



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENTRE LAS  
PROTEÍNAS EFL1 Y SDO1 MEDIANTE DOBLE  
HÍBRIDO EN LEVADURA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ALFONSO MÉNDEZ GODOY**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: Luz del Carmen Castellanos Román

**VOCAL:** Profesor: José Adelfo Escalante Lozada

**SECRETARIO:** Profesor: Nuria Victoria Sánchez Puig

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Nancy Monroy Jaramillo

**2° SUPLENTE:** Profesor: Aurora Lara Núñez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Laboratorio 7 del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM.**

**Asesor del tema:**

Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

Alfonso Méndez Godoy

\_\_\_\_\_

## Resumen

El reconocimiento molecular es un proceso vital en los sistemas biológicos que comprende la interacción específica entre dos o más biomoléculas a través de enlaces no-covalentes. Múltiples procesos celulares están mediados por la interacción entre proteínas y diversas biomoléculas. Un claro ejemplo, es la síntesis de ribosomas: las máquinas especializadas en la síntesis de proteínas. En *Saccharomyces cerevisiae* cada ribosoma está compuesto por dos subunidades: la subunidad menor 40S y la subunidad mayor 60S. El proceso de biogénesis ribosomal comprende la síntesis y modificación de los 4 rRNAs y de las 79 proteínas estructurales que constituyen al ribosoma maduro. Este proceso es asistido por más de 200 proteínas accesorias que coordinan su direccionalidad y ensamblaje sin formar parte de la partícula madura. Las proteínas Sdo1 y Efl1 son dos factores accesorios que participan en los pasos finales de la maduración de la subunidad 60S. Juntas, promueven la liberación de Tif6 de la superficie de la subunidad ribosomal mayor y su reciclaje al núcleo. La presencia de Tif6 sobre la subunidad mayor previene su asociación con la subunidad menor y por lo tanto la formación del ribosoma funcional.

En este trabajo estudiamos la interacción entre las proteínas Sdo1 y Efl1 mediante ensayos de doble híbrido en levadura. Diseñamos y construimos plásmidos con los diferentes dominios que comprenden Sdo1 y Efl1, así como diferentes combinaciones de los mismos, basándonos en las estructuras cristalográficas del homólogo de arquea de Sdo1 y de EF-2, homólogo de Efl1. Las interacciones entre proteínas fueron ensayadas mediante la técnica de doble híbrido cuantificando la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados mostraron que los dominios 2 y 3 de Sdo1 son los responsables de la interacción con los dominios 1 y 2 de Efl1. Interesantemente, estos descubrimientos concuerdan con la capacidad que tiene Sdo1 para modular la afinidad de Efl1 por los nucleótidos de guanina debido a que el dominio 1 de la GTPasa contiene el sitio de unión a nucleótidos.

# Índice de contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Antecedentes</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Reconocimiento molecular: clave de los procesos biológicos</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Clasificación de las interacciones proteína-proteína</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Complejos homo y heterooligoméricos.....	7
1.2.2 Complejos obligados y no obligados.....	8
1.2.3 Complejos permanentes y transitorios .....	9
<b>1.3 Caracterización de las interacciones proteína-proteína</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 Métodos masivos o de alto alcance: estudio global del interactoma.....	10
1.3.1.1 Microarreglos de proteínas.....	11
1.3.1.2 Purificación por afinidad en tándem acoplada a espectrometría de masas .....	11
1.3.1.3 Ensayos de letalidad sintética.....	11
1.3.1.4 Sistema de doble híbrido en levadura.....	12
1.3.2 Métodos de bajo alcance: estudio específico de las interacciones.....	14
<b>1.4 Los ribosomas: máquinas especializadas en la síntesis de proteínas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 Biogénesis ribosomal en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>16</b>
1.5.1 Transcripción del RNA necesario para la biogénesis ribosomal.....	16
1.5.2 El complejo 90S es el precursor de las subunidades 60S y 40S.....	17
1.5.3 Maduración de la subunidad 60S.....	18
<b>1.6 La GTPasa Efl1</b> .....	<b>19</b>
<b>1.7 La proteína Sdo1</b> .....	<b>20</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Objetivo general</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos particulares</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>4 Materiales y métodos</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 Modelado de las estructuras de Efl1 y Sdo1</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2 Análisis de las regiones desestructuradas en Efl1 y EF-2</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Vectores de expresión</b> .....	<b>25</b>
4.3.1 Vector pACT2.....	25
4.3.2 Vector pEG202 .....	26
<b>4.4 Construcciones para la expresión de Sdo1 y sus dominios 2-3</b> .....	<b>27</b>

<b>4.5 Estrategia de clonación de las secuencias codificantes de la proteína Efl1 y de sus diferentes dominios estructurales.....</b>	<b>27</b>
4.5.1 Identificación de los dominios de Efl1 por alineamiento con EF-2.....	27
4.5.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificar la secuencia codificante de Efl1 y de sus distintos dominios estructurales .....	28
4.5.3 Amplificación de la secuencia codificante de Efl1 y de sus distintos dominios estructurales .....	28
4.5.4 Digestión y purificación de los amplicones .....	29
4.5.5 Ligación de DNA .....	30
4.5.6 Transformación de DNA plasmídico en bacteria.....	30
4.5.7 Aislamiento de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina.....	30
4.5.8 Identificación de las construcciones por restricción.....	31
<b>4.6 Preparación de células competentes de levadura .....</b>	<b>31</b>
<b>4.7 Co-transformación del DNA plasmídico en levadura .....</b>	<b>32</b>
<b>4.8 Ensayos de interacción proteína-proteína (Doble híbrido) .....</b>	<b>32</b>
<b>5 Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Identificación de los dominios estructurales de Efl1 y clonación de sus secuencias codificantes en el vector pACT2.....</b>	<b>34</b>
5.1.1 Localización de los dominios estructurales de Efl1 .....	34
5.1.2 Modelos estructurales de Efl1 y Sdo1 .....	36
5.1.3 Regiones desestructuradas en la GTPasa Efl1.....	36
5.1.4 Amplificación, restricción y clonación de la secuencia codificante de Efl1 y sus dominios estructurales .....	38
<b>5.2 Ensayos de doble híbrido para evaluar la interacción entre Efl1 y Sdo1..</b>	<b>39</b>
<b>6 Análisis de resultados .....</b>	<b>43</b>
<b>6.1 Estudio topológico de Efl1 .....</b>	<b>44</b>
<b>6.2 Regiones implicadas en la interacción entre Efl1 y Sdo1 .....</b>	<b>44</b>
6.2.1 Identificación de los sitios de interacción en Efl1.....	44
6.2.2 Identificación de los sitios de interacción en Sdo1 .....	46
<b>6.3 Implicaciones clínicas del estudio de los ribosomas y las proteínas involucradas en su ensamble.....</b>	<b>48</b>
<b>7 Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>8 Bibliografía .....</b>	<b>50</b>
<b>9 Apéndices .....</b>	<b>57</b>

# 1 Antecedentes

## 1.1 Reconocimiento molecular: clave de los procesos biológicos

La célula es un medio altamente concurrido por número elevado de biomoléculas que constantemente interactúan entre sí. Su asociación da origen a complejos biomoleculares que forman parte de importantes vías encargadas de mantener diversas funciones biológicas. Particularmente, las interacciones entre proteínas, son esenciales en procesos como la transducción de señales, la regulación de la expresión génica, el transporte vesicular y la migración celular, permitiendo a la célula percibir, procesar y responder a la información del exterior. Además, las interacciones proteína-proteína, también están involucradas en la formación correcta de complejos macromoleculares implicados en la replicación, transcripción, traducción y mantenimiento de la información genética [1].

Las interacciones proteína-proteína están definidas como aquellas que ocurren entre dos o más proteínas de manera específica en el contexto de una célula o sistema vivo; por lo tanto, esta definición excluye asociaciones genéricas y funcionales. Las asociaciones genéricas son presentadas por una proteína durante su síntesis, plegamiento y eliminación o reciclaje; mientras que las asociaciones funcionales ocurren cuando dos proteínas que forman parte de un mismo complejo no hacen contacto directo entre ellas (De Las Rivas, 2010). Al conjunto de interacciones proteína-proteína que ocurren en la célula y que controlan los diversos eventos biológicos se le conoce como interactoma [2].

Los resultados de diversos estudios genéticos han sido útiles para el mapeo de un gran número de genes en humanos y otros organismos [3,4], en la identificación de variantes genéticas en poblaciones y en el reconocimiento de miles de sitios genómicos asociados con el riesgo a desarrollar enfermedades [5]. Con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de DNA masivas, ha sido posible reconocer variantes genéticas que alteran específicamente la función proteica y su asociación con un estado patológico [6]. Sin embargo, entender de qué manera diferentes mecanismos biológicos

son afectados por cada una de estas variantes es un hecho que en la actualidad permanece sin respuesta [7,8]. El estudio de las interacciones proteína-proteína se ha vuelto relevante debido a que su caracterización permitiría conocer estos procesos a nivel molecular y biofísico. La obtención de un mapa completo de las interacciones físicas que ocurren entre las proteínas humanas (interactoma humano), es una ambición de la investigación actual. De manera similar al proyecto de secuenciación del genoma humano, el interactoma puede ser utilizado como un medio para entender la manera en que se organizan las proteínas y realizan sus funciones dentro de la célula [9]. Además de que permitiría reconocer el papel que representa cada proteína en un determinado proceso biológico, ayudaría a identificar posibles blancos terapéuticos y a reunir información útil para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas [10].

En resumen, el estudio de las interacciones proteína-proteína aportaría información relevante para comprender la complejidad y diversidad de los sistemas vivos.

## **1.2 Clasificación de las interacciones proteína-proteína**

Las interacciones proteína-proteína pueden clasificarse en base a su composición, afinidad y tiempo de vida (Figura 1) [11–13].

### **1.2.1 Complejos homo y heterooligoméricos**

Con respecto a su composición, los complejos proteicos pueden ser clasificados como homo o heterooligómeros. Se ha definido a un homooligómero como un complejo que depende de la asociación entre dos o más cadenas idénticas, mientras que las interacciones que ocurren entre cadenas de diferente naturaleza dan lugar a un heterooligómero [11,13]. Los canales iónicos de potasio y el receptor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A ( $\text{GABA}_A$ ) son ejemplos de homooligómeros y heterooligómeros, respectivamente. Mientras que la formación de canales de potasio es producto de la interacción entre cuatro subunidades idénticas, el ensamblaje del receptor  $\text{GABA}_A$  requiere de la interacción entre cinco subunidades diferentes [14].





**Figura 1.** Clasificación de las interacciones proteína-proteína. Las interacciones entre proteínas pueden clasificarse de acuerdo a su composición, estabilidad y tiempo de vida en complejos homo o heterooligoméricos, obligadas o no obligadas, y transitorias o permanentes, respectivamente. Además, las interacciones transitorias, con respecto a su equilibrio oligomérico pueden ser catalogadas como fuertes y débiles.

### 1.2.2 Complejos obligados y no obligados

El punto clave para diferenciar entre los complejos obligados y no obligados es la estabilidad de las proteínas implicadas cuando no forman parte del complejo. Si los constituyentes son inestables fuera del complejo proteico, la interacción es clasificada como obligada. Cuando los componentes de una interacción pueden existir de manera independientemente a su unión al complejo, se habla de una interacción no obligada [11,13]. La mayoría de las proteínas que conforman el ribosoma experimentan interacciones de tipo obligado; debido a que, en general, el plegamiento adecuado de estas

proteínas depende de su interacción con todas aquellas proteínas y/o el RNA que la rodean y difícilmente son estables cuando no están formando parte de las partículas ribosomales. Por otro lado, los complejos de señalización intracelular, antígeno-anticuerpo, receptor-ligando y enzima-inhibidor son ejemplos de interacciones proteína-proteína no obligadas. Estos complejos están inicialmente localizados en distintos compartimentos de la célula y por lo tanto necesitan ser estables de manera independiente.

### **1.2.3 Complejos permanentes y transitorios**

Con respecto al tiempo de vida de un complejo, las interacciones pueden ser clasificadas como permanentes o transitorias. Las interacciones permanentes se caracterizan por ser muy estables e irreversibles, mientras que los componentes de las interacciones transitorias se asocian y disocian temporalmente *in vivo* [11,15–17]. Los complejos transitorios, dependiendo de su papel funcional en la célula, presentan un amplio rango de afinidades y tiempos de vida por lo que también pueden ser clasificados como fuertes o débiles con base en su estabilidad y equilibrio oligomérico. Mientras que las interacciones transitorias débiles se caracterizan por presentar un equilibrio oligomérico dinámico en solución, donde la interacción se rompe y se vuelve a establecer continuamente, las asociaciones transitorias fuertes requieren de una activación molecular para cambiar su equilibrio oligomérico [11,18].

Es importante notar que el comportamiento de las interacciones proteicas depende de las condiciones fisiológicas y ambientales a las que son sometidas. Una interacción puede ser predominantemente transitoria *in vivo* pero volverse permanente bajo condiciones celulares específicas. Por lo cual, el conocimiento a cerca del comportamiento de la interacción resulta importante durante la elección del(os) método(s) más conveniente(s) para su estudio.

## **1.3 Caracterización de las interacciones proteína-proteína**

Para comprender los mecanismos que rigen el reconocimiento entre proteínas a nivel molecular y generar un mapa completo de las interacciones que acontecen en la célula se han desarrollado diferentes técnicas experimentales (Tabla 1) [19]. De acuerdo a la cantidad y el detalle de los

datos producidos, éstos pueden ser categorizados en dos grupos: masivos o de alto alcance, y de bajo alcance. [9,12].

**Tabla 1.** Características de algunos métodos experimentales utilizados para la caracterización de las interacciones proteína-proteína. Modificado de Shoemaker & Panchenko *et al.* 2007.

<b>Método</b>	<b>Tipo de ensayo</b>	<b>Tipo de interacciones</b>	<b>Tipo de caracterización</b>
Sistema de doble híbrido	<i>In vivo</i>	Física (binaria)	Identificación
Purificación por afinidad en tándem acoplada a espectrometría de masas	<i>In vitro</i>	Física (Complejos)	Identificación
Microarreglos de proteínas	<i>In vitro</i>	Asociación funcional	Identificación
Ensayo de letalidad sintética	<i>In vivo</i>	Genética (Complejos)	Identificación
Cristalografía de rayos X	<i>In vitro</i>	Física (Complejos)	Caracterización (biológica/estructural)
Espectroscopia de RMN	<i>In vitro</i>	Física (Complejos)	Caracterización (biológica/estructural)
Transferencia de Energía por Resonancia (FRET)	<i>In vitro</i>	Física (binaria)	Caracterización biológica
Microscopia de fuerza atómica	<i>In vitro</i>	Física (binaria)	Caracterización dinámica
Microscopia electrónica	<i>In vitro</i>	Física (complejos)	Caracterización (biológica/estructural)

### 1.3.1 Métodos masivos o de alto alcance: estudio global del interactoma

Los métodos masivos o de alto alcance producen información estadística poco exacta acerca de las interacciones, pero pueden estudiar un gran número de interacciones al mismo tiempo [10]. En este grupo se incluyen los ensayos de doble híbrido en levadura y de letalidad sintética, la purificación por afinidad en tándem (TAP-Tag) acoplada a espectrometría de masas (PAT-EM) y los microarreglos de proteínas, entre otros. A continuación se describen algunas características de estos métodos.

### **1.3.1.1 Microarreglos de proteínas**

Esta tecnología está basada en los microarreglos genómicos [20]. Los microarreglos de proteínas se caracterizan por contener un arreglo de proteínas funcionales completas o dominios estructurales de las mismas (proteínas señuelo) sobre un soporte de vidrio o de sílice. Para detectar las interacciones, las proteínas señuelo se marcan con grupos fluorescentes, moléculas fotoquímicas o radioisótopos [21]. Su empleo permite caracterizar y cuantificar miles de interacciones proteína-proteína, y algunas otras como proteína-ácido nucleico (DNA/RNA), proteína-fosfolípido y proteína-pequeñas moléculas contenidas en una muestra al mismo tiempo [22,23].

### **1.3.1.2 Purificación por afinidad en tándem acoplada a espectrometría de masas**

Esta técnica fue desarrollada para caracterizar componentes de complejos multiproteicos, y ha sido muy importante para la caracterización de las partículas ribosomales [24]. Se basa en dos pasos técnicos: (1) la purificación de la proteína de interés (señuelo) fusionada a una etiqueta denominada "TAP" (un dominio de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus* y calmodulina, separadas por un sitio de corte específico para la proteasa del virus del tabaco) y todas las proteínas físicamente asociadas a ella; y (2) la identificación de las proteínas purificadas por afinidad al señuelo utilizando espectrometría de masas [12,24–26]. Más que identificar interacciones directas entre proteínas, esta técnica permite reconocer asociaciones funcionales. Las interacciones directas deben ser confirmadas por otras metodologías.

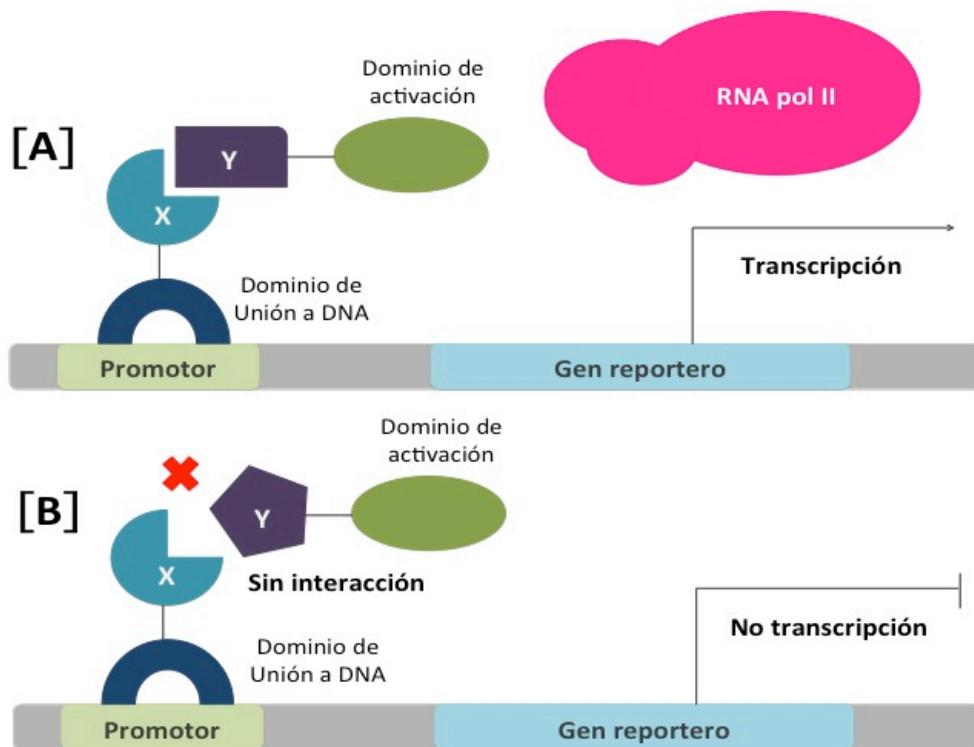
### **1.3.1.3 Ensayos de letalidad sintética**

El fenómeno de letalidad sintética ocurre cuando en una célula se producen mutaciones o deleciones de dos genes que son viables al presentarse de manera individual, pero que son letales en forma conjunta bajo ciertas condiciones [27]. El ensayo de letalidad sintética, es una prueba genética capaz de explicar posibles interacciones entre dos productos génicos que participan en una función similar. Los organismos más utilizados para este ensayo han sido *Saccharomyces cerevisiae* y distintas especies de *Drosophila*. Los ensayos se fundamentan en la necesidad que presenta un

organismo por mantener un plásmido que expresa un gen que ha sido eliminado o mutado en su genoma [28,29].

#### **1.3.1.4 Sistema de doble híbrido en levadura**

Esta técnica fue descrita por primera vez por Fields y Song en 1989 [30]. Está basada en las características estructurales de los factores de transcripción eucariontes que en su mayoría están compuestos por dos dominios funcionales [31]; uno encargado de dirigir la unión a una secuencia de DNA, y un segundo, que recluta la maquinaria necesaria para el proceso de transcripción [32,33]. Ambos dominios son funcionalmente independientes uno del otro, por lo cual es posible expresar una proteína *X* (señuelo) fusionada al dominio de unión a DNA (DUD), y una proteína *Y* (presa) fusionada al dominio de activación (DA). La proteína señuelo es capaz de reconocer una secuencia promotora que controla la expresión de un gen reportero a través del DUD. Si existe una interacción entre las proteínas *X* y *Y*, el factor de transcripción se restituye y permite la expresión del gen reportero (Figura 2) [19,31]. Existen diferentes sistemas de doble híbrido; los más utilizados son los dominios de unión a DNA GAL4 o LexA en combinación con dominios de activación como GAL4, VP16 o B42; todas estas alternativas son intercambiables [34]. Los genes reporteros más utilizados son marcadores nutricionales que codifican enzimas biosintéticas de aminoácidos, como *HIS3* o *LEU2*, o reporteros enzimáticos como *LACZ* o *MEL1*, que codifican  $\beta$  o  $\alpha$ -galactosidasa, respectivamente [35–37].



**Figura 2.** Sistema de doble híbrido. [A] Cuando la proteína Y (presa) es capaz de interactuar con la proteína X (señuelo), el factor de transcripción se reconstituye, quien se encarga de reclutar a la RNA polimerasa II y transcribir el mRNA del gen mensajero. [B] Cuando no existe interacción entre las proteínas X y Y, no se reconstituye el factor de transcripción y por lo tanto el gen reportero no puede expresarse.

El sistema de doble híbrido presenta ventajas notables con respecto a otros métodos [19]. En este método es posible ensayar grandes bibliotecas de cDNA, logrando la identificación de un gran número de interacciones en un mismo ensayo. Además, permite analizar interacciones conocidas, y caracterizar tanto subdominios como residuos específicos que son cruciales para la interacción [38]. La posibilidad de hacer estos ensayos semi-cuantitativos, permite obtener información a cerca de la fuerza de interacción. Finalmente, debido a que estos ensayos se realizan *in vivo*, se evita la purificación de grandes cantidades de proteína y el consumo de anticuerpos y otros materiales que limitan el uso de métodos *in vitro*.

Como cualquier método experimental, el sistema de doble híbrido presenta diversas desventajas implicadas con la manipulación, expresión y características funcionales de las proteínas a ensayar [24]. Por ejemplo, las proteínas que participan en el proceso de transcripción y que pueden auto-activarse, así como otras que podrían resultar tóxicas para el hospedero sólo pueden ser ensayadas en fragmentos [39,40]. Por otro lado, debe tomarse en cuenta que el plegamiento y la disponibilidad de los sitios de interacción de las proteínas a ensayar puede estar comprometido por la presencia de los dominios de unión a DNA y de activación. Cuando se emplea a *S. cerevisiae* como hospedero, es necesario tener en mente que este organismo no es capaz de realizar todas las modificaciones postraduccionales que podrían resultar esenciales para el plegamiento o la interacción cuando se ensayan proteínas heterólogas [19]. Finalmente, es necesario corroborar por otros métodos las interacciones resultantes, debido a que en ocasiones, es posible identificar interacciones *in vivo* que no necesariamente ocurren directamente *in vitro*, ya que una macromolécula Z podría mediar la interacción [31]. Además, debido a la compartimentalización del medio celular, gran parte de las interacciones observadas cuando se prueban bibliotecas de cDNA no son de relevancia biológica [41].

### **1.3.2 Métodos de bajo alcance: estudio específico de las interacciones**

Estos métodos se centran en la caracterización de las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de los complejos proteicos [42]. La información más detallada a cerca de la interface de interacción entre dos proteínas es provista por métodos como la cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética electrónica (RMN). Técnicas espectroscópicas como la transferencia de energía entre fluorocromos y anisotropía de fluorescencia, permiten el cálculo de parámetros fisicoquímicos que describen la fuerza de unión entre dos biomoléculas [43]. Otras técnicas, como la microscopía de fuerza atómica y la microscopía electrónica, permiten conocer a nivel tridimensional: la localización, el papel estructural y la relación biológica-estructural que presentan los componentes de un complejo multiproteico. En conjunto, estas técnicas son capaces de producir información detallada acerca de la estructura, mecánica, cinética y dinámica de la interacción, sin

embargo, el número de complejos proteicos que pueden ser solventados a partir de ellas es muy bajo. Actualmente se han caracterizado un gran número de componentes de complejos proteicos que participan en procesos celulares clave como el crecimiento, el mantenimiento de la información genética, la diferenciación, entre otros [44]. Sin embargo, es claro que aún resta mucho por descubrir y será el uso en conjunto de todas estas técnicas lo que permita obtener resultados de mayor contundencia dejando de lado las limitaciones que presentan cada una de estas metodologías individualmente.

#### **1.4 Los ribosomas: máquinas especializadas en la síntesis de proteínas**

Los ribosomas son máquinas moleculares encargadas de sintetizar todas las proteínas requeridas para el crecimiento y el mantenimiento celular. Cada ribosoma es capaz de decodificar la información contenida en los RNA mensajeros (mRNA) y producir una proteína específica. La mayor parte de los estudios sobre el ribosoma eucarionte han sido realizados en *S. cerevisiae*. En este organismo, cada ribosoma está conformado por dos subunidades. La subunidad menor (40S) contiene un rRNA ribosomal (18S) y 33 proteínas ribosomales, mientras que la subunidad mayor (60S) está compuesta por tres rRNA (5.8S, 5S y 25S) y 46 proteínas ribosomales [45]. Además de su composición, cada subunidad es funcionalmente diferente; mientras que la subunidad menor actúa como el centro de decodificación del mRNA, la subunidad mayor es el sitio en donde ocurre la transferencia peptídica que media la formación de la proteína [46].

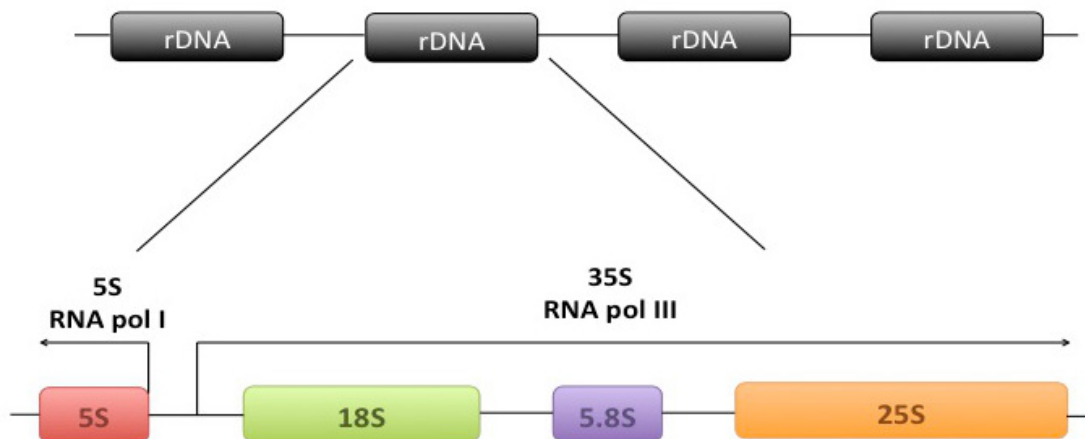
Cada ribosoma es construido en el nucléolo, el sitio en donde el rRNA ribosomal es transcrito. Posteriormente, cada uno de los intermediarios que dará origen a las subunidades mayor y menor, es procesado durante su transporte hasta el citoplasma, en donde sufren los últimos pasos de maduración. El proceso de biogénesis ribosomal es altamente complejo, requiere del esfuerzo concertado de las tres RNA polimerasas, de más de 200 proteínas no ribosomales o accesorias, y 75 RNA pequeños nucleolares (snoRNA), que en conjunto asisten el ensamblaje, la maduración y el transporte intracelular de ambas subunidades ribosomales.



## 1.5 Biogénesis ribosomal en *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.5.1 Transcripción del RNA necesario para la biogénesis ribosomal

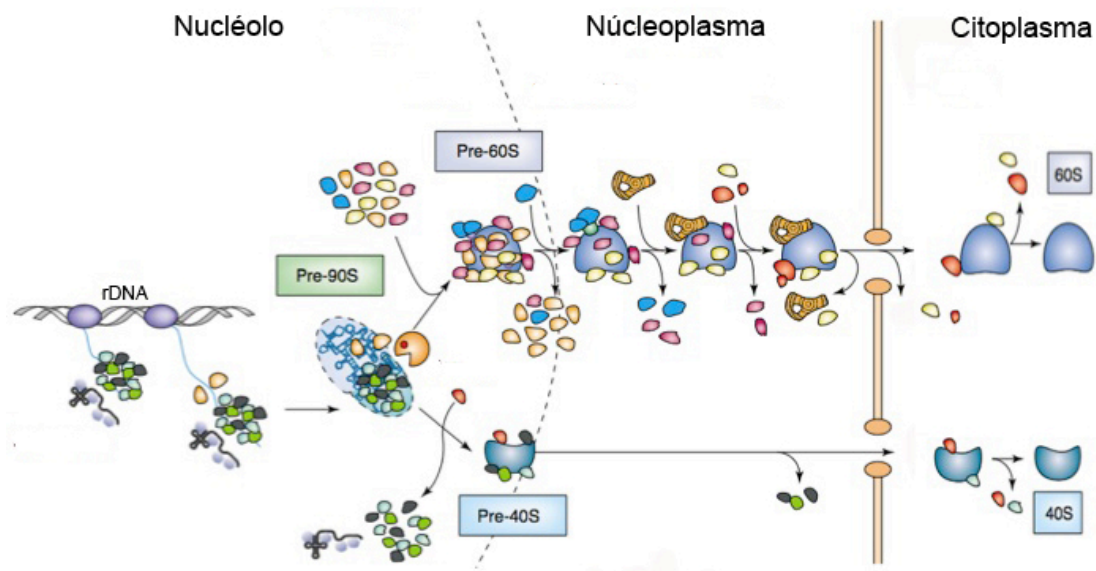
La biogénesis ribosomal comienza con la transcripción de un rRNA policistrónico conocido como pre-35S por parte de la RNA polimerasa I y el rRNA 5S por la RNA polimerasa III [47,48]. El rRNA 35S es precursor de las especies 18S, 5.8S y 25S (Figura 3). Mientras el pre-35S es transcrito, experimenta diferentes modificaciones químicas, como la pseudourinidilación y metilación, las cuales son realizadas por cerca de 75 ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNP). Se ha descubierto que estas modificaciones se presentan en secuencias relevantes para el funcionamiento ribosomal, debido a que los ribosomas que carecen de ellas muestran una reducción en su eficiencia de traducción [49–52]. Por otro lado, ha sido observado que durante el crecimiento celular, cerca del 60 % de los mRNA transcritos por la RNA polimerasa II codifican para las proteínas ribosomales y factores accesorios necesarios para la síntesis ribosomal [53]. Este alto porcentaje refleja la importancia del proceso ribosomal en el mantenimiento de la función celular.



**Figura 3.** Organización del locus de rDNA en el cromosoma XII de *S. cerevisiae*. El nucléolo es un subcompartimento nuclear conformado por repetidos de rDNA (150 a 200); la biogénesis ribosomal comienza en este sitio con la transcripción del rRNA 35S por parte de la RNA pol I y el rRNA 5S por parte de la RNA pol III [46].

### 1.5.2 El complejo 90S es el precursor de las subunidades 60S y 40S

Conforme el rRNA 35S es modificado, un pequeño subgrupo de proteínas ribosomales y proteínas accesorias se asocian con el ácido nucleico dando origen a un complejo conocido como 90S, el primer precursor identificable y que originara las subunidades 40S y 60S (Figura 4) [54]. Este complejo es procesado por una serie de endo y exonucleasas que realizan diversos cortes sobre el pre-rRNA 35S. El corte sobre el sitio A2 produce las subunidades pre-40S y 60S. En seguida, ambas subunidades siguen vías de maduración independientes. Por un lado, la subunidad pre-40S es rápidamente exportada al citoplasma, en donde experimenta dos eventos principales: (1) un rearrreglo estructural producido por una serie de factores accesorios y (2) el corte endonucleolítico por la nucleasa Nob1 sobre el rRNA 20S para producir el rRNA 18S maduro [45]. El proceso de maduración de la subunidad 60S es mucho más complejo e involucra, entre otras cosas, el procesamiento de los rRNA, así como la disociación y asociación de diversas proteínas ribosomales [46,55–58].

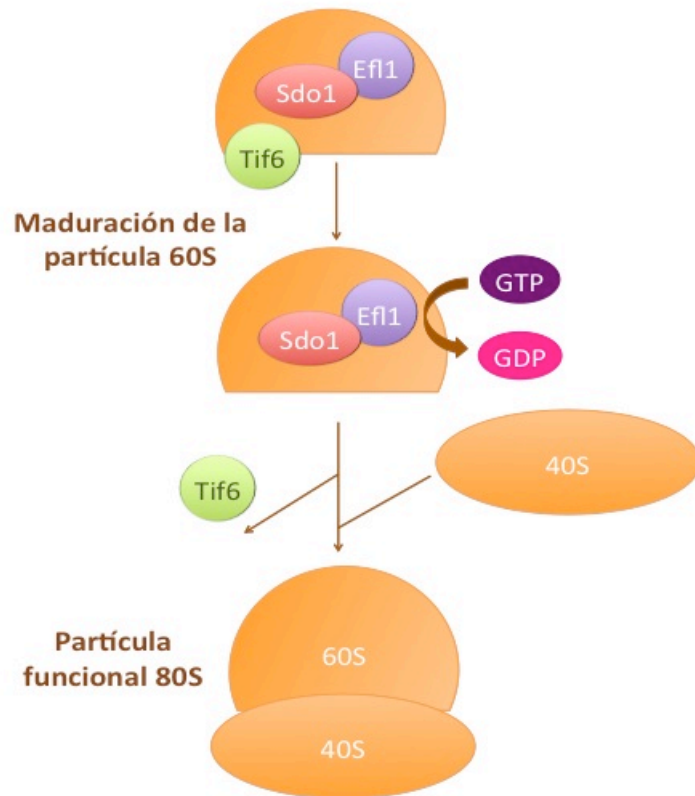


**Figura 4.** Proceso de biogénesis ribosomal. La asociación del rRNA ribosomal con proteínas ribosomales y accesorias da origen a la partícula 90S; el procesamiento de esta partícula produce las subunidades pre-60S y pre-40S. Cada partícula es transportada desde el nucléolo al nucleoplasma, y exportada al citoplasma, en donde sufren las últimas modificaciones para su maduración y se ensamblan para formar a la partícula 80S funcional. Modificada de [59].

### 1.5.3 Maduración de la subunidad 60S

La partícula pre-60S es exportada hasta el citoplasma para completar su proceso de maduración, el cual comprende el procesamiento final del rRNA y el ensamblaje de las últimas proteínas ribosomales. Una vez que la pre-subunidad 60S ha llegado a este sitio, mantiene un cierto número de proteínas no ribosomales encargadas de facilitar su exportación y de prevenir una interacción prematura con la subunidad 40S. Las proteínas que no formarán parte de la estructura de la subunidad 60S funcional, son liberadas en el citoplasma y recicladas al núcleo mediante la acción de proteínas especializadas conocidas como factores de liberación; éstos comprenden a las ATPasas Drg1 y Hsp70 Ssa1/Ssa2, a las GTPasas Lsg1 y Efl1, y la fosfatasa Yvh1, entre otras [60].

La maduración de la pre-subunidad 60S involucra una serie de pasos coordinados que están relacionados entre sí. A partir de estudios acerca de la composición de la partícula pre-ribosomal se han determinado al menos dos vías que convergen en la maduración de la subunidad pre-60S [59,61]. Una de ellas involucra el reciclaje de Mtr4, una RNA helicasa dependiente de ATP, encargada del procesamiento del rRNA 5.8S [62–64]. Mtr4 es paróloga a P0, un componente esencial del tallo ribosomal. El tallo es una estructura característica de la subunidad 60S funcional que se encarga del reclutamiento de los factores de traducción durante la síntesis de proteínas [65]. Su ensamblaje sobre la subunidad mayor depende de la liberación de Mtr4 por parte de la fosfatasa Yvh1. Cuando la disociación de Mtr4 no se realiza, la formación del tallo es alterada y provoca que las proteínas Tif6 y Nmd3 no sean recicladas al núcleo [60]. Tif6, conocida en mamíferos como eIF6, es un factor de anti-asociación que permanece unido a la subunidad pre-60S e impide su asociación prematura con la subunidad 40S [66]. La disociación de Tif6 de la subunidad 60S es esencial para permitir el ensamble del ribosoma funcional (80S). Este acontecimiento es catalizado por la participación conjunta de las proteínas Efl1 y Sdo1 [67–69] quienes son nuestro objeto de estudio (Figura 5).

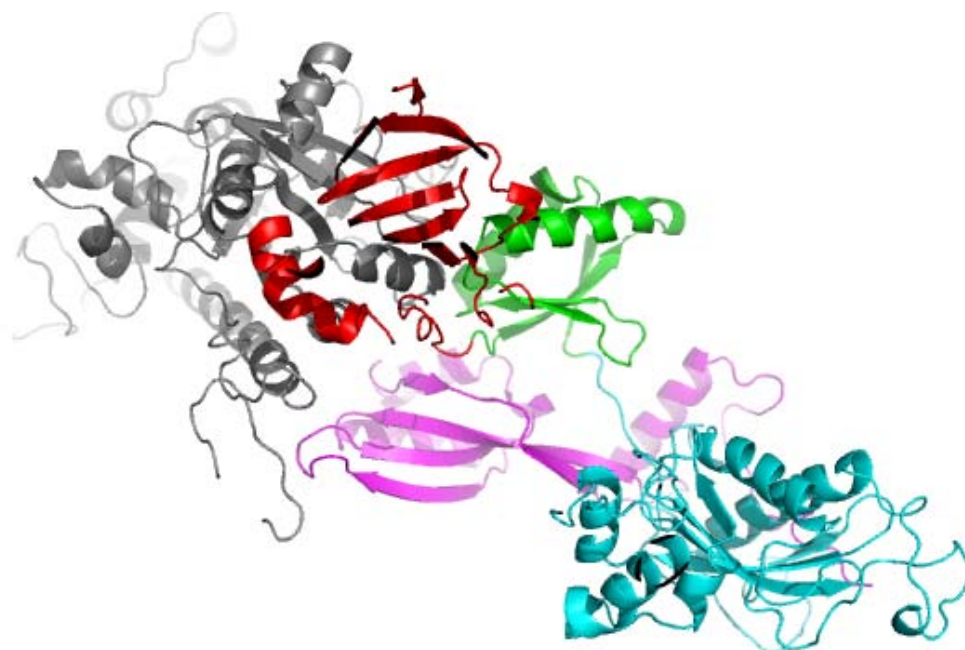


**Figura 5.** Liberación de Tif6 de la subunidad 60S. Tif6 permanece unida a la subunidad pre-60S e impide su asociación con la subunidad 40S. La disociación de Tif6 es catalizada las proteínas Efl1 y Sdo1 permitiendo el ensamble de la partícula 80S.

## 1.6 La GTPasa Efl1

La proteína Efl1 es una GTPasa homóloga a los factores de traducción EF-2 de eucariontes y EF-G de procariontes. Se ha establecido, de manera análoga a un proceso de control de calidad, que la función de Efl1 es monitorear que las regiones ribosomales como el tallo y el sitio P hayan sido ensambladas correctamente [70]. Debido a su similitud con EF-2, se ha planteado que remueve a Tif6 de la subunidad ribosomal a través de un cambio conformacional similar al que desencadena esta proteína durante la elongación de la síntesis proteica [70]. Además, ya que EF-2 y Efl1 tiene un 28 % de identidad, se ha propuesto que Efl1 presenta la misma organización estructural que EF-2 [68]: un subdominio G en el dominio I y cuatro dominios

más, numerados del II-V (Figura 6). Se sabe que en el dominio I es en donde ocurre la unión e hidrólisis de GTP, pero la función de los cuatro dominios restantes aún es desconocida. Estudios sobre la región C-terminal han establecido que probablemente está involucrada en la unión al ribosoma [67]. La diferencia más marcada entre ambas proteínas, es la existencia de una inserción de 160 residuos de aminoácidos en el dominio II de Efl1, ausente en EF-2 [67]. En esta tesis demostramos que esta región está involucrada en la interacción con la proteína Sdo1.

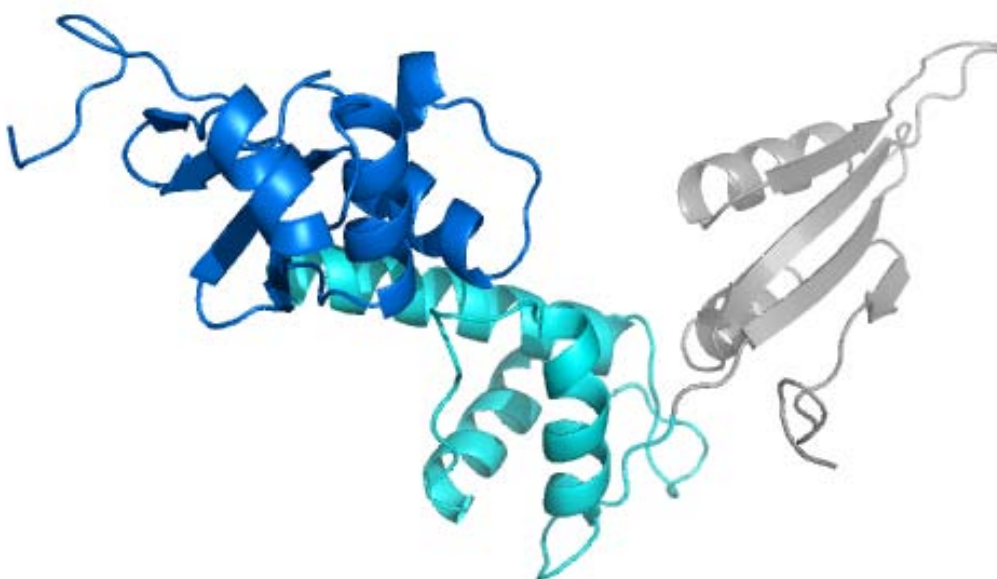


**Figura 6.** Modelo del plegamiento tridimensional de la GTPasa Efl1, excluyendo la secuencia de inserción de 160 residuos. Según nuestro modelo, la estructura de Efl1 está organizada en 5 dominios: un subdominio G dentro del dominio I (gris), y cuatro dominios numerados del II al V, cuya función aún es desconocida. El modelo fue obtenido por homología a partir de la estructura de EF-2 de *S. cerevisiae* (pdbid 1N0V) utilizando el servidor Swiss Model de Expasy. Dominio II: Rojo; Dominio III: Verde; Dominio IV: Cian; Dominio V: Rosa.

## 1.7 La proteína Sdo1

La proteína Sdo1 pertenece a una familia de proteínas presente en diversos organismos, que incluyen desde arquea hasta eucariontes [71]. En *Homo*

*sapiens* el ortólogo se conoce como SBDS, porque las mutaciones en el gen que la codifica, son la causa del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS). SBDS es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por insuficiencia pancreática exocrina, alteraciones esqueléticas, deficiencia en la función de la médula ósea y una alta predisposición a desarrollar leucemia [72,73]. Estas proteínas se organizan en tres dominios estructurales (Figura 7) [74–76]. Las estructuras determinadas mediante RMN han demostrado que el dominio I puede unirse a RNA, por lo cual se cree que media la interacción con el ribosoma [77]. La función de los dominios II y III restantes es desconocida. Bocook *et al.* [71], utilizó a distintos miembros de la familia de proteínas Sdo1/SBDS, así como proteínas quimera de las mismas, para complementar la función de Sdo1 en levadura. Los resultados obtenidos mostraron que los dominios I y II son indispensables para su función; mientras que el dominio I puede ser intercambiado entre especies y el dominio II rige la especificidad de especie.



**Figura 7.** Estructura tridimensional de la proteína Sdo1 de *S. cerevisiae*. Sdo1 es una proteína compuesta por tres dominios. El dominio I (azul marino) está implicado en la interacción con el ribosoma. Las funciones de los dominios II (cian) y III (gris) son desconocidas. Modelo obtenido por homología a partir de la estructura de SBDS humana (pdbid 2L9N), utilizando el servidor Swiss Model de Expasy.

En este trabajo establecimos una distribución teórica de los dominios estructurales que conforman a la proteína Efl1, a partir del modelo obtenido mediante alineamientos de secuencia primaria y secundaria con su homólogo EF-2 (ver sección 4.1). La secuencia de inserción de 160 residuos no fue incluida en el modelo, porque no encontramos relaciones de homología significativas con estructuras depositadas en el PDB. Por la ubicación en la secuencia primaria, pensamos que esta inserción puede conformar un dominio estructural o formar parte del Dominio II. Posteriormente, la secuencia codificante de cada dominio estructural de Efl1 y Sdo1, así como combinaciones de los mismos, se expresaron en *S. cerevisiae* CTY10-5d, y se realizaron ensayos de doble híbrido con el objetivo de establecer las regiones responsables en la interacción entre ambas proteínas.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Identificar los dominios que participan en la interacción entre las proteínas de levadura Sdo1 y Efl1 implicadas en la maduración de la subunidad ribosomal 60S.

### **2.2 Objetivos particulares**

- Determinar la distribución teórica de los dominios estructurales de Efl1.
- Clonar las secuencias codificantes de los diferentes dominios de Efl1 y Sdo1 en vectores que permitan expresarlos en levadura y realizar ensayos de doble híbrido.
- Evaluar la interacción entre los diferentes dominios de Efl1, y sus diferentes combinaciones con Sdo1 mediante ensayos de doble híbrido en levadura a partir de la cuantificación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

## **3 Hipótesis**

Debido a que la diferencia más marcada entre las GTPasas Efl1 y EF-2, es la presencia de una inserción de 160 aminoácidos dentro del dominio II de Efl1, entonces, la función de este dominio debe estar involucrada en la interacción de Efl1 con Sdo1.

Si el dominio II de Sdo1 es indispensable para la viabilidad celular y le confiere especie-especificidad a la proteína entonces debe ser importante para la interacción con Efl1 y se podrá evaluar mediante un ensayo de doble híbrido.



## **4 Materiales y métodos**

Para establecer los límites de cada uno de los dominios estructurales de Efl1, realizamos un modelo estructural de Efl1; ya que la estructura tridimensional de esta proteína no ha sido determinada. Una vez definidos los dominios estructurales, la estrategia experimental consistió en (1) obtener las construcciones para expresar a las proteínas Sdo1 y Efl1; (2) co-transformar combinaciones diferentes de estas construcciones en células de levadura; y (3) realizar los ensayos de doble híbrido para identificar las regiones que participan el fenómeno de interacción entre ambas proteínas. A continuación se describen los detalles de los materiales y métodos utilizados en este trabajo.

### **4.1 Modelado de las estructuras de Efl1 y Sdo1**

Las estructuras tridimensionales teóricas de las proteínas Efl1 (sin inserción) y Sdo1 fueron obtenidas empleando el programa Swiss-Model de Expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>). Para seleccionar los templados que utilizamos para obtener los modelos por homología se realizó un BLAST (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra las secuencias primarias de las proteínas depositadas en el PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). La secuencia de la proteína EF-2 de *S. cerevisiae* es la que comparte mayor identidad con Efl1 (28% identidad), por lo cual utilizamos como modelo el depósito 1N0V del PDB. En el caso de Sdo1, la proteína SBDS de *Homo sapiens* resultó la de mayor identidad (42.62 % de identidad) con Sdo1, por lo cual utilizamos como modelo el depósito 2L9N del PDB [78].

### **4.2 Análisis de las regiones desestructuradas en Efl1 y EF-2**

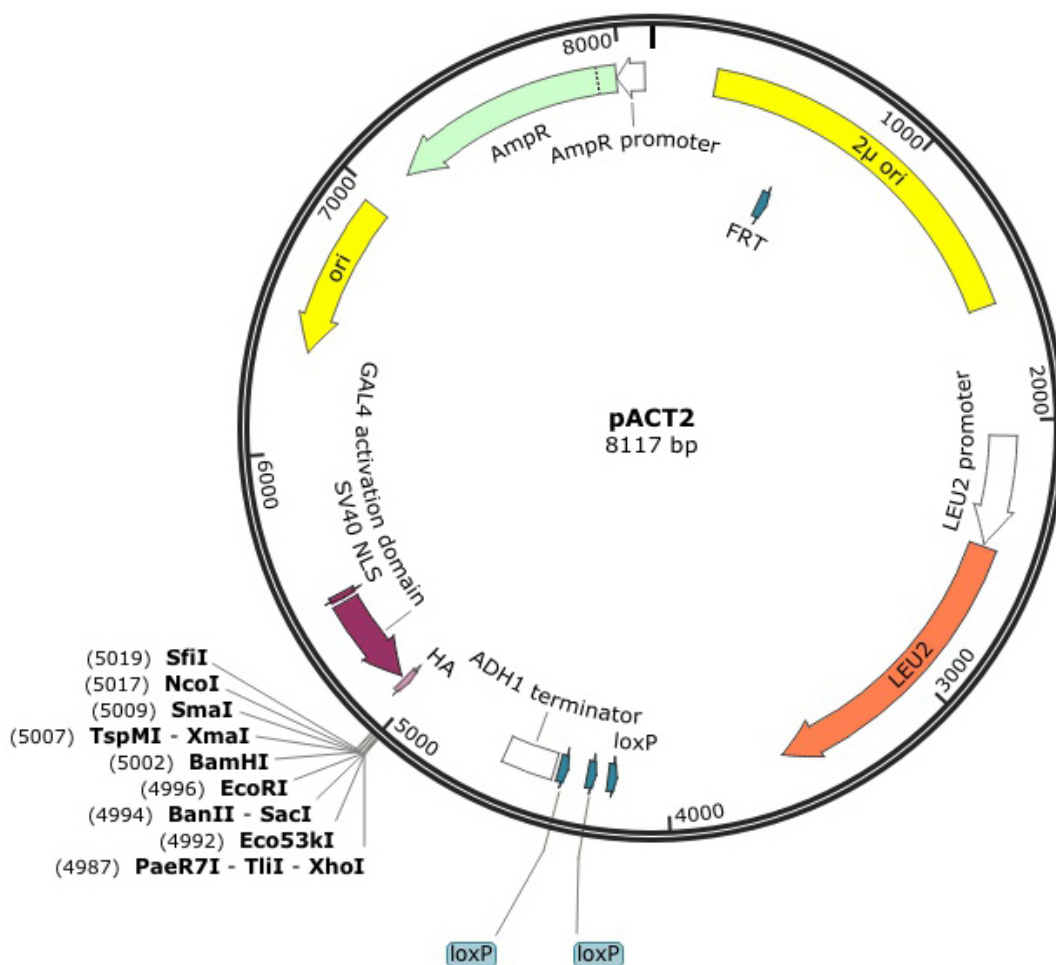
Para identificar las posibles regiones desestructuradas en Efl1 y EF-2 se analizó la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas utilizando los predictores PONDR® VSL2, PONDR® VL3 y PONDR® VLTX (<http://www.disprot.org/>). Posteriormente se construyó una gráfica para cada proteína en donde se representa la probabilidad teórica que tiene un determinado residuo, de acuerdo a su contexto o entorno, de formar parte de una región desestructurada.

### 4.3 Vectores de expresión

Los vectores de expresión pACT2 y el pEG202 fueron utilizados para la expresión de las proteínas EFL1 y Sdo1, respectivamente. A continuación se describen sus principales características.

#### 4.3.1 Vector pACT2

El vector pACT2 (Figura 8) es ampliamente utilizado para ensayos de doble híbrido debido a que permite la selección de células transformantes de levadura al complementar su auxotrofia a leucina. Otra ventaja de este vector es que permite expresar a la proteína de interés fusionada a un dominio de activación (DA) del factor de transcripción GAL4. Además, este vector contiene un origen de replicación procariota y expresa una  $\beta$ -lactamasa, por lo cual puede ser propagado en bacterias y seleccionar mediante resistencia a ampicilina.



**Figura 8.** Características generales del vector pACT2, utilizado para la expresión de la proteína Efl1 y sus distintos dominios estructurales en células de levadura. Esquema obtenido con el *software Snap Gene*.

#### 4.3.2 Vector pEG202

El vector pEG202 (Figura 9) también es capaz de ser propagado en bacteria, y al igual que el pACT2, expresa una  $\beta$ -lactamasa que otorga resistencia a las bacterias en un medio con ampicilina. En levadura, puede ser seleccionado debido a que presenta al gen *HIS3* como marcador nutricional. Este vector es utilizado para ensayos de doble híbrido debido a que permite la expresión de la proteína de interés fusionada a un dominio de unión a DNA del represor bacteriano LexA.



**Figura 9.** Características generales del vector pEG202 utilizado para la expresión de la proteína Sdo1. Esquema obtenido con el *software Snap Gene*.

#### **4.4 Construcciones para la expresión de Sdo1 y sus dominios 2-3**

Las construcciones pEG202-Sdo1 y pEG202-Sdo1 D2-D3 fueron obtenidas por la Doctora Nuria Victoria Sánchez Puig, y donadas para la realización de este trabajo. La construcción pEG202-Sdo1 expresa a la proteína completa, mientras que la construcción pEG202-Sdo1 D2-D3 expresa un polipéptido conformado por los dominios 2 y 3 (residuos 95 a 250) de Sdo1. Ambos polipéptidos se clonaron en marco de lectura tal que, se expresan fusionados a un dominio de unión a DNA del factor de transcripción LexA en el extremo N-terminal.

#### **4.5 Estrategia de clonación de las secuencias codificantes de la proteína Efl1 y de sus diferentes dominios estructurales**

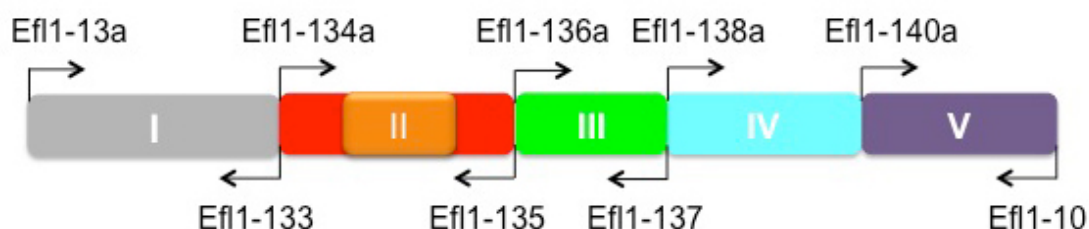
Para obtener las construcciones que nos permitieran expresar a Efl1 y sus dominios estructurales, primero identificamos su posible arreglo estructural y distribución de dominios a partir de un análisis comparativo entre la secuencia primaria y secundaria de su homólogo EF-2. Con esta información, diseñamos los oligonucleótidos necesarios para amplificar la secuencia completa de Efl1 y de sus diferentes dominios de manera independiente, por PCR. Cada amplicón, así como el vector pACT2, fueron digeridos con enzimas de restricción; y finalmente, cada inserto fue ligado en el vector de expresión. A continuación se describen las condiciones en las que se realizaron cada uno de estos pasos.

##### **4.5.1 Identificación de los dominios de Efl1 por alineamiento con EF-2**

Para identificar el posible arreglo estructural teórico, así como el número y distribución de los dominios de Efl1, realizamos un alineamiento de la secuencia primaria entre Efl1 y su homólogo EF-2 de levadura. El alineamiento se realizó sobre el programa T-Coffee del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), utilizando las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas obtenidas de la base de datos de proteínas (GenBank) del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI). Utilizando la información contenida en el PDB, marcamos las regiones que corresponden a la estructura secundaria de EF-2. El resultado del alineamiento se muestra en la Figura 11.

#### 4.5.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificar la secuencia codificante de Efl1 y de sus distintos dominios estructurales

A partir de los resultados obtenidos del alineamiento entre las secuencias de Efl1 y EF2 se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la secuencia codificante de la proteína completa y del dominio 1 (oligos Efl1-13a/Efl1-133), dominio 2 (oligos Efl1-34a/EFL1-135), dominios 1-2 (oligos Efl1-13a/Efl1-135), dominio 3 (oligos Efl1-136a/Efl1-137), dominios 4-5 (oligos Efl1-138a/Efl1-10) y dominio 5 (oligos Efl1-140/Efl1-10) de Efl1. Cada oligonucleótido consistió entre 30 y 40 pares de bases (pb), permitiendo que 20 pb o más hibridaran con el molde. Todos los oligonucleótidos sentido contenían un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* mientras que los oligonucleótidos contrasentido presentaban un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XhoI*. De cada oligonucleótido se prepararon soluciones *stock* a una concentración de 100  $\mu$ M, y soluciones de trabajo a una concentración de 10  $\mu$ M. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en el Apéndice 1. Las regiones en donde alinean cada uno de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Figura 10.



**Figura 10.** Localización de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la secuencia codificante y los diferentes dominios estructurales de Efl1.

#### 4.5.3 Amplificación de la secuencia codificante de Efl1 y de sus distintos dominios estructurales

Los fragmentos codificantes de Efl1, así como sus dominios 1, 2, 1-2, 3, 4-5 y 5, fueron amplificados mediante PCR utilizando como molde la construcción pRS426-Efl1 que ya se tenía en el laboratorio. La amplificación se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ L utilizando los respectivos oligonucleótidos y el PCR 2X *Master Mix* (Fermentas). En la Tabla 2 se muestra la composición de cada

una de las reacciones. Las condiciones de PCR fueron estandarizadas como se describe enseguida: desnaturalización 95 °C 5 min, 30 ciclos: 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C (el tiempo dependió del tamaño del amplicón; la polimerasa contenida en el 2X Master Mix amplifica 1 kb por cada 60 segundos); y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C.

**Tabla 2.** Composición de las reacciones de amplificación por PCR.

Componente	Volumen agregado
Molde (20 ng)	1 µL
Oligo Sentido 10 µM	1.5 µL
Oligo Contrasantido 10 µM	1.5 µL
PCR 2X Master Mix*	25 µL
Agua libre de nucleasas	21 µL

\* La composición del PCR 2X Master es Taq DNA polimerasa 0.05 U/µL, buffer de reacción, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP).

#### 4.5.4 Digestión y purificación de los amplicones

Los productos de PCR y el vector pACT2 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* (New England Biolabs) y *XhoI* (Fermentas) durante 4 h a 37 °C. La composición de las reacciones de restricción se muestra en la Tabla 3. Cada reacción se resolvió en un gel de agarosa al 1 % y se purificó utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del producto.

**Tabla 3.** Composición de las reacciones de restricción.

Componentes	Volumen agregado
NEBuffer 2 10X	6 µL
<i>EcoRI</i> (20 U/µL)	0.5 µL
<i>XhoI</i> (10 U/µL)	1 µL
Reacción de PCR	45 µL
Agua libre de nucleasas	7.5 µL

#### 4.5.5 Ligación de DNA

Cada reacción de ligación se realizó en un volumen de 20 µL utilizando la DNA ligasa T4 (New England Biolabs), 50 ng del vector pACT2 y la cantidad de inserto necesaria para alcanzar una relación molar 1:3 entre el vector y el inserto. La cantidad empleada de inserto se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$ng \text{ de inserto} = \left( \frac{(ng \text{ plásmido})(kb \text{ inserto})}{kb \text{ plásmido}} \right) (3)$$

Las reacciones de ligación se incubaron durante 18 h a 4 °C. En la Tabla 4 se muestra la composición de una reacción de ligación estándar.

**Tabla 4.** Composición de las reacciones de ligación.

Componente	Cantidad
Vector	50 ng
Inserto*	Relación 3:1
T4 DNA ligasa buffer 10X	2 µL
T4 DNA ligasa (10 U/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	C.B.P. 20 µL

\*La cantidad de DNA de inserto depende de su longitud y de la relación molar empleada. C.B.P. cuanto baste para.

#### 4.5.6 Transformación de DNA plasmídico en bacteria

Se mezclaron 10 µL de cada reacción de ligación con 50 µL de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α y se mantuvieron en hielo durante 30 min. En seguida, se les dio un choque térmico a 42 °C durante 40 s y permitimos que las células se duplicaran en medio LB fresco durante 1 h a 37 °C. Finalmente, cada mezcla de transformación se inoculó en cajas de LB-ampicilina y se incubó a 37 °C durante 18 h.

#### 4.5.7 Aislamiento de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina

Para cada una de las construcciones se tomaron 10 colonias transformantes y se inocularon por separado en 5 mL de medio LB con ampicilina. Estos

cultivos se incubaron a 37 °C durante 18 h con agitación constante (200 rpm). De cada cultivo obtuvimos el botón celular por centrifugación (8000 rpm 1 min), y se trataron como se describe a continuación: se agregaron 100 µL de la solución de miniprep S1 y se resuspendió con el vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Después se adicionaron 100 µL de la solución S2, se mezcló por inversión y en seguida se agregaron 120 µL de la solución S3. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm 15 min para eliminar restos celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo con 400 µL de isopropanol frío (4°C). Esta mezcla se centrifugó a 12000 rpm 15 min y el botón se lavó con 500 µL de una solución de etanol al 70 % v/v. Finalmente, el etanol se eliminó por evaporación y el botón se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas. La composición de las soluciones utilizadas en esta sección se encuentra descrita en el Apéndice 4.

#### **4.5.8 Identificación de las construcciones por restricción**

Se digirieron 5 µL de cada uno de los plásmidos purificados por lisis alcalina utilizando las enzimas *EcoR* I y *Xho* I por 2 h a 37 °C. Las reacciones de restricción se resolvieron en un gel de agarosa al 1% y se comparó su patrón electroforético con el predicho teóricamente utilizando el programa *Serial Cloner 2.6.1*. Las construcciones que mostraron un patrón de restricción correcto se purificaron con el kit *Plasmid Mini-Prep* de Jena Bioscience. Se estimó la concentración y pureza de cada plásmido midiendo su absorbancia a 260 nm en un equipo nanodrop BioSpec-nano de Shimadzu. Finalmente los plásmidos obtenidos se secuenciaron con la compañía LARAGEN para comprobar la presencia y correcta secuencia de cada inserto.

#### **4.6 Preparación de células competentes de levadura**

Se inocularon 10 mL de medio YPED con una colonia de *S. cerevisiae* CTY10-5d y se incubaron a 30 °C durante toda la noche con agitación constante (250 rpm). Posteriormente se inocularon 200 mL de medio YPED fresco con la cantidad de pre-inóculo necesaria para alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.1, este cultivo se incubó a 30 °C con agitación constante hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica (OD<sub>600nm</sub> entre 0.5-0.8). El paquete celular se obtuvo por centrifugación (5000 rpm, 5 min, 21 °C) y se resuspendió en 2 mL



de la solución CY (Apéndice 5) para después ser repartido en alícuotas de 100  $\mu$ L.

#### **4.7 Co-transformación del DNA plasmídico en levadura**

Se co-transformaron dos grupos de plásmidos; el primer grupo consistió en mezclas de 250 ng de la construcción pEG202-Sdo1 y 250 ng de cada construcción de Efl1, mientras que el segundo grupo contenía 250 ng de la construcción pEG202-Sdo1 D2-D3 y 250 ng de cada construcción de Efl1. Los plásmidos se mezclaron con 20  $\mu$ L (100  $\mu$ g) de acarreador de DNA (Invitrogen) y se agregaron a 100  $\mu$ L de células competentes de levadura. A cada tubo se le adicionó 600  $\mu$ L de la solución TY (Apéndice 5), los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron durante 2 h a 30 °C con agitación constante (250 rpm). Posteriormente, se agregaron 70  $\mu$ L de DMSO (Sigma) y se les dio un choque térmico a 42 °C durante 15 min. Para eliminar el sobrenadante cada tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min. Cada paquete celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de TE 1X y fue plaqueado en cajas de medio YM1 –Leu –His. Estas cajas fueron incubadas a 30 °C durante 3 días. Los vectores vacíos pEG202/pACT2, así como las mezclas pEG202-Sdo1/pACT2 y pEG202-Sdo1 D2-D3/pACT2, también se co-transformaron para utilizar las clonas transformantes como controles negativos en el ensayo de interacción.

#### **4.8 Ensayos de interacción proteína-proteína (Doble híbrido)**

Se inocularon 3 mL de medio YM1 –Leu –His con una de las colonias de levadura obtenidas de cada co-transformación y se incubaron a 30 °C durante toda la noche con agitación de 250 rpm. Enseguida, se inocularon 10 mL de medio YM1 –Leu –His fresco con 300  $\mu$ L de cada pre-inóculo por separado y se mantuvieron a 30 °C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> entre 0.5 y 0.8. Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento logarítmica, se transfirieron 1.5 mL del cultivo a un tubo limpio y se centrifugaron a 14000 rpm 2 min para eliminar el medio de cultivo. El botón celular se resuspendió en 300  $\mu$ L de Buffer Z (Apéndice 6). Después se transfirieron 100  $\mu$ L de esta suspensión a un tubo nuevo y las células fueron lisadas por ciclos de congelación/descongelación utilizando nitrógeno líquido

y un baño maría a 37 °C. Se agregaron a cada tubo 700 µL de Buffer Z/β-mercaptoetanol, 160 µL de solución de ONPG (*o*-nitrofenil galactopiranosido), se mezclaron por inversión y se incubaron a 30 °C hasta observar el desarrollo de un color amarillo. Una vez desarrollado el color, se agregaron 400 µL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M para detener la reacción, se registró el tiempo de incubación y los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se cuantificó su absorbancia a una longitud de onda de 420 nm ( $\lambda_{420nm}$ ). Las unidades de β-galactosidasa (cantidad que hidroliza 1 µM de ONPG a *o*-nitrofenol por minuto por célula) se calcularon empleando la siguiente fórmula:

$$U_{galactosidasa} = \frac{(1000)(OD_{420nm})}{(5)(t)(V)(OD_{600nm})}$$

En donde:

- $t$  es el tiempo de incubación
- $V$  es el volumen de suspensión celular utilizado para el ensayo
- $OD_{420nm}$  es la absorbancia del *o*-nitrofenol a una  $\lambda_{420 nm}$
- $OD_{600nm}$  es la absorbancia de las células en fase logarítmica de crecimiento

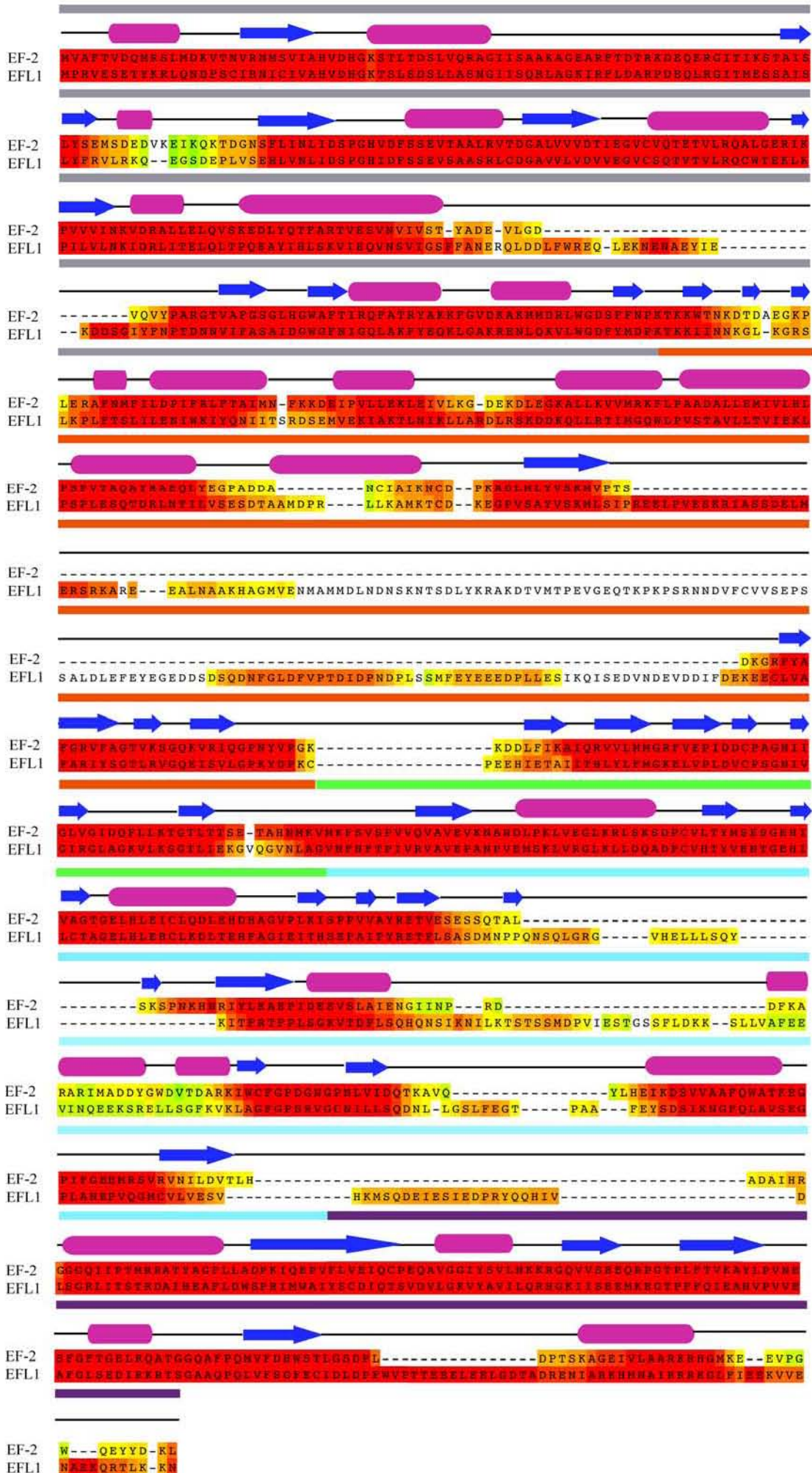
## **5 Resultados**

### **5.1 Identificación de los dominios estructurales de EFL1 y clonación de sus secuencias codificantes en el vector pACT2**

Para identificar a las regiones que median la interacción entre Sdo1 y Efl1, construimos diferentes plásmidos que nos permitieran expresar a ambas proteínas y sus diferentes dominios estructurales en levadura. Primeramente se identificó la distribución de los dominios estructurales de Efl1, para después amplificar su secuencia codificante por PCR y clonarlos en el vector pACT2. A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada uno de estos pasos.

#### **5.1.1 Localización de los dominios estructurales de EFL1**

En la Figura 11 se muestra el resultado del alineamiento de las secuencias primaria de Efl1 y EF-2. En la parte superior se encuentran esquematizadas las estructuras secundarias de EF-2 correspondientes a su estructura cristalográfica. A partir de este estudio pudimos observar cómo se encontraban distribuidos los dominios de Efl1 con respecto a la secuencia de EF-2. Conociendo el contenido de estructura secundaria de EF-2 y el modelo estructural de Efl1 obtenido por homología, identificamos los límites de cada dominio. De acuerdo con nuestros resultados, los dominios de Efl1 están conformados de la siguiente forma: dominio I comprende los residuos 1 a 365, el domino II del 366 al 675 (incluyendo la inserción), el dominio III del 676 al 747, el dominio IV del 748 al 975, y el dominio V del 976 al 1110. Es necesario notar, que con respecto a EF-2, Efl1 presenta una serie de inserciones en su secuencia. La más prominente se encuentra dentro del dominio II. Esta región no se muestra en el modelo obtenido por homología debido a que fuimos incapaces de modelarlo y todo indica que se trata de una región desestructurada.



**Figura 11.** Alineamiento entre las secuencias primarias y secundarias de las proteínas Efl1 y EF-2 de *S. cerevisiae*. Los colores que sombrean la secuencia de aminoácidos indican el porcentaje de conservación de residuos entre ambos polipéptidos. Rojo: mayor al 80 % de identidad; naranja: 80-60 % de identidad; amarillo: 60-40 % de identidad; verde: menor al 40 % de identidad. Las estructuras secundarias están representadas por flechas azules (hojas beta) y recuadros rosas (alfa hélices). Dominio I - línea gris, dominio II - línea naranja, dominio III - línea verde, dominio IV - línea cian y dominio V - línea morada.

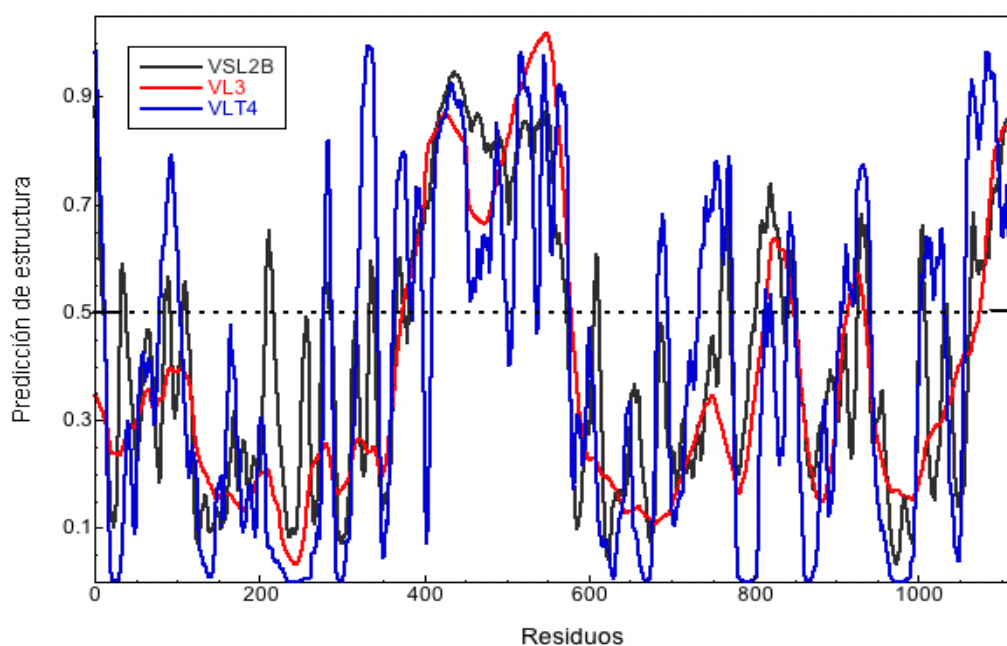
### 5.1.2 Modelos estructurales de Efl1 y Sdo1

A la fecha ha sido difícil obtener las estructuras tridimensionales de Efl1 y de Sdo1 de *S. cerevisiae*. La flexibilidad de ambas proteínas ha complicado la obtención de cristales para su estudio por difracción de rayos X, y en el caso de Efl1, su tamaño ha impedido su caracterización por RMN. Actualmente, existen dos estructuras de la proteína SBDS de *H. sapiens* obtenidas por RMN [74,79]. y dos estructuras cristalográficas del ortólogo de SBDS de arquea [76]. Todas las estructuras de las proteínas SBDS presentan el mismo número de residuos organizados en tres dominios estructurales y mantienen características similares entre sí. Basándonos en la información evolutiva que presentan Efl1 y Sdo1, nosotros obtuvimos modelos estructurales de los correspondientes ortólogos de *S. cerevisiae* utilizando el programa Swiss-Model (Figura 6 y Figura 7). Para cada modelo marcamos con diferentes colores sus dominios estructurales, y en cuanto a Efl1, notamos que su distribución corresponde con los resultados del alineamiento de secuencia primaria con EF-2. Con la información obtenida del alineamiento, así como con el modelo de Efl1, se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de sus diferentes dominios por PCR.

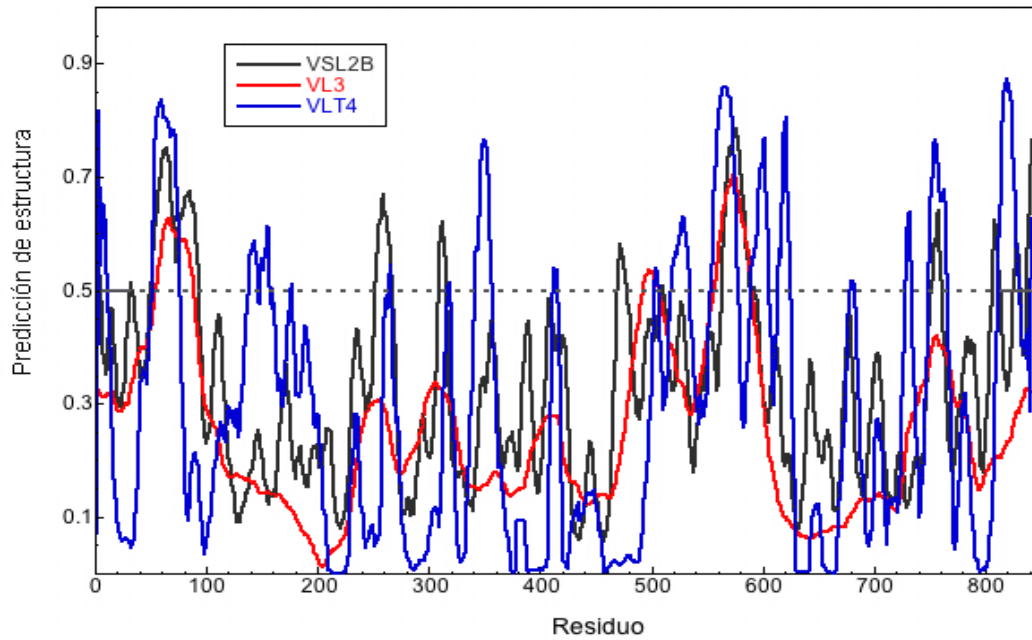
### 5.1.3 Regiones desestructuradas en la GTPasa EFL1

Durante la construcción del modelo de Efl1 observamos una región que se encuentra embebida en el dominio II, la cual, al incluirla en el modelo nos daba como resultado una región sin estructura. Esta región no pudo ser modelada por homología debido a que no existen homólogos estructurales. Interesantemente, esta zona corresponde con la secuencia de inserción no

presente en EF-2. Para comprobar que este sitio corresponde a una región desestructurada, realizamos un análisis predictivo utilizando diferentes servidores del programa PONDR® (<http://www.disprot.org/metapredictor.php>). Todos estos predictores realizan un análisis a partir de la secuencia primaria de la proteína y dan como resultado un valor de probabilidad para cada aminoácido, indicando si se encuentra estructurado ( $p < 0.5$ ) o desestructurado ( $p > 0.5$ ). En la Figura 12 podemos observar que EFL1 presenta cuatro regiones desestructuradas que son predichas por los cuatro programas usados. Cuatro regiones pequeñas que comprenden los residuos: 819 a 823, otra del 841 al 849, otra del 906 a 942, y del 1003 al 1032; y una región grande que comprende los residuos 413 - 575. Esta última corresponde a la secuencia de inserción ausente en EF-2 (Figura 13).



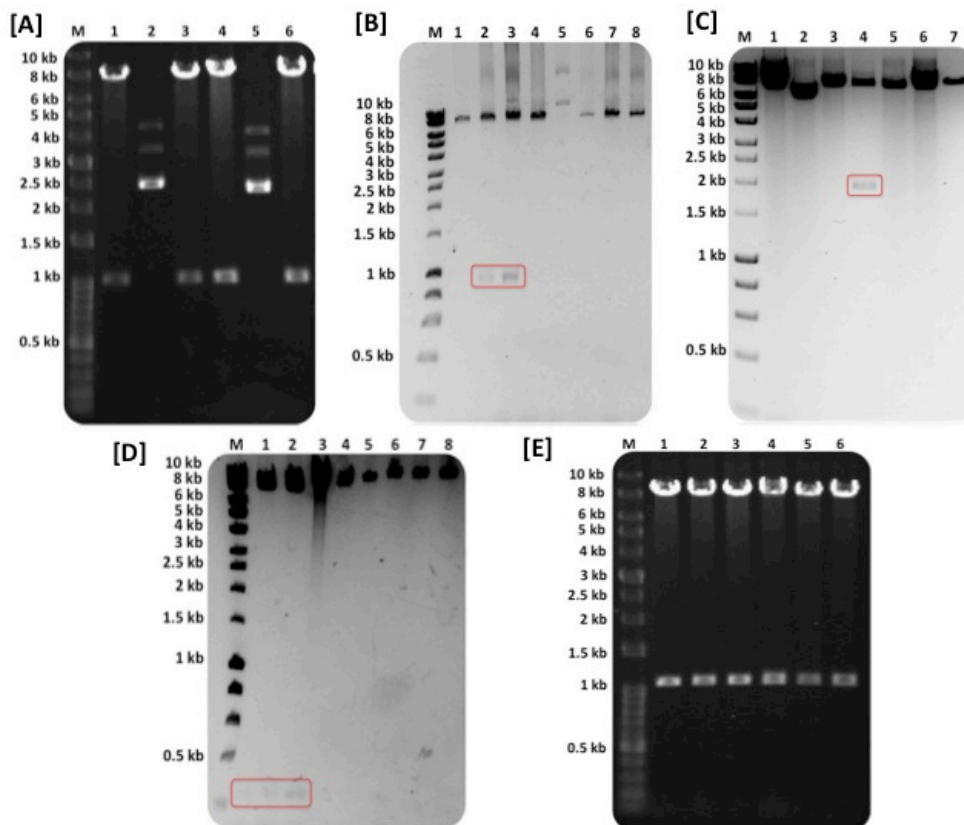
**Figura 12.** Predicción de regiones desestructuradas en Efl1. La región que comprende del residuo 400 al 600 corresponde a la secuencia de inserción no presente en EF-2 y muestra una alta probabilidad de encontrarse desestructurada.



**Figura 13.** Predicción de regiones desestructuradas en EF-2. Esta proteína presenta dos regiones desordenadas cercanas a los residuos 100 y 600. Ninguna de ellas corresponde a la secuencia de inserción observada en Efl1.

#### 5.1.4 Amplificación, restricción y clonación de la secuencia codificante de Efl1 y sus dominios estructurales

En la Figura 14 se muestran los patrones electroforéticos del DNA plásmidico después de ser restringido con *EcoRI* y *XhoI*. En todos los carriles observamos una banda cercana a 8 kb que corresponde al vector pACT2 abierto, y para cada construcción observamos los fragmentos de DNA que corresponden al dominio 1 (1083 pb, carril 2), dominio 2 (915 pb, carril 3), dominio 1-2 (1998 pb, carril 4), dominio 3 (225 pb, carril 5) y dominio 4-5 (1086 pb, carril 7); para las construcciones del dominio 5 (405 pb, carril 8) y de la secuencia completa de la proteína (3333 pb), observamos los mismos patrones (los resultados no se muestran). A partir de las clonas identificadas como portadoras de las construcciones de interés se procedió a extraer DNA plásmidico utilizando el *Kit Plasmid Mini-Prep*. Este kit se fundamenta en el mismo principio que el método de lisis alcalina pero se caracteriza por implementar el uso de una columna que permite obtener una mayor cantidad de DNA y con mayor pureza.



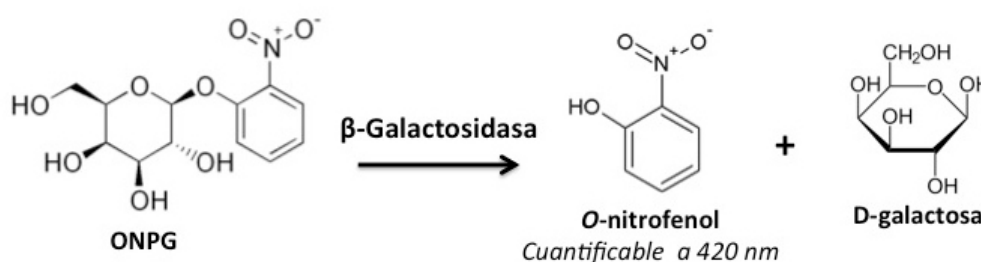
**Figura 14.** Patrones de restricción con *EcoRI* y *XhoI* de las construcciones de interés en el vector pACT2. Geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. **M:** marcador de peso molecular, **[A]:** pACT2-D1 clonas 1, 3, 4 y 6, positivas; **[B]:** pACT2-D2 clonas 2 y 3, positivas; **[C]:** pACT2-D1-D2, clona 4, positiva; **[D]:** pACT2-D3, clonas 1, 2 y 3, positivas; **[E]:** pACT2-D4-D5, clonas 1 a 6, positivas.

## 5.2 Ensayos de doble híbrido para evaluar la interacción entre Efl1 y Sdo1

Para investigar qué regiones median la interacción entre Efl1 y Sdo1, ambas proteínas, así como polipéptidos de sus diferentes dominios estructurales fueron expresados en levadura y se estudió su unión mediante ensayos de doble híbrido. En estos estudios empleamos como señuelo a la proteína Sdo1 completa y una proteína Sdo1 trunca que comprende a los dominio 2 - 3 (Sdo1 D2-D3), ambas fusionadas a un dominio de unión a DNA que reconoce la secuencia promotora LexA que a su vez controla la expresión del gen reportero  $\beta$ -galactosidasa. Ambos polipéptidos fueron ensayados contra Efl1 y contra los diferentes arreglos de sus dominios estructurales. Estos



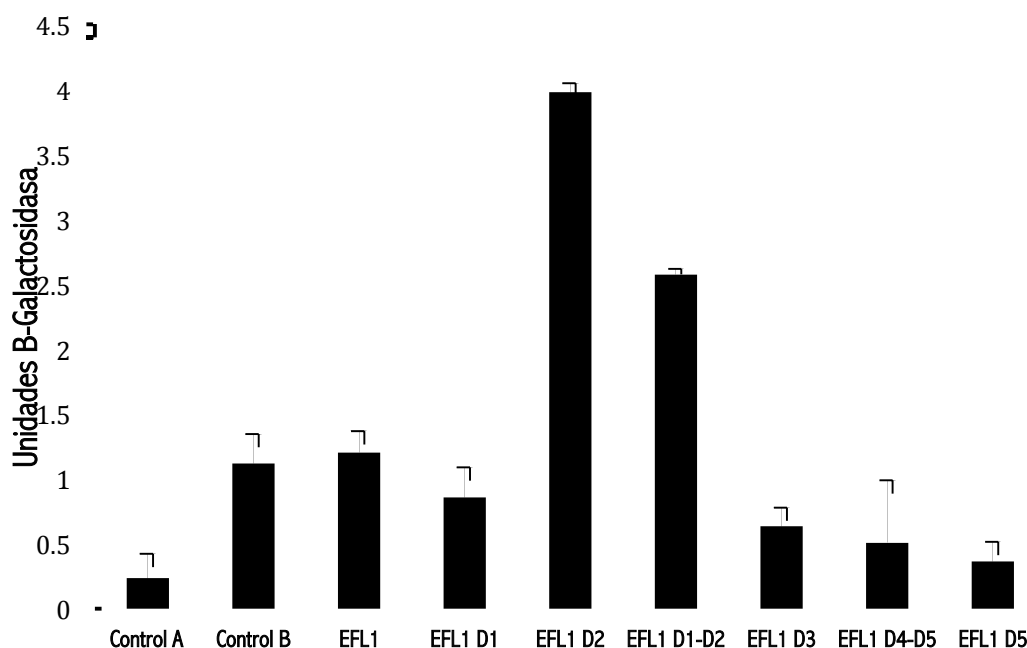
polipéptidos se fusionaron a un dominio de transactivación, de tal manera que al existir una interacción física entre ambas proteínas, este dominio es capaz de reclutar a la maquinaria de transcripción y expresar a la  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima actúa sobre el ONPG produciendo galactosa y o-nitrofenol (Figura 15), un compuesto soluble de color amarillo cuya absorbancia puede cuantificarse a una longitud de onda de 420 nm. La absorbancia obtenida permite calcular las unidades  $\beta$ -galactosidasa, ya que su valor se relaciona indirectamente con la interacción entre dos macromoléculas.



**Figura 15.** Hidrólisis de ONPG mediada por la  $\beta$ -galactosidasa. La  $\beta$ -galactosidasa escinde el ONPG en o-nitrofenol y galactosa. El o-nitrofenol es un compuesto amarillo, soluble en agua y que puede ser cuantificado a una longitud de onda de 420 nm.

Tanto la Figura 16 como la Figura 17 muestran los resultados de la interacción de Sdo1 y Sdo1 D2-D3 con los diferentes dominios de Efl1. Para ambos ensayos utilizamos como control a una levadura transformada con el pACT2 y el pEG202 vacíos (control A). Este control mostró la absorbancia producida por la hidrólisis en agua del ONPG, así como, la hidrólisis por la actividad promiscua de alguna enzima endógena de levadura. El segundo control (control B), fue utilizado en el ensayo donde se empleó a Sdo1 como señuelo (pEG202-Sdo1) y el vector pACT2 vacío con la finalidad de descartar la posible autoactivación de Sdo1 mediante su interacción inespecífica con otras proteínas del contexto celular (Figura 16). Se consideraron como verdaderas aquellas interacciones en las cuales el valor de las unidades  $\beta$ -galactosidasa se encontraron por encima de las del control B. De esta manera pudimos observar que el dominio 2 y los dominios 1-2 de Efl1, con

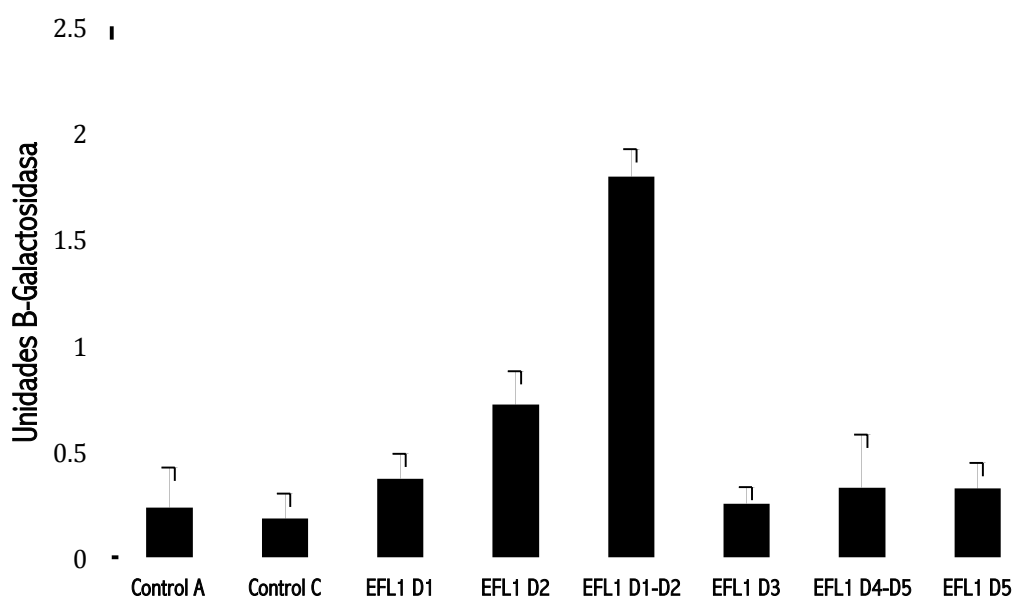
3.973 ± 0.071 y 2.57 ± 0.044 unidades de β-galactosidasa, respectivamente, presentan los valores más altos en el primer ensayo. Debido a que las unidades β-galactosidasa del dominio 1 están por de bajo del control B, concluimos que a pesar de existir una interacción con los dominios 1-2, este fenómeno es mediado por el dominio 2.



**Figura 16.** Ensayos de interacción mediante doble híbrido entre Sdo1 y los diferentes dominios de Efl1. Control A: control negativo; la levadura no expresa ninguna de las proteínas de interés; Control B: control negativo, la levadura sólo expresa a la proteína Sdo1. Efl1: proteína completa, Efl1 D1: Dominio I, Efl1 D2: dominio II, Efl1 D1-D2: dominios I a II, Efl1 D3: dominio III, Efl1 D4-5: dominio IV a V, Efl1 D5: dominio V.

En el segundo ensayo (Figura 17) utilizamos como señuelo a una proteína trunca de Sdo1 que comprende sólo a los dominios 2 y 3. El control C, que consistió en una levadura transformada con el vector pACT2 vacío y el pEG202-Sdo1 D2-D3, mostró que no hay autoactivación por parte de la proteína trunca Sdo1 D2-D3. Al igual que en el ensayo anterior, el dominio 2, así como el polipéptido que comprende los dominios 1 a 2 de Efl1 presentan los mayores valores de unidades β-galactosidasa, con  $0.7 \pm 0.16$  y  $1.8 \pm 0.13$ , respectivamente. Sin embargo, la mayor actividad se presentó entre los

dominios 1 a 2, y su valor es similar al obtenido en el primer ensayo. A partir de este estudio, notamos que el dominio 1 de Sdo1 no es necesario para la interacción entre ambas proteínas, pero posiblemente está involucrado en el aumento de la fuerza del fenómeno. A pesar de que se esperaba observar la mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa en el ensayo entre las proteínas Sdo1 y Efl1 completas (Figura 16), observamos que éste se encontraba muy cerca al valor del control B. Debido a que Efl1 es una proteína grande (1110 residuos), cabe la posibilidad que durante la interacción entre ambas proteínas, el gran tamaño de Efl1 resulte en un impedimento estérico que impida el reclutamiento de la maquinaria de transcripción por parte del dominio de activación fusionado en el N-terminal, y por lo tanto, el gen reportero no se expresó de manera eficiente.



**Figura 17** Ensayos de interacción mediante doble híbrido entre Sdo1 D2-D3 y los diferentes dominios de Efl1. Control A: control negativo; la levadura no expresa ninguna de las proteínas de interés; Control B: control negativo, la levadura sólo expresa a la proteína Sdo1 D2-D3. Efl1: proteína completa, Efl1 D1: Dominio I, Efl1 D2: dominio II, Efl1 D1-D2: dominios I a II, Efl1 D3: dominio III, Efl1 D4-5: dominio IV a V, Efl1 D5: dominio V.

## 6 Análisis de resultados

Las interacciones físicas entre proteínas son esenciales en el mantenimiento de diversos procesos celulares. Estas asociaciones dirigen la formación de complejos transitorios implicados en el reconocimiento, procesamiento y respuesta a señales externas, así como en el ensamblaje de máquinas proteicas implicadas en el mantenimiento, expresión y traducción de la información genética [24]. Los ribosomas pueden ser considerados como las máquinas celulares especializadas en la síntesis de proteínas. Su formación implica la participación de las tres RNA polimerasas, así como de 75 snoRNA y más de 200 proteínas accesorias involucradas en los eventos de maduración de las subunidades 60S y 40S [45,80]. Gracias al desarrollo de técnicas como la purificación por afinidad en tándem, y dada la oportunidad de acoplarla a la espectrometría de masas, así como a otros métodos experimentales que producen resultados más detallados, ha sido posible aislar diversos intermediarios de la biogénesis ribosomal, estudiar su composición y caracterizar diversas proteínas que sin formar parte del ribosoma, asisten su ensamblaje [81,82]. Aunque resta mucho por ser descifrado, los resultados de estos experimentos han hecho posible la construcción de mapas que describen a detalle el orden de eventos que presentan ambas subunidades ribosomales durante su maduración.

Actualmente, han sido los análisis bioquímicos en *S. cerevisiae*, los que han permitido establecer el papel que presentan algunas proteínas accesorias como Efl1 y Sdo1 durante el proceso de síntesis ribosomal. Ambas proteínas son requeridas para la liberación de Tif6 de la subunidad 60S, facilitando su ensamblaje con la subunidad menor y por tanto, la formación del ribosoma funcional [67–69]. El hecho de que mutaciones en Tif6 que disminuyen su afinidad por la partícula ribosomal 60S, supriman el defecto de crecimiento que presentan células de levadura *sdo1Δ Efl1Δ*, resulta ser una fuerte evidencia genética que propone a Tif6 como el principal blanco río arriba de Efl1 y Sdo1 [67–69]. En este trabajo, a partir de ensayos de doble híbrido, identificamos las regiones involucradas en la interacción entre Efl1 y Sdo1.

## **6.1 Estudio topológico de Efl1**

Debido a la alta identidad de secuencia que existe entre Efl1 y EF-2, se cree que presentan la misma distribución de dominios [68]. De acuerdo con nuestro modelo obtenido por homología, y a la comparación entre la secuencia primaria de ambas proteínas, nosotros establecimos que Efl1 se encuentra compuesta por cinco dominios estructurales (ver Figura 6). El primero de ellos, quien está implicado en la unión e hidrólisis de GTP, presenta la mayor conservación de residuos con EF-2 y comprende los primeros 365 residuos. Con respecto a la localización espacial de los dominios IV y V en nuestro modelo, notamos que el plegamiento del dominio IV (cian) podría ser asistido por el dominio V (morado); debido a esto, y con el fin de evitar comprometer el plegamiento del dominio IV, durante los ensayos de interacción en levadura, realizamos la expresión del dominio IV junto con dominio V; es decir no expresamos los dominios de forma independiente para no comprometer su plegamiento. El resto de los dominios fueron expresados de manera independiente.

Resulta interesante analizar el plegamiento teórico que presentan los dominios IV y V en nuestro modelo; cerca al dominio III se observa la formación de una bisagra que aísla a los dominios IV y V del resto de la estructura. Se ha propuesto que existe una relación entre el mecanismo por el cual EF-2 asiste el fenómeno de translocación en el proceso de traducción, y mediante el cual, Efl1 promueve la liberación de Tif6. Se ha sugerido que al igual que EF-2, Efl1 podría ser reclutada por el tallo ribosomal [60], y mediante un cambio conformacional (posiblemente el movimiento de los dominios IV y V) durante la hidrólisis de GTP, provoque un rearrreglo estructural de la subunidad 60S que promueva la disociación de Tif6 [70]. Para confirmar estas suposiciones será necesaria la realización de estudios de dinámica estructural.

## **6.2 Regiones implicadas en la interacción entre Efl1 y Sdo1**

### **6.2.1 Identificación de los sitios de interacción en Efl1**

Los ensayos de interacción mostraron que el dominio II, así como la expresión conjunta de los dominios I y II de Efl1 son los sitios que presentan

la mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Lo anterior a su vez, indica que estos son los dominios que intervienen en su interacción tanto con la proteína Sdo1 completa, como con la proteína que solo comprende los dominios 2 y 3 de la misma. Debido a que individualmente el dominio I de Efl1 es incapaz de interactuar con ambas versiones de la proteína Sdo1, pero la fuerza de la interacción aumenta cuando se encuentra unido al dominio II, es posible que esta región funcione como un sitio de interacción secundaria que se expone una vez que Sdo1 y Efl1 se han asociado a partir del dominio II. Dada la cercanía que presenta el dominio II con respecto al dominio I (sitio donde ocurre la hidrólisis de GTP), y la capacidad que tiene Sdo1 para abatir la afinidad que Efl1 presenta por el GDP [83], estas regiones están implicadas en la interacción entre ambas proteínas.

Por otro lado, dentro del dominio II de Efl1 existe una región de 160 aminoácidos que no está presente en la secuencia primaria de EF-2. A partir de un análisis predictivo con tres servidores de PONDR, se encontró que esta región tiene una alta probabilidad de encontrarse desestructurada. El fenómeno de proteínas o residuos desordenados ha sido observado extensivamente en la naturaleza. A pesar de que las regiones desestructuradas no tienen una forma tridimensional específica, están involucradas en diversos procesos biológicos, por ejemplo, señalización, regulación y reconocimiento [84]. De acuerdo con nuestros resultados, proponemos que esta región desordenada rige el reconocimiento específico de Efl1 por Sdo1. Muchas regiones desestructuradas sufren transiciones desorden-orden al interactuar con sus biomoléculas blanco, por lo que es posible que esta región adquiera estructura secundaria al interactuar con Sdo1.

El ensayo de doble híbrido para el resto de los dominios de Efl1 (III, IV y V) resultó negativo, lo que sugiere que estos dominios no participan en la interacción con Sdo1. Sin embargo, es importante aclarar que no se realizó ningún ensayo para comprobar la expresión de cada construcción. Por lo que un ensayo negativo en el doble híbrido también puede deberse al plegamiento incorrecto de estas regiones o su falta de expresión. Los

resultados globales del ensayo de doble híbrido demuestran que el dominio II de Efl1 es quien interactúa con Sdo1.

### **6.2.2 Identificación de los sitios de interacción en Sdo1**

Las primeras investigaciones a nivel estructural en esta familia de proteínas fueron realizadas en SBDS de *Archaeoglobus fulgidus*. Los resultados obtenidos mostraron que esta proteína se encuentra organizada en tres dominios estructurales [76]. Investigaciones posteriores, permitieron resolver la estructura tridimensional de SBDS en humano, mostrando que se organiza de la misma forma que en arquea [74,76]. En este trabajo, construimos un modelo estructural de Sdo1; el ortólogo de *S. cerevisiae* (Figura 7). A pesar de que se trata de un modelo teórico, de acuerdo a todos sus antecedentes evolutivos, es muy probable que Sdo1 se encuentre organizada de la misma manera que las proteínas SBDS de arquea y humano.

Para que una interacción ocurra en los ensayos de doble híbrido, y se vea reflejado en la actividad de un gen reportero, es necesario que ambas proteínas sean transportadas al núcleo. Sdo1 ha sido identificada en diferentes compartimentos celulares; se sabe que viaja unida a la partícula pre-60S desde el nucléolo hasta el citoplasma, en donde se encuentra en mayor proporción [77]. Debido a que una fracción de Sdo1 se encuentra de manera natural en el núcleo, no fue necesario adicionarle una señal de localización nuclear (SLN) encargada de transportarla al núcleo después de su traducción. Por ello es que se usó para su expresión el vector pEG202. Por el contrario, Efl1 se localiza en citoplasma [68], por lo cual se clonó en el vector pACT2 en el que se fusiona con una SLN en su N-terminal que le permite ser exportada al núcleo.

Los resultados en los ensayos de interacción mostraron que Sdo1 es capaz de interactuar con Efl1 aún sin el dominio 1, indicando que son los dominios 2 y 3, quienes están implicados en la interacción con la GTPasa. Es importante notar que la actividad de la galactosidasa disminuyó en el ensayo de interacción de Sdo1 D2-D3 y Efl1 D2 (Figura 16 y Figura 17). Esto lo explicamos de dos maneras alternativas: (i) el dominio 1 de Efl1 es importante para que el dominio 2 adquiera una conformación favorable para

la unión, tal que su ausencia impacta en su interacción con Efl1 o (ii) el dominio 1 de Sdo1 es una región de interacción secundaria que se expone después de la interacción con el dominio 2 y que refuerza esta asociación mediante un cambio conformacional inducido. Experimentos de RMN en SBDS de mamífero han demostrado que el dominio I presenta una gran flexibilidad con respecto a los dominios II y III, y que su plegamiento es independiente al resto de su estructura [79]. Además, podemos afirmar, por resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo, que la proteína trunca Sdo1 D2-D3 se expresa eficientemente y no tiene defectos en su plegamiento. Lo anterior refuerza la idea de que la ausencia del dominio 1 en Sdo1 no impacta en el plegamiento del resto de la proteína, por lo que es posible descartar la primera opción expuesta anteriormente. Así, a pesar de la evidencia en la literatura sugiere que el papel principal de este dominio es la unión al ribosoma, nuestros resultados indican que también es necesario para la interacción con Efl1.

Para no comprometer el plegamiento de los dominios 2 y 3 de Sdo1, se evitó expresarlos de manera independiente. Esto limitó conocer el papel individual, que presenta cada dominio en la interacción con Efl1. Se ha establecido que los dominios 1 y 2 de Sdo1 son esenciales para la función, mientras que el dominio 3 es dispensable [71,76]. Además, se ha determinado que el dominio 1 está implicado en la interacción con rRNA, lo que indicaría que funge como el sitio de unión al ribosoma [75]. Por otro lado, el dominio 2 ha sido caracterizado como la región de la proteína que le otorga la especificidad de especie [71] indicando que este sitio es quien se encuentra involucrado en la interacción con Efl1.

Para finalizar, resulta interesante notar que Sdo1 fue capaz de autoactivar la expresión del gen de la  $\beta$ -galactosidasa durante los ensayos de doble híbrido. Además de la biogénesis ribosomal, esta familia de proteínas ha sido relacionada con diversos procesos celulares, como el mantenimiento del huso mitótico y la reparación de ADN, entre otros [85]. Por lo cual, cabe la posibilidad de que Sdo1 interactúe con proteínas relacionadas con la expresión génica en el núcleo.



### **6.3 Implicaciones clínicas del estudio de los ribosomas y las proteínas involucradas en su ensamble**

Se conocen como ribosomopatías a todas aquellas enfermedades que tienen su etiología en la desregulación del proceso de biogénesis ribosomal. [73]. Ejemplos de estas enfermedades son la anemia de Diamond-Blackfan, la Disqueratosis congénita, la Hipoplasia de Cartílago Piloso, el síndrome de Teacher Collins, la enfermedad del cromosoma 5 y el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond. Todas estas enfermedades presentan rasgos similares, sin embargo, son clínicamente distintas y por tanto, requieren de diferentes intervenciones terapéuticas [72]. Tratando de dar una explicación a este fenómeno, los investigadores actuales han llegado a proponer que existe una posibilidad de que los ribosomas presenten una composición distinta dependiendo del tipo celular en el que se encuentren.

SDS es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por disfunción pancreática exocrina, anormalidades esqueléticas, falla en la médula ósea con neutropenia y poco crecimiento, además de que los pacientes con este síndrome presentan una alta predisposición a desarrollar leucemia [86–89]. Se ha determinado que cerca del 90% de los pacientes presenta mutaciones en el gen que codifica para SBDS [89]. La mayoría de estas mutaciones ocurren en los dominios 1 y 2, lo que posiblemente podría afectar su asociación con el ribosoma y la interacción con Efl1 durante el proceso de biogénesis ribosomal. Actualmente, se sabe que SBDS participa junto con Efl1 durante el proceso de maduración de la subunidad mayor. Con esta información podría proponerse la búsqueda de mutaciones en Efl1 en el 10% de los pacientes en donde SBDS se encuentra intacta, proponiendo así una nueva prueba diagnóstica. Es importante reconocer la necesidad de obtener información a nivel biofísico y molecular del evento catalizado por Efl1 y Sdo1, tanto en condiciones nativas, como en patológicas. Los resultados de estos estudios podrían mostrar el impacto que tienen las mutaciones sobre la estructura y función de ambas proteínas, y además, podría ayudar al desarrollo de nuevos tratamientos y aportar información importante para comprender una de las vías más importantes para la viabilidad celular.

## 7 Conclusiones

- Efl1 está organizada en cinco dominios estructurales, pero en comparación con su homóloga EF-2, tiene una inserción de aproximadamente 160 residuos en el dominio II.
- El dominio II de Efl1 contiene o incluye una región con una alta probabilidad de encontrarse desestructurada. De acuerdo a su longitud y función definida por nuestros resultados, podría constituir un dominio independiente.
- Efl1 interactúa con Sdo1 a partir del dominio II y nuestros resultados sugieren que el dominio I actúa como un sitio de interacción secundaria.
- El dominio 1 de Sdo1 no es necesario para dirigir la interacción con Efl1, pero nuestros resultados demuestran que presenta el papel de un sitio de interacción secundario encargado de reforzar la interacción entre ambas proteínas.
- Los dominios 2 y 3 de Sdo1 son los encargados de dirigir la interacción con Efl1. De acuerdo a los resultados obtenidos por otros grupos de investigación en donde se ha observado que la función de Sdo1 no depende del dominio 3, inferimos que el dominio 2 es el sitio principal encargado en la dirección del fenómeno.

## 8 Bibliografía

- [1] Andreani J, Guerois R. Evolution of protein interactions: From interactomes to interfaces. *Arch Biochem Biophys* 2014;554:65–75. doi:10.1016/j.abb.2014.05.010.
- [2] Cusick ME, Klitgord N, Vidal M, Hill DE. Interactome: Gateway into systems biology. *Hum Mol Genet* 2005;14. doi:10.1093/hmg/ddi335.
- [3] Lander ES. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860–921. doi:10.1038/35057062.
- [4] Venter JC. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304–51. doi:10.1126/science.1058040.
- [5] Mailman MD, Feolo M, Jin Y, Kimura M, Tryka K, Bagoutdinov R, *et al.* The NCBI dbGaP database of genotypes and phenotypes. *Nat Genet* 2007;39:1181–6. doi:10.1038/ng1007-1181.
- [6] Shendure J. Next-generation human genetics. *Genome Biol* 2011;12:408. doi:10.1186/gb-2011-12-9-408.
- [7] Lage K, Karlberg EO, Størling ZM, Olason PI, Pedersen AG, Rigina O, *et al.* A human phenome-interactome network of protein complexes implicated in genetic disorders. *Nat Biotechnol* 2007;25:309–16. doi:10.1038/nbt1295.
- [8] Lage K, Hansen NT, Karlberg EO, Eklund AC, Roque FS, Donahoe PK, *et al.* A large-scale analysis of tissue-specific pathology and gene expression of human disease genes and complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20870–5. doi:10.1073/pnas.0810772105.
- [9] Lage K. Protein-protein interactions and genetic diseases: The interactome. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2014. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.028.
- [10] Chen W, Zhang SW, Cheng YM, Pan Q. Prediction of protein-protein interaction types using the decision templates based on multiple classifier fusion. *Math Comput Model* 2010;52:2075–84. doi:10.1016/j.mcm.2010.01.025.
- [11] Nooren IMA, Thornton JM. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 2003;22:3486–92. doi:10.1093/emboj/cdg359.
- [12] Shoemaker B a, Panchenko AR. Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. *PLoS Comput Biol* 2007;3:e42. doi:10.1371/journal.pcbi.0030042.
- [13] Ozbabacan SEA, Engin HB, Gursoy A, Keskin O. Transient protein-protein interactions. *Protein Eng Des Sel* 2011;24:635–48. doi:10.1093/protein/gzr025.

- [14] Yu X, Wang C, Li Y. Classification of protein quaternary structure by functional domain composition. *BMC Bioinformatics* 2006;7:187. doi:10.1186/1471-2105-7-187.
- [15] Janin J, Bahadur RP, Chakrabarti P. Protein-protein interaction and quaternary structure. *Q Rev Biophys* 2008;41:133–80. doi:10.1017/S0033583508004708.
- [16] Block P, Paern J, Hüllermeier E, Sanschagrín P, Sotriffer CA, Klebe G. Physicochemical descriptors to discriminate protein-protein interactions in permanent and transient complexes selected by means of machine learning algorithms. *Proteins Struct Funct Genet* 2006;65:607–22. doi:10.1002/prot.21104.
- [17] Mintseris J, Weng Z. Atomic contact vectors in protein-protein recognition. *Proteins Struct Funct Genet* 2003;53:629–39. doi:10.1002/prot.10432.
- [18] Nyfeler B, Michnick SW, Hauri H-P. Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6350–5. doi:10.1073/pnas.0501976102.
- [19] Van Criekinge W, Beyaert R. Yeast two-hybrid: state of the art. *Biol Proced Online* 1999;2:1–38. doi:10.1251/bpo16.
- [20] Witzmann FA, Grant RA. Pharmacoproteomics in drug development. *Pharmacogenomics J* 2003;3:69–76. doi:10.1038/sj.tpj.6500164.
- [21] Hall DA, Ptacek J, Snyder M. Protein microarray technology. *Mech Ageing Dev* 2007;128:161–7. doi:10.1016/j.mad.2006.11.021.
- [22] Hall DA, Zhu H, Zhu X, Royce T, Gerstein M, Snyder M. Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* 2004;306:482–4. doi:10.1126/science.1096773.
- [23] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, *et al.* Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001;293:2101–5. doi:10.1126/science.1062191.
- [24] Westermarck J, Ivaska J, Corthals GL. Identification of protein interactions involved in cellular signaling. *Mol Cell Proteomics* 2013;12:1752–63. doi:10.1074/mcp.R113.027771.
- [25] Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, *et al.* The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 2001;24:218–29. doi:10.1006/meth.2001.1183.
- [26] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 1999;17:1030–2. doi:10.1038/13732.
- [27] Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 1995;59:94–123.

- [28] Hieter P, Mann C, Snyder M, Davis RW. Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* 1985;40:381–92.
- [29] Koshland D, Kent JC, Hartwell LH. Genetic analysis of the mitotic transmission of minichromosomes. *Cell* 1985;40:393–403. doi:10.1016/0092-8674(85)90153-9.
- [30] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245–6. doi:10.1038/340245a0.
- [31] Ferro E, Trabalzini L. The yeast two-hybrid and related methods as powerful tools to study plant cell signalling. *Plant Mol Biol* 2013;83:287–301. doi:10.1007/s11103-013-0094-4.
- [32] Hope IA, Struhl K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 1986;46:885–94. doi:10.1016/0092-8674(86)90070-X.
- [33] Keegan L, Gill G, Ptashne M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 1986;231:699–704. doi:10.1126/science.3080805.
- [34] Stephens DJ, Banting G. The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking. *Traffic* 2000;1:763–8. doi:tra011003 [pii].
- [35] Fashena SJ, Serebriiskii I, Golemis EA. The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: How to outwit different preys with different baits. *Gene* 2000;250:1–14. doi:10.1016/S0378-1119(00)00182-7.
- [36] Causier B. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2004;23:350–67. doi:10.1002/mas.10080.
- [37] Auerbach D, Thaminy S, Hottiger MO, Stagljar I. The post-genomic era of interactive proteomics: Facts and perspectives. *Proteomics*, vol. 2, 2002, p. 611–23. doi:10.1002/1615-9861(200206)2:6<611::AID-PROT611>3.0.CO;2-Y.
- [38] De Las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: Key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol* 2010;6:1–8. doi:10.1371/journal.pcbi.1000807.
- [39] Vidalain PO, Boxem M, Ge H, Li S, Vidal M. Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* 2004;32:363–70. doi:10.1016/j.ymeth.2003.10.001.
- [40] Fields S. High-throughput two-hybrid analysis: The promise and the peril. *FEBS J.*, vol. 272, 2005, p. 5391–9. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04973.x.
- [41] Deeds EJ, Ashenberg O, Shakhnovich EI. A simple physical model for scaling in protein-protein interaction networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:311–6. doi:10.1073/pnas.0509715102.

- [42] Martin S, Brown WM, Faulon JL. Using product kernels to predict protein interactions. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2008;110:215–45. doi:10.1007/10\_2007\_084.
- [43] Yan Y. Analysis of protein interactions using fluorescence technologies. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:635–40. doi:10.1016/j.cbpa.2003.08.017.
- [44] Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 2003;300:445–52. doi:10.1126/science.1083653.
- [45] Panse VG, Johnson AW. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci* 2010;35:260–6. doi:10.1016/j.tibs.2010.01.001.
- [46] Woolford JL, Baserga SJ. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2013;195:643–81. doi:10.1534/genetics.113.153197.
- [47] French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M, Beyer AL. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* 2003;23:1558–68. doi:10.1128/MCB.23.5.1558-1568.2003.
- [48] Koš M, Tollervey D. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell* 2010;37:809–20. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.024.
- [49] Decatur WA, Fournier MJ. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 2002;27:344–51. doi:10.1016/S0968-0004(02)02109-6.
- [50] Baxter-Roshek JL, Petrov AN, Dinman JD. Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PLoS One* 2007;2. doi:10.1371/journal.pone.0000174.
- [51] Liang X h., Liu Q, Fournier MJ. rRNA Modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Mol Cell* 2007;28:965–77. doi:10.1016/j.molcel.2007.10.012.
- [52] Jack K, Bellodi C, Landry DM, Niederer RO, Meskauskas A, Musalgaonkar S, et al. RRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol Cell* 2011;44:660–6. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.017.
- [53] Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 1999;24:437–40. doi:10.1016/S0968-0004(99)01460-7.
- [54] Trapman J, Retèl J, Planta RJ. Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp Cell Res* 1975;90:95–104. doi:10.1016/0014-4827(75)90361-4.
- [55] Nissan TA, Baßler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* 2002;21:5539–47. doi:10.1093/emboj/cdf547.

- [56] Fatica A, Cronshaw AD, Dlaki M, Tollervey D. Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* 2002;9:341–51. doi:10.1016/S1097-2765(02)00458-6.
- [57] Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, Horsey E, Miles T, Roman J, Rout M, *et al.* Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* 2001;8:505–15. doi:10.1016/S1097-2765(01)00344-6.
- [58] Saveanu C, Bienvenu D, Namane A, Gleizes PE, Gas N, Jacquier A, *et al.* Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J* 2001;20:6475–84. doi:10.1093/emboj/20.22.6475.
- [59] Tschochner H, Hurt E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 2003;13:255–63. doi:10.1016/S0962-8924(03)00054-0.
- [60] Lo KY, Li Z, Bussiere C, Bresson S, Marcotte EM, Johnson AW. Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell* 2010;39:196–208. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.018.
- [61] Hurt E, Hannus S, Schmelzl B, Lau D, Tollervey D, Simos G. A novel *in vivo* assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in Ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol* 1999;144:389–401. doi:10.1083/jcb.144.3.389.
- [62] De la Cruz J, Kressler D, Rojo M, Tollervey D, Linder P. Spb4p, an essential putative RNA helicase, is required for a late step in the assembly of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 1998;4:1268–81. doi:10.1017/S1355838298981158.
- [63] Vaňáčová Š, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, *et al.* A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* 2005;3:0986–97. doi:10.1371/journal.pbio.0030189.
- [64] LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, *et al.* RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 2005;121:713–24. doi:10.1016/j.cell.2005.04.029.
- [65] Rodríguez-Mateos M, García-Gómez JJ, Francisco-Velilla R, Remacha M, De la Cruz J, Ballesta JPG. Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2009;37:7519–32. doi:10.1093/nar/gkp806.
- [66] Gartmann M, Blau M, Armache JP, Mielke T, Topf M, Beckmann R. Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* 2010;285:14848–51. doi:10.1074/jbc.C109.096057.
- [67] Bécam a. M, Nasr F, Racki W, Zagulski M, Herbert C. Ria1p (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 2001;266:454–62. doi:10.1007/s004380100548.

- [68] Senger B, Lafontaine DL, Graindorge JS, Gadal O, Camasses a, Sanni a, *et al.* The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell* 2001;8:1363–73.
- [69] Menne TF, Goyenechea B, Sánchez-Puig N, Wong CC, Tonkin LM, Ancliff PJ, *et al.* The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* 2007;39:486–95. doi:10.1038/ng1994.
- [70] Bussiere C, Hashem Y, Arora S, Frank J, Johnson AW. Integrity of the P-site is probed during maturation of the 60S ribosomal subunit. *J Cell Biol* 2012;197:747–59. doi:10.1083/jcb.201112131.
- [71] Boocock GRB, Marit MR, Rommens JM. Phylogeny, sequence conservation, and functional complementation of the SBDS protein family. *Genomics* 2006;87:758–71. doi:10.1016/j.ygeno.2006.01.010.
- [72] Kathleen L. McCann and Susan J. Baserga, Ribosomopathies M. NIH Public Access 2014;341:849–50. doi:10.1126/science.1244156.Mysterious.
- [73] Khanna-Gupta A, Bone Marrow Failure Syndromes: The Ribosomopathies. NIH Public Access. *J Bone Marrow Res* 2013;1:1–5. doi:10.4172/jbmr.1000106.Bone.
- [74] De Oliveira JF, Sforça ML, Blumenschein TMA, Goldfeder MB, Guimarães BG, Oliveira CC, *et al.* Structure, dynamics, and rna interaction analysis of the human sbds protein. *J Mol Biol* 2010;396:1053–69. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.039.
- [75] Savchenko A, Krogan N, Cort JR, Evdokimova E, Lew JM, Yee A a, *et al.* The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *J Biol Chem* 2005;280:19213–20. doi:10.1074/jbc.M414421200.
- [76] Shamma C, Menne TF, Hilcenko C, Michell SR, Goyenechea B, Boocock GRB, *et al.* Structural and mutational analysis of the SBDS protein family: Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *J Biol Chem* 2005;280:19221–9. doi:10.1074/jbc.M414656200.
- [77] Luz JS, Georg RC, Gomes CH, Machado-Santelli GM, Oliveira CC. Sdo1p, the yeast orthologue of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein, binds RNA and interacts with nuclear rRNA-processing factors. *Yeast* 2009;26:287–98. doi:10.1002/yea.1668.
- [78] Asano N, Atsumi H, Nakamura A, Tanaka Y, Tanaka I, Yao M. Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:1251–6. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.143.
- [79] Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, Drynan LF, Goyenechea B, Menne TF, *et al.* Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev* 2011;25:917–29. doi:10.1101/gad.623011.



- [80] Henras a K, Soudet J, G erus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mougin A., et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2334–59. doi:10.1007/s00018-008-8027-0.
- [81] Tschochner H, Hurt E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 2003;13:255–63. doi:10.1016/S0962-8924(03)00054-0.
- [82] Zemp I, Kutay U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett* 2007;581:2783–93. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.013.
- [83] Gijsbers A, García-Márquez A, Luviano A, Sánchez-Puig N. Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;437:349–54. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.077.
- [84] Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker a K, Uversky VN. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:996–1010. doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.011.
- [85] Ball HL, Zhang B, Riches JJ, Gandhi R, Li J, Rommens JM, et al. Shwachman-Bodian Diamond syndrome is a multi-functional protein implicated in cellular stress responses. *Hum Mol Genet* 2009;18:3684–95. doi:10.1093/hmg/ddp316.
- [86] Ginzberg H, Shin J, Ellis L, Goobie S, Morrison J, Corey M, et al. Segregation analysis in Shwachman-Diamond syndrome: evidence for recessive inheritance. *Am J Hum Genet* 2000;66:1413–6. doi:10.1086/302856.
- [87] Mäkitie O, Ellis L, Durie PR, Morrison JA, Sochett EB, Rommens JM, et al. Skeletal phenotype in patients with Schwachman-Diamond syndrome and mutations in SBDS. *Clin Genet* 2004;65:101–12. doi:10.1111/j.0009-9163.2004.00198.x.
- [88] Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome: An inherited preleukemic bone marrow failure disorder with aberrant hematopoietic progenitors and faulty marrow microenvironment. *Blood* 1999;94:3048–54.
- [89] Boocock GRB, Morrison J a, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003;33:97–101. doi:10.1038/ng1062.

## 9 Apéndices

**Apéndice 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de Efl1 y sus diferentes dominios.

Nombre	Secuencia 5' - 3'
EFL1-10	CGGAATTCATGCCTAGAGTGGAATCGG
EFL1-13a	CGGAATTCCTAGAGTGGAATCGGAGACTTACAAACGTCTGC
EFL1-133	CCGCTCGAGTTATAATTTTTCAATAACTGTTAACAATAC
EFL1-134a	CGGAATTCCTTCACCTTTGGAATCACAAACCGATC
EFL1-135	CCGCTCGAGTTAGACGCCCGCTAGATTGACGCCTTG
EFL1-136a	CGGAATTCTCGTCAATTTCCATTTTACGCCAATCGTTC
EFL1-137	CCGCTCGAGTTAATGTGTAATTTCTATTCCTGC
EFL1-138a	CATGCCATGGAACCGGCTATTCCATATAGGGAAAC
EFL1-140	CCGCTCGAGCAATTTACTCATGTGATATTCAAACC

**Apéndice 2.** Composición de los medios para el cultivo de bacteria.

Medio de cultivo	Componentes
Luria Bertani (LB)	NaCl 1%, Extracto de levadura 0.5 %, Triptona 1 %, pH 7.5 Agar (placas) 1.5 %.
LB-ampicilina	NaCl 1%, Extracto de levadura 0.5 %, Triptona 1 %, ampicilina 100 µg/mL, pH 7.5. Agar (placas) 1.5 %.

**Apéndice 3.** Composición de los medios para el cultivo de levadura.

Medio de cultivo	Componentes
YPED	Extracto de levadura 1.1 %, Peptona 2.2 %, Sulfato de adenina 0.006 %, Glucosa 2 %.
YM1 –LEU – HIS	Base nitrogenada de levadura 0.8 %, Sulfato de adenina 0.006 %, L-tirosina 0.006 %, Uracilo 0.006 %, Glucosa 2 %, Dropout –LEU –HIS 1X. Agar (placas) 1.5 %.
Dropout 100X –LEU -HIS	Arginina 0.2 %, isoleucina 0.6 %, lisina 0.4 %, metionina 0.1 %, fenilalanina 0.6 %, 0.5 %, treonina 0.5 %, triptófano 0.4 %

**Apéndice 4.** Composición de las soluciones utilizadas para la purificación de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina.

Solución	Composición
S1	50 mM Glucosa, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA pH 8, RNAsa 10 mg/mL
S2	0.2 M NaOH, 1% SDS
S3	Acetato de potasio 5M pH 4.8

**Apéndice 5.** Composición de las soluciones utilizadas para la preparación de células de levadura competentes y su transformación.

Solución	Composición
LiCl 1M	Pesar 42.2 g de LiCl y aforar con agua hasta 1L.
TE 10X	Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM pH 8.0. Esterilizar
PEG 4000 50 % p/v	25 g de PEG y aforar a 50 mL con H <sub>2</sub> O desionizada. Esterilizar.
CY	TE 1X, LiCl 100 mM, en agua.
TY	TE 1X, LiCl 100 mM, en PEG 4000 50 % p/v.

**Apéndice 6.** Composición de las soluciones utilizadas para el ensayo de doble híbrido.

Solución	Composición
<i>Buffer Z</i>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 16.1 g/L, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 5.5 g/L, KCl 0.75g/L, MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0.246 g/L, pH 7.0
<i>Buffer Z</i> /β-mercaptoetanol	100 mL del buffer Z más 0.27 mL de β-mercaptoetanol concentrado.
O-nitrofenil-β-galactosido (ONPG)	4 mg de ONPG por mL de buffer Z, pH 7.0

**Apéndice 7.** Genotipos relevantes de las cepas empleadas.

- ***Escherichia coli* DH5α:** F<sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1
- ***Saccharomyces cerevisiae* CTY10-5d:** MATa ade2 trp1-901 leu2-3,112 his3-200 gal4 URA3::lexA-lacZ (R. Sternglanz).