

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas



Tesis de Doctorado

“Bases moleculares de la interacción de la E3 ubiquitina  
ligasa TRIM7 con glucogenina-1 y su potencial  
relevancia en el contexto de la glucogenosis tipo XV”

Christian Javier Muñoz Sosa

2021



**Departamento de  
QUÍMICA BIOLÓGICA  
Ranwel Caputto**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba

C I Q U I B I C

# **“Bases moleculares de la interacción de la E3 ubiquitina ligasa TRIM7 con glucogenina-1 y su potencial relevancia en el contexto de la glucogenosis tipo XV”**

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

**Farm. Christian Javier Muñoz Sosa**

Directora de Tesis: Dra. María Elena Carrizo García

Comisión de Tesis: Dra. Susana Genti de Raimondi

Dr. Raúl E. Carbonio

Dr. Jorge M. Romero

Evaluable externo: Dr. Mario R. Ermácora

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET  
Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

2021

*A las mujeres que fueron mi guía en la vida,  
mi mamá Cristina, mi tía Hortensia,  
mi abuela Amalia, mi tía Elena,  
mis tías Male y Lili*

## **-Agradecimientos**

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) que a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) otorgó la beca con la que inicié la carrera de Doctorado, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que me permitió obtener una beca para continuar hasta el final. A la Universidad Nacional de Córdoba, en particular a la Facultad de Ciencias Químicas y al CIQUIBIC por el excelente nivel en la formación recibida durante la carrera de grado y el Doctorado. Al Dr. Curtino que me hizo un lugar para trabajar en su laboratorio y siempre se mantuvo al tanto de mis avances. A los que también fueron parte del laboratorio, a Sole por sus consejos y a Fede por su colaboración en mi primer artículo como becario. A la Comisión de Tesis por el seguimiento durante este tiempo, por reconocer todo el esfuerzo y por alentarme a seguir. A todas las personas que integran el Instituto que siempre están dispuestos a brindar ayuda en cuestiones de trabajo y acompañar en lo personal, en particular al grupo de los biofísicos que me hicieron sentir parte. Especialmente nombro a Laurita, Ubeiden, Pili, Bela y Jesi por el aguante, las catarsis, las charlas y las risas, con quienes me siento feliz de haber compartido el paso por el CIQUIBIC. A mi familia que es mi base, en todo momento me apoyó y ayudó a levantarme, y sobre todo a mi madre que me enseñó a nunca bajar los brazos, me inculcó la dedicación y los valores que me hacen la persona y profesional que soy hoy. A mis demás amistades siempre presentes que me acompañaron durante este proceso, en especial a Carola.

El agradecimiento final y el más importante es para María, quien además de ser mi Directora es alguien por quien siento muchísimo aprecio. Durante estos 5 años fue mi compañera de mesada desde mis primeros pasos, y de ella aprendí destrezas en el laboratorio tanto técnicas como emocionales para el camino. En todo momento creyó en mí y la considero un modelo a seguir como profesional y más aún como persona. Esta ha sido una etapa muy intensa y una gran experiencia de vida, y la verdad no me alcanzan las palabras para expresarme, así que simplemente ¡GRACIAS!

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Abreviaturas</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	4
Las proteínas: su estructura y modificaciones .....	5
El sistema de ubiquitinación.....	5
La familia de proteínas TRIM.....	8
La enzima E3 ubiquitina ligasa TRIM7 .....	13
Glucogenina-1 y la glucogenosis tipo XV .....	17
<b>Objetivo general</b> .....	21
<b>Capítulo I- Estudio cristalográfico del dominio B30.2 de TRIM7 y análisis mutacional de su interacción con glucogenina-1</b> .....	22
I.A. Objetivos.....	23
I.B. Procedimientos experimentales .....	24
I.B.1. Construcción de vectores de expresión .....	24
I.B.2. Expresión y purificación de proteínas .....	26
I.B.3. Cristalización, obtención de los datos de difracción y resolución de la estructura de TRIM7 <sup>B30.2</sup> .....	27
I.B.4. Espectroscopía de dicroísmo circular .....	29
I.B.5. Ensayos de <i>pull-down</i> .....	29
I.B.6. Ensayo de autoglicosilación de glucogenina-1 en presencia de TRIM7 <sup>B30.2</sup> .....	30
I.C. Resultados .....	31
I.C.1. Análisis estructural de TRIM7 <sup>B30.2</sup> .....	31
I.C.2. Análisis estructural de la interacción entre glucogenina-1 y TRIM7 <sup>B30.2</sup> .....	37
-Análisis de la región de glucogenina-1 necesaria para la interacción con TRIM7 <sup>B30.2</sup> .....	38
-Análisis del potencial sitio de interacción de TRIM7 <sup>B30.2</sup> .....	39
-Determinación de la región de TRIM7 <sup>B30.2</sup> involucrada en la interacción con glucogenina-1 .....	42
I.C.3. Efecto del dominio B30.2 de TRIM7 sobre la actividad de glucogenina-1 .....	45
I.D. Discusión .....	46

<b>Capítulo II- Caracterización estructural y funcional de la mutante patológica Ala16Pro de glucogenina-1</b> .....	51
II.A. Objetivos .....	52
II.B. Procedimientos experimentales.....	53
II.B.1. Construcción de vectores de expresión.....	53
II.B.2. Expresión y purificación de proteínas .....	53
II.B.3. Ensayos de actividad de glucogenina-1 .....	54
-Ensayo para el análisis de la autoglicosilación .....	54
-Ensayo para el análisis de la hidrólisis de UDP-glucosa.....	55
-Ensayo para el análisis de la glucosilación de aceptores exógenos .....	55
II.B.4. Estudios por espectroscopía de fluorescencia.....	55
-Unión de UDP .....	55
-Atenuación de fluorescencia con acrilamida .....	56
II.B.5. Espectroscopía de dicroísmo circular.....	56
II.B.6. Ensayo de proteólisis .....	57
II.B.7. Calorimetría diferencial de barrido.....	57
II.C. Resultados .....	58
II.C.1. Efecto de la mutación Ala16Pro sobre la actividad de glucogenina-1 .....	58
II.C.2. Efecto de la mutación Ala16Pro sobre la unión del sustrato.....	60
II.C.3. Análisis del efecto de la mutación Ala16Pro sobre la estructura de glucogenina-1 ....	62
II.C.4. Análisis de la estabilidad de la mutante Ala16Pro .....	64
II.D. Discusión.....	66
<b>Capítulo III- Glucogenina-1 silvestre y mutantes patológicas como sustratos de ubiquitinación por parte de TRIM7</b> .....	70
III.A. Objetivos .....	71
III.B. Procedimientos experimentales .....	72
III.B.1. Construcción de vectores de expresión.....	72
III.B.2. Expresión y purificación de proteínas.....	73
III.B.3. Análisis de la interacción de TRIM7 con variantes de glucogenina-1 .....	76
III.B.4. Ensayo de ubiquitinación.....	76
III.C. Resultados.....	78
III.C.1. Actividad E3 ligasa de TRIM7 sobre glucogenina-1 y la mutante Ala16Pro .....	78
III.D. Discusión .....	82
<b>Conclusiones y perspectivas a futuro</b> .....	86
Conclusiones.....	87

Perspectivas a futuro.....	89
<b>Anexo</b> .....	90
Materiales.....	90
<b>Referencias</b> .....	93

## -Resumen

La ubiquitinación es un tipo de modificación postraduccional característico de organismos eucariotas, que requiere de la acción conjunta de las enzimas E1 activadora, E2 conjugadora y E3 ligasa para mediar la transferencia de ubiquitina a una proteína sustrato.

TRIM7 es una E3 ligasa que recientemente ha adquirido interés por su rol en diversas patologías, y pertenece a la familia de proteínas TRIM, caracterizadas por un motivo conservado tripartito (TRIM) N-terminal y una región C-terminal variable que puede mediar el reconocimiento de sustratos. Inicialmente, fue identificada como una proteína que interacciona a través de su dominio C-terminal B30.2 (TRIM7<sup>B30.2</sup>) con glucogenina-1 (GN1). Dicha proteína es responsable de la iniciación de la biosíntesis del glucógeno, por lo que las mutaciones que afectan al gen que la codifica se traducen en un trastorno extremadamente raro denominado glucogenosis tipo XV.

El presente trabajo se centró en caracterizar a TRIM7<sup>B30.2</sup> por cristalografía de rayos X, y describir detalles sobre las regiones relevantes para la interacción con GN1. La estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> reveló un plegamiento de tipo sándwich- $\beta$  formado por dos láminas  $\beta$  antiparalelas característico de este tipo de dominios, además de presentar una cavidad con carga positiva en la cara cóncava de dicho plegamiento. Adicionalmente, se logró identificar a residuos clave que delimitan la zona involucrada en la interacción con GN1, además de obtener indicios de que el extremo C-terminal de esta última es necesario para su reconocimiento por TRIM7<sup>B30.2</sup> y la proteína TRIM7 entera.

Otra parte de este estudio se dedicó a conocer el impacto de la mutación patológica Ala16Pro sobre GN1 de conejo, que presenta una alta homología con la proteína humana, mediante el uso de un amplio conjunto de técnicas bioquímicas y biofísicas. El análisis reveló un cambio estructural significativo que ocasionó una disminución de la afinidad por su sustrato y, en consecuencia, de la actividad de la proteína; además de una marcada pérdida de estabilidad.

Por último, se buscó conocer si GN1 y sus mutantes patológicas Ala16Pro y Thr83Met, son sustrato de su actividad E3 ligasa; y si esto podría tener un rol relevante en la glucogenosis tipo XV. Los resultados de la reacción *in vitro* mostraron que la transferencia de ubiquitina no ocurre bajo las condiciones empleadas, sin embargo, se encontró que TRIM7 interacciona con la mutante patológica GN1 Ala16Pro pese al cambio estructural de la proteína, lo que podría implicar a TRIM7 en la vía de degradación de esta mutante, y por ello el estudio será continuado en cultivos celulares.

Palabras clave: biofísica/bioquímica de proteínas, cristalografía de rayos X, dominio B30.2, E3 ligasa, familia TRIM, glucogenina-1, glucogenosis tipo XV, TRIM7, ubiquitinación.

## -Abstract

Ubiquitination is a common post translational modification in eukaryotes, which involves an E1 activating enzyme, an E2 conjugating enzyme, and an E3 ligase enzyme; in a process that mediates the transfer of ubiquitin to a substrate protein.

TRIM7 is an E3 ligase member of the TRIM protein family, characterized by an N-terminal tripartite motif (TRIM) and a variable C-terminal region that can mediate substrate recognition, that has been recently linked to diverse pathological processes. TRIM7 was initially identified as a glycogenin-1 (GN1) interacting protein, and this interaction involves the C-terminal B30.2 domain of TRIM7 (TRIM7<sup>B30.2</sup>). GN1 is the protein that initiates glycogen biosynthesis, and mutations in the gene that encodes for this enzyme are involved in the onset of an extremely rare disease known as type XV glycogen storage disease.

This work was mainly focused on the characterization of TRIM7<sup>B30.2</sup>, through the use of X-ray crystallography, and the details of the region involved in the interaction with GN1. The structure of TRIM7<sup>B30.2</sup> revealed the characteristic B30.2 domain fold consisting of two  $\beta$ -sheets arranged as a distorted  $\beta$ -sandwich, and a positively charged cavity in the hypervariable region of this domain. Besides, key residues that define the zone of interaction with GN1 were identified, and evidence for the requirement of the latter's C-terminal region in the binding was found.

This study was also focused on the effect of the pathogenic Ala16Pro mutation on rabbit GN1, which displays a high sequence homology with the human protein; and to this end, a wide range of biophysical and biochemical techniques were applied. The analysis revealed a significant structural change which resulted in a decrease in substrate affinity and protein activity, besides a considerable loss of stability.

Finally, the thesis was oriented towards analyzing the potential E3 ligase activity of TRIM7 on GN1 and the pathological mutants Ala16Pro and Thr83Met, and its possible functional role on type XV glycogen storage disease. The results have shown that *in vitro*, TRIM7 does not transfer ubiquitin to GN1 or the mutants in this experimental setup. However, it was found that despite the structural change caused by the mutation, TRIM7 still interacts with the Ala16Pro mutant of human GN1, which might implicate the intervention of TRIM7 in the degradation pathway of this mutant, and for this reason, this study will be continued in cell cultures.

Keywords: B30.2 domain, E3 ligase, glycogenin-1, glycogen storage disease, protein biochemistry/biophysics, TRIM7, TRIM family, ubiquitination, X-ray crystallography.

## -Abreviaturas

ADN - ácido desoxirribonucleico

ATP - adenosina trifosfato

$\beta$ ME -  $\beta$ -mercaptoetanol

DBM - n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido

D.O.<sub>600</sub> - densidad óptica a 600 nm

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético

g - fuerza de gravedad

IPTG - isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

kb - 1000 pares de bases

LB - *Lysogeny Broth*

NTA - ácido nitrilo triacético

pb - pares de bases

PBS - buffer fosfato-salino

PCR - reacción en cadena de la polimerasa

PDB - *Protein Data Bank*

PMSF – fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF - fluoruro de polivinilideno

SDS - dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

TCEP - tris (2-carboxietil) fosfina

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

UDP - uridina di fosfato

UDPG - uridina di fosfato-glucosa

# **-Introducción-**

## **-Las proteínas: su estructura y modificaciones**

Las proteínas son macromoléculas cuya secuencia de aminoácidos o residuos se encuentra definida por un gen específico que la codifica. Luego de ser sintetizadas, estas adoptan un plegamiento particular, estabilizado por el efecto hidrofóbico y por diferentes tipos de interacciones que resultan de las propiedades características de los aminoácidos que las componen. Las proteínas presentan grados crecientes de complejidad estructural: la secuencia de aminoácidos o estructura primaria, los arreglos locales de residuos o estructura secundaria, el arreglo espacial general de la cadena polipeptídica o estructura terciaria y la asociación de más de una cadena, o subunidades, llamada estructura cuaternaria.

El estudio de las proteínas puede involucrar diferentes enfoques estructurales dirigidos, por ejemplo, a conocer cómo ocurren las interacciones con otras moléculas, entre otros aspectos, tales como comprender las bases moleculares de su función, que pueden incluir desde pruebas *in vitro* hasta ensayos *in vivo*.

Las diversas combinaciones posibles de los aminoácidos pueden definir una amplia variedad de estructuras; esto a su vez determina el gran número de funciones que las proteínas pueden cumplir; entre las cuales se pueden mencionar la catálisis de reacciones bioquímicas, el transporte de moléculas o la transducción de señales celulares.

En los organismos, las proteínas son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales que pueden provocar cambios en su estructura o función. Dichas modificaciones pueden, por ejemplo, regular los niveles o la localización de las proteínas, modular su actividad enzimática o promover su participación en eventos de señalización celular. Entre las modificaciones mencionadas, se pueden incluir la adición de grupos funcionales, tales como la metilación y la fosforilación, la glucosilación o la unión covalente de péptidos pequeños o proteínas, como, por ejemplo, la SUMOilación y la ubiquitinación. Una proteína puede sufrir diferentes modificaciones o una misma, pero en diferentes sitios; y en ambas situaciones los efectos pueden ser muy diversos (1).

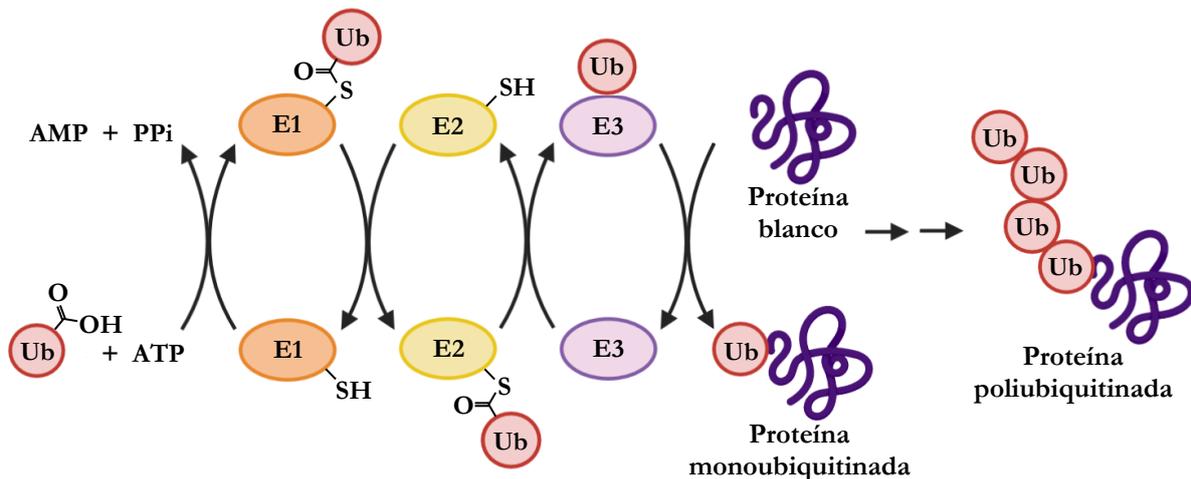
## **-El sistema de ubiquitinación**

El sistema de ubiquitinación, cuya pieza central es una proteína de 76 aminoácidos llamada ubiquitina (Ub), es responsable de un tipo de modificación postraduccional esencial para la degradación de proteínas en organismos eucariotas y la participación de estas en eventos de señalización intracelular, entre otros aspectos de regulación de la fisiología celular (2, 3).

La ubiquitinación de proteínas es el proceso en el que se transfiere una o más moléculas de ubiquitina (poliubiquitinación) a una proteína blanco en múltiples etapas e involucra la acción secuencial de diferentes enzimas, denominadas genéricamente E1 o enzima activadora, E2 o

enzima conjugadora y E3 o enzima ubiquitina ligasa (Figura I.1). Hasta el momento, se conoce que el genoma humano codifica para 2 enzimas E1, aproximadamente 40 enzimas E2 y alrededor de 800 enzimas E3, número que aún continúa en aumento (2-6).

Durante la primera etapa de este proceso dependiente de ATP, la enzima E1 cataliza la activación de ubiquitina mediante la reacción de un residuo cisteína ubicado en su sitio catalítico con el extremo C-terminal de ubiquitina para formar el complejo activado E1~ubiquitina (7). A continuación, la enzima E1 transfiere la ubiquitina activada a un residuo cisteína en el sitio catalítico de una enzima E2, para ser finalmente conjugada a la proteína blanco en cooperación con diferentes clases de enzimas E3 (8). En este último paso, una enzima E3 se asocia de modo específico con una enzima E2 y, dependiendo del tipo de enzima E3 involucrada, la transferencia de ubiquitina puede ocurrir de manera directa o por formación de un enlace tioéster entre dicha enzima y ubiquitina, previo a su transferencia al sustrato (3, 4).



**Figura I.1. La vía de ubiquitinación.** La enzima E1 activa a ubiquitina (Ub), que es transferida a la enzima E2 y posteriormente a la proteína sustrato mediante una enzima E3 específica. Las proteínas pueden ser modificadas con una sola molécula de ubiquitina o con cadenas de poliubiquitina.

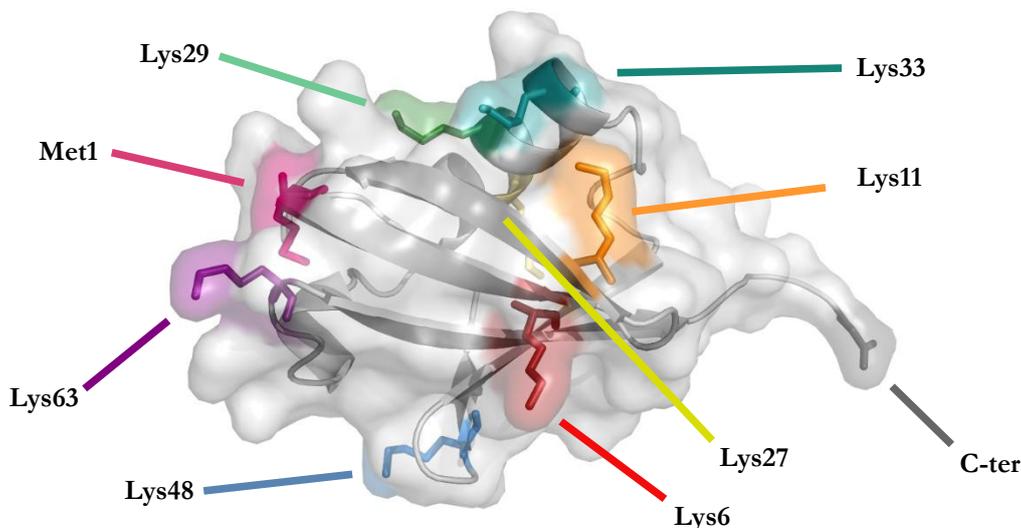
Figura adaptada de “Ubiquitin Proteasome System” en BioRender.com (2021). Extraído de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

La unión de ubiquitina comprende la formación de un enlace covalente isopeptídico entre el residuo glicina 76 (Gly76, Figura I.2) localizado en el extremo carboxilo terminal y, usualmente, el grupo ε-amino de un residuo lisina en la proteína sustrato. En algunas proteínas sustrato, es su extremo amino terminal el que participa en la formación del enlace isopeptídico; y en raras ocasiones se involucran también residuos como serina, treonina y cisteína (2, 3, 8).

Luego de ocurrida la primera transferencia, la enzima E2 se disocia de la enzima E3 y así puede ocurrir la interacción subsecuente entre esta última y otra molécula de E2 con ubiquitina unida. Estos ciclos de carga y descarga de ubiquitina pueden resultar en la transferencia de una molécula

a uno o más sitios de la proteína sustrato (mono y multiubiquitinación respectivamente), o bien sobre otra molécula de ubiquitina (7).

La transferencia de una molécula de ubiquitina sobre otra, que resulta en la formación de una cadena de poliubiquitina, puede ocurrir en el extremo N-terminal (Met1) o en uno de sus siete residuos lisina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63) mediante la formación de enlaces isopeptídicos (Figura I.2). Dicha cadena de poliubiquitina puede adoptar una estructura lineal o ramificada con un solo tipo (poliubiquitinación homotípica) o diferentes tipos (poliubiquitinación heterotípica) de residuos lisina involucrados (9).



**Figura I.2. Sitios de ubiquitina involucrados en la poliubiquitinación.** La proteína (código de PDB: 1UBQ) se encuentra representada como cintas bajo una superficie semitransparente, mientras que los residuos que median la unión entre moléculas de ubiquitina, además del extremo C-terminal que media la unión a la proteína sustrato, se representan como bastones.

Figura creada con PyMOL (Schrödinger LLC; <http://www.pymol.org>), adaptada de ref. 9.

Ubiquitina puede además ser sujeto de modificaciones por moléculas pequeñas como fosfato, o similares a ubiquitina como SUMO (*small ubiquitin-like modifier*). Esto resulta en un abanico complejo de señales posibles referido como “el código de ubiquitina”, que determina el destino particular al que será dirigida la proteína sustrato y las diferentes funciones que puede cumplir (2, 9).

Hasta el momento, la monoubiquitinación ha sido asociada a la regulación de la actividad de las proteínas sustrato, como ocurre en el caso de las histonas; aunque es creciente la evidencia de su implicancia en la proteólisis. En cuanto a la poliubiquitinación, los tipos de uniones más comunes que pueden encontrarse ocurren a través de los residuos Lys48 y Lys63 de ubiquitina. Las cadenas de poliubiquitina formadas por moléculas unidas a través de residuos Lys48 se comportan como señales de degradación, en consecuencia, las proteínas modificadas son dirigidas al complejo proteolítico proteasoma 26S. Si en cambio, la unión involucra a residuos Lys63, las proteínas

continúan asociadas a componentes celulares en la vía de degradación por autofagia o también puede haber modulación de procesos no degradativos como el transporte de las proteínas modificadas (2, 3, 4). Si bien se conoce por estudios de proteómica que los ocho residuos mencionados participan en el enlace entre moléculas de ubiquitina, aquellos menos frecuentes, también denominados atípicos, han comenzado a ser caracterizados recientemente, por lo que sus mecanismos y roles fisiológicos son todavía relativamente poco conocidos (2, 9).

La regulación del sistema de ubiquitinación ofrece importantes oportunidades terapéuticas a través del desarrollo de moléculas inhibitoras que pueden actuar sobre los diferentes pasos de la cascada de reacciones del proceso. Las enzimas E3 tienen un amplio rango de sustratos y son esencialmente las responsables de la especificidad del proceso de ubiquitinación, por lo que el desarrollo de moduladores de E3 ligasas resulta promisorio como una potencial estrategia terapéutica que brinde una mayor selectividad con una menor probabilidad de aparición de efectos adversos (6, 10).

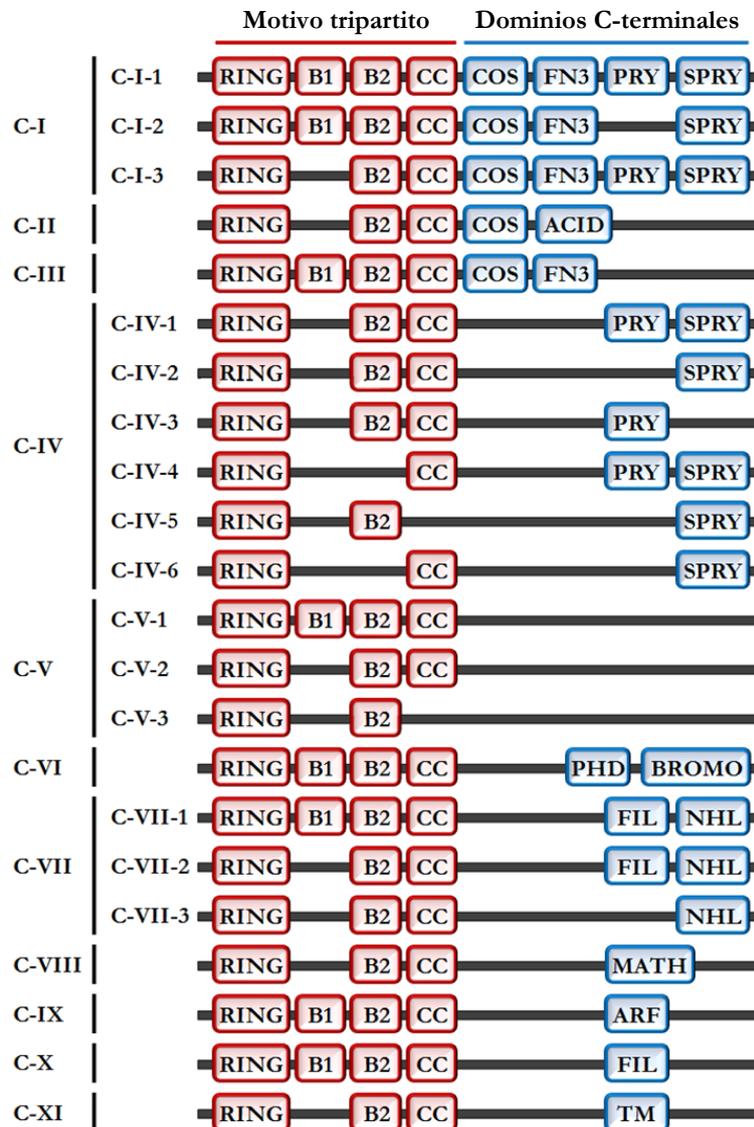
Las enzimas E3 ligasas se mantienen a menudo en forma latente y son activadas por modificaciones postraduccionales, lo que previene la ubiquitinación anormal sobre ellas mismas o sus proteínas sustrato. Algunas de estas proteínas, han incluso evolucionado para formar homómeros o heterodímeros, lo que les podría permitir reconocer múltiples secuencias cortas en las proteínas sustrato y así mantener la alta especificidad (11).

Las enzimas E3 ligasas presentan diferentes dominios en su estructura terciaria, que son utilizados como base para su clasificación estructural. La mayoría de las enzimas E3 se agrupan en 2 familias: aquellas con un dominio RING (*Really Interesting New Gene*) N-terminal, y las que poseen un dominio HECT (*Homologous to E6-AP C Terminus*) C-terminal. Las enzimas E3 de tipo HECT se caracterizan por actuar formando un enlace covalente tioéster con ubiquitina, previo a la transferencia de esta a la proteína sustrato. En cambio, las enzimas E3 de tipo RING actúan como armazón, interaccionando con el complejo E2-ubiquitina a la vez que reconocen a la proteína sustrato, facilitando el acercamiento entre ambas y catalizando la transferencia directa de ubiquitina sin transtiolación adicional, como ocurre con las enzimas E3 de tipo HECT (3, 5).

## **-La familia de proteínas TRIM**

De las E3 ligasas tipo RING, una de las familias más numerosas es la constituida por las proteínas TRIM, caracterizadas por compartir como patrón molecular un arreglo modular tripartito N-terminal denominado TRIM (*tripartite motif*). Este motivo se encuentra compuesto por tres regiones estructuralmente distinguibles: un dominio RING, seguido de uno o dos dominios B-box y una región de hélice superenrollada (*coiled-coil*); por lo que el motivo TRIM (Figura I.3) es también

conocido como RBCC (12, 13). Las proteínas TRIM poseen adicionalmente uno o más dominios en la región C-terminal que les otorgan su diversidad estructural, y esta diferencia en su arquitectura ha sido utilizada como base para clasificarlas en once subfamilias. (ref. 14, Figura I.3).



**Figura I.3. La familia de proteínas con motivo tripartito (TRIM).** Representación esquemática de las proteínas TRIM clasificadas en los subgrupos C-I a C-XI, los dominios correspondientes al arreglo conservado TRIM se muestran en recuadros de color rojo, y aquellos presentes en la región C-terminal en recuadros de color azul. Abreviaturas: B1, dominio B-box tipo 1; B2, dominio B-box tipo 2; CC, dominio de hélice superenrollada (*coiled coil*); COS, *cos box*; FN3, motivo fibronectina tipo 3; ACID, región rica en aminoácidos ácidos; FIL, dominio IG tipo filamina; MATH, dominio homólogo a meprina y TRAF; ARF, dominio de la familia de factores de ADP-ribosilación; TM, región transmembrana.

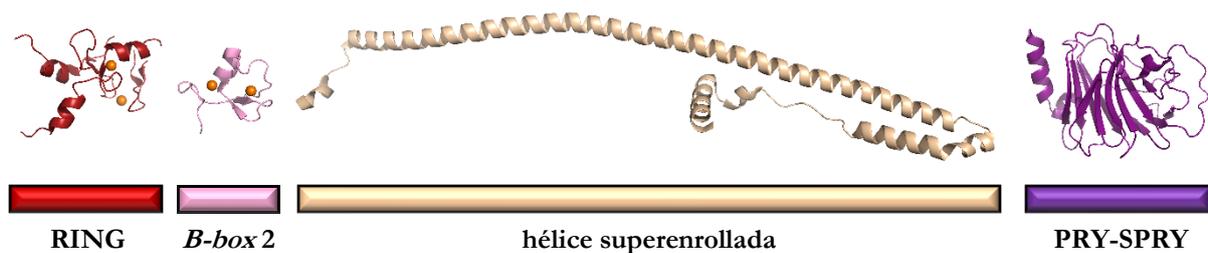
Figura adaptada de ref. 14.

El arreglo ordenado y altamente conservado RBCC es característico de las proteínas animales, sin embargo, los dominios que lo constituyen también se encuentran de manera independiente en

las proteínas de otros organismos eucariotas. Otra particularidad de esta familia es que, si bien en ciertas proteínas TRIM se encuentran ausentes algunos de los dominios individuales, el orden y espaciamiento entre ellos se mantiene evolutivamente conservado; lo que sugiere que la estructura multidominio RBCC no se comporta como un conjunto de módulos separados, sino como un módulo integrado (12).

En humanos, se pueden considerar dos grupos de proteínas TRIM con diferencias en su dinámica evolutiva: aquellas con variabilidad en su región C-terminal que se encuentran tanto en vertebrados como en invertebrados, o las que poseen solo un tipo de dominio *B-box* y comparten mayormente los dominios C-terminales PRY-SPRY, que son exclusivas de organismos vertebrados (15).

En cuanto a la arquitectura global de las proteínas TRIM, se ha logrado determinar mayormente la estructura de dominios aislados (Figura I.4), y en menor medida de múltiples dominios o complejos de dominios con otras proteínas por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, pero poco se conoce acerca de cómo interaccionan los dominios de estas proteínas entre sí, o en el contexto de las proteínas completas (13).



**Figura I.4. Esquema de la arquitectura de dominios de la subfamilia C-IV-1 junto con estructuras representativas de cada dominio de otros miembros de la familia TRIM.** Las estructuras corresponden a: el dominio RING de TRIM32 (cadena A, código de PDB: 5FEY), el *B-box* tipo 2 de TRIM18 (cadena A, aminoácidos 172-212, código de PDB: 2JUN), la región de hélice superenrollada de TRIM69 (cadena A, código de PDB: 4NQJ) y los dominios PRY-SPRY de TRIM25 (cadena A, código de PDB: 4B8E). Las estructuras están representadas en la misma escala en forma de cintas y los iones  $Zn^{2+}$  como esferas.

Figura creada con PyMOL (Schrödinger LLC; <http://www.pymol.org>), adaptada de ref. 13.

Hasta el momento, se conocen más de 80 genes TRIM en humanos y si bien la mayoría de las proteínas TRIM que estos codifican son consideradas E3 ligasas de tipo RING, dada la presencia de este dominio catalítico, un número reducido de miembros de la familia no lo posee, como ocurre en el caso de TRIM20 (14). Adicionalmente, pese a que la presencia del dominio RING sugiere que estas proteínas podrían funcionar como E3 ligasas, no todas las proteínas con este tipo de dominio presentan actividad E3 intrínseca o demostrada (16).

El dominio RING consiste en una región de entre 40 y 60 aminoácidos de longitud, caracterizada por un patrón conservado de residuos histidina y cisteína que coordinan dos iones  $Zn^{2+}$  y la

dimerización de las proteínas TRIM a través de este dominio es requerida para la actividad catalítica (13, 14). Se conoce que los dominios RING son necesarios para la interacción específica con determinadas enzimas E2 entre las presentes en las células. Al respecto, diversos estudios han mostrado que las proteínas E3 de tipo RING se unen a las proteínas E2 débilmente, con constantes de disociación en el orden milimolar, lo que dificulta el poder detectar la interacción (17).

Los dominios B-*box* se categorizan como tipo 1 o tipo 2 y se encuentran en arreglo secuencial en algunas proteínas TRIM, mientras que otras solo poseen un dominio B-*box* tipo 2. Sin embargo, pese a ser motivos de unión a zinc como el dominio RING, con el que podrían haber evolucionado a partir de un ancestro común, carecen de actividad catalítica E3 ligasa. En otras proteínas, estos dominios se encuentran implicados en diversos roles, por ejemplo, como reguladores de la transcripción; sin embargo, no tienen asignada hasta el momento una función unificada (13).

El dominio de hélice superenrollada, de aproximadamente 100 residuos de longitud, consiste en hélices  $\alpha$  enrolladas entre sí formando una estructura estabilizada por interacciones hidrofóbicas. Esta región de las proteínas TRIM está involucrada en la formación de dímeros y complejos de alto peso molecular consigo mismas o con otros miembros de la familia, que forman compartimientos subcelulares determinados, para lo cual es además necesaria la integridad del motivo tripartito (12, 18). Muchas de estas homointeracciones o heterointeracciones no ocurren de manera indiscriminada, sino que pueden deberse a la presencia de secuencias específicas en este dominio, y han sido observadas entre miembros relacionados de la familia (18, 19).

Por otra parte, a diferencia del motivo RBCC, los dominios presentes en la región C-terminal no son exclusivos de la familia TRIM, sino que también se encuentran en otras familias de proteínas no relacionadas (15, 20). Estos dominios son de variada naturaleza y participan a menudo en el reconocimiento y la especificidad respecto al sustrato (13).

En las proteínas TRIM clasificadas como pertenecientes al subgrupo C-IV (Figura I.3), se encuentran en el extremo C-terminal los dominios conservados y evolutivamente relacionados PRY y SPRY, ambos o solo uno de ellos. Cuando el elemento PRY se encuentra asociado en posición N-terminal a SPRY, son denominados en conjunto como dominio similar a RFP (*ret finger protein*) o B30.2; presente hasta el momento solo en vertebrados con sistema inmune adaptativo (15, 21, 22). Los dominios B30.2 no tienen actividad enzimática conocida, y los estudios sobre ellos los relacionan a interacciones proteína-proteína; aunque también pueden mediar la unión a moléculas de ARN (21, 23). Las estructuras resueltas de dominios B30.2 de diferentes proteínas, muestran dos láminas  $\beta$  enfrentadas, formadas por hebras  $\beta$  dispuestas de forma antiparalela, que toman un plegamiento característico denominado sándwich- $\beta$  distorsionado (24-26).

Como ya se mencionó, muchas proteínas TRIM tienen la capacidad de formar homo u heterooligómeros, lo que además podría llevar al reconocimiento de una amplia variedad de sustratos, mediado por la región C-terminal. En muchas ocasiones, la formación de heterooligómeros dificulta el poder distinguir la función asociada a cada proteína (19).

Las proteínas de esta familia se encuentran involucradas en diversos procesos celulares, tales como el desarrollo celular y la apoptosis (14). Algunas proteínas TRIM cumplen funciones específicas en inmunidad innata, como TRIM5 $\alpha$ , que reconoce la cápside externa de numerosos retrovirus y lentivirus a través de su dominio C-terminal. Otras actúan como reguladores de la señalización celular, por ejemplo, TRIM5 que activa a la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, involucrada en la señalización intracelular de los receptores tipo *toll* TLR4 (14). Al respecto, la expresión de muchos miembros de la familia es inducida por interferones en respuesta a estímulos de receptores del sistema inmune (27).

Recientemente, también se ha descrito el rol regulatorio de la autofagia de diferentes miembros de la familia, como TRIM13, TRIM55 y TRIM63, que interaccionan con p62, un receptor de proteínas destinadas a dicha vía de degradación. A su vez, se ha demostrado que varias proteínas TRIM participan en la regulación de la formación del autofagosoma, para la degradación posterior de componentes citoplasmáticos en el lisosoma (14).

Se conoce que las alteraciones en los genes TRIM son importantes en la etiología de diversas patologías, tales como desórdenes neuropsiquiátricos, enfermedades cardiovasculares y enfermedades del desarrollo (28). Hay además creciente evidencia de que las proteínas TRIM regulan la carcinogénesis positiva y negativamente. Frecuentemente, las proteínas TRIM tienen más de un rol en diferentes vías, y para algunas de ellas se ha reportado un rol dual como oncogen o como supresor de tumores dependiendo del contexto celular (18). Las proteínas TRIM muestran además patrones diferenciales de expresión en tejidos tumorales; por ejemplo, TRIM47 y TRIM68 se encuentran sobreexpresadas en cáncer de próstata, en cambio la expresión de TRIM26 se encuentra reducida en hepatocarcinoma celular. Más aún, en algunos casos, se observa una correlación entre el nivel de expresión de estas proteínas y la malignidad del cáncer (14).

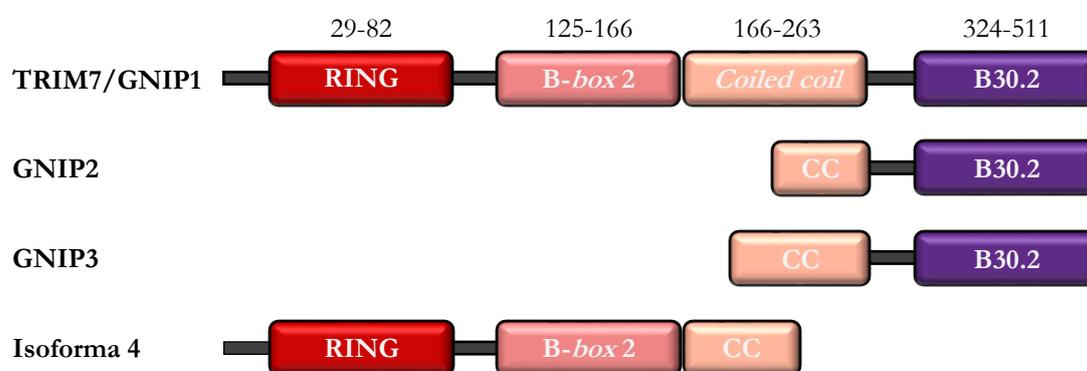
Uno de los miembros de la familia que destaca por estar implicada en múltiples procesos es TRIM7; a continuación, se presentarán algunos de los antecedentes relacionados a esta proteína.

### **-La enzima E3 ubiquitina ligasa TRIM7**

La proteína TRIM7 forma parte de la subfamilia C-IV-1 (Figura I.3), el grupo más numeroso y estudiado, y ha empezado a adquirir interés con base en evidencias recientes (19). Inicialmente, fue

detectada a través de un ensayo de doble híbrido como una proteína que interactúa con glucogenina-1, la autoglucosiltransferasa que inicia la biosíntesis del glucógeno; y debido a ello fue nombrada GNIP1 (*Glycogenin Interacting Protein*, ref. 29). En dicho estudio se identificaron 4 isoformas de TRIM7 generadas por empalme alternativo (Figura I.5), sobre las cuales se realizó un análisis para predecir dominios conservados con la herramienta SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*). Este análisis predijo para la secuencia completa de 511 aminoácidos (TRIM7/GNIP1) la presencia en el extremo N-terminal del motivo tripartito compuesto por el dominio RING, un dominio B-box tipo 2, la región de hélice superenrollada y el dominio B30.2 en el extremo C-terminal. La isoforma GNIP2 contiene el dominio C-terminal B30.2 y una porción del dominio de hélice superenrollada, mientras que GNIP3 posee 26 aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal respecto a GNIP2. La isoforma 4 posee los dominios RING, B-box y parte de la región de hélice superenrollada en la que exhibe 14 aminoácidos diferentes en el extremo C-terminal, respecto a la secuencia completa (Figura I.5).

La isoforma GNIP2, la única que en este primer estudio pudo ser obtenida en forma soluble en *Escherichia coli*, fue incubada *in vitro* con glucogenina-1, tras lo cual se observó un marcado incremento en la actividad autoglucosiltransferasa de esta última, efecto evidenciado tanto en la incorporación de glucosa como en el aumento del parámetro  $V_{max}$ , sin cambio observable en el parámetro  $K_m$  (29).

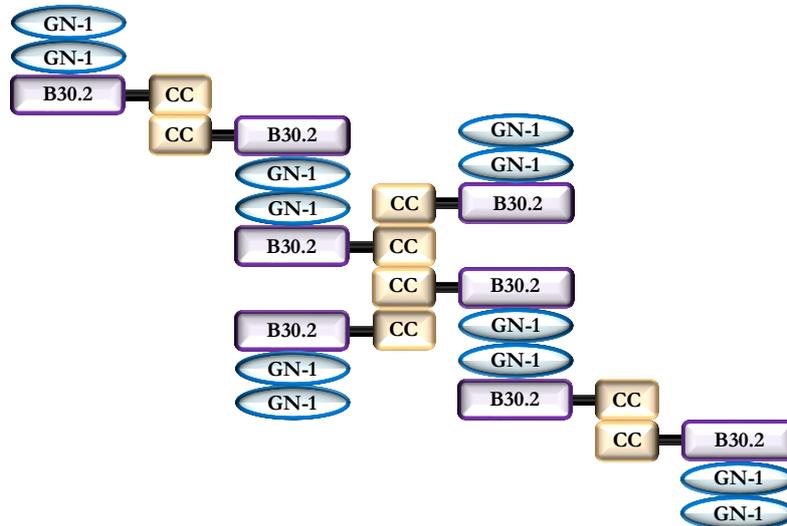


**Figura I.5. Arquitectura estructural predicha de las isoformas codificadas por el gen TRIM7.** Los números en la parte superior demarcan la posición aproximada de los dominios en la secuencia, de acuerdo a la base de datos UniProt (30). Abreviaturas: CC (*coiled coil*), hélice superenrollada.

Figura adaptada de ref. 31.

Posteriormente, en otro estudio de los mismos autores, la expresión de TRIM7 (GNIP1, según la denominación empleada en su momento por los autores) fue detectada mayormente en tejido de corazón, testicular, de riñón y en músculo esquelético. Además, se identificó al dominio B30.2 como la región de la isoforma GNIP2 necesaria para la interacción con glucogenina-1, y al dominio de hélice superenrollada como responsable de la interacción de GNIP2 consigo misma, lo que

indica que TRIM7 podría formar oligómeros de alto peso molecular como otras proteínas de la misma familia. Con base en estas evidencias, se propuso además el reclutamiento de moléculas de glucogenina-1 mediado por GNIP2, formando complejos de orden superior, que si bien se desconoce si existen en la naturaleza, podrían explicar la estimulación de la actividad de autoglucosilación observada (ref. 31, Figura I.6).



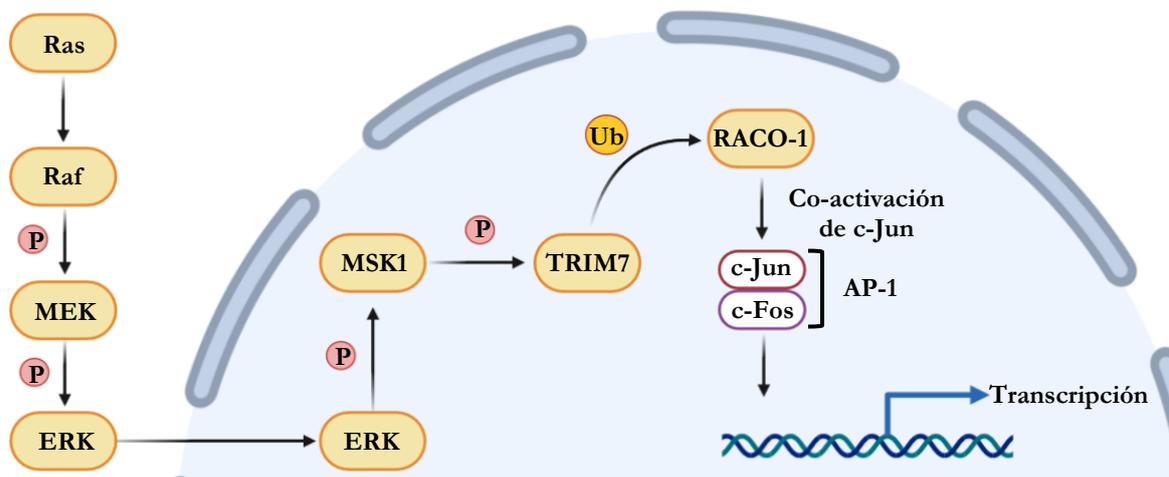
**Figura I.6. Modelo para las interacciones entre GNIP2 consigo misma y con glucogenina-1 (GN1).** Se considera que glucogenina-1 interactúa con el dominio B30.2 de GNIP2, mientras que la interacción entre moléculas de GNIP2 involucra al dominio de hélice superenrollada (CC); que además podría mediar la formación de heterooligómeros.

Figura adaptada de ref.31.

Más recientemente, en una publicación de otros autores se describió un incremento en la absorción de glucosa en células musculares humanas en respuesta a la sobreexpresión de TRIM7 y su isoforma 4, siendo en este caso, TRIM7 la variante más abundante en el músculo esquelético humano y la isoforma 4 predominante en el músculo cardíaco. En ratones transfectados con el gen de TRIM7 se observaron, además, menores niveles de glucosa en sangre y un mayor nivel de glucógeno en el músculo gastrocnemio sin registro de un cambio en el contenido de glucogenina-1. Ambas isoformas mostraron ser capaces de autoubiquitinarse *in vitro* (32), al igual que otras enzimas E3 que pueden hacerlo como una posible forma de regulación de su estabilidad (33).

En otro estudio, se logró identificar a TRIM7 como una enzima E3 ligasa clave en la vía de señalización de la proteína Ras, que regula la proliferación celular. En dicha vía, TRIM7 es fosforilada por la proteína MSK-1, luego reconoce específicamente al extremo C-terminal de otra E3 ligasa llamada RACO-1 y media su poliubiquitinación, para lo que es necesario el dominio RING de TRIM7. La poliubiquitinación estabiliza a RACO-1 y esto lleva a un incremento de la

transcripción de c-Jun (Figura I.7). Se encontró, además, que la expresión de TRIM7 estimula la proliferación celular en tumores de pulmón en ratones, mientras que su silenciamiento disminuye la proliferación de células tumorales (34).



**Figura I.7. Modelo esquemático de la vía de señalización que asocia Ras a c-Jun.** La proteína Ras activa a Raf y esta inicia una cascada de fosforilación al actuar sobre MEK, que a su vez fosforila a ERK. A continuación, ERK se transloca al núcleo donde fosforila a MSK1, que luego activa a TRIM7, y esta media la ubiquitinación de RACO-1 y su estabilización. A continuación, RACO-1 actúa como un co-activador transcripcional de c-Jun y del complejo AP-1. Abreviaturas: P, fosfato; Ub, ubiquitina.

Figura adaptada de “Ras Activation” en BioRender.com (2021). Extraído de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

En un trabajo de otros autores sobre carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC), se reportó un menor nivel de expresión de TRIM7 en tejido tumoral comparado con tejido normal (35). Adicionalmente, se observó que su sobreexpresión inhibe la proliferación y migración de células de NSCLC, a diferencia de la evidencia previa que describe a la proteína como promotora de la proliferación (34). Además, se encontró que la isoforma 4 de TRIM7 interacciona con la proteína p65 y acelera su degradación por la vía del proteasoma, lo que indica que participa en la regulación de la vía de NF- $\kappa$ B (35).

TRIM7 también ha sido recientemente vinculada a la regulación de la invasión celular y la resistencia a la quimioterapia en osteosarcoma, a través de la ubiquitinación del supresor tumoral BRMS1 (36); en tanto que, otros autores han descrito que la expresión del gen TRIM7 se encuentra regulada negativamente en melanoma (37).

En un estudio relacionado a hepatocarcinoma celular humano, se describió a TRIM7 como reguladora de la fosfatasa DUSP6, que es poliubiquitinada y luego degradada en proteasoma, lo que promueve la fosforilación de p38, un componente de la vía de señalización de MAPK, y como

consecuencia, también promueve la proliferación celular (38). Por otra parte, en un segundo estudio llevado a cabo en el mismo tipo celular, se realizaron ensayos que muestran la interacción entre TRIM7, mediada por su dominio B30.2, y el dominio SH2 de la tirosina quinasa Src. Esto resulta en la poliubiquitinación de Src y su posterior degradación por la vía del proteasoma. Al interferir en la vía de señalización que involucra a Src, TRIM7 tiene un efecto supresor de tumor (39), contrario al observado en el primer estudio sobre la función de TRIM7 en este tipo de cáncer.

TRIM7 cumple también diferentes roles en inmunidad al tener efecto protector contra cepas de norovirus de ratón, para lo cual se requiere el dominio RING y la capacidad que este otorga para transferir ubiquitina (40). Contrariamente, en un estudio más reciente se observó que TRIM7 media la poliubiquitinación de la proteína E de envoltura del virus Zika, lo que promueve la replicación viral (41); y que este efecto proviral sería dominante sobre la actividad antiviral (42) previamente descrita. Más aún, se ha encontrado evidencia de que TRIM7 también promueve la poliubiquitinación y posterior degradación dependiente del proteasoma de la proteína MITA, que interviene en vías de señalización antiviral (42) y de la proteína 2BC que es crítica en el ciclo de replicación de múltiples enterovirus (43).

Otros antecedentes muestran que TRIM7 puede también promover la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  inducida por el lipopolisacárido bacteriano. Adicionalmente, los datos presentados en el mismo trabajo indican que el dominio RING es la región esencial para la respuesta inmune innata desencadenada por receptores tipo *toll*/TLR4 (44).

Más aún, TRIM7 tiene una función promotora de la proliferación y migración de células de músculo liso vascular, que es dependiente de la activación de la vía c-Jun/AP-1 descrita anteriormente (34), favoreciendo por lo tanto la formación de lesiones en aterosclerosis (45).

Como todo lo descrito indica, TRIM7 está involucrada en una gran variedad de procesos. En lo que respecta a las proteínas con las que interacciona, las que se conocen hasta el momento son destinadas a la degradación, excepto en el caso de RACO-1 que es estabilizada para cumplir una función no proteolítica. En el caso particular de glucogenina-1, solo ha sido probada su interacción con TRIM7; además del efecto sobre su actividad que tiene la isoforma GNIP2.

Si bien no ha sido comprobado en todos los estudios realizados con TRIM7, los antecedentes de otros miembros de la familia sugieren que en los procesos que la proteína participa serían necesarios el dominio RING, para cumplir con el rol de E3 ligasa observado, y el dominio C-terminal (B30.2) que es responsable de la especificidad respecto a sus sustratos.

Dado que TRIM7 presenta potencial de emerger como blanco terapéutico por su carácter de E3 ligasa e intervención en múltiples procesos patológicos, en el presente trabajo se buscó caracterizar la estructura del dominio B30.2 de TRIM7, y su interacción con glucogenina-1. Esto último resulta

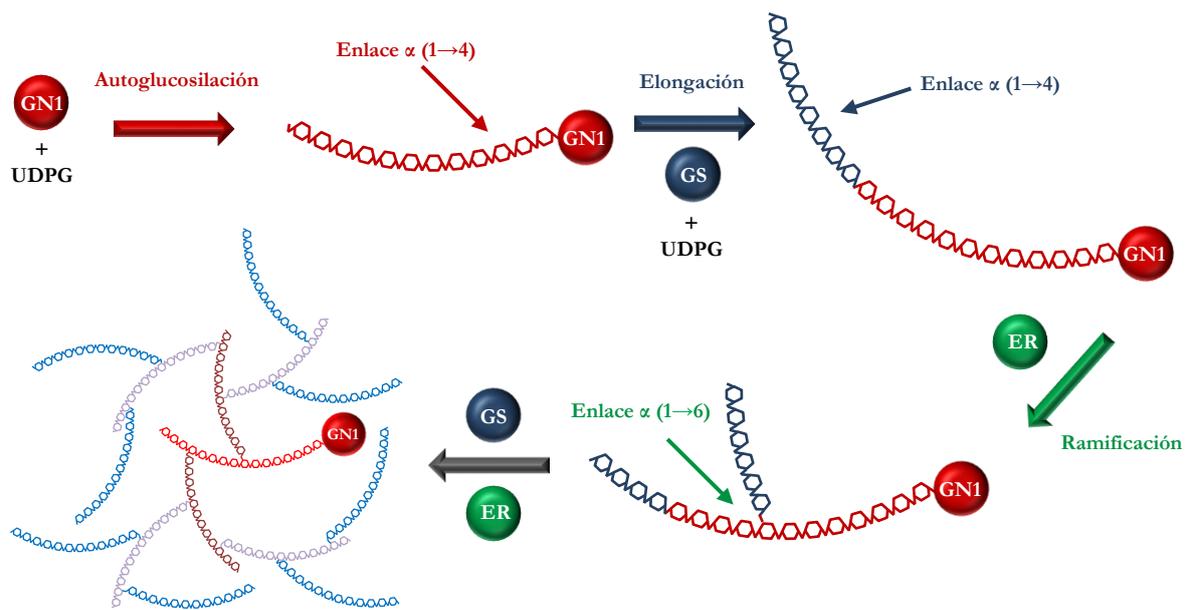
de particular interés, ya que glucogenina-1 no se encuentra relacionada a las funciones usualmente asociadas a las proteínas TRIM.

## **-Glucogenina-1 y la glucogenosis tipo XV**

Glucogenina-1 es una enzima de la familia de glicosiltransferasas GT8 que tiene la capacidad de catalizar su autoglucosilación y es responsable de la etapa inicial de la biosíntesis *de novo* del glucógeno, permaneciendo luego unida al polisacárido. El glucógeno es un biopolímero de glucosa que en bacterias y animales se utiliza como fuente de almacenamiento de energía para estar rápidamente disponible según la demanda de los diferentes tejidos, además de tener un rol clave en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Estructuralmente, se define como un homopolisacárido ramificado de estructura similar a la amilopectina, pero con mayor frecuencia de ramificaciones (46, 47).

Como todos los miembros de la familia GT8, glucogenina-1 utiliza un mecanismo catalítico que conserva la configuración  $\alpha$ -anomérica del sustrato dador del azúcar en el producto (*retaining mechanism*). En una primera etapa, usando principalmente uridina di fosfato-glucosa (UDPG) como sustrato dador del carbohidrato y de una manera dependiente de la presencia de un catión divalente, glucogenina-1 forma una cadena de aproximadamente 13 unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) sobre su residuo Tyr195 (48). Esta cadena actúa como sustrato para la enzima glucógeno sintasa, que media su elongación empleando también UDPG como sustrato dador (Figura I.8). Posteriormente, la enzima ramificante cataliza la hidrólisis de un fragmento de 6-7 residuos de glucosa del extremo no reductor de una cadena lineal del glucógeno y su transferencia a otra posición en la misma cadena o en otra, mediante la formación de un enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). La acción conjunta de glucógeno sintasa y la enzima ramificante completa la síntesis de la molécula de glucógeno bajo la forma de proteoglucógeno, cuya estructura contiene a glucogenina-1 unida al extremo reductor del polisacárido (ref. 48-50, Figura I.8).

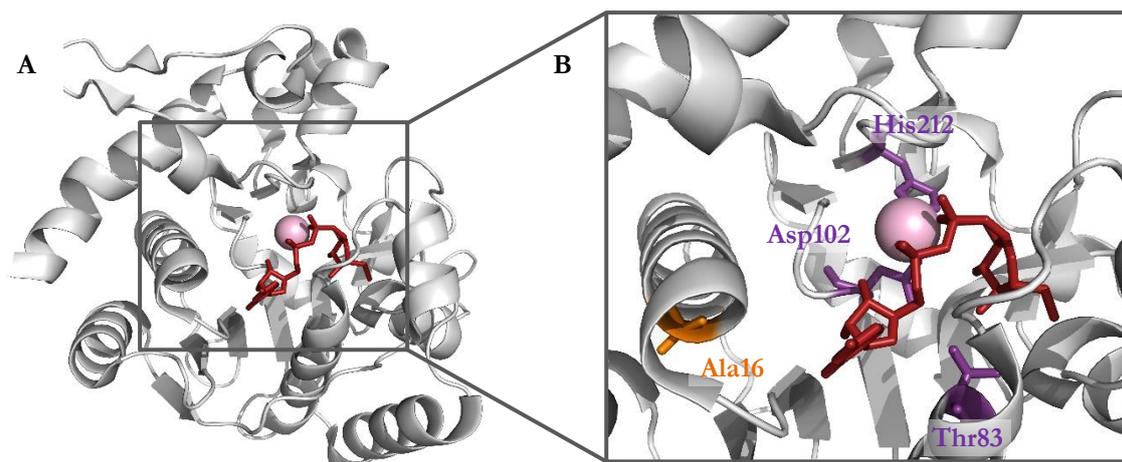
El mecanismo propuesto para la reacción de autoglucosilación involucra la transferencia entre subunidades de una estructura dimérica, aunque recientemente se ha encontrado evidencia de que la forma monomérica también es capaz de incorporar unidades de glucosa en una reacción intramolecular (51, 52). Luego de ocurrida la reacción intersubunidad, glucogenina-1 continúa la glucosilación mediante una reacción intrasubunidad, y la combinación de los dos tipos de reacciones es necesaria para la glucosilación total de ambas subunidades del dímero de la proteína (53).



**Figura I.8. Esquema de la biosíntesis del glucógeno.** Glucogenina-1 (GN1), en presencia de UDPG, cataliza su autoglucosilación hasta formar una cadena de ~13 residuos de glucosa. En este punto, glucógeno sintasa (GS), también en presencia de UDPG, media la elongación de dicha cadena y finalmente la enzima ramificante (ER) cataliza la formación de ramificaciones al transferir segmentos de 6-7 residuos de glucosa a los grupos C6-OH de residuos de glucosa en la misma u otra cadena. La estructura completa del glucógeno contiene a GN1 unida a su extremo no reductor. En la figura se representan 4 capas de ramificaciones del polisacárido.

La estructura de la proteína obtenida mediante cristalografía de rayos X (Figura I.9 A), que corresponde a los aminoácidos 1-262 de la secuencia completa de 333 aminoácidos, se caracteriza por un único dominio de plegamiento tipo Rossmann  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  N-terminal y posee un motivo canónico DXD donde se une el catión divalente, lo que es esencial para la unión del sustrato (54). El hecho de que dicha estructura no incluya los últimos aminoácidos de la proteína, se debe a que este fragmento es fácilmente degradado por una actividad proteolítica desconocida, dando origen a una especie truncada más estable que aún conserva la actividad autoglucosiltransferasa de la enzima entera (52, 54). De esta región C-terminal, se conoce además que los últimos 33 residuos participan en la interacción con la glucógeno sintasa (55).

En humanos, además de glucogenina-1, que tiene un amplio patrón de expresión, se ha descrito una segunda proteína con la capacidad para autoglucosilarse denominada glucogenina-2, cuya expresión se observa en hígado y corazón, pero no en tejido muscular esquelético de individuos sanos. Glucogenina-2 compensaría la deficiencia de glucogenina-1 en pacientes que padecen un trastorno genético extremadamente raro llamado glucogenosis tipo XV, originado por mutaciones en el gen GYG1 que codifica para esta proteína (47, 56).



**Figura I.9. Estructura cristalográfica de glucogenina-1 humana.** (A) La proteína se observa en representación de cintas color gris con el ligando UDP-glucosa en color rojo en forma de bastones y el cofactor  $Mn^{2+}$  como una esfera en color rosado (cadena A, aminoácidos 1-262, código de PDB: 3T7O). (B) Los residuos Ala16 (color naranja), Thr83, Asp102 e His212 (color violeta) se muestran representados como bastones.

Figura creada con PyMOL (Schrödinger LLC; <http://www.pymol.org>).

Las glucogenosis o enfermedades de almacenamiento de glucógeno son una serie de desórdenes metabólicos hereditarios que involucran a las enzimas responsables de la síntesis, regulación y degradación del glucógeno (57).

En particular, los pacientes con glucogenosis tipo XV no almacenan glucógeno debido a una deficiencia en glucogenina-1, aunque en la mayoría de los casos acumulan un polisacárido de estructura anormal con menor grado de ramificación denominado poliglucosano, cuyo origen se desconoce (57). Hasta la fecha se han reportado los casos de 22 pacientes en todo el mundo, que en edad tardía manifiestan síntomas de la enfermedad que, generalmente, cursa con debilidad muscular progresiva (56). Algunos de estos casos corresponden a mutaciones con cambio de sentido en el gen *GYG1*, que producen la alteración de los aminoácidos altamente conservados Thr83, Asp102 e His212 (Figura I.9 B). Si bien en estos pacientes se ha detectado la expresión de las variantes de glucogenina-1 (c.248C>T, p.Thr83Met), (c.304G>C, p.Asp102His), y (c.634C>T, p.His212Tyr), las mutaciones causan la pérdida de la actividad de autoglucosilación (58-60). Otro caso reciente que resultó homocigota para una variante de la proteína con cambio de sentido (c.46G>C, p.Ala16Pro), corresponde a un paciente que exhibió miopatía esquelética con acumulación de poliglucosano en las fibras musculares (61). Sin embargo, a diferencia de los aminoácidos antes mencionados, Ala16 (Figura I.9 B) presenta un menor grado de conservación, mientras que la variante Ala16Pro resultó inactiva en ensayos de autoglucosilación *in vitro*, pero no se detectó su presencia en tejido muscular esquelético (61).

Por estos motivos, de las mutantes de glucogenina-1 que son estudiadas en el laboratorio, en otra parte de este trabajo, resultó de particular interés analizar el efecto de la sustitución Ala16Pro sobre la estructura y propiedades catalíticas de la proteína con el fin de comprender su rol en la patología mencionada.

Considerando además que, la función más común de las proteínas de la familia TRIM es su rol como E3 ligasas de ubiquitina, y que solo se ha descrito la estimulación de la actividad de glucogenina-1 por la isoforma GNIP2 de TRIM7, la parte final este trabajo de tesis fue dedicada a estudiar el efecto que esta E3 ligasa podría tener sobre glucogenina-1 silvestre y sus mutantes patológicas.

## **-Objetivo general**

Determinar las bases moleculares de la interacción entre la enzima E3 ligasa TRIM7 y glucogenina-1, y de la deficiencia funcional de la mutante Ala16Pro de esta última, con la finalidad de generar un aporte a la comprensión del rol fisiológico de dicha interacción en el contexto de la glucogenosis tipo XV.

Realizada la descripción de antecedentes que establecen el marco teórico en el que se sitúa el estudio, se encuentran diferentes secciones de resultados, dispuestas como capítulos, que incluyen su correspondiente detalle experimental, la discusión acerca de la interpretación de los mismos y el análisis de su implicancia. La primera de estas secciones se enfoca en el estudio estructural del dominio B30.2 de TRIM7 y su interacción con glucogenina-1. La siguiente está dedicada a un análisis sobre la mutante patológica Ala16Pro de glucogenina-1 de conejo, que presenta una alta homología de secuencia con la proteína humana. Por último, se encuentra una sección relacionada a la actividad E3 ligasa de TRIM7 y su posible rol funcional sobre glucogenina-1 humana y mutantes patológicas de esta última.

# **-Capítulo I-**

**Estudio cristalográfico del dominio B30.2  
de TRIM7 y análisis mutacional de su interacción  
con glucogenina-1**

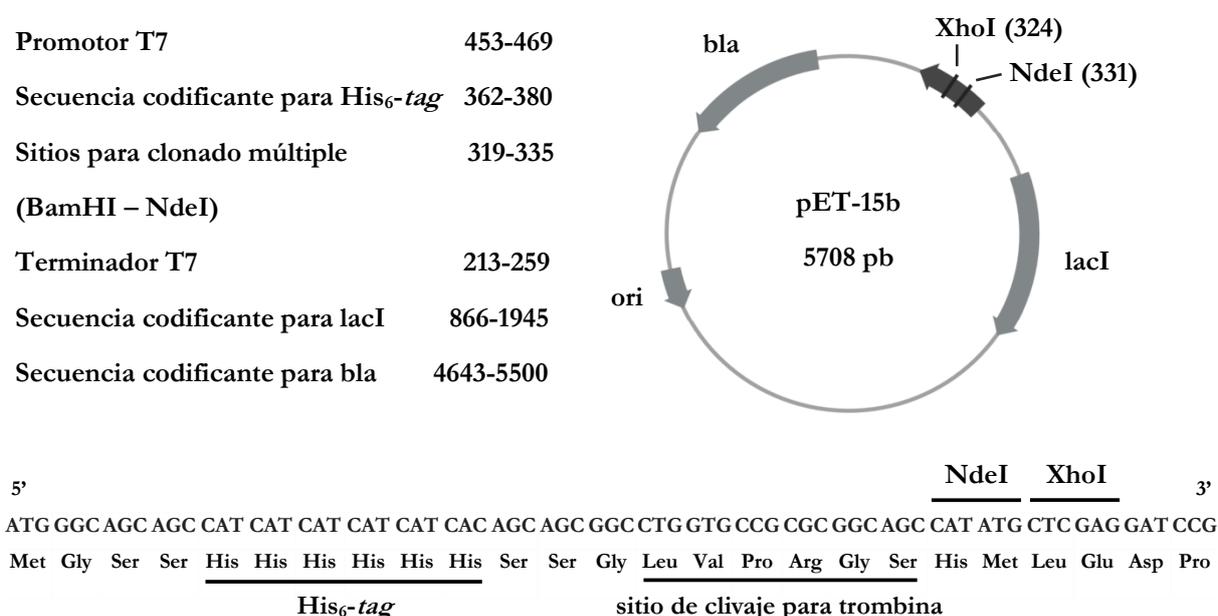
## **-I.A. Objetivos**

El primer objetivo de esta sección consiste en caracterizar estructuralmente al dominio B30.2 de TRIM7 (TRIM7<sup>B30.2</sup>). Dado que este dominio es necesario para la interacción con glucogenina-1 humana (GN1), otro objetivo es conocer el efecto que dicha interacción tiene sobre la función de GN1. Como últimos objetivos, se plantea establecer la región de GN1 necesaria para su reconocimiento por parte de TRIM7<sup>B30.2</sup> y definir la región de TRIM7<sup>B30.2</sup> involucrada en dicha interacción.

## -I.B. Procedimientos experimentales

### -I.B.1. Construcción de vectores de expresión

Los ADNc que codifican para el dominio B30.2 de TRIM7 (aminoácidos 338 a 510, Introducción, Figura I.6) y para glucogenina-1, ambas humanas, fueron subclonados en el plásmido pET-15b, en los sitios para las enzimas de restricción XhoI y NdeI, río abajo de la secuencia que codifica para una etiqueta de hexahistidina, o *His<sub>6</sub>-tag* (Figura 1.1), para obtener las construcciones pET-TRIM7<sup>B30.2</sup> y pET-GN1.

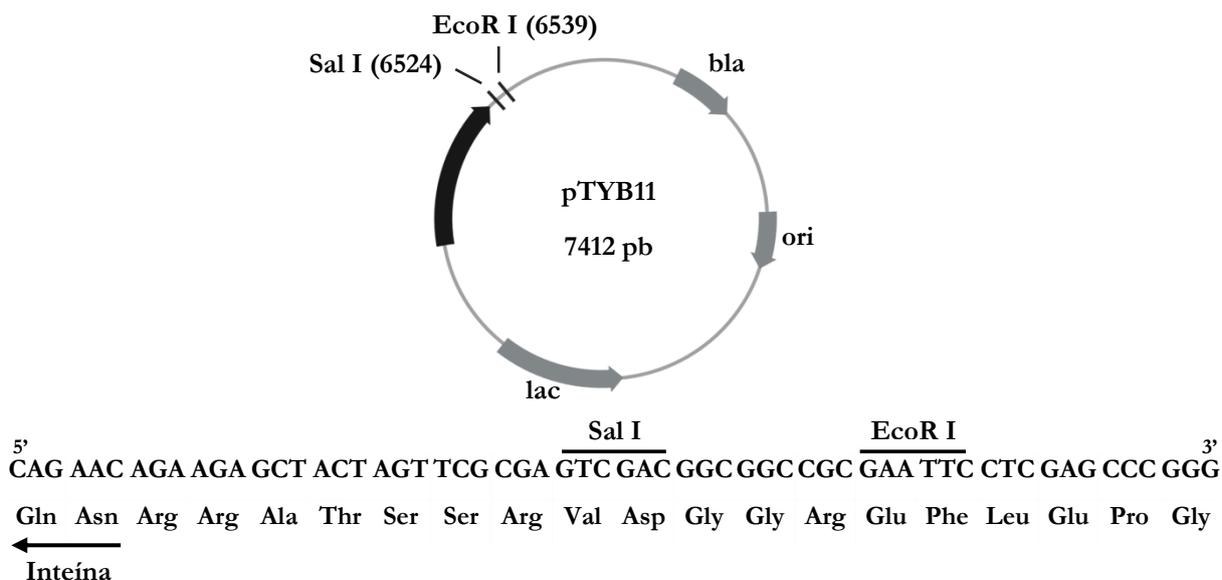


**Figura 1.1. Esquema del plásmido pET-15b.** El plásmido pET-15b codifica para un sitio de reconocimiento por trombina que permite separar a la proteína de interés del *His<sub>6</sub>-tag* N-terminal. Además, posee la secuencia de una  $\beta$ -lactamasa (*bla*) que permite seleccionar bacterias que incorporen el plásmido con ampicilina. Abreviaturas: pb; pares de bases.

Figura adaptada de “DNA Cloning Vectors” por BioRender.com (2021). Extraído de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

El ADNc para glucogenina-1 humana fue además introducido en el plásmido pTYB11 (Figura 1.2), incluido en el kit IMPACT-CN (New England Biolabs), en los sitios para las enzimas de restricción Sall y XhoI, río abajo de la secuencia que codifica para el segmento autoclivable inteína.

La construcción pTYB11-GN1 utilizada para la expresión de inteína junto a un dominio de unión a quitina y fusionada a glucogenina-1, previamente obtenida en el laboratorio, fue utilizada como molde para generar las mutantes truncadas en el aminoácido 270 y en el aminoácido 300; de ahora en más inteína-GN1, inteína-GN1 $\Delta$ C63 e inteína-GN1 $\Delta$ C33. Dichas mutantes fueron obtenidas mediante el Protocolo 1.1 de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



**Figura 1.2. Esquema del plásmido pTYB11.** El plásmido pTYB11 contiene una secuencia que codifica para el elemento inteína y un dominio de unión a quitina en posición N-terminal respecto al inserto de interés; además codifica para una  $\beta$ -lactamasa como el plásmido pET-15b.

Figura adaptada de “DNA Cloning Vectors” por BioRender.com (2021). Extraído de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

### Protocolo 1.1. PCR para subclonado:

- |                              |                     |
|------------------------------|---------------------|
| 1-Desnaturalización del ADN  | 95 °C durante 5 min |
| 2-Desnaturalización del ADN  | 95 °C durante 1 min |
| 3-Hibridación de iniciadores | 58 °C durante 30 s  |
| 4-Elongación de cadena       | 72 °C durante 2 min |
- Los pasos 2 a 4 fueron repetidos durante 30 ciclos.
- |    |                      |
|----|----------------------|
| 5- | 72 °C durante 10 min |
|----|----------------------|

Utilizando el vector pET-TRIM7<sup>B30.2</sup> como molde, se generaron las mutantes puntuales TRIM7<sup>B30.2</sup>Arg354Ala, TRIM7<sup>B30.2</sup>Glu368Ala, TRIM7<sup>B30.2</sup>Thr384Ala, TRIM7<sup>B30.2</sup>Leu423Ala, TRIM7<sup>B30.2</sup>Asn438Ala, TRIM7<sup>B30.2</sup>Ser499Ala y TRIM7<sup>B30.2</sup>Cys501Ser.

Todas las construcciones para expresar las proteínas mutantes fueron obtenidas utilizando el kit QuickChange de mutagénesis sitio dirigida (Agilent Technologies). El protocolo de PCR recomendado por el manual de dicho kit, fue adaptado considerando el tamaño de cada plásmido empleado como molde (Protocolo 1.2).

Las secuencias de oligonucleótidos iniciadores empleados tanto en los subclonados como en las mutagénesis sitio dirigidas fueron sintetizadas por Invitrogen (Tabla 1.1).

**Protocolo 1.2. PCR para mutagénesis sitio dirigida:**

1-Desnaturalización del ADN	95 °C durante 1 min
2-Desnaturalización del ADN	95 °C durante 30 s
3-Hibridación de iniciadores	55 °C durante 1 min
4-Elongación de cadena	68 °C durante 13 min

Los pasos 2 a 4 fueron repetidos durante 12 ciclos.

**Tabla 1.1.** Iniciadores directos y reversos en sentido 5' a 3' utilizados para obtener las diferentes proteínas.

Proteína	Iniciador directo	Iniciador reverso
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Arg354Ala	5' GACACGGCAAATCCGG CCCTGATCTTGCTCTG 3'	5' CAGAGACAAGATCAGG GCCGGATTGCCGTGTC 3'
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Glu368Ala	5' CGTTCGTCIGGGAGC AAGAGCGCAGGATTTG 3'	5' CAAATCCTGCGCTCT TGCTCCAGACGAACG 3'
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Thr384Ala	5' AGATTTGACACAAATG CGCGCGTGCTGGCTTCC 3'	5' GGAAGCCAGCACGCGC GCATTTGTGTCAAATCT 3'
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Leu423Ala	5' CGCCGTAAGGGCG CAACCCATTCACT 3'	5' AGTGAATGGGGTC GCGCCCTTACGGCG 3'
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Asn438Ala	5' CTGGGCGCTGCAATTG GCCGGTGGCCAATACTGG 3'	5' CCAGTATTGGCCACCG GCCAATTGCAGCGCCAG 3'
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Ser499Ala	5' GTCITTCCACTGTTTG CCGTCTGTAGCACGGG 3'	5' CCCGTGCTACAGACGG CAAACAGTGGAAAGAC 3'
TRIM7 <sup>B30.2</sup> Cys501Ser	5' CACTGTTTAGCGTCTC TAGCACGGGCACTTAC 3'	5' GTAAGTGCCGTGCTA GAGACGCTAAACAGTG 3'
Inteína-GN1ΔC63	5' GGTGGTGTGCGACATGACA GATCAGGCCTTTGTGACA 3'	5' GGTGGTCTCGAGCTAGCA GGTGTCTTTGACAAGGCC 3'
Inteína-GN1ΔC33		5' GGTGGTCTCGAGCTACTA GGATACAAACGGCTGTGCCAT 3'

**-I.B.2. Expresión y purificación de proteínas**

Todas las proteínas fueron expresadas en bacterias *E. coli* Rosetta 2(DE3), previamente transformadas con la construcción correspondiente. Dichas bacterias fueron crecidas en medio LB (Anexo) hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,6-1,0; momento en que se indujo la expresión de las proteínas por la adición de 150 μM de IPTG y la posterior incubación a 18°C durante 16 h. Luego, las células fueron cosechadas por centrifugación a 4500 x g y lisadas por alta presión en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/NaCl 500 mM, utilizando el homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin). GN1, TRIM7<sup>B30.2</sup> y las variantes mutantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. Para ello, los extractos solubles de las bacterias fueron sembrados en una columna de agarosa-Ni<sup>2+</sup>-ácido nitrilo triacético (NTA) HisTrap HP (GE Life Sciences) y las proteínas fueron eluidas con un gradiente de imidazol. Las fracciones conteniendo las proteínas fueron concentradas en una unidad Amicon para filtración (Millipore) y luego se procedió a remover las sales mediante

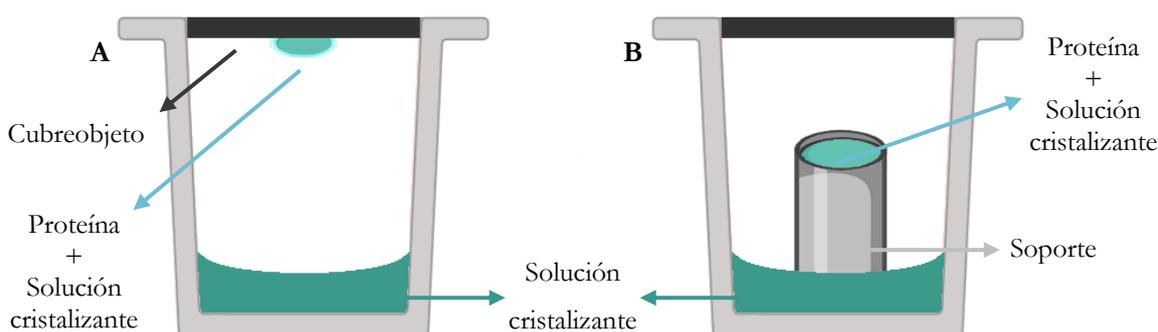
sucesivos pasos de dilución y concentración en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4. TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre fue posteriormente sometida a una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Life Sciences) en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/NaCl 150 mM/ $\beta$ ME 10 mM y luego desalada siguiendo el procedimiento descrito previamente. Todas las proteínas en su forma silvestre y sus diferentes variantes fueron almacenadas a 4 °C. En el caso de las proteínas que fueron utilizadas en los experimentos de *pull-down*, los cultivos de las bacterias expresando TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre, sus variantes mutantes, inteína, inteína-GN1 y sus variantes de delección fueron lisados en buffer PBS con una mezcla de inhibidores de proteasas (Amersham) y los extractos solubles conservados a 4°C para su uso inmediato. El nivel de pureza de las proteínas fue corroborado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Los coeficientes de extinción molar teóricos para TRIM7<sup>B30.2</sup> y GN1 (33460 y 56380 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, respectivamente) fueron calculados con la herramienta ProtParam (62) y empleados para la cuantificación de las proteínas a través de su absorbancia a 280 nm, que fue registrada en un espectrofotómetro BioSpec-mini UV/VIS (Shimadzu) por triplicado.

### **-I.B.3. Cristalización, obtención de los datos de difracción y resolución de la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup>**

TRIM7<sup>B30.2</sup> fue concentrada a 5 mg/ml en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/ $\beta$ ME 10 mM/TCEP 1 mM, mientras que  $\beta$ ME fue incluido desde la purificación para prevenir la precipitación de la proteína que ocurre cuando se encuentra a altas concentraciones. Las pruebas de cristalización fueron llevadas a cabo empleando el método de difusión de vapor en gota colgante (Figura 1.3 A) a 10 °C utilizando los kits de soluciones comerciales Classics, Classics II, PACT y Protein Complex (Qiagen), que corresponden a un total de 384 condiciones diferentes. Para ello, la solución de proteína fue mezclada con cada una de las soluciones en iguales volúmenes (1-2  $\mu$ l) en un cubreobjeto que luego fue ubicado sobre un pocillo conteniendo 250  $\mu$ l de la solución cristalizante.

En los primeros ensayos, se obtuvieron microcristales en una condición que contenía malonato de sodio 1,4 M a pH 6. Con la intención de aumentar el tamaño de dichos cristales, se emplearon diferentes estrategias y con dos de ellas se consiguió el objetivo deseado. En la primera con el método de difusión de vapor en gota colgante, la solución de proteína fue concentrada a 10 mg/ml y mezclada con malonato de sodio 1,4 M a pH 6 en iguales volúmenes suplementando glicerol 3%. En la segunda, se utilizó el método de difusión de vapor en gota sentada, que permite usar un volumen mayor de muestra (Figura 1.3 B) con la proteína concentrada a 5 mg/ml.



**Figura 1.3. Diseño experimental para las pruebas de cristalización con el método de difusión de vapor (A) en gota colgante y (B) en gota sentada.** La mezcla de solución de proteína y el cristalizante, se coloca sobre un cubreobjeto (A) o un soporte (B) en un pocillo conteniendo la solución cristalizante y el sistema es sellado luego con aceite de inmersión. Para alcanzar el equilibrio, el vapor de agua difunde desde la gota hacia el reservorio, lo que resulta en un incremento en la concentración de la muestra. Durante este proceso es esperable que los cristales crezcan al llegar a una concentración de proteína y del cristalizante apropiada.

Figura creada con BioRender.com.

Los cristales obtenidos en ambas condiciones fueron crioprottegidos sumergiéndolos en una mezcla conteniendo la solución de cristalización al 85% y glicerol 15% antes de ser congelados. Los datos fueron obtenidos a 100 K en la línea MX2 de cristalografía de macromoléculas (longitud de onda 1,4586 Å) del *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron* (LNLS; Campinas, Brasil).

Los datos de difracción fueron integrados y escalados utilizando iMOSFLM (63) y AIMLESS (64), del conjunto de programas CCP4 para el procesado de los datos de cristalografía (65).

Para la resolución de la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> a partir de los datos de los cristales crecidos en la condición de gota colgante, se utilizó el método de reemplazo molecular con el programa PHASER (66) empleando las coordenadas del dominio homólogo B30.2 de butirofilina 3A1 (cadena A, código de PDB: 4N7I, ref. 67) como modelo de búsqueda. El modelo resultante fue ajustado a la densidad electrónica experimental por repetidos ciclos de manipulación manual y refinamiento realizados con los programas COOT (68) y REFMAC5 (69), respectivamente. Las moléculas de ligando y solvente fueron añadidas al modelo en la etapa final del refinamiento basándose en la examinación de los mapas de diferencia de densidad electrónica. En cambio, para la resolución de la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> a partir de los datos de los cristales crecidos en la condición de gota sentada, se utilizó el método de reemplazo molecular utilizando las coordenadas de la estructura resuelta a partir de los cristales crecidos en la condición de gota colgante. El análisis y la comparación de estructuras se realizó con el servidor Dali (70), el empaquetamiento cristalino y la estructura cuaternaria fueron analizados con el programa Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (PISA, ref. 71) y los contactos directos con el algoritmo Ligplot (72). Las secuencias de

aminoácidos fueron alineadas con el programa Clustal Omega (73) y el servidor ConSurf fue utilizado para el análisis de conservación de secuencia (74). El programa Dictionary of Protein Secondary Structure (DSSP) fue utilizado para asignar los elementos de estructura secundaria (75). Las figuras fueron generadas utilizando PyMOL (Schrödinger LLC; <http://www.pymol.org>) y los cálculos de superficie electrostática fueron llevados a cabo utilizando el *plugin* APBS de PyMOL (76).

#### **-I.B.4. Espectroscopía de dicroísmo circular**

Las mezclas de GN1 y el dominio B30.2 de TRIM7 en diferentes relaciones molares para una concentración total de 0,25 mg/ml, fueron preparadas en Tris-HCl 20 mM pH 7,4 en presencia y ausencia de  $\beta$ ME 10 mM. Luego, fueron recolectados los espectros de las proteínas por separado, a la misma concentración que se encontraban en la mezcla. Adicionalmente, los espectros individuales de TRIM7<sup>B30.2</sup> purificada en  $\beta$ ME 10 mM, sin reductor y de todas las mutantes preparadas fueron medidos a 0,25 mg/ml. Para la recolección de los espectros de todas las muestras, fue utilizado un espectropolarímetro JASCO J810 (Jasco) y cubetas de cuarzo de 0,2 cm de paso óptico. Los espectros representan el promedio de cinco escaneos en la región ultravioleta lejano (190-260 nm) con un ancho de banda de 2,0 nm, en pasos de 0,2 nm y con un tiempo de respuesta de 8 s. Las mediciones fueron corregidas sustrayendo las señales del control correspondiente al buffer sin proteína.

#### **-I.B.5. Ensayos de *pull-down***

La interacción entre las diferentes variantes de GN1 y TRIM7<sup>B30.2</sup> fue analizada mediante ensayos de *pull-down*. Para esto, se eligió la estrategia de inmovilizar en una resina de quitina las diferentes versiones de GN1 fusionadas a inteína con un dominio de unión a quitina en su extremo N-terminal (Sección I.B.1). Más específicamente, se utilizaron los extractos solubles de bacterias en buffer PBS (Anexo) expresando las diferentes versiones de GN1 fusionada a inteína (inteína-GN1, inteína-GN1 $\Delta$ C63, inteína-GN1 $\Delta$ C33) e inteína sola. Dichos extractos fueron incubados con 40  $\mu$ l de resina de quitina durante 1 h a 4°C, seguido de tres lavados con buffer PBS. Luego, las resinas con cantidades molares similares de las diferentes versiones de GN1 inmovilizadas, fueron incubadas durante 2 h a 4°C con 50  $\mu$ l del extracto de bacterias expresando TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre. Un procedimiento similar se utilizó para analizar la interacción entre GN1 y las diferentes mutantes de TRIM7<sup>B30.2</sup>. En tanto, las resinas con cantidades molares similares de inteína e inteína-GN1 fueron incubadas durante 2 h a 4°C con 50  $\mu$ l del extracto de bacterias correspondiente a las diferentes mutantes de TRIM7<sup>B30.2</sup>. A continuación, las resinas fueron lavadas tres veces con buffer

PBS (Anexo) y luego del agregado de buffer de carga 3X (Anexo), fueron calentadas a 100 °C durante 5 min para su posterior análisis por inmunoblot.

Para emplear cantidades equivalentes de las variantes de GN1 inmovilizadas, o de TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre y sus mutantes, se realizó un análisis por inmunoblot con el programa ImageJ (77).

Para determinar si TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre y sus mutantes interaccionaron con las variantes de GN1 empleadas en cada experimento de *pull-down*, las muestras resultantes de la incubación con la enzima inmovilizada en la resina de quitina fueron sometidas a SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de PVDF en buffer de transferencia (Anexo). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas en buffer TBS (Anexo)/leche 1% incubadas con un anticuerpo primario *mouse* anti-His<sub>6</sub>-tag y secundario *goat* anti-*mouse* IgG IRDye® 800, utilizando el sistema de imagen en infrarrojo Odyssey (LI-COR Biosciences). Para obtener una imagen de las diferentes proteínas inmovilizadas como control de la siembra en el gel, las membranas fueron lavadas con solución Tris-HCl 20 mM pH 7,5/NaCl 150 mM/Tween-20 0,2 %, teñidas con solución de Coomassie Brilliant Blue (Anexo) por 1 min, desteñidas en etanol 50%/ácido acético 10%, lavadas con agua y secadas.

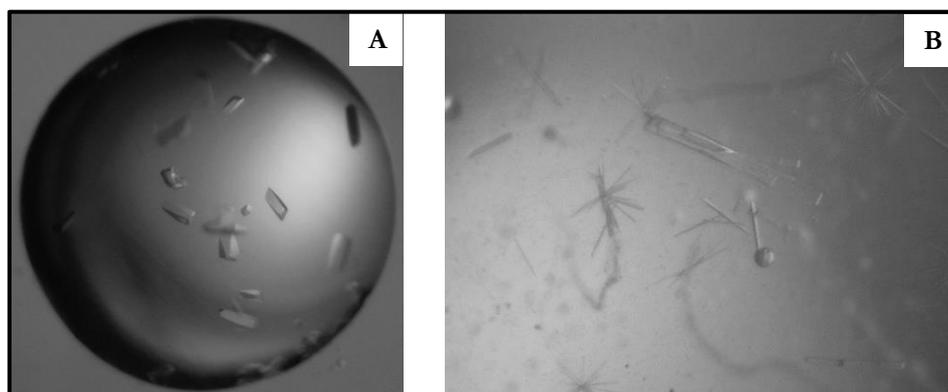
#### **-I.B.6. Ensayo de autoglucosilación de glucogenina-1 en presencia de TRIM7<sup>B30.2</sup>**

La actividad de autoglucosilación de glucogenina-1 fue determinada como la cantidad de [<sup>14</sup>C] glucosa incorporada por la enzima. Para esto, GN1 (2,5 μM) fue incubada con TRIM7<sup>B30.2</sup> a diferentes relaciones molares, en un volumen final de 10 μl de una mezcla que además contenía MES 100 mM pH 7,0/MnSO<sub>4</sub> 5 mM/UDP-[<sup>14</sup>C]glucosa 80 μM a 30° C durante 5 min y por triplicado. La reacción fue detenida con el agregado de 6 μl de albúmina sérica bovina 10% p/v y 1 μl de EDTA 0,5 M, seguido de la adición en frío de 200 μl de ácido tricloroacético 10%/ácido fosfotúngstico 1%, que precipitó la mezcla de proteínas. Las muestras fueron incubadas en hielo durante 5 min y centrifugadas a 16000 x g durante 3 min. Para eliminar el material radiactivo libre fueron realizados tres pasos de resuspensión por sonicación del precipitado en ácido tricloroacético 5%/ácido fosfotúngstico 0,5%, seguido de centrifugación a 16000 x g durante 3 min. Los precipitados finales conteniendo la proteína [<sup>14</sup>C]glucosilada fueron resuspendidos en 0,2 ml de Tris 20 mM/SDS 10%, y este material fue mezclado con 0,8 ml de solución de centelleo Optiphase HiSafe 3 (Perkin Elmer). La cantidad de [<sup>14</sup>C]glucosa incorporada en GN1 fue determinada utilizando un contador de centello líquido Wallac 1214 Rackbeta (Wallac) (78).

## -I.C. Resultados

### -I.C.1. Análisis estructural de TRIM7<sup>B30.2</sup>

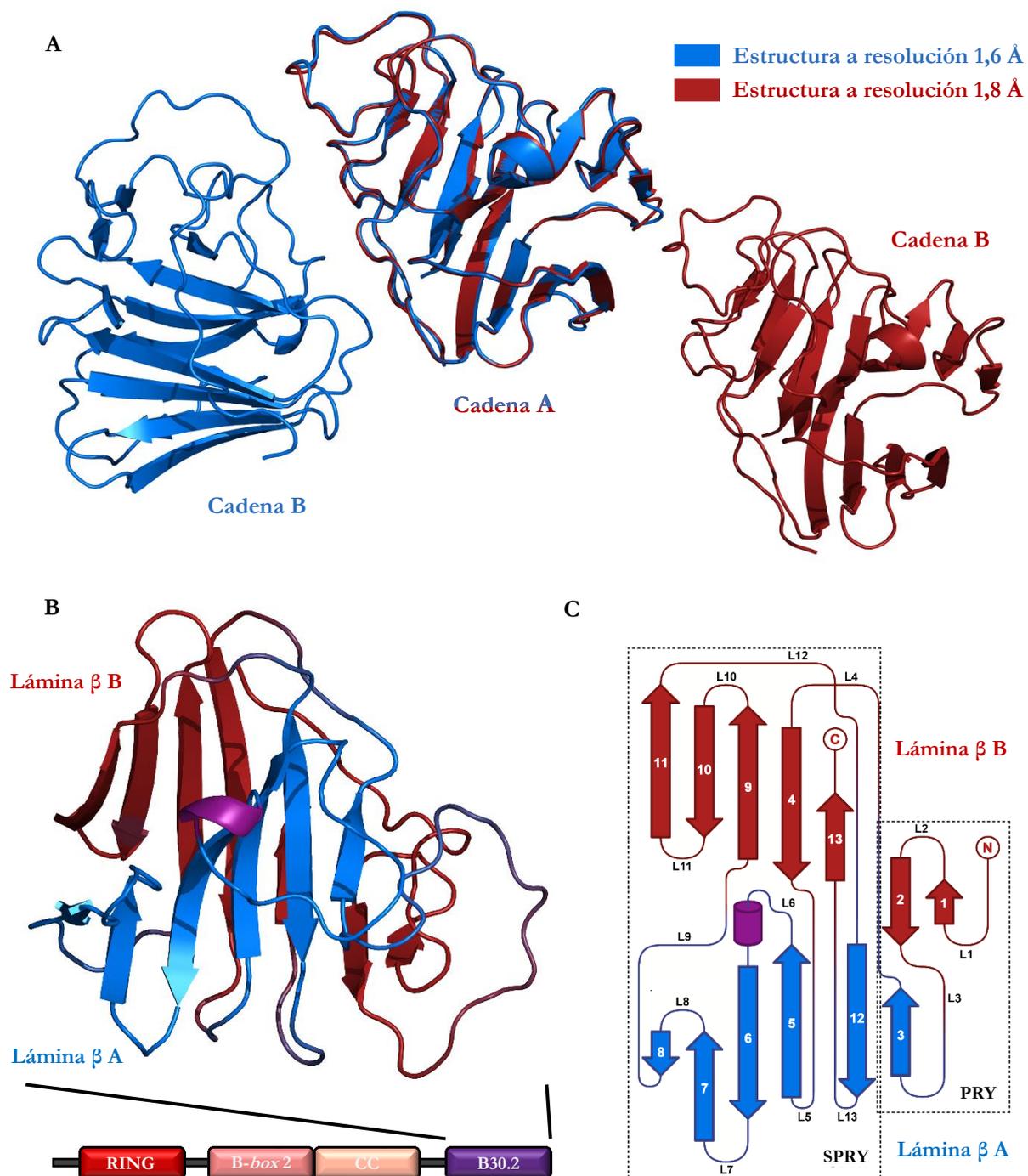
Para determinar la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> humana por cristalografía de rayos X, primeramente se realizaron pruebas de cristalización en múltiples condiciones. Transcurrida una semana, se observaron pequeños cristales en una condición que contenía malonato de sodio 1,4 M a pH 6. En el intento de obtener cristales de mayor tamaño se realizaron pruebas haciendo variaciones a dicha condición y utilizando tanto el método de difusión de vapor en gota colgante como en gota sentada. En dos de esas condiciones, la primera correspondiente al método de gota colgante y concentración inicial de proteína de 10 mg/ml y suplementando glicerol 3%, y la segunda correspondiente al método de gota sentada con la concentración inicial a 5 mg/ml, crecieron cristales lo suficientemente grandes para ser empleados en los experimentos de difracción de rayos X (Figura 1.4). Dichos experimentos fueron realizados en el *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron* (LNLS; Campinas, Brasil) como se detalla en la Sección I.B.3. Los cristales que crecieron mediante el método de gota colgante difractaron a una resolución de 1,6 Å, mientras que los cristales de la condición en gota sentada lo hicieron a 1,8 Å (Tabla 1.2).



**Figura 1.4 Cristales de TRIM7<sup>B30.2</sup>.** Cristales crecidos en malonato de sodio 1,4 M pH 6,0 por el método de difusión de vapor **(A)** en gota colgante con glicerol 3% a 10 mg/ml, **(B)** en gota sentada a 5 mg/ml.

El dominio B30.2 de butirofilina 3A1, una proteína involucrada en la activación de células T  $\gamma\delta$  (ref. 67, BTN3A1<sup>B30.2</sup>), fue utilizado por su alta homología de secuencia (41,3% de identidad) como modelo de búsqueda para la resolución de la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> a 1,6 Å con el método de reemplazo molecular. La estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> a 1,6 Å fue posteriormente utilizada para determinar la estructura a partir de los datos a 1,8 Å (Figura 1.5).

Los cristales crecidos en ambas condiciones pertenecen al grupo espacial ortorrómbico P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, aunque difieren en las dimensiones de la celda unitaria (Tabla 1.2) y presentan dos moléculas en la unidad asimétrica (Figura 1.5 A).



**Figura 1.5. Estructura general de TRIM7<sup>B30.2</sup>.** (A) Superposición de la unidad asimétrica de las estructuras a 1,6 Å (azul) y 1,8 Å (rojo) de resolución. Al superponer las cadenas A de las dos estructuras, se puede observar el arreglo diferente de las cadenas B. (B) Modelo de cintas de la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> en el cual se muestran la lámina- $\beta$  A en azul y la lámina- $\beta$  B en rojo. La estructura secundaria fue asignada con el algoritmo DSSP (75). En la base de la figura se indica la posición de la región B30.2 en la arquitectura de dominios predicha de TRIM7 (31). (C) Diagrama topológico de TRIM7<sup>B30.2</sup> con los elementos de estructura secundaria en el mismo color que en (B). Las regiones correspondientes a los subdominios PRY y SPRY se resaltan en recuadros con línea punteada. Abreviaturas: CC (*coiled coil*), dominio de hélice superenrollada; L, *loop*.

**Tabla 1.2. Estadísticas de la recolección de datos y del refinamiento del modelo.**

	Cristal crecido por el método de gota colgante (Código de PDB: 6UMA)	Cristal crecido por el método de gota sentada (Código de PDB: 6UMB)
Recolección de datos		
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a (Å)	41,94	62,36
b (Å)	62,07	67,44
c (Å)	128,76	85,69
Rango de resolución (Å)	20,69-1,60 (1,63-1,60)	50,42-1,80 (1,84-1,80)
Reflexiones observadas	237684	193627
Reflexiones independientes	44099	33860
R <sub>merge</sub> (%) <sup>a</sup>	4,2 (33,7)	7,6 (54,6)
I/σ	11,3 (1,7)	10,7 (2,9)
Compleitud (%)	97,6 (90,5)	99,6 (97,8)
Refinamiento		
Reflexiones en refinamiento	39306	32144
R <sub>cryst</sub> (%) <sup>b</sup>	17,36	18,41
R <sub>free</sub> (%) (conjunto de datos 5%) <sup>c</sup>	20,35	22,34
r.m.s.d. en longitudes de enlace (Å) <sup>d</sup>	0,012	0,011
r.m.s.d. en ángulos de enlace (°) <sup>d</sup>	1,793	1,685

Los valores en paréntesis corresponden a las capas de mayor resolución.

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum b \sum i | I_{ih} - \langle I_{ih} \rangle | / \sum b \sum i \langle I_{ih} \rangle$  donde  $\langle I_{ih} \rangle$  es la intensidad media de las  $i$  observaciones de la reflexión  $h$ .

<sup>b</sup>  $R_{\text{cryst}} = \sum | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| | / \sum |F_{\text{obs}}|$  donde  $|F_{\text{obs}}|$  y  $|F_{\text{calc}}|$  son las amplitudes de los factores de estructura observadas y calculadas, respectivamente. La sumatoria incluye todas las reflexiones usadas en el refinamiento.

<sup>c</sup>  $R_{\text{free}} = \sum | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| | / \sum |F_{\text{obs}}|$  evaluado para un subconjunto seleccionado al azar del 5% de los datos de difracción no incluidos en el refinamiento.

<sup>d</sup> Desviación del valor cuadrático medio de los valores ideales.

Pese a que el arreglo espacial de las moléculas en los cristales crecidos utilizando el método de gota colgante o de gota sentada es diferente, la estructura de las cuatro moléculas presentes en las unidades asimétricas de los cristales crecidos por ambos métodos es muy similar. Esto se evidencia en los valores de la raíz de la desviación cuadrática media (r.m.s.d.) observados al comparar de a pares las 4 moléculas, que en todos los casos son menores a 0,5 Å. La estructura de la cadena A obtenida a la resolución más alta (1,6 Å, código de PDB: 6UMA) será utilizada de aquí en adelante para la descripción general de TRIM7<sup>B30.2</sup> y los análisis posteriores.

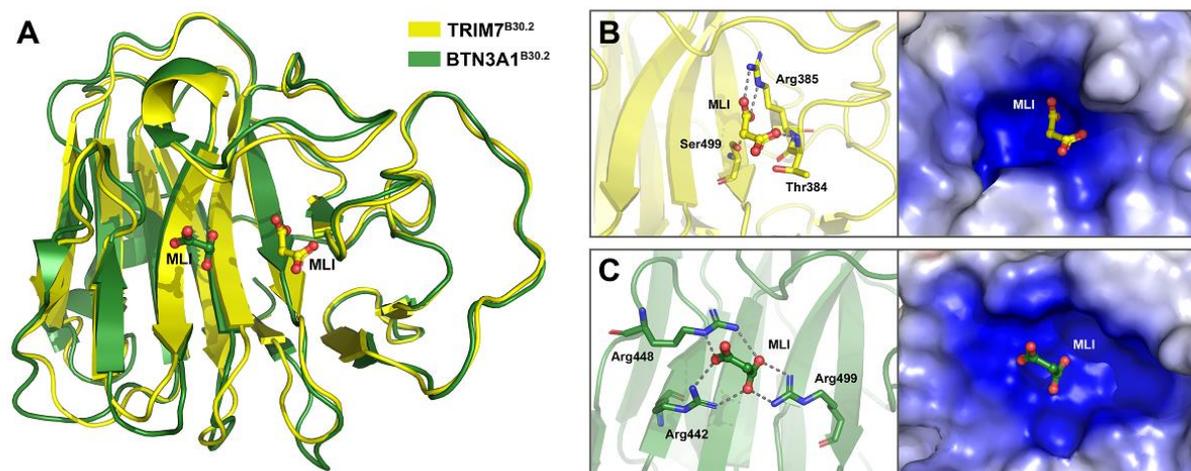
La estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> presenta el plegamiento característico de otros dominios B30.2 que consta de dos láminas  $\beta$  de siete ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 9$ ,  $\beta 10$ ,  $\beta 11$  y  $\beta 13$ ) y seis ( $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ , y  $\beta 12$ ) hebras dispuestas de forma antiparalela en un arreglo de sándwich- $\beta$  distorsionado (Figura 1.5 B y C); además, posee una hélice  $3_{10}$  a continuación de la hebra  $\beta 6$ . La lámina  $\beta$  de 7 hebras forma una superficie levemente convexa en una cara del sándwich- $\beta$ , mientras que la lámina  $\beta$  de 6 hebras forma una superficie cóncava, cubierta parcialmente por los *loops* L3 y L6.

Como se mencionó anteriormente, hay estudios que sugieren que el dominio B30.2 evolucionó a partir del dominio SPRY al incorporar la secuencia del dominio PRY (22), y de acuerdo a la base de datos Pfam (79), en TRIM7<sup>B30.2</sup>, la secuencia del dominio PRY abarca los residuos 344-392 (correspondiente a las hebras  $\beta 1$  a  $\beta 3$ ) mientras que la secuencia del dominio SPRY incluye los residuos 396-509 (correspondiente a las hebras  $\beta 4$  a  $\beta 13$ ) (Figura 1.5 C).

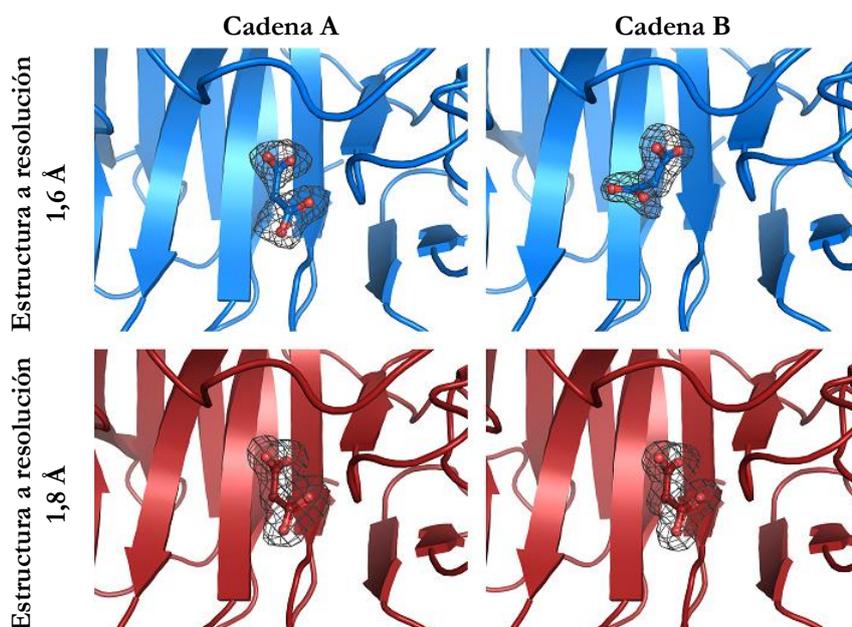
La búsqueda de estructuras similares a TRIM7<sup>B30.2</sup> humana se realizó con el servidor Dali (70), que asigna un grado de similitud (puntaje-Z) al comparar dichas estructuras de a pares, y dio como homólogo más cercano a BTN3A1<sup>B30.2</sup> humana (código de PDB: 4N7I, puntaje-Z= 28,9) sobre 187 residuos (Figura 1.6 A, ref. 67). La búsqueda arrojó como resultados adicionales a los dominios B30.2 de otras proteínas de la familia TRIM: TRIM21 murina (código de PDB: 3ZO0, puntaje-Z= 28,1 (80)), TRIM25 humana (código de PDB: 6FLM, puntaje-Z= 27,8 (81)), TRIM20 humana (código de PDB: 2WL1, puntaje-Z= 26,0 (82)), TRIM14 humana (código de PDB: 6JBM, puntaje-Z= 25,7 (83)), TRIM72 humana (código de PDB: 3KB5, puntaje-Z= 25,6 (84)) y TRIM65 humana (código de PDB: 7JL4, puntaje-Z= 23,7 (85)).

Por otra parte, durante el proceso de refinamiento, se observó además una densidad electrónica que se ajustaba a un ion malonato, presente en la solución de cristalización, que está ubicado en una cavidad cargada positivamente sobre un bolsillo en la superficie de las cuatro moléculas de las unidades asimétricas de los cristales crecidos en las dos condiciones (Figura 1.7). El ion malonato se encuentra en la misma posición en la cadena A de la estructura a resolución de 1,6 Å y en ambas cadenas de la estructura a resolución de 1,8 Å (Figura 1.7), formando puentes hidrógeno con los residuos Thr384, Arg385 y Ser499 (Figura 1.6 A y B). En el caso de BTN3A1<sup>B30.2</sup> también se observa

un ion malonato, unido a una zona de carga positiva en la superficie de un bolsillo equivalente al que se encuentra en la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup>, que interacciona con los residuos Arg442, Arg448 y Arg499 (Figura 1.6 A y C).

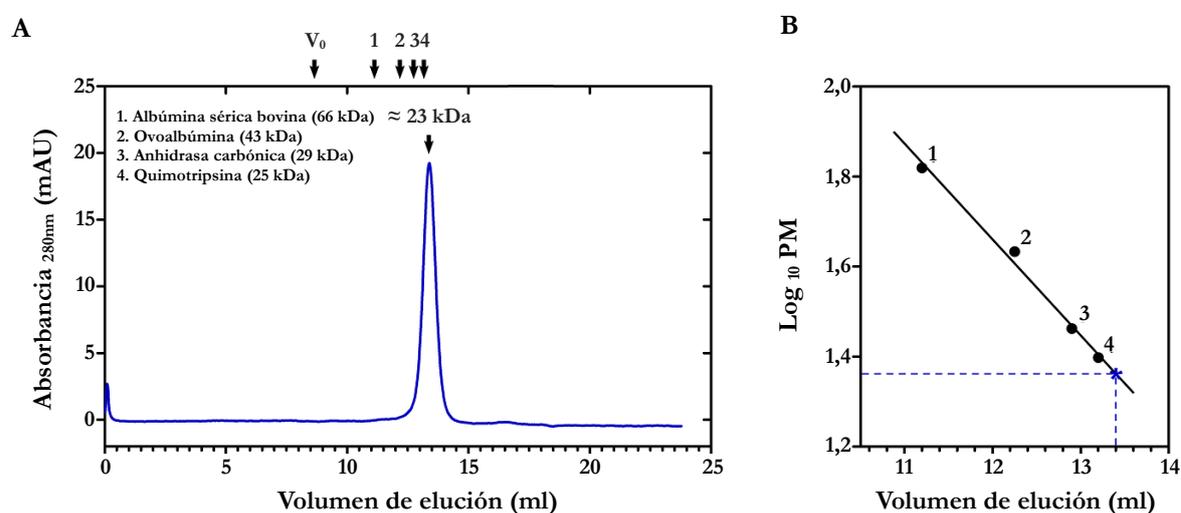


**Figura 1.6. Comparación de las estructuras de TRIM7<sup>B30.2</sup> y BTN3A1<sup>B30.2</sup>.** (A) Superposición de las estructuras de TRIM7<sup>B30.2</sup> (código de PDB: 6UMA, color amarillo) y BTN3A1<sup>B30.2</sup> (código de PDB: 5LYG, color verde) representadas en forma de cintas, con el ion malonato (MLI) unido, en forma de bastones. Interacciones de tipo puente hidrógeno de (B) TRIM7<sup>B30.2</sup> y (C) BTN3A1<sup>B30.2</sup> con el ion malonato representadas con líneas punteadas. La superficie de potencial electrostático en las cavidades de unión a malonato fue calculada con contornos entre -5 kT/e (rojo) y +5kT/e (azul).



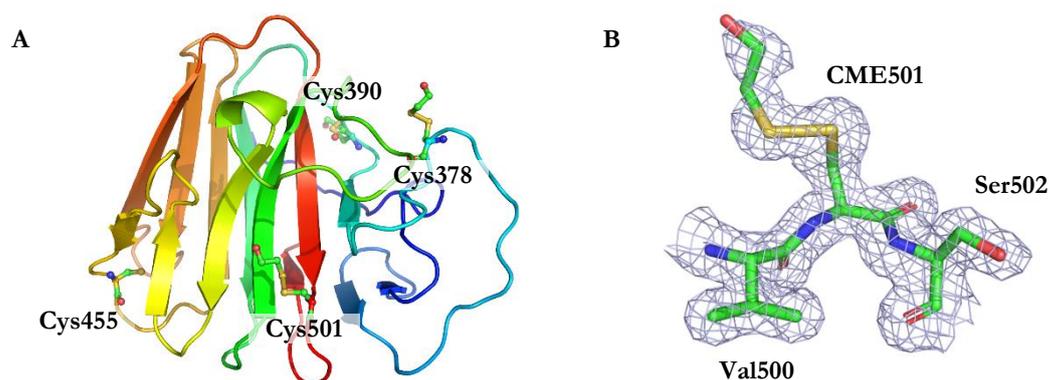
**Figura 1.7. Posición del ion malonato en la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup>.** La estructura se encuentra representada en forma de cintas, el ion malonato como bastones y la densidad electrónica como una red gris oscuro.

Pese a la alta similitud estructural y de secuencia,  $\text{BTN3A1}^{\text{B30.2}}$  forma parte de una proteína de la familia de las butirofilinas, y además posee la capacidad de formar dímeros (67, 86).  $\text{TRIM7}^{\text{B30.2}}$ , en cambio, se comporta como monómero en los cristales según lo revela el análisis de estructura cuaternaria realizado con el servidor PISA (71). Además, como se mencionó anteriormente, en la unidad asimétrica de los diferentes cristales se observan dos moléculas en diferente arreglo espacial, lo que no es esperable si ambas moléculas formaran un dímero (Figura 1.5 A). Coincidentemente, al realizar un análisis por cromatografía de exclusión molecular, se observó la elución de una especie cuyo tiempo de retención es el esperado para el monómero con un peso molecular aproximado de 22 kDa, comparado con proteínas estándar utilizadas para el método. Este resultado también evidencia el comportamiento de  $\text{TRIM7}^{\text{B30.2}}$  como monómero en solución (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Cromatografía de exclusión molecular de  $\text{TRIM7}^{\text{B30.2}}$ .** (A) Análisis de  $\text{TRIM7}^{\text{B30.2}}$  en una columna Superdex 75 10/300 GL en comparación al volumen de elución de proteínas estándar. (B) Curva de calibración con proteínas estándar. Abreviaturas:  $V_0$ , volumen de exclusión; PM, peso molecular.

Por otra parte, durante el proceso de refinamiento de las estructuras a 1,6 Å y 1,8 Å, se observó una densidad electrónica adicional sobre los residuos Cys378, Cys390 y Cys501 en ambos mapas de diferencia  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  (Figura 1.9). Al igual que en la estructura de  $\text{BTN3A1}^{\text{B30.2}}$  utilizada como modelo de búsqueda (67), esta densidad fue atribuida a la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en el medio de cristalización, que reacciona con los residuos cisteína formando S,S-(2-hidroxi)tiocisteína. El único residuo cisteína que no parece modificado de acuerdo a los mapas de densidad electrónica es Cys455, cuya cadena lateral se orienta hacia el interior del sándwich- $\beta$ .



**Figura 1.9. Modificación de cisteínas por  $\beta$ -mercaptoetanol.** (A) La estructura se encuentra representada en forma de cintas, y los residuos cisteína en forma de bastones y esferas. (B) A modo representativo se muestra un detalle de la región de la estructura correspondiente a Cys501, uno de los residuos cisteína modificados a S,S-(2-hidroxi)tiocisteína (CME). El modelo refinado se encuentra representado como bastones, mientras que el mapa  $F_{obs}-F_{calc}$  se observa como una red de color gris.

### -I.C.2. Análisis estructural de la interacción entre glucogenina-1 y TRIM7<sup>B30.2</sup>

Como se describió en la Introducción, TRIM7<sup>B30.2</sup> ha sido identificada como la región de la isoforma GNIP2 necesaria para la interacción con GN1 (31). A continuación, se exponen los resultados obtenidos para intentar definir las regiones de cada proteína que participan en dicha interacción.

En un primer intento de caracterizar la interacción entre GN1 y TRIM7<sup>B30.2</sup>, las proteínas por separado y mezcladas en diferente relación molar, fueron utilizadas en mediciones de dicroísmo circular como se describió en la sección de procedimientos experimentales. Una ventaja de este tipo de espectroscopía es la posibilidad de detectar cambios conformacionales cuando dos proteínas interactúan, evidenciados por diferencias entre la suma de los espectros de las proteínas por separado y el espectro de la mezcla de ellas (87). Sin embargo, no se pudo apreciar dicho cambio en la condición reductora en que se mantiene a TRIM7<sup>B30.2</sup> cuando está en la concentración requerida para las pruebas de cristalización (Figura 1.10 A).

Esto sugería que alguno de los tres residuos cisteína modificados por el  $\beta$ ME, que se encontraban expuestos en la estructura cristalográfica de TRIM7<sup>B30.2</sup>, podría estar involucrado en la interacción. Las mediciones fueron llevadas a cabo nuevamente en ausencia del reductor con el fin de determinar si esta modificación estaba interfiriendo en la interacción. En este caso, en cambio, si se observó una diferencia entre la mezcla teórica y experimental, consistente incluso en las diferentes relaciones molares medidas (Figura 1.10 B). Esto indica que, en ausencia del reductor, la interacción transcurre acompañada de un cambio de conformación que involucraría un incremento de estructura de lámina  $\beta$ , indicado por un aumento negativo de la señal a 218 nm de la mezcla de proteínas, respecto a la suma de las señales individuales.

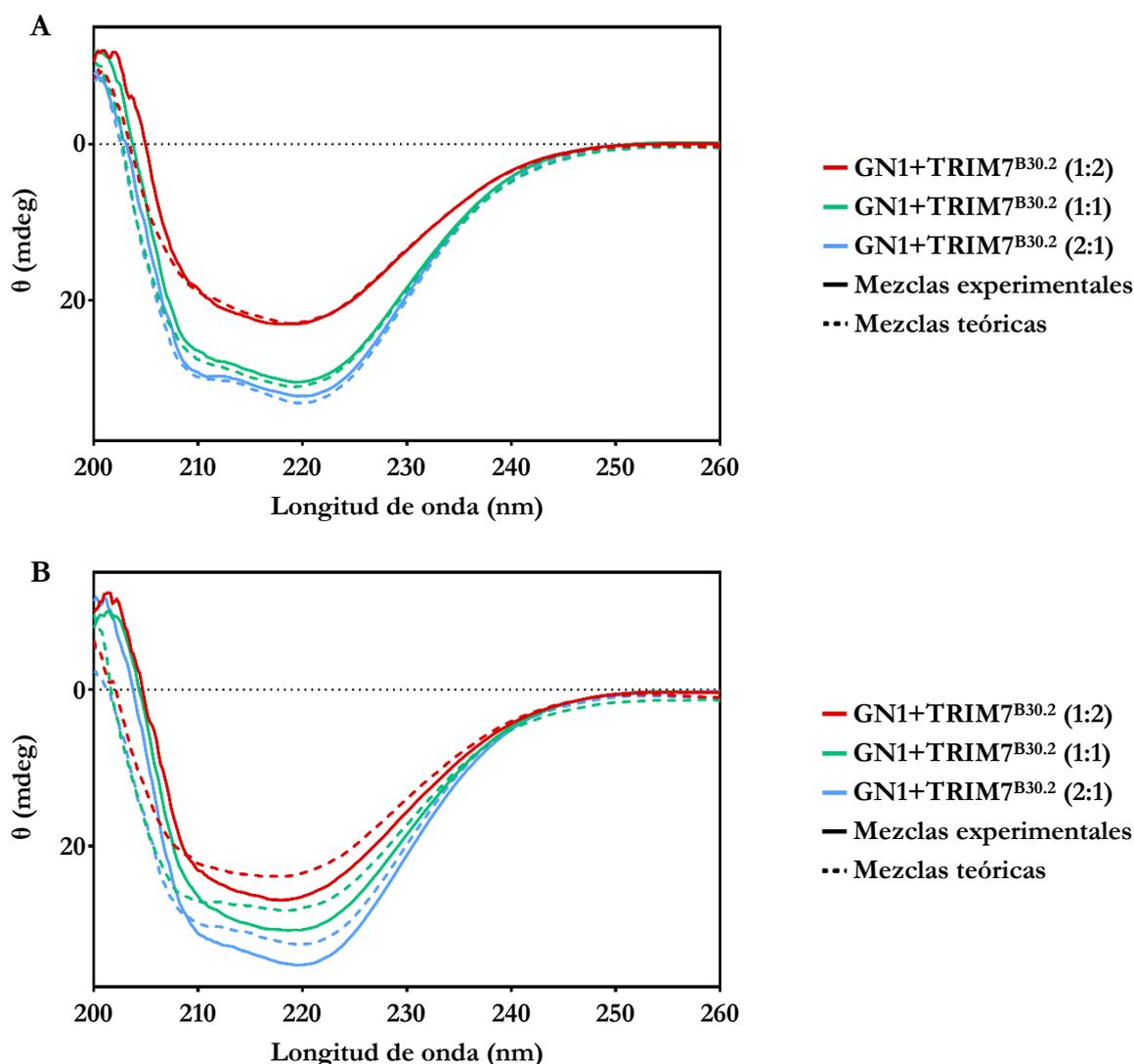
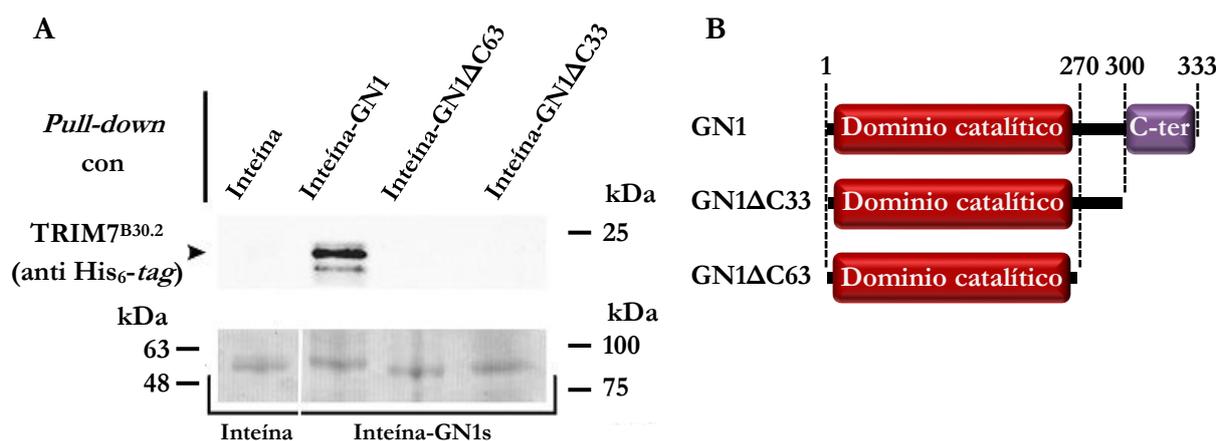


Figura 1.10. Análisis por dicroísmo circular de la interacción entre GN1 y TRIM7<sup>B30.2</sup>. Los espectros fueron medidos (A) en presencia y (B) en ausencia de βME a diferentes relaciones molares.

#### -Análisis de la región de glucogenina-1 necesaria para la interacción con TRIM7<sup>B30.2</sup>

Durante los intentos por caracterizar la interacción entre GN1 y TRIM7<sup>B30.2</sup> mediante el uso de la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y en ausencia del βME, se observó un alto grado de precipitación que ocasionaba una señal muy irregular. Por ello, debido a la dificultad de utilizar la técnica de ITC y que el uso de dicroísmo circular en este caso solo muestra diferencias pequeñas de estructura secundaria, se optó finalmente por utilizar un ensayo de *pull-down* para estudiar la región de GN1 involucrada en la interacción con TRIM7<sup>B30.2</sup>. Con este fin, se utilizó a GN1 fusionada a inteína y un dominio de unión a quitina (inteína-GN1), y se prepararon las mutantes de delección sin los últimos 63 y 33 aminoácidos (inteína-GN1ΔC63 e inteína-GN1ΔC33, respectivamente). Dichas mutantes fueron construidas debido a que se conoce que el fragmento

C-terminal de GN1 es susceptible a una actividad proteolítica desconocida (52, 54), y que los 33 aminoácidos finales son necesarios para la interacción con glucógeno sintasa (55). El ensayo de *pull-down* mostró que, mientras que TRIM7<sup>B30.2</sup> sí interacciona con GN1 entera, no es retenida en las resinas de quitina con las mutantes de delección de GN1 inmovilizadas, luego de realizar los lavados correspondientes (Figura 1.11), lo que restringe la región involucrada en la interacción a los 33 aminoácidos finales de la secuencia.

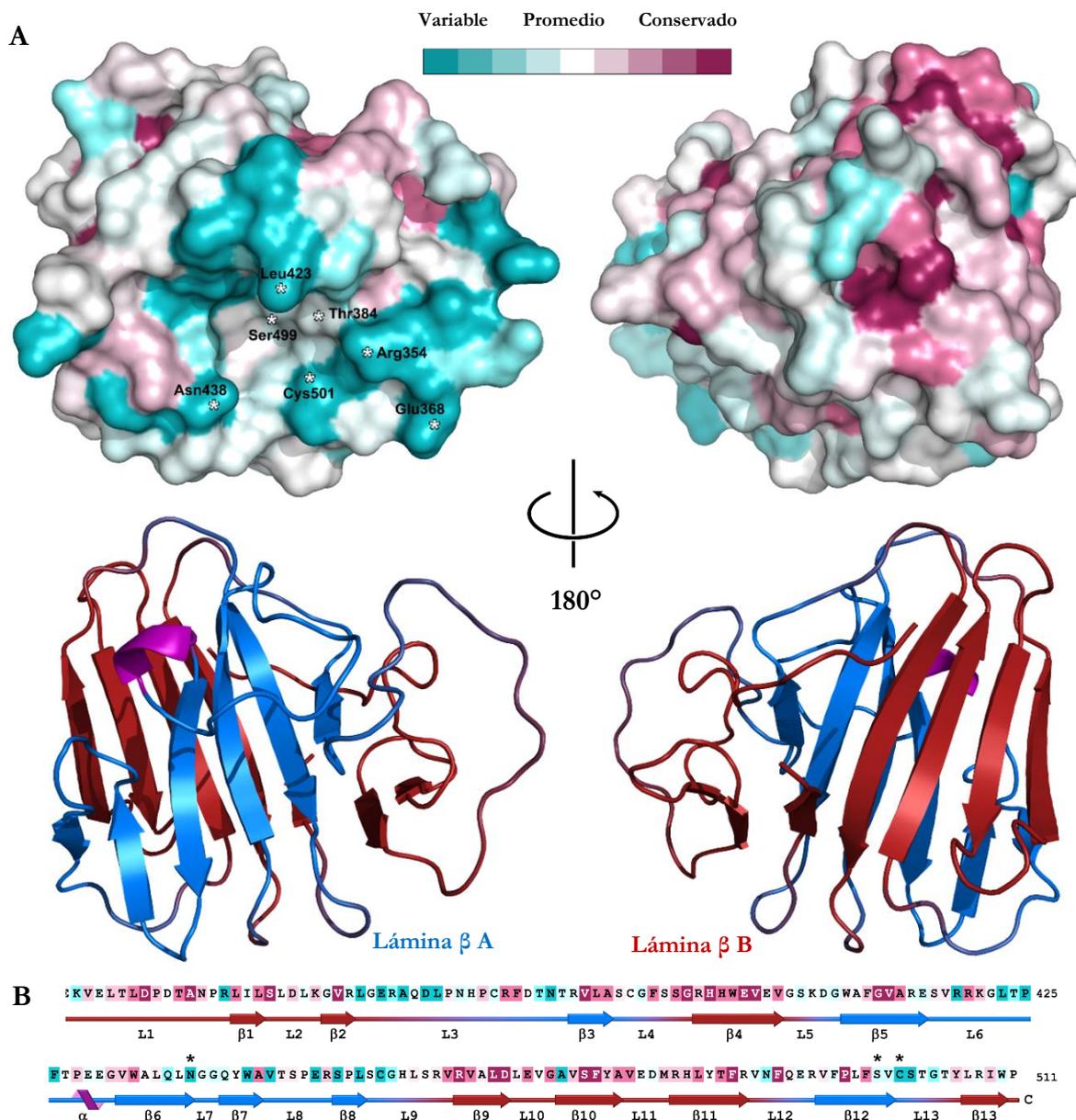


**Figura 1.11. Análisis por *pull-down* de la unión de TRIM7<sup>B30.2</sup> con variantes de GN1.** (A) Las variantes de GN1 fusionadas a inteína e inmovilizadas en la resina de quitina fueron incubadas con extractos solubles de *E. coli* expresando TRIM7<sup>B30.2</sup> y analizadas por inmunoblot con un anticuerpo anti-His<sub>6</sub>-tag. La doble señal correspondiente a TRIM7<sup>B30.2</sup> se debería a una proteólisis causada por una proteasa desconocida durante el procesamiento de las muestras. Como control, se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue, donde se observan las cantidades similares de inteína, o inteína fusionada a las variantes de GN1 inmovilizadas en las resinas. (B) Representación esquemática de las versiones de GN1 utilizadas en los ensayos. Los números en la parte superior indican la posición en la secuencia de las regiones de GN1 señaladas. Abreviaturas: C-ter, región carboxilo terminal.

### -Análisis del potencial sitio de interacción de TRIM7<sup>B30.2</sup>

Como se mencionó en la Introducción, en las proteínas de la familia TRIM, la región C-terminal es aquella que interviene en la interacción con sus proteínas sustrato. Tras pruebas iniciales de cristalización infructuosas del complejo entre TRIM7<sup>B30.2</sup> y GN1, primeramente, la potencial región de unión de TRIM7<sup>B30.2</sup> fue definida por comparación con secuencias de otros dominios B30.2. Estos dominios presentan alta homología de secuencia, por lo que los aminoácidos conservados serían determinantes para su similitud estructural, sin embargo, tienen la capacidad de reconocer sustratos muy diferentes; y esta selectividad, en cambio, podría estar relacionada a los aminoácidos que los diferencian (84, 88, 89). Con el fin de identificar regiones de TRIM7<sup>B30.2</sup> conservadas y variables, estas últimas posiblemente responsables de su especificidad, se llevó a cabo un alineamiento de 42 secuencias de dominios B30.2 de proteínas humanas de la familia TRIM y de

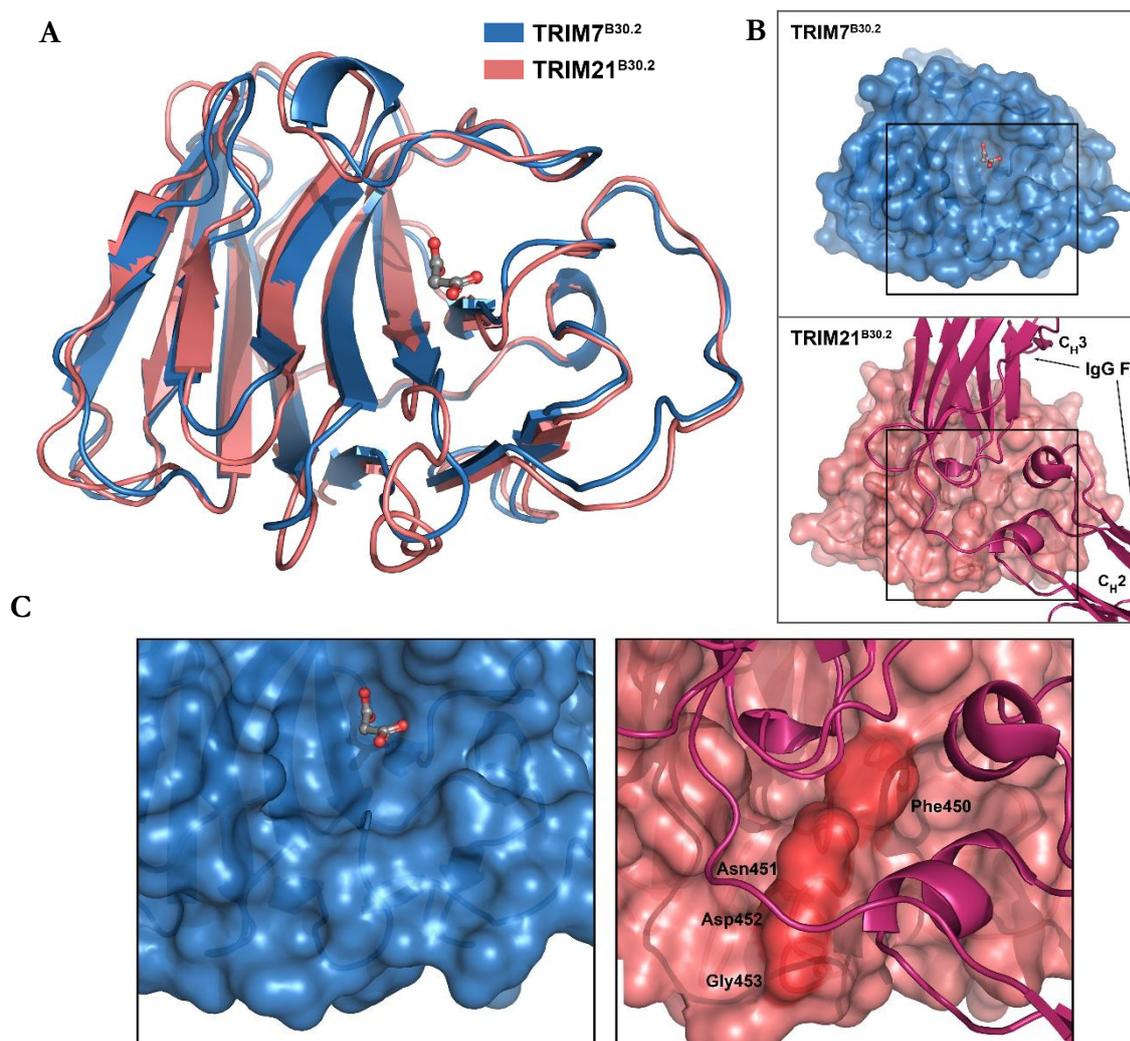
butirofilinas, empleando el programa Clustal Omega (73). El grado de conservación de los aminoácidos fue calculado con el servidor ConSurf (74) y luego representado sobre la estructura tridimensional siguiendo un código de colores entre violeta y turquesa (Figura 1.12).



**Figura 1.12. Análisis de conservación de secuencia de homólogos de TRIM7<sup>B30.2</sup>.** (A) El grado de conservación se encuentra representado sobre la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> representada en forma de superficie en un espectro entre color violeta, correspondiente a las regiones de mayor conservación, y color turquesa, en el que se observan las zonas más variables. A modo de comparación también se encuentra representada la estructura en forma de cintas, en color azul la lámina β A y en color rojo la lámina β B. (B) Secuencia de TRIM7<sup>B30.2</sup> con la misma escala de colores para el grado de conservación de los residuos y esquema de la estructura secundaria. Los asteriscos muestran los aminoácidos que fueron mutados para el análisis de la interacción con GN1. Abreviaturas: L=loop, α=hélice α, β=lámina β.

Como se observa en la Figura 1.12, la mayoría de los residuos conservados se localizan sobre una de las caras (lámina- $\beta$  B) del sándwich- $\beta$ , mientras que aquellos no conservados predominan en la cara opuesta (lámina- $\beta$  A). Sobre esta cara también se encuentran residuos invariables mayormente hidrofóbicos, pero con sus cadenas laterales orientadas hacia la interfase entre las láminas- $\beta$ .

Coincidentemente, se ha descrito que en la estructura del complejo entre TRIM21<sup>B30.2</sup> e IgG Fc (Ref. 88, Figura 1.13), dicha interacción involucra la cara de TRIM21<sup>B30.2</sup> donde se encuentran los residuos variables.



**Figura 1.13. Comparación de los dominios B30.2 de TRIM7 y TRIM21.** (A) Superposición de la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> (azul) y TRIM21<sup>B30.2</sup> (rojo, código de PDB: 2IWG) representadas en forma de cintas. (B) Representación de la superficie de ambas proteínas donde también se muestran los dominios C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 de IgG Fc en complejo con TRIM21<sup>B30.2</sup>. (C) Región ampliada de los recuadros marcados en (B), en color rojo se observa la cresta que separa los dos bolsillos de TRIM21<sup>B30.2</sup> de unión a IgG Fc.

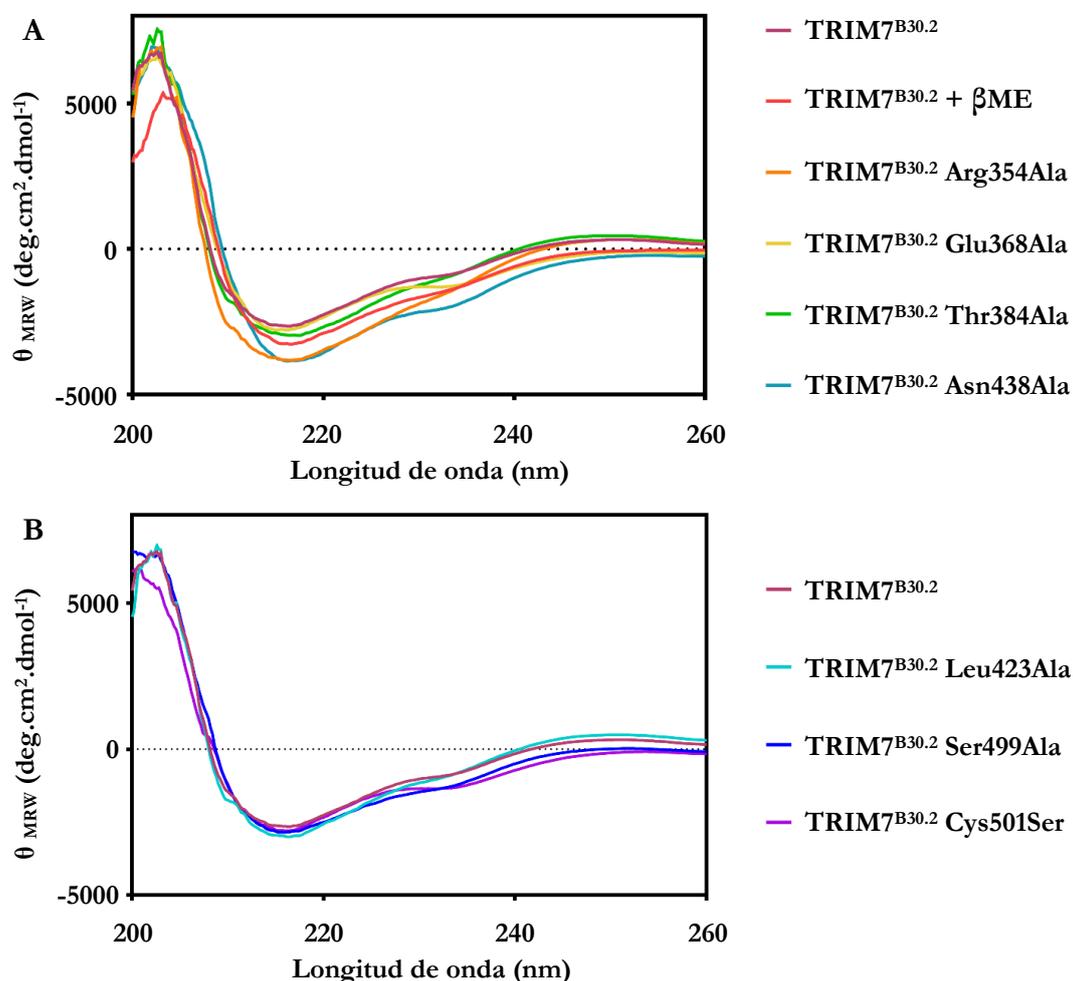
Los residuos Asp355, Trp381, Trp383 y Phe450 de TRIM21 son esenciales para la unión a IgG Fc (88) y en TRIM7 corresponden a Ala410, Gln436, Asn438 y Ser502, respectivamente. Otra diferencia entre ambos dominios se encuentra en el *loop* de TRIM21<sup>B30.2</sup>, equivalente al *loop* 13 en TRIM7<sup>B30.2</sup>, que contiene a la mayoría de los residuos involucrados en la interacción con IgG Fc (Asn451, Asp452 y Gly453, Figura 1.13 C). Este *loop* en TRIM21 es más extenso y además de los residuos mencionados contiene al residuo voluminoso Phe450; de esta manera, constituye una superficie con forma de cresta que separa dos cavidades donde se unen cada uno de los dominios de IgG Fc (Figura 1.13 B, C). La cresta mencionada no se encuentra en TRIM7, sino que se observa solo un bolsillo con menor profundidad que en TRIM21, mayormente definido por aminoácidos variables. Estas diferencias tanto en los aminoácidos importantes para la interacción en TRIM21<sup>B30.2</sup> como en la conformación del sitio de unión, sugieren que las características de la interacción entre TRIM7 y las proteínas con las que se asocia, deberían ser diferentes en comparación al complejo TRIM21/IgG Fc.

Por otra parte, la zona de carga positiva donde se une el ion malonato en la superficie de BTN3A1<sup>B30.2</sup> antes mencionada (Figura 1.6 C), constituye un sitio de unión para el compuesto hidroximetil butil pirofosfonato (90) y otras moléculas pequeñas cargadas negativamente. Dicha zona es equivalente a la cavidad cargada positivamente de TRIM7<sup>B30.2</sup> (Figura 1.7 B); lo que sugiere que el bolsillo sobre esta cavidad también podría resultar relevante para la interacción de TRIM7<sup>B30.2</sup> con otras proteínas.

### **-Determinación de la región de TRIM7<sup>B30.2</sup> involucrada en la interacción con glucogenina-1**

Para determinar si la región de interacción con GN1 en TRIM7 se encuentra sobre la cara cóncava del sándwich- $\beta$ , como se predijo según la conservación de la secuencia, se analizó el efecto de la mutación de diferentes aminoácidos en la región cercana al bolsillo cargado positivamente en dicha interacción. Inicialmente, se introdujeron las siguientes mutaciones: Glu368Ala, Asn438Ala, Ser499Ala y Cys501Ser, para lo que se consideró como primer criterio el análisis de variabilidad realizado con el servidor Consurf (Figura 1.12). Luego, se tuvo en cuenta que Glu368 y Ser499 son análogos a los residuos Asp488 y Trp621, respectivamente, en TRIM25 murina, que al ser mutados disminuyen la unión de su dominio B30.2 a RIG-I y reducen drásticamente su capacidad de ubiquitinación (89). Además, Ser499 también está involucrada en la interacción por puente hidrógeno con el ion malonato (Figura 1.6 B). Por otra parte, Asn438 es equivalente a Trp383 de TRIM21 humana, aminoácido identificado como esencial para su unión a IgG Fc (88). Cys501 también fue reemplazada dado que es uno de los tres residuos cisteína modificados por el  $\beta$ ME utilizado durante la purificación y cristalización (Figura 1.9), y por su proximidad a Ser499. Todas

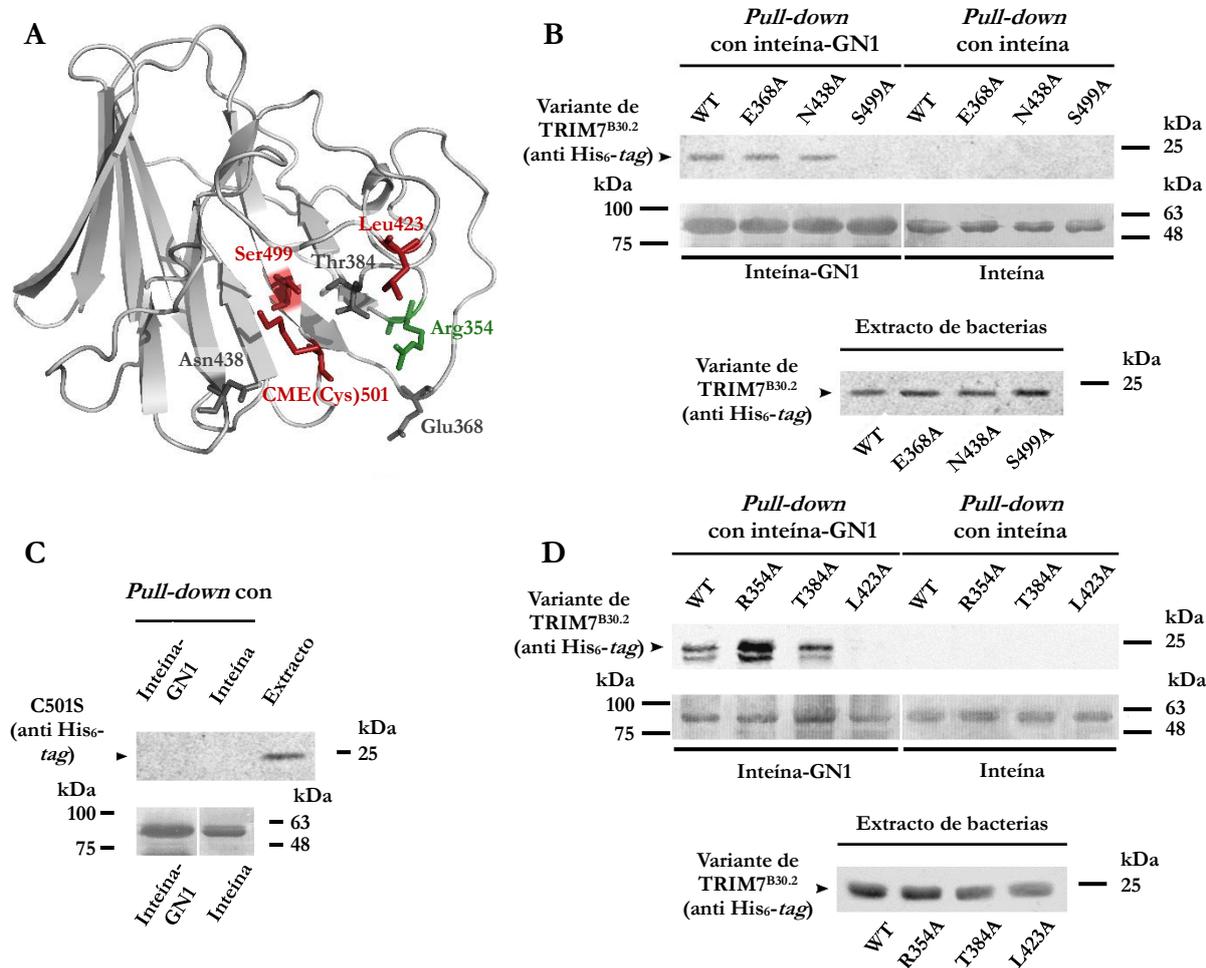
las mutantes fueron analizadas por espectroscopía de dicroísmo circular y no presentan variación significativa respecto a la estructura silvestre, al igual que la proteína en presencia de  $\beta$ ME, como se observa comparando la señal de sus espectros (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de las variantes de TRIM7<sup>B30.2</sup>. Análisis de similitud estructural entre TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre y (A) el dominio en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) y las mutantes Arg354Ala, Glu368Ala, Thr384Ala, Asn438Ala; y (B) las mutantes Leu423Ala, Ser499Ala y Cys501Ser.

Por otro lado, cuando se realizó un análisis mediante un ensayo de *pull-down* entre las variantes de TRIM7<sup>B30.2</sup> y GN1 fusionada a inteína y fijada en resinas de quitina (Figura 1.15 B, C), se encontró que la interacción de GN1 con las mutantes Glu368Ala y Asn438Ala es similar a la que mostró con la forma silvestre de TRIM7<sup>B30.2</sup> (Figura 1.15 B). Por otra parte, las mutantes Ser499Ala y Cys501Ser se unieron a GN1 con menor afinidad (Figura 1.15 B, C). El efecto de la mutación Cys501Ser, sugiere además que la modificación de esta cisteína por el  $\beta$ ME incluido para disminuir la precipitación de la proteína cuando se encuentra en una alta concentración (Figura 1.9) interfiere en la interacción con GN1, lo que se corresponde con el efecto de este reductor observado por dicroísmo circular (Figura 1.10).

Luego de determinar a Ser499 y Cys501 como aminoácidos importantes para la unión a GN1 en la cara cóncava de TRIM7<sup>B30.2</sup>, el estudio fue extendido a las mutantes Arg354Ala, Thr384Ala y Leu423Ala (Figura 1.15 D).



**Figura 1.15. Análisis por pull-down de la unión de glucogenina-1 con las diferentes variantes de TRIM7<sup>B30.2</sup>.** (A) Posición de los aminoácidos mutados sobre la estructura de TRIM7<sup>B30.2</sup> (color gris), los aminoácidos cuya mutación provoca la pérdida de interacción se encuentran representados en color rojo, mientras que la mutación que favorece la interacción, se observa en color verde. (B-D) Resinas de quitina con GN1 fusionada a inteína e inmovilizada fueron incubadas con extractos solubles de *E. coli* expresando TRIM7<sup>B30.2</sup> silvestre o mutantes, y analizadas por inmunoblot con anticuerpo anti His<sub>6</sub>-tag. Como control, se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue, donde se observan las cantidades similares de inteína, o inteína fusionada a las variantes de GN1 inmovilizadas en las resinas. La doble señal correspondiente a TRIM7<sup>B30.2</sup> se debería a una proteólisis causada por una proteasa desconocida durante el tratamiento de las muestras. Abreviaturas: CME, Cys modificada; WT, silvestre; R354A, Arg354Ala; E368A, Glu368Ala; T384A, Thr384Ala; N438A, Asn438Ala; L423A, Leu423Ala; S499A, Ser499Ala; C501S, Cys501Ser.

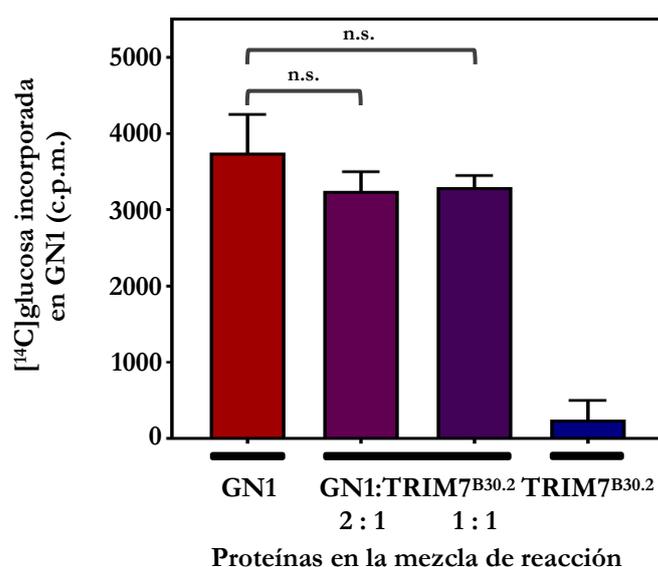
En este caso, se consideró como criterio adicional que Thr384 se encuentra unida por puente hidrógeno con malonato al igual que Ser499 (Figura 1.6 B), en tanto que los restantes aminoácidos

reemplazados fueron elegidos por ser residuos poco conservados en diferentes puntos de la región predicha como potencialmente involucrada en la interacción con GN1. Los resultados mostraron que la unión de GN1 con TRIM7<sup>B30.2</sup> Thr384Ala no fue afectada por la mutación. En cambio, la mutación Arg354Ala parece tener un efecto beneficioso sobre la interacción, mientras que la mutante Leu423Ala mostró menor afinidad con GN1. En todos los casos, además, se corroboró la utilización de cantidades similares de todas las variantes en los ensayos (Figura 1.15 B-D).

En resumen, estos ensayos indican que Leu423, Ser499 y Cys501 son esenciales para la interacción de TRIM7<sup>B30.2</sup> y GN1, mientras que el reemplazo de Arg354 por alanina conduciría a un incremento de aproximadamente dos veces de la afinidad de interacción.

### -I.C.3. Efecto del dominio B30.2 de TRIM7 sobre la actividad de glucogenina-1

Como se mencionó en la Introducción, la isoforma GNIP2 de TRIM7 produjo un incremento de la actividad de GN1 (29), por lo que, una vez confirmada la interacción del dominio B30.2 de TRIM7 aislado con GN1, se procedió a estudiar si tenía algún efecto sobre la actividad de esta última. Para ello, ambas proteínas fueron incubadas en presencia del cofactor y de UDP-glucosa, el sustrato de GN1, marcado con carbono radiactivo. La actividad de GN1 fue medida en función de la [<sup>14</sup>C]glucosa incorporada por la enzima en ausencia o en presencia de dos cantidades diferentes de TRIM7<sup>B30.2</sup>. Como muestra la Figura 1.16, a diferencia de la estimulación de autoglicosilación de GN1 observada en presencia de GNIP2 (29), TRIM7<sup>B30.2</sup> por sí solo no produce efecto sobre dicha actividad.



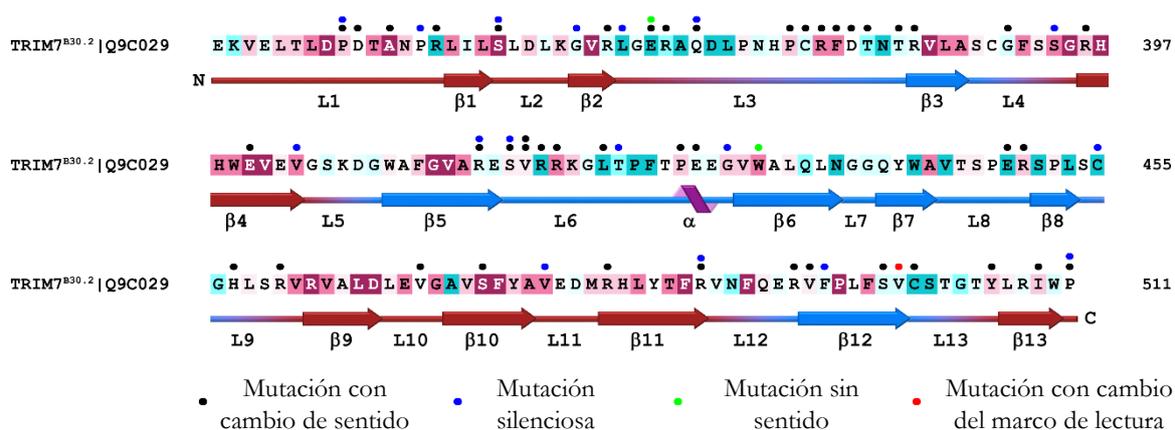
**Figura 1.16. Efecto de TRIM7<sup>B30.2</sup> sobre la actividad de autoglicosilación de glucogenina-1.** GN1 fue incubada con el dominio B30.2 de TRIM7 en las relaciones molares indicadas y la actividad fue medida en cuentas por minuto (c.p.m.) como la radiactividad emitida por la [<sup>14</sup>C]glucosa incorporada a la enzima. Las barras representan el promedio  $\pm$  de desviación estándar de tres experimentos. Abreviaturas: n.s., no significativo.

## I.D. Discusión

Como se mencionó en la Introducción, las proteínas de la familia TRIM se encuentran involucradas en una gran variedad de procesos celulares fisiológicos y patológicos (14, 28). En el caso de TRIM7, que posee actividad E3 ligasa (34), se ha descrito su intervención en el desarrollo de cáncer (34-39) y en inmunidad innata (40-44). Además, se conocen otras funciones, como su efecto promotor del desarrollo de aterosclerosis (45) y su estimulación de la acumulación de glucógeno (32).

Estructuralmente, TRIM7 posee el motivo tripartito característico de la familia de proteínas TRIM, formado por un dominio RING, un dominio B-*bax* y un dominio de hélice superenrollada, además de un dominio B30.2 en el extremo C-terminal. TRIM7 fue inicialmente descrita como una proteína que interactúa con glucogenina-1 (29), proceso que mostró estar mediado por el dominio B30.2.

Según la base de datos PROSITE, el dominio B30.2 se encuentra en más de 300 proteínas eucariotas y su función consiste en interactuar con proteínas específicas más que secuencias o motivos consenso (26), como de hecho ocurre en el caso de TRIM7<sup>B30.2</sup>. Por otra parte, resulta interesante señalar que, de acuerdo a la base de datos de mutaciones somáticas en cáncer humano COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, ref. 91), alrededor del 54% de las mutaciones asociadas al gen TRIM7 se localizan en el dominio B30.2 (Figura 1.17). Considerando estos datos, si bien se conoce el plegamiento de otros dominios B30.2 por estructuras previamente resueltas (67, 80-85), se destaca la potencial relevancia de disponer de información estructural sobre TRIM7<sup>B30.2</sup>.



**Figura 1.17. Mutaciones en TRIM7<sup>B30.2</sup> asociadas a cáncer de acuerdo a la base de datos COSMIC.** Los aminoácidos se encuentran representados en un espectro entre color violeta, correspondiente a aquellos con mayor grado de conservación, y color turquesa, en el que se observan aquellos de mayor variabilidad. Abreviaturas: L=loop, α=hélice α, β=lámina β.

En el caso de TRIM7<sup>B30.2</sup>, presenta el plegamiento característico de sándwich- $\beta$  de otras estructuras conocidas, formado por dos láminas  $\beta$  de siete y seis hebras, que forman una cara convexa y una cóncava, respectivamente, conectadas por *loops* de longitud variable. Pese a la similitud estructural entre los dominios B30.2, los residuos con mayor variabilidad podrían otorgar la especificidad de TRIM7<sup>B30.2</sup> respecto a sustrato (84, 88, 89). Esto podría deberse a diferencias notables en la superficie tales como, la ausencia de una cresta que se encuentra presente en TRIM21<sup>B30.2</sup> y la presencia de un solo bolsillo con una cavidad con carga positiva en vez de dos bolsillos como en esta última (Figura 1.13).

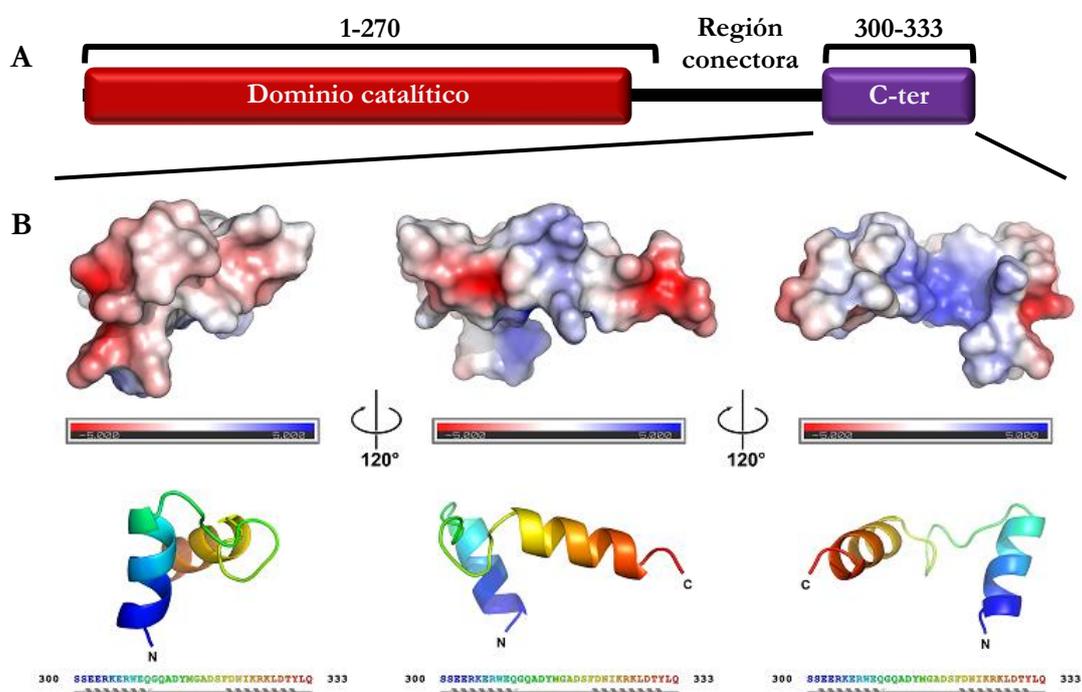
En otras estructuras de dominios B30.2 en complejo con las proteínas con las que interactúan, parece haber dos regiones involucradas en la interacción. En proteínas de la familia SOCS-*box* de E3 ligasas se observa una de estas regiones equivalente a los *loops* 3 y 13 de TRIM7<sup>B30.2</sup>, en los complejos GUSTAVUS/péptido VASA (92), SPSB1/péptido VASA, SPSB1/Par4 y SPSB2/péptido VASA (93). La otra región sobre la superficie del sándwich- $\beta$  se observa en las estructuras de los complejos TRIM65<sup>B30.2</sup>/MDA5 (85), BTN3A1/pAgs (86), TRIM21/IgG (88) y Ash2L/RbBP5 (94).

Como se mencionó anteriormente, en el caso de TRIM7<sup>B30.2</sup>, una de las proteínas con las que interactúa es GN1, y por este motivo fue utilizada para identificar residuos potencialmente importantes para dicha interacción. Para tal fin, se realizaron mutaciones por Ala de los aminoácidos Arg354, Thr384, Asn438 y Ser499 localizados en la superficie cóncava del sándwich- $\beta$ , y de Glu368 y Leu423 ubicados en los *loops* 3 y 6, respectivamente. Por otra parte, la estructura cristalográfica de TRIM7<sup>B30.2</sup> reveló que tres residuos cisteína se encuentran modificados por  $\beta$ ME formando S,S-(2-hidroxietil) tiocisteína (CME). Adicionalmente, en presencia de  $\beta$ ME no se observó un cambio conformacional en la mezcla experimental de GN1 y TRIM7<sup>B30.2</sup> en el análisis por dicroísmo circular (Figura 1.10 A), lo que sugería que alguno de los residuos cisteína modificados podía ser relevante para la interacción. Debido a ello, el residuo Cys501 ubicado en la región propuesta como posible sitio de interacción y que en la estructura cristalográfica se encuentra modificado, fue a su vez reemplazado por un residuo serina. Todas las mutantes fueron evaluadas en su capacidad de interactuar con TRIM7<sup>B30.2</sup> utilizando un ensayo de *pull-down*, habiendo previamente verificado por dicroísmo circular que no hubo una alteración notable en el plegamiento de cada proteína debida a la presencia de la mutación (Figura 1.14). Los resultados revelaron que Leu423Ala, Ser499Ala y Cys501Ser producen una disminución considerable de la interacción con TRIM7<sup>B30.2</sup>, mientras que Arg354Ala ocasiona un aumento de la afinidad de interacción. Estos datos confirman que la cara cóncava de TRIM7<sup>B30.2</sup> participa en la interacción

con GN1, y que el bolsillo donde se encuentra el ion malonato formando puente hidrógeno con Ser499 (Figura 1.6) podría ser relevante en la interacción.

Adicionalmente, los resultados obtenidos al utilizar las variantes de delección de GN1 sugieren que los últimos 33 aminoácidos, también involucrados en la interacción con glucógeno sintasa (55), son necesarios para la interacción con TRIM7<sup>B30.2</sup> (Figura 1.11), por lo que será considerado además para futuras pruebas de cristalización en complejo con este dominio.

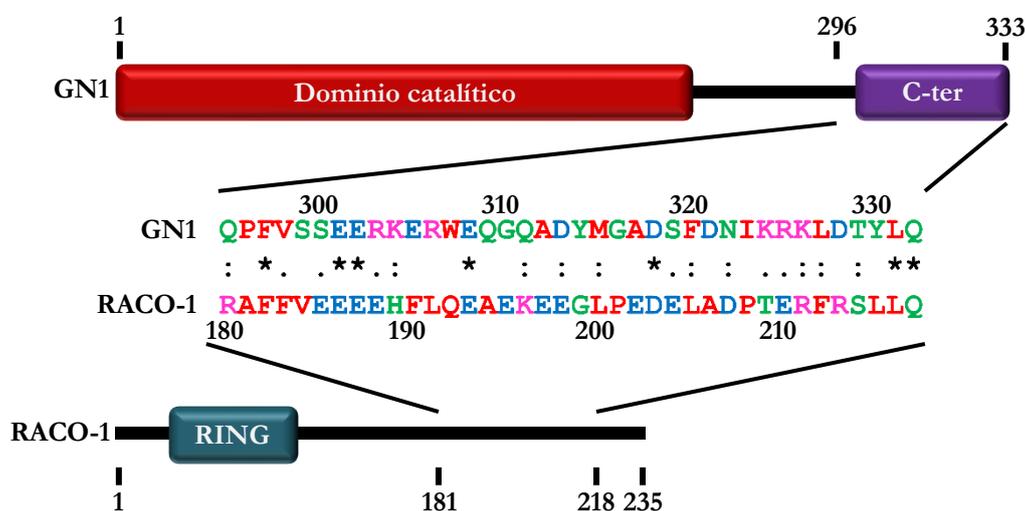
Con base en estos datos, se realizó un modelado de esta región con el programa Modeller (95), a partir de un segmento de GN1 de *C. elegans*, que exhibe un 48,5% de identidad de secuencia con la proteína humana, cristalizado en complejo con glucógeno sintasa (96). Este modelo presenta regiones con carga negativa (Figura 1.18) que podrían interactuar con el bolsillo con carga positiva de TRIM7<sup>B30.2</sup> donde se encuentra unido el ion malonato en la estructura cristalográfica.



**Figura 1.18. (A) Arquitectura de dominios de GN1.** En el esquema se encuentran representadas la secuencia que corresponde a la estructura cristalográfica (54) que contiene al dominio catalítico, una región conectora de composición y longitud variable común a la familia GT8 de glucosiltransferasas, y la región conservada C-terminal (C-ter). **(B) Estructura modelada del segmento C-terminal de GN1 humana.** El modelo se encuentra representado en forma de cintas y de superficie. La superficie en color azul representa regiones con carga positiva y en color rojo con carga negativa.

El dominio B30.2 de TRIM7 también es responsable de la interacción con Src (39) y es esencial para la actividad antiviral (40). En el caso particular de RACO-1, se ha descrito que su extremo C-terminal es reconocido por TRIM7 (34), pero no se conoce cuál es el dominio de esta última

involucrado en la interacción. Curiosamente, RACO-1, presenta en su extremo C-terminal una identidad de 18,4% y una similitud de secuencia del 68,5% de acuerdo con el servidor LALIGN (97) con la región C-terminal de GN1, también reconocida por TRIM7 (Figura 1.19), por lo que, considerando la función de los dominios B30.2, este dominio podría también mediar la interacción con RACO-1.



**Figura 1.19.** Alineamiento de secuencia entre los extremos C-terminales de GN1 y RACO-1. Los aminoácidos se muestran en un código de colores de acuerdo a sus características: en rojo, pequeños e hidrofóbicos; en azul, ácidos, en magenta, básicos, y en verde, hidroxilo, sulfhidrilo, amina y Gly. Los símbolos indican el grado de conservación de los residuos: un asterisco (\*) indica conservación total, dos puntos (:) indican conservación entre grupos con propiedades fuertemente similares y un punto (.) indica conservación entre grupos con propiedades débilmente similares.

Más aún, tal como ocurre con muchos dominios en la región C-terminal de las proteínas de la familia TRIM que participan en el reconocimiento de sustratos (13), es probable que TRIM7<sup>B30.2</sup> también participe en la interacción de TRIM7 con otras proteínas, entre las cuales se encuentran BRMS1 (36), DUSP6 (38), la proteína de envoltura del virus Zika (41), MITA (42) y 2BC (43).

Como el efecto activador sobre la autoglicosilación de GN1 solo fue analizado previamente con la isoforma GNIP2 de TRIM7 (31), en este caso se estudió el efecto del dominio B30.2 aislado sobre la actividad de GN1, sin encontrar indicios de estimulación de la incorporación de glucosa. Este resultado podría relacionarse además con el hecho de que la interacción con TRIM7<sup>B30.2</sup> involucraría al extremo C-terminal de GN1 (Figura 1.11) y no a su dominio catalítico, ya que de otro modo probablemente hubiera interferido con la actividad de la enzima.

Como se describió en la Introducción, la primera estructura de GN1 de conejo no presenta densidad electrónica observable más allá del aminoácido 270 (54), debido a que, según se observó al analizar muestras de cristales, gran parte de la proteína se encontraba como una especie de menor

peso molecular. En otro trabajo, se ha propuesto que la región conectora variable y la región conservada C-terminal de GN1 (Figura 1.18 A) se encuentran desordenadas en ausencia de proteínas con las que pueda interactuar GN1 (98). Por otro lado, el análisis por dicroísmo circular reveló una diferencia entre la señal de GN1 y TRIM7<sup>B30.2</sup> por separado y la mezcla de ellas, lo que indica que la interacción entre las proteínas se encuentra acompañada de un cambio conformacional (Figura 1.10). Es probable entonces, que dicho cambio conformacional involucre a la región C-terminal de GN1.

De todo el análisis realizado se desprende la necesidad de continuar con otros estudios, para comprender en mayor profundidad cuál es la función fisiológica de la interacción entre TRIM7<sup>B30.2</sup> y GN-1.

## **-Capítulo II-**

**Caracterización estructural y funcional de la mutante  
patológica Ala16Pro de glucogenina-1**

## **-II.A. Objetivos**

El objetivo de las actividades que se presentan en esta sección es analizar el efecto de la mutación patológica de glucogenina-1 Ala16Pro sobre la función y la estructura en la proteína homóloga de conejo, haciendo énfasis en el análisis de la estabilidad de la mutante y la causa molecular subyacente.

## -II.B. Procedimientos experimentales

### -II.B.1. Construcción de vectores de expresión

El ADNc correspondiente a glucogenina-1 de conejo fue subclonado en el plásmido pET-15b (Figura 1.1) para obtener la construcción pET-rGN1. Dicha construcción fue utilizada previamente en el laboratorio para obtener la forma truncada de la proteína en el aminoácido 270 (rGN1ΔC63). La construcción pET-rGN1ΔC63 fue utilizada luego como molde para introducir la mutación Ala16Pro, que en humanos provoca una deficiencia en la enzima que causa glucogenosis tipo XV, empleando el kit QuickChange de mutagénesis sitio dirigida. El protocolo de PCR empleado para la mutagénesis fue el siguiente:

#### Protocolo 2.1. PCR para mutagénesis sitio dirigida:

1-Desnaturalización del ADN	95 °C durante 1 min
2-Desnaturalización del ADN	95 °C durante 30 s
3-Hibridación de iniciadores	55 °C durante 1 min
4-Elongación de cadena	68 °C durante 14 min

Los pasos 2 a 4 fueron repetidos durante 16 ciclos.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados (Tabla 2.1) fueron sintetizados por Invitrogen.

**Tabla 2.1.** Iniciadores directos y reversos en sentido 5' a 3' utilizados para obtener las diferentes proteínas.

Proteína	Iniciador directo	Iniciador reverso
rGN1ΔC63 Ala16Pro	5' ACAAACGATGCCTAC CCCAAAGGTGCCCTG 3'	5' CAGGGCACCTTTGGG GTAGGCATCGTTTGT 3'

### -II.B.2. Expresión y purificación de proteínas

La mutante Ala16Pro de rGN1ΔC63 fue expresada en la cepa de *E. coli* Rosetta 2(DE3); y rGN1ΔC63 silvestre en la cepa CGSC 4997 (Novagen), que carece de actividad UDP-glucosa pirofosforilasa y permite obtener a la proteína no glucosilada dada la ausencia del sustrato dador de glucosa (52).

La expresión de las proteínas fue realizada como en la sección I.B.2. Luego, las células fueron cosechadas por centrifugación a 4500 x g y lisadas por alta presión en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/NaCl 500 mM, utilizando el homogeneizador EmulsiFlex-C3. Adicionalmente, las muestras del cultivo total y el extracto soluble fueron sometidas a SDS-PAGE para corroborar el nivel de pureza de las proteínas.

La purificación y cuantificación de las proteínas fue realizada como se detalla en la sección I.B.2, empleando los coeficientes de extinción molar teóricos calculados con la herramienta ProtParam (62) para rGN1ΔC63 y rGN1ΔC63 Ala16Pro ( $46410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  en ambos casos). En las ocasiones en que la cuantificación por espectrofotometría UV se vio limitada por la cantidad de proteína, se procedió a utilizar el método de Bradford (99).

### **-II.B.3. Ensayos de actividad de glucogenina-1**

#### **-Ensayo para el análisis de la autoglicosilación**

Para las mediciones de actividad de autoglicosilación, rGN1ΔC63 y rGN1ΔC63 Ala16Pro en concentración  $2,5 \mu\text{M}$  fueron incubadas en una mezcla de reacción conteniendo además MES pH 7,0  $0,1 \text{ M}$ /UDP- $^{14}\text{C}$  glucosa  $80 \mu\text{M}$ /MnSO<sub>4</sub>  $5 \text{ mM}$  en un volumen final de  $10 \mu\text{l}$  por  $5 \text{ min}$  a  $30^\circ\text{C}$ . Luego de realizar las incubaciones, las muestras correspondientes a la proteína silvestre o mutante fueron procesadas de diferentes maneras.

En primer lugar, las muestras fueron separadas para detener la reacción con el agregado de buffer de carga 3X (Anexo), y luego fueron sometidas a SDS-PAGE. El gel de poliacrilamida fue posteriormente teñido con solución de Coomassie Brilliant Blue (Anexo), lavado con solución desteñidora (Anexo) y secado durante  $2 \text{ h}$  a  $80^\circ\text{C}$  en un secador de geles BioRad modelo 503 (BioRad). Por último, el gel fue dejado en contacto con una placa radiográfica (Kodak), que fue revelada luego de transcurridos  $7 \text{ días}$  (78).

Por otro lado, la reacción fue detenida y las muestras separadas fueron procesadas como se describió en la sección I.B.6, para determinar los valores de  $^{14}\text{C}$ glucosa incorporados en glucogenina-1.

En el ensayo de autoglicosilación intermolecular se utilizaron, además, las mutantes de glucogenina-1 de conejo Tyr195Phe que puede transferir, pero no incorporar glucosa al carecer de la tirosina aceptora del carbohidrato, y Thr83Met, que solo posee capacidad aceptora, ambas previamente purificadas en nuestro laboratorio y almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$ . rGN1ΔC63 Tyr195Phe fue utilizada como molécula dadora ( $4 \mu\text{M}$ ) y rGN1ΔC63 Ala16Pro o Thr83Met como moléculasceptoras ( $0,04 \mu\text{M}$ ). Las diferentes mezclas de las proteínas fueron incubadas en un volumen final de  $40 \mu\text{l}$  de un medio de reacción conteniendo MES pH 7,0  $0,125 \text{ M}$ /albúmina sérica bovina  $20 \mu\text{M}$ /UDP-glucosa  $300 \mu\text{M}$ /UDP- $^{14}\text{C}$ glucosa  $20 \mu\text{M}$ /MnSO<sub>4</sub>  $6,25 \text{ mM}$  por  $1 \text{ h}$  a  $30^\circ\text{C}$ . Las muestras fueron luego procesadas como en la sección I.B.6 para cuantificar la  $^{14}\text{C}$ glucosa incorporada por la enzima.

### **-Ensayo para el análisis de la hidrólisis de UDP-glucosa**

Para la determinación de la hidrólisis de UDP-glucosa, las mismas mezclas de la sección anterior fueron incubadas por 2 min a 30° C, para luego detener la reacción como se mencionó en la sección I.B.6. Posteriormente, 2 µl de cada muestra fueron tomados y sembrados en una placa para cromatografía en placa delgada de alta resolución (HPTLC), utilizando como fase móvil una mezcla de etanol:acetato de amonio:ácido acético (150:8:2). La placa para HPTLC fue luego colocada junto con una placa radiográfica (Kodak), durante 7 días, tras lo cual fue revelada. Por último, la [<sup>14</sup>C]glucosa liberada debido a la hidrólisis del nucleótido UDP [<sup>14</sup>C]glucosa por rGN1ΔC63 silvestre o Ala16Pro, fue recuperada de la placa para HPTLC (100), resuspendida y cuantificada en un contador de centelleo líquido como se describió para el tratamiento de las muestras en la sección I.B.6.

### **-Ensayo para el análisis de la glucosilación de aceptores exógenos**

Para medir la capacidad de transferencia de glucosa a moléculas pequeñas (transglucosilación) se utilizó n-dodecil-β-D-maltósido (DBM) como aceptor, que fue incorporado a la mezcla de incubación descrita anteriormente en una concentración de 0,2 mM. Como en los casos anteriores, las incubaciones se llevaron a cabo por 2 min a 30 °C, para luego ser sembradas en una columna de C18 (Waters) y sometidas a cromatografía en fase reversa. El material radiactivo no retenido en la columna fue eliminado por un lavado exhaustivo con agua y el [<sup>14</sup>C] n-dodecil-β-D-maltotriósido producto de la transferencia de glucosa a DBM, fue eluido con metanol (78). Las muestras eluidas fueron tratadas como se describió en la sección I.B.6 para ser cuantificadas en un contador de centelleo líquido.

## **-II.B.4. Estudios por espectroscopía de fluorescencia**

### **-Unión de UDP**

Glucogenina-1 de conejo silvestre y Ala16Pro a concentración 20 µM, en presencia de MnCl<sub>2</sub> 1 mM y en un volumen final de 300 µl fueron tituladas con alícuotas de 1 µl de UDP 1 mM, a 25°C. Se utilizó UDP en lugar de UDPG con el fin de observar la atenuación de fluorescencia ocasionada por la unión del ligando a la proteína, sin la influencia de la incorporación de glucosa que de otro modo ocurriría con la proteína activa. Los espectros de emisión fueron registrados para las proteínas solas y luego de la adición de cada alícuota de UDP; con un tiempo de equilibrio de 2 min luego de cada adición, en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent). Cada espectro representa el promedio de 10 mediciones, que fueron realizadas en el rango 305-500 nm utilizando una  $\lambda_{exc} = 295$  nm, para la absorción de luz selectiva por los residuos Trp, con un ancho

de rendija de excitación y de emisión de 5 nm, y un ancho de banda de 1 nm. Los valores de intensidad de fluorescencia, fueron corregidos debido al cambio de volumen y procesados utilizando el método de Chipman (101). Para ello, se realizó un gráfico de  $F_0/\Delta F$  en función de  $1/[\text{UDP}]_t$ , donde  $F_0$  y  $F$  representan la intensidad de fluorescencia inicial y en cada punto de la titulación, respectivamente,  $\Delta F = F_0 - F$  es el cambio en intensidad de fluorescencia y  $[\text{UDP}]_t$  es la concentración de ligando total. A partir de dicho gráfico, se determinó la intensidad de fluorescencia a concentración infinita de ligando  $F_\infty$ , que fue utilizada para conocer la concentración de ligando libre  $[\text{UDP}]_l$  en cada punto de la titulación a partir de la ecuación 2.1, donde  $\Delta F_\infty = F_0 - F_\infty$  es el cambio en intensidad de fluorescencia a unión de saturación y  $[P]$  es la concentración total de proteína. Por último, los datos fueron analizados utilizando la ecuación 2.2 y realizando un ajuste lineal para conocer el valor de  $pK_a$  a partir de la intersección con el eje x del gráfico correspondiente, y así calcular las constantes de asociación a UDP ( $K_a$ ).

$$\text{Ecuación 2.1: } [\text{UDP}]_l = [\text{UDP}]_t - \left\{ \frac{\Delta F}{\Delta F_\infty} \cdot [P] \right\}$$

$$\text{Ecuación 2.2: } \log \left\{ \frac{\Delta F}{(F - F_\infty)} \right\} = \log K_a + \log [\text{UDP}]_l$$

### -Atenuación de fluorescencia con acrilamida

Las proteínas rGN1ΔC63 y rGN1ΔC63 Ala16Pro a concentración 20 μM y en un volumen final de 300 μl, fueron tituladas con acrilamida 4 M como agente atenuante neutro en alícuotas de 3 μl, a 25 °C. Los espectros de emisión fueron registrados para las proteínas solas y luego de la adición de cada alícuota de acrilamida, utilizando los mismos parámetros que en los experimentos de la sección anterior.

Los valores de intensidad de fluorescencia fueron corregidos debido al efecto de filtro interno por la absorción de acrilamida a 295 nm (Ecuación 2.3, ref. 102), y la disminución de intensidad de fluorescencia a 334 y 340 nm, respectivamente para la proteína silvestre y la mutante, fue utilizada para obtener la constante de Stern-Volmer (Ecuación 2.4, ref. 103).

$$\text{Ecuación 2.3: } I_{\text{corregida}} = 10^{\frac{0,23 \cdot [A]}{2}} I_{\text{medida}} \quad \text{Ecuación 2.4: } \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [A]$$

En las ecuaciones,  $F_0$  y  $F$  representan la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de agente atenuante,  $K_{SV}$  es la constante de atenuación de Stern-Volmer y  $[A]$  es la concentración de atenuante.

### -II.B.5. Espectroscopía de dicroísmo circular

Los espectros fueron registrados en un espectropolarímetro JASCO 810, utilizando una concentración de proteína de 16 μM para aquellos obtenidos en la región UV lejano y 32 μM para

el UV cercano, en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 a 25 °C. Las medidas se realizaron tanto con las proteínas solas, como luego del agregado de MnCl<sub>2</sub> y UDP para una concentración final de 1 mM. Posteriormente, se sustrajo la señal correspondiente a buffer en presencia de MnCl<sub>2</sub> y UDP. Los espectros fueron el resultado del promedio de diez mediciones para cada muestra con un ancho de banda de 2 nm, una longitud de paso 0,2 nm, una velocidad de escaneo de 50 nm/min y un tiempo de respuesta de 8 s para el UV lejano y de 2 s para el UV cercano. Para las medidas en la región UV lejano, fue utilizada una cubeta de 0,2 cm de paso óptico, mientras que para la región UV cercano la cubeta utilizada fue de 1 cm. Los datos obtenidos fueron finalmente convertidos de unidades deg a  $\theta_{MRW}$ .

#### **-II.B.6. Ensayo de proteólisis**

rGN1ΔC63 silvestre y Ala16Pro (20 μM) fueron incubadas con tripsina 0,1 μM en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 a 37 °C durante 1 h (103). Las diferentes alícuotas fueron tomadas luego de 5, 15, 30, 45 y 60 min de incubación, y en cada punto la reacción fue detenida con el agregado de buffer de carga 3X (Anexo). Las muestras fueron analizadas luego de ser sometidas a SDS-PAGE y tinción con Coomassie Brilliant Blue.

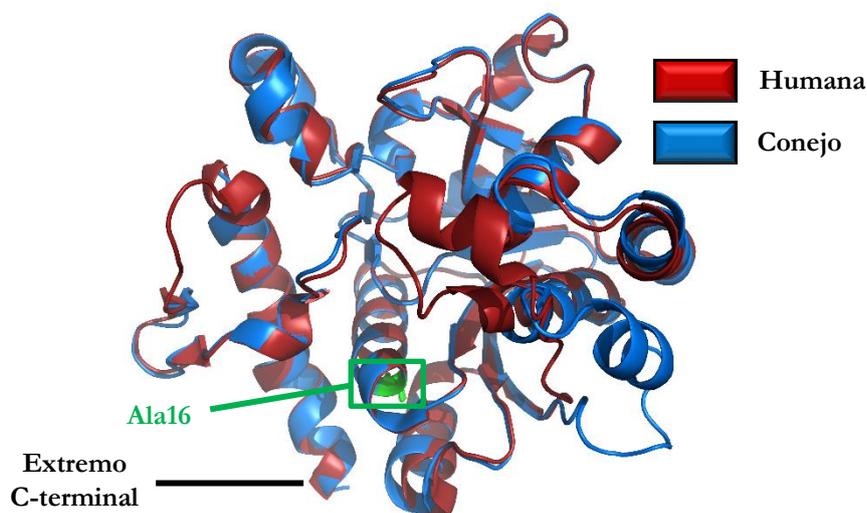
#### **-II.B.7. Calorimetría diferencial de barrido**

Los experimentos de desnaturalización térmica se llevaron a cabo utilizando un microcalorímetro MicroCal VP-DSC (Malvern Panalytical). rGN1ΔC63 silvestre y Ala16Pro fueron diluidas a 0,25 mg/ml en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 y desgasificadas durante 10 minutos previo a la siembra. En la celda de referencia fue colocado el mismo buffer utilizado para las muestras de proteínas. Los barridos de temperatura fueron realizados entre 15 y 80 °C, a una velocidad de 1 °C por minuto. Para la recolección y procesamiento de datos se utilizó el programa Origin Pro. La línea de base fue registrada utilizando el mismo buffer en las celdas de muestra y de referencia y luego sustraída de las mediciones realizadas con las proteínas.

## -II.C. Resultados

### -II.C.1. Efecto de la mutación Ala16Pro sobre la actividad de glucogenina-1

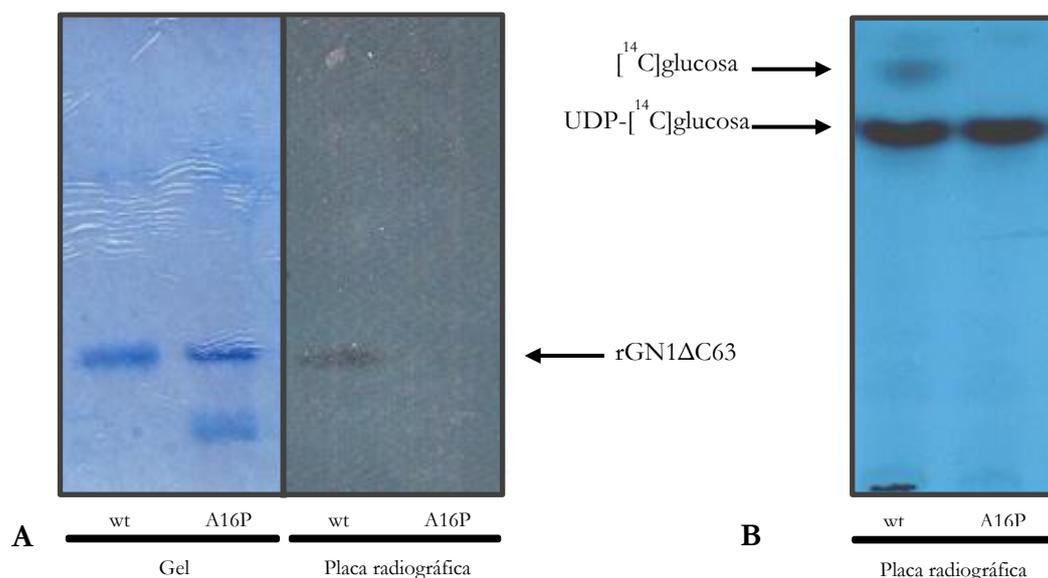
En intentos iniciales para obtener la mutante Ala16Pro de glucogenina-1 humana truncada en el aminoácido 270 (GN1ΔC63 Ala16Pro), que no posee el fragmento C-terminal, fácilmente degradado, pero aún conserva la actividad catalítica (52, 54), se observó un bajo nivel de expresión y no se encontró proteína soluble. Por este motivo y debido a que glucogenina-1 de conejo es homóloga a la proteína humana con un 93% de identidad de secuencia (100), posee estructura altamente similar (Figura 2.1) y ha sido utilizada en múltiples estudios sobre el mecanismo de acción de la enzima, la mutación Ala16Pro fue introducida en la proteína de conejo truncada (rGN1ΔC63 Ala16Pro) para los experimentos posteriores.



**Figura 2.1. Comparación de las estructuras de glucogenina-1 humana y de conejo.** Las proteínas se encuentran representadas en forma de cintas, en color rojo, la proteína humana (código de PDB: 3T7O), en color azul, la proteína de conejo (código de PDB: 1LL2), y los residuos Ala16 de ambas proteínas representados como bastones en color verde.

Los antecedentes muestran que la mutación afecta la actividad de autoglucosilación de glucogenina-1 *in vitro* (61). Por ello, la pérdida de la capacidad de autoglucosilarse de GN1 causada por la mutación fue corroborada por autorradiografía, empleando en este caso rGN1ΔC63, que solo reveló la marca ocasionada por la [<sup>14</sup>C]glucosa incorporada a la proteína silvestre, mientras que no se pudo detectar la incorporación de glucosa en la proteína mutante (Figura 2.2 A). Este resultado fue confirmado en un ensayo en el que se cuantificó la [<sup>14</sup>C]glucosa incorporada por ambas especies (Tabla 2.2). Adicionalmente, rGN1ΔC63 es capaz también de catalizar la glucosilación de aceptores exógenos (transglucosilación) y la hidrólisis de UDP-glucosa. Con el propósito de analizar si la mutación afecta estas últimas actividades, se llevaron a cabo

modificaciones al ensayo de autoglucosilación como se detalla en la sección II.B.3. En el caso de la transglucosilación sobre DBM, se observó que la mutación Ala16Pro provocó una marcada reducción, de aproximadamente 84 veces, de la transferencia de glucosa sobre el sustrato exógeno (Tabla 2.2). Además, se observó la disminución de su actividad hidrolítica frente al sustrato UDP-glucosa, la cual se encuentra por debajo del límite de detección del ensayo (Figura 2.2 B, Tabla 2.2).



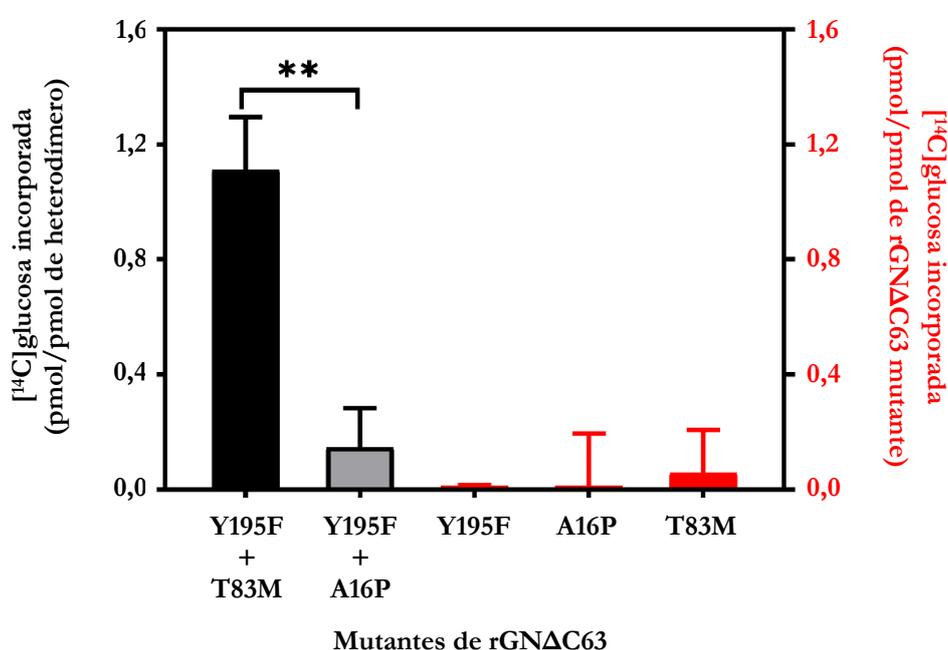
**Figura 2.2. Actividad de glucogenina-1 de conejo truncada silvestre y mutante Ala16Pro. (A) Análisis por autorradiografía de la autoglucosilación de rGN1ΔC63 silvestre y Ala16Pro.** Ambas mezclas de reacción fueron separadas en un gel de poliacrilamida (panel izquierdo), que posteriormente fue expuesto a una placa radiográfica (panel derecho) para detectar la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa. **(B) Análisis por autorradiografía de la hidrólisis de UDP-glucosa.** En la placa radiográfica se observan las marcas correspondientes a UDP-[<sup>14</sup>C]glucosa y [<sup>14</sup>C]glucosa liberada. Abreviaturas: wt (*wild-type*), silvestre; A16P, Ala16Pro.

**Tabla 2.2. Actividad de glucogenina-1 silvestre y mutante Ala16Pro.**

	Actividad (mmol de glucosa/min/mmol de proteína)		
	Autoglucosilación	Transglucosilación	Hidrólisis de UDP-glucosa
rGN1ΔC63	0,393±0,046	14,761±0,455	2,547±0,211
rGN1ΔC63 Ala16Pro	0,019±0,001	0,176±0,071	<0,050

Antecedentes obtenidos en nuestro laboratorio indican que, en las primeras etapas de la autoglucosilación, glucogenina-1 se transfiere la glucosa por un mecanismo intramolecular; mientras que solo las moléculas finales son transferidas de manera intermolecular entre los protómeros del dímero que forma (53). Para determinar si la mutante Ala16Pro, aun siendo incapaz de transferir glucosa, puede recibirla de otra molécula de glucogenina-1, se analizó la incorporación

de [<sup>14</sup>C]glucosa en un heterodímero con la mutante Tyr195Phe, que es activa para transferir glucosa, pero que carece de capacidad aceptora. Para esto, ambas mutantes de la enzima fueron mezcladas utilizando una cantidad 100 veces mayor de la mutante Tyr195Phe (4 μM) que de la mutante Ala16Pro (0,4 μM). De este modo, es esperable que la mutante Ala16Pro se encuentre mayormente formando un heterodímero con la mutante Tyr195Phe; mientras que el excedente de esta última, aun siendo capaz de formar dímeros (53) como se mencionó anteriormente, no incorporaría glucosa. Como control se analizó una mezcla similar, solo que en este caso la mutante Ala16Pro fue reemplazada por la mutante Thr83Met que tampoco tiene capacidad de transferencia de glucosa, aunque puede actuar como molécula aceptora (53). Los resultados mostraron una disminución marcada en la capacidad aceptora de Ala16Pro respecto a Thr83Met (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Autoglicosilación intersubunidad de heterodímeros.** Las diferentes mutantes de glucogenina-1 fueron mezcladas como se describió en la sección II.B.3 para medir la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa. Las barras representan el promedio ± de desviación estándar de tres experimentos. \*\*P<0,05. Abreviaturas: A16P, Ala16Pro; T83M, Thr83Met; Y195F, Tyr195Phe.

### -II.C.2. Efecto de la mutación Ala16Pro sobre la unión del sustrato

Para determinar si la pérdida de la actividad se debe a que la mutación ha afectado la capacidad de glucogenina-1 de unir el sustrato dador de glucosa, se realizaron ensayos de titulación de la proteína con UDP mediante espectroscopía de fluorescencia.

Como se mencionó en la sección II.B.4, se utilizó UDP en lugar de UDP-glucosa debido a que, con este último, además de la interacción se produciría la incorporación de la glucosa en la proteína silvestre. Los resultados mostraron una atenuación de la fluorescencia muy poco marcada para

Ala16Pro con los sucesivos agregados del ligando respecto a la observada para la forma silvestre (Figura 2.4 A); lo que sugiere un menor grado de interacción en el caso de la mutante.

Al analizar el cambio de la intensidad de fluorescencia durante la titulación con UDP, es posible caracterizar la afinidad de la unión del ligando. Para este fin, los datos fueron procesados por el método de Chipman (101) utilizando la atenuación de fluorescencia a 334 nm para rGN1ΔC63 y a 340 nm para rGN1ΔC63 Ala16Pro (Figura 2.4 B). A partir de estos valores, se obtuvo la constante de asociación para cada caso, como se describió en la sección II.B.4, que mostró un valor aproximadamente 20 veces menor para la mutante respecto a la proteína silvestre.

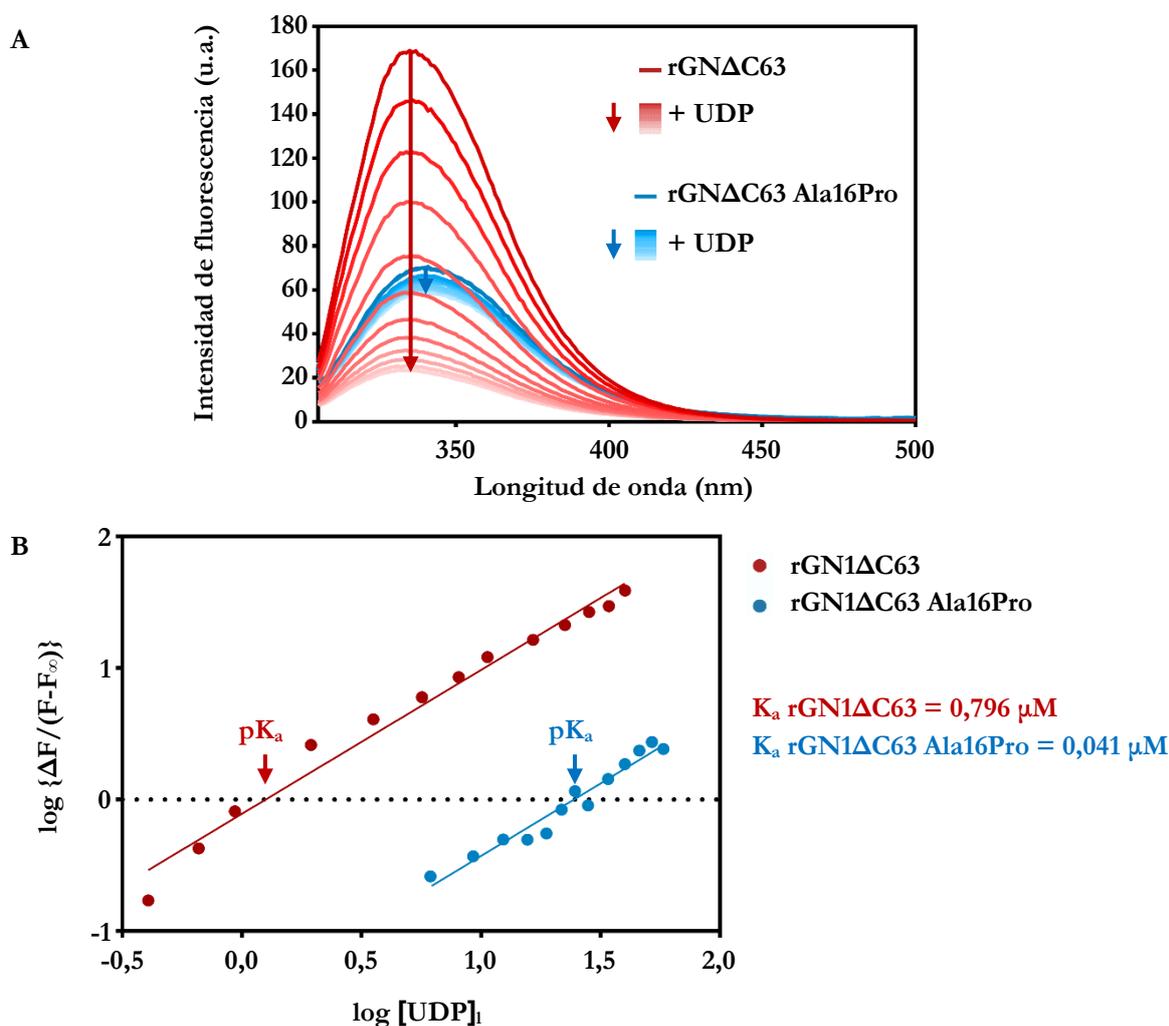
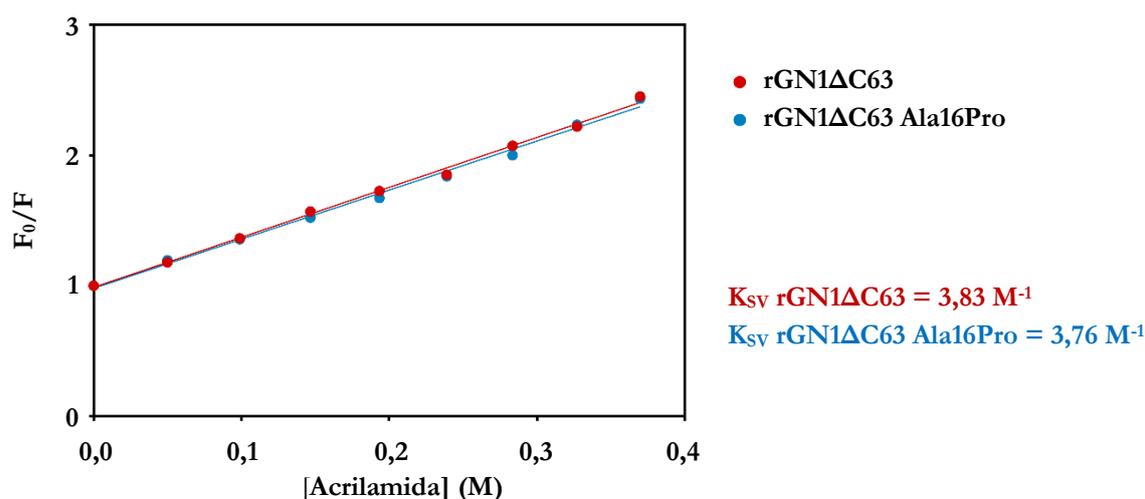


Figura 2.4. Unión de UDP a rGN1ΔC63 silvestre y Ala16Pro analizada por la atenuación de fluorescencia de triptófano. (A) Espectros de emisión de fluorescencia a concentraciones crecientes de UDP. El sentido de las flechas indica el orden en el que se obtuvieron los espectros durante el transcurso de la titulación con UDP. (B) Gráfico de Chipman. Las constantes de asociación  $K_a$  para la unión de UDP a la proteína silvestre o mutante fueron estimadas a partir de la intersección con el eje x de un ajuste lineal, que corresponde al valor de  $pK_a$ .  $F_0$  y  $F$  representan la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de ligando, respectivamente,  $F_{\infty}$  la intensidad de fluorescencia a concentración infinita de ligando y  $[UDP]_i$  la concentración de ligando libre en cada punto de la titulación.

Para evaluar la posibilidad de que la disminución de la afinidad por el UDP ocasionada por la mutación no se debiera a un cambio profundo en la estructura, se realizaron nuevas titulaciones sobre las proteínas silvestre y mutante con acrilamida, un agente atenuador polar sin carga. Los valores de fluorescencia relativa fueron calculados para concentraciones crecientes de acrilamida y los datos fueron ajustados linealmente. A partir este ajuste se determinó la constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), que no mostró un cambio significativo entre las proteínas silvestre y mutante (Figura 2.5). Esto indicaría que la mutación Ala16Pro no ha ocasionado un cambio estructural que afecte la accesibilidad a los residuos triptófano y, por lo tanto, el UDP podría acceder al sitio de unión.



**Figura 2.5. Gráfico de Stern-Volmer de atenuación de fluorescencia de triptófano.** Las constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) se obtienen a partir del análisis del gráfico de fluorescencia relativa en función de la concentración de acrilamida.  $F_0$  y  $F$  representan la intensidad de fluorescencia inicial y luego del agregado de acrilamida en cada punto de la titulación, respectivamente.

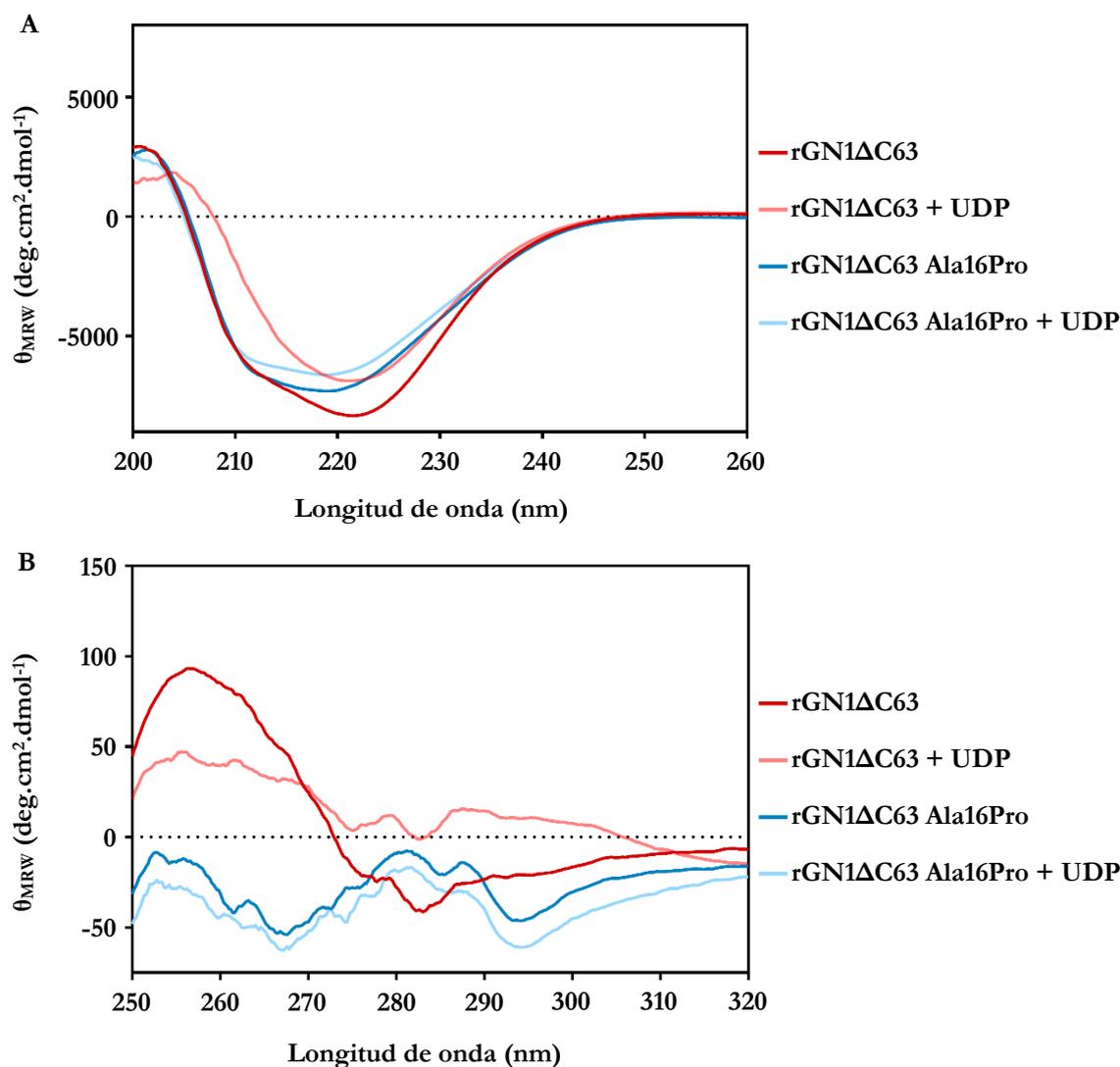
### -II.C.3. Análisis del efecto de la mutación Ala16Pro sobre la estructura de glucogenina-1

Debido a que las pruebas de cristalización realizadas con la proteína mutante no arrojaron resultados positivos, para estudiar el efecto de la mutación Ala16Pro sobre la estructura de GN1 se utilizó la técnica de espectroscopía de dicroísmo circular. Los espectros medidos en la región ultravioleta lejano revelaron diferencias de estructura secundaria (Figura 2.6 A) entre glucogenina silvestre y la mutante Ala16Pro. El cambio estructural fue evidenciado por la disminución del mínimo a 222 nm, correspondiente a una pérdida de plegamiento de hélice  $\alpha$ , y si bien se intentó estimar el contenido de estructura secundaria con los diferentes algoritmos del servidor DichroWeb, no se logró obtener un ajuste confiable con los datos experimentales.

Adicionalmente, se pudo notar un menor cambio conformacional de Ala16Pro respecto a glucogenina silvestre luego del agregado de UDP, siendo marcada la disminución de la señal de los mínimos a 208 y 222 nm y del máximo cercano a 200 nm para la forma silvestre, aunque más leve

en el caso de la proteína mutante, lo que se condice con la menor afinidad de la mutante por UDP observada en el ensayo de atenuación de fluorescencia.

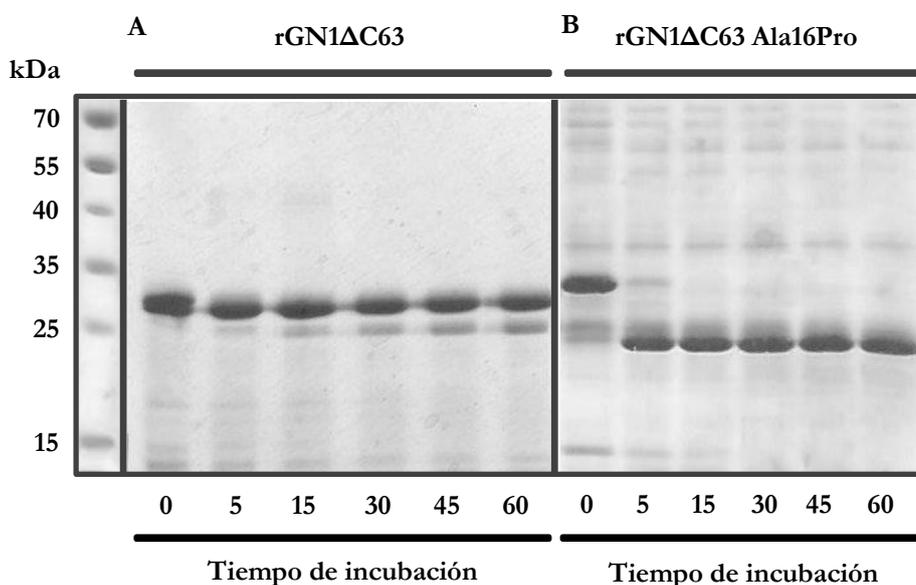
Más aún, los espectros medidos en la región del UV cercano, revelaron cambios importantes en el entorno de aminoácidos aromáticos al comparar a GN1 silvestre y la mutante Ala16Pro, indicado por las diferentes señales a  $\sim 260$  nm,  $\sim 280$  nm y 290 nm para residuos Phe, Tyr y Trp, respectivamente (104). Además, luego del agregado de UDP, en el caso de la proteína silvestre, se observó un cambio conformacional significativo; no así en el caso de la mutante, lo que nuevamente se condice con la menor afinidad por UDP observada previamente (Figura 2.6 B).



**Figura 2.6. Espectros de dicroísmo circular. (A)** Región UV-lejano y **(B)** región UV-cercano. En ambas regiones se representan los espectros de rGN1ΔC63 silvestre y de la mutante Ala16Pro solas, en líneas color rojo y azul, respectivamente, y luego del agregado de UDP, en color rosa y celeste, respectivamente.

#### -II.C.4. Análisis de la estabilidad de la mutante Ala16Pro

Para estudiar si la mutación afecta la estabilidad de rGN1ΔC63 respecto a la proteólisis, se realizó un ensayo de digestión parcial de la proteína silvestre y la mutante con tripsina, como se detalla en la sección II.B.6, en el cual se tomaron alícuotas de cada mezcla de reacción a diferentes tiempos de incubación que luego fueron sometidas a SDS-PAGE. Durante la reacción, se observó que la degradación de glucogenina silvestre procede muy lentamente, dando lugar en el tiempo analizado principalmente a un único producto de aproximadamente 28 kDa, mientras que la mayor parte de la proteína entera aún permanece sin degradar luego de transcurrida una hora de tratamiento (Figura 2.7 A). En el caso de la mutante Ala16Pro, la acción de la proteasa fue muy rápida; tanto que a los 5 min la mayor parte de la proteína ya había sido degradada y a los 15 minutos la degradación era completa. Además, presentó un patrón de degradación diferente, en el que destaca como producto mayoritario, una especie de alrededor de 23 kDa (Figura 2.7 B). Esto permite inferir, ya que la mutación de Ala16 por prolina no introduce un sitio adicional para el reconocimiento por parte de tripsina, que el cambio en la estructura que provoca la mutación hace que un sitio de corte para la proteasa resulte fácilmente accesible y que además dicho sitio sería diferente al que es reconocido en la proteína silvestre.

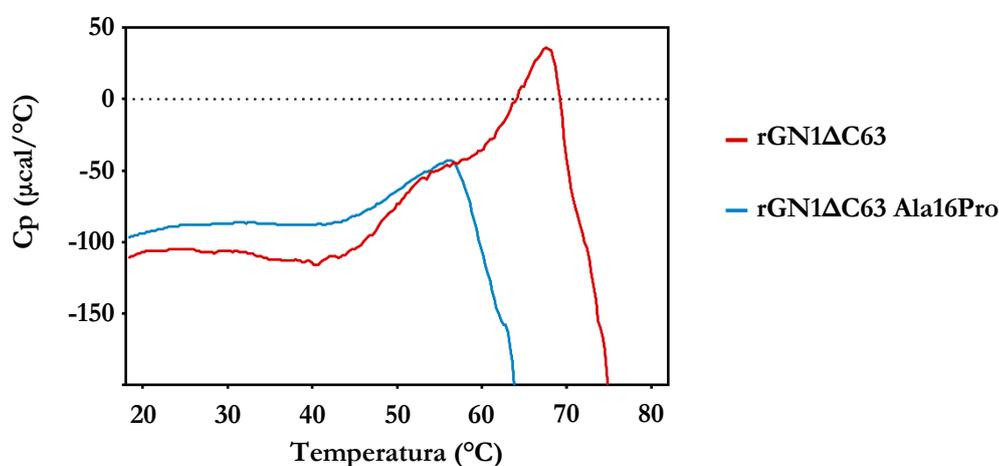


**Figura 2.7. Análisis de resistencia a la proteólisis.** A los tiempos de incubación indicados se tomaron alícuotas de las digestiones de **(A)** rGN1ΔC63 silvestre y **(B)** mutante Ala16Pro con tripsina, la reacción se detuvo con el agregado de buffer de carga 3X y finalmente todas las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

La degradación espontánea de la proteína mutante también se observa en el lapso de una semana, solo que en ese caso el producto es de aproximadamente 25 kDa, como se observa en la Figura 2.7 B a tiempo inicial. Un análisis por inmunoblot con anticuerpo anti His<sub>6</sub>-tag (no mostrado), reveló

que dicha especie aún posee el His<sub>6</sub>-tag N-terminal, lo que indica que la degradación espontánea ocurre desde el extremo C-terminal.

Para complementar el estudio anterior, se analizó la estabilidad térmica de ambas proteínas por calorimetría diferencial de barrido. El termograma fue registrado entre 15 y 85 °C y la medición fue detenida en este punto por la precipitación de las proteínas al desnaturalizarse (Figura 2.8). Los resultados mostraron la presencia de dos transiciones térmicas en el desplegamiento para rGN1ΔC63 silvestre, aproximadamente a 55 °C y a 68 °C, previo a una caída abrupta de la señal que fue asociada a su desnaturalización y agregación, lo que dificultó realizar la integración de los datos. En cambio, este proceso para la mutante Ala16Pro ocurrió a una temperatura cercana a los 55 °C, además de exhibir una sola transición (Figura 2.8).



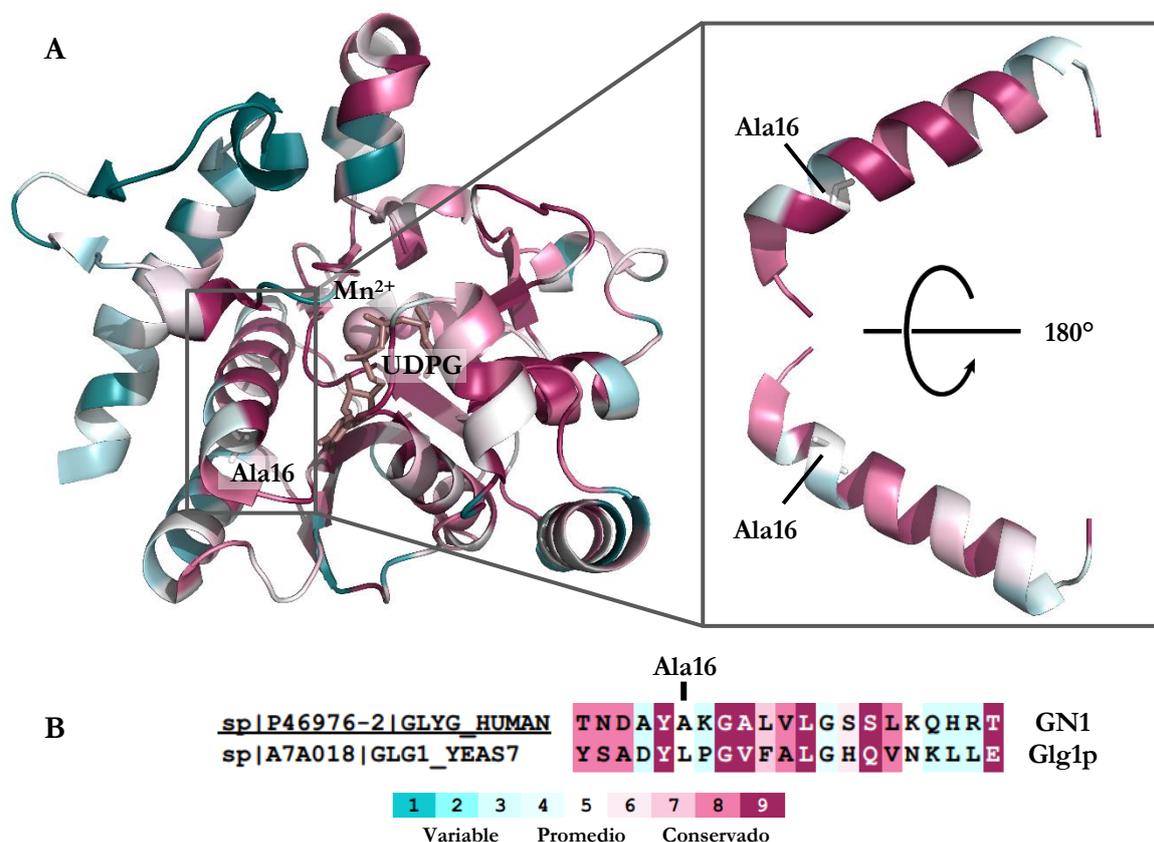
**Figura 2.8. Análisis de la estabilidad térmica.** Datos de calorimetría diferencial de barrido representando el cambio de calor específico (Cp) a medida que ocurre el desplegamiento de rGN1ΔC63 silvestre y Ala16Pro.

En conjunto, la proteólisis con tripsina y la desnaturalización térmica revelan una menor estabilidad general de la mutante Ala16Pro, que es muy probablemente una consecuencia de los cambios estructurales que dicha mutación genera en la proteína.

## -II.D. Discusión

Los defectos en las enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno causan enfermedades de almacenamiento del polisacárido. Recientemente, se ha descrito una nueva miopatía con cuerpos de poliglucosano debido a variantes patogénicas del gen GYG1 que codifica para la proteína glucogenina-1, entre ellas la variante con cambio de sentido que produce la alteración Ala16Pro en la proteína (61).

El alineamiento de secuencias de glucogenina-1 de 50 especies realizado con Clustal Omega (73) y el posterior análisis con el servidor Consurf (74) de la estructura de la proteína humana revelaron que, si bien Ala16 de GN1 humana, también presente en la proteína de conejo, está localizada en una hélice  $\alpha$  que comprende aminoácidos mayormente conservados (Figura 2.9), presenta un grado promedio de conservación.



**Figura 2.9. Análisis de conservación de secuencias de glucogenina-1.** (A) Análisis de conservación sobre la estructura de glucogenina-1 humana (GN1, código de PDB: 3T7O). La proteína se encuentra representada en forma de cintas, Ala16 y el ligando UDPG en forma de bastones y el ion  $Mn^{2+}$  como una esfera. Las secuencias de glucogenina-1 de 50 especies fueron tomadas de la base datos UniProt (30) y utilizadas en un alineamiento múltiple con el programa Clustal Omega, mientras que el grado de conservación asignado a cada aminoácido por el servidor Consurf se observa en escala entre turquesa (residuos variables) y violeta (residuos altamente conservados). (B) Alineamiento de secuencias de GN1 (aminoácidos 11-31) y la proteína homóloga de levadura Glg1p (aminoácidos 12-32). La secuencia mostrada corresponde a la región ampliada en (A).

A pesar de que en las bases de datos se encuentran numerosas secuencias de glucogenina-1 y glucogeninas putativas de orígenes muy variados y con diferentes grados de homología respecto a GN1, con la proteína Glg1p de levadura hay suficiente evidencia genética y bioquímica que demuestra además la homología funcional (105). La proteína Glg1p tiene ~33% y ~29% de identidad de secuencia con las proteínas de conejo y humana, respectivamente. Curiosamente, como se observa en el análisis de conservación de secuencia, posee un residuo prolina en la posición 18 variable, equivalente a Lys17 en GN1, que estaría localizado sobre la misma región de la hélice  $\alpha$  donde se encuentra el residuo Ala16 en GN1 (Figura 2.9 B). Sin embargo, a pesar de que los residuos prolina generalmente alteran la conformación de las hélices  $\alpha$ , la presencia de Pro18 no tiene un efecto sobre la estructura de Glg1p tal que impida que la proteína pueda cumplir su función de autoglucosiltransferasa. Este hecho y el que la mutación por prolina ocurre en una región de GN1 con un grado de conservación intermedio, a diferencia de otras mutaciones patológicas en aminoácidos conservados como se mencionó en la Introducción, hicieron que resultara de interés estudiar el motivo por el que la mutación Ala16Pro provoca la pérdida de actividad de la enzima y, en consecuencia, la patología.

De las mutantes patológicas estudiadas en nuestro laboratorio, anteriormente se logró resolver la estructura cristalográfica de rGN1 $\Delta$ C63 Thr83Met (100), por lo que inicialmente se realizaron pruebas de cristalización con la mutante Ala16Pro de rGN1 $\Delta$ C63. Dado que estas pruebas no dieron resultados positivos, se emprendió un estudio mediante el empleo de técnicas biofísicas y pruebas funcionales para comprender cómo afecta dicha mutación a la enzima de conejo. El estudio podría ser extrapolado a GN1 humana, considerando la alta homología entre las proteínas (93% de identidad) y el alto grado de conservación de los aminoácidos localizados sobre la hélice  $\alpha$  cercanos a Ala16.

Luego de purificar a rGN1 $\Delta$ C63 Ala16Pro, esta fue utilizada en el ensayo de autoglucosilación para comprobar la pérdida de actividad descrita previamente (61), en este caso analizada tanto por autorradiografía como mediante la cuantificación por incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa. La notable reducción de la capacidad de hidrólisis de UDP-glucosa y transglucosilación respecto a la proteína silvestre, en un principio sugeriría un impedimento para adoptar la conformación adecuada que permite la transferencia de glucosa a un sustrato.

Al respecto, el análisis comparativo por atenuación de fluorescencia entre rGN1 $\Delta$ C63 silvestre y la mutante mostró una afinidad mucho menor de esta última por UDP, y por lo tanto de UDPG, probablemente atribuible a una modificación apreciable de la estructura. Por lo tanto, si bien no puede ser descartada una falla en la capacidad de transferir glucosa, la disminución de la afinidad por el sustrato dador podría ser considerado el primer motivo de la pérdida de actividad catalítica

de la enzima. Por otro lado, la acrilamida es una molécula neutra que accede parcialmente al interior de las proteínas (101, 103), que fue utilizada en los ensayos de atenuación de fluorescencia y de cuyo análisis se determinaron las constantes de Stern-Volmer similares entre proteína silvestre y mutante. Más aún, mediante un ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído se obtuvo un indicio de que la proteína mutante se asocia formando especies de alto peso molecular (no mostrado) en comparación a la proteína silvestre, probablemente debido a la exposición parcial de ciertos residuos hidrofóbicos. Los ensayos de atenuación de fluorescencia indicarían que los cambios conformacionales que pudieran haber ocurrido debido a la mutación no modificaron la accesibilidad de los residuos triptófano, a pesar de la formación de especies de alto peso molecular en el caso de la proteína mutante. Esto sugiere que, de haberse conservado estructuralmente intacto, el sitio de unión hubiera estado accesible al UDP.

El efecto de la mutación sobre la estructura se hace más claro al analizar los resultados obtenidos por espectroscopía de dicroísmo circular en el espectro UV lejano, que revelan una reducción del contenido de hélice  $\alpha$  respecto a la proteína silvestre, atribuible a la posición del residuo Ala16 en una hélice y a la probable distorsión que la presencia de un residuo prolina pueda producir en ella. Esta diferencia respecto a la proteína silvestre es más notable en el espectro UV cercano, lo que da incluso más sustento a la hipótesis de que la baja afinidad de unión del UDP a Ala16Pro se debería al cambio conformacional que produce la mutación.

La perturbación de la estructura incluso afectaría el correcto funcionamiento de la mutante como sustrato aceptor, evidenciado por la imposibilidad de incorporar glucosa cuando fue incubada con la mutante Tyr195Phe, probablemente debida a una imposibilidad de asociarse a ella, como sí lo hace, en cambio, la mutante Thr83Met, cuya estructura es muy similar a la de la proteína silvestre (100). La formación de especies de alto peso molecular de Ala16Pro también podría ser un motivo por el que la proteína no pueda formar el heterodímero correspondiente con la mutante Tyr195Phe, y por lo tanto de que no sea capaz de recibir glucosa.

Por otra parte, la menor estabilidad de Ala16Pro observada en el ensayo de proteólisis con tripsina sugiere que la mutante podría también ser más susceptible al ataque de proteasas *in vivo*. Dicho ensayo mostró una rápida degradación a una especie de aproximadamente 23 kDa que parece tener mayor estabilidad que la especie de partida. En la proteína silvestre, la hélice  $\alpha$  donde se localiza Ala16 se mantiene en proximidad a la hélice que forma el fragmento C-terminal (Figura 2.1). Es posible que la introducción del residuo prolina provoque la alteración de las interacciones entre ambas hélices, lo que resultaría en una estructura general menos compacta, y por lo tanto en que esta región quede más accesible al reconocimiento por proteasas. Si esta u otras regiones adicionales de la mutante Ala16Pro poseen interacciones más débiles que GN1 silvestre, también

se debería requerir menor energía para que se produzca la desnaturalización. Esto ocurrió en efecto durante la rampa de temperatura utilizada en el ensayo de calorimetría, donde fue observada una sola transición asociada al desplegamiento, a menor temperatura que para la proteína silvestre. La menor estabilidad que ocasiona la mutación, sumado al hecho de que la proteína mutante al no formar parte del glucógeno es más susceptible a la acción de proteasas, podrían ser las razones de que no se detectara la presencia de la proteína en músculo esquelético en el paciente reportado, a diferencia de las otras proteínas mutantes (58-61).

A pesar de que la sustitución por prolina ocurre en un aminoácido poco conservado, los resultados obtenidos mostraron un efecto pronunciado sobre la estructura y función de glucogenina-1 truncada de conejo.

En el caso de la proteína mutante humana, solo se logró purificarla en baja cantidad y con muchas impurezas. A pesar de ello, algunos de los resultados obtenidos con la proteína de conejo truncada pudieron ser replicados con ella (no mostrado), lo que sugiere que se podría esperar un comportamiento similar debido a la alta homología de secuencia entre la GN1 de humano y de conejo mencionada anteriormente. El hecho de que la mutación Ala16Pro no se encuentre sobre la región C-terminal de la proteína, posiblemente permita su reconocimiento por parte del dominio B30.2 de TRIM7, y por este motivo resulta de interés estudiar si esta interacción ocurre, y si TRIM7 tiene actividad sobre esta mutante.

## **-Capítulo III-**

# **Glucogenina-1 silvestre y mutantes patológicas como sustratos de ubiquitinación de TRIM7**

### **-III.A. Objetivos**

El primer objetivo de esta sección consiste en analizar la interacción de TRIM7 con la mutante Ala16Pro de glucogenina-1 humana como punto de partida para comprender su relevancia funcional. El siguiente objetivo se centra en estudiar la actividad E3 ligasa de TRIM7 frente a glucogenina-1 y sus mutantes patológicas; además de vincular esta actividad con la información obtenida durante todo el desarrollo del trabajo de tesis.

## -III.B. Procedimientos experimentales

### -III.B.1. Construcción de vectores de expresión

Las secuencias de ADN que codifican para la enzima activadora de ubiquitina (Uba1) y para la enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2D1), ambas con un *His<sub>6</sub>-tag* N-terminal y clonadas en los plásmidos pET21d y pET15, respectivamente, y para ubiquitina (Ub) en el plásmido pET15 fueron adquiridas en Addgene (Figura 3.1) (106-108). Todas las proteínas son humanas y, en el caso de la enzima UBE2D1, fue elegida debido a que es una de las dos enzimas E2 empleadas en los ensayos de autoubiquitinación de TRIM7 con las que se encontró una actividad óptima (32).

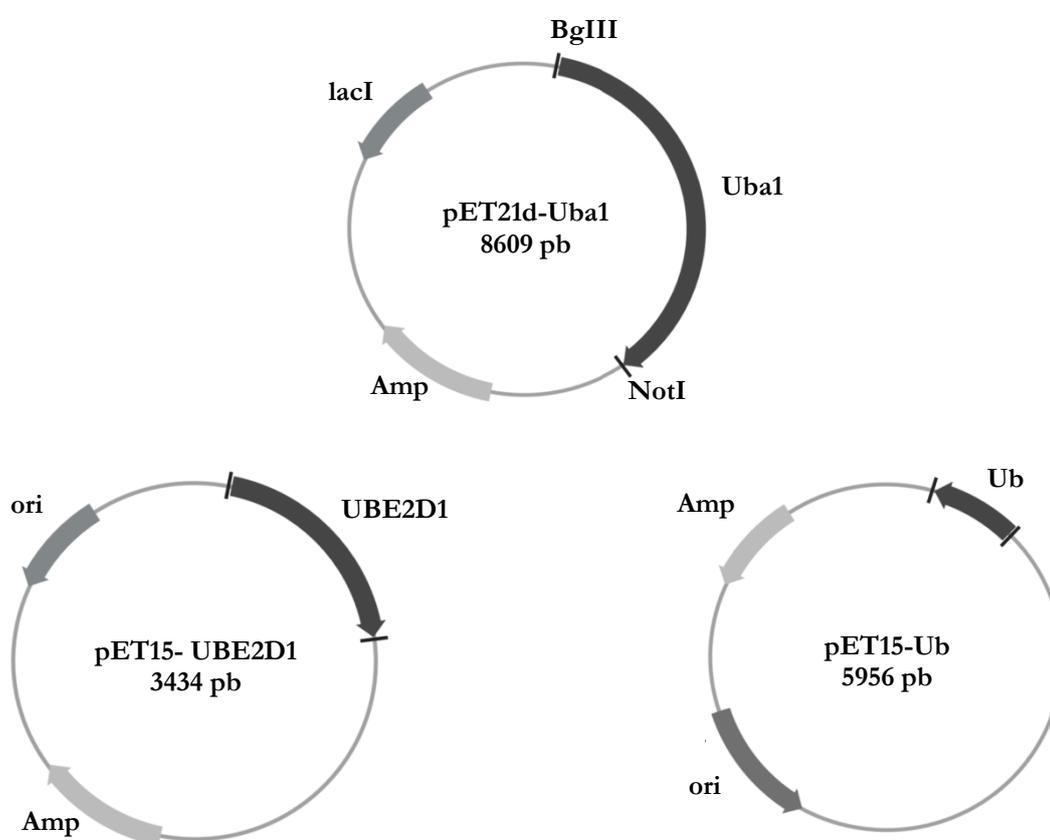
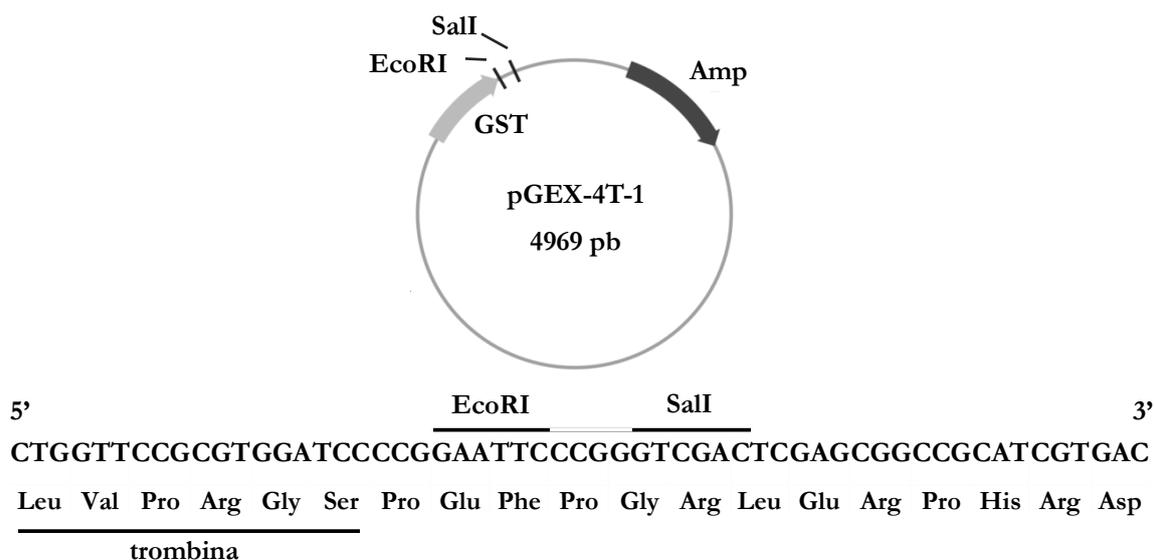


Figura 3.1. Esquema de plásmidos con los insertos correspondientes para la expresión de Uba1, UBE2D1 y Ub. Todos los plásmidos poseen la secuencia que codifica para la resistencia a ampicilina.

El ADNc que codifica para la proteína TRIM7 humana fue hecho sintetizar y subclonar en el plásmido pUC57 (Genscript). Dicha construcción fue utilizada como molde para la amplificación por PCR de la secuencia que codifica a la proteína completa y su subclonado en el plásmido pGEX-4T-1 (Figura 3.2) en los sitios para las enzimas de restricción EcoRI y SalI río abajo de la secuencia que codifica para la proteína glutatión transferasa, GST.



**Figura 3.2. Esquema de pGEX-4T-1.** El plásmido contiene secuencias que codifican para la resistencia a ampicilina y para un sitio de reconocimiento de trombina, que permite separar a GST de la proteína de interés.

El diseño de iniciadores (Tabla 3.1) incluyó además la secuencia que codifica para un His<sub>6</sub>-tag en el extremo C-terminal de TRIM7 para obtener la proteína de fusión GST-TRIM7-His<sub>6</sub>.

**Tabla 3.1.** Iniciadores directos y reversos en sentido 5' a 3' utilizados para obtener la proteína TRIM7.

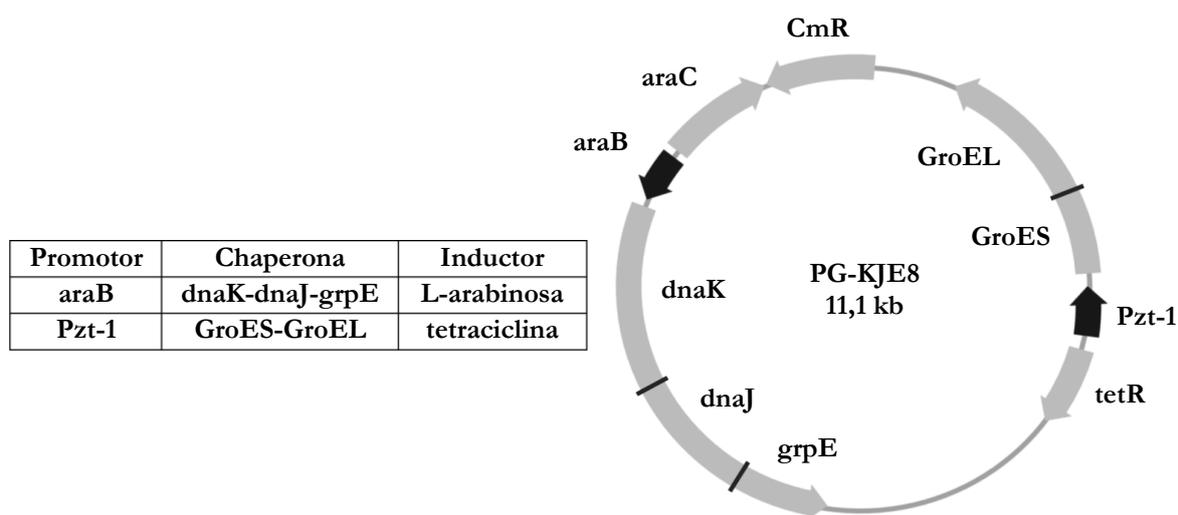
Proteína	Iniciador directo	Iniciador reverso
TRIM7	5' GGTGGTGAATTCATGGCG GCTGTTGGTCCACGCACG 3'	5' GGTGGTGTCGACTCAATGATGATGATG ATGATGAGGCCAGATACGCAGGTAAGT 3'

La construcción pET-GN1 (Sección I.B.1) fue utilizada como molde para introducir la mutación Ala16Pro en glucogenina-1 humana (GN1 Ala16Pro). como se describió en el procedimiento de la sección II.B.1.

### -III.B.2. Expresión y purificación de proteínas

Todas las proteínas fueron expresadas en la cepa Rosetta 2(DE3) de *E. coli*, con la excepción de GN1 y GN1 Ala16Pro. GN1 fue expresada en la cepa CGSC 4997 para obtener la proteína no glucosilada y GN1 Ala16Pro fue expresada en la cepa BL21(DE3) previamente transformada con el plásmido pG-KJE8 (Figura 3.3) incluido en el kit Chaperone Plasmid Set (Takara Bio). La coexpresión de GN1 Ala16Pro junto a las chaperonas GroES, GroEL, dnaK, dnaJ y grpE codificadas en pG-KJE8, permitió obtenerla soluble para los estudios posteriores. Las bacterias fueron crecidas en medio LB (Anexo) a 37°C hasta una D.O.<sub>600</sub> entre 0,3 y 0,6, momento en que se indujo la expresión con el agregado de distintas cantidades de IPTG (Tabla 3.2) y la posterior

incubación a 18°C durante 14 h, con la excepción de ubiquitina, cuya expresión fue realizada a 37°C durante 3 h y 30 min. En el caso del cultivo de las bacterias transformadas con pG-KJE8, este fue suplementado con tetraciclina 2 ng/ml y L-arabinosa 0,5 mg/ml para inducir la expresión de las chaperonas, mientras que la expresión de GN1 Ala16Pro fue llevada a cabo como se describió en el procedimiento de la sección I.B.2. Todas las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4500 x g y lisadas en un homogeneizador EmulsiFlex-C3.



**Figura 3.3. Esquema del plásmido pG-KJE8.** El plásmido ha sido diseñado para la expresión eficiente de múltiples chaperonas moleculares que asisten en el proceso de plegamiento de las proteínas. Además, posee el gen CmR para la resistencia a cloranfenicol. Abreviaturas: kb, kilo pares de bases.

Adaptado de “DNA Cloning Vectors” por BioRender.com (2021). Extraído de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

La enzima activadora de ubiquitina Uba1 fue purificada luego de la siembra del extracto soluble de las bacterias conteniendo buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/NaCl 500 mM/ $\beta$ ME 5 mM, en una columna HisTrap HP con Ni<sup>2+</sup>-NTA y eluida con un gradiente de imidazol. Posteriormente, la mezcla de las fracciones que contenían la proteína fue concentrada, dializada en solución buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/NaCl 50 mM/ $\beta$ ME 5 mM y sometida a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono Q 5/50 GL (GE Life Sciences). Las fracciones de la elución en las que estaba presente la proteína fueron concentradas y dializadas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4/NaCl 100 mM/ $\beta$ ME 7,5 mM (106).

Proteína	[IPTG]
Uba1	0,5 mM
UBE2D1	0,4 mM
TRIM7	1 mM
Ub	0,5 mM

La enzima conjugadora de ubiquitina UBE2D1 fue purificada luego de la siembra del extracto soluble de las bacterias conteniendo buffer Tris-HCl pH 7,4 50 mM/ $\beta$ ME 5 mM/NaCl 150

mM/tritón X-100 0,5%/PMSF 0,1 mM en una columna con Ni<sup>2+</sup>-NTA, y eluida con imidazol. Las fracciones conteniendo la proteína fueron concentradas y dializadas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4/ $\beta$ ME 5 mM/NaCl 150 mM (107, 109).

La enzima E3 ubiquitina ligasa TRIM7 fue obtenida en el extracto de las bacterias conteniendo buffer Tris-HCl pH 7,5 50 mM/NaCl 150 mM/glicerol 10%/tritón X-100 0,5%/PMSF 0,1 mM/TCEP 0,5 mM (Buffer D, ref. 34) al momento de ser utilizada en los ensayos posteriores. Esta estrategia se utilizó para prevenir la precipitación y posible modificación por glutatión de residuos cisteína durante la purificación que pudieran interferir en la interacción con GN1 como ocurre con TRIM7<sup>B30.2</sup> en presencia de  $\beta$ ME (Figuras 1.9 y 1.10).

La preparación enriquecida en la proteína ubiquitina fue obtenida por sucesivas etapas de concentración en filtros de límites de exclusión diferentes. En la primera de esas etapas, el extracto soluble de las bacterias conteniendo buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0/EDTA 5 mM fue concentrado en filtros de ultracentrífuga Amicon (Merck Millipore) con límite de exclusión de 30000 kDa. El material no retenido fue posteriormente concentrado en filtros de ultracentrífuga con límite de 3000 kDa, diluido mil veces para eliminar restos del extracto bacteriano de bajo peso molecular y concentrado nuevamente en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4/NaCl 0,5 M/EDTA 5 mM previo a su almacenamiento (108, 110). Todas las proteínas fueron almacenadas a -80 °C en el buffer correspondiente con glicerol 10%.

Glucogenina-1 humana no glucosilada fue purificada como se describió en la sección II.B.2, y posteriormente sometida a un tratamiento con trombina (Biomed) durante 2 h a temperatura ambiente para separar a la proteína del His<sub>6</sub>-tag N-terminal.

La mutante Ala16Pro de glucogenina-1 humana fue obtenida del mismo modo que TRIM7 para ser utilizada a partir del extracto de las bacterias en el momento de los ensayos, debido a la precipitación de la proteína en previos intentos de purificación.

La mutante GN1 Thr83Met, rutinariamente preparada en nuestro laboratorio, fue purificada como se detalla en el procedimiento para GN1 silvestre en la sección I.B.2.

GN1 y GN1 Thr83Met fueron cuantificadas por espectrofotometría UV como se describió en la sección I.B.2, mientras que la concentración de las demás proteínas debido a su bajo nivel de pureza fue estimada mediante SDS-PAGE y posterior análisis con el programa ImageJ (77). TRIM7 y GN1 Ala16Pro no pudieron ser cuantificadas en el extracto por la baja proporción de proteína soluble respecto al total de proteínas, por lo que en los ensayos se utilizaron cantidades que pudieran ser detectadas por inmunoblot.

### **-III.B.3. Análisis de la interacción de TRIM7 con variantes de glucogenina-1**

La interacción entre las variantes de glucogenina-1 y TRIM7 fue analizada mediante ensayos de *pull-down* siguiendo la estrategia que se describió en la sección I.B.5. Para ello, se utilizaron las diferentes versiones de glucogenina-1 fusionadas a inteína (inteína-GN1, inteína-GN1 $\Delta$ C33) e inteína sola, inmovilizadas en una resina de quitina y cuantificadas para utilizar cantidades similares (Sección I.B.5). A continuación, cada muestra de resina fue incubada con 50  $\mu$ l de extracto de las bacterias expresando TRIM7 en buffer D (Sección III.B.2) durante 2 h a 4°C. Luego, las resinas fueron lavadas tres veces con buffer D y la proteína fue separada por el agregado de buffer de carga 3X (Anexo). Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario *rabbit* anti-TRIM7, posteriormente con uno secundario *donkey* anti-*Rabbit* IgG IRDye® 680RD, y finalmente tratadas como se describió en la sección I.B.5.

La interacción entre TRIM7 y GN1 Ala16Pro fue analizada, utilizando una estrategia similar a la previamente descrita para la proteína silvestre, pero adaptada a una cromatografía de afinidad. En este caso, el extracto de las bacterias en buffer D expresando TRIM7 fue sembrado en una columna GSTrap (GE Life Sciences) para inmovilizar a la enzima fusionada a la proteína GST en su extremo N-terminal que se une al glutatión fijado en la columna. Luego de realizar un lavado equivalente a 10 volúmenes de columna con el mismo buffer, se procedió a sembrar el extracto de bacterias en buffer D expresando GN1 Ala16Pro. La columna fue lavada nuevamente como en el paso anterior y las proteínas fueron eluidas con buffer D/glutatión libre 20 mM. Como control, el extracto de las bacterias expresando GN1 Ala16Pro fue sembrado en una columna GSTrap previamente equilibrada en buffer D, seguido de un lavado equivalente a 10 volúmenes de columna y elución con buffer D/glutatión 20 mM.

### **-III.B.4. Ensayo de ubiquitinación**

Para conocer si GN1 es sustrato de la ubiquitinación mediada por TRIM7, se prepararon mezclas de reacción con diferentes versiones de la enzima. Dichas mezclas contenían buffer Tris-HCl 50 mM pH 8/NaCl 150 mM/TCEP 0,5 mM/MgCl<sub>2</sub> 20 mM/ATP 10 mM/Uba1 0,1  $\mu$ M/UBE2D1 1  $\mu$ M/Ub 10  $\mu$ M en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las bacterias expresando TRIM7 fueron lisadas en buffer D y 10  $\mu$ l del extracto obtenido fueron agregados a la mezcla de reacción. En las diferentes mezclas, GN1 no glucosilada fue utilizada en concentraciones de 0,4  $\mu$ M y 2  $\mu$ M, a las que la proteína se encuentra como monómero y dímero, respectivamente, sin tratar con trombina y luego de dicho tratamiento por 2 h. La mutante GN1 Thr83Met fue utilizada para las reacciones a una

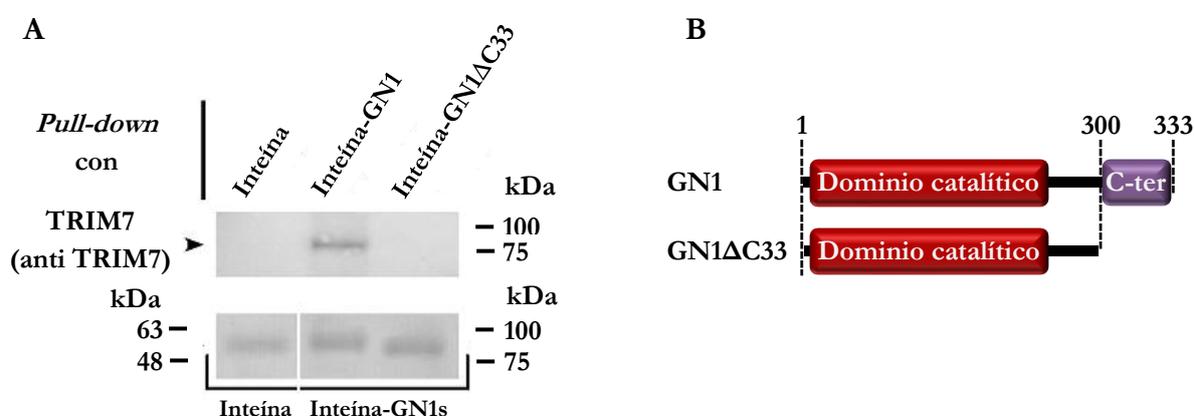
concentración de 2  $\mu$ M, mientras que GN1 Ala16Pro fue incluida en la mezcla de reacción utilizando 10  $\mu$ l del extracto de las bacterias coexpresando chaperonas (sección III.B.2). Debido a las dificultades mencionadas en la sección III.B.2 para purificar a TRIM7 y GN1 Ala16Pro, y que ya se ha descrito el uso de E3 ligasas desde extracto de bacterias en reacciones de ubiquitinación *in vitro* (111), se empleó la misma estrategia para estas proteínas. Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 30 °C, momento en que se agregó ubiquitina al medio para comenzar la reacción, que fue detenida luego de 0, 20 y 60 min de incubación con el agregado de buffer de carga 3X (Anexo) en presencia de urea 4M.

Los productos de reacción fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a membranas de PVDF en buffer de transferencia (Anexo) con SDS 0,01%. Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBS (Anexo)/Tween 20 0,2 %/albúmina sérica bovina 1% e incubadas con los anticuerpos primarios *mouse* anti-Ub y *goat* anti-GN1, seguido de los anticuerpos secundarios *goat* anti-*mouse* IgG IRDye® 800 o *donkey* anti-*goat* IgG IRDye® 800CW, respectivamente, y finalmente analizadas utilizando el sistema de imagen en infrarrojo Odyssey.

## -III.C. Resultados

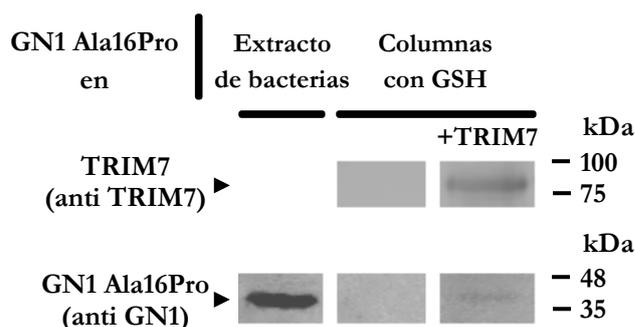
### -III.C.1. Actividad E3 ligasa de TRIM7 sobre glucogenina-1 y mutantes patológicas.

Con la intención de confirmar si la construcción obtenida de TRIM7 interacciona con glucogenina-1, tal como lo hace el dominio B30.2 aislado, se realizó el ensayo de *pull-down* con la proteína completa. Los resultados indican que TRIM7 interacciona con GN1 entera pero no queda retenida en la resina con la mutante de delección GN1 $\Delta$ C33 inmovilizada (Figura 3.4). Esto confirma que TRIM7 interaccionaría a través de su dominio B30.2 con la región que comprende los últimos 33 aminoácidos de GN1, tal como lo sugerían los estudios con el dominio aislado (Figura 1.11).



**Figura 3.4.** Análisis por *pull-down* de la interacción de TRIM7 con el extremo C-terminal de GN1. **(A)** GN1 y GN1 $\Delta$ C33 fusionadas a inteína e inmovilizadas en la resina de quitina fueron incubadas con extractos solubles de *E. coli* expresando TRIM7 y analizadas por inmunoblot con un anticuerpo anti-TRIM7. Como control, se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue, donde se observan las cantidades similares de inteína, o inteína fusionada a las variantes de GN1 inmovilizadas en las resinas. **(B)** Representación esquemática de las versiones de GN1 utilizadas en los ensayos. Abreviaturas: C-ter, región carboxilo terminal.

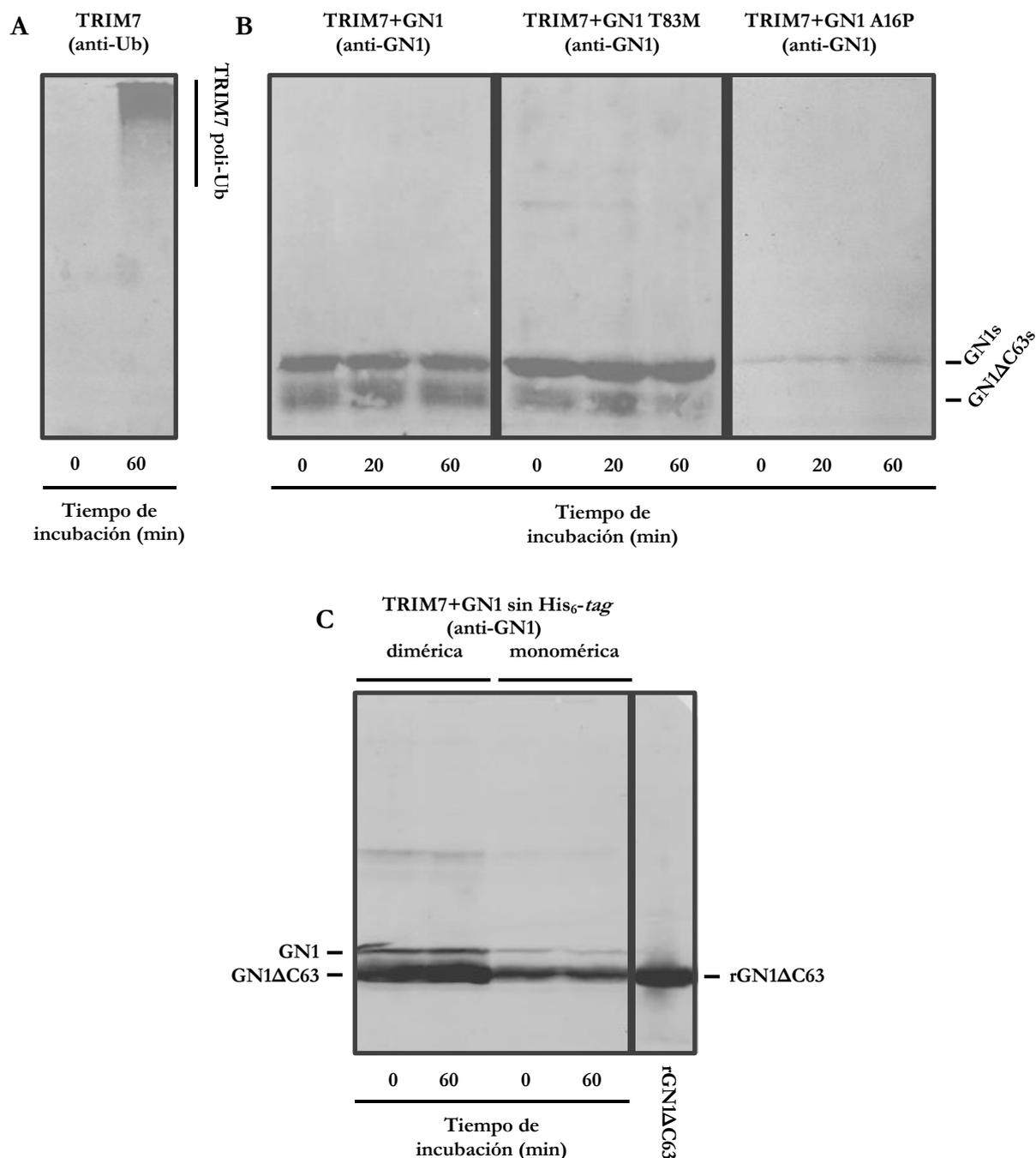
Debido a la alta homología entre glucogenina-1 de conejo y humana (100), es esperable que el notable cambio estructural observado en la proteína de conejo truncada (rGN1 $\Delta$ C63 Ala16Pro) descrito en el Capítulo II (Figura 2.6), también ocurra en la versión humana de la mutante. Debido a esto, resultó necesario determinar si TRIM7 es capaz de interaccionar con esta mutante de GN1 humana, para lo que se utilizó un ensayo similar al *pull-down* usado anteriormente con la proteína silvestre. En este caso, así como con GN1, también se observó la interacción de TRIM7 con GN1 Ala16Pro (Figura 3.5), sin embargo, la proporción de GN1 mutante retenida por TRIM7 respecto al material total sembrado es muy pequeña. Esto indicaría que las proteínas interaccionan débilmente, muy probablemente debido al cambio estructural que ocasiona la mutación en GN1.



**Figura 3.5. Análisis por cromatografía de afinidad de la interacción entre TRIM7 y GN1 Ala16Pro.** El extracto de *E. coli* expresando GN1 Ala16Pro fue sembrado en una columna con glutatión (GSH) y en otra similar en la que TRIM7 se encontraba inmovilizada. Las muestras eluidas con GSH libre fueron analizadas luego por inmunoblot con anticuerpos anti-TRIM7 y anti-GN1.

Habiendo confirmado que TRIM7 interacciona con el extremo C-terminal de glucogenina-1 y que también lo hace con la mutante Ala16Pro, se procedió a analizar la actividad E3 ligasa de TRIM7 sobre estas proteínas y una segunda mutante de GN1, previamente caracterizada en el laboratorio (100). A tal fin, se prepararon mezclas de reacción en diferentes condiciones para estudiar el efecto del estado oligomérico de GN1 y la presencia del His<sub>6</sub>-tag N-terminal, en la reacción de ubiquitinación. Dichas condiciones incluyeron a GN1 no glucosilada que, adicionalmente, fue sometida a un tratamiento con trombina para comparar el comportamiento en presencia o ausencia del His<sub>6</sub>-tag. En este último caso, se utilizaron distintas concentraciones en las que GN1 se encuentra como especie monomérica o dimérica (52). Por último, se prepararon también mezclas de reacción con las, ya mencionadas, mutantes patológicas GN1 Ala16Pro y Thr83Met.

Durante el transcurso de las reacciones, se observó la aparición de un precipitado en las mezclas luego de transcurrida aproximadamente 1 h, por lo que las muestras incubadas a tiempos mayores no fueron incluidas en el análisis. Por otro lado, las muestras incubadas correspondientes a TRIM7 sola, TRIM7+GN1 y TRIM7+Ub, todas ellas en ausencia de las demás proteínas necesarias para la reacción, revelaron que TRIM7 forma oligómeros de alto peso molecular con los que interaccionan tanto GN1 como Ub (no mostrado). La presencia de urea 4M en el buffer de carga previo al inmunoblot permitió prevenir la formación de dichos oligómeros para no enmascarar la señal correspondiente a las especies de alto peso molecular resultado de poliubiquitinación. Luego de la inclusión de esta modificación en el análisis de los productos de reacción, se confirmó que, tal como fuera descrito (32), TRIM7 es capaz de autoubiquitinarse, como lo refleja la presencia de especies poliubiquitinadas a los 60 min de reacción (Figura 3.6 A).



**Figura 3.6. Análisis por inmunoblot de las reacciones de transferencia de ubiquitina (Ub).** Las mezclas de reacción fueron incubadas a 30 °C y detenidas a los tiempos indicados con el agregado de buffer de carga 3X/urea 4M. **(A)** Análisis de autoubiquitinación de TRIM7, las señales corresponden a lo revelado por un anticuerpo anti-Ub. **(B)** Análisis de mezclas de reacción conteniendo GN1 no glucosilada dimérica o las mutantes Thr83Met y Ala16Pro, donde todas las señales de GN1 silvestre y mutantes enteras (GN1s) o productos de proteólisis de origen desconocido (GN1ΔC63s) corresponden al análisis con un anticuerpo anti-GN1. **(C)** Análisis de mezclas de reacción conteniendo GN1 no glucosilada luego del tratamiento con trombina (sin His<sub>6</sub>-tag) dimérica y monomérica, reveladas con anti-GN1. Como control de peso molecular, se utilizó la proteína truncada de conejo rGN1ΔC63 (sección II.B.2).

Sin embargo, no fue posible detectar la ubiquitinación de GN1 y las mutantes patológicas en las condiciones en que TRIM7 es capaz de autoubiquitinarse, observando en todos los casos solo la señal correspondiente a las proteínas sin modificar (Figura 3.6 B). Cabe destacar que, en estos ensayos se optó por utilizar un anticuerpo anti-GN1, en lugar de anti-Ub, para evitar la interferencia que podría observarse debida a la autoubiquitinación de TRIM7.

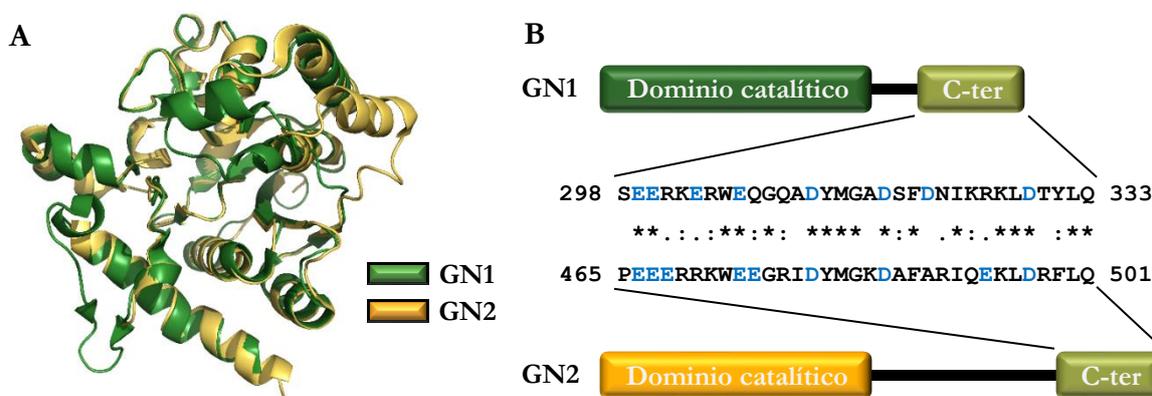
Para determinar si la presencia del His<sub>6</sub>-tag N-terminal podría afectar una posible ubiquitinación de GN1 mediada por TRIM7, la proteína fue tratada con trombina para liberar el tag, e incubada en la condición empleada en los experimentos anteriores. Sin embargo, la incubación con trombina para eliminar el His<sub>6</sub>-tag, parece haber favorecido la degradación de GN1 a la especie GN1ΔC63 previamente al ensayo de ubiquitinación (Figura 3.6 C), lo cual se corroboró utilizando como control de peso molecular a la proteína de conejo troncada rGN1ΔC63 (sección II.B.2). Esta especie no sería reconocida por TRIM7 ya que carece de los últimos 33 aminoácidos necesarios para la interacción entre las proteínas (Figura 3.4); por lo que, será necesaria la búsqueda de condiciones que garanticen la estabilidad de GN1 libre del His<sub>6</sub>-tag para luego determinar si es sustrato de ubiquitinación.

### -III.D. Discusión

Recientemente, se ha descrito la interacción de TRIM7 con múltiples proteínas, lo que se encuentra asociado a su actividad E3 ligasa (34-36, 38, 39, 41-43). En el caso de glucogenina-1, solo ha sido observado el efecto activador de la autoglicosilación con la isoforma GNIP2; sin embargo, la interacción descrita con la forma completa de TRIM7 (29) aún no tiene función conocida. Adicionalmente, debido a que en condiciones patológicas las mutantes de GN1 no tienen capacidad de autoglicosilarse (58-61), es posible que la activación de la autoglicosilación de GN1 sea una función particular de la isoforma GNIP2 y que TRIM7 cumpla un rol fisiológico diferente, más aún, teniendo en cuenta el reciente interés en el hallazgo de su actividad E3 ligasa.

Primeramente, se corroboró que TRIM7 interacciona con GN1 como fue previamente descrito (29), además de confirmar la importancia de la región que comprende los últimos 33 aminoácidos de GN1 para la interacción (Figura 3.4), tal como ocurre con el dominio B30.2 aislado.

Considerando la relevancia de la región C-terminal de GN1 para la interacción con TRIM7, es posible que esta también reconozca a glucogenina-2 (GN2), que presenta una estructura similar a GN1 en el dominio catalítico y en la región C-terminal exhibe una identidad de 51,5%. Además, GN2 presenta la conservación de muchos aminoácidos respecto a GN1 (Figura 3.7), que podrían estar involucrados en una interacción con el bolsillo cargado positivamente en TRIM7<sup>B30.2</sup> (Figura 1.6).



**Figura 3.7. Comparación de las estructuras de glucogenina-1 y glucogenina-2 humanas. (A)** Las proteínas se encuentran representadas superpuestas en forma de cintas; GN1 (código de PDB: 3T7O) en color verde y GN2 (código de PDB: 4UEG) en color amarillo. **(B)** Alineamiento de secuencia en la región correspondiente a los aminoácidos 298-333 de GN1 y 465-501 de GN2. En color azul se encuentran representados los aminoácidos que poseen cadenas laterales con carga negativa. Los símbolos indican el grado de conservación de los residuos: un asterisco (\*) indica conservación total, dos puntos (:) indican conservación entre grupos con propiedades fuertemente similares y un punto (.) indica conservación entre grupos con propiedades débilmente similares.

Por otra parte, la cromatografía de afinidad con TRIM7 y GN1 Ala16Pro mostró que estas proteínas también interactúan, aunque más débilmente que en el caso de GN1 silvestre. Es posible que GN1 Ala16Pro, pese a tener un plegamiento diferente a la proteína silvestre, aún sea reconocida por TRIM7 en su extremo C-terminal, lo que será determinado en pruebas futuras utilizando mutantes de delección. Por otro lado, GN1 Ala16Pro podría exponer regiones diferentes a las expuestas en la proteína silvestre, que también permitan su reconocimiento por TRIM7.

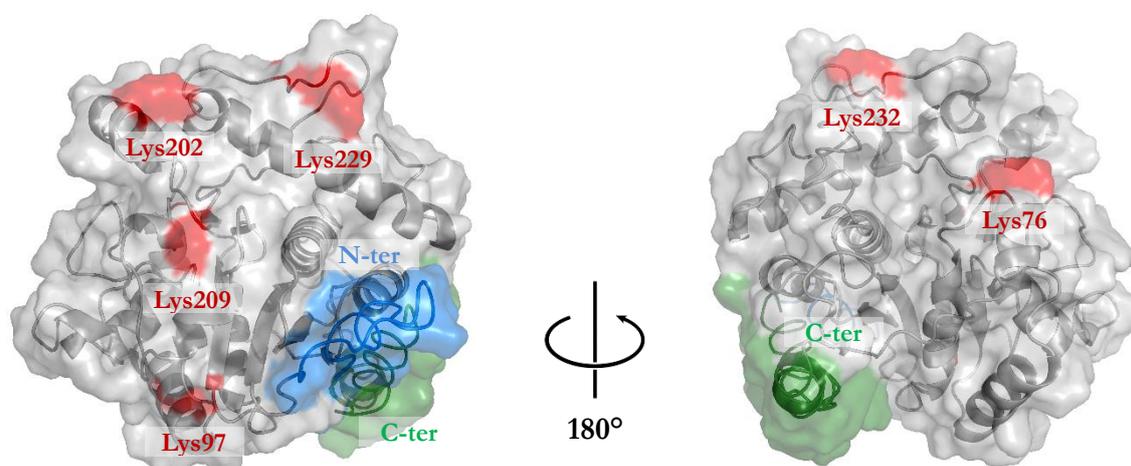
Con el objetivo de estudiar la relevancia funcional de la interacción de GN1 con TRIM7, se prepararon mezclas de reacción *in vitro* para intentar determinar si GN1 es sustrato de ubiquitinación. En intentos iniciales del ensayo de ubiquitinación, cuando tanto TRIM7 como GN1 se encontraban en el medio de reacción luego de transcurrida 1 h, se observó la precipitación de las proteínas, por lo que este fue el límite de tiempo considerado para ensayos posteriores. El análisis de muestras de TRIM7 incubada sola mostró la formación de oligómeros, lo que se relaciona con la presencia en su estructura del dominio de hélice superenrollada, que media la homomultimerización de las proteínas TRIM (12). Adicionalmente, cuando TRIM7 fue incubada junto con GN1 se observó que esta última interactuaba con dichas especies de alto peso molecular, lo que se condice con el comportamiento descrito entre GN1 y la isoforma GNIP2 de TRIM7 (31).

Debido a que, en los pacientes con glucogenosis tipo XV, las mutaciones de GN1 con cambio de sentido mencionadas en la Introducción provocan la pérdida de la capacidad de autoglicosilación de la enzima, GN1 fue incluida en los ensayos en su forma no glucosilada. Sin embargo, pese a haber confirmado la interacción de TRIM7 con GN1 en el ensayo de *pull-down*, no se detectó que GN1 o las mutantes Ala16Pro y Thr83Met fueran sustrato de ubiquitinación en las condiciones empleadas.

Por otro lado, debido a que GN1 obtenida utilizando el plásmido pET-15b tiene 20 residuos adicionales en la región N-terminal que incluyen al His<sub>6</sub>-tag, GN1 fue sometida a un tratamiento con trombina para separar dichos residuos y evaluar si su presencia podía estar interfiriendo en la reacción. Además, se incluyó a GN1 a diferentes concentraciones para analizar si había alguna diferencia en la reacción al encontrarse como monómero o como dímero. Sin embargo, el tratamiento con trombina favoreció la degradación a la especie GN1ΔC63, que al carecer de la región necesaria para el reconocimiento por parte de TRIM7 (Figura 3.4) tampoco sería sustrato de ubiquitinación, lo que dificulta determinar si en este caso ocurriría la ubiquitinación *in vitro*.

Curiosamente, el servidor BDM-PUB (112) predijo como sitios de ubiquitinación a los residuos Lys76, Lys97, Lys202, Lys209, Lys229, Lys232. Estos sitios se encuentran representados en la

estructura de GN1 entera modelada por el servidor I-TASSER (Figura 3.8, ref. 113). En esta figura se puede observar que los residuos Lys97, Lys209 y Lys229 se localizan cercanos al extremo N-terminal donde se encuentran los 20 aminoácidos adicionales introducidos por el plásmido pET-15b, que al ocupar un volumen considerable pueden ocasionar un impedimento estérico.



**Figura 3.8. Análisis de predicción de sitios de ubiquitinación en glucogenina-1 humana. (A)** GN1 entera modelada con el servidor I-TASSER se muestra en forma de cintas y superficie. La región necesaria para la interacción con el dominio B30.2 de TRIM7 (C-ter, aminoácidos 301-333) se observa en color verde y la región N-terminal que contiene al His<sub>6</sub>-tag (N-ter) en color azul. Los residuos lisina que el servidor BDM-PUB predijo como sitios de ubiquitinación se observan en color rojo.

La enzima E2 utilizada en los ensayos de ubiquitinación forma parte de la familia UBE2D, cuyos miembros a diferencia de otras E2, no tienen especificidad por un residuo lisina particular en el sustrato (8), por lo que esencialmente transfieren ubiquitina a cualquier residuo lisina que se encuentre cercano a su sitio activo (114). Por esta razón, la presencia de la región que contiene al His<sub>6</sub>-tag en GN1 podría de hecho prevenir que hubiera transferencia de ubiquitina desde la enzima UBE2D1 al dificultar el acercamiento entre las proteínas mediado por TRIM7. Otra posibilidad es que la transferencia de ubiquitina sobre GN1 requiriera la participación de otra enzima E2.

Considerando además que, las proteínas TRIM son capaces de formar heterooligómeros (14, 19) y de esta manera pueden reconocer diversos sustratos, esto incrementa la complejidad de determinar el rol fisiológico de la interacción de TRIM7 con GN1, y si esta última es sustrato de ubiquitinación, por lo que este estudio se continuará a futuro *in vitro* en células. Dicho rol fisiológico podría estar relacionado a la glucogenosis tipo XV, debido a que GN1 se encuentra inaccesible a TRIM7 al formar parte del glucógeno (50) en condiciones normales. Por esta razón, GN1 solo puede ser detectada luego de una biopsia de tejido muscular esquelético y tratamiento con  $\alpha$  amilasa, que libera a la proteína al producir la hidrólisis del glucógeno (59). En cambio, en los pacientes con

glucogenosis tipo XV, las proteínas al ser inactivas no se encuentran formando parte del glucógeno, y por ello pueden ser detectadas sin tratamiento con  $\alpha$  amilasa, como ocurre en el caso de las mutantes patológicas con cambio de sentido descritas en la Introducción: Thr83Met, Asp102His, e His212Tyr (58-60). Por otro lado, la mutante Ala16Pro no fue detectada en el paciente correspondiente (61), lo que podría deberse a una menor estabilidad respecto a la proteína silvestre. Adicionalmente, es posible que GN1 Ala16Pro sea blanco de degradación debido a su plegamiento anómalo, como ocurre con proteínas con secuencias mutadas que no se pliegan correctamente luego de la traducción y son sustrato de lisosomas y proteasomas (115). De hecho, en el estudio donde fue reportada la mutante Ala16Pro, se encontraron inclusiones en las fibras musculares de los pacientes, con nivel normal o con disminución de glucógeno; y en algunos casos como el correspondiente a la mutación Ala16Pro se detectó la presencia de ubiquitina (61).

Otra posibilidad es que la transferencia de ubiquitina sobre GN1 mediada por TRIM7, si ocurriera, resulte en un efecto diferente a la degradación, lo que también explicaría que las mutantes patológicas GN1 Thr83Met, Asp102His, e His212Tyr sí se encuentren expresadas en los pacientes con glucogenosis tipo XV, a diferencia de GN1 Ala16Pro.

Si bien en el presente estudio no se pudo determinar si GN1 es sustrato de ubiquitinación en las condiciones empleadas *in vitro*, el hecho de que TRIM7 interaccione con su región C-terminal y con la mutante patológica Ala16Pro bajo condiciones similares resulta de interés para realizar estudios en un sistema más complejo. Estos estudios, podrían incluir dilucidar si el grado de glucosilación tiene alguna incidencia sobre la ubiquitinación, además de determinar el tamaño de las especies que se pudieran formar, los residuos lisina de GN1 involucrados y el tipo de enlace entre moléculas de ubiquitina. Adicionalmente, los estudios se podrían extender a otras mutantes patológicas de GN1, y a GN2 por su homología de secuencia.

## **Conclusiones y perspectivas a futuro**

## **-Conclusiones**

### **-Capítulo I**

En este trabajo, se logró caracterizar estructuralmente a TRIM7<sup>B30.2</sup>, que presenta el plegamiento de sándwich- $\beta$  distorsionado típico de otros dominios B30.2. Este estudio permitió además conocer detalles particulares de esta estructura, de los cuales destaca la existencia de una cavidad con carga positiva como potencial sitio de interacción con otras proteínas.

Se encontró que la interacción con el dominio B30.2 de TRIM7 aislado no es suficiente para lograr la activación de la autoglicosilación de GN1, como fuera descrito para la isoforma GNIP2 de TRIM7, pero sí provocaría un cambio conformacional en esta enzima.

Más aún, se encontraron evidencias de que los aminoácidos Leu423, Ser499 y Cys501 de TRIM7<sup>B30.2</sup> son claves para la interacción con GN1, y que demarcan una zona que rodea a la cavidad con carga positiva en la región hipervariable de este dominio.

Por otro lado, los resultados mostraron que el segmento C-terminal de GN1, involucrado en la interacción con glucógeno sintasa, también es clave para la interacción con TRIM7<sup>B30.2</sup>.

Como ya se mencionó, las enzimas E3 ligasas presentan potencial en el desarrollo de moduladores del proceso de ubiquitinación, por ello, la selectividad del dominio B30.2 de TRIM7, cuya estructura fue resuelta durante este trabajo, puede convertir a la proteína en un promisorio blanco terapéutico.

### **-Capítulo II**

A partir de los resultados obtenidos, se logró determinar que la mutación patológica Ala16Pro produce cambios sobre la estructura de GN1 de conejo que provocan la alteración de la capacidad de la enzima para unir al sustrato, y que, en consecuencia, dicha mutación acarrea una drástica disminución de los diferentes tipos de actividad de la proteína.

Adicionalmente, se determinó el efecto perjudicial de esta mutación sobre la estabilidad de GN1 de conejo, lo que, debido a la homología con la proteína humana, podría explicar en parte la ausencia de proteína libre que al ser inactiva, no formaría parte del glucógeno en el paciente con dicha variante genética patológica.

### **-Capítulo III**

Con base en los resultados obtenidos, se confirmó que la región C-terminal de GN1 también es necesaria para la interacción con TRIM7, del mismo modo que lo observado con el dominio B30.2 aislado. Además, aunque la interacción de TRIM7 con la mutante Ala16Pro de GN1 humana sería

débil, puede considerarse que, incluso a pesar del cambio conformacional ocasionado por la mutación, TRIM7 reconoce a la proteína y en consecuencia podría estar implicada en la vía de degradación de Ala16Pro.

Sin embargo, no se logró determinar la posible actividad E3 ligasa de TRIM7 sobre glucogenina-1 y mutantes patológicas en las condiciones utilizadas *in vitro*. Debido a la complejidad de esta reacción, que requiere de sucesivas interacciones entre proteínas, y en el caso de GN1 se requiere la región C-terminal susceptible a la degradación *in vitro*, estos estudios se continuarán en cultivos celulares.

Como conclusión general, en el presente trabajo se lograron determinar las bases moleculares de la interacción entre la enzima TRIM7 y glucogenina-1 mediante un enfoque integral, que abarcó tanto información estructural sobre interacciones específicas entre las proteínas, como detalles bioquímicos sobre las reacciones en las que intervienen. Además, se lograron estudiar los cambios estructurales y funcionales provocados por la mutación Ala16Pro de glucogenina-1, y la posible relevancia de la interacción de GN1 con TRIM7, que podría estar relacionada a las causas de la glucogenosis tipo XV.

## **-Perspectivas a futuro**

La valiosa información estructural obtenida sobre la interacción de TRIM7<sup>B30.2</sup> con GN1, será utilizada como base para llevar a cabo futuras pruebas de cristalización del complejo TRIM7<sup>B30.2</sup> con el fragmento C-terminal de GN1 también implicado en la interacción con glucógeno sintasa. Como alternativa, se presenta conocer la estructura del fragmento C-terminal aislado de GN1 para realizar simulaciones de dinámica molecular sobre la interacción entre las proteínas. El estudio podría ser extendido a otras proteínas con las que interacciona TRIM7, con el fin de comprender cómo contribuye la unión a sus proteínas sustrato en el desarrollo de los procesos en los que están involucradas. Esto puede facilitar eventualmente la búsqueda y diseño racional de inhibidores, debido al potencial terapéutico con mayor selectividad y menores efectos adversos de las enzimas E3 ligasas.

El estudio de la posible actividad E3 ligasa de TRIM7 sobre glucogenina-1 será continuado en cultivos celulares, y en caso de ser confirmada, se intentará profundizar en el tipo de enlace involucrado en las cadenas de ubiquitina transferidas y dilucidar el destino al que podría ser dirigida GN1 en la célula. Además, debido a la relevancia del segmento C-terminal de GN1 en la interacción, surge la hipótesis de que también pueda ocurrir ubiquitinación de otras mutantes patológicas y de glucogenina-2, que serán incluidas en futuros ensayos.

Adicionalmente, es de interés conocer si TRIM7 tiene el efecto activador de la autoglicosilación descrito para su isoforma GNIP2, o si dicho efecto es exclusivo de esta isoforma.

Por último, debido a que las modificaciones postraduccionales pueden regular la ubiquitinación, si fuera detectada, también existe el interrogante acerca de si el grado de glicosilación de glucogenina-1 podría influir sobre su función como sustrato de TRIM7.

# Anexo

## -Materiales

Estándares de proteínas para SDS-PAGE BLUelf prestained protein ladder (Genbiotech)

Resinas de quitina (New England Biolabs)

### Anticuerpos:

*goat* anti-GN1 (Santa Cruz Biotechnology)

*mouse* anti-His<sub>6</sub>-tag (Invitrogen)

*mouse* anti-Ub (Enzo Life Sciences)

*rabbit* anti-TRIM7 (Santa Cruz Biotechnology)

*donkey* anti-*rabbit* IgG IRDye® 680RD (LI-COR Biosciences)

*donkey* anti-*goat* IgG IRDye® 800CW (LI-COR Biosciences)

*goat* anti-*mouse* IgG IRDye® 800 (LI-COR Biosciences)

### Bacterias:

*E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen)

*E. coli* CGSC 4997 (Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, Yale University)

### Columnas:

Histrap HP (GE Life Sciences)

GSTrap (GE Life Sciences)

Superdex 200 10/300 GL (GE Life Sciences)

Mono Q 5/50 GL (GE Life Sciences)

### Enzimas de restricción:

EcoR I (Fermentas)

Nde I (Takara Bio)

Sal I (Fermentas)

Xho I (Promega)

### Kits:

Kits de cristalización Classics I, Classics II, PACT, ProComplex (Qiagen)

Kit para miniprep (Productos Bio-lógicos)

Kit para purificación de ADN en gel (Axygen)

Plásmidos:

pET 15b (Novagen)

pGEX-4T-1 (GE Life Sciences)

pTYB11 (New England Biolabs)

Reactivos:

Los reactivos que no sean especificados fueron obtenidos de Sigma.

Ácido acético (Sintorgan)

ATP (Roche)

Ácido tricloroacético (Cicarelli)

Cocktail de inhibidores de proteasas 100x (Amersham)

Coomassie Brilliant Blue R250 (Anedra)

Etanol (Anedra)

Glicerol (J.T.Baker)

Imidazol (J.T.Baker)

IPTG (Genbiotech)

Metanol (Sintorgan)

Polimerasa Pfu (Promega)

TCEP (Merck)

Tritón X-100 (Anedra)

UDP-[<sup>14</sup>C]glucosa (320 mCi/mmol) (Fundación Campomar)

Urea (J.T.Baker)

Soluciones:

Buffer TBS: buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM

Buffer PBS: buffer fosfato 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM

Buffer de carga 3X: buffer Tris-HCl 150 mM pH 6,8, SDS 4,5 %, glicerol 30 %, β-mercaptoetanol 9 % y azul de bromofenol 0,01 %

Buffer de transferencia: Tris-Glicina (pH 8,3) 0,01 M, Metanol 20 %.

Medio LB (*Lysogeny Broth*): NaCl 0,5%, extracto de levadura 0,5%, tripteína 1%.

Solución de centelleo líquido Optiphase HiSafe 3 (Perkin-Elmer)

Solución de Coomassie Brilliant Blue: etanol 25 %, ácido acético 5 %, Coomassie Brilliant Blue R250 0,25 %.

Solución desteñidora: etanol 25 %, ácido acético 5 %.

## -Referencias

1. Wang, R., Wang, G. (2019) Protein modification and autophagy activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1206**: 237-259
2. Kwon, Y.T., Ciechanover, A. (2017) The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends Biochem. Sci.* **42 (11)**: 873-886.
3. Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D. (2006) The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* **31(1)**: 137-155.
4. Leestemaker, Y., Ovaa, H. (2017) Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discov. Today Technol.* **26**: 25-31.
5. Uchida, C., Kitagawa, M. (2016) RING-, HECT-, and RBR-type E3 ubiquitin ligases: involvement in human cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* **16(2)**: 157-174.
6. Li, X., Elmira, E., Rohondia, S., Wang, J., Liu, J., Ping Dou, Q. (2018) A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015-2018. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **28(12)**: 919-937.
7. Schulman, B.A., Wade Harper, J. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10(5)**: 319-331.
8. Ye, Y., Rape, M. (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10(11)**: 755-764.
9. Swatek, K.N., Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26(4)**: 399-422.
10. Huang, X., Dixit, V.M. (2016) Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development. *Cell Res.* **26(4)**: 484-98.
11. Zheng, N., Shabek, N. (2017) Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **86**: 129-57.

12. Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L. *et al.* (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20(9)**: 2140-2151.
13. Esposito, D., Koliopoulos, M.G., Rittinger, K. (2017) Structural determinants of TRIM protein function. *Biochem. Soc. Trans.* **45(1)**: 183-191.
14. Hatakeyama, S. (2017) TRIM family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **42(4)**: 297-311.
15. Sardiello, M., Cairo, S., Fontanella, B., Ballabio, A., Meroni, G. (2008) Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. *BMC Evol. Biol.* **8**: 225.
16. Deshaies, R., Joazeiro, C. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 399-434.
17. Behera, A.P., Naskar, P., Agarwal, S., Banka, P.A., Poddar, A., Datta, A.B. (2018) Structural insights into the nanomolar affinity of RING E3 ligase ZNRF1 for Ube2N and its functional implications. *Biochem. Journal.* **475(9)**: 1569-1582.
18. Napolitano, L.M., Meroni, G. (2012) TRIM family: pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life.* **64(1)**: 64-71.
19. Gushchina, L.V., Kwiatkowski, T.A., Bhattacharya, S., Weisleder, N.L. (2018) Conserved structural and functional aspects of the tripartite motif gene family point towards therapeutic applications in multiple diseases. *Pharmacol. Ther.* **185**:12-25.
20. Meroni, G., Diez-Roux, G. (2005) TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays.* **27(11)**: 1147-1157.
21. Perfetto, L., Gherardini, P.F., Davey, N.E., Diella, F., Helmer-Citterich, M., Cesareni, G. (2013) Exploring the diversity of SPRY/B30.2-mediated interactions. *Trends Biochem. Sci.* **38(1)**: 38-46.

22. Rhodes, D.A., de Bono, B., Trowsdale, J. (2005) Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence?. *Immunology*. **116**; 411-417.
23. van Gent, M., Sparrer, K.M.J., Gack, M.U. (2018) TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu Rev Virol*. **5(1)**: 385-405.
24. Grutter, C., Briand, C., Capitani, G., Mittl, P.R., Papin, S., Tschopp, J. *et al.* (2006) Structure of the PRYSPRY-domain: implications for autoinflammatory diseases. *FEBS Lett*. **580(1)**: 99-106.
25. Masters, S.L., Yao, S., Willson, T.A., Zhang, J.G., Palmer, K.R., Smith, B.J. *et al.* (2006) The SPRY domain of SSB-2 adopts a novel fold that presents conserved Par-4-binding residues. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **13(1)**: 77-84.
26. Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., Oh, B.H. (2006) Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J*. **25(6)**: 1353-1363.
27. Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., Morse, H.C. (2008) TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. **8(11)**: 849-860.
28. Watanabe, M., Hatakeyama, S. (2017) TRIM proteins and diseases. *J. Biochem*. **161(2)**: 135-144.
29. Skurat, A.V., Dietrich, A.D., Zhai, L., Roach, P.J. (2002) GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem*. **277 (22)**: 19331-8.
30. The UniProt Consortium. (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. **49 (D1)**: D480-D489.
31. Zhai, L., Dietrich, A., Skurat, A.V., Roach, P.J. (2004) Structure-function analysis of GNIP, the glycogenin-interacting protein. *Arch. Biochem. Biophys*. **421(2)**: 236-42.
32. Montori-Grau, M., Pedreira-Casahuga, R., Boyer-Díaz, Z., Lassot, I., García-Martínez, C., Orozco, A. *et al.* (2018) GNIP1 E3 ubiquitin ligase is a novel player in regulating glycogen metabolism in skeletal muscle. *Metabolism*. **83**: 177-187.

33. Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. *et al.* (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis. *Trends Cell Biol.* **10(10)**: 429-39.
34. Chakraborty, A., Diefenbacher, M.E., Mylona, A., Kassel, O., Behrens, A. (2015) The E3 ubiquitin ligase Trim7 mediates c-Jun/AP-1 activation by Ras signalling. *Nat. Commun.* **6**: 6782.
35. Jin, J, Lu, Z., Wang, X., Liu, Y., Han, T., Wang, Y. *et al.* (2020) E3 ubiquitin ligase TRIM7 negatively regulates NF-kappa B signaling pathway by degrading p65 in lung cancer. *Cell. Signal.* **69**: 109543.
36. Zhou, C., Zhang, Z., Zhu, X., Qian, G., Zhou, Y., Sun, Y. *et al.* (2020) N6-Methyladenosine modification of the TRIM7 positively regulates tumorigenesis and chemoresistance in osteosarcoma through ubiquitination of BRMS1. *EBioMedicine.* **59**: 102955.
37. Xia, Y., Zhao, J., Yang, C. (2020) Identification of key genes and pathways for melanoma in the TRIM family. *Cancer med.* **9(23)**: 8989-9005.
38. Hu, X., Tang, Z., Ma, S., Yu, Y., Chen, X., Zang, G. (2019) Tripartite motif-containing protein 7 regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation via the DUSP6/p38 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **511(4)**: 889-895.
39. Zhu, L., Qin, C., Li, T., Ma, X., Qiu, Y., Lin, Y. *et al.* (2019) The E3 ubiquitin ligase TRIM7 suppressed hepatocellular carcinoma progression by directly targeting Src protein. *Cell Death Differ.* **27**: 1819-1831.
40. Orchard, R.C., Sullender, M.E., Dunlap, B.F., Balce, D.R., Doench, J.G., Virgin, H.W. (2019) Identification of Antinorovirus Genes in Human Cells Using Genome-Wide CRISPR Activation Screening. *J. Virol.* **93**: 01324-18.
41. Giraldo, M.I., Xia, H., Aguilera-Aguirre, L., Hage, A., van Tol, S., Shan, C. *et al.* (2020) Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature.* **585**: 414-419.

42. Yang, B., Liu, Y., Cui, Y., Song, D., Zhang, G., Ma, S. *et al.* (2020) RNF90 negatively regulates cellular antiviral responses by targeting MITA for degradation. *PLoS Pathog.* **16(3)**: e1008387.
43. Fan, W., Mar, K.B., Sari, L., Gaszek, I.K., Cheng, Q., Evers, B.M. *et al.* (2021) TRIM7 inhibits enterovirus replication and promotes emergence of a viral variant with increased pathogenicity. *Cell.*
44. Lu, M., Zhu, X., Yang, Z., Zhang, W., Sun, Z., Ji, Q. *et al.* (2019) E3 ubiquitin ligase tripartite motif 7 positively regulates the TLR4-mediated immune response via its E3 ligase domain in macrophages. *Mol. Immunol.* **109**: 126-133.
45. Ji, R., Gu, Y., Zhang, J., Gao, C., Gao, W., Zang, X. *et al.* (2019) TRIM7 promotes proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis through activating c-Jun/AP-1. *IUBMB Life.* **72(2)**: 247-258.
46. Rodriguez, I.R., Whelan, W.J. (1985) A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 829-836.
47. Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., Tagliabracci, V.S. (2012) Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.* **441(3)**: 763-87.
48. Hurley, T.D., Stout, S., Miner, E., Zhou, J., Roach, P.J. (2005) Requirements for catalysis in mammalian glycogenin. *J. Biol. Chem.* **280(25)**: 23892-9.
49. Pitcher, J., Smythe, C., Cohen, P. (1988) Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **176(2)**: 391-5.
50. Aon, M.A., Curtino, J.A. (1984) Evidence for the glycoprotein nature of retina glycogen. *Eur. J. Biochem.* **140**, 557-566.
51. Lin, A., Mu, J., Yang, J., Roach, P.J. (1999) Self-glycosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an intersubunit reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **363(1)**: 163-170.

52. Bazán, S., Issoglio, F.M., Carrizo, M.E., Curtino, J.A. (2008) The intramolecular autoglucosylation of monomeric glycogenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371(2)**: 328-332.
53. Issoglio, F.M., Carrizo, M.E., Romero, J.M., Curtino, J.A. (2012) Mechanisms of monomeric and dimeric glycogenin autoglucosylation. *J. Biol. Chem.* **287(3)**: 1955-61.
54. Gibbons, B.J., Roach, P.J., Hurley, T.D. (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* **319(2)**: 463-477.
55. Skurat, A.V., Dietrich, A.D., Roach, P.J. (2006) Interaction between glycogenin and glycogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **456(1)**: 93-97.
56. Krag, T.O., Ruiz-Ruiz, C., Vissing, J. (2017) Glycogen synthesis in glycogenin 1-deficient patients: a role for glycogenin 2 in muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102(8)**: 2690-2700.
57. Ellingwood, S.S., Cheng, A. (2018) Biochemical and clinical aspects of glycogen storage diseases. *J. Endocrinol.* **238(3)**: R131-R141.
58. Moslemi, A.R., Lindberg, C., Nilsson, J., Tajsharghi, H., Andersson, B., Oldfors, A. (2010) Glycogenin-1 deficiency and inactivated priming of glycogen synthesis. *N. Engl. J. Med.* **362(13)**: 1203-10.
59. Hedberg-Oldfors, C., Glamuzina, E., Ruygrok, P., Anderson, L.J., Elliott, P., Watkinson, O. *et al.* (2017) Cardiomyopathy as presenting sign of glycogenin-1 deficiency-report of three cases and review of the literature. *J. Inherit. Metab. Dis.* **40(1)**: 139-149.
60. Luo, S., Zhu, W., Yue, D., Lin, J., Wang, Y., Zhu, Z. *et al.* (2015) Muscle pathology and whole-body MRI in a polyglucosan myopathy associated with a novel glycogenin-1 mutation. *Neuromuscul. Disord.* **25(10)**: 780-5.
61. Malfatti, E., Nilsson, J., Hedberg-Oldfors, C., Hernandez-Lain, A., Michel, F., Dominguez-Gonzalez, C. *et al.* (2014) A new muscle glycogen storage disease associated with glycogenin-1 deficiency. *Ann. Neurol.* **76(6)**: 891-898.

62. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. *et al.* (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. 571-607.
63. Battye, T.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., Leslie, A.G. (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D*. **67**: 271-281.
64. Evans, P.R., Murshudov, G.N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D*. **69**: 1204-1214.
65. Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R. *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D*. **67**: 235-242.
66. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40 (4)**: 658-674.
67. Sandstrom, A., Peigné, C.M., Léger, A., Crooks, J.E., Konczak, F., Gesnel, M.C. *et al.* (2014) The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Immunity*. **40(4)**: 490-500.
68. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D*. **66 (4)**: 486-501.
69. Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A. *et al.* (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D*. **67**: 355-367.
70. Holm, L., Laakso, L.M. (2016). Dali server update. *Nucleic Acids Res.* **44 (W1)**: W351-W355.
71. Krissinel, E., Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372 (3)**: 774-797.

72. Wallace, A.C., Laskowski, R.A., Thornton, J.M. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8(2)**: 127-134.
73. Sievers, F., Wilm, A., Dineen D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W. *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**: 539.
74. Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T. *et al.* (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **44**: W344-W350.
75. Kabsch, W., Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers.* **22(12)**: 2577-2637.
76. Lerner, M.G., Carlson, H.A. (2006) APBS plugin for PyMOL. Ann Arbor: University of Michigan.
77. Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
78. Carrizo, M.E., Miozzo, M.C., Goldraij, A., Curtino, J.A. (1997) Purification of rabbit skeletal muscle proteoglycogen: studies on the glucosyltransferase activity of polysaccharide-free and -bound glycogenin. *Glycobiology.* **7(4)**: 571-578.
79. El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C. *et al.* (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47(D1)**: D427-D432.
80. Keeble, A.H., Khan, Z., Forster, A., James, L.C.. (2008) TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **105(16)**: 6045-6050.
81. Koliopoulos, M.G., Lethier, M., Veen, A.G., Haubrich, K., Hennig, J., Kowalinski, E. *et al.* (2018) Molecular mechanism of influenza A NS1-mediated TRIM25 recognition and inhibition. *Nat. Commun.* **9(1)**: 1820.

82. Weinert, C., Grütter, C., Roschitzki-Voser, H., Mittl, P.R., Grütter, M.G. (2009) The crystal structure of human pyrin B30.2 domain: implications for mutations associated with familial Mediterranean fever. *J. Mol. Biol.* **394(2)**: 226-236.
83. Yu, Y., Liang, L., Jin, Y., Yin, Y. (2019) The TRIM14 PRYSPRY domain mediates protein interaction via its basic interface. *FEBS Lett.* **593(10)**: 1122-1129.
84. Park, E.Y., Kwon, O.B., Jeong, B.C., Yi, J.S., Lee, C.S., Ko, Y.G. *et al.* (2010) Crystal structure of PRY-SPRY domain of human TRIM72. *Proteins.* **78(3)**: 790-795.
85. Kato, K., Ahmad, S., Zhu, Z., Young, J.M., Mu, X., Park, S. *et al.* (2021) Structural analysis of RIG-I-like receptors reveals ancient rules of engagement between diverse RNA helicases and TRIM ubiquitin ligases. *Mol. Cell.* **81(3)**: 599-613.
86. Gu, S., Sachleben, J.R., Boughter, C.T., Nawrocka, W.I., Borowska, M.T., Tarrasch, J.T. *et al.* (2017) Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (BTN3A1) and its implication on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **114(35)**: E7311-E7320.
87. Greenfield, N.J. (2004) Circular dichroism (CD) analyses of protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* **261**: 55-78.
88. James, L.C., Keeble, A.H., Khan, Z., Rhodes, D.A., Trowsdale, J. (2007) Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **104 (15)**: 6200-6205.
89. D'Cruz, A.A., Kershaw, N.J., Chiang, J.J., Wang, M.K., Nicola, N.A., Babon, J.J. *et al.* (2013) Crystal structure of the TRIM25 B30.2 (PRYSPRY) domain: a key component of antiviral signalling. *Biochem. J.* **456(2)**: 231-240.
90. Salim, M., Knowles, T.J., Baker, A.T., Davey, M.S., Jeeves, M., Sridhar, P. *et al.* (2017) BTN3A1 discriminates  $\gamma\delta$  T cell phosphoantigens from nonantigenic small molecules via a conformational sensor in its B30.2 domain. *ACS Chem. Biol.* **12(10)**: 2631-2643.

91. Tate, J.G., Bamford, S., Jubb, H.C., Sondka, Z., Beare, D.M., Bindal, N. *et al.* (2018) COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* **47**: D941-D947.
92. Woo, J.S., Suh, H.Y., Park, S.Y., Oh, B.H. (2006) Structural basis for protein recognition by B30.2/SPRY domains. *Mol. Cell.* **24(6)**: 967-976.
93. Filippakopoulos, P., Low, A., Sharpe, T.D., Uppenberg, J., Yao, S., Kuang, Z. *et al.* (2010) Structural basis for Par-4 recognition by the SPRY domain-and SOCS box-containing proteins SPSB1, SPSB2, and SPSB4. *J. Mol. Biol.* **401(3)**: 389-402.
94. Zhang, P., Chaturvedi, C.P., Tremblay, V., Cramet, M., Brunzelle, J.S., Skiniotis, G. *et al.* (2015). A phosphorylation switch on RbBP5 regulates histone H3 Lys4 methylation. *Genes Dev.* **29**: 123-128.
95. Šali, A., Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234(3)**: 779-815.
96. Zeqiraj, E., Tang, X., Hunter, R.W., García-Rocha, M., Judd, A., Deak, M. *et al.* (2014) Structural basis for the recruitment of glycogen synthase by glycogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111(28)**: E2831-E2840.
97. Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N. *et al.* (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**, W636–W641.
98. Zeqiraj, E., Sicheri, F. (2015) Getting a handle on glycogen synthase - Its interaction with glycogenin. *Mol. Aspects Med.* **46**: 63-69.
99. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
100. Carrizo, M.E., Romero, J.M., Issoglio, F.M., Curtino, J.A. (2012) Structural and biochemical insight into glycogenin inactivation by the glycogenosis-causing T82M mutation. *FEBS Lett.* **586(3)**: 254-7.

101. Sultan, N., Kavitha, M., Swamy, M. (2009) Purification and physicochemical characterization of two galactose-specific isolectins from the seeds of *Trichosanthes cordata*. *Life*. **61(4)**: 457-469.
102. Phillips, S.R, Wilson, L.J., Borkman, R.F. (1986). Acrylamide and iodide fluorescence quenching as a structural probe of tryptophan microenvironment in bovine lens crystallins. *Curr. Eye Res.* 5(8): 611-619.
103. Correia, A.R., Adinolfi, S., Pastore, A., Gomes, C.M. (2006) Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *Biochem. J.* **398(3)**: 605-611.
104. Córscico, B., Falomir Lockhart, L.J., Franchini, G., Scaglia, N. (2013) Análisis estructural y funcional de macromoléculas. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
105. Roach, P.J., Skurat, A.V. (1997) Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **57**: 289-316.
106. Berndsen, C.E., Wolberger, C. (2011) A spectrophotometric assay for conjugation of ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Anal. Biochem.* **418(1)**: 102-10.
107. Jin, J., Li, X., Gygi, S.P., Harper, J.W. (2007) Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature*. **447(7148)**: 1135-8.
108. Brzovic, P.S., Lissounov, A., Christensen, D.E., Hoyt, D.W., Klevit, R.E. (2006) A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Mol. Cell.* **21(6)**: 873-80.
109. Banka, P.A., Behera, A.P., Sarkar, S., Datta, A.B. (2015) RING E3-Catalyzed E2 Self-Ubiquitination Attenuates the Activity of Ube2E Ubiquitin-Conjugating Enzymes. *J. Mol. Biol.* **427(13)**: 2290-2304.
110. Lazar, G.A., Desjarlais, J.R., Handel, T.M. (1997) De novo design of the hydrophobic core of ubiquitin. *Protein Sci.* **6**: 1167-1178.

111. Maitland, M.E.R., Onea, G., Chiasson, CA., Wang, X., Ma, J., Moor, S.E. *et al.* (2019) The mammalian CtLH complex is an E3 ubiquitin ligase that targets its subunit muskelin for degradation. *Sci. Rep.* **9(1)**: 9864.
112. Li, X., Gao, X., Ren, J., Jin, C., Xue, Y. (2009) BDM-PUB: Computational prediction of protein ubiquitination sites with a Bayesian discriminant method.
113. Yang, J., Zhang, Y. (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **43**: W174-W181.
114. Stewart, M.D., Ritterhoff, T., Klevit, R.E., Brzovic, P.S. (2016) E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Res.* **26(4)**: 423-40.
115. Jackson, M.P., Hewitt, E.W. (2016) Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem.* **60(2)**: 173-180.



UNC

Universidad  
Nacional  
de Córdoba