

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



***Sobreexpresión, purificación y
caracterización de proteínas involucradas
en la exportación nuclear del ARN***

CURSO ACADÉMICO 2016-2017

Colaboradores:



TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Alumno/a: Irene Martín López
Tutor/a: Consuelo Sabater Marco
Cotutor/a: D. Jerónimo Bravo Sicilia

València, Julio 2017



RESUMEN

Sobreexpresión, purificación y caracterización de proteínas involucradas en la exportación nuclear del ARN

La exportación nuclear del mRNA está coordinada con las diferentes etapas de la expresión génica. En las células de los organismos eucariotas existen diferentes orgánulos donde se realizan las funciones celulares, incluyendo el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. En el núcleo celular es donde se encuentra la información genética almacenada en el DNA, y donde ocurre la replicación y reparación del DNA, la transcripción y el procesamiento del RNA. La traducción de las proteínas ocurre exclusivamente en el citoplasma. Por ello, a través del complejo de poro nuclear, el mRNA y otras macromoléculas se transportan al citoplasma. Hay proteínas adaptadoras del transporte de mRNA que actúan como un sistema de control para prevenir una incorrecta exportación nuclear causada por un mal procesamiento o ensamblaje de las ribonucleoproteínas. En este proyecto se pretenden generar mutantes puntuales de una serie de construcciones de Mip6, proteínas celulares de unión a la proteína Mex67, un elemento fundamental en la exportación del RNA desde el núcleo al citoplasma. Se generarán una serie de mutantes por biología molecular para poder proceder a su sobreexpresión y purificación. Según las cantidades obtenidas se procederán a distintos tipos de caracterización biofísica. En primer lugar se procederá a la obtención de mutantes de una supuesta secuencia de exportación nuclear (NES) con el objetivo de validarla como tal. La presencia o no de un NES en Mip6, proteína de unión a Mex67 tiene importantes implicaciones funcionales en su biología y en la interpretación de sus asociaciones con Mex67. También se procederá a la sobreexpresión y purificación de la unidad mínima de interacción de Mip6 con Mex67 con el objetivo de iniciar series de cristalización para poder resolver su estructura cristalina en un futuro. Por otra parte, mediante técnicas de clonaje se pretende caracterizar las proteínas Mex67 y Dbp5, dos proteínas involucradas en el transporte nuclear.

Palabras clave: Mip6, Mex67, Exportación mRNA , Complejo THO/TREX, Mutagénesis

Overexpression, purification and characterization of proteins involved in nuclear export of RNA

The nuclear export of mRNAs is coordinated with different steps of gene expression. Eukaryotic organisms have a physical and functional compartmentalization of the cells into organelles that are the sites where cellular activities occur, including growth, development, and differentiation. Genetic information is stored in the cell nucleus in the form of chromosomal DNA, in this compartment, DNA replication and repair, transcription of genes, and RNA processing occur. Protein translation occurs exclusively in the cytoplasm. Thus, mRNAs and other macromolecules are transported into the cytoplasm through the NPC. There are adaptor proteins to control and prevent an improperly processed or assembled ribonucleoproteins. Mip6 is a protein that interacts with the protein Mex67, which is a component of the nuclear pore involved in nuclear mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. It aims to generate different mutants by molecular biology to overexpress and purify these constructs. Depending on the quantities of protein obtained, different types of biophysical characterization will be carried out. The first step is to obtain the mutants of a determinate nuclear export sequence (NES) in order to validate it as such. The presence of NES in Mip6 has important functional implications in her biology and in the characterization of their associations with Mex67. Moreover, the overexpression and purification of the minimal interaction unit of Mip6 with Mex67 is going to be done with the objective to make crystallization series to be able to solve its crystalline structure in the future. Furthermore, cloning techniques used in this work will provide a characterization of Mex67 and Dbp5 proteins, which are two proteins involved in nuclear transport.

Key words: Mip6, Mex67, nuclear export of mRNA, THO/TREX complex, Mutagenesis

Autor: Irene Martín López Valencia, Julio 2017

Tutor: Consuelo Sabater Marco

Cotutor: Jerónimo Bravo Sicilia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Jero por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y formar parte de su equipo UTS. Gracias por tu dedicación y tu ayuda cuando algo no salía del todo bien.

Dar las gracias a Nada por aguantarme y enseñarme todas las técnicas y protocolos que debía seguir. Gracias por su paciencia y ayuda durante todos estos meses.

También agradecer la ayuda de Lidia, Susana y Júlia en el laboratorio. Ellas me enseñaron todas las normas y técnicas para saber cómo trabajar en el laboratorio.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio que han estado durante estos meses realizando su proyecto. Entre todos formamos un buen equipo y siempre hemos sabido trabajar juntos. También quiero agradecer el trabajo de Marcos, nuestro técnico de laboratorio, no sé qué habríamos hecho sin su ayuda.

Agradecer todo el apoyo que he tenido de mis amigos y compañeros que han estado conmigo durante estos cuatro años. Por vuestro apoyo incondicional, por aguantar mis malos momentos, por esos días eternos en la universidad, y sobre todo por todos los buenos momentos vividos juntos. OHANA means family.

Por último, pero no menos importante, dar las gracias a mi familia y amigas de siempre, por todo el cariño que me habéis dado. Habéis estado ahí para animarme y ayudarme a conseguir mis sueños.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Exportación mRNA	1
1.2. NPC (Complejos de Poro Nuclear)	2
1.3. Complejo Mex67-Mtr2	4
1.3.1. Caracterización estructural de Mex67/NXF1	4
1.4. El complejo THO/TREX	5
1.5. El complejo SAGA	6
1.6. Mip6	7
1.7. Dbp5: direccionalidad y terminación de la exportación mRNA	7
2. Objetivos	8
3. Materiales y métodos	9
3.1. Construcciones proteína Mip6	9
3.2. Vector pGEX-6P-2	9
3.3. Mutagénesis dirigida	10
3.4. Transformación en Escherichia coli	11
3.5. Extracción de DNA plasmídico	12
3.6. Expresión y purificación a pequeña escala	12
3.7. SDS-PAGE	14
3.8. Coexpresión y purificación de proteínas	14
3.9. Clonaje	15
3.9.1. Preparación del vector pNKI	15
3.9.2. Diseño de cebadores	16
3.9.3. Amplificación de los insertos por PCR	16
3.9.4. Tratamiento con T4 DNA Polimerasa	17
3.9.5. Combinación del vector e insertos tratados: reacción de anillamiento	18
3.9.6. PCR colonia	18
3.10. Sobreexpresión y purificación con la resina de níquel (NI-NTA)	19
3.11. Western Blot	20
4. Resultados y discusión	21
4.1. Mutagénesis Mip6	21
4.2. Secuenciación mutantes	21
4.3. Expresión y purificación a pequeña escala	22
4.4. Interacción proteína Mip6 y Mex67	24
4.5. Clonaje	25
4.5.1. Clonación Mex67 de <i>Chaetomium thermophilum</i>	25
4.5.2. Expresión y purificación de Mex67 de <i>Chaetomium thermophilum</i>	27
4.5.3. Western Blot de Mex67 de <i>Chaetomium thermophilum</i>	27
4.5.4. Clonación Dbp5 de <i>Chaetomium thermophilum</i>	28
4.5.5. Clonación Dbp5 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.6. Perspectiva del estudio	34
5. Conclusiones	35
6. Referencias bibliográficas	35
7. ANEXO	38

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1. EXPORTACIÓN NUCLEAR DEL MRNA EN LEVADURAS Y METAZOOS.	2
FIGURA 2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO DE PORO NUCLEAR.....	3
FIGURA 3. COMPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE MEX67/NXF1 DE <i>H. SAPIENS</i> , <i>C. THERMOPHILUM</i> Y <i>S. CEREVISIAE</i>	4
FIGURA 4. MODELO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y EXPORTACIÓN DEL MRNA MEDIADA POR LOS COMPLEJOS PROTEICOS THO/TREX, TREX-2 Y SAGA EN LEVADURAS.	6
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE MIP6.....	7
TABLA 1. FACTORES DE LEVADURA Y SUS HOMÓLOGOS DE METAZOOS CITADOS EN ESTE TRABAJO.	8

MATERIALES Y MÉTODOS

FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE PGEX-6P-2.	10
FIGURA 7. ESQUEMA DEL PROCESO DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.	10
TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA MUTAGÉNESIS.....	11
FIGURA 8. VECTOR pETNKI-HIS-3C-LIC-KAN.	15
TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA PREPARAR LOS CONSTRUCTOS EN ESTE TRABAJO.....	16
FIGURA 9. REACCIÓN DE ANILLAMIENTO.	18
TABLA 4. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES T7 PROMOTOR Y T7 TERMINADOR.	19

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FIGURA 10. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) DE LA MUTAGÉNESIS	21
FIGURA 11. SECUENCIACIÓN DE LA PROTEÍNA MIP6 CON LOS DOBLES MUTANTES DE LA REGIÓN RRM4.	21
FIGURA 12. SECUENCIACIÓN DE LA PROTEÍNA MIP6 CON LOS DOBLES MUTANTES	22
FIGURA 13. GEL DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE (10% ACRILAMIDA) DE LA PURIFICACIÓN A PEQUEÑA ESCALA CON LA RESINA DE GLUTATIÓN SEFAROSA DE LOS 4 MUTANTES DE MIP6 EN PGEX DE LA REGIÓN RRM3/4	23
FIGURA 14. GEL DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE (10% ACRILAMIDA) DE LA PURIFICACIÓN A PEQUEÑA ESCALA CON LA RESINA DE GLUTATIÓN SEFAROSA, DE LAS 4 CONSTRUCCIONES DE MIP6 DE LA REGIÓN RRM4	23
FIGURA 15. GEL DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE (10% ACRILAMIDA) DE LA PURIFICACIÓN E INTERACCIÓN CON MEX67 A PEQUEÑA ESCALA CON LA RESINA DE GLUTATIÓN SEFAROSA, DE LAS 4 CONSTRUCCIONES DE DOBLES MUTANTES DE MIP6 DE LAS REGIONES RRM3/4 Y RRM4	24
FIGURA 16. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) CLONACIÓN MEX67 <i>CHAETOMIUM THERMOPHILUM</i>	25
FIGURA 17. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) DE LA PCR COLONIA DE LA PROTEÍNA MEX67	25
FIGURA 18. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) DE LA PCR DEL DNA PLASMÍDICO DE LA PROTEÍNA MEX67 CLONADA.	25
FIGURA 19. SECUENCIACIÓN DE LA CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA MEX67.....	26
FIGURA 20. CROMATOGRAMA DE LA SECUENCIACIÓN DEL DNA DE MEX67 DE <i>CHAETOMIUM THERMOPHILUM</i> CON EL T7 PROMOTOR.	26
FIGURA 21. GEL DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE (10% ACRILAMIDA) DE LA PURIFICACIÓN A PEQUEÑA ESCALA CON LA RESINA DE NÍQUEL DE LA PROTEÍNA MEX67.	27
FIGURA 22. WESTERN BLOT REVELADO CON EL ANTICUERPO ANTI-HIS6-PEROXIDASA.	28
FIGURA 23. ALINEAMIENTO SECUENCIA PROTEICA DE DBP5 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (QUERY) Y DBP5 DE <i>CHAETOMIUM THERMOPHILUM</i> (SBJCT).....	29
FIGURA 24. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) CLONACIÓN DBP5 DE <i>CHAETOMIUM THERMOPHILUM</i>	29
FIGURA 25. SECUENCIACIÓN DE LA CLONACIÓN DE DBP5 DE <i>CHAETOMIUM THERMOPHILUM</i>	30
FIGURA 26. ALINEAMIENTO DEL DNA GENÓMICO Y cDNA DE DBP5 DE <i>CHAETOMIUM THERMOPHILUM</i>	31
FIGURA 27. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) DE LA PCR COLONIA DE LA PROTEÍNA DBP5 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	32
FIGURA 28. GEL DE AGAROSA (TAE 1X, 0.5 % AGAROSA) DE LA PCR DEL DNA PLASMÍDICO Y DEL DNA PLASMÍDICO DE LAS COLONIAS POSITIVAS DE DBP5 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	32
FIGURA 29. SECUENCIACIÓN DE LA CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA DBP5 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	33
FIGURA 30. CROMATOGRAMA DE LA SECUENCIACIÓN DEL DNA DE DBP5 DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CON EL T7 PROMOTOR.	33

ABREVIATURAS

μl: microlitro
DNA: ácido desoxirribonucleico
RNA: ácido ribonucleico
dNTPs: desoxirribonucleótidos
MW: marcador de pesos moleculares
FT: *Flow Throught*, fluido a través
W: lavado
E: eluido
His: histidina
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
IPTG: Isopropil - β-D-tiogalactopiranosido
LB: Luria Broth medio
OD: densidad óptica
Tm: temperatura de fusión
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: tampón fosfato salino
tRNA: RNA de transferencia
mRNA: RNA mensajero
mRNP: *mRNA-protein complex*
NPC: *nuclear pore complex*
Nups: nucleoporinas
TRES: *transcription-export*
CTD: dominio C-terminal
SAGA: Spt5-Ada-Gen5 acetiltransferasa
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
GTP: guanosín trifosfato
GDP: guanosín difosfato
SAXS: small-angle X-ray scattering
CDS: *coding DNA sequence*
ATP: adenosín trifosfato
Chm: Chaetomium thermophilum
S.c: Saccharomyces cerevisiae
E. coli: Escherichia coli
FW: *forward*, directo
REV: *reverse*, reverso
DM: doble mutante
hnRNP: ribonucleoproteína heterogénea nuclear
ts: termosensible
bp: pares de bases
ng: nanogramo
tag: etiqueta proteica
His: histidina
°C: grado celsius

1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento del dogma central de la biología molecular propuesto por Crick, se sabe que hay un flujo de información entre el DNA, RNA y las proteínas. Estudios recientes han demostrado la relación que existe entre la expresión génica y la exportación del mRNA del núcleo al citoplasma. En las células eucariotas se requieren una serie de procesos nucleares coordinados, estos incluyen la síntesis y maduración de los complejos pre-mRNAs, la unión de pre-mRNA junto con proteínas (pre-mRNPs), el transporte a través de los gránulos de intercromatina, la exportación a través del poro nuclear y la liberación de los mRNP en el citoplasma (Björk y Wieslander, 2014). Los complejos RNP y algunas proteínas multifuncionales facilitan la comunicación entre los procesos anteriores y posteriores del transporte de mRNA a través del poro nuclear (NPC) (Moore y Proudfoot, 2009). La transcripción, el empalme (splicing), la formación de mRNP, el procesamiento del extremo 3' y el reclutamiento de NPC son los procesos anteriores, mientras que las modificaciones de mRNP y la traducción ocurren posteriormente (Rodríguez-Navarro y Hurt, 2011).

Existen distintos mecanismos de exportación nuclear dependiendo del tipo de RNA, desde rutas simples de sRNAs (small RNAs) hasta mecanismos complejos de biogénesis y exportación de ribonucleoproteínas más grandes. Sin embargo, muchos estudios científicos han demostrado que cualquier transporte nucleocitoplasmático requiere el uso de receptores móviles que se enlazan y movilizan las moléculas (Köhler y Hurt, 2007).

La RNA polimerasa II (Pol II) juega un papel principal en la exportación nuclear, ya que se encarga de reclutar todos los factores que intervienen en el empalme, taponado 5' (*capping*), en la formación del extremo 3' y la exportación del mRNA (Vinciguerra y Stutz, 2004).

1.1. EXPORTACIÓN MRNA

La mayoría de RNAs dependen del gradiente RanGTP-RanGDP para su exportación, por lo tanto las carioferinas actúan directamente o indirectamente en el proceso. Las exportinas translocan las moléculas al citoplasma solo cuando el RanGTP está también unido a este complejo, una vez en el citoplasma se produce la hidrólisis del RanGTP en RanGAP. En cambio, se ha visto que no es igual en la exportación del mRNA, es un proceso más complejo que la exportación de proteínas o pequeñas moléculas de RNA (Köhler y Hurt, 2007).

A partir de los análisis genómicos realizados, se ha visto que la biogénesis, exportación y traducción de las diferentes subpoblaciones del mRNA están coordinadas de forma distinta. Estudios han revelado que el mecanismo de exportación del mRNA está conservado en levaduras y seres humanos, aunque cada organismo tiene sus peculiaridades.

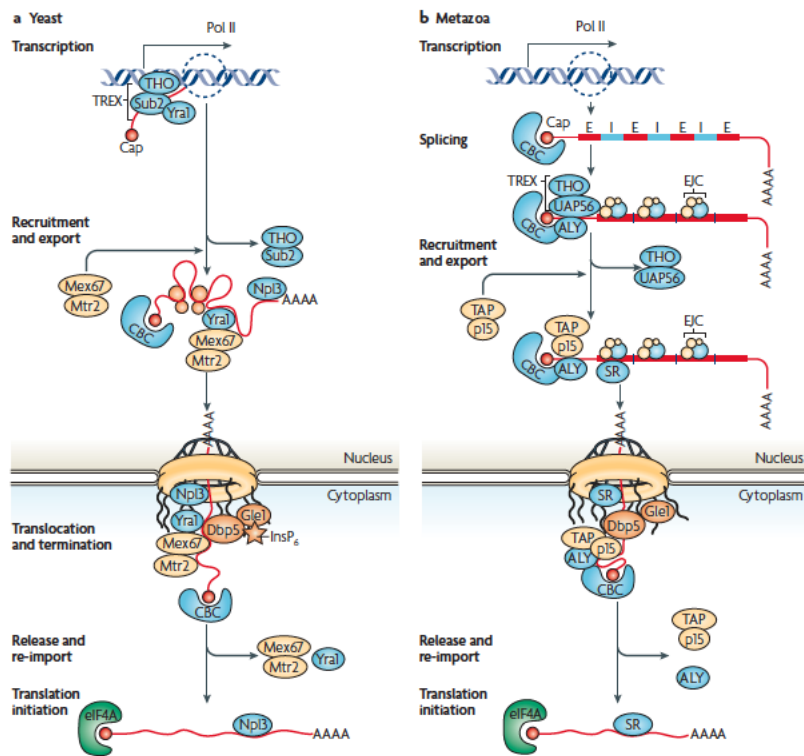


Figura 1. Exportación nuclear del mRNA en levaduras y metazoos. a) En levaduras, el transcrito generado por la RNA Pol II se pliega y es ensamblado en un pre-mRNP por el complejo THO/TREX. Se asocia a factores adicionales pre-mRNA y el receptor de exportación Mex67-Mtr2 es incorporado al mRNP por proteínas adaptadores como Yra1. El mRNP se dirige al NPC, Mex67 genera la translocación del mRNP a través del poro nuclear mediante la interacción de las FG nucleoporinas. En el citoplasma, la RNA helicasa Dbp5 libera mRNP del poro produciendo un remodelamiento y el reciclado de los factores de transporte que vuelven al núcleo. b) En metazoos, se produce el *splicing* y *capping* del mRNP. Esta es una de las diferencias que hay con respecto a las levaduras, ya que en estas solo un pequeño porcentaje contiene intrones en sus genes. El receptor de exportación en este caso se llama TAP-p15. Los procesos *downstream* de la exportación del mRNA son muy similares en los dos organismos. En la figura se muestran los receptores de exportación en amarillo y los adaptadores en azul (Köhler y Hurt, 2007).

Las proteínas adaptadoras del transporte de mRNA actúan como un sistema de control para prevenir una incorrecta exportación nuclear causada por un mal procesamiento o ensamblaje de las ribonucleoproteínas. Sin embargo, se ha observado que la exportación del mRNA frente a un estrés térmico no necesita adaptadores. Mex67 se une directamente a la RNA Polimerasa II y rápidamente se produce la exportación y traducción de este tipo de mRNAs, permitiendo a las células sobrevivir a situaciones extremas (Zander *et al.*, 2016)

Se ha demostrado que la desregulación de la maquinaria de exportación del mRNA puede dar lugar a varias enfermedades, incluyendo el desarrollo de cáncer. Además, mutaciones en factores de exportación del mRNA producen enfermedades autosómicas recesivas de la neurona motora y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Wickramasinghe y Laskey, 2015).

1.2. NPC (COMPLEJOS DE PORO NUCLEAR)

Los poros nucleares son grandes complejos macromoleculares que se encuentran en la envoltura nuclear y regulan el transporte de manera selectiva. Tienen la forma de un cilindro con una simetría del orden de 8, de 100 nm de diámetro y con un canal central de 30-50 nm. El tamaño total en levaduras es de 40-60 MDa y 60-120 MDa en vertebrados (Niño *et al.*, 2013).

El NPC actúa como un portal entre el núcleo y el citoplasma (Grünwald, 2011). Tiene una región nucleoplásmica que consiste en un anillo nuclear y una cesta nuclear con grandes filamentos. La parte central forma el canal de translocación y la región citoplasmática está formada por un anillo citoplasmático y unos filamentos largos (Björk y Wieslander, 2014).

Las proteínas que forman los poros nucleares se llaman nucleoporinas (Nups). Esta clase de proteínas se divide en tres grupos dependiendo de su localización en el NPC: las proteínas transmembrana, las proteínas que forman la estructura del NPC y las nucleoporinas que contienen repeticiones del péptido fenilalanina-glicina (nucleoporinas FG). En levaduras existen 30 tipos diferentes de Nups, de las cuales la mitad contienen repeticiones FG. El transporte nuclear de grandes proteínas y moléculas de RNA está mediado por señales y es energéticamente dependiente. Las señales de localización nuclear (NLS) y las de exportación nuclear (NES) dirigen a las proteínas para la importación o exportación mediante interacciones con receptores para el transporte de la familia de las importinas- β (carioferinas) (Zenklusen y Stutz, 2001)

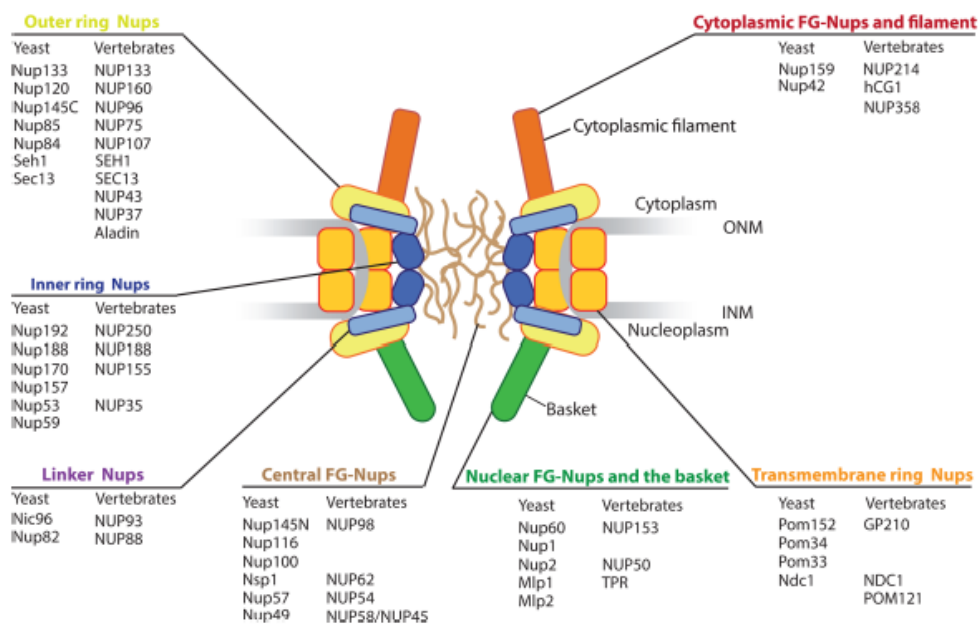


Figura 2. Estructura y función del complejo de poro nuclear. El NPC está formado por un canal central localizado en el plano de la envoltura nuclear que conecta el núcleo y el citoplasma. Las nucleoporinas se agrupan respecto a la localización en las diferentes subestructuras del NPC. En esta figura quedan representadas todas las Nups presentes en levaduras y vertebrados. Las nucleoporinas transmembranas anclan el núcleo del NPC a la envoltura nuclear. El núcleo está compuesto por las nucleoporinas del anillo interno y externo. Las nucleoporinas de enlace permiten la unión de las nucleoporinas FG y el núcleo. Los filamentos citoplasmáticos y la cesta nuclear actúan como sitios de acoplamiento para los complejos transportadores (Niño *et al.*, 2013).

De acuerdo con los análisis realizados se ha llegado a la conclusión que hay dominios de las nucleoporinas FG asimétricas (Nup1 y Nup2) que participan en el anclaje del mRNP al NPC, mientras que Nup57 y Nup49 participan en su translocación. Por lo tanto, hay una interacción de las mRNPs con las FG-Nups durante la translocación (Niño *et al.*, 2013).

Estudios *in vivo* han identificado un paso limitante en el transporte del mRNA. En la parte nuclear, este paso depende del control de calidad del mRNA y de los mecanismos de supervivencia. En la parte citoplasmática, dependerá del remodelamiento del mRNP que define la direccionalidad.

1.3. COMPLEJO MEX67-MTR2

A partir de los experimentos de hibridación *in situ* realizados se identificó Mex67 como un factor de exportación nuclear del mRNA (NXF) en *Saccharomyces cerevisiae*. En metazoos, TAP/NXF1, ortólogo de Mex67 en mamíferos, interactúa con CTE (*constitutive transport element*), un elemento presente en los transcritos de retrovirus simples de tipo D, fundamental para la exportación del RNA genómico retroviral *unspliced* (Niño *et al.*, 2013).

El complejo Mex67-Mtr2 de levaduras y su homólogo en metazoos TAP-p15, es un receptor heterodimérico de exportación del mRNA que transporta mRNPs a través de NPCs. Este complejo actúa junto con proteínas de unión al RNA (*RNA-binding proteins*) (Köhler y Hurt, 2007). Hay una gran interacción genética entre MTR2 y MEX67 que sugiere que las proteínas están físicamente asociadas (Santos-Rosa, 1998).

Mex67 se asocia físicamente al RNA, y Mtr2 es necesaria para la asociación de Mex67 a partir de las nucleoporinas FG del complejo de poros nucleares. Además, se sabe que hay una interacción física y genética entre Mtr2 y Nup85, por lo que esta proteína actúa como diana para la unión del complejo Mex67-Mtr2 al NPC. Si se produce una mutación en Mex67 y no se puede unir a Mtr2, se inhibe la exportación nuclear de mRNA y el crecimiento celular. Mediante estudios genéticos realizados, se ha propuesto un modelo que implica la interacción directa del complejo Mex67-Mtr2 con nucleoporinas FG. Nup84 y Nup159 son dos subcomplejos NPC de levaduras esenciales para la exportación del mRNA. Además, hay dos evidencias claras que indican que Mex67 participa en la exportación. La primera fue descubierta a partir del estudio *in vivo* de mutantes termosensibles generados por mutagénesis del gen MEX67. El mutante *ts mex67-5* no mostró ningún defecto de crecimiento a 30°C, en cambio a 37°C las células no crecían pero no se morían gracias a la reversibilidad del fenotipo *ts*. Esto sugiere que Mex67 controla este proceso celular esencial. La segunda evidencia es la unión de Mex67 al RNA poliadenilado (poly (A⁺) RNA) en las células (Segref *et al.*, 1997).

1.3.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE MEX67/NXF1

Mex67/NXF1 está formado por cuatro dominios. La región N-terminal contiene un dominio de reconocimiento del RNA (RRM) y un dominio de repetición rica en leucina (LRR). La región C-terminal contiene un dominio de factor de transporte nuclear (NTF2L) y un dominio de asociación a la ubiquitina (UBA), y se une con las nucleoporinas FG (Aibara, 2015).

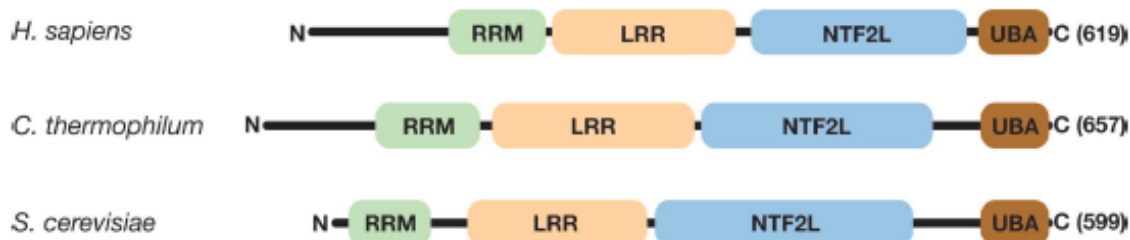


Figura 3. Comparación de la estructura de Mex67/NXF1 de *H. sapiens*, *C. thermophilum* y *S. cerevisiae*. Los tres organismos presentan los cuatro dominios estructurales (RRM, LRR, NTF2L y UBA). Sin embargo, en *H. sapiens* y *C. thermophilum* la extensión de la región N-terminal es mayor (Aibara, 2015).

Mtr2 es una proteína de 15-20 kDa que también tiene un dominio NTF2L y forma un heterodímero con el dominio NTF2L de la proteína Mex67. Este complejo Mex67-Mtr2 tiene un contacto directo con mRNA y con interacciones de baja afinidad con las nucleoporinas FG.

Para determinar estructuras cristalinas de alta resolución de las proteínas se han realizado estudios con organismos termófilos eucarióticos como el hongo filamentoso *Chaetomium thermophilum*. Por otra parte, a partir de estudios *in vitro* (SAXS y estudios de unión al RNA) se ha demostrado que Mex67-Mtr2 en *Chaetomium thermophilum* tiene propiedades bioquímicas similares a NXF1-NXT1 en *Homo sapiens*.

Son necesarias varias proteínas adaptadores que permiten la asociación de Mex67 con mRNP maduras. Algunas de las que se han identificado son: Yra1, es un adaptador que se encarga de la exportación de la mayoría de mRNAs; SRp20 y 9G8 son dos proteínas ricas en serina/arginina (*SR-like protein*) necesarias para la exportación de mRNA en mamíferos; otra proteína SR es Npl3 que funciona como adaptador en levaduras interactuando directamente con Mex67; Nab2 es una proteína de unión al RNA (RNP) que actúa en la exportación del mRNA en levaduras y es capaz de interactuar con Mex67 e Yra1; y Sub2 es otro factor de exportación que como se explica posteriormente es capaz de unirse a varios complejos involucrados en la maduración del mRNA (Kurshakova, 2016).

Npl3 en su forma fosforilada es reclutada por los mRNPs formados, pero interactúa con Mex67 solo en su forma desfosforilada. La fosfatasa Glc7 coordina la defosforilación de Npl3 para asegurarse de la asociación de los mRNPs procesados correctamente con el receptor de exportación Mex67 (Vinciguerra y Stutz, 2004).

1.4. EL COMPLEJO THO/TREX

El complejo THO es importante para la biogénesis de partículas mRNP y en la interfaz entre la transcripción y la exportación del RNA. Muchos estudios han revelado que también participa en el desarrollo y diferenciación tisular (Jimeno y Aguilera, 2010).

El pre-mRNA sufre un proceso de empaquetamiento llevado a cabo por el complejo THO/TREX en levadura. Este complejo proteico nuclear está formado por diferentes componentes que intervienen en la elongación de la transcripción, recombinación del transcrito, y es el principal mediador de la exportación nuclear del mRNA. El complejo THO (conservado de levaduras a humanos) está formado por cuatro subunidades (Tho2, Hpr1, Mft1 y Thp2) en las levaduras, y en los metazoos contiene 3 subunidades más THOC5, THOC6 y THOC7. Este está asociado a dos factores de exportación que generan una unión física con el receptor de exportación del mRNA: Yra1 (REF/Aly en mamíferos) y Sub2 (UAP56 en mamíferos) (Köhler y Hurt, 2007).

Yra1 contiene una región RRM que une el mRNA a Mex67 (NXF1/TAP en mamíferos), en cambio Sub2 es una proteína DEAD-box con actividad ATPasa que ayuda en el ensamblaje del spliceosoma. Yra1 se une primero al complejo tetramérico THO, asociado con una quinta proteína, Tex1. Se han encontrado muchas helicasas RNA DEAD-box que intervienen en el procesamiento del pre-mRNA y la reorganización de ribonucleoproteínas. Esta familia de proteínas hidroliza ATP para catalizar los dos procesos: reordenamientos RNA-RNA a partir de su actividad helicasa y el remodelamiento del complejo RNA-proteína (Niño *et al.*, 2013).

Tho, Yra1 y Sub2 copurifican en un complejo llamado TREX (*Transcription-export*) que ensambla la transcripción y la exportación. Los componentes de TREX son reclutados en un gen activo casi al mismo tiempo durante la elongación de la transcripción. Se ha estudiado que las

mutaciones que eliminan componentes del complejo THO/TREX producen una acumulación de los genes de los extremos 3' anclados al NPC. Además, debido a un fallo en la poliadenilación y escisión, estas asociaciones de las mRNP con NPC dan lugar a la destrucción del transcrito. La principal enzima responsable de su degradación es el exosoma, este retiene y elimina los transcritos malformados en el proceso (Vinciguerra y Stutz, 2004).

El complejo TREX es importante para la formación estable y exportación de los mRNP, a través de la interacción directa entre Yra1 y Mex67. Mientras los componentes del complejo THO se unen a la cromatina, Yra1 y Sub2 interaccionan con el mRNA (Kurshakova, 2016).

1.5. EL COMPLEJO SAGA

Sac3 es un adaptador adicional de la exportación del mRNA en levadura que tiene la capacidad de reclutar físicamente al complejo Mex67-Mtr2 e interaccionar genéticamente con el complejo TREX. Sac3 junto con Thp1, Sus1 y Cdc31 forman el complejo TREX-2 y se encuentra anclado en la parte interna del NPC gracias a las nucleoporinas Nup1 y Nup60. El complejo TREX-2 junto con Sus1 (pequeña proteína), interaccionan con SAGA, un complejo intranuclear grande implicado en la activación de la transcripción y la modificación de la cromatina, que cataliza la acetilación de las histonas y la desubiquitinación (Köhler y Hurt, 2007).

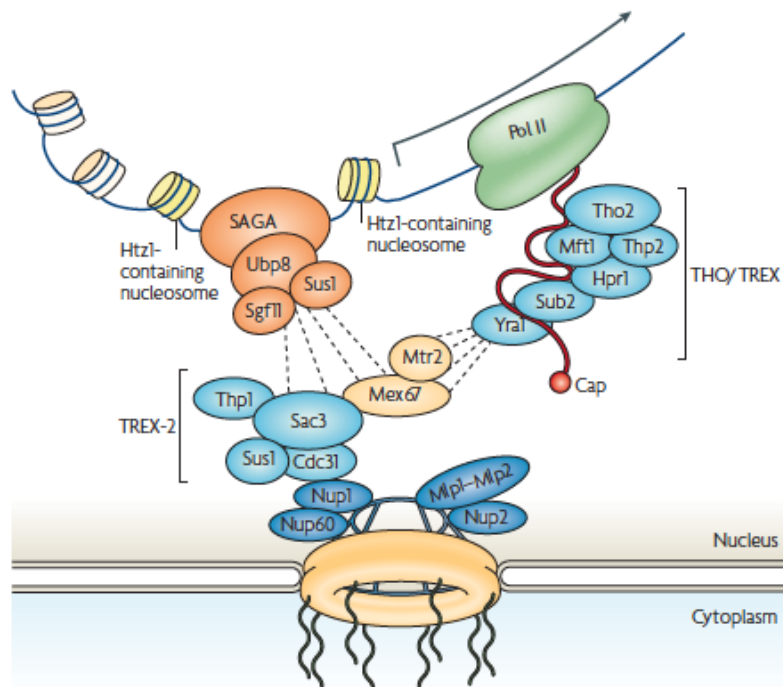


Figura 4. Modelo de la transcripción y exportación del mRNA mediada por los complejos proteicos THO/TREX, TREX-2 y SAGA en levaduras. Durante la iniciación de la transcripción, SAGA es reclutado como parte de un gran complejo de pre-iniciación de la transcripción. Posteriormente, el gen activo queda anclado a la periferia nuclear mediante la interacción de SAGA y el complejo TREX-2. Una vez transcrito el gen, junto con la ayuda del complejo THO/TREX pasa a ser un mRNP listo para ser exportado al citoplasma. El mRNP es transportado al complejo de poro nuclear asociado a la maquinaria de exportación del mRNA Mex67-Mtr2, reclutado por Yra1 y Sub2. Las líneas punteadas representan las interacciones entre los complejos. Los complejos TREX y Sus1-Thp1-Sac3 representan diferentes vías de unión de la transcripción y la maquinaria de exportación (Köhler y Hurt, 2007).

1.6. MIP6

A partir de un sistema de doble híbrido, se identificaron las proteínas que interactúan con Mex67. El resultado obtenido fue la presencia de una proteína hipotética de unión al RNA con tres motivos RNP en su parte central que interactúan con Mex67. La proteína Mip6 con su dominio C-terminal solo, sin los dominios RNP, también interactúa con Mex67. Mip6 es altamente homóloga a otra proteína de unión al RNA de levaduras llamada Pes4 (Segref *et al.*, 1997).

Mip6 contiene una región N-terminal desordenada (aa 1–32), 4 dominios RRM (aa 112–185, aa 200–270, aa 314–385 y aa 403–476) y dos regiones cortas de baja complejidad (aa 82–93 y aa 525–546). Se han obtenido ciertas conclusiones a partir del análisis de incremento de expresión de la proteína. Se ha visto que cuando se sobreexpresa esta proteína cambia su localización, ya que una elevada sobreexpresión inhibe el crecimiento de las células. Además, Mip6 se asocia con componentes de los gránulos de procesamiento (*P-bodies*) cuando se sobreexpresa e independientemente de si hay un estrés osmótico o no. Los gránulos de procesamiento constituyen sitios de almacenamiento y degradación del mRNA, en células de tipo salvaje (*wild-type cells*), su formación puede ser estimulada en respuesta a un estrés osmótico. Analizando las propiedades biofísicas de esta proteína se observó que las cepas Mip6 tienen una estructura dinámica y propiedades líquidas, que proporcionan un intercambio rápido de las moléculas con el reservorio de proteínas citoplasmáticas. Para que las cepas sobrevivan es necesaria una alta concentración de la proteína, así como la formación de las cepas y la toxicidad dependen de la interacción del RNA con Mip6. Por lo tanto, la hipótesis propuesta es que la toxicidad está relacionada con la formación de *P-bodies* que contienen factores de traducción de proteína y causan una inhibición de la traducción celular (Bolognesi *et al.*, 2016).

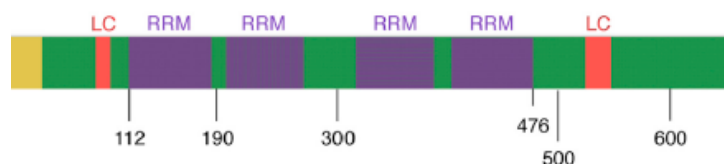


Figura 5. Esquema de la secuencia de Mip6. En amarillo se muestra la región N-terminal desordenada, en morado las regiones de reconocimiento del RNA (RRM) y en rojo las secuencias de baja complejidad (LC) (Bolognesi *et al.*, 2016).

Un estudio molecular y celular realizado actualmente ha demostrado que las dos proteínas de unión al RNA, Pes4 y Mip6, son reguladores de la traducción tardía, protección y localización del mRNA durante la esporulación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Jin *et al.*, 2017).

Actualmente se sabe muy poco de esta proteína y se debe investigar más para saber si Mip6 representa una proteína hnRNP o una proteína de unión al RNA poliadenilado, que junto a Mex67 intervienen en los mecanismos de exportación nuclear del mRNA (Segref *et al.*, 1997).

1.7. DBP5: DIRECCIONALIDAD Y TERMINACIÓN DE LA EXPORTACIÓN MRNA

Dbp5 (Rat8/DDX19 en humanos) es una proteína helicasa DEAD-box ATP dependiente que genera una reorganización irreversible de las ribonucleopartículas mensajeras emergentes (mRNPs) en el lado citoplasmático del poro nuclear, desencadenando la liberación del receptor Mex67-Mtr2 (fase terminación) y la direccionalidad del transporte. Esta proteína está asociada

con la nucleoporina Nup159 y Gle1 (Köhler y Hurt, 2007). La actividad ATPasa de Dbp5 es estimulada por la nucleoporina Gle1, la cual se une directamente a la molécula de hexafosfato de inositol (InsP₆) y este modula la interacción entre Gle1 y Dbp5 (Weirich *et al.*, 2006).

Dbp5 se asocia con los transcritos para su transporte del núcleo al citoplasma y además con su dominio N-terminal interacciona directamente con Nup159 (Rat7). Esta última interacción sirve para el reciclado de Dbp5-ADP en apoDbp5, listo para usarse en un nuevo ciclo (Niño *et al.*, 2013). Posiblemente la influencia de los complejos de poros nucleares permite el transporte de algunos mRNPs a zonas específicas del citoplasma (Björk y Wieslander, 2014).

Se sabe que las proteínas Dbp5 y Mex67 están altamente relacionadas. El mecanismo utilizado por Dbp5 permite la direccionalidad de las mRNPs exportadas capturando el receptor Mex67 en la parte citoplasmática del poro nuclear, generando una liberación irreversible en el citoplasma y previniendo su regreso al canal central del poro nuclear (Lund and Guthrie, 2005).

En cambio, se ha observado que diferentes ribonucleoproteínas utilizan mecanismos de transporte diversos en los que interviene Dbp5. Por ejemplo, la actividad ATPasa de Dbp5 no es necesaria para la exportación nuclear de las subunidades pre-ribosomales (Neumann *et al.* 2016).

Yeast	Metazoans	Description
Mex67-Mtr2	NXF1-NXT1 (TAP-15)	mRNA export receptor
Yra1	Aly/REF	RNA binding protein, mRNA adaptor
Sub2	UAP56	RNA helicase, splicing/export factor
Sus1	ENY2	SAGA (DUBm) and TREX-2 component
Dbp5/Rat8	DDX19B	RNA helicase
Pcf11	PCF11	mRNA 3' end processing factor
Tho2	THOC2	THO/TREX complex
n.d.	THOC5	THO/TREX complex
Tho1	CIP29	THO/TREX complex
n.d.	UIF	THO/TREX complex
n.d.	ZC3H3	Polyadenylation/export factor
Sac3	GANP/Xmas-2	TREX-2 component
Thp1	ENST00000246505	TREX-2 component
Sem1	Dss1	Proteasome 19S and TREX-2 component
Tom1	n.d.	E3 ubiquitin ligase
Nab2	NAB2	RNA binding protein
Hpr1	THOC1	THO/TREX complex
Np13	n.d.	RNA-binding protein
Mip1	TPR/megator	Myosin-like protein
Nup116		
Nup110	Nup98	Nucleoporin
Nup145		
Nup1	Nup153	Nucleoporin
Sec13	Sec 13	Nucleoporin
Gle1	GLE1	Nucleoporin
Nup159	Nup214	Nucleoporin

Tabla 1. Factores de levadura y sus homólogos de metazoos citados en este trabajo. La descripción se refiere a la función biológica de cada uno (Rodríguez-Navarro y Hurt, 2011).

2. OBJETIVOS

La finalidad de este proyecto es caracterizar experimentalmente una serie de proteínas involucradas en la exportación nuclear del RNA. Para su abordaje se ha planteado:

- Generar mutantes puntuales de la proteína Mip6 para proceder a su sobreexpresión en *E. coli* y purificación.

- Determinar la unión de Mip6 con Mex67 mediante la sobreexpresión y purificación de la unidad mínima de interacción entre ambas, para poder resolver su estructura cristalina en un futuro.
- Clonar las proteínas Dbp5 y Mex67 completas de organismos eucariotas para su posterior sobreexpresión en procariotas y purificación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de las proteínas Mip6, Dbp5 y Mex67 se han empleado una serie de técnicas bioquímicas, biofísicas y de biología molecular detalladas a continuación.

3.1. CONSTRUCCIONES PROTEÍNA MIP6

La proteína Mip6 en *Saccharomyces cerevisiae* contiene 659 aminoácidos. La región codificante del gen (CDS) contiene 1980 pares de bases. Esta proteína tiene un peso molecular de 75,920 KDa.

En este proyecto se han utilizado las construcciones pertenecientes a las regiones de Mip6 RRM4 (401-480) y Mip6 RRM3/4 (313-480), con un peso molecular de 19,66 KDa y 41,33 KDa respectivamente.

3.2. VECTOR PGEX-6P-2

El vector en el cual se encuentran las construcciones de Mip6 es pGEX-6P-2 (Figura 6). Es un plásmido de expresión con orígenes de replicación pBR322. Contiene un marcador de resistencia a ampicilina y su tamaño es de 4985 pares de bases. Tiene un promotor Tac, el cual es inducido por el análogo de la lactosa: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Posee una secuencia específica GST Tag (*Glutathione S-transferase*), la cual tiene un peso molecular de 26 KDa. Por lo tanto, para poder expresar las proteínas también deberán contener este GST tag, de forma que cuando se purifiquen con una matriz de glutatión sefarosa quede retenida la fracción soluble de interés.

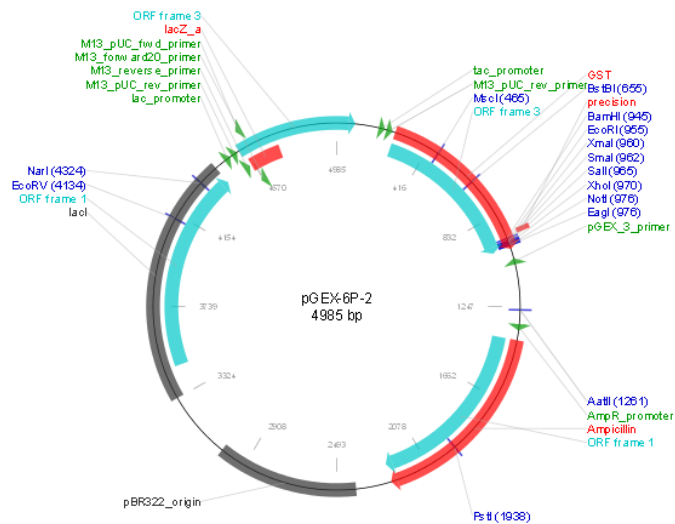


Figura 6. Representación esquemática de pGEX-6P-2.

3.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es una técnica *in vitro* que permite la introducción de mutaciones en puntos específicos conocidos, modificando de esta manera la secuencia aminoacídica. Esto permite estudiar la relación que hay entre la estructura y la función de una proteína y conocer la expresión génica.

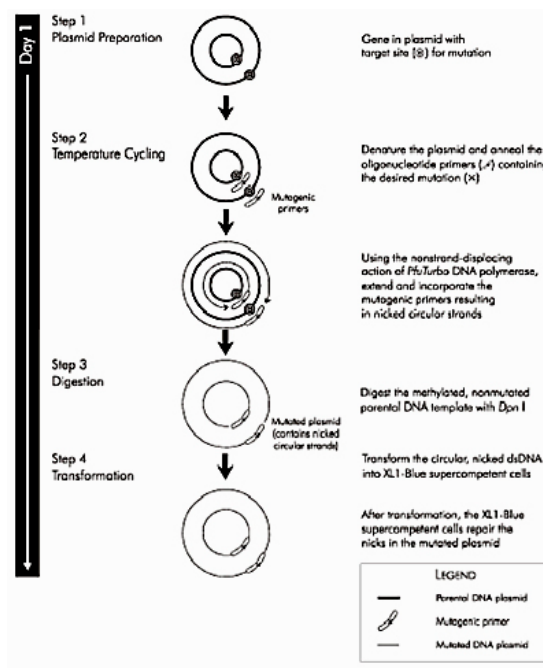


Figura 7. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida.

El proceso de mutagénesis dirigida consta de tres etapas: PCR sobre el plásmido original utilizando cebadores que introducen la mutación deseada, digestión del DNA parental con DpnI y la transformación.

Se realizaron una serie de modificaciones de un único aminoácido en la secuencia de Mip6. Se eligieron tres residuos para realizar la mutación: la isoleucina 427 se cambió por alanina (I427A), la isoleucina 432 se cambió por alanina (I432A) y la leucina 423 por alanina (L423A). A partir de estas modificaciones se realizaron una serie de combinaciones de mutantes, para obtener mutantes con solo una mutación o dobles mutantes. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para generar los mutantes:

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
Mip6 I427A FW	5'- TGTTTACAAGAAAAA GCA AGATTCAGTGAAAT -3'
Mip6 I427A REV	5'- ATTTCACTGAATCTT GCT TTTTCTTGTAACA -3'
Mip6 I427A;I432A DM FW	5'- GCA AGATTCAGTGA AGCT AAGATCACAACTA-3'
Mip6 I427A;I432A DM REV	5'- TAGTTTGTGATCTTAG GCT TTCACTGAATCTT GC -3'
Mip6 I427A;L423A DM FW	5'- ATTTCTCAACTATGT GC ACAAGAAAAA GCA AG-3'
Mip6 I427A;L423A DM REV	5'- CTT GCT TTTTCTTGT GC ACATAGTTGAGAAAT-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis. La secuencia correspondiente al codón mutado está subrayada y en negrita.

La mezcla de reacción que se utilizó para la amplificación de insertos es la correspondiente a la Tabla 1 del Anexo.

El programa de PCR usado fue: 2 minutos a 95°C seguido de 16 ciclos con 20 segundos de desnaturalización a 98°C, 15 segundos de alineamiento a 60°C y 4 minutos de extensión a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Se eliminó el DNA parental para obtener solo el plásmido mutado, mediante una digestión de los productos de PCR con 1,5 µL de la enzima DpnI 20 U/mL (New England Biolabs), incubando la reacción a 37°C durante 1 h. Una vez purificados los productos de PCR mediante el kit *Speedtools PCR Clean-up* de Biotools, se pasó a transformar en células competentes *E. coli* DH5α y posterior extracción de DNA plasmídico como se describe en el apartado 3.4 y 3.5.

Para la generación de los dobles mutantes se siguió el mismo protocolo, empleando el plásmido resultante de la primera mutagénesis, Mip6 I427A, como molde para la segunda PCR de mutagénesis, junto con los oligonucleótidos correspondientes de la Tabla 2.

3.4. TRANSFORMACIÓN EN *ESCHERICHIA COLI*

Las transformaciones se han llevado a cabo en dos cepas diferentes de células competentes *E. coli*: DH5α y BL21 CodonPlus (RIPL) de Stratagene. Las células DH5α proporcionan un incremento de la estabilidad del inserto y mejora la calidad del DNA plasmídico. Las células BL21 CodonPlus (RIPL) para expresar las construcciones obtenidas.

Primero, se añadieron 50 ng de DNA a una alícuota de 60 µL de células competentes. Se mantuvo en hielo durante 30 minutos y se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90

segundos (en el caso de la cepa DH5 α) y 45 segundos (en el caso de las células BL21). A continuación se volvió a dejar en hielo 5 minutos y se añadieron 200 μ l de medio LB (*Luria Broth*) incubándose mínimo 45 minutos a 37°C en el termobloque (Eppendorf®) con agitación a 450 rpm. Las bacterias transformadas se sembraron, en condiciones de esterilidad, en medio sólido preparado con el antibiótico correspondiente para llevar a cabo la selección de la transformación. La placas se incubaron toda la noche a 37°C, y transcurrido este tiempo, se comprobó la presencia o no de colonias.

3.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

El día anterior se prepararon los cultivos, de 3 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente con las colonias que se habían obtenido. Estos cultivos se incubaron durante 18 horas en el incubador a 37°C.

Antes de la extracción del DNA plasmídico, se prepararon los glicerizados de cada muestra a partir de los cultivos. Se añadieron 750 μ l de cultivo y 250 μ l de glicerol al 87% en un tubo estéril con rosca especial para su congelación a -80°C.

Para la extracción del DNA de naturaleza plasmídica de los cultivos bacterianos, se empleó el Kit *QuickGene Plasmid Kit S II* de KURABO INDUSTRIES LTD, siguiendo el protocolo del fabricante.

Al finalizar la extracción se midió la concentración de la muestra en el NanoDrop *ND 1000 Spectrophotometer* utilizando 1 μ l.

Se envió a secuenciar este DNA al servicio de Secuenciación de DNA de Macrogen Inc. (Holanda) y al servicio de secuenciación y análisis de DNA del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), para comprobar que la clonación se había realizado correctamente. El resto de la muestra se almacenó a -20°C.

Una vez recibidas las secuencias se analizaron los datos mediante la página web MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) y ApE v.2.0.36.

Tras el análisis de los resultados de la secuenciación, se utilizaron las construcciones obtenidas para la expresión y purificación de la proteína.

3.6. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN A PEQUEÑA ESCALA

Para comprobar la expresión de la proteína y ver si es soluble se sigue el procedimiento de pequeña escala para la expresión y purificación por afinidad de la proteína. A partir de los resultados obtenidos se podrá expresar y purificar a gran escala o ver la interacción del constructo con otras proteínas.

La técnica consiste en una ruptura celular para extraer las proteínas solubles, unión de las proteínas, lavado del material que no se ha unido y elución de la proteína de interés.

Se cogieron dos colonias transformadas en *E. coli* (DE3) BL21 CodonPlus (RIPL) de cada mutante, una de ellas para ver la expresión en medio LB y otra en medio ZY.

- Se realizó el **test de expresión por IPTG** con: 10 mL LB con los antibióticos correspondientes y una colonia crecida de la placa. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀) entre 0,6 y 0,8. Esta densidad corresponde al crecimiento exponencial de las células *E. coli* y es el momento clave para inducir la sobreexpresión de la proteína. La absorbancia se midió con un densitómetro Ultrospec 10 (Amersham Biosciences®). Una vez tuvimos los cultivos listos la expresión de la proteína de interés fue inducida con 0,8 mM IPTG (CalBiochem®). El cultivo se dejó a 20°C toda la noche. El IPTG es un inductor análogo de la lactosa que induce la transcripción del operón *lac* en bacterias y por lo tanto, induce la expresión de la proteína recombinante de interés.
- **El método por autoinducción** se realizó con: 9,3 mL de ZY (Tryptona, extracto de levadura y agua miliQ) con MgSO₄ (1M), 5052 50X (glicerol, glucosa, α -lactosa y agua miliQ), NPS 20X (sulfato de amonio, fosfato monopotásico, fosfato monosódico y agua miliQ), los antibióticos ampicilina y cloranfenicol, y la colonia de *E. coli*. Se dejó incubar a 37°C hasta que la densidad óptica (OD₆₀₀) fue de 0,8-1. El cultivo permaneció a 20°C toda la noche.

Para ver los niveles de expresión y solubilidad de las proteínas, se realizó un ensayo de purificación a pequeña escala para cada construcción usando la resina de Glutación Sefarosa 4B (GE Healthcare) que permite la purificación de las proteínas de fusión marcadas con GST. La separación se basa en una cromatografía de afinidad que depende de una absorción reversible de las biomoléculas mediante interacciones específicas con el ligando. La proteína de interés es recuperada mediante un tampón de elución que contiene glutatión reducido al 98% y las impurezas y las proteínas inespecíficas que no se unen al ligando son eliminadas gracias a una serie de lavados (Smith y Johnson, 1988).

Se centrifugaron los cultivos incubados a 20°C toda la noche a 4000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 1 mL PBS 1X. Se transfirió a tubos de 1,5 mL y se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm a 4°C, hasta que se formase un precipitado en el fondo del tubo y el medio estuviera transparente.

La preparación de los tampones utilizados se encuentra detallada en la Tabla 2 del Anexo.

1. Una vez centrifugados los cultivos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300 μ L de tampón de lisis. Si no se va a purificar directamente se puede guardar el precipitado a -80°C.
2. Se sonicaron las muestras en el Bioruptor UCD-200 (*Diagenode*) a intensidad media (200W) con ciclos de 30 segundos encendido/30 segundos apagado durante 35 minutos.
3. La muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 13000g a 4°C para separar la fracción soluble de proteína.
4. Se tomó una muestra de 30 μ L de sobrenadante y una muestra de precipitado mezclado con 30 μ L de tampón A.
5. Se añadieron los sobrenadantes sonicados (aproximadamente 300 μ L) a los medios con la resina de Glutación Sefarosa 4B que fueron preparados y lavados previamente.

6. El medio para la resina se obtuvo a partir del siguiente protocolo: en tubos de 1,5 mL se añadió 70 μ L de la resina, después de haberla agitado un poco. Centrifugar a mínima velocidad (3000g) durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante de etanol usando pipeta, con cuidado de no tocar la resina. Añadir 1 mL de agua y centrifugar a baja velocidad durante 2 minutos. Eliminar el agua y añadir 1 mL de tampón A y centrifugar a baja velocidad 2 minutos. Eliminar tampón A y añadir los sobrenadantes.
7. Se incubaron las muestras del sobrenadante con la resina 60 minutos a 4°C en agitación.
8. Posteriormente, se centrifugaron a 3000g 5 minutos a 4°C.
9. Se tomó una muestra de 20 μ L de los sobrenadantes (*Flow Through*, FT).
10. Se lavaron 3 veces con 1 mL del tampón A.
11. Se cogió una muestra de 20 μ L del último lavado (W) y se eliminó todo el tampón con la pipeta.
12. Se analizaron las muestras extraídas en un gel SDS-PAGE.

3.7. SDS-PAGE

Las alícuotas de las proteínas obtenidas se analizaron en un gel SDS-PAGE. Se añadió 10 μ L de tampón de carga 6X (0,3 M Tris pH 6,8, 26,1% glicerol, 2% SDS, 7mg Azul de bromofenol, 675 μ L β -mercaptoetanol, 30% agua destilada) a cada muestra, se calentaron a 95°C durante 10 minutos en el termobloque (Eppendorf®) para desnaturalizar la proteína y se centrifugaron 10 segundos. Se usaron 10 μ L en cada pocillo de la proteína purificada, 4 μ L de las muestras control recogidas (sobrenadante, precipitado, parte de la proteína no adherida y último lavado) y 3 μ L del marcador de peso molecular de proteína BluStar Prestained Protein Marker de Genetics. Se realizó la electroforesis a 200 Voltios durante 20 minutos en tampón de electroforesis NuPAGE MOPS SDS 1x (Life Technologies). Se dejó teñir con el colorante azul de Coomassie (1g Azul de Coomassie, 40% metanol, 10% ácido acético, 50% agua destilada) durante 10 minutos y se destiñó con la solución de destinción (10% Metanol, 10% Ácido acético glacial, 80% Agua destilada) hasta que se distinguió el patrón de bandas.

3.8. COEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El protocolo que se siguió fue el mismo utilizado en los apartados 3.6 para expresar y purificar las proteínas Mip6 con los dobles mutantes (Mip6 I427A;L423A y Mip6 I427A;I432A). La única diferencia fue la adición de la proteína Mex67 purificada (sin GST) una vez obtenidos los sobrenadantes sonicados con la resina de glutatión sefarosa. Se añadieron 20 μ L de la proteína purificada Mex67 en cada muestra. Esta proteína estaba a una concentración de 14,4 ng/ μ L, con un peso molecular de 8,69 kDa y un coeficiente molar de extinción de 8480. Las muestras se dejaron en agitación a 4°C durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con tampón A para eliminar la fracción de la proteína no unida. Finalmente, la proteína unida a la resina fue eluida y se corrió un gel SDS-PAGE con todas las alícuotas obtenidas a partir del protocolo del apartado 3.7.

Se debe tener en cuenta que la proteína de interés que se une a la proteína con la etiqueta GST, no debe contener el mismo tag. Pues en ese caso, se pegaría también a la resina y no veríamos la coexpresión.

3.9. CLONAJE

Se llevó a cabo el sistema de clonaje LIC (*Ligation Independent Cloning*) para obtener las proteínas Mex67 y Dbp5. Es una técnica de clonación que no requiere el uso de enzimas de restricción, T4 DNA ligasa ni fosfatasa alcalina, sino que utiliza la actividad exonucleasa 3'→5' de corrección de errores de la T4 DNA Polimerasa para crear extremos cohesivos con complementariedad entre el vector y el inserto permitiendo la ligación. Es una técnica barata y se pueden utilizar diferentes vectores.

3.9.1. PREPARACIÓN DEL VECTOR PNKI

El plásmido que se ha utilizado en este proyecto fue el pET28-NKI/LIC 6His/3C, obtenido del grupo de investigación del Dr. A. Perrakis (NKI, Amsterdam). El marcador es de resistencia a la kanamicina y posee un promotor T7 y terminador T7. Tiene un tamaño de 5347 pares de bases y posee en su extremo C-terminal la etiqueta His₆, secuencia específica de DNA de seis histidinas. Las proteínas con esta etiqueta podrán ser purificadas gracias a la afinidad de esta cola de residuos a iones metálicos como níquel. Contiene dos sitios de restricción KpnI y las secuencias LIC que se utilizan para crear los extremos sobresalientes para la reacción de ligación.

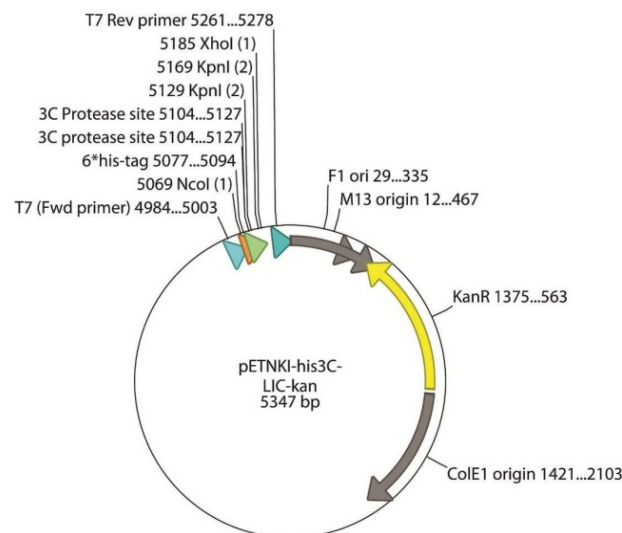


Figura 8. Vector pETNKI-His-3C-LIC-kan.

Para la digestión del plásmido se utilizaron 20 µl del plásmido pNKI a 105 ng/µl. Se añadieron 3 µl del tampón NEB 1 10X (New England Biolabs®), 3 µl de la enzima KpnI 10 U/mL (New England Biolabs®) y 4 µl de H₂O MiliQ. Se resuspendió adecuadamente y se incubó durante 2 h a 37°C.

Tras la digestión del plásmido, se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris, EDTA y ácido acético glacial). Como tinción de ácidos nucleicos se empleó la solución *RedSafe* (Ecogen).

Se cargaron 5 µl de muestra y 2 µl de tampón de carga 6X. En el primer pocillo se añadió 4 µl de marcador de pesos moleculares 1Kb DNA Ladder RTU de Genetics. Una vez cargadas todas las muestras, se llevó a cabo la electroforesis a 100 V durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se pudo visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta ULTima 16si Plus de Isogen Life Science y se registró con una videocámara acoplada.

Finalmente, se purificó el plásmido pNKI digerido siguiendo el protocolo de purificación del kit *Speedtools PCR Clean-up* de Biotools.

3.9.2. DISEÑO DE CEBADORES

Para poder amplificar el inserto, el primer paso a seguir es el diseño de los cebadores específicos. Es importante evitar la auto-hibridación o la hibridación cruzada de los extremos 3' de los cebadores, así como tener temperaturas de anillamiento similares. Otros parámetros como la longitud y el contenido en GC son menos importantes pero también se deben tener en cuenta.

El diseño de cebadores se realizó a partir de la página Crystallisation Construct Designer (<https://xtal.nki.nl/ccd/>).

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
Mex67 <i>Chm</i> FW	5'- cagggaccggtATGGCGCCCCAACTGGACCTCGTCGTGGT -3'
Mex67 <i>Chm</i> REV	5'- cgaggagaagcccgggtaCACCTGAGGTTGGCTAATGAACGCCTCAGG -3'
Dbp5 <i>Chm</i> FW	5'- cagggaccggtATGCGAAGAAGTCGTCGTCCAACGATACGG -3'
Dbp5 <i>Chm</i> REV	5'- cgaggagaagcccgggta CTAGCACGTAGCTTCGCTGGCGGGCTTATA -3'
Dbp5 <i>S.c</i> FW	5' cagggaccggtATGAGTGATACAAAGAGAGATCCGGCCGATTTACTAGC -3'
Dbp5 <i>S.c</i> REV	5'- cgaggagaagcccgggtaATCCTTAACTTTCTTAACTATTTTTTC -3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para preparar los constructos en este trabajo. La secuencia de los extremos sobresalientes compatibles con el vector se muestran en minúscula.

3.9.3. AMPLIFICACIÓN DE LOS INSERTOS POR PCR

Se realizó una PCR con los cebadores directo y reverso diseñados. Se utilizaron los cebadores con o sin extremos sobresalientes, ya que se ha comprobado que al ser una proteína bastante grande la primera amplificación con los cebadores con extremos sobresalientes no siempre funciona correctamente. Por lo tanto, se realizó una primera PCR con los cebadores sin los extremos sobresalientes y posteriormente se realizó una segunda PCR con la muestra obtenida de la primera PCR como molde de DNA pero con los cebadores con los extremos diseñados.

La mezcla de reacción de PCR tenía un volumen final de 25 µL y fue preparada utilizando la tabla 1 del ANEXO. Se utilizó en cada caso como molde de DNA el cDNA de *Chaetomium thermophilum* o DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que la proteína Mex67 y Dbp5

en *Chaetomium thermophilum* contenía intrones, y en cambio la proteína Dbp5 en *Saccharomyces cerevisiae* carece de ellos.

El programa de PCR a seguir fue el siguiente: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos con 20 segundos de desnaturalización a 98°C, 15 segundos de alineamiento a 65°C y 3 minutos de extensión a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Se observó en un gel de agarosa al 1% si el inserto se había amplificado correctamente. Un dato importante para clonar una proteína es saber la cantidad de pares de bases que tiene, para saber cuál es su peso molecular. De esta forma se puede comprobar que el resultado de la amplificación del inserto mediante PCR coincide con el tamaño del inserto de la proteína en cuestión.

A partir de la búsqueda en Uniprot (<http://www.uniprot.org>) y el alineamiento de secuencias BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de las proteínas en cuestión, se comprobó el tamaño de las proteínas:

- La proteína Mex67 en *Chaetomium thermophilum* está compuesta por 657 aminoácidos, es decir, 1974 pares de bases, con un peso de 71514 Da.
- La proteína Dbp5 en *Chaetomium thermophilum* está compuesta por 580 aminoácidos, es decir, 1743 bp, con un peso de 64552 Da.
- La proteína Dbp5 en *Saccharomyces cerevisiae* está compuesta por 482 aminoácidos, es decir, 1449 bp, con un peso de 53874 Da.

Se purificaron los fragmentos de PCR mediante el kit *Speedtools PCR Clean-up* de Biotoools. Después de purificar se midió la absorbancia y concentración de las muestras en el NanoDrop (Thermo Scientific).

3.9.4. TRATAMIENTO CON T4 DNA POLIMERASA

Una vez se obtuvo el vector linealizado y los insertos amplificados, se realizó el tratamiento con la enzima T4 DNA Polimerasa en 20 µL de la mezcla de reacción que contenía:

VECTOR	
DNA (0,1 pmol)	15,3 µl
T4 DNA Pol tampón 5X	4 µl
dTTP 100mM	0,5 µl
T4 DNA polimerasa (5U/µl)	0,2 µl

INSERT	
DNA (0,1 pmol)	15,3 µl
T4 DNA Pol tampón 5X	4 µl
dATP 100mM	0,5 µl
T4 DNA polimerasa (5U/µl)	0,2 µl

Ambas muestras se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y luego 10 minutos a 70°C.

3.9.5. COMBINACIÓN DEL VECTOR E INSERTOS TRATADOS: REACCIÓN DE ANILLAMIENTO

Para que la reacción funcione correctamente, es necesario calcular la concentración de vector abierto y de inserto, ya que la reacción de ligación se debe hacer en unas proporciones moleculares que permitan optimizar el rendimiento de la reacción. En este caso, es necesario tener el doble de inserto que de plásmido.

Por lo tanto, se mezcló 2 μL de plásmido pNKI tratado (27,081 ng) con 2 μL de inserto (44,217 ng) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió a la mezcla 2 μL de EDTA 50 mM y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

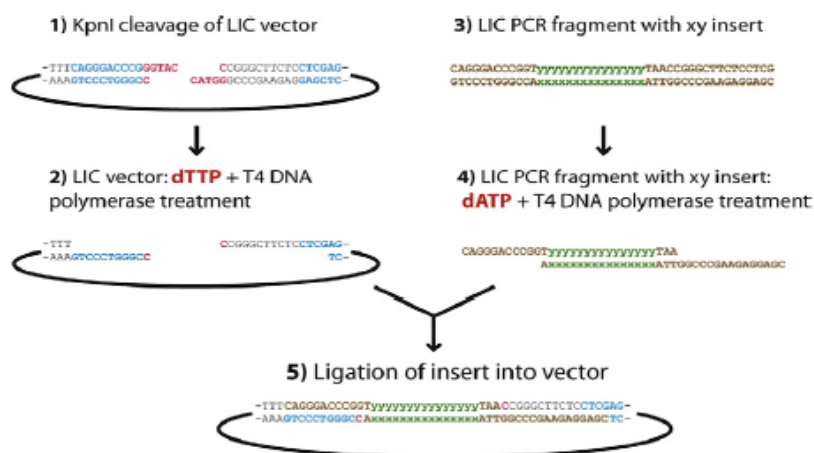


Figura 9. Reacción de anillamiento.

Se transformó toda la muestra (6 μL) en células competentes de *E. coli* DH5 α (Stratagene[®]) como en el protocolo de transformación 3.4 y a continuación se sembró en placas de agar con kanamicina (50 mg/mL).

3.9.6. PCR COLONIA

Se examinaron las placas de células transformadas con la reacción de ligación para ver si habían crecido colonias de *E. coli*. Cabe la posibilidad de que, en alguna de las colonias, el plásmido no contenga el inserto de interés y sean colonias negativas. Para comprobar que las colonias tienen el plásmido recombinante, se realizó una amplificación mediante PCR a partir de colonias que habían crecido en la placa donde se transformó la ligación.

Se preparó la mezcla para la PCR en el orden indicado y en hielo: 14,1 μL H₂O MiliQ, 2 μL tampón B 10x, 2 μL MgCl₂ 25 mM, 0,5 μL dNTPs 10 mM, 0,6 μL cebador FW 10 μM T7 promotor, 0,6 μL cebador REV μM T7 terminador y 0,2 μL DNA Polimerasa *Firepol*. Se añadió la mezcla de 20 μL en cada tubo y con una colonia de la placa. Una vez utilizado el palillo para picar la colonia, se humedeció en la mezcla de PCR y se plaqueó en una sección de una nueva placa de agar con kanamicina. Esta última placa se dejó toda la noche en la estufa a 37°C para realizar al día siguiente cultivos de las colonias positivas.

Cebador T7 Promotor Forward: TAATACGACTCACTATAGGG

Cebador T7 Terminador Reverse: GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Tabla 4. Secuencias de los cebadores T7 promotor y T7 terminador.

Las condiciones del programa utilizado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos con 20 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de alineamiento a 55°C y 2 minutos y medio de extensión a 72°C. A continuación se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C y mantener a 4°C.

Para el análisis por electroforesis, se realiza un gel de agarosa al 1% para visualizar las bandas del DNA amplificado, el marcador y un control positivo de la colonia UTS-108.

3.10. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN CON LA RESINA DE NÍQUEL (NI-NTA)

Una vez comprobadas las secuencias se procedió con la expresión y purificación a pequeña escala de la proteína Mex67 de *Chaetomium thermophilum*. Se siguió el protocolo de Transformación en *E. coli* con células competentes BL21 CodonPlus (RIPL) (Stratagene®). Al día siguiente se prepararon los cultivos para el protocolo de inducción con IPTG y para la autoinducción.

Se purificó a pequeña escala con la resina de Níquel (Ni-NTA) y se eluyó con el tampón con imidazol. La preparación de los tampones utilizados se encuentra detallada en la Tabla 2 del Anexo. El protocolo que se realizó fue:

1. Se centrifugaron los cultivos incubados a 20°C toda la noche a 4000g durante 15 minutos.
2. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 1 mL PBS 1X. Se transfirió a tubos de 1,5 mL.
3. Se centrifugaron las muestras 15 minutos a 4000g a 4°C.
4. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300 µL de tampón de lisis.
5. Se añadieron perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro para realizar una lisis mecánica homogeneizando con el aparato *Precllys* durante 10 minutos (programa 30 minutos ON/30 minutos OFF x10 ciclos)
6. Se centrifugó 20 minutos a 4°C a 11000g. Se guardó precipitado en un tubo con 20 µL de tampón A y 20 µL del sobrenadante. El resto de sobrenadante se purificó con la resina de níquel.
7. Mientras se centrifugaron las muestras se equilibró 50 µL de Níquel-Agarosa. Primero se añadió 1 mL de H₂O estéril y se centrifugó 1 minutos a 6000g. Se retiró el sobrenadante y se equilibró con 1 mL de Tampón A.
8. Se añadieron los 300 µL de sobrenadante a la resina.
9. Se dejó incubar 20 minutos en un agitador a 4°C y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad a 4°C. Posteriormente se recogieron 20 µL de la fracción no unida (FT).

10. Se hicieron 3 lavados de 1 mL cada uno de Tampón A. En el último lavado se recogieron 20 μ L del sobrenadante.
11. Se añadieron 50 μ L de tampón de elución con imidazol a 50 mM.
12. Se analizaron las muestras extraídas en un gel SDS-PAGE según se indica en el protocolo del apartado 3.7.

3.11. WESTERN BLOT

El análisis de Western Blot consiste en la inmunodetección de proteínas separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Los geles de poliacrilamida-SDS para proteínas se realizaron según el protocolo del apartado 3.7. La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 200 Voltios. Las proteínas se transfirieron mediante el sistema de transferencia semiseco, con un aparato *Trans blot SD semi-dry transfer cell* de BioRad, a membranas de nitrocelulosa (*Hybond ECL* de Amersham Biosciences) durante 45 minutos a 15 Voltios constantes. Se comprobó la eficiencia de la transferencia de proteínas por tinción reversible con rojo-Ponceau (0,5% rojo-ponceau, 1% ácido acético glacial).

Se realizó un bloqueo de la membrana para evitar las uniones inespecíficas entre el anticuerpo y las proteínas retenidas en ella. Por ello, se utilizó la solución de bloqueo rica en proteínas (PBS, 0,1% Tween 20, 5 % leche desnatada en polvo) durante 1 hora con agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo Anti-His₆-Peroxidasa de Roche Diagnostics disuelto en la solución de bloqueo (1:500) durante 1 hora. Y posteriormente, se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS y 0,1% Tween 20.

La detección de la señal se hizo por quimioluminiscencia, utilizando 1 mL de la solución de Pierce® ECL Western Blotting (Thermo scientific). Se mezclaron los dos substratos, el reactivo de peróxido estable y el reactivo de luminol, a volúmenes iguales. Finalmente, la imagen fue adquirida mediante el aparato *LAS-3000* de Fujifilm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MUTAGÉNESIS MIP6

A partir de la mutagénesis realizada se obtuvieron una serie de mutantes con las modificaciones del aminoácido en la secuencia. Se digirió el DNA parental para obtener solo el plásmido mutado y proceder a la sobreexpresión y purificación de la proteína.

Se puede observar que la banda coincide con 5,500 pares de bases aproximadamente.

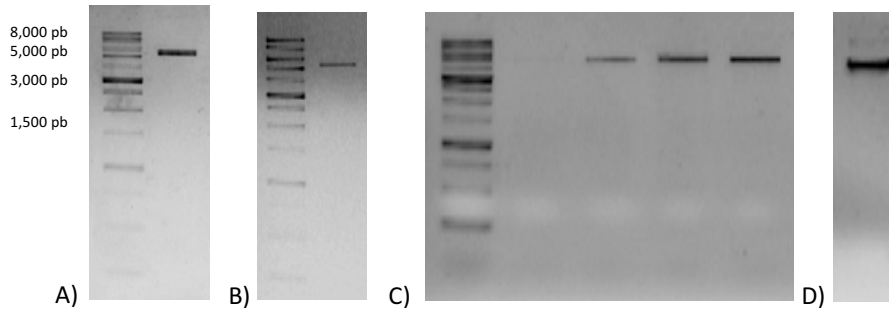


Figura 10. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) de la mutagénesis. A) Mip6 I432A, B) Mip6 I427A, C) Mip6 I427A;L423A, D) Mip6 I427A;I432A

El objetivo de la generación de estos mutantes es validar la presencia de la secuencia de exportación nuclear y la asociación de la proteína Mip6 con Mex67 que está implicada en la exportación nuclear del mRNA.

4.2. SECUENCIACIÓN MUTANTES

Primero se enviaron a secuenciar los mutantes de Mip6 de ambas regiones (RRM3/4 y RRM4) con una sola mutación: Mip6 I427A, Mip6 I432A y Mip6 L423A. Una vez comprobadas las secuencias mediante MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) se procedió a obtener los dobles mutantes: Mip6 I427A;I432A y Mip6 I427A;L423A.

Aquí se muestra el alineamiento obtenido de las secuencias de los dobles mutantes.

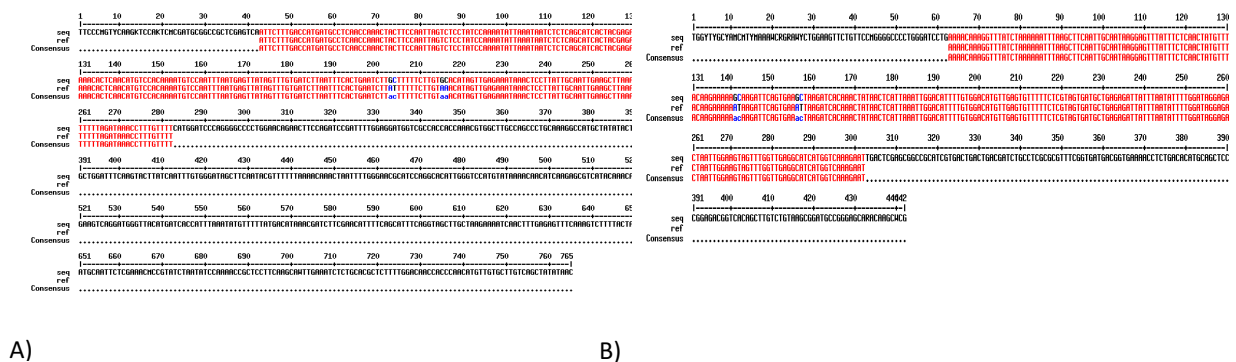


Figura 11. Secuenciación de la proteína Mip6 con los dobles mutantes de la región RRM4.

A) I427A;L423A y B) I427A;I432A

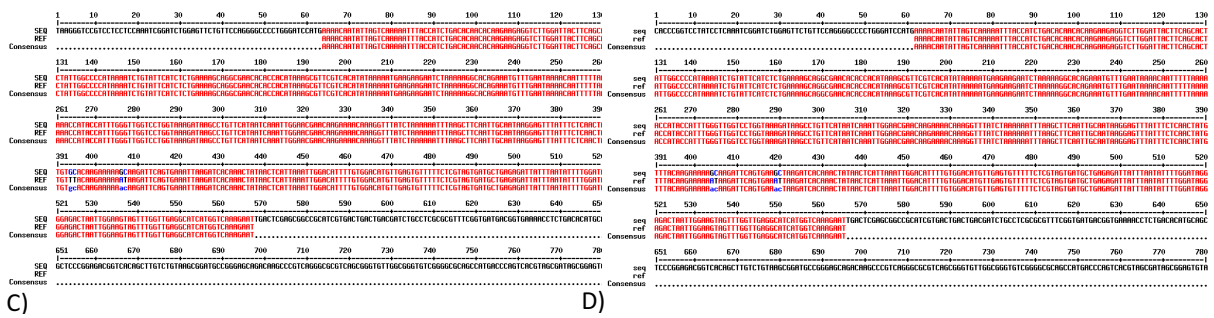


Figura 12. Secuenciación de la proteína Mip6 con los dobles mutantes de la región RRM3/4. C) I427A;L423A y D) I427A;I432A.

En rojo se muestra arriba del todo nuestra secuencia y al medio la secuencia de referencia, que son las secuencias de las regiones RRM3/4 y RRM4 del mRNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Aparecen en azul las bases que no son complementarias, que en este caso coinciden con las mutaciones realizadas.

4.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN A PEQUEÑA ESCALA

Se obtuvo como resultado de la purificación diversos geles con cada mutante y doble mutante de Mip6. En el gel de acrilamida de 10% se observó el sobrenadante (S), precipitado (P), los extractos celulares no unidos a la resina (*flow through*, FT), una muestra del último lavado con las uniones no específicas (W), y la proteína purificada (E). Las construcciones de Mip6 fueron sobreexpresadas en el vector pGEX-6P-2 que contiene el tag GST.

Las siguientes figuras muestran la elución de los diferentes mutantes de Mip6.

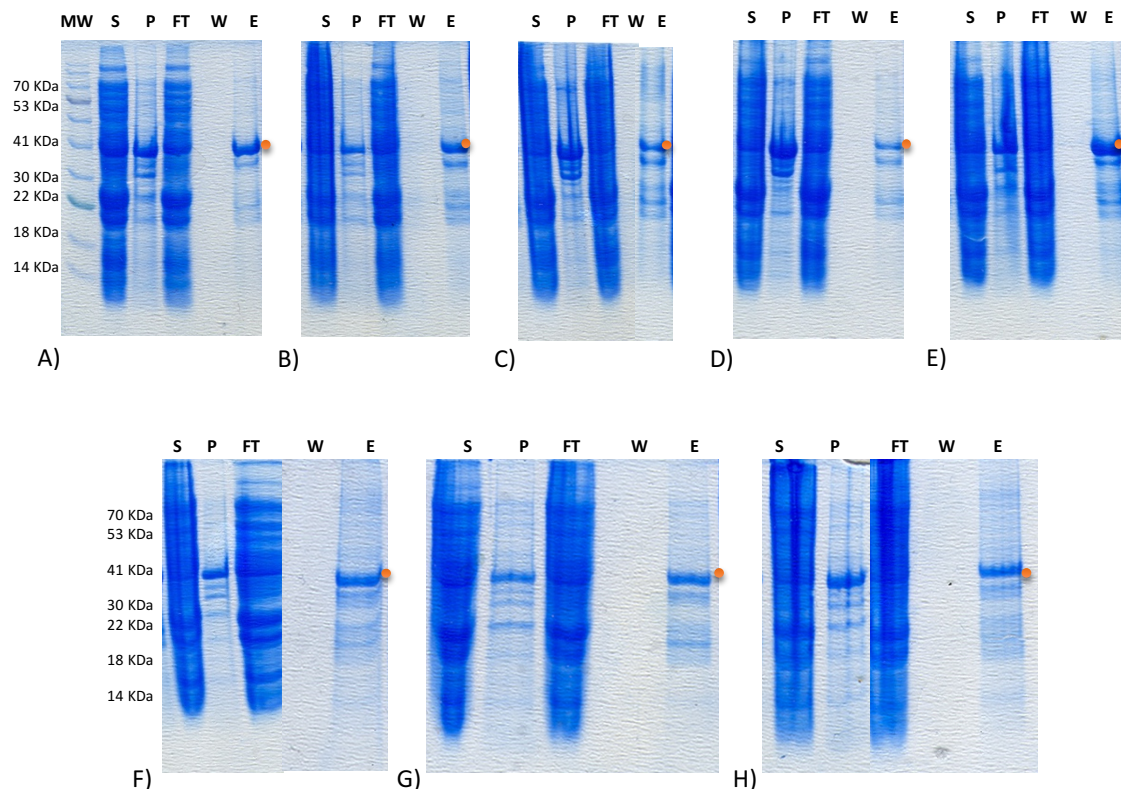


Figura 13. Gel de electroforesis SDS-PAGE (10% acrilamida) de la purificación a pequeña escala con la resina de glutatión sefarosa de los 4 mutantes de Mip6 en pGEX de la región RRM3/4. La proteína eluida (E), señalada con un punto naranja, en cada gel corresponde a: A) Mip6 I432A sobreexpresada por IPTG; B) Mip6 I427A sobreexpresada por IPTG; C) Mip6 I427;L423A sobreexpresada por IPTG; D) Mip6 I427;I432A sobreexpresada por IPTG; E) Mip6 I432A sobreexpresada por autoinducción; F) Mip6 I427A sobreexpresada por autoinducción; G) Mip6 I427;L423A sobreexpresada por autoinducción; H) Mip6 I427A;I432A sobreexpresada por autoinducción.

La proteína Mip6 RRM3/4 mutada tiene un peso molecular de 19,38 KDa que junto al GST (26 KDa) aparece como una banda de 45 KDa.

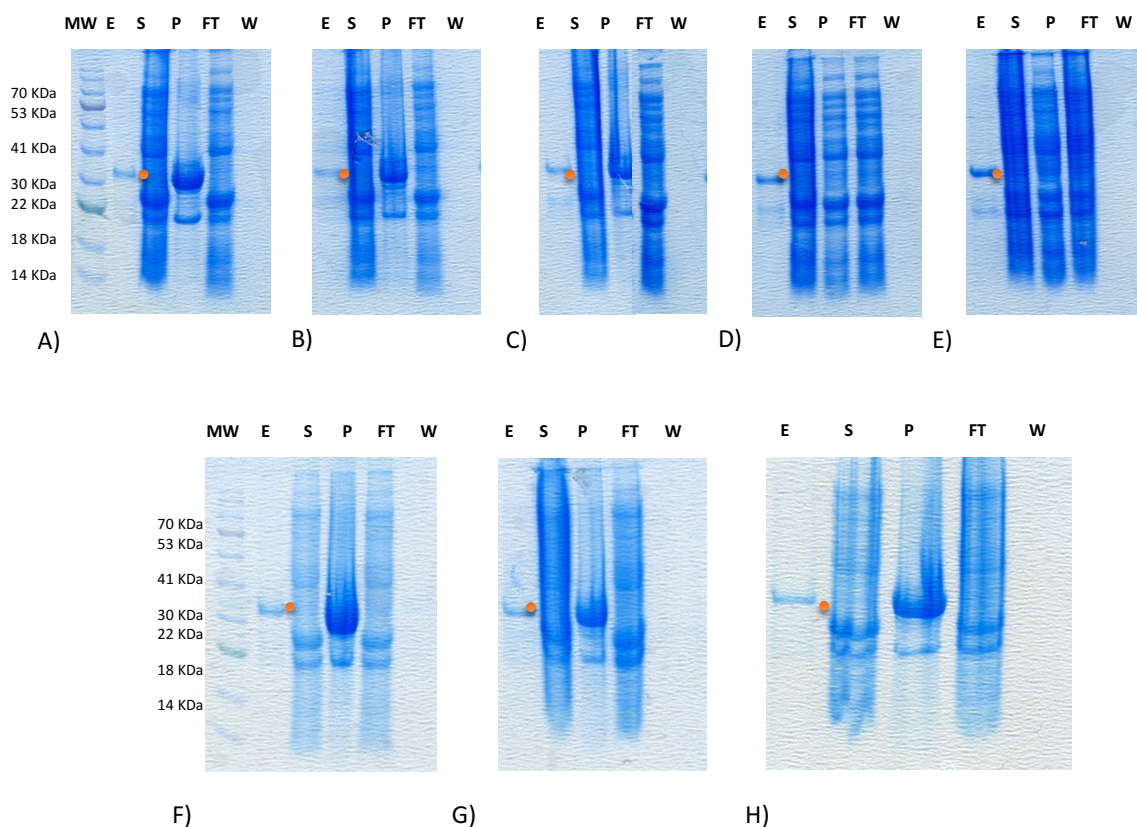


Figura 14. Gel de electroforesis SDS-PAGE (10% acrilamida) de la purificación a pequeña escala con la resina de glutatión sefarosa, de las 4 construcciones de Mip6 de la región RRM4. La proteína eluida (E), señalada con un punto naranja, en cada gel corresponde a: A) Mip6 I432A sobreexpresada por IPTG; B) Mip6 I427A sobreexpresada por IPTG; C) Mip6 I427;L423A sobreexpresada por IPTG; D) Mip6 I427;I432A sobreexpresada por IPTG; E) Mip6 I427A sobreexpresada por autoinducción; F) Mip6 I432A sobreexpresada por autoinducción; G) Mip6 I427 sobreexpresada por autoinducción; H) Mip6 I427A;I432A sobreexpresada por autoinducción.

La proteína Mip6 RRM4 tiene un peso molecular de 9,42 KDa que junto al GST (26 KDa) aparece como una banda de 35,42 KDa.

Mediante la expresión a pequeña escala se puede saber cuál es el mejor método de purificación. Una banda con mayor intensidad en la fracción eluida (E) indica que la proteína se expresa bien con ese método. Se ha podido observar que dependiendo de la muestra el mejor método de expresión varía, pero en general se puede afirmar que el método por autoinducción da mejores resultados para la purificación de la proteína Mip6.

En la fracción de proteína eluida se observar la parte soluble de la proteína que se ha unido completamente a la resina. Mientras que en el precipitado se ve la fracción insoluble de la proteína. Esta diferencia clara de bandas se puede observar mejor en los constructos de las mutaciones de Mip6 RRM4.

4.4. INTERACCIÓN PROTEÍNA MIP6 Y MEX67

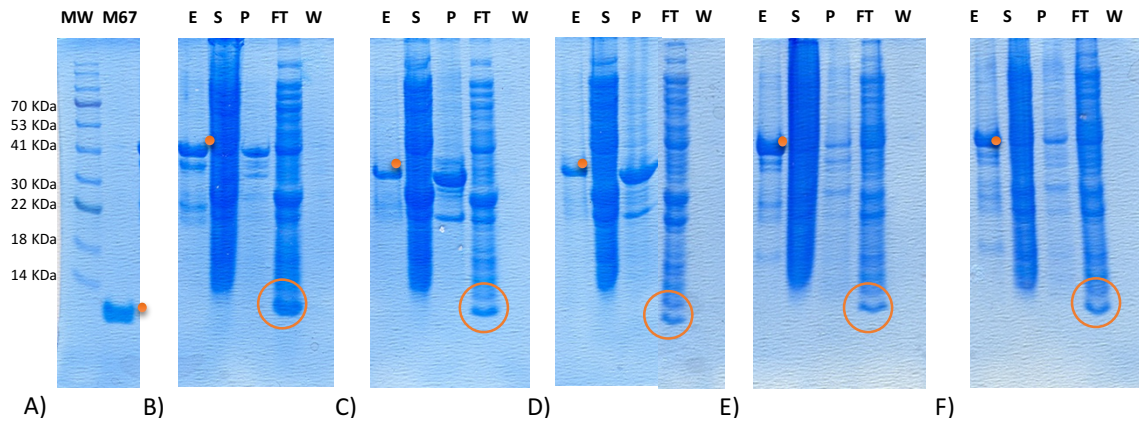


Figura 15. Gel de electroforesis SDS-PAGE (10% acrilamida) de la purificación e interacción con Mex67 a pequeña escala con la resina de glutatión sefarosa, de las 4 construcciones de dobles mutantes de Mip6 de las regiones RRM3/4 y RRM4. A) Proteína Mex67 sin GST purificada; B) Elución proteína Mip6 I427A;L423A RRM3/4 por IPTG; C) Mip6 I427A;L423A RRM4 por IPTG; D) Mip6 I427A;I432A RRM4 por IPTG; E) Mip6 I427A;L423A RRM3/4 por autoinducción; F) Mip6 I427A;I432A RRM3/4 por autoinducción.

Se seleccionó el método de expresión de los dobles mutantes de Mip6 con el cuál se obtuvo más rendimiento en la purificación para ver la interacción con la proteína Mex67. Para este experimento se usó la expresión del doble mutante Mip6 I427A;L423A RRM3/4 por IPTG, Mip6 I427A;L423A RRM4 por IPTG, Mip6 I427A;I432A RRM4 por IPTG, Mip6 I427A;L423A RRM3/4 por autoinducción y Mip6 I427A;I432A RRM3/4 por autoinducción.

Se utilizó una muestra de la región de aminoácidos 528-599 de la proteína Mex67 purificada a gran escala con una columna de glutatión sefarosa de GE Healthcare Life Sciences. Esta proteína fue clonada por Nada Mohamad con el plásmido pGEX-6P-2, por lo tanto contiene en el N-terminal la etiqueta GST. Se eluyó la proteína y se eliminó la etiqueta GST con la proteasa PreScission de GE Healthcare. Se añadió 20 μL de Mex67 a 14,4 $\text{ng}/\mu\text{L}$ con un peso molecular de 8,69 KDa a cada tubo con la resina de glutatión sefarosa y la proteína Mip6.

Los resultados obtenidos muestran como los mutantes distorsionan la interacción con la proteína Mex67, ya que se puede observar que cuando eluimos no se ve la banda de la proteína Mex67. En la fracción *flow through* se puede observar la banda de Mex67, por debajo del marcador de 14 KDa, lo que confirma que no hay interacción, ya que esta fracción contiene todos los extractos celulares que no se han unido a la resina. Estos resultados se contraponen a las investigaciones realizadas anteriormente que afirman que hay una interacción entre Mex67 y Mip6 en estas subunidades (Segref *et al.*, 1997).

4.5. CLONAJE

4.5.1. CLONACIÓN MEX67 DE *CHAETOMIUM THERMOPHILUM*

Para la clonación de la proteína Mex67 de *Chaetomium thermophilum* fue necesario la digestión del plásmido pNKI y la obtención de los insertos por amplificación.

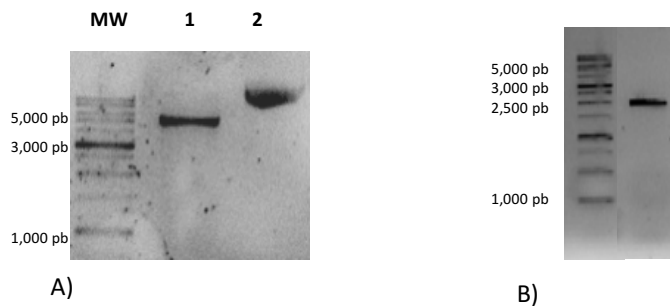


Figura 16. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) clonación Mex67 *Chaetomium thermophilum*. A) vector pNKI digerido (1) y sin digerir (2); B) amplificación del inserto obtenido de Mex67.

A partir de las colonias crecidas se realizó una PCR para comprobar si se había insertado correctamente el inserto en el plásmido.

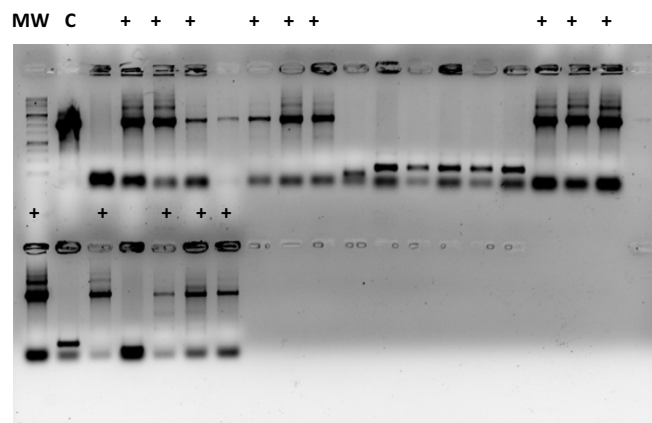


Figura 17. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) de la PCR colonia de la proteína Mex67. Se muestra con una C la colonia control utilizada y las colonias con una + son las colonias positivas obtenidas.

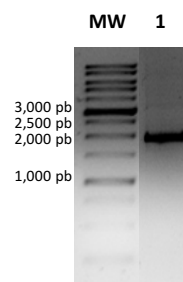


Figura 18. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) de la PCR del DNA plasmídico de la proteína Mex67 clonada.

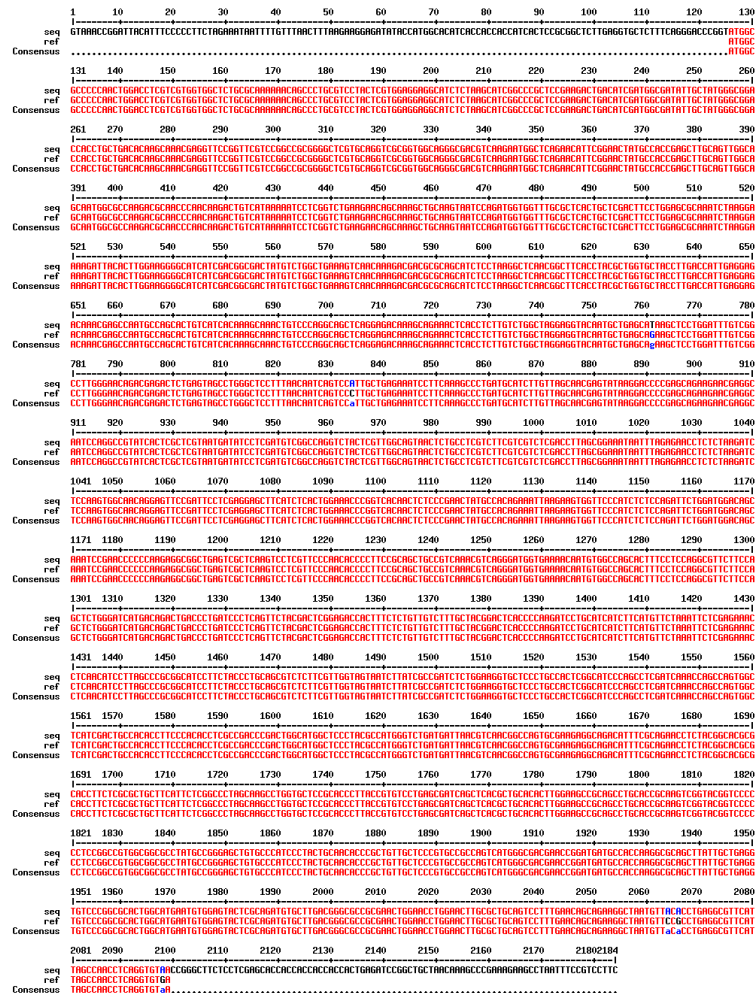


Figura 19. Secuenciación de la clonación de la proteína Mex67. Se muestra la secuencia de la proteína Mex67 clonada como seq y en la línea inferior el cDNA de referencia (ref) obtenido de la base de datos. En rojo aparece el alineamiento correcto de los nucleótidos y en azul la modificación. También se observa los oligonucleótidos sobresalientes del LIC cloning.

La proteína Mex67 en *Chaetomium thermophilum* contiene un intrón de 56 nucleótidos, por lo tanto se escogió la colonia con el empalme alternativo, es decir, sin el intrón. Se comprobó la secuenciación y se pudo observar que la clonación era correcta. Las modificaciones en azul que aparecen en la figura 19 fueron identificadas mediante el análisis del cromatograma obtenido como fallo en la secuenciación o mutaciones silenciosas que no modifican el aminoácido.

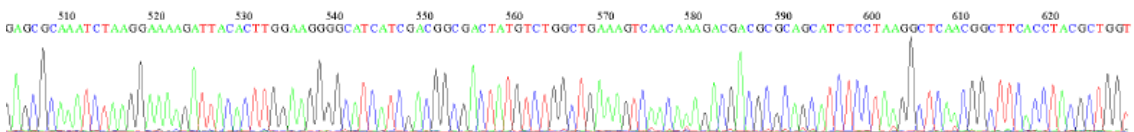


Figura 20. Cromatograma de la secuenciación del DNA de Mex67 de *Chaetomium thermophilum* con el T7 promotor.

4.5.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE MEX67 DE *CHAETOMIUM THERMOPHILUM*

A partir de la purificación a pequeña escala se pudo comprobar que el método por autoinducción da mejores resultados de expresión de la proteína que el de inducción por IPTG. En el gel de electroforesis se pudo observar una banda en la muestra de elución (E) a 70 KDa aproximadamente que corresponde con el tamaño de la proteína Mex67 de 71,514 KDa. A parte de esta banda también se observan otras bandas que corresponden a proteínas que también se han pegado a la resina de níquel porque contienen histidinas. Por ello, para distinguir la proteína Mex67 clonada que contiene el tag-His, se procedió a un análisis Western Blot.

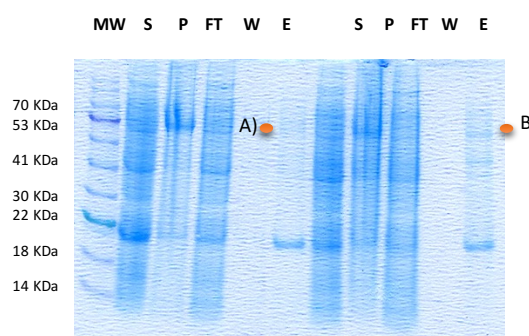


Figura 21. Gel de electroforesis SDS-PAGE (10% acrilamida) de la purificación a pequeña escala con la resina de Níquel de la proteína Mex67. La proteína eluida (E), señalada con un punto naranja, corresponde a: A) Mex67 sobreexpresada por IPTG; B) Mex67 sobreexpresada por autoinducción.

Otro ensayo que podría realizarse sería una coexpresión y purificación de la proteína Mex67 con Mtr2 que contiene la etiqueta His₆ para ver la formación del heterodímero y determinar cuál es el dominio al cual se asocia Mtr2 (Sträßer *et al.*, 2000).

En el año 2015, Dimitrova *et al.* publicaron un artículo en el que caracterizaban estructuralmente el complejo TREX-2 de *Chaetomium thermophilum* y estudiaron su interacción con el factor de exportación nuclear Mex67:Mtr2. Se obtuvieron los mismos resultados en la purificación de Mex67 y además mediante la combinación de métodos estructurales, bioquímicos y celulares se observó la interacción de TREX-2 con componentes que intervienen en la exportación nuclear.

4.5.3. WESTERN BLOT DE MEX67 DE *CHAETOMIUM THERMOPHILUM*

Para comprobar la identidad de la proteína obtenida se hizo un Western Blot después del proceso de purificación. Se utilizó un anticuerpo monoclonal Anti-His₆ conjugado con peroxidasa confirmándose la presencia de la proteína recombinante al detectar el epitopo de 6 residuos de histidina consecutivos. Este anticuerpo permite una alta sensibilidad en el proceso, reduce el tiempo de ensayo porque no es necesario un anticuerpo secundario y se obtienen resultados claros.

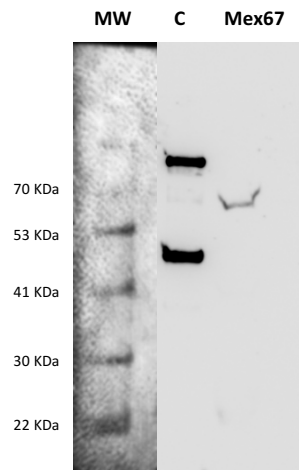


Figura 22. Western Blot revelado con el anticuerpo Anti-His6-Peroxidasa. En la figura se observa el marcador de pesos moleculares de proteínas (MW), el control utilizado (C) que corresponde a tres proteínas con colas de histidina (Erb1 de 90,721 KDa, Nop7 de 69,9 KDa y Ytm1 de 51,358 KDa) y Mex67 purificada.

Los próximos análisis conllevarán una sobreexpresión por autoinducción y la purificación a gran escala de la proteína Mex67 de *Chaetomium thermophilum*.

4.5.4. CLONACIÓN DBP5 DE *CHAETOMIUM THERMOPHILUM*

Se realizó una búsqueda mediante el programa informático BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para ver el alineamiento de la secuencia de la proteína Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae* y la proteína Dbp5 de *Chaetomium thermophilum*. Se encontró que la secuencia proteica de Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae* tenía un *query coverage* (porcentaje de la secuencia de interés que se superpone con la secuencia encontrada) del 86% y un porcentaje de identidad del 56% con la secuencia de la RNA helicasa dependiente de ATP de *Chaetomium thermophilum* var. *Thermophilum* DSM 1495.

En la figura 23 se muestra el alineamiento encontrado a partir de la búsqueda realizada.

ATP-dependent RNA helicase-like protein [Chaetomium thermophilum var. thermophilum DSM 1495]
 Sequence ID: XP_006695581.1 Length: 580 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)
 range 1: 143 to 564

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
493 bits(1269)	2e-171()	Compositional matrix adjust.	238/424(56%)	326/424(76%)	7/424(1%)	
Features:						
Query	63	DSNLISSEYEVKVKLADIQADPNSPLYSA-KSFDELGLAPELLKGIYAMKFQKPSKIQER				121
Sbjct	143	NTGLVDSTYDVEVKLSDLQ-DTDNPLSSKISSFEELGLRKELNEGLLAMNFKKPSKIQER				201
Query	122	ALPLLLHNPPRNMIASQSGTGKTAAFSLTMLTRVN-PEDASQAICLAPSRELARQTLE				180
Sbjct	202	ALPLMLANPPRNMIASQSGTGKTAAFVLTVLSRVDFTKPTQPQALLLAPSRELARQIQT				261
Query	181	VVQEMGKFTK-ITSQLIVPDSFEKNKQINAQVIVGTPGTVLDLMRRKLMQLQKIKIFVLD				239
Sbjct	262	VIQQIGQFIKDLVTEAAIPGNVSRETGVRASVVTGTPGTVTDLIRQRKFDVSQKLVLD				321
Query	240	EADNMLDQQLGDQCIRVKRFLPKDTQLVLFSATFADAVRQYAKKIVPNANTLELQTNEV				299
Sbjct	322	EADNMLD+QQLGDQC+RVK LPK+ Q++LFSATF + V YA+K PNAN ++L+ E+				381
Query	300	NVDAIKQLYMDCKNEADKFDVLTLEYGLMTIGSSII FVATKKTANVLYGKLGKSEGHEVSI				359
Sbjct	382	TVKGISQMYMDCPDESCKYDILCQLYGLMTIGSSVIFVKTRESANEIQRMEADGHKVS				441
Query	360	LHGDLQTQERDRLIDDFREGRSKVLITTNVLARGIDIPTVSMVVNYDLPTLANGQADP--				417
Sbjct	442	LHGAHEGQNRDALLEDFRTGRSKVLITTNVLARGIDVSSVSMVINYDIPMKGPGDREPC				501
Query	418	ATYIHRIGRTGRFGRKGVASISFVHDKNSFNILSAIQKYFGDIEMTRVPTDDWDEVEKIVK				477
Sbjct	502	ETYLHRIGRTGRFGRVGVGISFVYDRKSFEALSNIANYG-IDLIQLSPDDWDATEKKVQ				560
Query	478	KVLK 481				
Sbjct	561	EVIK 564				

Figura 23. Alineamiento secuencia proteica de Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae* (Query) y Dbp5 de *Chaetomium thermophilum* (Sbjct).

El resultado del clonaje de Dbp5 de *Chaetomium thermophilum* fue el siguiente:

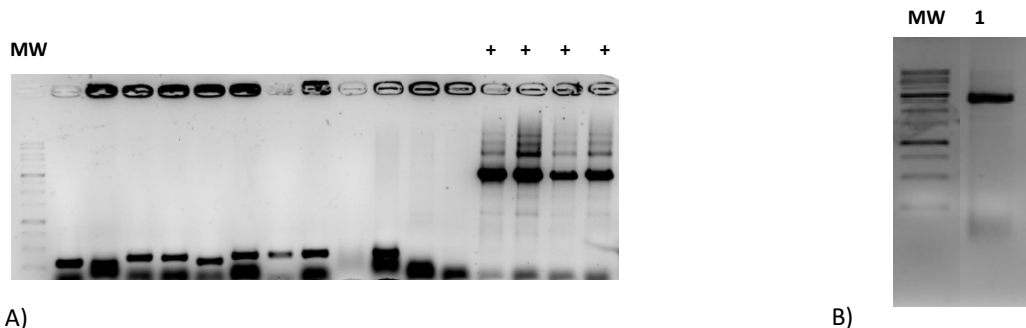


Figura 24. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) clonación Dbp5 de *Chaetomium thermophilum*. A) PCR colonia de la proteína Dbp5 y B) PCR del DNA plasmídico de Dbp5.

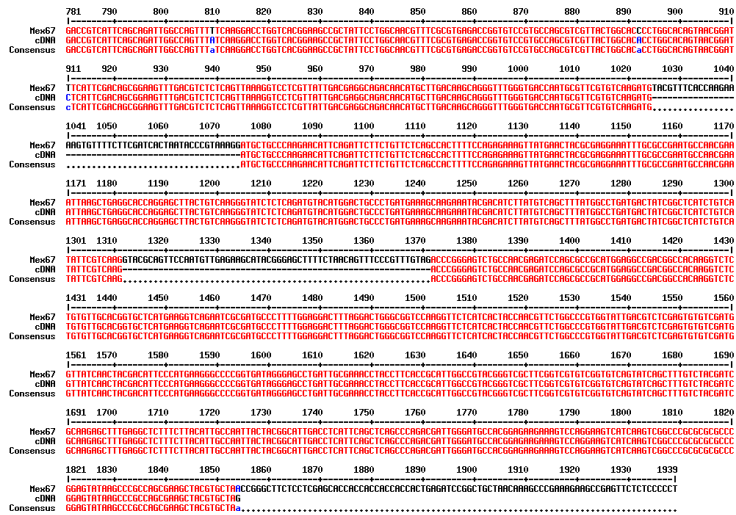


Figura 25. Secuenciación de la clonación de Dbp5 de *Chaetomium thermophilum*. La secuencia superior es la secuencia obtenida de Dbp5 y como referencia se ha utilizado la secuencia de cDNA de Dbp5 de la base de datos. Se puede observar que la secuencia de Dbp5 contiene fragmentos que no coinciden con el cDNA.

Se comprobó que la proteína Dbp5 en *Chaetomium thermophilum* contenía intrones en el genoma. La secuencia con intrones contiene 2527 pares de bases, en comparación con el mRNA de Dbp5 de 1743 pares de bases. El problema fue que a partir de los oligosacáridos diseñados se amplificó el inserto con intrones habiendo usado el cDNA de *Chaetomium thermophilum*, que codifica proteínas funcionales y no contiene intrones. La hipótesis probable que se obtuvo fue que el cDNA contenía DNA genómico y en el proceso se clonó el DNA genómico entero, incluyendo los intrones. Esta contaminación de DNA genómico no se supo hasta obtener las secuencias, ya que la extracción de cDNA se había hecho correctamente mediante el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* de Applied Biosystems.

Además, cabe destacar que esta clonación fue costosa y posiblemente al forzar las condiciones para intentar el clonaje se amplificó el poco DNA genómico contaminante que podría haber en la preparación de cDNA de *Chaetomium thermophilum*.

Otra hipótesis no descartable es que al tratarse de genes de gran tamaño no se haya podido retrotranscribir el gen completo, es decir, que no haya cDNA del gen en su totalidad y por eso los oligonucleótidos hayan funcionado para el DNA genómico.

En la figura siguiente se muestra el alineamiento obtenido del DNA genómico y cDNA de Dbp5 de *Chaetomium thermophilum*. Se puede observar los intrones que aparecen en la clonación realizada.

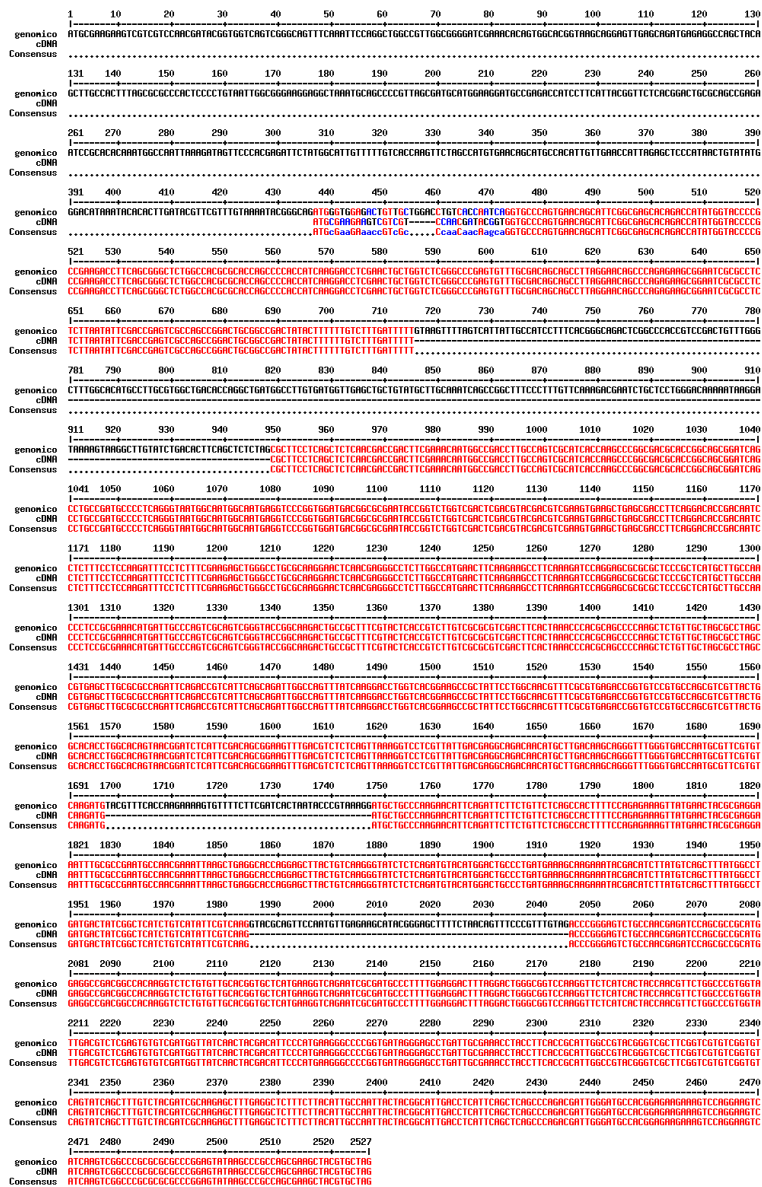


Figura 26. Alineamiento del DNA genómico y cDNA de Dbp5 de *Chaetomium thermophilum*. Se observan los 4 intrones del genoma.

4.5.5. CLONACIÓN DBP5 DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Para la clonación de las proteínas Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae* se necesitó la digestión del plásmido pNKI y la obtención de los insertos por amplificación. Se hizo una PCR con gradiente de temperatura utilizando cDNA y DNA genómico de levadura para obtener el inserto de Dbp5. Para realizar el *LIC cloning* se utilizó la muestra obtenida de PCR para la cual se había utilizado DNA genómico de levadura como molde y una temperatura de anillamiento de 63°C, ya que el resultado de la amplificación fue el adecuado, es decir, en el gel de agarosa se observó una única banda de DNA, sin que aparecieran otras amplificaciones inespecíficas. Se obtuvieron 16 colonias del proceso de clonación, de estas se eligieron 4 colonias positivas de la

PCR colonia realizada. Se enviaron a secuenciar las muestras del DNA plasmídico obtenido y las PCR de ese DNA plasmídico utilizado como molde, para comprobar si la clonación se había realizado correctamente.

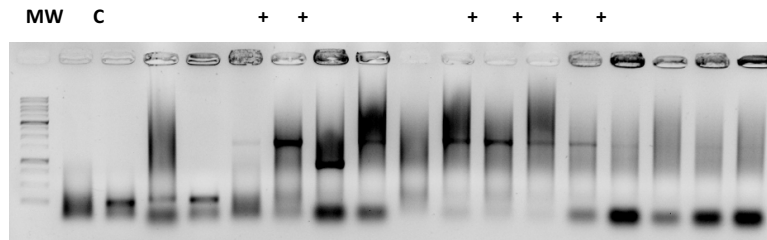


Figura 27. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) de la PCR colonia de la proteína Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestra con una C la colonia control utilizada y las colonias con una + son las colonias positivas obtenidas.

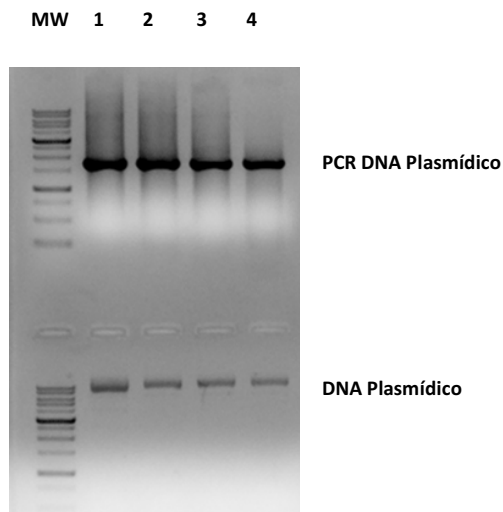


Figura 28. Gel de agarosa (TAE 1X, 0.5 % agarosa) de la PCR del DNA plasmídico y del DNA plasmídico de las colonias positivas de Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*.

El alineamiento que se obtuvo de la secuenciación fue el siguiente:

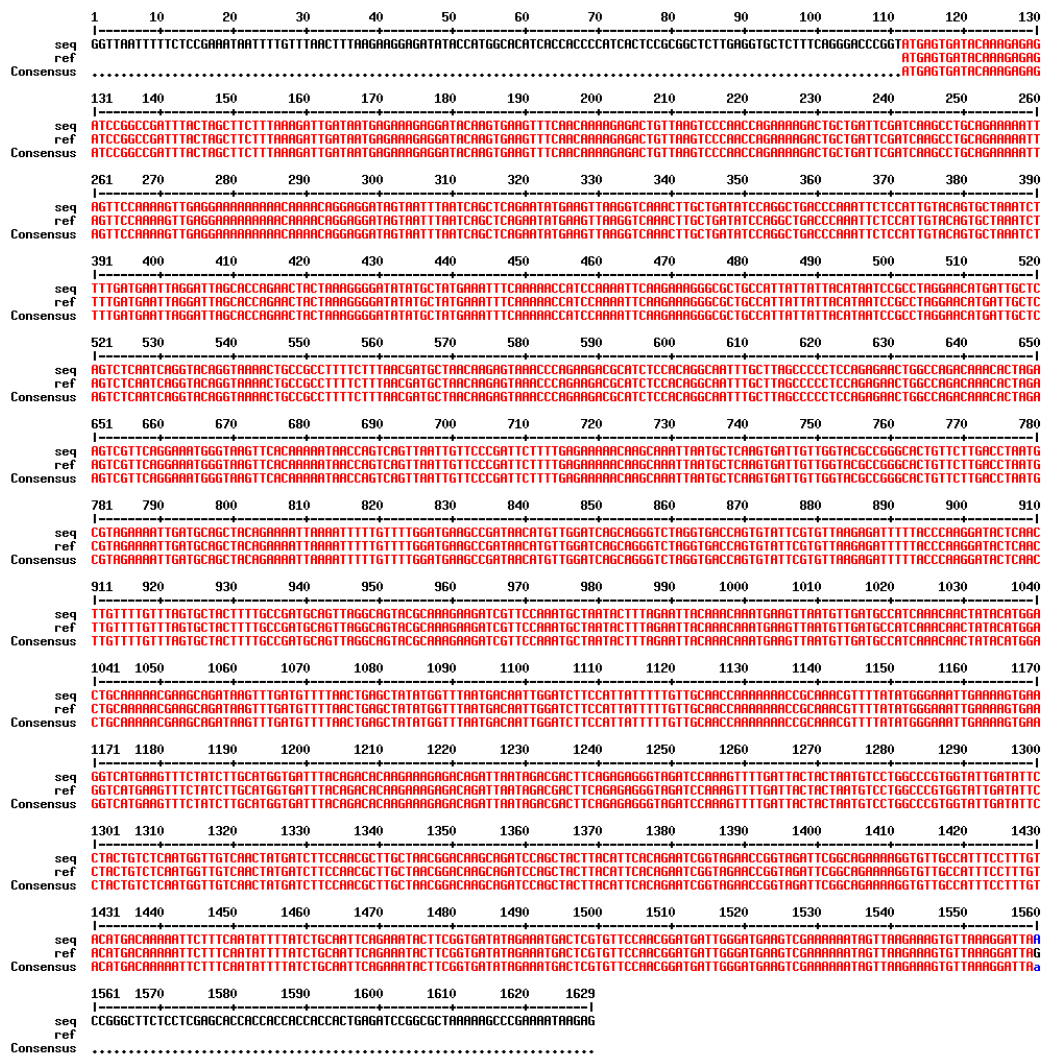


Figura 29. Secuenciación de la clonación de la proteína Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestra la secuencia de la proteína Dbp5 clonada completamente (seq) y en la línea inferior el cDNA de referencia (ref) obtenido de la base de datos. En rojo aparece el alineamiento correcto de los nucleótidos. También se observa los oligonucleótidos sobresalientes del *LIC cloning*.

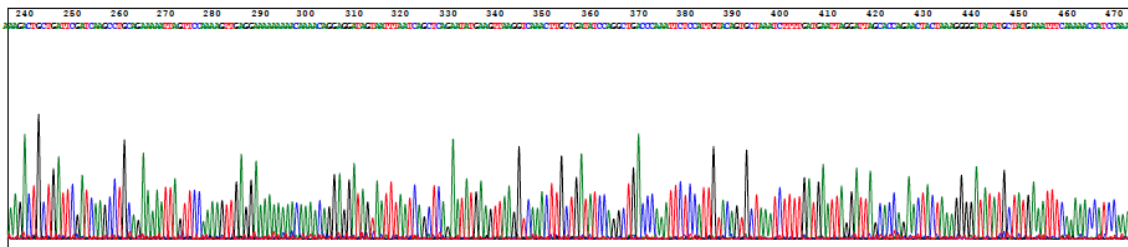


Figura 30. Cromatograma de la secuenciación del DNA de Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae* con el T7 promotor.

Se puede observar la clonación completa de la proteína Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que el protocolo de clonación es el adecuado. Esta clonación del producto de PCR en un plásmido fue almacenada de forma estable para futuros análisis. Actualmente, se pretende sobreexpresar y purificar a gran escala la proteína Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el año 2011, gracias a la clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*, Noble *et al.*, demostraron la actividad ATPasa de Dbp5 para el remodelamiento del mRNA.

4.6. PERSPECTIVA DEL ESTUDIO

A partir de los estudios realizados en organismos modelos se ha observado que además de los complejos de partículas ribonucleoproteicas con el RNA mensajero y los componentes del poro nuclear, la exportación del mRNA está ligada a los procesos de maduración nuclear del mRNA. Pero todavía se necesita profundizar más en el conocimiento de la exportación del RNA. Uno de los principales problemas es la dificultad de establecer sistemas *in vitro* que conecten la transcripción del RNA con la exportación. Son necesarios estudios detallados para entender la conectividad funcional que existe entre las diferentes etapas de la biogénesis del RNA y la exportación (Köhler y Hurt, 2007).

Mediante procesos de cristalografía y SAXS se ha identificado la organización espacial del complejo Mex67:Mtr2 y se ha comprobado que hay una interacción con el RNA. Sin embargo, se necesita estudiar si los resultados obtenidos de Mex67 en levadura son parecidos en metazoos, ya que estas moléculas tienen estructura similar y probablemente reconozcan el mRNA de forma parecida (Aibara *et al.*, 2015).

En este trabajo se ha intentado caracterizar el factor Dbp5, que tiene una función esencial en la exportación del mRNA. Estudios realizados *in vivo* muestran que Dbp5 controla la eficiencia de exportación y liberación de mRNP del poro nuclear (Tran *et al.*, 2007).

El método de clonaje utilizado es más eficiente que otras técnicas convencionales, ya que no requiere el uso de enzimas de restricción ni DNA ligasa, y además, es independiente de sitios de restricción adicionales en las secuencias internas del gen. Para que el proceso funcione se debe tener un ratio de la concentración de inserto-vector adecuado, siempre debe haber el doble de inserto que de vector. En este trabajo se ha comprobado que las proteínas con elevado peso molecular pueden ser difíciles de clonar mediante *LIC-cloning*, pero es uno de los métodos más adecuados para ello (Aslanidis and de Jong, 1990).

Uno de los puntos fundamentales por los que se realizó este proyecto fue la relación de estas proteínas con enfermedades humanas. Las mutaciones en las secuencias del pre-mRNA y en los factores de exportación o transcripción pueden resultar en enfermedades humanas como osteogénesis imperfecta, distrofia miotónica y síndrome de contractura congénita letal (Hurt y Silver, 2008).

5. CONCLUSIONES

Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Los mutantes de Mip6 fueron diseñados, sobreexpresados y purificados correctamente.
- No se observa interacción entre la proteína Mex67 y los dobles mutantes de Mip6 I427A;I423A y I427A;I432A. Esto afirma que las mutaciones puntuales realizadas distorsionan la unión de ambas proteínas.
- La sobreexpresión de las diferentes construcciones mediante el método de autoinducción ha sido más efectiva que a través de la inducción por IPTG.
- La clonación del factor de exportación Mex67 completo de *Chaetomium thermophilum* se ha realizado con éxito y se ha purificado la proteína a pequeña escala mediante una resina de níquel. El Western Blot realizado confirmó la correcta purificación.
- Se obtuvo correctamente la clonación completa de la helicasa Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBARA, S., VALKOV, E., LAMERS, M. H., DIMITROVA, L., HURT, E., AND STEWART, M. (2015). Structural characterization of the principal mRNA-export factor Mex67–Mtr2 from *Chaetomium thermophilum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 71(7), pp.876-888.

AIBARA, S., VALKOV, E., LAMERS, M. AND STEWART, M. (2015). Domain organization within the nuclear export factor Mex67:Mtr2 generates an extended mRNA binding surface. *Nucleic Acids Research*, 43(3), pp.1927-1936.

ASLANIDIS, C. AND DE JONG, P. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18(20), pp.6069-6074.

BJÖRK, P. AND WIESLANDER, L. (2014). Mechanisms of mRNA export. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 32, pp.47-54.

BOLOGNESI, B., GOTOR, N. L., DHAR, R., CIRILLO, D., BALDRIGHI, M., TARTAGLIA, G. G., & LEHNER, B. (2016). A concentration-dependent liquid phase separation can cause toxicity upon increased protein expression. *Cell Reports*, 16(1), pp.222-231.

DIMITROVA, L., VALKOV, E., AIBARA, S., FLEMMING, D., MCLAUGHLIN, S., HURT, E. AND STEWART, M. (2015). Structural Characterization of the *Chaetomium thermophilum* TREX-2 Complex and its Interaction with the mRNA Nuclear Export Factor Mex67:Mtr2. *Structure*, 23(7), pp.1246-1257.

GRÜNWARD, D., SINGER, R. H., AND ROUT, M. (2011). Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature*, 475(7356), pp.333-341.

HURT, J. A., AND SILVER, P. A. (2008). mRNA nuclear export and human disease. *Disease models & mechanisms*, 1(2-3), pp.103-108.

- JIMENO, S., AND AGUILERA, A. (2010). The THO complex as a key mRNP biogenesis factor in development and cell differentiation. *Journal of biology*, 9(1), pp.6.
- JIN, L., ZHANG, K., STERNGLANZ, R., AND NEIMAN, A. M. (2017). Predicted RNA Binding Proteins Pes4 and Mip6 Regulate mRNA Levels, Translation, and Localization during Sporulation in Budding Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 37(9), e00408-16.
- KÖHLER, A., AND HURT, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), pp.761-773.
- KURSHAKOVA, M. M., GEORGIEVA, S. G., AND KOPYTOVA, D. V. (2016). Protein complexes coordinating mRNA export from the nucleus into the cytoplasm. *Molecular Biology*, 50(5), pp.639-644.
- LUND, M. AND GUTHRIE, C. (2005). The DEAD-Box Protein Dbp5p Is Required to Dissociate Mex67p from Exported mRNPs at the Nuclear Rim. *Molecular Cell*, 20(4), pp.645-651.
- MOORE, M. J., AND PROUDFOOT, N. J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 136(4), pp.688-700.
- NIÑO, C. A., HÉRISSANT, L., BABOUR, A., AND DARGEMONT, C. (2013). mRNA nuclear export in yeast. *Chemical reviews*, 113(11), pp.8523-8545.
- NEUMANN, B., WU, H., HACKMANN, A., AND KREBBER, H. (2016). Nuclear export of pre-ribosomal subunits requires Dbp5, but not as an RNA-Helicase as for mRNA export. *PLoS one*, 11(2), e0149571.
- NOBLE, K., TRAN, E., ALCAZAR-ROMAN, A., HODGE, C., COLE, C. AND WENTE, S. (2011). The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export II: nucleotide cycling and mRNP remodeling by Dbp5 are controlled by Nup159 and Gle1. *Genes & Development*, 25(10), pp.1065-1077.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, S. AND HURT, E. (2011). Linking gene regulation to mRNA production and export. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(3), pp.302-309.
- SANTOS-ROSA, H., MORENO, H., SIMOS, G., SEGREF, A., FAHRENKROG, B., PANTÉ, N., AND HURT, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Molecular and cellular biology*, 18(11), pp.6826-6838.
- SEGREF, A., SHARMA, K., DOYE, V., HELLWIG, A., HUBER, J., LÜHRMANN, R., AND HURT, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly (A)⁺ RNA and nuclear pores. *The EMBO journal*, 16(11), pp.3256-3271.
- SMITH D.B. AND JOHNSON K.S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67, pp.31-40.
- STRÄßER, K., BAßLER, J. AND HURT, E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p Heterodimer to Fxfg, G1fg, and Fg Repeat Nucleoporins Is Essential for Nuclear mRNA Export. *The Journal of Cell Biology*, 150(4), pp.695-706.

TRAN, E., ZHOU, Y., CORBETT, A. AND WENTE, S. (2007). The DEAD-Box Protein Dbp5 Controls mRNA Export by Triggering Specific RNA:Protein Remodeling Events. *Molecular Cell*, 28(5), pp.850-859.

VINCIGUERRA, P., AND STUTZ, F. (2004). mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(3), pp.285-292.

WEIRICH, C. S., ERZBERGER, J. P., FLICK, J. S., BERGER, J. M., THORNER, J., AND WEIS, K. (2006). Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nature cell biology*, 8(7), pp.668-676.

WICKRAMASINGHE, V. O., AND LASKEY, R. A. (2015). Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(7), pp.431-442.

ZANDER, G., HACKMANN, A., BENDER, L., BECKER, D., LINGNER, T., SALINAS, G. AND KREBBER, H. (2016). mRNA quality control is bypassed for immediate export of stress-responsive transcripts. *Nature*, 540(7634), pp.593-596.

ZENKLUSEN, D. and STUTZ, F. (2001). Nuclear export of mRNA. *FEBS Letters*, 498(2-3), pp.150-156.

7. ANEXO

Reactivos	25 μ l de reacción	Concentración final
Tampón 5x Kapa Hifi	5 μ l	1x
10 mM Kapa dNTPs	0.75 μ l	0.3 mM
10 μ M cebador directo	0.75 μ l	0.3 μ M
10 μ M cebador reverso	0.75 μ l	0.3 μ M
DMSO puro	1.25 μ l	
Patrón de DNA	1 μ l o el requerido (10-100 ng)	La necesaria en cada caso
1 U/ μ L KAPA HiFi DNA Polimerasa (Kapa Biosystems)	0.5 μ l	0.5 U
H ₂ O MQ (Milli-Q)	15 μ l (up to 25 μ l)	

Tabla 1. Preparación de la mezcla de PCR para la polimerasa Kapa Hifi Hot start.

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Tampón A	50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% Glicerol, 1mM Betamercaptoetanol (β ME)
Tampón de lisis	50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% Glicerol, 1mM Betamercaptoetanol (β ME), 1% Triton X-100, inhibidor de proteasa
Tampón de elución	50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% Glicerol, 2mM Betamercaptoetanol (β ME), 50 mM imidazol.

Tabla 2. Tampones empleados junto con sus composiciones.