2022). Las observaciones de dicho experimento muestran un rápido intercambio entre la Fib en el nucléolo y el nucleoplasma, también muestran ligeras diferencias cinéticas dependiendo de la localización de Fib bajo estas condiciones, las moléculas de Fib están presentes en Cuerpos Cajales (CB) y el nucléolo solo por corto tiempo (Snaar et al., 2000).

Se ha propuesto que Fib funciona como un eslabón molecular entre los nucléolos y los CB. Como se observa en la Figura 1.2, el movimiento de Fib en cuestión de segundos, a través del nucleoplasma de los nucléolos hacia los CB y viceversa, sugiere que esta se

transporta entre ambas regiones más de una vez durante su periodo activo (Gall, 2000). Dicho transporte podría suceder después de cada acto funcional, por ejemplo, un suceso de transcripción o al terminar el procesamiento del pre-ARNr. Por otro lado, en la Figura 1.2 se esquematiza cómo Fib dispersa en el nucleoplasma se dirige al nucleolo donde se concentra en mayor cantidad. Se observa que después de un evento de fotoblanqueo Fib presenta tasas de recambio entre el nucleolo y las zonas circundantes (Snaar *et al.*, 2000).

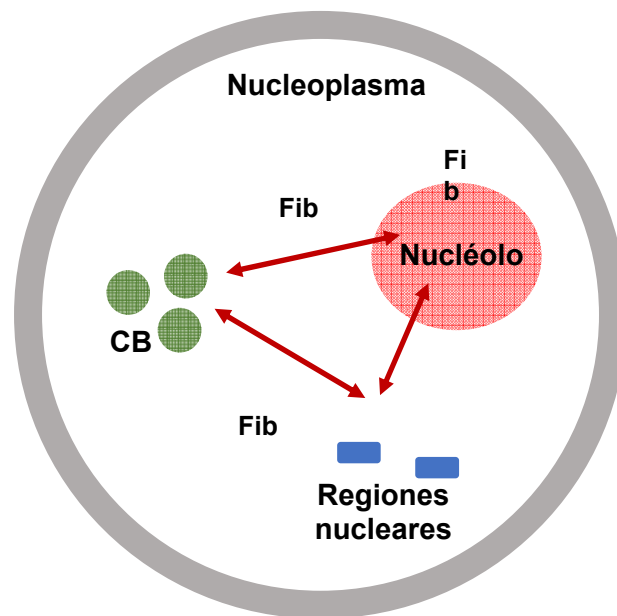


Figura 1.2. Esquema de la dinámica de localización de Fibrilarina entre el nucleolo, los cuerpos de Cajal y otras regiones nucleares (Modificado de Aquino *et al.*, 2016).

1.2.3. Funciones de la Fibrilarina

Fib está implicada en el procesamiento y maduración del ARNr al igual que en el ensamblaje de ribosomas, la metilación de histonas y se ha relacionado con el movimiento del virus y la infección sistémica en las plantas (Li *et al.*, 2017). Esto la asocia a procesos de vital importancia como el desarrollo celular, la progresión viral, la oncogénesis, el estrés celular, la muerte celular y por supuesto, la biogénesis de los ribosomas (Marcel *et al.*, 2013). Fib se encuentra directamente involucrada en diversos

procesos postranscripcionales como son el procesamiento del pre-ARNr, la metilación del pre-ARNr y el ensamblaje de los ribosomas.

La principal función conocida de Fib es la metilación de la 2'-O-ribose blanco del ARNr y de los ARN pequeños nucleares (snARN), sin embargo debido a que esta proteína tiene una baja afinidad por el ARN se sugiere que forma complejos con otras proteínas formando así un snoRNP específico para llevar a cabo la metilación (Guillen-Chable et al., 2020).

Dicho complejo es dirigido por un snoARN guía que tiene la secuencia de la caja H/ACA, la cual determina la especificidad por el ARN a modificar. Cada snoRNP contiene un snoRNA de entre 70 a 600 nucleótidos y proteínas asociadas (Lechertier et al., 2009).

Fib también se ha relacionado con la progresión de diversas enfermedades virales y la patogenicidad de varios agentes bacterianos. Los virus han evolucionado para utilizar la maquinaria celular a su favor. Los virus de ADN ingresan al núcleo para replicar su genoma utilizando los componentes nucleares de la célula (Chang et al., 2016). En el caso de la mayoría de los virus de ARN, la replicación se lleva a cabo en el citoplasma y su interacción con el núcleo no es algo esperado. Sin embargo, se ha observado que algunas proteínas de virus de ARN en efecto ingresan al núcleo, no para llevar a cabo la replicación de su genoma, sino para otros propósitos en beneficio del virus, como la inhibición de la respuesta inmune, inhibición de la apoptosis o la regulación del ciclo celular (Sang et al., 2007).

Se ha observado que, en el caso de algunos virus de cadena sencilla, de polaridad positiva, el núcleo puede ser removido de la célula con ayuda de la citocalasina B y después infectado y el virus se replicará con una eficiencia similar a las células con el núcleo intacto. Sin embargo, una pequeña reducción puede observarse en estas células, lo que sugiere que el nucléolo no está relacionado directamente en la replicación de los virus de ARN, pero afecta otros eventos en el ciclo viral (Sango et, al 2007).

En las plantas, el efecto de silenciamiento de la expresión de la Fib sugiere que está involucrada únicamente en el movimiento de los virus a larga distancia. Los virus son capaces de generar proteínas de movimiento que pueden localizarse en el núcleo y co-localizarse en el nucléolo donde se encuentra Fib. Algunas de estas proteínas pueden interactuar directamente con Fib y se requiere de dichas interacciones para facilitar las diferentes funciones de los virus. Estas proteínas pueden llegar al nucléolo donde se

encuentra Fib y reclutarla para poder llevar las proteínas virales al citoplasma tal como lo hace ORF3 del virus GRV (Canetta et al., 2008).

1.2.4. Fibrilarina y Cáncer

Las alteraciones en la función nucleolar y la biogénesis de los ribosomas tienen una asociación notable con varias patologías importantes, como enfermedades neurológicas (enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington) y fisiopatologías cardiovasculares (isquemia, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio e hipertrofia de cardiomiocitos). A finales del siglo XVIII, un patólogo italiano, Giuseppe Pianese, describió los nucléolos agrandados y más numerosos como uno de los primeros marcadores de cáncer observados (Ruggero, 2012).

El pensamiento prevaleciente es consistente con el conocimiento de sentido común de que un tumor es un tejido que prolifera rápidamente y, por lo tanto, tiene una gran demanda de producción de proteínas que se satisface con un aumento del número de ribosomas. Sin embargo, estudios más profundos han revelado que el núcleo puede estar involucrado en múltiples aspectos de la oncogénesis y la progresión tumoral.

1.2.4.1. Fibrilarina y Cáncer de Mama

Hallazgos recientes respaldan la idea emergente de que la desregulación de la biogénesis de los ribosomas en las células cancerosas no es solo una consecuencia de la oncogénesis, sino que representa un paso clave en este proceso complejo. La biogénesis de los ribosomas es un proceso de múltiples etapas que implica la regulación transcripcional y postranscripcional y un estricto control de calidad para producir ribosomas funcionales. Los primeros estudios en cáncer de mama detallaron la relevancia funcional entre la metilación mejorada del ARNr y la biogénesis de los ribosomas en relación con la progresión de la enfermedad (Belin, 2009).

Más recientemente, se informó mediante un análisis detallado de modelos de cáncer de mama humano y de ratón que había aumentado la expresión de Fib. Además, la eliminación de Fib produjo efectos perjudiciales significativos sobre la tumorigenicidad, lo que fortaleció aún más las evidencias de la importancia de Fib en el proceso de progresión del cáncer (Gong, 2017).

1.2.4.2. Fibrilarina y Carcinoma Hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (HCC) es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. Se caracteriza por un rápido progreso y mal pronóstico. Weixin et al. (2022) determinaron el grado de expresión de Fibrilarina en el HCC, analizando su expresión en muestras de tejido de carcinoma hepatocelular y tejido hepático normal. En este caso la concentración de ARNm de Fibrilarina en tejidos de HCC fue significativamente mayor que en tejidos de hígados normales ($p < 0,001$).

Los resultados de análisis de supervivencia mostraron que la expresión alta de Fib se correlacionó positivamente con una supervivencia general más corta. Los resultados mostraron que, en comparación con tejidos hepáticos normales adyacentes, la expresión de Fibrilarina en términos de nivel de ARNm y nivel de proteína en tejidos de HCC estaba regulada al alza, y las diferencias eran estadísticamente significativas (Weixin et al., 2022).

1.2.4.3. Fibrilarina y Cáncer de Próstata

En el cáncer de próstata, el agrandamiento y el aumento del número nucleolar son algunos de los primeros cambios morfológicos asociados con el desarrollo de lesiones premalignas de neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) y adenocarcinomas invasivos.

Para determinar la relevancia potencial de Fibrilarina para el cáncer de próstata humana, se evaluó su expresión en muestras clínicas de pacientes con cáncer de próstata. En primer lugar, se aisló el ARN total de 21 tumores de próstata congelados frescos y pares normales, y usando la técnica de PCR en Tiempo Real se encontró que Fib estaba sobreexpresada en el nivel de ARNm en la mayoría de los casos analizados (Uemura et al., 2012).

1.2.5. Filogenética de la Fibrilarina

La estructura 3D de varias Fib de Archaea y vertebrados animales (incluida la Fib humana) han sido resueltas por rayos X y resonancia magnética nuclear, mostrando dominios centrales muy similares entre arqueas y humanos. El dominio GAR no se encuentra en las Fib de Archaea, lo que sugiere su incorporación posterior en Fib eucariotas durante la evolución. Hasta la fecha, no se han detectado proteínas Fib en bacterias. En eucariotas, la Fib forma un complejo de ribonucleoproteína con las proteínas Nop56, Nop58 y un ARN nucleolar pequeño de caja C/D (snoRNA); este último guía todo el complejo hacia el ARNr objetivo para la metilación (Pereira et al., 2020).

Las proteínas Fib se han estudiado ampliamente en diferentes organismos modelo y ha ganado atención en la comunidad científica debido a sus funciones esenciales en la supervivencia celular, la terapia del cáncer, la tolerancia al estrés y la dinámica nucleolar (Pereira et al., 2020).

Pereira y colaboradores en el 2020 proporcionaron una descripción filogenética de las proteínas Fib en el Árbol de la vida mediante el uso de 1049 genomas secuenciados disponibles que abarcan virus, bacterias, arqueas, protistas, hongos, plantas y animales.

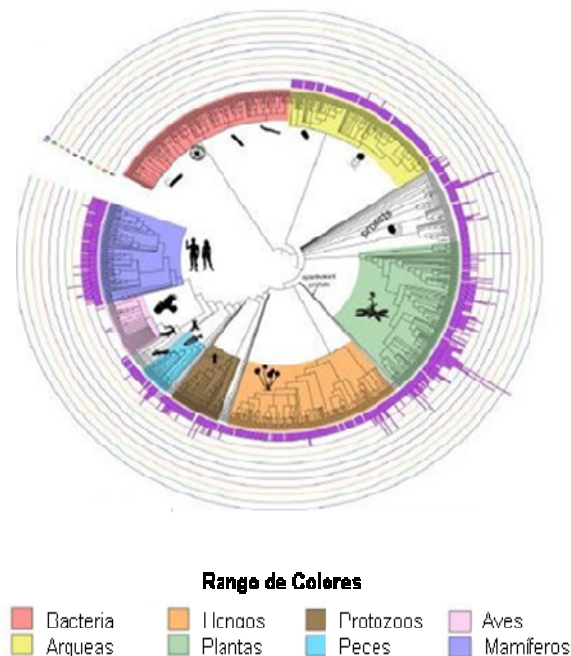


Figura 1.3. Resumen de los grupos taxonómicos y distribución de secuencias de proteínas FIB a través de los tres dominios de la vida. Se buscaron secuencias de FIB en un total de 1002 genomas de los tres dominios de la vida (212 Bacteria, 148 Archaea y 642 Eukarya). Las dimensiones del gráfico no están a escala. El número de secuencias FIB (barras moradas) por genoma analizado se agrupa según los principales taxones en un árbol filogenético de especies. Los círculos concéntricos indican el número de secuencias FIB (Modificado de Pereira et al., 2020).

El análisis filogenético de 319 Fib de animales mostró una clara separación entre invertebrados y vertebrados y la agrupación de genes por taxones principales. El hallazgo

más sorprendente fue en las Fib de mamíferos (casi todas las especies tienen dos Fib por genoma) se dividieron en dos grupos principales. Uno de estos grupos corresponde a los genes Fib clásicos (verde), y el otro a genes similares a Fib o Fib like (amarillo oscuro); (Pereira et al, 2020) (Figura 1.4).

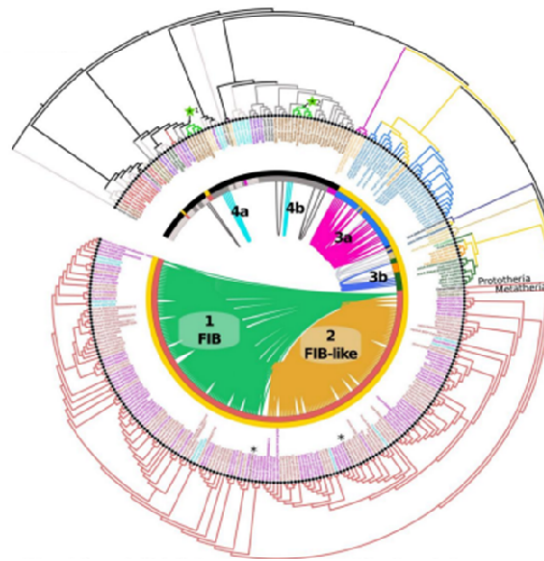


Figura 1.4. Análisis de sintenia de proteínas Fib animales. Árbol filogenético del total de 319 proteínas Fib detectadas en 257 genomas inspeccionados (195 Vertebrados y 62 Invertebrados). Se detectaron dos Fib presentes en mamíferos: Fib Clásica (se muestra en verde) y Fib Like (se muestra en amarillo). (Modificado de Pereira et al, 2020).

A la fecha, a pesar de que se conoce la existencia de ambas variantes de Fib en mamíferos, poco se conoce acerca de Fib Like. Todos los estudios que se han llevado a cabo y que hablan de Fib no realizan una distinción entre ambos genes por lo que son necesarios estudios funcionales que involucren a Fib Like. Existen diferentes técnicas que pueden permitir una diferenciación entre ambas variantes como puede ser la producción de anticuerpos (Ac_s) específicos.

1.3. Herramientas para la identificación y caracterización de proteínas

1.3.1. Producción de anticuerpos específicos

Los Ac_s policlonales son un conjunto de Ac_s diferentes que se dirigen a muchos epítomos dentro del mismo antígeno. Este tipo de Ac_s se diferencian porque son producidos por diversos clones de células B. Por tanto, tienen afinidades y especificidades diferentes por el antígeno. Estos se obtienen a partir de animales inmunizados, preferentemente conejos. Sin embargo, también se pueden producir en cabras, vacas y cerdos. Se pueden utilizar Ac_s específicos de diana para aislar e identificar moléculas de interés. Los Ac_s se han convertido en una de las herramientas más importantes en la investigación de las ciencias biológicas, ya que permiten la detección, cuantificación y determinación de cambios en proteínas y otras moléculas con respecto al tiempo y otras perturbaciones (Edfors et al., 2014). Para producir Ac_s policlonales, la inmunización con el antígeno diana se realiza en el animal durante 3 a 8 meses mediante múltiples inyecciones a lo largo de este período. A veces, también se añade al antígeno un adyuvante (Adyuvante completo o incompleto de Freund) o péptidos inmunogénicos (albúmina sérica bovina-BSA, ovoalbúmina-OVA) para mejorar la respuesta inmunitaria. Finalmente, las inmunoglobulinas policlonales se purifican a partir de suero animal.

Dependiendo del antígeno que se use para crear el Ac, se pueden usar Ac_s policlonales para identificar proteínas de alta homología con la proteína inmunógena o para detectar la proteína diana en muestras de tejido de especies distintas a la del inmunógeno. En la misma línea, es especialmente importante cuando se trabaja con Ac_s policlonales aprender tanto como sea posible sobre el inmunógeno que se ha utilizado para la producción del Ac policlonal y la posibilidad de reactividad cruzada no deseada dentro de la muestra que se está analizando. Los inmunógenos peptídicos se utilizan a menudo para generar anticuerpos policlonales que se dirigen a epítomos únicos, especialmente para familias de proteínas de alta homología.

Los Ac_s policlonales suelen estar disponibles en formatos relativamente no purificados y se denominan "antisuero" o simplemente "suero". El antisuero se refiere a la sangre de un huésped inmunizado de la que se han eliminado las proteínas de coagulación y los glóbulos rojos. El antisuero, como su nombre indica, todavía contiene Ac_s /inmunoglobulinas de todas las clases, así como otras proteínas séricas. Además de los Ac_s que reconocen el antígeno diana, el antisuero también contiene Ac_s contra otros antígenos que a veces pueden reaccionar de forma no específica en ensayos inmunológicos. Por esta razón, el antisuero crudo a menudo se somete a pasos de

purificación, para eliminar las proteínas séricas y enriquecer la fracción de inmunoglobulina que reacciona específicamente con el antígeno diana.

Horowitz et al. (2001) estudiaron la localización neuronal de la proteína Parkin, una proteína intracelular que desempeña un papel importante en la etiopatogenia del parkinsonismo juvenil autosómico recesivo. Se observó un marcaje citoplásmico consistente para Parkin en tejido de roedor incubado con un Ac policlonal generado contra la proteína Parkin humana y que tenía una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la rata. Kee et al. (2013) desarrollaron el primer Ac pan-fosfohistidina (pHis) utilizando un mimético de pHis estable como hapteno. Este Ac se utilizó con éxito en ELISA, transferencia Western, ensayos de transferencia puntual e inmunoprecipitación y en la detección e identificación de proteínas fosforiladas con histidina a partir de lisados de células nativas.

Por otra parte Liu et al. (1993) desarrollaron Ac_s para cada proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP). Con este objetivo, generaron Ac_s policlonales de conejo contra IGFBP-2, -4, -5 y -6 de rata, utilizando fragmentos peptídicos sintéticos de las IGFBP. Esto con el objetivo de estudiar la producción de IGFBP en cultivos primarios de células de rata. El uso de Ac_s es por lo tanto una herramienta importante para análisis sistemáticos de distribución celular y localización subcelular de proteínas a nivel celular así como para el estudio del comportamiento de la proteína de interés en presencia de diferentes tipos de estrés (Berglund et al., 2008).

1.3.2. Localización celular de proteínas mediante microscopía de fluorescencia.

Las actividades funcionales de las proteínas se corresponden con su expresión subcelular y sus interacciones moleculares complejas. La localización se puede demostrar eficazmente con técnicas basadas en microscopía de fluorescencia o procedimientos de fraccionamiento. Se puede lograr un amplio espectro de imágenes de fluorescencia mediante el uso de proteínas indicadoras recombinantes. El descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP, de sus siglas en inglés) de *Aequorea Victoria* y sus análogos posteriores ha revolucionado el estudio de las proteínas y su dinámica intracelular. Los investigadores han aislado, caracterizado y modificado docenas de proteínas fluorescentes de especies de medusas, corales y anémonas para satisfacer una variedad de necesidades de investigación. El resultado es un depósito de proteínas fluorescentes que varían en color, brillo, estabilidad y tiempo de maduración (Casey et al., 2016).

En la actualidad se utiliza GFP, SNAP-tag®), tintes fluorescentes o moléculas marcadas con fluoróforos (es decir, anticuerpos específicos de proteínas). Las células pueden modificarse genéticamente para sobreexpresar dianas proteicas o componentes reguladores de secuencias no codificantes, con fines tales como: determinar procesos celulares fundamentales, mecanismos de enfermedades, terapia génica y respuesta a terapias (Glory y Murphy, 2007). La etiqueta SNAP es una pequeña proteína basada en O6-alkilguanina-ADN-alkiltransferasa. Los Sustratos de etiquetas SNAP son derivados de bencil purinas y bencil pirimidinas. En la reacción de marcaje, el grupo bencilo sustituido del sustrato se une covalentemente a la etiqueta SNAP. El uso de este sistema consta de dos pasos: subclonación y expresión de la proteína de interés como una fusión SNAP-tag, y el etiquetado de la fusión con el sustrato SNAP-tag de elección (Glory y Murphy, 2007).

Los sistemas de etiquetado de proteínas fluorescentes permiten que pequeñas moléculas se vuelvan fluorescentes cuando se unen a una pequeña secuencia peptídica insertada genéticamente en la proteína diana de interés. Los avances en los sistemas de fluorescencia genéticamente modificados y en la maquinaria óptica de microscopía han convertido las imágenes en un método fundamental para la localización de proteínas (Lu et al., 2018).

Nicolle et al. (2010) construyeron un plásmido replicativo que porta SNAP-26b bajo el control del promotor *trxB* endógeno de *Porphyromonas gingivalis* (patógeno periodontal anaeróbico que reside en la compleja biopelícula microbiana de múltiples especies conocida como placa dental). La proteína SNAP26 que expresa *P. gingivalis* se marcó con éxito con fluoróforos específicos en condiciones anaeróbicas. La formación de biopelículas de *P. gingivalis* se investigó utilizando células de flujo y microscopía de barrido láser confocal. Kanda et al. (1998) fusionaron el gen de la histona humana H2B con el gen que codifica GFP y se transfectó en células HeLa humanas para generar una línea estable que expresa constitutivamente H2B-GFP. La proteína de fusión H2B-GFP se incorporó a los nucleosomas sin afectar la progresión del ciclo celular. Utilizando microscopía confocal, H2B-GFP permitió obtener imágenes de alta resolución tanto de los cromosomas mitóticos como de la cromatina en interfase, y esta última reveló varios estados de condensación de cromatina en células vivas.

Más específicamente para Fib, Guillen-Chable et al. (2020) generaron una línea celular estable SNAP-tag-Fib empleando células Hela para llevar a cabo estudios de interacción con otras moléculas celulares como es el caso de PIP2.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que se conoce la existencia de ambas variantes de Fibrilinas humanas (Fibrilarina y Fibrilarina Like), los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha que hablan de Fib no realizan una distinción entre ambos genes, por lo que se desconoce bajo qué condiciones se expresa cada uno de estas, lo cual pudiera tener una implicación biológica importante que nos permita entender la dinámica de respuesta celular ante diferentes tipos de estrés.

HIPÓTESIS

Fibrilarina y Fibrilarina Like presentan diferente localización en el núcleo celular.

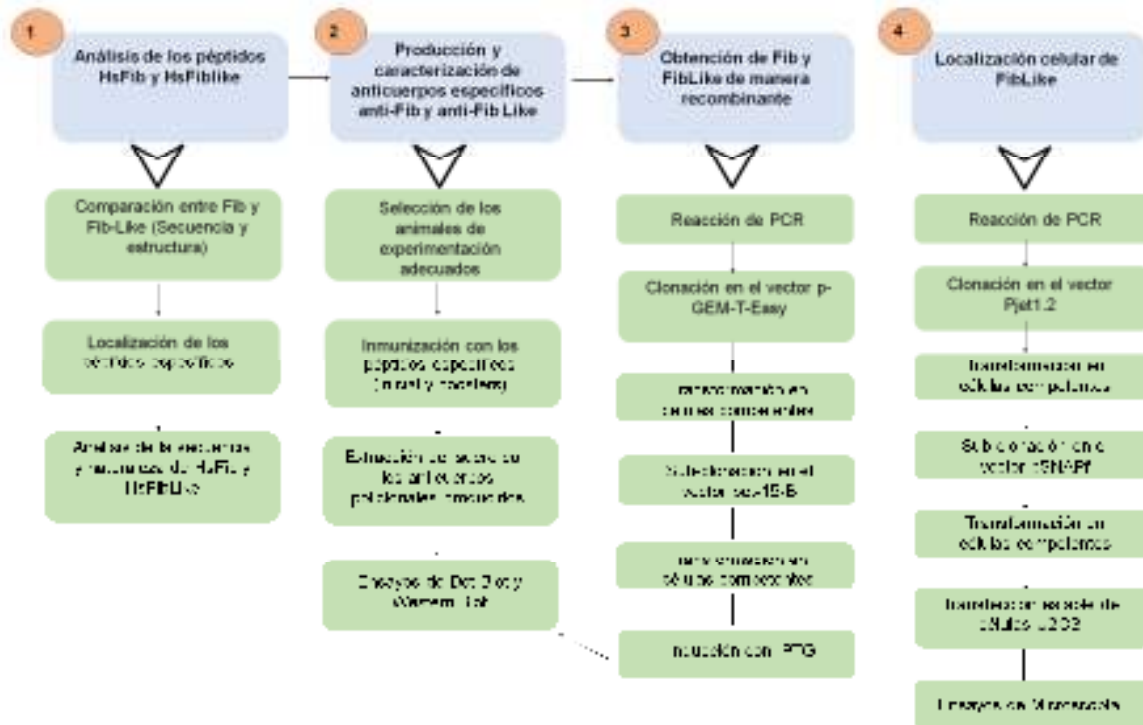
OBJETIVO GENERAL

Estudio inicial comparativo entre Fib y Fib Like

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las secuencias y estructuras de Fib y Fib Like
2. Obtener anticuerpos contra péptidos seleccionados para Fib y Fibrilarina Like
3. Clonar y expresar de manera recombinante la proteína Fib Like en bacteria y en células U2OS
4. Analizar la localización celular de Fib Like en células humanas

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis de la secuencia y estructura de Fib y Fib Like

Para analizar las secuencias de Fib y Fib Like se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias nucleotídicas empleando el programa informático *Clustal Omega versión 2.0.12*, las secuencias fueron tomadas del NCBI (ID: 2091 e ID: 345630 para Fib y Fib Like respectivamente). Para comparar la estructura tridimensional de Fib y Fib Like se utilizó el programa informático *UniProt release 2022_02*. Este es un repositorio central de datos gratuito sobre proteínas. Esto lo ha convertido en el recurso líder a nivel mundial en cuanto al almacenamiento de información sobre proteínas. La mayoría de entradas proviene de proyectos de secuenciación del genoma, y se encuentran publicadas en revistas científicas

2.2. Síntesis y disolución de los péptidos HsFib y HsFibLike

Los péptidos fueron sintetizados por la empresa Pepmic. Cada péptido fue centrifugado a temperatura ambiente luego de ser abierto para compactar la muestra en forma de “pastilla”, tal y como se recomienda previo a su reconstitución. Los péptidos fueron disueltos en 15% de acetonitrilo (ACN) y 85% de agua (**Anexo 1**).

2.3. Inmunización

En la presente investigación se emplearon 2 conejos Nueva Zelanda machos de 3 meses de edad. La vía de administración utilizada fue subcutánea y el inmunógeno se administró con adyuvantes de aceite, Adyuvante Completo de Freund (FCA, de sus siglas en inglés) (Sigma F5881) y Adyuvante Incompleto de Freund (FIA, de sus siglas en inglés) (Sigma F5506) para utilizar el “efecto de almacén”, el cual protege el inmunógeno de su dilución degradación por parte del hospedador. La **Tabla 2.1** muestra los días y dosis de administración del inmunógeno.

Tabla 2.1 Calendario de Inmunización

Procedimiento	Día del protocolo	Descripción
Colección de suero (control)	Día -7	Sangrado previo a la inmunización (1 mL)
Inmunización inicial	Día 1	Inmunización con 0.4 mg del antígeno en FCA
1er Booster	Día 21	Inmunización con 0.2 mg del antígeno en FIA
Colección de Suero	Día 35	Sangrado
2do Booster	Día 42	Inmunización con 0.2 mg del antígeno en IFA
Colección de suero	Día 56	Sangrado
3er Booster	Día 63	Inmunización con 0.2 mg del antígeno en IFA
Colección de suero	Día 77	Sangrado (50 ml)

2.4. Ensayo de Dot Blot

Para determinar la unión de los péptidos recombinantes a los sueros colectados durante la inmunización se llevó a cabo el ensayo Dot-blot (Fenoll et al., 1997). Para este ensayo se utilizó el suero colectado de la última inmunización, el cual fue concentrado usando el Kit Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters (Sigma, 36100101). El ensayo de Dot Blot se realizó empleando concentraciones del péptido en el intervalo de: 5-20 µg y el suero en una proporción 1-200. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa para inmovilizar los péptidos, en este caso se empleó como control el péptido correspondiente a Histidina (His). Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS1X-Tween 0.1% durante 1h. Posteriormente las membranas fueron transferidas a una solución de leche al 3% en PBS1X-Tween 0.1% y se añadió el anticuerpo primario (suero) durante toda la noche. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos y se adicionó el anticuerpo secundario (anti-conejo) durante 1h.

2.5. Extracción de ADN y Amplificación del gen de Fibrilarina Like

Para obtener el ADN de Fib Like se utilizaron dos muestras de ADN las cuales se usaron como molde para la amplificación del gen de interés. Las muestras de ADN eran provenientes de células Hela (ADN1 y ADN2). El ADN total se extrajo usando el reactivo Trizol siguiendo la metodología del fabricante (Invitrogen, 15596026) (Anexo 2). La secuencia nucleotídica de Fib Like se obtuvo de la base de datos del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* con un total de 1005 pb (ID: 345630) (Anexo 3). Una vez conociendo la secuencia se diseñaron los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen completo de Fib Like, utilizando el programa informático *OligoCalc*, (**Tabla 2.2**). De la misma forma se diseñaron oligonucleótidos adicionando los sitios de restricción específicos para sub clonar Fib Like en los vectores de expresión pET15b y pSNAPf. Para esto se adiciona a cada oligonucleótido la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI y BamHI según corresponda en el extremo Fw (5'-3') o Rv (3'-5') (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2. Características de los cebadores específicos para Fibrilarina Like

	Nombre	Secuencia	Número de bases	Temperatura de alineamiento
PCR Fib Like	(Fw) FibLike-PCR	ATG AAG TCG GCC GCG AGC T	19	61.6°C
	(Rv) FibLike-PCR	CTA TTT GCT GCT GCT CTT GGG	21	61.2°C
Clonación de FibLike en pET-15	(Fw)pET15-FibLike-XhoI	CTC GAG ATG AAG TCG GCC G	19	61.6°C
	(Rv)pET15 FibLike-BamHI	GGA TCC TGC TGC TCT TGG G	19	61.6°C
Clonación de FibLike en Snap	(Fw)FibLike-SNAP-BamHI	TGGA TCC ATG AAG TCG GCC GCG AGC T	26	72.8°C
	(Rv)FibLike-SNAP-XhoI	CTC GAG CTA TTT GCT GCT GCT CTT GGG	27	71.5°C

Posterior se realizó la reacción de PCR para amplificar el gen de Fib Like bajo las condiciones que se muestran en la **Tabla 2.3**. Para la electroforesis se utilizó gel de Agarosa al 1.2% y se corrió a 100V durante 30min. Posteriormente se procedió a purificar la banda obtenida del gel a través del Kit GeneJET Gel Extraction, siguiendo las instrucciones del Fabricante (Anexo 4).

Tabla 2.3. Condiciones de PCR para Fibrilarina Like

Condiciones de PCR	
Número de Ciclos	30
Temperatura de desnaturalización	95°C, 30 seg
Temperatura de alineamiento	58°C, 45 seg
Temperatura de Extensión	72°C, 1 min 30s
Extensión Final	72 °C, 10 min

2.6. Clonación del fragmento de PCR en el vector pGem-T Easy

Una vez purificado el fragmento de PCR de Fib Like con la secuencia de reconocimiento de la enzima XhoI y BamHI, este fue ligado al vector pGEM-T Easy (3015pb) (Promega, A1360) (Anexo 5). Se realizó una reacción de ligación, usando ligasa T4 (Promega, M179A) siguiendo las especificaciones que describe el fabricante. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 5µL de amortiguador de ligación rápida 2X, 1µL del vector de clonación pGEM-T Easy, 1µL de producto de PCR purificado, 1µL de ligasa T4 y se ajustó a un volumen final de 10 µL con agua libre de nucleasas. La mezcla fue homogenizada e incubada a 4°C toda la noche. Posteriormente la ligación fue transformada en células competentes de *E. coli* DH5α (Anexo 6). Las células transformadas fueron sembradas en cajas Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 ug/ml) e incubadas a 37°C durante 14 horas. Para verificar que la secuencia de Fib Like fue correctamente ligada al vector se seleccionaron colonias y se transfirieron a un tubo con 3 mL de medio LB con ampicilina, se incubaron a 37°C por toda la noche a 200 rpm. Finalmente se hizo la extracción del ADN plasmídico (Birnboim y Doly, 1979) (Anexo 7).

2.7. Sub-clonación al vector de expresión pET-15b

Se llevó a cabo una subclonación en el vector de expresión pET15b (5708 pb) (Novagen) (Anexo 8), utilizando el vector previo denominado pGEM-XhoI-FibLike-BamHI. Para liberar el fragmento de Fib Like de pGEM, este fue digerido con las enzimas XhoI y BamHI (6 µL de amortiguador 10X, 20µL de pGEM-FibLike, 1µL de Xho I, 1µL de BamHI ajustado a un volumen final de 60 µL con agua libre de nucleasas); y purificado a través del Kit GeneJET Gel Extraction. Posteriormente el vector de expresión pET15b fue digerido utilizando las mismas enzimas de restricción. Finalmente se realizó una reacción de

ligación (5 μ L de amortiguador de ligación rápida, 1 μ L de pET15B linearizado, 3 μ L de inserto de Fib Like liberado, 1 μ L de ligasa T4, ajustado a un volumen final de 10 μ L). Una vez hecha la reacción de ligación, esta fue transformada en células competentes (Cohen et al., 1972) de *E. coli* DH5 α sembradas en placas con ampicilina, incubadas durante 14 h a 37°C. Se seleccionaron colonias, producto de la transformación, para extraer el ADN plásmidico. Posteriormente se transformaron cepas de *E.coli* BL21 utilizando el plásmido que pET15B-FibLike.

2.8. Clonación de Fibrilarina Like en el vector pJET1.2

Para determinar la dinámica de localización celular de Fib Like se ligó la secuencia del gen en el vector de entrada pJET1.2 (2974pb) (Anexo 9) usando los oligonucleótidos con las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y XhoI (Tabla 2.2). El producto de la ligación fue transformado en células de *E. coli* DH5 α , sembradas en placas con ampicilina e incubadas a 37°C por 14 h. Se seleccionaron colonias positivas, las cuales fueron crecidas en medio LB líquido con ampicilina para extraer el ADN.

2.9. Subclonación en el vector de expresión pSNAPf

Se llevó a cabo una subclonación en el vector de expresión pSNAPf (5849 pb) (Novagen, N9183S) (Anexo 10), utilizando el vector obtenido previamente en pJET1.2, denominado pJET1.2-BamH-FibLike-Xho. Para liberar el fragmento de Fib Like de pJET1.2, este fue digerido con las enzimas BamHI y XhoI (6 μ L de amortiguador 10X, 20 μ L de pGEM-Fib Like, 1 μ L de Xho I, 1 μ L de BamH I ajustado a un volumen final de 60 μ L con agua libre de nucleasas); y purificado por el Kit GeneJET Gel Extraction. Posteriormente el vector de expresión pSNAPf fue digerido utilizando las mismas enzimas de restricción. Finalmente se realizó una reacción de ligación (5 μ L de amortiguador de ligación rápida, 1 μ L de pSNAPf linearizado, 3 μ L de inserto de Fib Like liberado, 1 μ L de ligasa T4, ajustado a un volumen final de 10 μ L). Una vez realizada la reacción de ligación, esta fue transformada en células competentes (Cohen et al., 1972) de *E. coli* cepa DH5 α sembradas en placas con ampicilina, incubadas durante 14 h a 37°C. Se seleccionaron colonias, producto de la transformación, para extraer el ADN plásmidico.

2.10. 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 sembrarlas 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 microscopía en células que serían transfectadas, se colocan cubreobjetos de vidrio para permitir que las células crezcan sobre ellos en una monocapa.

2.11. Transfección estable de células U2OS con la construcción Fib-Like-pSNAPf

La transfección se llevó a cabo empleando el vector de expresión en mamíferos pSNAPf con el gen de Fib Like humana. 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 polietilenimina (PEi). Transcurridas 48 horas post-transfección se les adicionó 5 ml de medio con 1000 µg/ml de ampicilina y se incubó por 9 días para evaluar la cantidad de colonias positivas. Se lavó la caja de Petri con PBS, se tripsinaron las células y se cambió a otra caja con medio nuevo con antibiótico en la misma concentración utilizada para la selección. Para la visualización de la señal se utilizó el reactivo rojo fluorescente SNAP-Cell® TMR-Star.

2.12. Transfección transitoria de células U2OS con la construcción Fib-pEGFP-C2

La transfección se llevó a cabo empleando el vector de expresión en mamíferos pEGFP-C2 con el gen de Fib humana. 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. 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 incubó a temperatura ambiente (25°C), 15 minutos para permitir la formación de los complejos.

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 por goteo. Los cultivos de células en transfección fueron incubados durante 24 y 48 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ (Guillen-Chable et al., 2020).

2.13. Análisis Microscópico de las Células U2OS transfectadas.

La microscopía de campo amplio se realizó en un Leica DM6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania; cubos de filtro: DAPI (Ex: 360/40, Em: 470/40), FITC (Ex: 480/40; Em: 527/30) , TRITC (Ej: 546/12; Em: 600/40), Cy5 (Ej: 620/60; Em: 700/75)) utilizando un objetivo HCX PL APO 100x/1,40-0,70 OIL, un Leica EL6000 con un HXP. Fuente de luz Vis Hg de 120W/45C, líquido de inmersión tipo F (Leica Microsystems), una cámara Leica DFC350 FX y software Las X.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Análisis Bioinformático de Fibrilarina y Fibrilarina Like así como de los péptidos correspondientes.

Para llevar a cabo un análisis de la estructura tridimensional de ambas variantes de Fib se utilizó el programa informático *Uniprot* (**Fig. 3.1**). Estos resultados evidencian que las principales diferencias en cuanto a la orientación en el espacio de ambas variantes de Fib radican fundamentalmente en la sección desordenada de esta proteína. Esta estructura desordenada está definida en gran medida por la secuencia de aminoácidos, que definen la flexibilidad de la proteína y su capacidad de plegarse. Suelen estar formadas por una mayor proporción de aminoácidos hidrofílicos, mientras que es poco frecuente que tengan residuos aromáticos o aminoácidos hidrofóbicos (Cuevas-Velázquez., 2011).

Estas características son importantes para mantenerse sin estructura dentro de la célula. La carga neta que pueden tener estas secciones, junto a la baja hidrofobicidad, hacen que haya cierto grado de repulsión y un menor número de interacciones hidrofóbicas en comparación con las que hay en otras secciones de las proteínas, de forma que puedan mantenerse sin estructura terciaria (Cuevas-Velázquez., 2011).

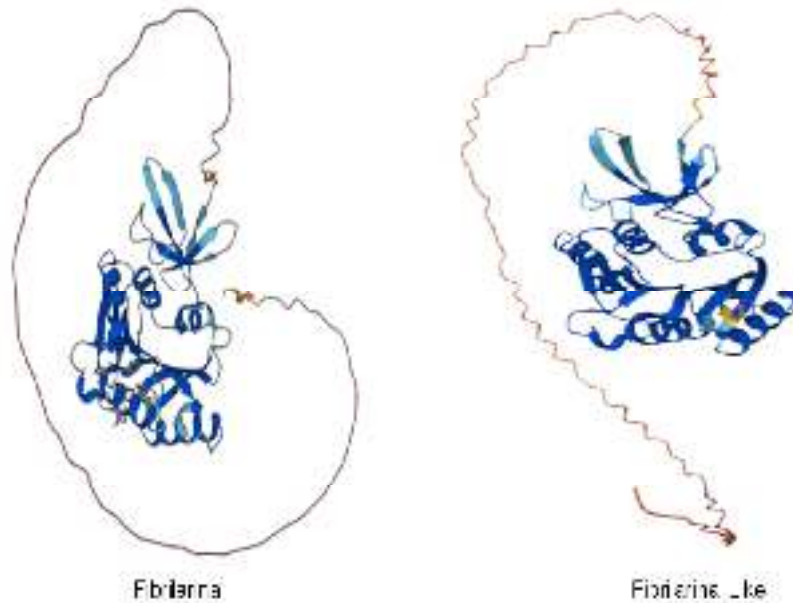


Figura 3.1. Estructura Tridimensional de Fibrilarina y Fibrilarina Like obtenida a través de la base de datos del programa bioinformático Uniprot.

Al analizar el alineamiento de estas variantes llevado a cabo a través del programa informático Clustal Omega (**Fig. 3.2**) se observa que justo donde convergen las principales diferencias en cuanto a secuencia se corresponde específicamente con el dominio GAR, lo que se corresponde con lo reportado anteriormente en la literatura y que ha sido ampliamente estudiado en Fib: confirmando que en este dominio se generan las mayores variaciones en la secuencia y es por tanto la zona menos conservada dentro de la misma.

#fib	MKPGFSPRGGFGGRGGFGDRGGGRGGFGGGRGG-----GFRGR	43
Fibrilarina Like	PKSAASSRGGGGGRGGG-----GMSSWGGGGGGGGAGKGGGGGGGGQGGKGGFGR	53
	** , * **** ***** * * ,***** ** , *	
#fib	GRGGGGGGG-----GGGGGRGGGFH5GGNRGRGGKRGINQ5GKNVYVEPHRHEGVFI	98
Fibrilarina Like	ARGFGGGGGRGRGGGGKDRGGGGQRGGV---AKSKSRRKSGAMVVSVEPHRHEGVFI	110
	** **** * * * ***** - ** - * - * *****	
#fib	CRGKEDALVTKNLV-GEVSYGEKRVSISEGGDKIEYRAMNPFRSKLAAAILGGVQIHIK	157
Fibrilarina Like	YRGAEDALVTLNWPQGSVYGERRVTVEGGVKQEVRTIMPFRSKLAAAILGGVQIHIK	170
	** ***** * , * * ,***** ,** , : ,** , * ** ,*****	
#fib	PGAKVLYLGAASGTTVSHVSDIVGPDGLVYAVEFSHRSGRDLINLAKKRTNIIPVLEDAR	217
Fibrilarina Like	PKSKVLYLGA-SGTTVSHVSDIIGPDGLVYAVEFSHRAGRDLVNAKKRTNIIPVLEDAR	229
	* :***** ***** ,***** ,***** ,***** ,****	
#fib	HPHKYRMLIAMVDVIFADVAQPDQTRIVALNAHTFLRNGGHFVISIKANCIDSTASAEAV	277
Fibrilarina Like	HPLKYRMLIGHVDVIFADVAQPDQSRIVALNAHTFLRNGGHFLISIKANCIDSTASAEAV	289
	** ***** ,***** ,***** ,***** ,***** ,*****	
#fib	FASEVKKQENMKPQEQLTLEPYERDHAVVGVYRPPKVKN-	320
Fibrilarina Like	FASEVRKLQENLKPQEQLTLEPYERDHAVVGVYRPLPKSSSK	333
	***** ,* ,**** ,***** ,***** ,***** ** ..	

Figura 3.2. Alineamiento de secuencias entre Fibrilarina y Fibrilarina Like empleando el programa bioinformático Clustal Omega. En rojo se enmarca el Dominio GAR donde se muestran las mayores diferencias en cuanto a secuencia de aminoácidos.

Como se muestra en la **Figura 3.3**, es precisamente este dominio GAR la región desordenada de estas proteínas. Por lo tanto es en este dominio donde convergen las principales diferencias en cuanto a secuencia de aminoácidos y en cuanto a estructura entre ambas variantes de Fib y es justo en esta sección donde se encuentran los péptidos HsFib y HsFibLike que serán objeto de estudio de esta investigación y a través de los cuales se obtendrán los anticuerpos que permitan diferenciar entre Fib y Fib Like. Estas diferencias en cuanto a estructura y secuencia será una herramienta importante para garantizar que los anticuerpos que se produzcan sean realmente diferenciales.

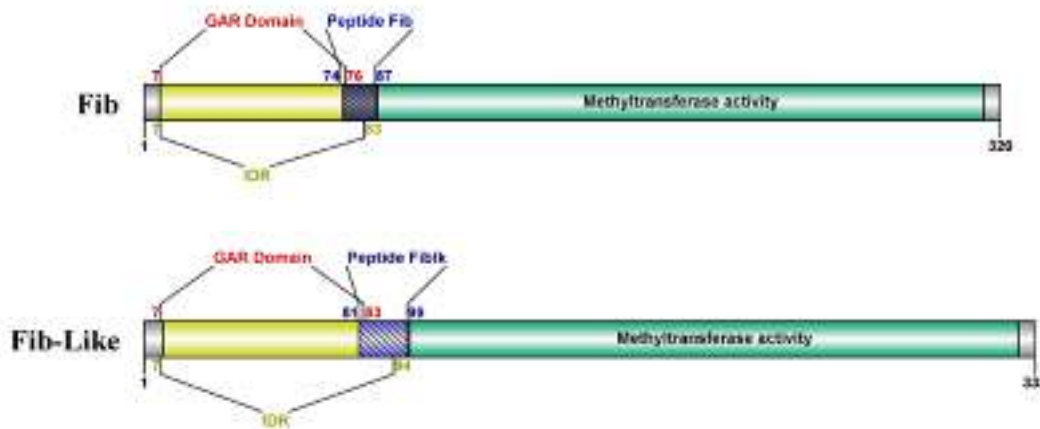


Figura 3.3. Análisis de las secciones desordenadas en Fibrilarina y Fibrilarina Like. (DOG 1.0: Illustrator of Protein Domain Structures). Las secciones intrínsecamente desordenadas (IDR) de ambas proteínas corresponden al dominio GAR (amarillo), la sección con actividad de metiltransferasa (verde) y entre la sección IDR/GAR y el dominio con actividad metiltransferasa se señalan los péptidos HsFib y HsFibLike correspondientes a Fibrilarina (aminoácido 74-87) y Fibrilarina Like (aminoácido 81-99) respectivamente (sombreado con líneas azul). (Péptido HsFib: CRGGKRGNQSGKNVM; Péptido HsFibLike: CRGGVAKSKSRRRKGAMVVS)

Es importante destacar que en función del tipo de ensayo que se va a realizar, la elección del tipo de antígeno es crucial para la obtención de anticuerpos funcionales. A la hora de diseñar un buen antígeno peptídico es necesario prestar atención a algunos parámetros para evitar, entre otras cosas, seleccionar epítopos que no estén expuestos en la proteína nativa, y evitar posibles reacciones cruzadas con otras proteínas.

A continuación se resumen una selección de los criterios más importantes que se tuvieron en cuenta para el diseño de los péptidos en la presente investigación:

1.- Longitud de la Secuencia: Aunque en principio las secuencias muy cortas generan anticuerpos con una mayor especificidad, es menos probable que esa secuencia se encuentren expuestas en la estructura de la proteína nativa. Por el contrario, cuanto más larga sea la secuencia, menos específico será el anticuerpo resultante, pero aumentará la probabilidad de que este reconozca la proteína nativa. Es por esto que se buscó el

equilibrio entre estos dos aspectos empleando péptidos de entre 15-20 aminoácidos que es el tamaño recomendado para obtener anticuerpos de calidad.

2.- Exposición de los Epítomos: Es importante que la secuencia peptídica que se va a utilizar, se encuentre en una región expuesta y por lo tanto accesible de la proteína, lo cual ya corroboramos anteriormente. Estas secuencias expuestas son generalmente ricas en aminoácidos hidrofílicos, forman parte de los extremos N o C terminal y sin estructura secundaria definida.

3.- Conjugación a Carriers: Sabemos que estos péptidos son demasiado pequeños para inducir una respuesta inmune por sí mismos por lo que es necesario conjugarlos a un transportador capaz de estimular las células inmunológicas e inducir una respuesta. Los péptidos HsFib y HsFibLike tienen conjugados la proteína acarreadora Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) con el fin de activar la respuesta inmune debido a la gran distancia filogenética que tiene con proteínas de vertebrados. KLH es una metaloproteína grande, multisubunidad, transportadora de oxígeno que se encuentra en la hemolinfa de la lapa californiana gigante de *Megathura crenulata*, Por lo tanto es una proteína de alto peso molecular de aproximadamente 390,000 Daltons, altamente inmunogénica y muy distante desde el punto de vista filogenético de humanos lo que garantiza una respuesta de calidad.

4.- Residuos: Respecto a los aminoácidos que componen la secuencia fue necesario añadir una cisteína en el extremo para su correcta conjugación al transportador, así como evitar las cisteínas internas dentro de la secuencia y evitar múltiples serinas, prolinas y glutaminas para evitar la formación de puentes de hidrógeno entre péptidos.

En la **Figura 3.4** se muestra un análisis de la composición o naturaleza de los aminoácidos que componen la secuencia de ambos péptidos: HsFib y HsFibLike. Se conoce que hay aminoácidos que aumentan el nivel de desorden. Aminoácidos polares aparecen con mayor frecuencia en estas secciones sin estructura (Ala, Arg, Ser). Además, estas secciones desordenadas también tienen con mayor frecuencia Gly y Pro, que hacen menos estables las estructuras terciarias, mientras que los aminoácidos aromáticos son menos frecuentes



Figura 3.4. Análisis de los péptidos HsFib y HsFibLike teniendo en cuenta la naturaleza de los aminoácidos que componen la secuencia. Ambos péptidos están compuestos en su mayoría por aminoácidos polares o hidrofílicos que garantizan precisamente que sean regiones expuestas dentro de la secuencia de la proteína.

Ambos péptidos cumplen con las características necesarias que definen a un buen antígeno peptídico: Longitud de la secuencia de 10-20 aminoácidos, exposición de epítomos a través de aminoácidos hidrofílicos que garantizan que sean regiones expuestas dentro de la estructura tridimensional de la proteína y además llevan conjugados una cisteína en el extremo N-terminal para que pueda unirse fácilmente a través de puentes disulfuro a carriers que potencien la respuesta inmunológica. Además de esto, se comprobó a través del programa informático NCBI-Blast que en Homo Sapiens ambos péptidos solo muestran alineamiento con sus correspondientes variantes de Fib lo que demuestra al menos empíricamente que no debe existir una reacción cruzada entre la respuesta de anticuerpos que desencadenen cada uno de estos (Fig.3.5).

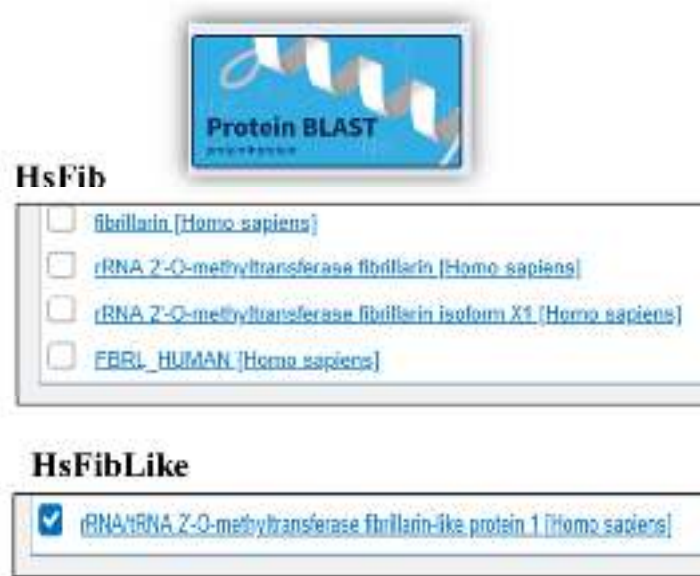


Figura 3.5. Análisis mediante NCBI-Blast de la homología entre los péptidos HsFib y HsFibLike con proteínas humanas. Se demuestra que cada péptido solo muestra homología con su correspondiente variante de Fib y que no existen alineamientos cruzados entre estos.

3.2. Obtención y procesamiento de anticuerpos policlonales en conejos

Los Acs poseen una estructura básica simétrica e independiente de su especificidad antigénica, con un peso molecular aproximado de 150 kDa. Estructuralmente los Acs constan de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas simétricas con un peso molecular de entre 55 y 70 kDa, y dos cadenas ligeras con un peso molecular de 25 kDa e igualmente idénticas entre sí (Edfors et al., 2014). Para identificar y analizar la integridad de los Acs generados, con sus correspondientes cadenas pesadas y ligeras se corrieron los sueros obtenidos durante las inoculaciones con los péptidos de HsFib y HsFibLike en un gel de acrilamida como se muestra en la **Figura 3.6**. Se comprobó la integridad de las cadenas de los anticuerpos generados, con cadenas pesadas aproximadamente de 50 kDa y cadenas ligeras de aproximadamente 30 kDa.

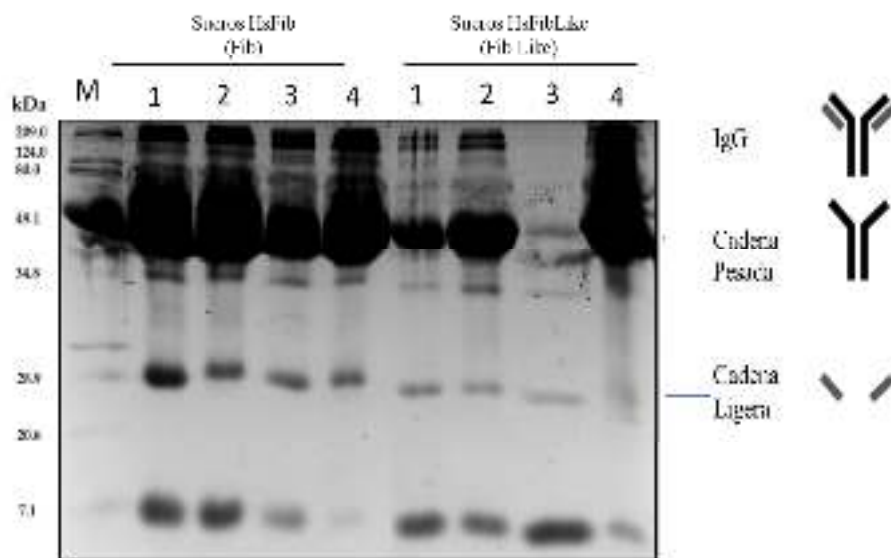


Figura 3.6. Análisis por SDS-PAGE los sueros obtenidos luego de la inoculación con los péptidos HsFib y HsFibLike. **M:** Marcador de Peso Molecular (Precision Plus Protein, Biorad, Num Cat: 1610374S). **1:** Suero Preimmune. **2:** Suero luego de la segunda inmunización. **3:** Suero luego de la cuarta inmunización. **4:** Suero Final.

3.2.1 Ensayo de Dot Blot

Para comprobar la especificidad de los Ac_s obtenidos se llevó a cabo un ensayo de Dot Blot, en el cual se inmovilizó en membranas de nitrocelulosa el péptido HsFibLike con concentraciones en el intervalo de 5-20 µg (**Fig. 3.7**). Las membranas se incubaron con los sueros finales concentrados luego de la inmunización con HsFib y HsFibLike empleando una proporción 1:200. Como control negativo se utilizó el péptido correspondiente a Histidinas (His) 5µg.

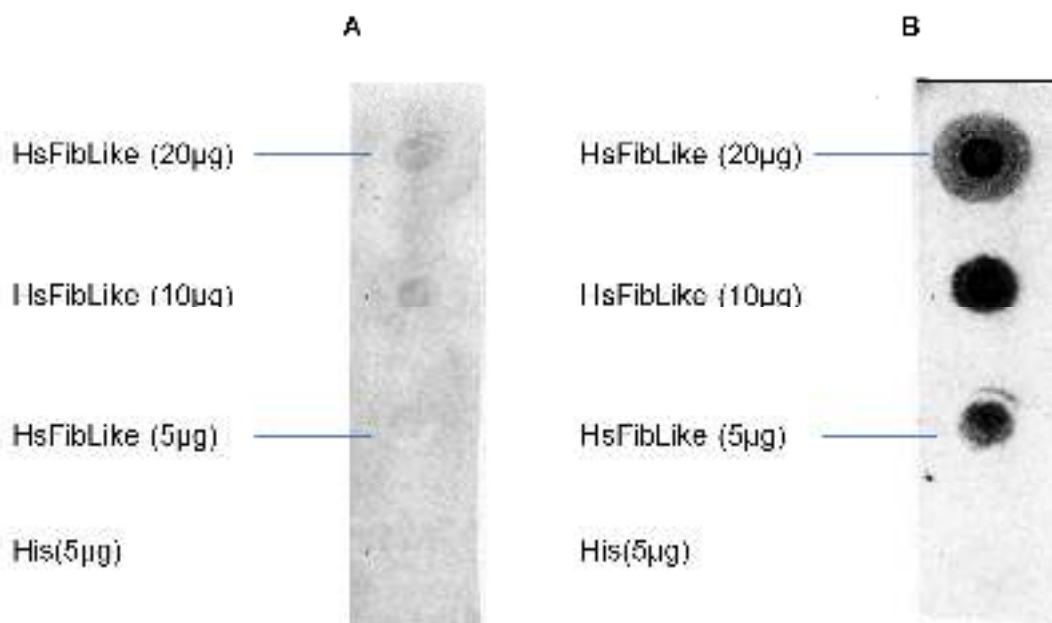


Figura 3.7. Resultado del ensayo de Dot Blot empleando diferentes concentraciones del péptido HsFibLike. **A:** Membrana de nitrocelulosa incubada con el suero final correspondiente a la inmunización con el péptido HsFib (1:200). **B:** Incubado con el suero final extraído correspondiente a la inmunización con el péptido HsFibLike (1:200). Histidina como control negativo.

Este resultado demuestra que el péptido HsFibLike es reconocido por los anticuerpos específicos que fueron obtenidos a través de la inmunización con este y no por los anticuerpos que se obtienen luego de la exposición al péptido HsFib. Esto demuestra que los anticuerpos son específicos contra Fib Like y que no presenta reactividad cruzada con Fib. Lo que resulta realmente importante en la búsqueda de herramientas que permitan diferenciar entre ambas variantes de Fib.

3.3. Obtención de Fibrilarina Like recombinante

Con el objetivo de generar la proteína Fib Like recombinante primeramente se realizó la reacción de PCR del gen de interés. La **Figura 3.8** muestra el resultado de la reacción de PCR para Fib Like, utilizando los oligonucleótidos con los extremos para las enzimas de restricción XhoI y BamHI (**Tabla 2.2**). Para la electroforesis se utilizó gel de agarosa al 1.2% y se corrió a 95 V durante 30min.

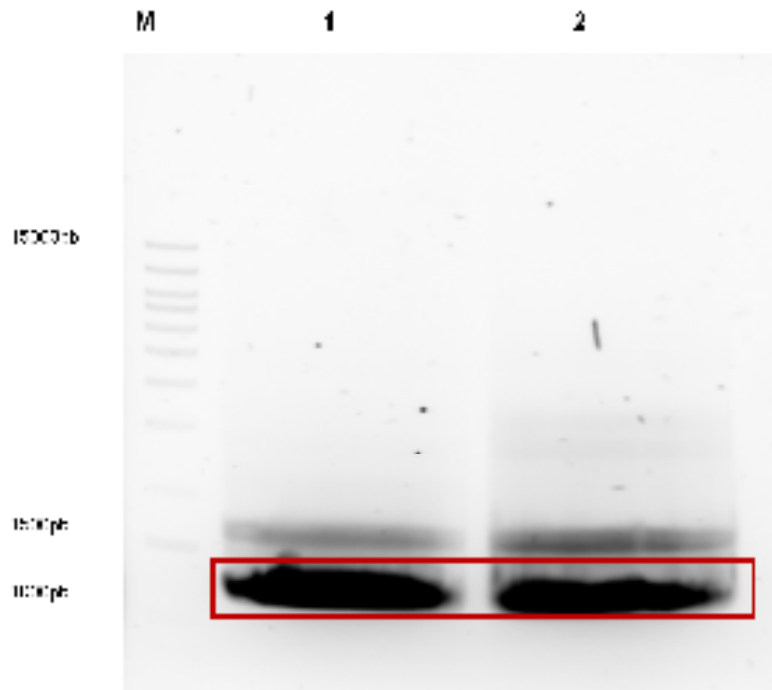


Figura 3.8. Electroforesis en gel de agarosa de la Reacción de PCR del gen que codifica para Fibrilarina Like empleando los oligonucleótidos con los extremos para las enzimas de restricción XhoI y BamHI. **M:** Marcador de Peso Molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Num Cat: 10787018/10787026). 1 y 2: Reacción de PCR para Fibrilarina Like. En rojo la banda correspondiente a Fibrilarina Like: aproximadamente 1005pb.

El producto de PCR se purificó empleando el GeneJET Gel Extraction Kit. La **Figura 3.9** muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la reacción de purificación con el objetivo de comprobar dicho procedimiento. Se observa solo una banda correspondiente con el peso molecular de Fib Like (1005pb). Se garantiza el procedimiento idóneo de purificación.

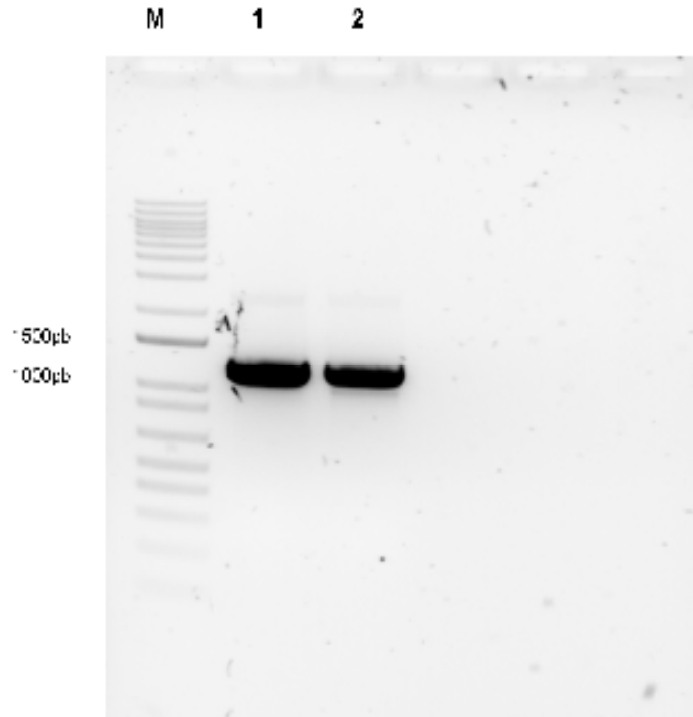


Figura 3.9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Purificado de Fibrilarina Like con los extremos para las enzimas de restricción XhoI y BamHI. **M:** Marcador de Peso Molecular (1Kb, Invitrogen). **1 y 2:** Purificado de Fibrilarina Like. Con los extremos para XhoI y BamHI.

El producto purificado se ligó al vector de expresión pGEMT-easy. La **Figura 3.10 (A)** muestra una representación in silico del fragmento de Fib Like en el vector pGEM-Teasy empleando el programa informático *Sanp gene viwer*. La reacción de ligación se transformó en células competentes de *E.coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias positivas y se extrajo el plásmido por medio de minipreps (**Fig. 3.10 B**).

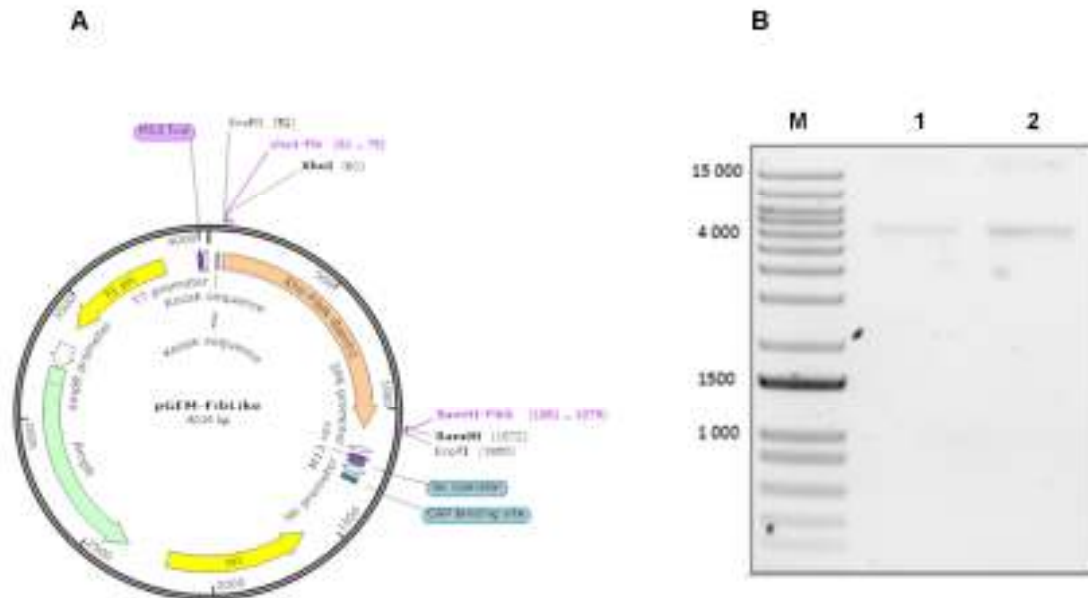


Figura 3.10. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pGEMT-easy (SnapGene_viewer_7.0.2). La construcción con un total de 4034pb. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% correspondientes a ADN plasmídico (pGem-FibLike) extraído. M: Marcador de Peso Molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Num Cat: 10787018/10787026). 1 y 2: DNAp pGem-FibLike. Las bandas se observan a la altura de los 4000pb lo que se corresponde con el tamaño del vector (3015pb) y en adición, el gen de interés (1005pb).

Luego de la extracción de ADN plasmídico (pGem-FibLike) de las células DH5 α , este se digirió con las enzimas XhoI y BamHI con el objetivo de comprobar que estuviera presente el inserto correspondiente a Fib Like para su posterior purificación y ligación al vector de expresión pET-15b. La **Figura 3.11** muestra el resultado de la digestión de ADN plasmídico, en comparación con la muestra sin digerir.

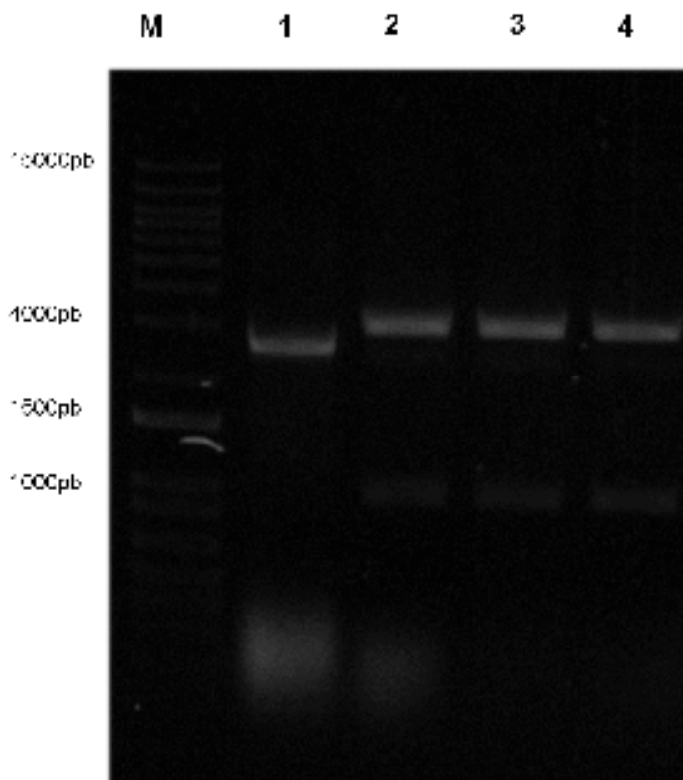
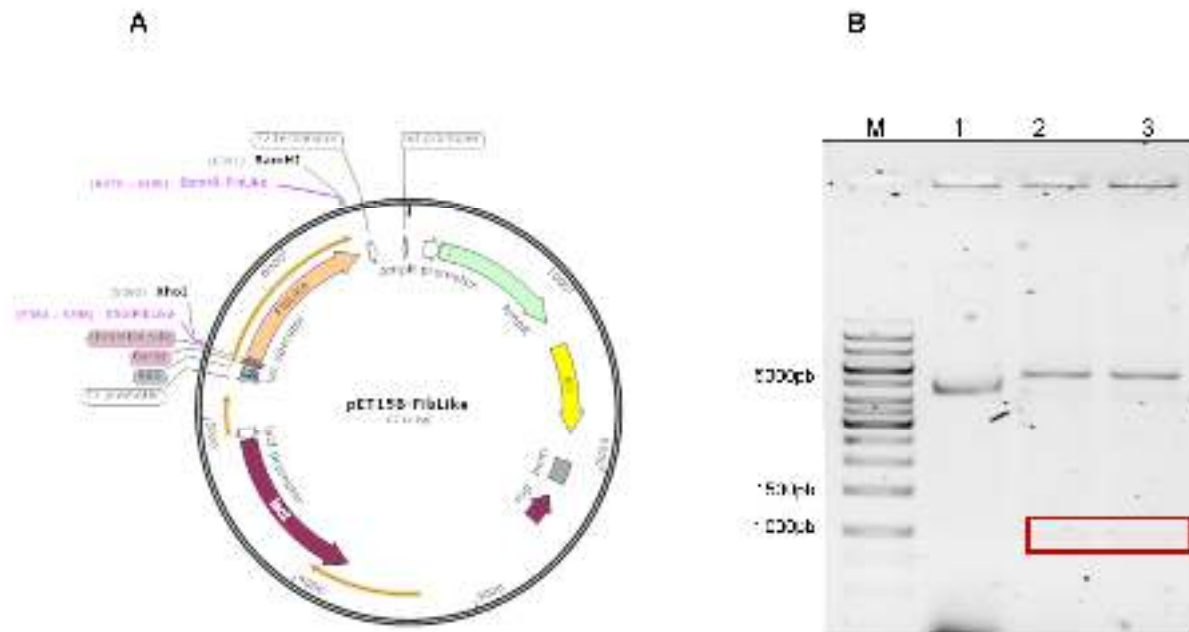


Figura 3.11. Electroforesis en Gel de agarosa al 1% correspondiente a ADN plasmídico pGem-FibLike antes y después de la digestión con las enzimas de restricción XhoI y BamHI. **M:** Marcador de Peso Molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Num Cat: 10787018/10787026) **1:** DNAp sin digerir. **2, 3 y 4:** Reacción de digestión del DNAp pGem-FibLike con las enzimas XhoI y BamHI. Fragmento de aproximadamente 1000pb, correspondiente a Fib Like.

Esto comprueba que el inserto correspondiente a Fib Like estaba presente en el vector pGEM. Posteriormente se procedió a purificar el fragmento obtenido del gel de agarosa para su posterior ligación al vector de expresión pET-15b. La **Figura 3.12 (A)** muestra una representación in silico del inserto de FibLike purificado, insertado en el vector de clonación pET15-B empleando el programa informático *SanpGene viewer*. **Figura 3.12 (B)** muestra el resultado de la digestión de ADN plasmídico pET15-B-FibLike, en comparación con la muestra sin digerir, esto se realizó con el objetivo de comprobar si estaba presente

el inserto de Fib Like en el vector pET-15b para la posterior transformación en células competente de *E. coli* BL21. Se observa un fragmento liberado de aproximadamente



1000pb correspondiente a Fib Like..

Figura 3.12. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pET15-B. (SnapGene_viewer_7.0.2). La construcción con un total de 6714pb. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% correspondiente a ADN plasmídico pET15B-FibLike antes y después de la digestión con las enzimas de restricción XhoI y BamHI. M: Marcador de Peso Molecular (1Kb, Invitrogen). 1: DNAp pET15B-FibLike sin digerir. 2 y 3: DNAp pET15B-FibLike digerido con XhoI y BamHI.

3.4. Generación del vector con Fibrilarina Like y la etiqueta SNAP

El gen que codifica para Fib Like se amplificó mediante PCR utilizando los sitios de restricción de las enzimas XhoI y BamHI (**Fig. 3.13 B**) visualizándose un fragmento de 1000pb correspondiente a Fibrilarina Like. El producto purificado se ligó al vector de expresión pJET1.2.

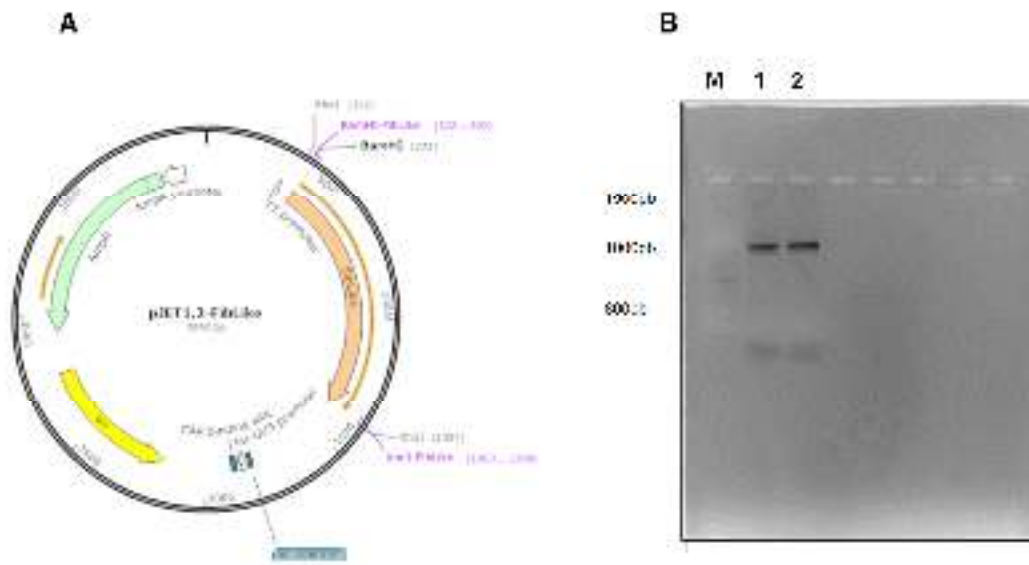


Figura 3.13. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pJET1.2. (SnapGene_viewer_7.0.2). La construcción con un total de 3992pb. **B)** Electroforesis en gel de agarosa 1% M: Marcador de Peso Molecular (100pb, Ladder). 1 y 2: Resultado de PCR de Fibrilarina Like utilizando los sitios de restricción de las enzimas XhoI/BamHI.

El producto de PCR se purificó y se ligó al vector de clonación pJET1.2. La **Figura 3.13 A** muestra una representación in silico del inserto de Fib Like purificado, insertado en este vector de clonación empleando el programa informático *SanpGene viwer*. Posteriormente, células competentes de *E. coli* DH5α fueron transformadas con el producto de ligación y sembradas en placas con ampicilina para su incubación durante 24 horas a 37°C. Se seleccionaron colonias, producto de la transformación, para extraer el plásmido por medio de minipreps. Se realizó la digestión con las enzimas de restricción XhoI y BamHI y se ligó al vector de expresión pSNAPf. La **Figura 3.14 A** muestra una representación in silico del inserto de Fib Like purificado, insertado en este vector de expresión empleando el programa informático *SanpGene viwer*.

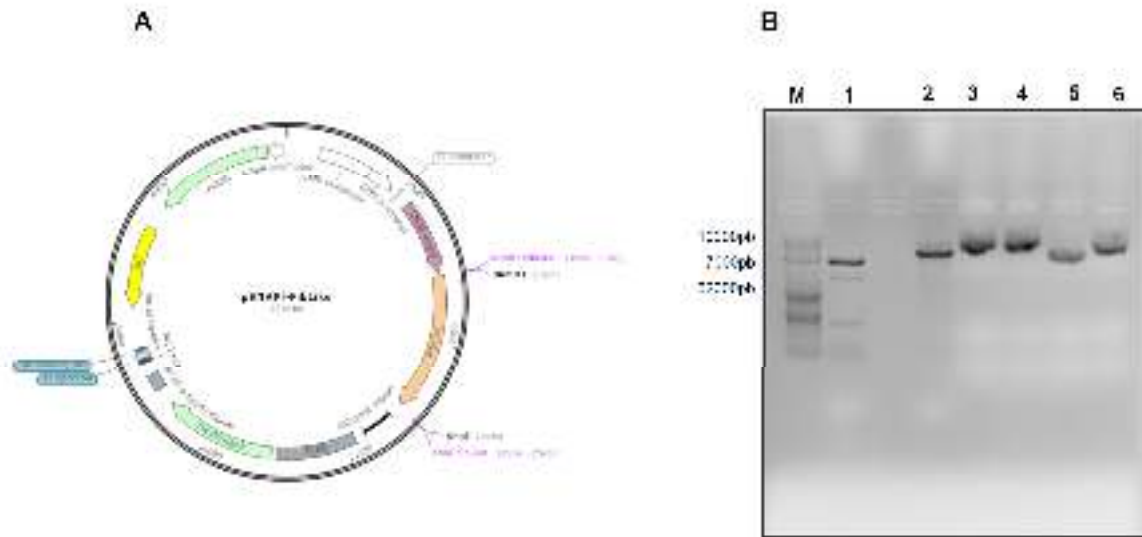


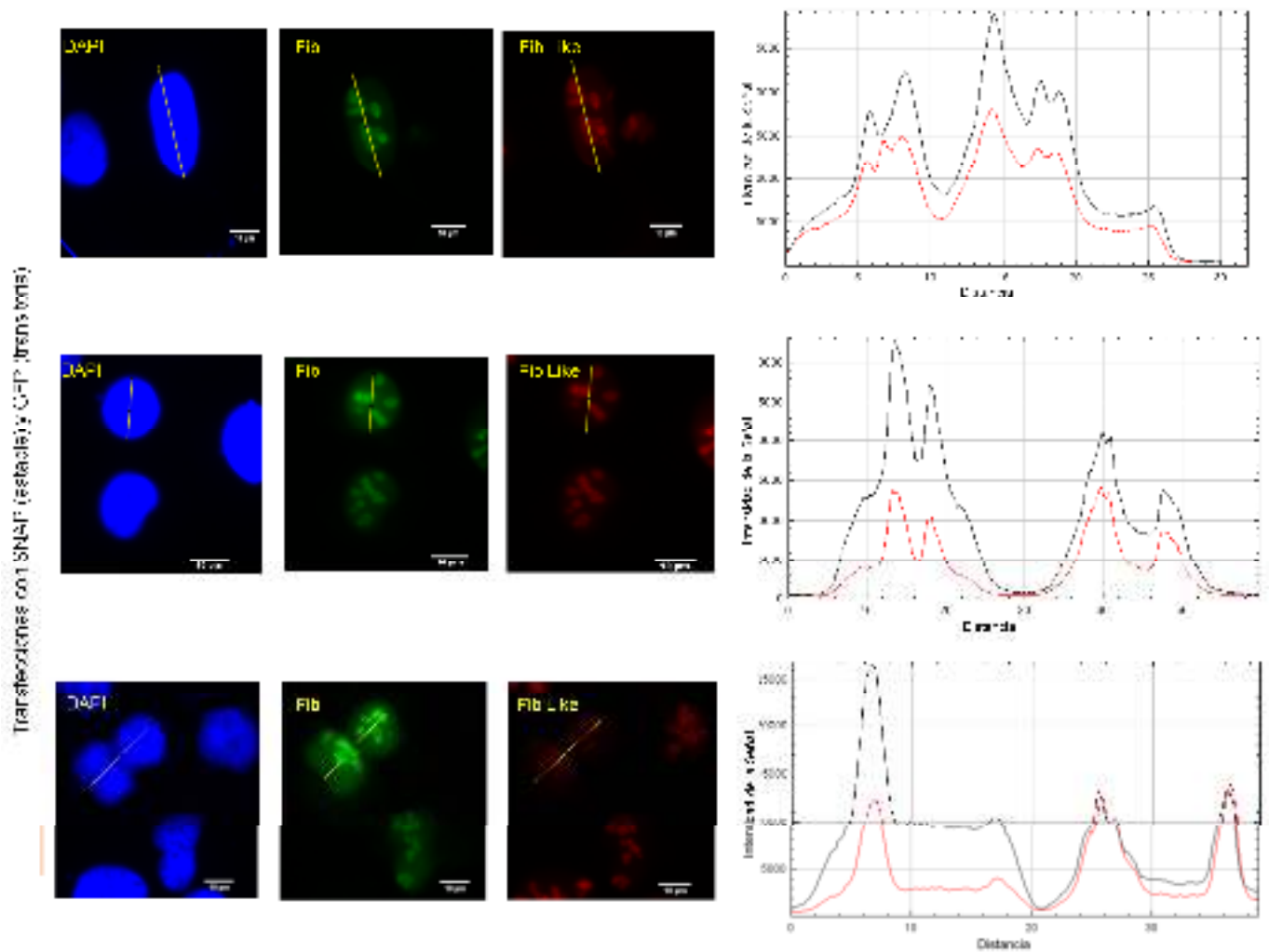
Figura 3.14. A) Representación esquemática de Fibrilarina Like ligada al vector pSNAPf. (SnapGene_viewer_7.0.2). La construcción con un total de 6845pb. **B)** Electroforesis en gel de agarosa luego de la extracción de FibLike-pSNAPf en comparación con el plásmido sin el inserto. M: Marcador de Peso Molecular (1Kb). 1: Plásmido solo. 2,3,4,5 y 6: Minipreps de FibLike-pSNAPf .

Células competentes de *E. coli* DH5a fueron transformadas con el producto de ligación y sembradas en placas con ampicilina para su incubación durante 24 horas a 37°C. Se seleccionaron colonias, producto de la transformación, para extraer el plásmido por medio de minipreps (**Figura 3.14 B**). Las bandas correspondientes a la extracción (carril 2-6) se encuentran a la altura de las 7000pb lo que se corresponde con el vector pSNAPf (5849pb) y Fib Like (1005pb).

3.5. Localización celular de Fibrilarina Like en células humanas.

Para determinar la localización en células humanas de Fib Like se transfectaron de manera estable células U2OS con la construcción Fib-Like-pSNAPf y de manera transitoria con la construcción Fib-pEGFP-C2. Debido a que ya se conoce la localización de Fib, esto pudiera servir como una herramienta predictiva y comparativa de la localización que pudiera tener en la célula Fib Like. Los resultados de microscopía obtenidos se muestran en la **Figura 3.15**. Se observa una señal específica para Fib (verde) y Fib Like (rojo).

A



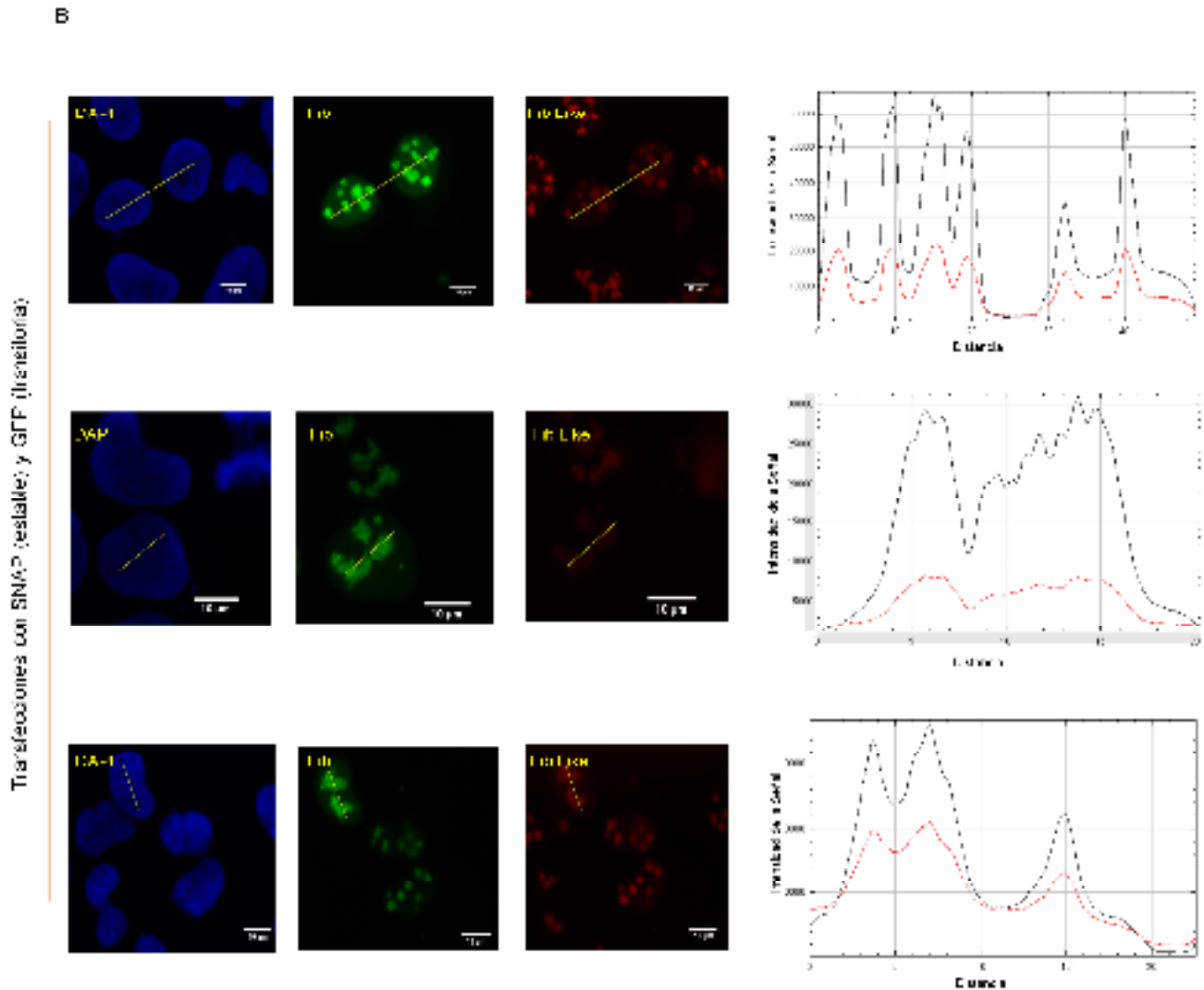


Figura 3.15. Transfecciones en líneas celulares estables FibLike-pSNAPf con transfecciones transitorias de Fib-pEGFP-C2 luego de 24 h de incubación **(A)** y 48 h de incubación **(B)**.

El perfil de intensidad y localización de las señales correspondientes a FibLike-SNAP es equiparable con el de Fib-GFP. Los picos de intensidad muestran un comportamiento similar. La señal correspondiente a ambas variantes de Fib se localiza dentro del núcleo, lo cual se corresponde con el comportamiento descrito para Fib, el cual parece ser atribuible también a Fib Like.

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN

En general, la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de Fib están muy conservadas, pero el grado de homología es diferente en los dominios principales de la proteína. Las secuencias de aminoácidos de los dominios de metiltransferasa de casi todas las Fib estudiadas comparten un alto grado de homología; sin embargo, los dominios GAR varían considerablemente en los eucariotas (Shubina et al., 2016).

Las proteínas Fib se han estudiado ampliamente en diferentes organismos modelo y han ganado atención en la comunidad científica debido a sus funciones esenciales en la supervivencia celular, la terapia del cáncer, la tolerancia al estrés y la dinámica nucleolar (Shubina et al., 2018). Por lo tanto el estudio de Fib es relevante debido a su papel vital en el mantenimiento de la homeostasis celular y muchas funciones específicas (Pereira et al., 2020). Las investigaciones basadas en análisis evolutivos muestran una división de dos Fib diferentes en mamíferos (Fib y Fib Like). Esto resulta de gran importancia ya que existe una gran cantidad de investigación sobre la Fib humana y algunas de las funciones que hoy son atribuibles a Fib pueden estar involucrando a Fib Like.

4.1.1. Obtención de anticuerpos específicos contra Fibrilarina y Fibrilarina Like

Con la presente investigación se logró obtener Ac_s para cada uno de los péptidos específicos correspondientes a Fib y Fib Like, esto constituye un aporte valioso teniendo en cuenta que actualmente no existen anticuerpos comerciales que puedan distinguir entre las dos proteínas parálogas. Por lo tanto, es pertinente definir el rol específico de cada una de estas proteínas en células de mamíferos, lo cual se lograría con más estudios funcionales sobre Fib Like, de la cual no existe información publicada hasta la fecha. Todos los estudios realizados hasta el momento y que se basan en Ac_s no logran hacer una distinción entre ambos genes.

Los anticuerpos policlonales se utilizan ampliamente con fines de investigación en muchas áreas de la biología, como inmunoprecipitación, histoquímica, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), diagnóstico de enfermedades y western blots. Típicamente, el sistema inmunológico de un animal generará un gran grupo de Ac_s que reconocen varios epítomos de un antígeno particular (Mehreen et al., 2021).

En el presente estudio se emplearon conejos como modelo experimental para la producción de Ac_s policlonales. Esto se corresponde con reportes previos que señalan a

este, como el animal más utilizado para la producción de estos Ac_s, ya que es fácil de manipular, sangrar y produce un volumen adecuado de antisuero de alto título y alta afinidad. En un sangrado típico, el rendimiento debe ser de aproximadamente 250 mg de Ac_s policlonales.

Si bien es cierto que en la práctica, los conejos hembra se utilizan con mayor frecuencia debido a su docilidad, en este estudio se emplearon conejos machos para la producción de Ac_s, lo cual resulta igualmente una correcta estrategia, teniendo en cuenta que varios estudios sugieren que la variable de género en este caso no tiene un impacto significativo en el resultado final, basta con poseer personal capacitado para la adecuada manipulación del animal en estudio (Hutu et al., 2019).

4.1.2. Obtención de la proteína Fibrilarina Like Recombinante

El estudio de las proteínas o su uso en aplicaciones biotecnológicas requiere a menudo su aislamiento de otros componentes celulares. La purificación se puede realizar a partir de la fuente natural de proteína; sin embargo, este enfoque suele resultar engorroso e ineficiente para la mayoría de ellos. La secuencia codificante de la proteína de interés puede insertarse en un vector de expresión apropiado y transformarse en un huésped procariótico, tal como la bacteria *E coli* (Rosano et al., 2019).

El uso de *E. coli* como fábrica de células microbianas para producir proteínas recombinantes reduce los costos de producción y mejora el rendimiento. Hoy en día, en *E. coli* se producen muchas proteínas de interés comercial. En el laboratorio, la producción recombinante de proteínas en *E. coli* es el método de elección para su estudio estructural y funcional (Gopal y Kumar, 2013).

Desde la clonación de genes hasta la purificación de proteínas, las herramientas celulares y moleculares necesarias en todos los pasos del proceso son ampliamente accesibles y hay muchas alternativas disponibles. Aun así, no es infrecuente no poder obtener una proteína recombinante funcional, debido a la toxicidad de la proteína para el huésped o a la agregación en cuerpos de inclusión. Es por eso que existe un interés continuo en enfoques novedosos que optimicen la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Overton, 2014).

En medio de la revolución biotecnológica ocurrida en las últimas décadas del siglo XX, diferentes líneas de *E. coli* fueron probadas por sus características en el producción de proteínas recombinantes. Surgió la línea B como ganadora dadas sus características más

destacadas, dentro de esta, la BL21, se ha convertido en el anfitrión preferido para la producción de proteínas recombinantes (Rosano et al., 2019).

Hoy en día, muchas empresas de biotecnología ofrecen diferentes tipos de cepas de *E. coli* genéticamente alteradas según la idoneidad de la expresión de genes extraños pero la cepa BL21 es la opción preferida para la expresión debido a la ausencia de dos proteasas principales (Gopal y Kumar, 2013). La secuencia que codifica la proteína de interés generalmente es clonada en un plásmido de expresión. El plásmido debe contener al menos un promotor, un sitio inicial de traducción, un marcador seleccionable y elementos de replicación. Además, el vector puede contener otros elementos genéticos para facilitar la detección, purificación o solubilización de la proteína, como secuencias que codifican para etiquetas de afinidad (Overton, 2014).

Los vectores pET con etiqueta de 6 histidina (His tag) como el pET-15b, suelen ser la primera opción para obtener proteína recombinante porque His es una etiqueta de afinidad más pequeña con altos niveles de expresión debido a la presencia de un promotor fuerte y la disponibilidad de promotores robustos. Tomando en consideración lo antes mencionado podemos decir que es beneficioso, y una buena elección utilizar el vector pET-15b y *E. coli* como huésped para la producción de la proteína deseada.

4.1.3. Localización de la Fibrilarina en células humanas

En cuanto a la localización y el comportamiento dinámico de Fib en células humanas, este ha sido ampliamente estudiado. Snaar et al. (2000) estudiaron mediante transfección transitoria de células humanas tanto células U2OS como células HeLa con un plásmido que codifica Fib fusionada con Proteína Verde Fluorescente (GFP, de sus siglas en inglés). Los patrones de distribución de Fib-GFP se registraron mediante microscopía de fluorescencia después de 4–48 h. Los resultados mostraron que Fib-GFP estaba presente en cada uno de los puntos de tiempo tanto en nucleolos como en CB.

En la presente investigación empleamos la línea celular U2OS. Esta fue una de las primeras líneas celulares derivadas del cáncer descritas. Se obtuvo de un sarcoma óseo moderadamente diferenciado de la tibia de una niña de 15 años en 1964. La línea celular se designó originalmente como '2T' y se cree que es una de las primeras líneas celulares humanas derivadas de un tumor mesenquimatoso.

Esta línea celular U2OS es cromosómicamente aberrante con un cariotipo poliploide. De acuerdo con la literatura, la línea celular secreta una proteína 2 similar al factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), expresa los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y responde a la adición de IGF-I y II con un aumento en la síntesis de ADN.

Nuestros resultados se corresponden con lo que se ha descrito para Fib y además los ensayos de microscopía para Fib Like revelaron que esta presenta una localización similar a lo que se ha reportado anteriormente para Fib. Se ha propuesto que Fib funciona como un eslabón molecular entre el nucleolo y los CB. Algunos autores incluso sugieren la existencia de mecanismos de retención en compartimentos específicos para las proteínas del nucleolo y los CBs debido a la naturaleza de las interacciones que pueden tener sus dominios (Snaar et al., 2000).

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

- Se obtuvieron anticuerpos específicos contra los péptidos HsFib y HsFibLike correspondientes a Fib y Fib Like respectivamente
- Se generaron vectores de expresión de FibLike recombinante para *E.coli* y células humanas.
- Los ensayos de microscopía muestran una localización para Fib Like comparable con la localización que tiene Fib en células humanas

4.3. PERSPECTIVAS

- Determinar la actividad de Fib Like en células cancerígenas, células infectadas por virus o expuestas a otro tipo de estrés.
- Caracterizar los ARN guías de Fib Like y sus procesos celulares
- Determinar la interacción de Fib Like con diferentes proteínas, lípidos y otros mensajeros celulares.

BIBLIOGRAFÍA

Aittaleb, M., Visone, T., Fenley, M. O., & Li, H. (2004). Structural and Thermodynamic Evidence for a Stabilizing Role of Nop5p in S-Adenosyl-L-methionine Binding to Fibrillarin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41822-41829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406209200>

Amin, N., Van Duijn, C. M., & Aulchenko, Y. S. (2007). A Genomic Background Based Method for Association Analysis in Related Individuals. *PLoS ONE*, 2(12), e1274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001274>

Belin, S., Beghin, A., Solano-González, E., Bezin, L., Brunet-Manquat, S., Textoris, J., Prats, A.-C., Mertani, H. C., Dumontet, C., & Diaz, J.-J. (2009). Dysregulation of Ribosome Biogenesis and Translational Capacity Is Associated with Tumor Progression of Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 4(9), e7147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007147>

Berglund, L., Björling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Al-Khalili Szigartyo, C., Persson, A., Ottosson, J., Wernérus, H., Nilsson, P., Lundberg, E., Sivertsson, Å., Navani, S., Wester, K., Kampf, C., Hober, S., Pontén, F., & Uhlén, M. (2008). A Genecentric Human Protein Atlas for Expression Profiles Based on Antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(10), 2019-2027. <https://doi.org/10.1074/mcp.R800013-MCP200>

Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>

Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., Brown, J. W. S., & Taliansky, M. (2008). A Plant Virus Movement Protein Forms Ringlike Complexes with the Major Nucleolar Protein, Fibrillarin, In Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 932-937. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.039>

Chang, C.-H., Hsu, F.-C., Lee, S.-C., Lo, Y.-S., Wang, J.-D., Shaw, J., Taliansky, M., Chang, B.-Y., Hsu, Y.-H., & Lin, N.-S. (2016). The Nucleolar Fibrillarin Protein Is Required

for Helper Virus-Independent Long-Distance Trafficking of a Subviral Satellite RNA in Plants. *The Plant Cell*, 28(10), 2586-2602. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00071>

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2110-2114. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2110>

Dagher, J., Delahunt, B., Rioux-Leclercq, N., Egevad, L., Srigley, J. R., Coughlin, G., Dungalinson, N., Gianduzzo, T., Kua, B., Malone, G., Martin, B., Preston, J., Pokorny, M., Wood, S., Yaxley, J., & Samaratunga, H. (2017). Clear cell renal cell carcinoma: Validation of World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading. *Histopathology*, 71(6), 918-925. <https://doi.org/10.1111/his.13311>

Edfors, F., Boström, T., Forsström, B., Zeiler, M., Johansson, H., Lundberg, E., Hober, S., Lehtiö, J., Mann, M., & Uhlen, M. (2014). Immunoproteomics Using Polyclonal Antibodies and Stable Isotope-labeled Affinity-purified Recombinant Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(6), 1611-1624. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.034140>

El Hassouni, B., Sarkisjan, D., Vos, J. C., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2019). Targeting the Ribosome Biogenesis Key Molecule Fibrillarin to Avoid Chemoresistance. *Current Medicinal Chemistry*, 26(33), 6020-6032. <https://doi.org/10.2174/0929867326666181203133332>

Enyedi, B., Jelcic, M., & Niethammer, P. (2016). The Cell Nucleus Serves as a Mechanotransducer of Tissue Damage-Induced Inflammation. *Cell*, 165(5), 1160-1170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.016>

Fatica, A., Galardi, S., Altieri, F., & Bozzoni, I. (2000). Fibrillarin binds directly and specifically to U16 box C/D snoRNA. *RNA*, 6(1), 88-95. <https://doi.org/10.1017/S1355838200991623>

Fatima, M., Khalid, F., & Quraishi, A. (2021). The Production and characterization of Polyclonal Antibodies Against Interferon Alpha in Mice. *BioScientific Review*, 3(4). <https://doi.org/10.32350/BSR.0304.03>

Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., & Casal, J. (1997). Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 764-766. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.764-766.1997>

Fuhrman, S. A., Lasky, L. C., & Limas, C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma: *The American Journal of Surgical Pathology*, 6(7), 655-664. <https://doi.org/10.1097/00000478-198210000-00007>

Glory, E., & Murphy, R. F. (2007). Automated Subcellular Location Determination and High-Throughput Microscopy. *Developmental Cell*, 12(1), 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.12.007>

Gong, J., Li, Y., Liu, C., Xiang, Y., Li, C., Ye, Y., Zhang, Z., Hawke, D. H., Park, P. K., Diao, L., Putkey, J. A., Yang, L., Guo, A.-Y., Lin, C., & Han, L. (2017). A Pan-cancer Analysis of the Expression and Clinical Relevance of Small Nucleolar RNAs in Human Cancer. *Cell Reports*, 21(7), 1968-1981. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.070>

Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, 32(6), 419-425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>

Guillen-Chable, F., Rodríguez Corona, U., Pereira-Santana, A., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., Aquino, C., Šebestová, L., Vitale, N., Hozak, P., & Castano, E. (2020). Fibrillarin Ribonuclease Activity is Dependent on the GAR Domain and Modulated by Phospholipids. *Cells*, 9(5), 1143. <https://doi.org/10.3390/cells9051143>

Horowitz, J. M., Vernace, V. A., Myers, J., Stachowiak, M. K., Hanlon, D. W., Fraley, G. S., & Torres, G. (2001). Immunodetection of Parkin protein in vertebrate and invertebrate brains: A comparative study using specific antibodies. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 21(1), 75-93. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(00\)00111-3](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(00)00111-3)

Hutu, I., Calin Mircu, Lungu, B., Panaitescu, C., & Kuan-Wei Chen. (2019). Polyclonal Antibody Production in Several Rabbit Models. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19130.34249>

Janota, C. S., Calero-Cuenca, F. J., & Gomes, E. R. (2020). The role of the cell nucleus in mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 204-211. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.03.001>

Kanda, T., Sullivan, K. F., & Wahl, G. M. (1998). Histone–GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current Biology*, 8(7), 377-385. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70156-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70156-3)

Kee, J.-M., Oslund, R. C., Perlman, D. H., & Muir, T. W. (2013). A pan-specific antibody for direct detection of protein histidine phosphorylation. *Nature Chemical Biology*, 9(7), 416-421. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1259>

Keppeke, G. D., Satoh, M., Kayser, C., Matos, P., Hasegawa, T., Tanaka, S., Diogenes, L., Amaral, R. Q., Rodrigues, S. H., & Andrade, L. E. C. (2022). A cell-based assay for detection of anti-fibrillarin autoantibodies with performance equivalent to immunoprecipitation. *Frontiers in Immunology*, 13, 1011110. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011110>

Kohnhorst, C. L., Schmitt, D. L., Sundaram, A., & An, S. (2016). Subcellular functions of proteins under fluorescence single-cell microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(1), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.05.014>

Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(3), 165-182. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0272-6>

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>

Liu, X. J., Malkowski, M., Guo, Y., Erickson, G. F., Shimasaki, S., & Ling, N. (1993). Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): Analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology*, 132(3), 1176-1183. <https://doi.org/10.1210/endo.132.3.7679972>

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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00976>

Lu, A. X., Chong, Y. T., Hsu, I. S., Strome, B., Handfield, L.-F., Kraus, O., Andrews, B. J., & Moses, A. M. (2018). Integrating images from multiple microscopy screens reveals diverse patterns of change in the subcellular localization of proteins. *eLife*, 7, e31872. <https://doi.org/10.7554/eLife.31872>

Luo, W., Lin, S., Huang, Y., Zhu, K., Zhang, F., Lin, J., Qin, Y., Zhou, Z., Wu, W., & Liu, C. (2022). Bioinformatic Analysis and In Vitro and In Vivo Experiments Reveal That Fibrillarin Participates in the Promotion of Lung Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *Bioengineering*, 9(8), 396. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080396>

Marcel, V., Ghayad, S. E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.-P., Solano-González, E., Vendrell, J. A., Hacot, S., Mertani, H. C., Albaret, M. A., Bourdon, J.-C., Jordan, L., Thompson, A., Tafer, Y., Cong, R., Bouvet, P., Saurin, J.-C., Catez, F., Prats, A.-C., ... 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>

Mei, Y., Deng, Z., Vladimirova, O., Gulve, N., Johnson, F. B., Drosopoulos, W. C., Schildkraut, C. L., & Lieberman, P. M. (2021). TERRA G-quadruplex RNA interaction with TRF2 GAR domain is required for telomere integrity. *Scientific Reports*, 11(1), 3509. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82406-x>

Menon, R. P., Gibson, T. J., & Pastore, A. (2004). The C Terminus of Fragile X Mental Retardation Protein Interacts with the Multi-domain Ran-binding Protein in the Microtubule-

organising Centre. Journal of Molecular Biology, 343(1), 43-53.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.024>

Nguyen Van Long, F., Lardy-Cleaud, A., Carène, D., Rossoni, C., Catez, F., Rollet, P., Pion, N., Monchiet, D., Dolbeau, A., Martin, M., Simioni, V., Bray, S., Le Beherec, D., Mosele, F., Bouakka, I., Colombe-Vermorel, A., Odeyer, L., Diot, A., Jordan, L. B., ... Marcel, V. (2022). Low level of Fibrillarin, a ribosome biogenesis factor, is a new independent marker of poor outcome in breast cancer. BMC Cancer, 22(1), 526.
<https://doi.org/10.1186/s12885-022-09552-x>

Nicolle, O., Rouillon, A., Guyodo, H., Tamanai-Shacoori, Z., Chandad, F., Meuric, V., & Bonnaure-Mallet, M. (2010). Development of SNAP-tag-mediated live cell labeling as an alternative to GFP in *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59(3), 357-363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00681.x>

Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., & Parker, R. (2010). Decapping Activators in *Saccharomyces cerevisiae* Act by Multiple Mechanisms. Molecular Cell, 39(5), 773-783.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.025>

Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discovery Today, 19(5), 590-601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>

Pawson, T., & Nash, P. (2003). Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. Science, 300(5618), 445-452.
<https://doi.org/10.1126/science.1083653>

Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast, 24, S26-S35. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>

Ricketts, C. J., De Cubas, A. A., Fan, H., Smith, C. C., Lang, M., Reznik, E., Bowlby, R., Gibb, E. A., Akbani, R., Beroukhim, R., Bottaro, D. P., Choueiri, T. K., Gibbs, R. A., Godwin, A. K., Haake, S., Hakimi, A. A., Henske, E. P., Hsieh, J. J., Ho, T. H., ... Mariamidze, A. (2018). The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular

Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*, 23(1), 313-326.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.075>

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, 1878.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01878>

Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422.
<https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Ruggero, D. (2012). Revisiting the Nucleolus: From Marker to Dynamic Integrator of Cancer Signaling. *Science Signaling*, 5(241). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003477>

Shubina, M. Y., Arifulin, E. A., Sorokin, D. V., Sosina, M. A., Tikhomirova, M. A., Serebryakova, M. V., Smirnova, T., Sokolov, S. S., Musinova, Y. R., & Sheval, E. V. (2020). The GAR domain integrates functions that are necessary for the proper localization of fibrillarin (FBL) inside eukaryotic cells. *PeerJ*, 8, e9029.
<https://doi.org/10.7717/peerj.9029>

Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., & Sheval, E. V. (2016). Nucleolar methyltransferase fibrillarin: Evolution of structure and functions. *Biochemistry (Moscow)*, 81(9), 941-950.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916090030>

Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., & Sheval, E. V. (2018). Proliferation, cancer, and aging-novel functions of the nucleolar methyltransferase fibrillarin?: Unexpected functions of fibrillarin. *Cell Biology International*, 42(11), 1463-1466. <https://doi.org/10.1002/cbin.11044>

Sirri, V., Grob, A., Berthelet, J., Jourdan, N., & Roussel, P. (2019). Sirtuin 7 promotes 45S pre-rRNA cleavage at site 2 and determines the processing pathway. *Journal of Cell Science*, jcs.228601. <https://doi.org/10.1242/jcs.228601>

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. *The Journal of Cell Biology*, 151(3), 653-662. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.653>

Spector, D. L. (1993). Macromolecular Domains within the Cell Nucleus. *Annual Review of Cell Biology*, 9(1), 265-315. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001405>

Tartakoff, A., DiMario, P., Hurt, E., McStay, B., Panse, V. G., & Tollervey, D. (2022). The dual nature of the nucleolus. *Genes & Development*, 36(13-14), 765-769. <https://doi.org/10.1101/gad.349748.122>

Tiku, V., Kew, C., Mehrotra, P., Ganesan, R., Robinson, N., & Antebi, A. (2018). Nucleolar fibrillarin is an evolutionarily conserved regulator of bacterial pathogen resistance. *Nature Communications*, 9(1), 3607. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06051-1>

Uemura, M., Zheng, Q., Koh, C. M., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., & De Marzo, A. M. (2012). Overexpression of ribosomal RNA in prostate cancer is common but not linked to rDNA promoter hypomethylation. *Oncogene*, 31(10), 1254-1263. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.319>

Zhang, J., Yang, G., Li, Q., & Xie, F. (2020). Increased fibrillarin expression is associated with tumor progression and an unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 21(2), 92. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12353>

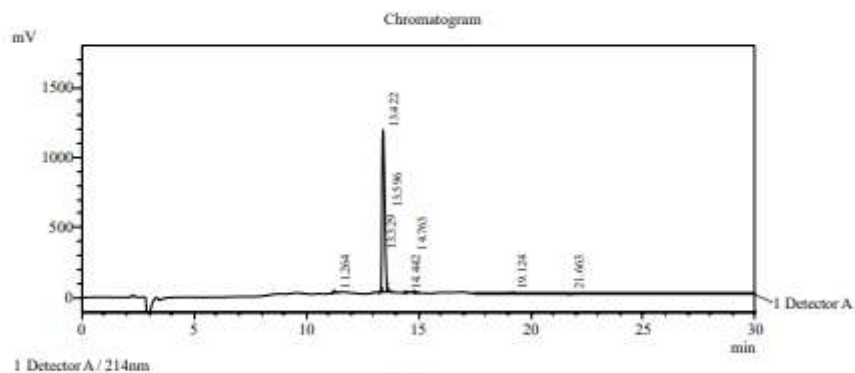
Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z., & Xie, L. (2015). Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement: Nucleolus and RSV systemic movement. *Molecular Plant Pathology*, 16(9), 921-930. <https://doi.org/10.1111/mpp.12220>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica y método de dilución de los péptidos HsFib y HsFibLike

HPLC Analysis

Name	:HsFib		
Sequence	:CRGGKRGNQSGKNVM		
Lot. No	:PCM12575-10-0419		
Pump A	:0.1% trifluoroacetic in 100% water		
Pump B	:0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile		
Total Flow	:0.8ml/min		
Wavelength	:214nm		
Analytical column type	:Phenomenex Luna 3u C18(2) (4.6*150mm*3um)		
Dissolution method	:15%ACN+85%H2O		
Acquisition Time	:2018/5/6 13:16:54		
Inj. Volume	:9.5ul		
Time	Module	Action	Value
0.01	Pumps	B.Conc	2
30.00	Pumps	B.Conc	65
33.00	Pumps	B.Conc	100
38.00	Pumps	B.Conc	100
40.00	Pumps	B.Conc	2
50.00	Controller	Stop	



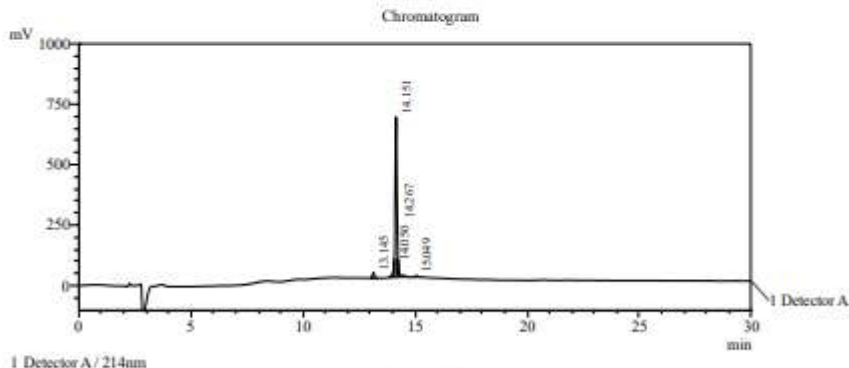
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	11.264	74439	14293	0.760
2	13.329	44600	15543	0.455
3	13.422	9339465	1156273	95.338
4	13.596	111931	47076	1.143
5	14.442	36852	9295	0.376
6	14.763	59383	98	0.606
7	19.124	66072	11969	0.674
8	21.663	63434	14698	0.648
Total		9796175	1269244	100.000

HPLC Analysis

Name :HsFibLike
 Sequence :CRGGVAKSKSRRRKGAMVVS
 Lot. No :PCM12575-9-0419
 Pump A :0.1% trifluoroacetic in 100% water
 Pump B :0.1% trifluoroacetic in 100% acetontrile
 Total Flow :0.8ml/min
 Wavelength :214nm
 Analytical column type :Phenomenex Luna 3u C18(2) (4.6*150mm*3um)
 Dissolution method :15%ACN+85%H2O
 Acquisition Time :2018/5/9 13:11:10
 Inj. Volume :60ul

Time	Module	Action	Value
0.01	Pumps	B.Conc	2
30.00	Pumps	B.Conc	65
33.00	Pumps	B.Conc	100
38.00	Pumps	B.Conc	100
40.00	Pumps	B.Conc	2
50.00	Controller	Stop	



PeakTable

Detector A 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	13.145	123179	21949	2.879
2	14.050	241054	37064	5.635
3	14.151	3653381	662923	85.401
4	14.267	220832	46363	5.162
5	15.049	39458	6377	0.922
Total		4277904	774676	100.000

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN con Trizol



USER GUIDE

TRIZOL™ Reagent

Experimental protocol for DNA isolation

Catalog Numbers 15576026 and 15576018

Pub. No. MAN0016395 Rev. A.0

L 1	1	Precipitate the DNA	a. Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase. This is critical for the quality of the isolated DNA.	int
			b. Add 0.3 mL of 100% ethanol per 1 mL of TRIZOL™ Reagent used for lysis. c. Cap the tube, mix by inverting the tube several times. d. Incubate for 2–3 minutes. e. Centrifuge for 5 minutes at 2000 × g at 4°C to pellet the DNA. f. Transfer the phenol-ethanol supernatant to a new tube. The supernatant is used for protein isolation [refer to TRIZOL™ Reagent User Guide (Pub. No. MAN0001271)], if needed, and can be stored at –70°C for several months.	ie. a — ite
	2	Wash the DNA	a. Resuspend the pellet in 1 mL of 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol, pH 8.5, per 1 mL of TRIZOL™ Reagent used for lysis.	ir l
			b. Incubate for 30 minutes, mixing occasionally by gentle inversion. Note: The DNA can be stored in sodium citrate/ethanol for at least 2 hours.	
			c. Centrifuge for 5 minutes at 2000 × g at 4°C.	
			d. Discard the supernatant with a micropipette.	
			e. Repeat step 2a–step 2d once. Note: Repeat step 2a–step 2d twice for large DNA pellets (>200 µg).	
			f. Resuspend the pellet in 1.5–2 mL of 75% ethanol per 1 mL of TRIZOL™ Reagent used for lysis.	
			g. Incubate for 10–20 minutes, mixing occasionally by gentle inversion. Note: The DNA can be stored in 75% ethanol at several months at 4°C.	
			h. Centrifuge for 5 minutes at 2000 × g at 4°C.	
			i. Discard the supernatant with a micropipette.	
			j. Vacuum or air dry the DNA pellet for 5–10 minutes. IMPORTANT! Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.	
	3	Solubilize the DNA	a. Resuspend the pellet in 0.3–0.6 mL of 8 mM NaOH by pipetting up and down. Note: We recommend resuspending the DNA in a mild base because isolated DNA does not resuspend well in water or Tris buffer.	
			b. Centrifuge for 10 minutes at 12,000 × g at 4°C to remove insoluble materials.	
			c. Transfer the supernatant to a new tube, then adjust pH as needed with HEPES. Proceed to downstream applications, or store the DNA at 4°C overnight. For longer-term storage at –20°C, adjust the pH to 7–8 with HEPES and add 1 mM EDTA.	

Anexo 3. Secuencia nucleotídica del Cromosoma 5 de Homo Sapiens donde se encuentra el gen que codifica para Fibrilarina Like marcado en azul (obtenido de la base de Datos del NCBI).

```

1  gctgatgctt acctcccct ctcctgcagc agagagccc cgtccctgt gcccaggga
61  agtgccagg atccctggg agccgggag tggggaggg gcagggtgag cgaaggagg
121  caggctcgt ctgcacggg gctgggagc gggacttccg gcccagagg tgcggggac
181  ggtgtatg caatgacc atagccctc gtcagggg ggttcggg atcgggac
241  tgggtatg ctcctctc cccgcggc cccgcggc cccgcctc cctcctaa
301  cccgcggc cccgcggc cccgcggc cccgcggc cccgcctc cctcctaa
361  gaggcagg taaccagg cccgcggc ggtccttc atgagctc cccgcctc
421  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
481  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
541  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
601  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
661  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
721  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
781  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
841  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
901  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
961  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1021  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1081  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1141  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1201  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1261  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1321  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1381  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1441  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1501  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1561  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1621  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg
1681  gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg gggggggg

```

Fibrilarina Like

Anexo 4. GeneJET Gel Extraction Kit

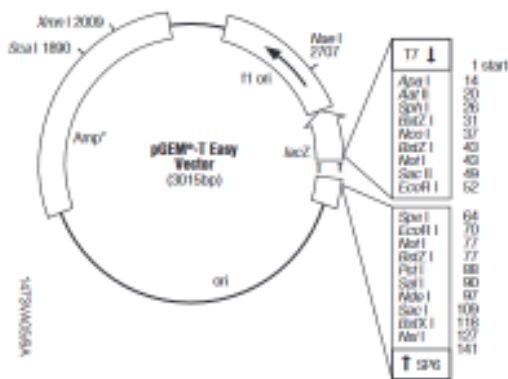
El kit de extracción de gel Thermo Scientific GeneJET está diseñado para la purificación rápida y eficaz de fragmentos de ADN extraídos de geles de agarosa estándares o de punto de fusión bajo en tampón TAE o TBE. El kit emplea una tecnología patentada de membrana a base de sílice en forma de una práctica columna de centrifugado. Se puede utilizar para purificar fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 25 pb y 20 kb con recuperación de hasta el 95 %. Todas las columnas de purificación GeneJET disponen de una capacidad de unión de hasta 25 µg de ADN y pueden procesar hasta 1 g de gel de agarosa. El procedimiento completo dura solo 15 minutos y el ADN aislado está listo para usarse en todas las aplicaciones posteriores comunes, incluyendo ligadura, digestión de restricción, PCR, secuenciación y etiquetado.

Protocolo de extracción.

Paso	Procedimiento
1	Corte la rebanada de gel que contiene el fragmento de ADN usando un bisturí limpio o una hoja de afeitar. Corte lo más cerca posible del ADN para minimizar el volumen del gel. Coloque la rodaja de gel en un tubo de 1,5 ml previamente pesado y pese. Registre el peso de la porción de gel.
2	Agregue un volumen 1:1 de Binding Buffer a la porción de gel (volumen: peso) (por ejemplo, agregue 100 μ L de Binding Buffer por cada 100 mg de gel de agarosa).
3	Incubar la mezcla de gel a 50-60 °C durante 10 minutos o hasta que la porción de gel esté completamente disuelta. Mezclar el tubo por inversión cada pocos minutos para facilitar el proceso de fusión. Asegúrese de que el gel esté completamente disuelto. Agitar brevemente la mezcla de gel antes de cargarla en la columna.
4	Transfiera hasta 800 μ L de la solución de gel solubilizada (del paso 3) a la columna de purificación GeneJET. Centrifugar durante 1 min. Deseche el flujo y coloque la columna nuevamente en el mismo tubo de recolección.
5	Agregue 700 μ L de tampón de lavado a la columna de purificación GeneJET. Centrifugar durante 1 min. Deseche el flujo y coloque la columna nuevamente en el mismo tubo de recolección.
6	Transfiera la columna de purificación GeneJET a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml (no incluido). Agregue 50 μ L de tampón de elución al centro de la membrana de la columna de purificación. Centrifugar durante 1 min.
7	Deseche la columna de purificación GeneJET y almacene el ADN purificado a 20 °C

Anexo 5. Esquema del plásmido pGEM-T Easy (3015pb)

pGEM[®]-T Easy Vector Circle Map and Sequence Reference Points



pGEM[®]-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β -lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2635
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Anexo 6. Transformación de células de *E. coli* DH5 α

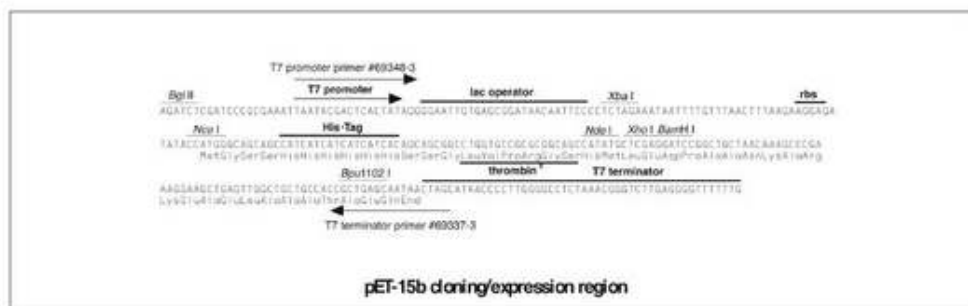
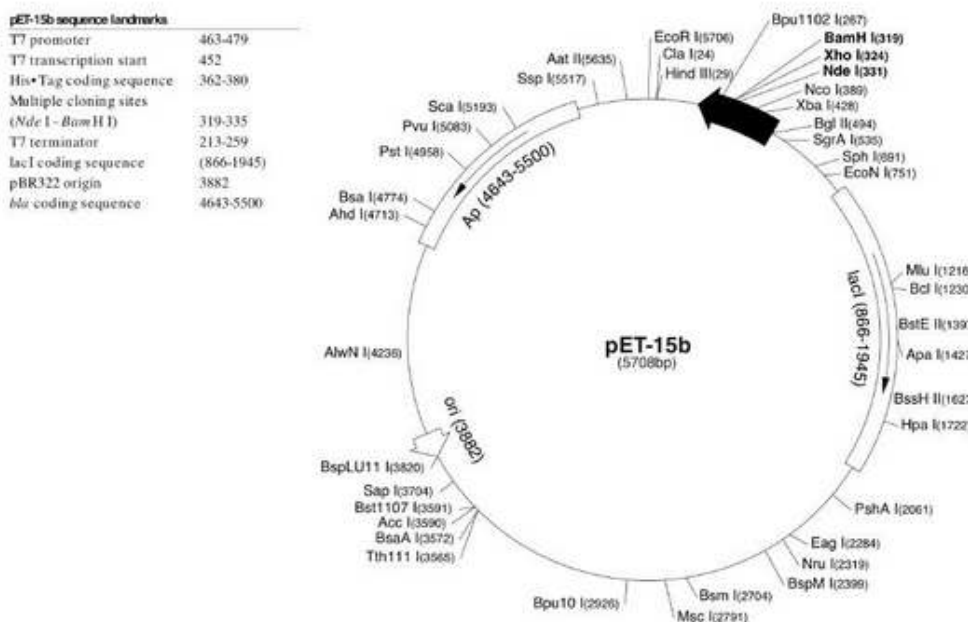
Las células termocompetentes de *E. coli* DH5 α son una cepa versátil que se utiliza para aplicaciones generales de clonación y subclonación. Generan alta estabilidad del inserto con una eficiencia de transformación alta. En la etapa de transformación, se añadieron 5 μ L de la reacción de ligación en 200 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α y la mezcla se mantuvo en hielo por 5 min. Después el choque térmico se llevó a cabo a 42° C por 90s. Se le añadió 500 μ L de medio LB sin ampicilina y se incubó a 37° C por una hora con una agitación constante de 200 rpm. Después del tiempo de incubación se plaquearon las bacterias transformadas en cajas Petri con medio LB sólido con ampicilina. Las cajas se dejaron a 37° C toda la noche.

Anexo 7. Extracción del ADN plasmídico

Se picaron colonias y se inocularon en 5mL de medio LB con ampicilina. Se dejaron incubando a 37°C toda la noche en agitación a 200 rpm. Al día siguiente se centrifugó a 10 000 rpm por 5min a temperatura ambiente. La pastilla bacteriana fue resuspendida con 100 µL de la solución de lisis alcalina I (glucosa 50 mM, Tris Base pH: 8 25 mM, EDTA pH: 8 10 mM) y se mantuvo en hielo. Después se agregaron 100 µL de la solución de lisis alcalina II (NaOH 0.2 N, 1% w/v, recién preparada) a cada suspensión bacteriana y se homogenizó por inversión. Se mantuvo a temperatura ambiente por 5 min.

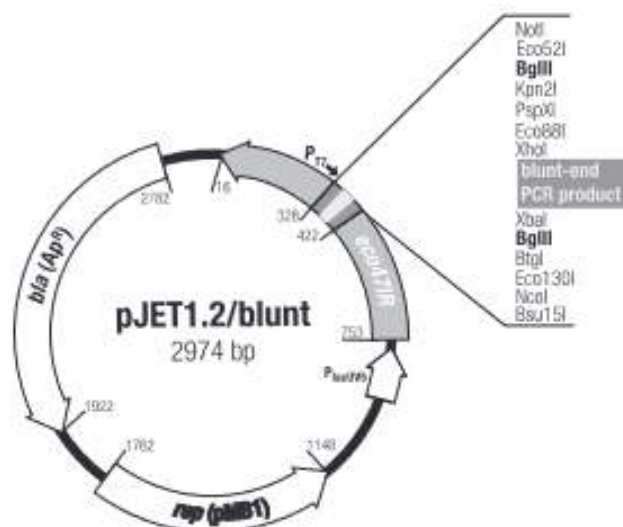
Posteriormente se adicionaron 150 µL de la solución fría de lisis alcalina III (acetato de potasio 3 M, ácido acético glacial 2.01 M), se homogenizó por inversión y se mantuvo en hielo por 15 min. El lisado bacteriano obtenido fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 min, el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo estéril, seguidamente se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se incubó durante 1h a -20°C. Se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min hasta que se obtuvo una pastilla. El sobrenadante fue descartado, la pastilla fue lavada con 500 µL de etanol al 70%. Posteriormente el sobrenadante fue desechado por decantación y el tubo fue invertido a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del etanol. Por último, la pastilla fue disuelta en 50 µL de agua libre de nucleasas. Se almacenó a -20° C hasta su uso luego de tomar una alícuota para su verificación en un gel de agarosa al 1%.

Anexo 8. Mapa del plásmido pET15b (5,708 pb). Dentro del sitio múltiple de clonación se encuentran las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción XhoI y BamHI.



Novagen - cloning 800-526-7319 · technical support 800-207-0144

Anexo 9. Mapa del plásmido Pjet1.2 (2,974 pb)



Genetic elements of the pJET1.2/blunt cloning vector

Element	Function	Position (bp)
rep (pMB1)	Replicon (rep) from the pMB1 plasmid responsible for the replication of pJET1.2	1782-1148
Replication start	Initiation of replication	1162±1
bla (Ap ^R)	β -lactamase gene conferring resistance to ampicillin. Used for selection and maintenance of recombinant <i>E. coli</i> cells	2782-1922
eco47I/R	Lethal gene <i>eco47I/R</i> enables positive selection of recombinant plasmid	753-16
P _{MCS2}	Modified P _{MCS} promoter for expression of the <i>eco47I/R</i> gene at a level sufficient to allow for positive selection	892-769
T7 promoter	T7 RNA polymerase promoter for <i>in vitro</i> transcription of the cloned insert	305-324
Multiple cloning site (MCS)	Mapping, screening and excision of the cloned insert	422-328
Insertion site	Blunt DNA ends for ligation with insert	371-372
Primer binding sites:		
pJET1.2 forward sequencing primer	Sequencing of insert, colony PCR. Sequence: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	310-332
pJET1.2 reverse sequencing primer	Sequencing of insert, colony PCR. Sequence: 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	428-405

Anexo 10. Mapa del plásmido pSNAPf (5,849 pb)

