



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA EFTUD1 CON LOS
DOMINIOS DE SBDS A TRAVÉS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. DIANA CAROLINA MONTAGUT GUEVARA

Dra. NURIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE BIOMACROMOLÉCULAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. SEPTIEMBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA EFTUD1 CON
LOS DOMINIOS DE SBDS A TRAVÉS DE ANISOTROPÍA DE
FLUORESCENCIA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. DIANA CAROLINA MONTAGUT GUEVARA



CDMX, SEPTIEMBRE DE 2017

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Ernesto Carrillo Nava	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Takuya Nishigaki Shimizu	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Carmina Montiel Pacheco	Facultad de Química, UNAM

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio 7 del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dra. Nuria Sánchez Puig, con el apoyo económico otorgado por el PAPIIT proyecto IN201615.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al PAPIIT proyecto IN201615 “Estudios de complementación funcional en la familia de proteínas EFL1/SBDS involucradas en la maduración ribosomal” por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría (Número de becario 594945).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir al XXXI Congreso Nacional de Bioquímica, Aguascalientes, 2016.

A los técnicos académicos del Instituto de Química, UNAM

Dra. Patricia Cano Sánchez, Q. Eréndira García Ríos y M. en C. Lucero Ríos Ruiz.

A la Dra. Nuria Sánchez y todos los integrantes del laboratorio 7 de Bioquímica del departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química.

ABREVIATURAS

GSF	Del inglés Guanine Stabilizing Factor
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
LB	Medio Luria-Bertani
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, PCR del inglés polymerase chain reaction
PSA	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
SBDS	Proteína mutada en el Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond
Sdo1	Ortólogo en levadura de la proteína SBDS
SD-URA	Medio Synthetic Drop-out sin uracilo
SSD	Síndrome Shwachman-Diamond / Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond
SDS	Dodecilsulfato de sodio, SDS del inglés sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante de proteínas en gel de poliacrilamida
5q-	Enfermedad por la pérdida del brazo largo del cromosoma 5
RNP	Ribonucleoproteínas
S	Unidades Svedberg
RNPsn	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares
TEMED	Tetrametilendiamina
NTS	Espaciador no transcrito, NTS del inglés non transcribed spacer
ITS	Espaciadores transcritos externos, ITS del inglés internal transcribed spacer
ETS	Espaciadores transcritos internos, ETS del inglés external transcribed spacer
EFL1	Proteína tipo Factor de elongación 1, EFL1 del inglés elongation factor-like 1
EFTUD1	Proteína tipo Factor de elongación Tu 1, EFTUD1 del inglés elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein isoform 1
DC	Dicroísmo circular
SAXS	Dispersión de rayos X en ángulo bajo
dH₂O	Agua destilada

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	1
INDICE DE FIGURAS	1
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 El ribosoma.....	1
1.2 Biogénesis ribosomal.....	2
1.3 Ribosomopatías y el Síndrome de Shwachman-Diamond (SSD).....	5
1.4 Fundamentos de difracción circular.....	8
1.5 Principios del funcionamiento de dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS)	9
1.6 Interacciones proteína-proteína	10
1.7 Anisotropía de fluorescencia	11
1.8 Cooperatividad.....	16
2 ANTECEDENTES.....	21
3 HIPÓTESIS.....	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5 ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	27
6 MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Reactivos químicos.....	28
6.2 Medios de cultivo	28
6.3 Microorganismos	28
6.4 Soluciones y amortiguadores de pH	29
6.5 Plásmidos.....	30
6.5.1 Vector pRS426-EFTUD1	30
6.5.2 Vector pRSET-SBDS FLaSH	30
6.6 Oligonucleótidos.....	30
6.7 Transformación de células bacterianas.....	31
6.8 Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	31
6.9 Restricción de ADN.....	31
6.10 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	32
6.11 Expresión de la proteína EFTUD1	32

6.12	Expresión de la proteína SBDS-FlAsH y sus diferentes dominios	32
6.13	Purificación de la proteína EFTUD1	33
6.14	Purificación de la proteína SBDS-FlAsH y sus diferentes dominios	34
6.15	Electroforesis de proteína en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)...	34
6.16	Espectrometría de masas.....	35
6.17	Cuantificación de la concentración de proteínas	35
6.18	Dicroísmo circular (CD).....	36
6.19	Ensayos de anisotropía de fluorescencia	37
6.19.1	Marcaje con el reactivo Lumio Green.....	37
6.19.2	Experimentos de anisotropía de fluorescencia	38
6.19.3	Análisis de datos.....	38
7	RESULTADOS.....	40
7.1	Amplificación por PCR de la secuencia codificante de los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 de SBDS 40	
7.2	Restricción de la secuencia codificante de los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 de SBDS	40
7.3	Purificación de los dominios de la proteína SBDS.....	41
7.4	Purificación de la proteína EFTUD1	44
7.5	Caracterización estructural	45
7.5.1	Dicroísmo circular.....	45
7.6	Ensayos de anisotropía de fluorescencia	49
7.7	SAXS: Dispersión de rayos X a ángulo bajo.....	53
8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
9	CONCLUSIONES	59
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	60
	ANEXO A	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Constantes de disociación de la interacción entre EFTUD1 y mutantes no-sinónimas (aquellas que produce una alteración en el polipéptido codificado) en la proteína SBDS descritas en pacientes con el Síndrome de Shwachman-Diamond.....	23
Tabla 2. Componentes de los diferentes medios de cultivo usados durante el proyecto.....	28
Tabla 3. Composición de los reguladores de pH y diferentes amortiguadores usados durante el proyecto.....	29
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este proyecto.....	30
Tabla 5. Coeficientes de extinción molar de los diferentes dominios de SBDS y de la proteína EFTUD1.....	36
Tabla 6. Modelos de unión para la interacción proteína-ligando.....	39
Tabla 7. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de los diferentes dominios de SBDS-FIAsH.....	48
Tabla 8. Comparación de contenido de estructura secundaria entre los valores obtenidos del espectro de DC (deconvolución) entre los calculados a partir de la estructura conocida de la proteína.....	56
Tabla 9. Constantes de disociación de la interacción entre EFTUD1 y los diferentes dominios de SBDS. Los dominios 1, 2 y 2+3 se ajustan al modelo de unión de un solo sitio, por lo que no presentanda valores de K_{d2}	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición esquematizada del ribosoma y su conformación general.	1
Figura 2. Procesamiento del pre-rARN 35S. Una sola unidad repetida es transcrita por la ARN polimerasa I (ARN pol I) para sintetizar el transcripto de ARN primario 35S que será procesado para generar los ARNr 18S, 5.8S y 25S, mientras la ARN polimerasa III (ARN pol III) sintetiza el ARNr 5S (imagen modificada de Woolford 2013) [20].....	3
Figura 3. Diagrama del proceso de biogénesis ribosomal. El procesamiento de partícula pre-90S da lugar a las subunidades pre-60S y pre-40S que llevan procesos de maduración independientes que finalizan en el citoplasma. Las partículas son transportadas desde el nucléolo al nucleoplasma, y posteriormente exportadas al citoplasma, en donde sufren las últimas modificaciones para su maduración y se ensamblan para formar la partícula funcional 80S [17].	4
Figura 4. Modelo de liberación de eIF6 (Tif6) por las proteínas EFL1 y SBDS. Las proteínas SBDS y EFL1 se unen al ribosoma, donde la actividad GTPasa de EFL1 está acoplada a la proteína SBDS y a partir de la fuerza de hidrólisis de GTP se libera al factor de anti-asociación Tif6 de la superficie de la subunidad 60S. Actualmente se cree que la pérdida de interacción entre estas proteínas debido a mutaciones en SBDS (que producen SSD), impide la regulación del intercambio de nucleótidos que SBDS ejerce sobre EFL1 5S (imagen modificada de Plisson-Chastang 2015) [27].	6
Figura 5. Estructura de la proteína SBDS. El dominio N-terminal está formado por cuatro hebras beta y cuatro alfa-hélices dispuestas en forma de tres hebras beta antiparalelas, el dominio 2 o central tiene tres hélices alfa, mientras el dominio C-terminal contiene una estructura similar a la ferredoxina [28].	7
Figura 6. Luz linealmente polarizada, vista como una superposición de luz polarizada circular de igual amplitud y fase	8
Figura 7. Espectro de dicroísmo circular para diferentes estructuras secundarias presentes en las proteínas [34].	9
Figura 8. Gráfico de Kratky normalizado para proteínas con distintas conformaciones $(sR_g)^2 I(s)/I(0)$ vs. sR_g [37].	10
Figura 9. Esquema general del proceso de anisotropía de fluorescencia. (A) la luz de excitación verticalmente polarizada donde I_{VH} es la intensidad con una excitación en vertical y una emisión en horizontal y I_{VV} es la intensidad con una excitación y emisión en vertical. (B) muestra la polarización de excitación en horizontal, y la detección dada por I_{HH} (intensidad con una excitación y emisión	

en horizontal) yI_{HV} (es una intensidad con una excitación en horizontal y una emisión en vertical) y μ es el momento dipolar que ha sido excitado por el haz de excitación vertical o horizontal según sea el caso [44].	12
Figura 10. Grafica clásica de Hill.	18
Figura 11. Modelo de Scatchard	19
Figura 12. Apariencias esperadas en las gráficas de Scatchard	20
Figura 13. Sistema de doble híbrido. [A] Cuando la proteína Y (Efl1 silvestre y sus dominios estructurales) es capaz de interactuar con la proteína señuelo, representada por X (la proteína Sdo1 completa y una proteína Sdo1 trunca que comprende los dominios 2+3 (Sdo1 D2-D3), el factor de transcripción se reconstituye, quien se encarga de reclutar a la RNA polimerasa II y transcribir el mRNA del gen mensajero. (B) Representa el caso 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 (imagen modificada de Brückner 2009 [58]).	22
Figura 14. Representación de los sitios de interacción de la SBDS con la EFTUD1. El primer evento de unión se cree, está ubicado en el dominio 2 de SBDS, mientras el segundo sitio de unión se encuentra en el dominio 1 (Se omite la participación de EFTUD1 para dar más simplicidad al esquema).	24
Figura 15. Interacción esperada entre la etiqueta FLaSH con el reactivo Lumio Green.	37
Figura 16. Amplificación de los dominios 1, 2, 1+2, 2+3 de la proteína SBDS por PCR. (A) Amplicones antes de purificar. (B) Amplicones después de purificar.	40
Figura 17. Patrones de restricción con EcoRI y NdeI de las construcciones de interés en el vector pRSET. (A) pRSET-D1, clonas 1 y 2 positivas y el carril 3 el vector pRSET más inserto. (B) pRSET-D2, clonas 1, 2 y 3, positivas. (C) pRSET-D1+2, clonas 1,2 y 3 positivas (D) pRSET-D2+3 clonas 1,2 y 4 positivas mientras los carriles 3 y 5 son negativos.	41
Figura 18. Purificación del dominio 1 (D1) de la proteína SBDS mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel seguida de una purificación por una columna de intercambio catiónico.	42
Figura 19. Purificación del dominio 2 de la proteína SBDS (D2) mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel.	42
Figura 20. Purificación del dominio 1+2 de la proteína SBDS (D1+2) mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel, seguida por una columna de intercambio catiónico.	43
Figura 21. Purificación del dominio 2+3 de SBDS (D2+3) mediante una cromatografía de afinidad	

a iones níquel seguida por una columna de intercambio catiónico.	43
Figura 22. Purificación de la proteína EFTUD1 mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+}	44
Figura 23. Purificación de la proteína EFTUD1 mediante cromatografía de exclusión molecular. En la parte superior se muestra el número de las fracciones en las que se encontraba la proteína EFTUD1 y que corresponden a un volumen de elución de 63-71 mL.	45
Figura 24. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 1 (D1) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 1 de SBDS (PDB 2L9N), donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores.	46
Figura 25. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 2 (D2) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 2 de SBDS (PDB 2L9N), donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores.	46
Figura 26. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 1+2 (D1+2) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 1+2 de SBDS, donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores (PDB 2L9N).	47
Figura 27. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 2+3 (D2+3) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 2+3 de SBDS, donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores (PDB 2L9N).	48
Figura 28. Interacción entre EFTUD1 y el dominio 1 de SBDS (D1 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.	49
Figura 29. Interacción entre EFTUD1 y el dominio 2 de SBDS (D2 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.	50
Figura 30. Interacción entre EFTUD1 y la construcción consistente de los dominios 1+2 de SBDS (D1+2 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión.	51
Figura 31. Análisis de la cooperatividad en la interacción entre los dominios 1+2 de SBDS y EFTUD1 mediante el (A) gráfico de Hill y de (B) Scatchard. Donde el coeficiente de Hill es nH y la constante de unión aparente del substrato es KH , mientras que PL es la proteína-ligando.	52
Figura 32. Interacción entre EFTUD1 y la construcción consistente de los dominios 2+3 de SBDS	

(D2+3 SBDS) evaluado mediante anisotropia de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión. 53

Figura 33. Experimentos de SAXS de la proteína Sdo1 silvestre y sus dominios 2+3. Gráfico adimensional de Kratky de las proteínas Sdo1 silvestre (azul), construcción de los dominios 2-3 de Sdo1 (rojo) y albúmina bovina sérica (BSA) como proteína control (verde). 54

Figura 34. Representación de los sitios de interacción de la SBDS con la EFTUD1. En el primer evento de unión participan los dominios 2+3 (representados en azul), mientras el segundo sitio de unión se encuentra en el dominio1 (representando por un círculo rojo). 58

RESUMEN

Los ribosomas son los organelos responsables de catalizar la síntesis de proteínas en todos los organismos y una de las maquinarias más precisas de construcción y regulación molecular en la célula. Sin embargo, la síntesis de ribosomas no está exenta de cometer errores, así como alteraciones en sus componentes, ocasionando una clase heterogénea de enfermedades conocidas como ribosomopatías. Actualmente se desconocen muchos aspectos moleculares acerca de las ribosomopatías, desde su causa por alteraciones en el genoma, como lo son mutaciones específicas en proteínas ribosomales o en factores accesorios del ensamblaje de los ribosomas hasta su efecto en tejidos celulares específicos [1]. Entre las ribosomopatías más comunes sobresalen la anemia de Diamond-Blackfan, el síndrome de Treacher Collins, la asplenia congénita aislada y el síndrome de Shwachman-Diamond (SSD).

SSD es una enfermedad autosómica recesiva que presenta una ocurrencia de 1 en 160,000 nacimientos, caracterizada por hematopoyesis alterada, insuficiencia pancreática exocrina y aumento en el riesgo de desarrollar leucemia. Otras características variables incluyen trastornos esqueléticos, hepáticos, inmunológicos y cardíacos [2,3]. El 90% de los pacientes que cumplen los criterios diagnósticos para SSD tienen mutaciones en el gen *SBDS*, el cual participa en múltiples vías celulares [4–6], entre las cuales destaca su participación en la liberación de eIF6/Tif6 de la superficie de la subunidad ribosomal 60S permitiendo la formación de los ribosomas maduros 80S [7,8]. El factor eIF6 es liberado por la acción de las proteínas SBDS y la GTPasa EFTUD1 de la superficie de la subunidad 60S; por lo que deficiencias en este proceso conllevará al deficiente ensamblaje de ribosomas maduros. Debido a esto, resulta importante entender el reconocimiento molecular que ocurre entre SBDS y EFTUD1. En este trabajo se estudió la interacción entre las proteínas SBDS y EFTUD1 mediante anisotropía de fluorescencia. Para ello, se disectó la interacción entre los distintos dominios de SBDS: 1, 2, 1+2 y 2+3 con EFTUD1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, junto con los resultados adquiridos previamente en el grupo de investigación, sugieren que la interacción entre EFTUD1 y SBDS se lleva a cabo a través de dos eventos de unión distintos con cooperatividad positiva. El primer evento de unión ocurre entre el dominio 2+3, mientras el segundo ocurre en el dominio 1 de SBDS.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El ribosoma

Los ribosomas son máquinas moleculares muy complejas responsables de la producción de proteínas [9]. Debido a que la calidad y cantidad de proteínas en todas las células es mediada por el ribosoma, la producción de ribosomas es un proceso altamente regulado e integrado a muchos procesos celulares incluyendo el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular.[10] Los ribosomas están compuestos por dos subunidades, ambas constituidas por ARN ribosomal y proteínas, conocidas como subunidad menor y mayor (**Figura 1**). La subunidad menor (30S en bacterias y archaeas, y 40S en eucariota) se encarga de decodificar la información contenida en la secuencia del ARNm y está compuesta de aproximadamente 20 diferentes proteínas y un ARN ribosomal 16S que contiene aproximadamente 1600 nucleótidos, mientras la subunidad mayor (50S en bacteria y archaea, y 60S en eucariota) es responsable de catalizar la formación de los enlaces peptídicos y de igual forma está compuesta de alrededor de 33 proteínas diferentes, y dos ARNr conocidas como 5S y 23S que presentan alrededor de 120 y 2900 nucleótidos respectivamente [11–13].

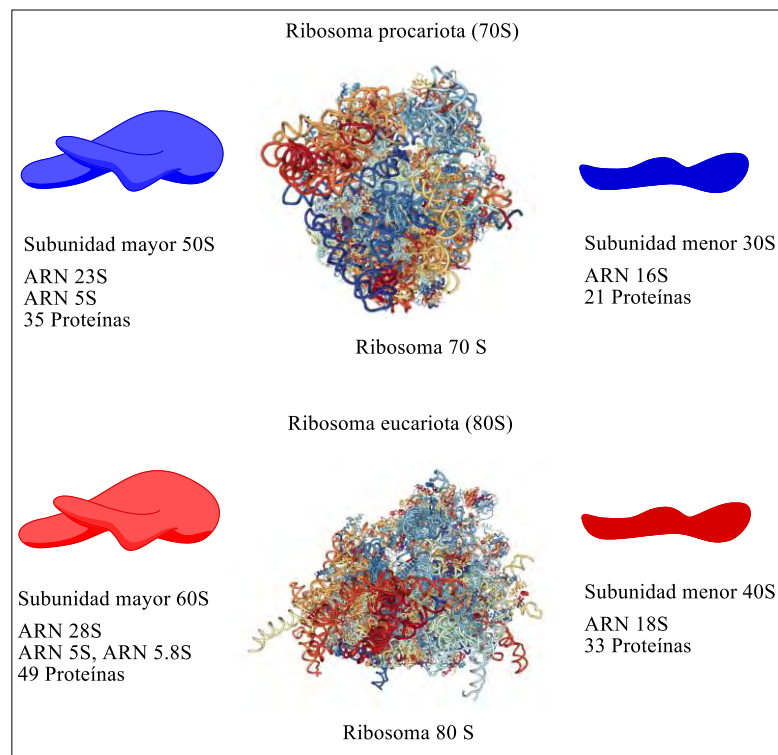


Figura 1. Composición esquematizada del ribosoma y su conformación general.

El ribosoma contiene cuatro sitios de unión para las moléculas de ARN, un sitio para el ARNm y tres sitios de unión para el ARNt, conocidas como el sitio A (aminoacil), el sitio P (peptidil) y el sitio E (salida). El sitio A es el punto de entrada para el aminoacil-ARNt (excepto para el primer aminoacil-ARNt, fmet-ARNt, que entra en el sitio P). El sitio P es donde se aloja el peptidil-ARNt y el sitio E es el sitio de salida del ARNt una vez descargado, es decir, luego de ofrecer su aminoácido a la cadena peptídica en crecimiento [13,14].

1.2 Biogénesis ribosomal

La biogénesis ribosomal se define como el proceso de construir ribosomas a través del consumo de energía e involucra cientos de factores. En los eucariotas, la biogénesis ribosomal inicia en el nucléolo cuando la ARN polimerasa II sintetiza el pre-ARNm de las proteínas ribosomales y los factores accesorios involucrados en la biogénesis ribosomal. Por otro lado, la ARN polimerasa III produce el precursor del ARNr 5S [15,16], mientras que la secuencia del pre-ARNr 35S se encuentra separado por dos secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS1 y ITS2) y espaciadores transcritos externos (5' y 3' ETSS) cuyo procesamiento elimina los espaciadores no codificantes y da lugar a los ARNr 25S, 18S y 5.8 S [17].

La ARN polimerasa I transcribe el ARNr precursor 35S que se procesa rápidamente a través de una serie de cortes endo- y exonucleolíticos, para eliminar los espaciadores intragénicos o también conocidos como espaciadores de transcrito (ITS). Inicialmente el pre-ARNr 35S es escindido sucesivamente en los sitios A₀ del extremo 5' generando el pre-ARNr 33S, luego en el sitio A₁ produciendo el pre-ARNr 32S y en el sitio A₂ en el ITS1 generando los pre-ARNr 20S y 27SA₂. Posteriormente el ARNr 20S continua su procesamiento en citoplasma, donde es cortado en el sitio D para generar finalmente el ARNr maduro 18S, mientras el pre-ARNr 27SA₂ continua en el nucléolo donde es procesado a través de dos rutas.

De la población total, el 85% del ARNr 27SA₂ es dividido en el sitio A₃ en ITS1 por la ARNasa MRP, seguido por recortes en el sitio B_{1S} por Rat1, mientras el 15% de la población restante es incidida directamente en el sitio B_{1L}, el corte en el sitio B₂ ocurre junto con el corte en el sitio B₁ en el extremo 3' del 25S (**Figura 2**) [17–19].

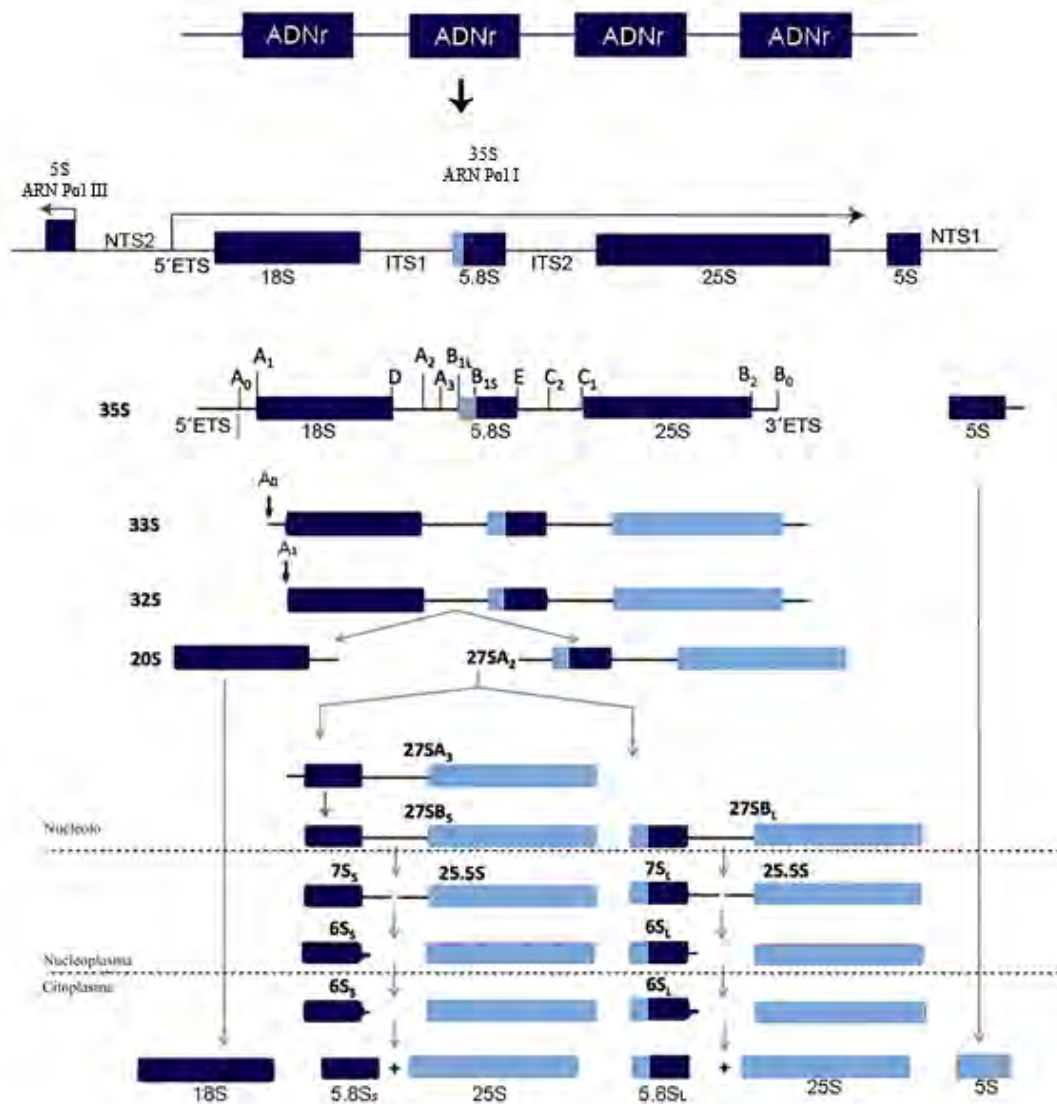


Figura 2. Procesamiento del pre-rARN 35S. Una sola unidad repetida es transcrita por la ARN polimerasa I (ARN pol I) para sintetizar el transcrito de ARN primario 35S que será procesado para generar los ARNr 18S, 5.8S y 25S, mientras la ARN polimerasa III (ARN pol III) sintetiza el ARNr 5S (imagen modificada de Woolford 2013) [20].

De forma paralela a la síntesis y procesamiento del pre-ARNr, también son sintetizadas las proteínas estructurales del ribosoma, las proteínas accesorias de la biogénesis ribosomal y las ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (RNPsn). Las proteínas estructurales se asocian a las subunidades pre-ribosomales y los factores accesorios participan en diferentes etapas sin ser parte de la partícula final (**Figura 3**) [17,21].

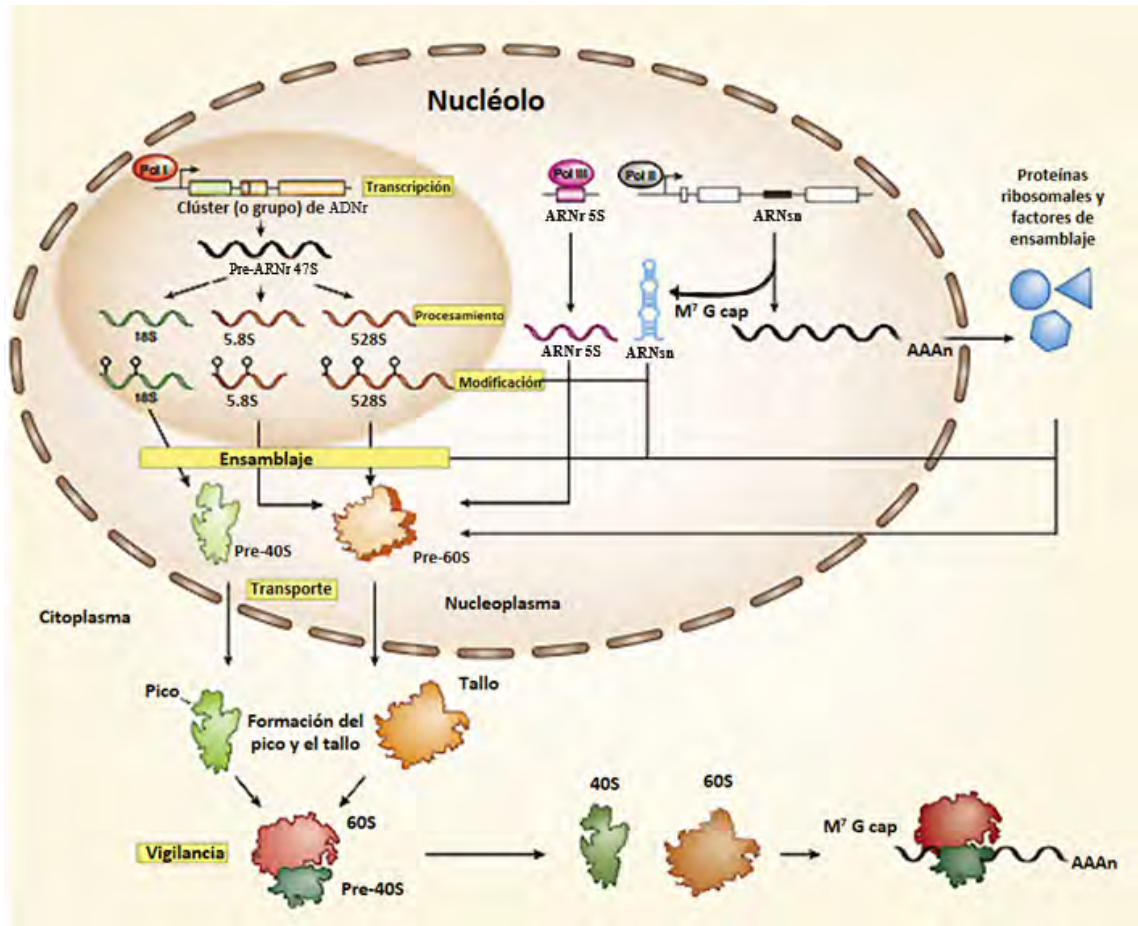


Figura 3. Diagrama del proceso de biogénesis ribosomal. El procesamiento de partícula pre-90S da lugar a las subunidades pre-60S y pre-40S que llevan procesos de maduración independientes que finalizan en el citoplasma. Las partículas son transportadas desde el nucléolo al nucleoplasma, y posteriormente exportadas al citoplasma, en donde sufren las últimas modificaciones para su maduración y se ensamblan para formar la partícula funcional 80S [17].

El proceso es tan complejo que durante el ensamblaje participan cerca de 200 factores accesorios, entre los que se encuentran endo- y exo-nucleasas, helicasas, ATPasas, GTPasas, chaperonas y proteínas de exportación. De esta forma, las subunidades nacientes 40S y 60S entran al citoplasma a través de vías complejas, con el fin de completar su maduración a subunidades funcionales. Debido a que este proceso requiere de múltiples pasos, puede estar sujeto a errores en su desarrollo o pueden existir mutaciones en las proteínas tanto estructurales como accesorias que pueden generar efectos adversos como enfermedades [20,22].

1.3 Ribosomopatías y el Síndrome de Shwachman-Diamond (SSD)

Las ribosomopatías son un conjunto de trastornos originados por mutaciones en proteínas estructurales del ribosoma o factores accesorios de su procesamiento, ocasionando alteraciones en la biogénesis o la función de los mismos. Los pacientes afectados por ribosomopatías presentan cuadros clínicos específicos, pero conservan algunas características relativamente comunes, como falla medular, anormalidades óseas y predisposición a desarrollar algún tipo de leucemia [23]. En particular SSD (descrita por primera vez por Shwachman y sus colegas en 1964 [24]), es una enfermedad hereditaria poco común, caracterizada por insuficiencia pancreática y fallas de la médula ósea, los pacientes con SSD tienen un riesgo acumulativo entre el 20 al 36% de desarrollar síndrome mielodisplásico y leucemia mielógena aguda entre los 20 y 30 años; también se caracterizan por tener una baja estatura, neutropenia, insuficiencia pancreática exocrina y anemia. En la mayoría de los casos, la enfermedad se origina por alteraciones en la función de la proteína SBDS, al presentar variantes patogénicas que pueden incluir desde pequeñas deleciones, inserciones intragénicas, variantes de sentido erróneo (o contrasentido), sin sentido y de empalme. En la mayoría de los casos las anormalidades estructurales y/o numéricas, causantes del síndrome se localizan en el cromosoma 7 en el locus 7q11, la cual consiste de monosomía 7, deleciones o traslocaciones involucradas en el brazo largo del cromosoma 7 y isocromosoma 7q [i(7) (q10)] (cromosoma anormal en el que se ha perdido un brazo y el otro se ha duplicado de manera especular).

Boocock et al. [25] descubrió que las mutaciones en el gen SBDS, localizado dentro del intervalo de 1,9 cM (centimorgan, unidad de distancia genética para mapas de ligamiento), están relacionados con SDS. Donde el 90% de los pacientes con diagnóstico clínico de SSD presentan alteraciones en la función de la proteína SBDS, de este porcentaje el 75% de ellos presentan mutaciones ocasionadas por la conversión con un pseudogen adyacente (SBDSP) que presenta un 97% de identidad y produce una proteína truncada [1,26].

Las mutaciones que presentan son la K62X (183-184TA→CT), que genera un codón de paro (X) en el aminoácido 62 y la C84fsX3 (258+2T→C) que interrumpe el sitio donador del empalme en el intrón 2 generando otro en el sitio 251-252, provocando un corrimiento en el marco de lectura (frameshift) que codifica para un codón de paro, tres residuos después del aminoácido 84, mientras el 25% de los pacientes restante presentan mutaciones contrasentido o sinsentido en SBDS, de esta forma los dos casos anteriormente mencionados impiden de manera general que SBDS ejecute su

función y por ende interrumpen la función de EFL1 como intercambiador de nucleótidos de guanina, al evitar que EFL1 realice su movimiento natural en bisagra, donde los dominios 1-2 y 4 giran alrededor de los dominios 3 y 5 (**Figura 5**). De esta forma no se produce el cambio conformacional adecuado que libraría a eIF6 y daría lugar a ribosomas anormales con capacidades de traducción alteradas [25].

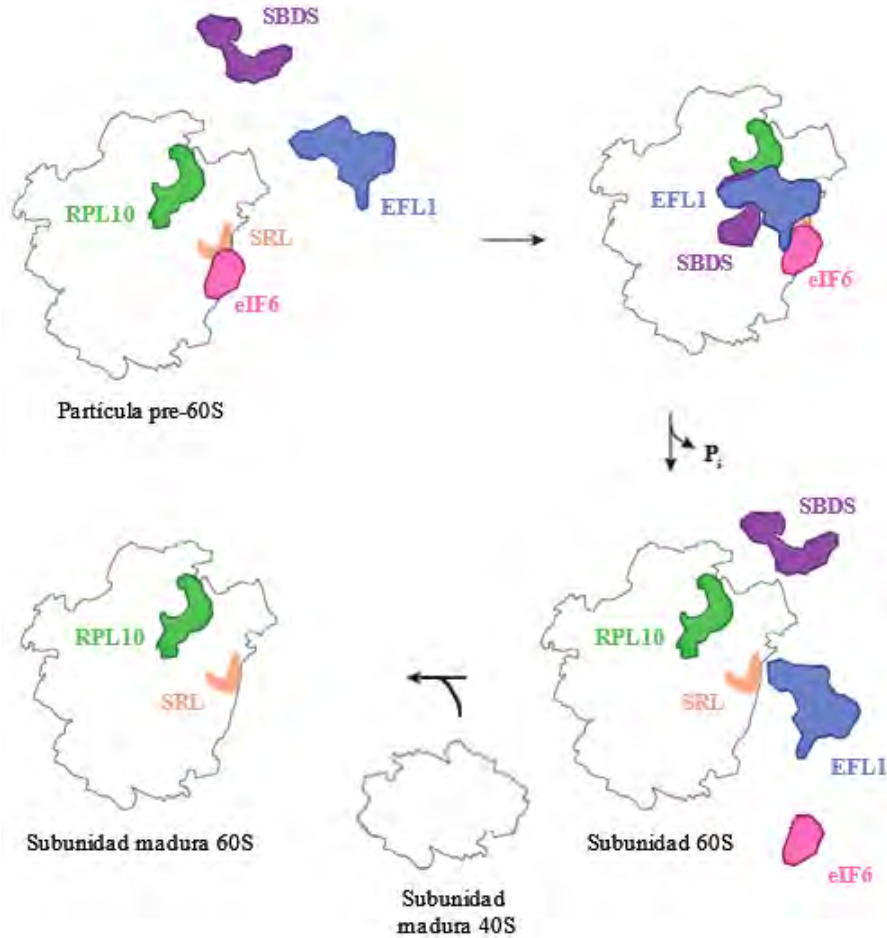


Figura 4. Modelo de liberación de eIF6 (Tif6) por las proteínas EFL1 y SBDS. Las proteínas SBDS y EFL1 se unen al ribosoma, donde la actividad GTPasa de EFL1 está acoplada a la proteína SBDS y a partir de la fuerza de hidrólisis de GTP se libera al factor de anti-asociación Tif6 de la superficie de la subunidad 60S. Actualmente se cree que la pérdida de interacción entre estas proteínas debido a mutaciones en SBDS (que producen SSD), impide la regulación del intercambio de nucleótidos que SBDS ejerce sobre EFL1 5S (imagen modificada de Plisson-Chastang 2015) [27].

La proteína SBDS está compuesta por 250 residuos organizados en tres dominios, como se muestra en la **Figura 5**, y desarrolla su papel principal en la biogénesis ribosomal junto a la GTPasa,

conocida como proteína tipo factor de elongación 1 (EFL1), donde liberan al factor de anti-asociación IF6 (eIF6) de la superficie de la subunidad ribosomal pre-60S, el cual se encuentra unido a la superficie de la subunidad ribosomal pre-60S (subunidad mayor) para evitar la unión prematura de las dos subunidades.

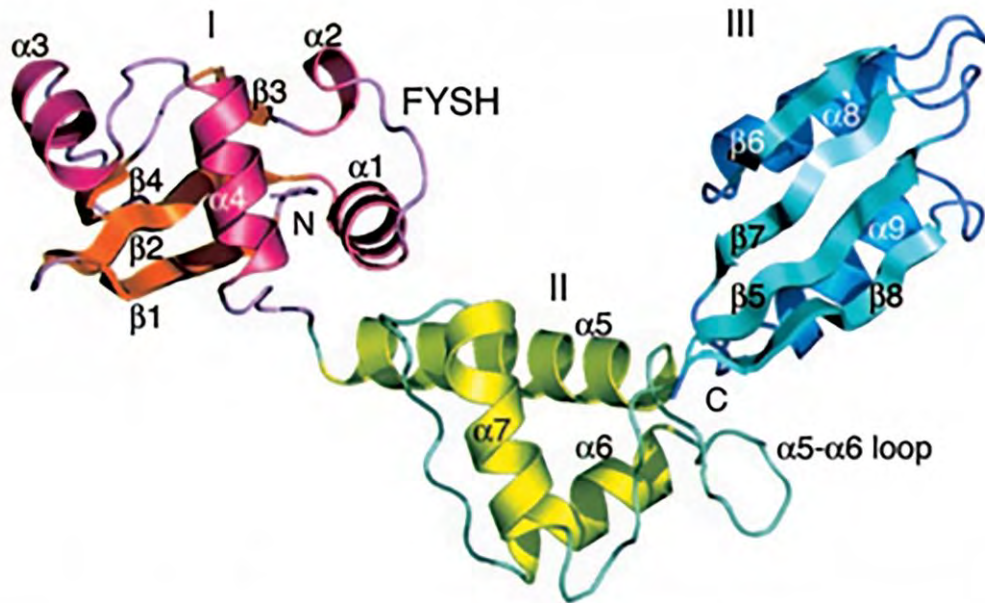


Figura 5. Estructura de la proteína SBDS. El dominio N-terminal está formado por cuatro hebras beta y cuatro alfa-hélices dispuestas en forma de tres hebras beta antiparalelas, el dominio 2 o central tiene tres hélices alfa, mientras el dominio C-terminal contiene una estructura similar a la ferredoxina [28].

La principal alteración molecular en SSD es la incapacidad de acoplar la hidrólisis de GTP (realizada por EFL1) con el cambio conformacional requerido para promover la liberación del factor de anti-asociación Tif6/eIF6 de la superficie de la subunidad ribosomal 60S [29], ya sea por mutaciones en SBDS (que actúa como una proteína efectora de EFL1) o posiblemente por mutaciones en EFL1. Investigaciones en el laboratorio demostraron que pacientes con SSD poseían mutaciones en EFL1 (afectando su actividad catalítica y por ende produciendo síntomas similares) [30]. Sin embargo, se demostró que éstas no afectan el correcto plegamiento de EFL1, así como tampoco desestabilizan el núcleo hidrofóbico del mismo (es decir no promueven un cambio conformacional). No obstante, estas mutaciones promueven que Tif6 se acumule en el citoplasma de las células en lugar del núcleo, evitando su reciclaje desde la partícula pre-60S y por ende generando el síndrome.

1.4 Fundamentos de dicroísmo circular

El dicroísmo circular mide la interacción de una molécula quiral (mayoría de moléculas biológicas) con un haz de la luz polarizada circularmente – también quiral –. Si la luz polarizada pasa a través de prismas o filtros adecuados, su campo eléctrico (E), componente responsable de la interacción con la materia, oscilará sinusoidalmente en un solo plano. Cuando se ve desde el frente, la onda sinusoidal puede visualizarse como la resultante de dos vectores de igual longitud, que trazan círculos, uno que gira en el sentido de las agujas del reloj (E_R) y el otro que gira en sentido contrario a las agujas del reloj (E_L), como se muestra en la **Figura 6**. [31]. Esta técnica se fundamenta en la absorción diferencial de estos 2 componentes, los cuales atraviesan la muestra e interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes en el medio, induciendo un desfaseamiento y un cambio en la magnitud de ambos vectores, provocando una rotación del plano en un ángulo α . Ésta desviación se debe al cambio en el índice de refracción entre la luz polarizada circular a la izquierda y a la derecha. La distorsión de este plano genera una elipse. Tanto la rotación del plano como la diferencia en la absorción de los componentes son funciones de la longitud de onda [32,33].

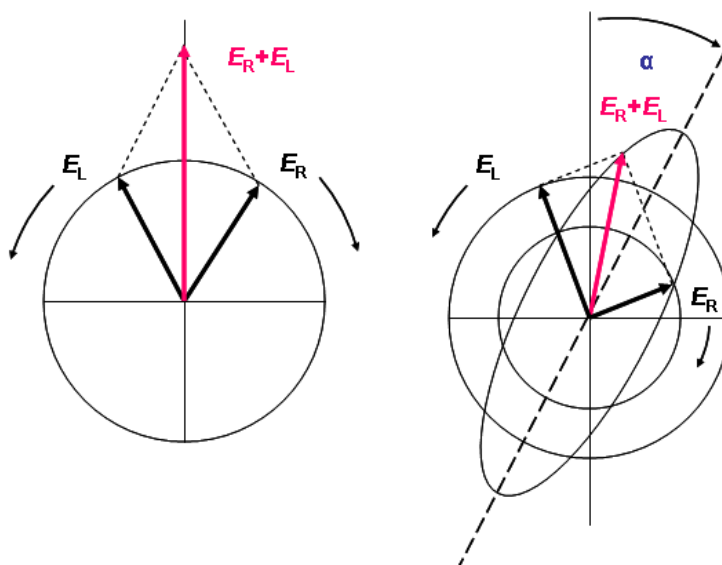


Figura 6. Luz linealmente polarizada, vista como una superposición de luz polarizada circular de igual amplitud y fase

Mediante dicroísmo circular (CD) es posible estudiar la estructura secundaria de una proteína en solución ya que sus motivos conformacionales presentan características específicas de absorción.

Por ejemplo, las hélices α muestran señales características en su espectro con elipticidad negativa entre 222 y 208 nm y elipticidad positiva a 193 nm, las láminas β presentan una banda amplia y negativa cerca de 218 nm y una banda positiva cerca de 195 nm, mientras que las cadenas extendidas desordenadas muestran una banda amplia en sus CD y débil cerca de 217 nm, al igual que una banda negativa cerca de 200nm (**Figura 7**). El espectro de una proteína es básicamente la suma de los espectros de sus elementos conformacionales y, por tanto, su CD puede usarse para estimar el contenido de estructura secundaria. En este trabajo utilizamos la técnica de dicroísmo circular para evaluar el contenido de estructura secundaria y, por tanto, su plegamiento, de los diferentes dominio y combinaciones de la proteína SBDS.

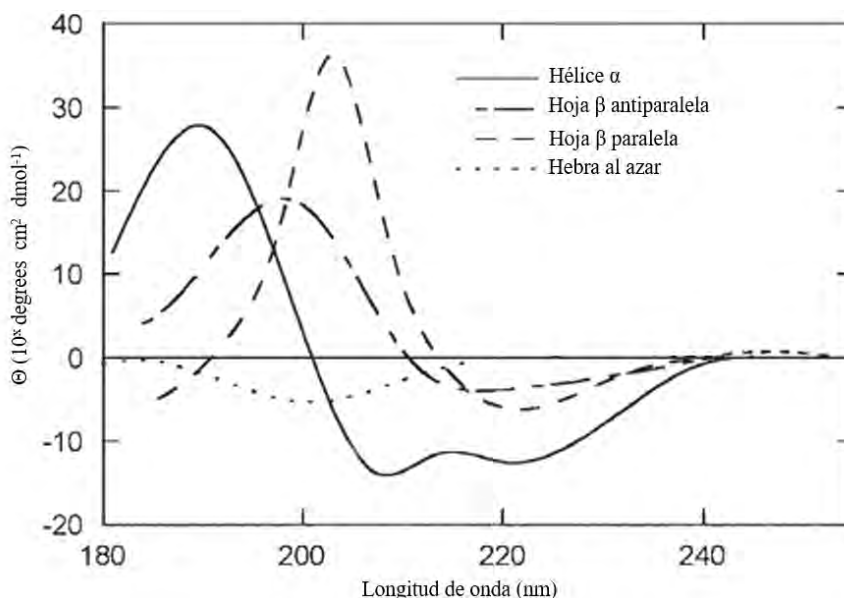


Figura 7. Espectro de dicroísmo circular para diferentes estructuras secundarias presentes en las proteínas [34].

1.5 Principios del funcionamiento de dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS)

SAXS es una forma de difracción de los rayos X que se basa en analizar la dispersión de los rayos X producida por un material al paso del haz a ángulos muy próximos a cero. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para obtener información estructural de baja resolución para macromoléculas biológicas en solución. Sin embargo, en comparación con otras técnicas experimentales, SAXS es particularmente útil para caracterizar la flexibilidad de las biomoléculas [35]. El fundamento de la técnica consiste en pasar un haz rayos X monocromático colimado a través de la muestra de interés y registrar la intensidad de los rayos X dispersos. De igual forma se obtiene el patrón de dispersión

del disolvente puro el cual subsecuentemente se extrae de los datos de la solución con la muestra, dejando sólo la señal de las partículas de interés. El patrón de dispersión resultante se relaciona con la forma general y el tamaño de las partículas bajo investigación, obteniendo así información estructural de la macromolécula a una resolución entre 5 y 25 nm. Con esto, es posible estudiar el tamaño y la forma de una proteína bajo diversas condiciones experimentales. El gráfico de Kratky identifica de forma cualitativa la conformación de una proteína y permite distinguir proteínas globulares de las desplegadas (**Figura 8**) [36,37].

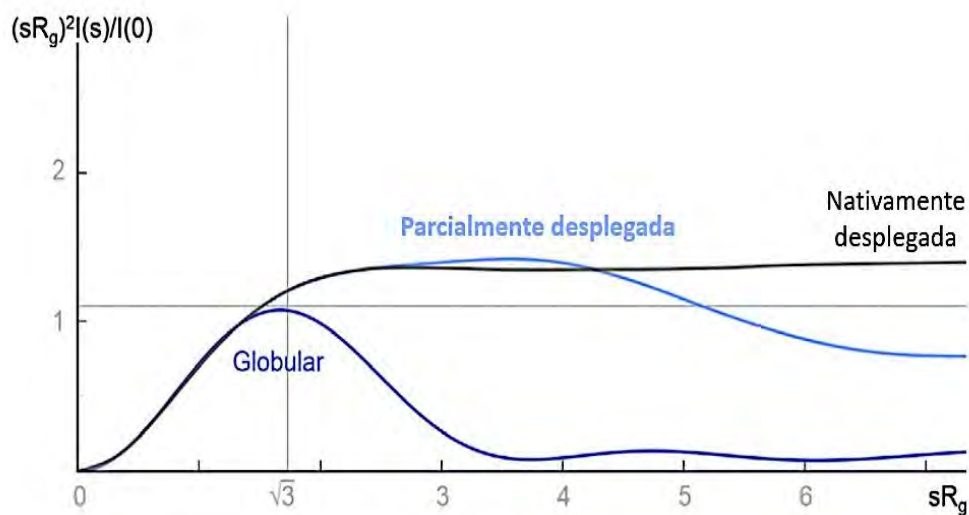


Figura 8. Gráfico de Kratky normalizado para proteínas con distintas conformaciones $(sR_g)^2 I(s)/I(0)$ vs. sR_g [37].

1.6 Interacciones proteína-proteína

Comprender los mecanismos moleculares y las interacciones que rigen los procesos en los seres vivos es un tema central en áreas como la biología molecular, la bioquímica y la medicina. Para alcanzar este objetivo, es indispensable identificar los componentes que participan en la interacción. Actualmente se conocen una gran variedad de técnicas para medir la interacción proteína-ligando (P-L), entre las más tradicionales se encuentran los métodos espectroscópicos como la RMN, la cristalografía y la calorimetría, entre otros, como el sistema de doble híbrido y purificación por afinidad en tándem. Sin embargo, determinar si dos proteínas pueden interactuar entre sí, es sólo el primer paso para comprender el mecanismo y en qué medida la interacción tiene lugar *in vivo*. La evaluación de la interacción entre P-L, requiere de la consideración de al menos seis parámetros que

son: las constantes de unión, la concentración de las especies, la influencia de las proteínas competidoras, la influencia de los cofactores, así como el efecto de la compartimentación celular y las condiciones de la solución [38,39]. Para determinar las constantes de unión, entre proteínas, se conocen varios métodos, algunas de los más utilizadas son la unión a proteínas inmovilizadas, sedimentación a través de gradientes y métodos de fluorescencia entre otros.

Entre ellos, los métodos de fluorescencia sobresalen, debido a que la fluorescencia es un método altamente sensible para la detección de proteínas y gracias al gran avance de los reactivos de fluorescencia se han promovido una serie de nuevas y más complejas tecnologías. Actualmente es posible estudiar las interacciones P-L, al marcar selectivamente a la proteína con un cromóforo, para así evaluar el efecto de dicha interacción sobre la absorbancia/fluorescencia del marcador y detectar la presencia del marcador unido a la proteína (después de la eliminación de cualquier exceso de marcador libre). A través de esta técnica es posible analizar las interacciones moleculares, sin la necesidad de eliminar la fracción no unida. Sin embargo, con el fin de obtener resultados reales, acerca de la interacción P-L, es esencial verificar que el porcentaje de P unida al marcador es mayor al 50%, garantizando así que la señal obtenida será un reflejo real de la interacción. Algunas de las técnicas basadas en el fenómeno de fluorescencia pueden analizarse a través de diferentes maneras (debido a que cada una de ellas mide una propiedad diferente asociada con la fluorescencia.), dependiendo de la propiedad de fluorescencia que se utiliza para la detección. Algunas de ellas son alteración del espectro de fluorescencia y/o intensidad por cambio ambiental local, transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, del inglés Förster resonance energy transfer), complementación bimolecular fluorescente (BiFC, del inglés Bimolecular fluorescence complementation), espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, del inglés fluorescence cross-correlation spectroscopy) y anisotropía de fluorescencia [40,41].

1.7 Anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia es una técnica que se basa en la interacción de un fluoróforo con una onda electromagnética, donde el proceso de absorción de fotones por parte del fluoróforo ocurre a través del acoplamiento del campo electromagnético a su momento dipolar de transición. Si la orientación del vector eléctrico de la luz excitada es paralela al momento dipolar de transición del fluoróforo, entonces ocurre una excitación eficiente de éste (**Figura 9**). De esta forma, al excitar un conjunto de moléculas orientadas al azar con una luz linealmente polarizada, sólo se excitan las

moléculas que están alineadas a la dirección de la luz de excitación.

El principio de la anisotropía de fluorescencia deriva del grado de polarización de un fluoróforo, el cual está inversamente relacionado con su rotación molecular [42,43]. Así mismo, la anisotropía de un fluoróforo en solución se determina principalmente por el movimiento de rotación de éste, el cual depende de su tamaño molecular, y de otros parámetros como la temperatura y viscosidad del medio. A diferencia de la polarización de fluorescencia, la anisotropía nos permite relacionar de forma lineal, la velocidad del movimiento con el número de moléculas de fluoróforo presentes [41].

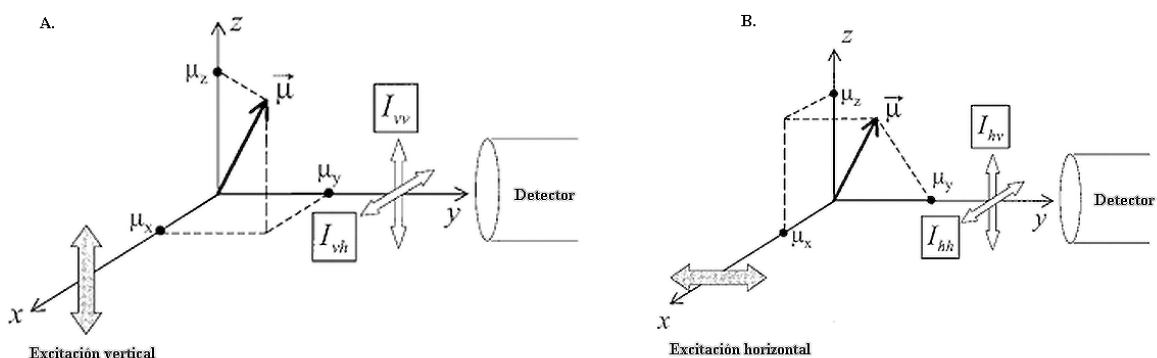


Figura 9. Esquema general del proceso de anisotropía de fluorescencia. (A) la luz de excitación verticalmente polarizada donde I_{VH} es la intensidad con una excitación en vertical y una emisión en horizontal y I_{VV} es la intensidad con una excitación y emisión en vertical. (B) muestra la polarización de excitación en horizontal, y la detección dada por I_{HH} (intensidad con una excitación y emisión en horizontal) y I_{HV} (es una intensidad con una excitación en horizontal y una emisión en vertical) y $\vec{\mu}$ es el momento dipolar que ha sido excitado por el haz de excitación vertical o horizontal según sea el caso [44].

La anisotropía de fluorescencia es útil para estudiar el proceso de unión entre una proteína y su ligando que puede ser ADN, ARN u otra proteína (donde una de ellas está marcada con una etiqueta fluorescente). La interacción de la molécula fluorescente con su ligando resulta en un aumento de los valores de anisotropía. Este enfoque ha sido utilizado con éxito en diversos estudios [45–47]. La cuantificación del proceso de interacción puede describirse a través de una ecuación de velocidad entre cualquiera de las dos moléculas (P y L).

$$(1)$$



Las velocidades de las dos reacciones están dadas por la concentración de la proteína y el ligando, y el valor de las constantes de velocidad de asociación y disociación, representadas como k_{+1} o k_{-1} .

$$\text{Velocidad de asociación} = k_{+1} [P][L] \quad (3)$$

$$\text{Velocidad de disociación} = k_{-1} [PL]$$

En el equilibrio ambas reacciones ocurren a la misma velocidad, obteniendo:



$$k_1 [P][L] = k_{-1} [PL]$$

Por lo tanto:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (6)$$

Donde K_d es la constante de disociación ($K_d = 1/K_A = [P][L]/[PL]$, K_A es la constante de asociación de equilibrio), la cual define la fuerza (o afinidad) de la interacción. Para el análisis de los datos se emplearon dos modelos de unión, uno de ellos un modelo de un sitio de unión y otro para dos sitios de unión distintos, de esta forma, la ecuación que representa el modelo más simple, de un sitio de unión es (ecuación 7):



Donde P representa una molécula de EFTUD1 y L representa los diferentes dominios evaluados de SBDS-FIAsH, mientras K_d representa la constante de disociación en el equilibrio. Considerando que $[P] \gg [L]$ en cualquier momento de la titulación, podemos inferir que $P \approx P_0$ (pues una pequeña cantidad de P se encuentra formando el complejo). Teniendo en cuenta que $[P]_0$ es la concentración inicial de EFTUD1, mientras $[L]_0$ es la concentración inicial de EFTUD1, donde

$$[P]_0 = [P] + [PL] \quad (8)$$

$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad (9)$$

Estimando el efecto de la anisotropía de fluorescencia para las especies que aportan a la señal

observada (r_{obs}), tenemos:

$$r_{obs} = \sum \text{Todas las especies con anisotropía} \quad (10)$$

$$r_{obs} = r_L[L] + r_{PL}[PL] \quad (11)$$

Considerando la ley de acción de masas y a la reacción en el equilibrio, tendríamos la siguiente expresión:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (12)$$

Para un tiempo ($t=0$), en donde $[P] = [P]_0$ y despejando $[PL]$, la ecuación 12 es:

$$[PL] = \frac{[P]_0[L]}{K_d} \quad (13)$$

Reemplazando la ecuación 9 en 13, y despejando $[L]$ tenemos:

$$[L] = \frac{[L]_0 K_d}{K_d + [P]_0} \quad (14)$$

Ahora reemplazando la ecuación 13 en 11:

$$r_{obs} = \frac{[P]_0[L]}{K_d} (r_{PL} - r_L) + r_L[L]_0 \quad (15)$$

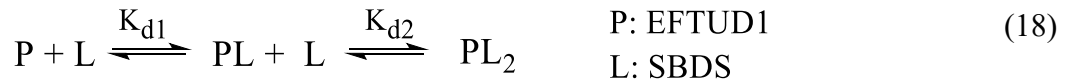
Finalmente, reemplazando 14 en 15:

$$r_{obs} = r_L[L]_0 + \frac{[P]_0[L]_0(r_{PL} - r_L)}{K_d + [P]_0} \quad (16)$$

Reduciendo términos, donde $r_i = r_L[L]_0$ y $\Delta r_{PL} = [L]_0(r_{PL} - r_L)$, la ecuación final sería:

$$r_{obs} = r_i + \frac{[P]_0 \Delta r_{PL}}{K_1 + [P]_0} \quad (17)$$

El ajuste de unión con dos sitios de diferentes, consideraremos la siguiente ecuación:



Considerando que $[P] \gg [L]$ en cualquier momento de la titulación, podemos inferir que $P \approx P_0$ (pues una pequeña cantidad de P se encuentra formando el complejo). Teniendo en cuenta que $[P]_0$ es la concentración inicial de EFTUD1, mientras $[L]_0$ es la concentración inicial de EFTUD1, donde:

$$[P]_0 = [P] + [PL] + [PL_2] \quad (19)$$

$$[L]_0 = [L] + [PL] + [PL_2] \quad (20)$$

$$R_{obs} = \sum \text{Todas las especies con anisotropía} \quad (21)$$

$$r_{obs} = r_L[L] + r_{PL}[PL] + r_{PL_2}[PL_2] \quad (22)$$

Donde r_{obs} es la anisotropía observada, r_L la anisotropía de SBDS libre, r_{PL} anisotropía del complejo PL y r_{PL_2} anisotropía del complejo PL_2 . Mientras que las constantes de equilibrio de la reacción se representan por (ecuación 23 y 24):

$$K_{d1} = \frac{[P]_0[L]}{[PL]} \quad (23)$$

$$K_{d2} = \frac{[P]_0[PL]}{[PL_2]} \quad (24)$$

Despejando de la ecuación 23 [PL] y reemplazando en 24, tenemos (ecuación 25):

$$[PL_2] = \frac{[P]}{K_2} \left(\frac{[P]_0[L]}{K_1} \right) = \frac{[P]_0^2 [L]}{K_2 K_1} \quad (25)$$

Reemplazamos la ecuación (23) y (24) en la (20)

$$[L]_0 = [L] \left(1 + \frac{[P]_0}{K_1} + \frac{[P]_0^2}{K_1 K_2} \right) \quad (26)$$

Despejando [L] de la ecuación 26 e igualando a $[L]=[L]_0 - [PL] - [PL_2]$, tenemos:

$$[L] = \frac{K_1 K_2 [L]_0}{K_1 K_2 + K_2 [A]_0 + [A]_0^2} \quad (27)$$

Adicionando los valores de anisotropía, de la ecuación 22 y reemplazando $[L]=[L]_0 - [PL] - [PL_2]$,tenemos:

$$R_{obs} = r_L[L]_0 + [PL](r_{PL} - r_L) + [PL_2] (r_{PL_2} - r_L) \quad (28)$$

Sustituyendo las ecuaciones 23y 24, de la forma $[PL] = \frac{[P]_0[L]}{K_1}$ y $[PL_2] = \frac{[P]_0^2[L]}{K_1 K_2}$, luego:

$$r_{obs} = r_L[L]_0 + \frac{[P]_0[L]}{K_1} (r_{PL} - r_L) + \frac{[P]_0^2[L]}{K_1 K_2} (r_{PL_2} r_L) \quad (29)$$

A partir de ahora consideraremos a $r_L[L]_0 = r_i$ o anisotropía inicial. Ahora en la ecuación anterior (ecuación 29) reemplazamos la ecuación 27, posteriormente eliminamos términos semejantes, obteniendo así:

$$r_{obs} = r_i + \left(\frac{[L]_0}{K_1 K_2 + K_2 [P]_0 + [P]_0^2} \right) (K_2 [P]_0 (r_{PL} - r_L) + [P]_0^2 (r_{PL_2} - r_L)) \quad (30)$$

$$r_{obs} = r_i + \left(\frac{K_2 [P]_0 (r_{PL} - r_L) [L]_0 + [P]_0^2 (r_{PL_2} - r_L) [L]_0}{K_1 K_2 + K_2 [P]_0 + [P]_0^2} \right)$$

Con el propósito de reducir términos, realizaremos las siguientes consideraciones:

$$\Delta r_{PL} = (r_{PL} - r_L) [L]_0 \quad (31)$$

$$\Delta r_{PL_2} = (r_{PL_2} - r_L) [L]_0 \quad (32)$$

Finalmente, reemplazamos las ecuaciones 31 y 32 en la ecuación 30, teniendo así:

$$r_{obs} = r_i \left(\frac{\Delta r_{PL} [P]_0 K_2 + \Delta r_{PL_2} [P]_0^2}{K_1 K_2 + K_2 [P]_0 + [P]_0^2} \right) \quad (33)$$

1.8 Cooperatividad

La cooperación es un concepto central para la comprensión del reconocimiento molecular y el auto-ensamblaje supramolecular. Muchas proteínas están compuestas de subunidades y tienen múltiples sitios de unión a un ligando específico, de esta forma la cooperatividad surge de la interacción de dos o más subunidades de una proteína, de modo que el sistema como un todo se comporta de manera diferente, frente a las expectativas basadas en las propiedades de sus interacciones individuales (considerando que estas actúan aisladamente). De esta forma el acoplamiento de las interacciones puede conducir a una cooperatividad positiva o negativa, dependiendo de si la interacción es favorecida o desfavorecida por otra previa [48].

Estimar el número de sitios receptores de una proteína y evaluar el proceso de unión que desarrolla la misma, requiere del análisis de un espectro de unión y la selección de un modelo teórico que se adapte a los datos experimentales, por ende, resulta esencial evaluar la existencia de cooperatividad, con el fin de describir la situación en donde la ocupación de un sitio cambia la afinidad por el ligando en otro sitio. Existen muchos tratamientos de interacciones de unión cooperativa, dos de los más usados son el análisis de las gráficas de Scatchard y Hill [49].

Uno de los primeros estudios acerca del comportamiento de las proteínas cooperativas fue realizado por Hill en 1919 [50], en donde explico el comportamiento sigmoide de la unión del oxígeno a la hemoglobina, suponiendo el caso extremo de máxima cooperatividad positiva, es decir considerando que la unión puede representar una reacción todo o nada para una proteína con n sitios de unión al ligando. De esta forma relacionando la constante de disociación de los n ligandos derivo una ecuación que reflejaba un comportamiento intermedio entre un modelo de unión de una proteína con máxima cooperatividad de una proteína no cooperativa, así permite diferenciar el tipo de cooperatividad (de pendiendo del tipo de grafica sea más o menos pronunciada). Este análisis permite diferenciar entre cooperatividad y múltiples sitios de unión, pues considera posible que no todos los sitios de receptores sean independientes, en otras palabras, relaciona la fracción ocupada, de un receptor con un ligando dado, esto es definido como la cantidad de sitios de unión unidos al ligando dividido por la cantidad total de sitios de unión al ligando, represenado por (ecuación 34) [51]:

$$\bar{Y} = \frac{[\text{sitios de unión}]}{[\text{sitios de unión}] + [\text{sitios de no unión}]} = \frac{[\text{sitios de unión}]}{[\text{sitios totales}]} \quad (34)$$

Cuando $\bar{Y} = 0$, la proteína carece de sitios de unión, mientras que un valor de $\bar{Y} = 1$ indica que esta se encuentra completamente saturada. Hill a través de sus observaciones, acerca de la unión del oxígeno a la hemoglobina, sugiriendo la siguiente relación:

$$\bar{Y} (\text{fracción ocupada}) = \frac{[L]_L^n}{K_d + [L]_L^n} \quad (35)$$

Donde n es la pendiente del grafico de Hill, \bar{Y} es la fracción ocupada y K_d la constante de disociación aparente. Considerando que $[L]_L = [L]_T - [B]$, la ecuación 36 sería:

$$B = \frac{([L]_T - [B])[R]_T}{K_d + ([L]_T - [B])} \quad (36)$$

Desarrollando la ecuación 36, tendríamos:

$$B = \frac{[R]_T[L]_T - [R]_T B}{K_d + [L]_T - B} \quad (37)$$

Igualando a cero, la forma cuadrática es:

$$0 = [B]^2 - [B](K_d + [L]_T + [R]_T) + [R]_T[L]_T \quad (38)$$

A partir de la formula cuadrática, la solución de la ecuación anterior sería:

$$\text{Log} \frac{[B]}{[R]_T - [B]} = n[\log[L]_L - \log K_d] \quad (39)$$

Esta ecuación se representa gráficamente como como $\text{Log } \frac{[B]}{[R]_T - [B]}$ vs $\text{Log } [L]_L$, donde la intersección con el Y es $-\text{Log } K_d$ y la pendiente n_H es el coeficiente de Hill (**Figura 10**) [48,49].

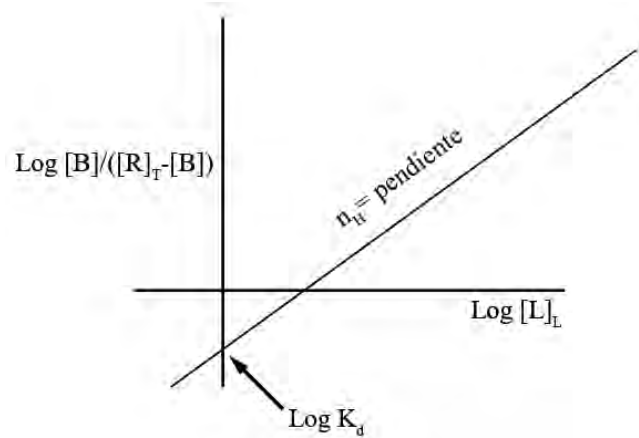
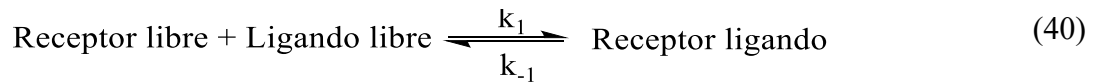


Figura 10. Grafica clásica de Hill

De esta forma sí el coeficiente de Hill es representa valores de $n_H < 1$, el sistema presenta cooperatividad negativa y positiva si $n_H > 1$. A través del coeficiente no es posible determinar el número de sitios interactuantes, ya que este es un coeficiente de interacción, únicamente puede reflejar si existe o no cooperatividad.

De igual forma, las gráficas de Scatchard se han usado ampliamente, como indicador de la existencia de cooperatividad entre una proteína y un ligando. Para sustraer información relevante de estos dos métodos y comprender sus bases, debemos considerar un sistema en equilibrio donde:



Relacionando la ley de acción de masas y las constantes de velocidad:

$$\frac{[\text{Ligando}]_{\text{Libre}}[\text{Receptor}]_{\text{Libre}}}{R:L} = \frac{[L]_L[R]_L}{[B]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d \quad (42)$$

Asumiendo que $B = R:L$ y $[R]_T = [R]_L + [B]$, podemos reescribir la ecuación como:

$$K_d = \frac{[L]_L[R]_T - [B]}{[B]} \quad (43)$$

Despejando el termino $\frac{[B]}{[R]_T}$, la ecuación 43 quedaría:

$$\frac{[L]_L}{K_d + [L]_L} = \frac{[B]}{R_T} \quad (44)$$

Donde la relación $\frac{[B]}{[R]_T}$ se le conoce como fracción ocupada. Reordenando la ecuación 44:

$$\frac{[B]}{[L]_L} = \frac{[R]_T}{K_d} - \frac{[B]}{K_d} \quad (45)$$

La cual se ajusta a la ecuación de una recta ($y = mx + b$; $B/[L]_L$ vs. B) donde R_T/K_d es la intersección y, R_T es la intersección x, mientras $1/K_d$ es la pendiente de la recta (**Figura 11**) [48].

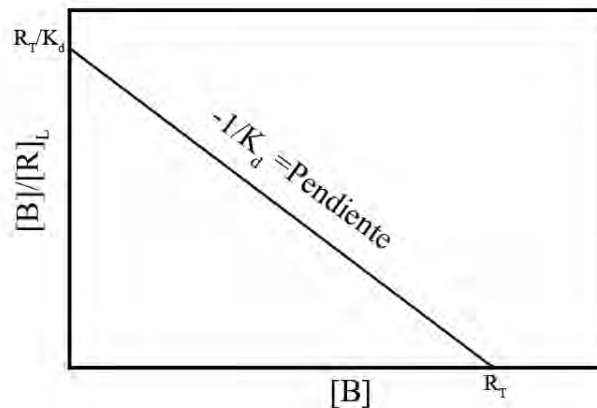


Figura 11. Modelo de Scatchard

Analizar correctamente un diagrama de Scatchard, pues ser complicado, pues es posible obtener diagramas que representen una curva cóncava hacia arriba, que puede indicar la presencia de uniones no específicas o NSB por sus siglas en inglés non-specific binding (es decir, NSB debe ser restado radialmente de la curva de Scatchard). Razón por la cual, es esencial recurrir no solo a las gráficas de Scatchard, de igual forma analizar los datos obtenidos a través del coeficiente de Hill [52].

Las posibles graficas que se pueden obtener a través de la curva de Scatchard, se muestran en la **Figura 12B**, donde una curva cóncava hacia arriba puede indicar la presencia de cooperatividad negativa entre los receptores. Sin embargo, resulta difícil diferenciar entre cooperatividad negativa y NSB en la parcela de Scatchard (comúnmente se sospecha cooperatividad negativa sólo cuando otros datos apoyan la posibilidad). Mientras una curva cóncava hacia abajo indica cooperatividad positiva (**Figura 12C**).

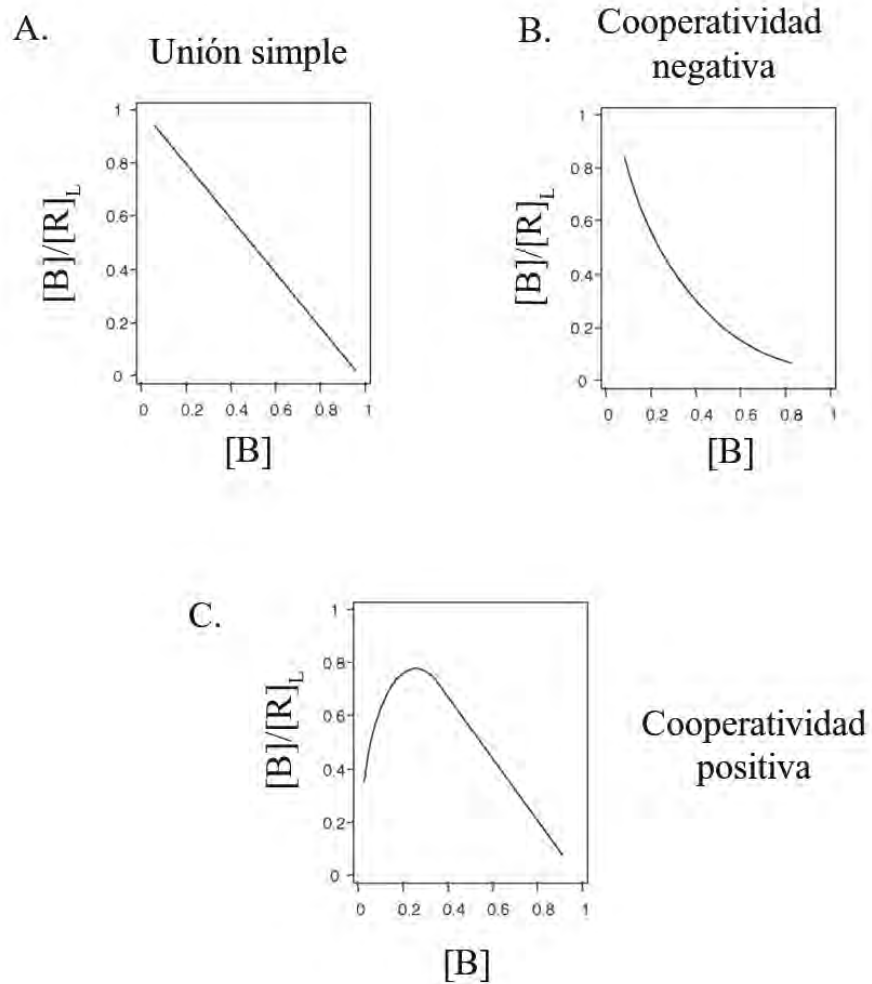


Figura 12. Apariencias esperadas en las gráficas de Scatchard

2 ANTECEDENTES

El ribosoma es un complejo macromolecular y auto-organizado es esencial para la vida en todas las células, en virtud de su papel en la traducción del código genético a proteínas. Diversos estudios han ampliado la comprensión sobre la actividad catalítica del ribosoma, su síntesis (proceso conocido como biogénesis ribosomal) y su relación con diversos trastornos congénitos (ribosomopatías) [15,53–55]. Debido a que la mayoría de los factores involucrados en la biogénesis ribosomal y las proteínas estructurales *per se* son esenciales para la supervivencia celular, resulta sorprendente que defectos en la biogénesis del ribosoma conduzcan a una enfermedad detectable en lugar de letalidad embrionaria. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la biogénesis ribosomal y las bases moleculares relacionadas con la ribosomopatía conocida como el Síndrome de Shwachman-Diamond. En particular hemos estudiado el mecanismo de interacción entre la proteína EFTUD1 (Efl1 ortólogo en levadura) y SBDS (Sdo1 ortólogo en levadura) [56,57], siendo SBDS el responsable principal del de generar el síndrome.

Diversos estudios sugieren que la proteína SBDS actúa en la regulación de la apoptosis, la quimiotaxis y en la biogénesis ribosomal [5]. En el caso particular de la biogénesis ribosomal, SBDS junto con la GTPasa conocida como el factor de elongación tipo 1 o EFL1 (cuyo ortólogo en humanos es EFTUD1) son las encargadas de liberar a el factor de anti-asociación Tif6 (eIF6 en eucariotas) de la subunidad ribosomal pre-60S para permitir el ensamblaje del ribosoma maduro [25,29]. Los antecedentes inmediatos que dieron lugar a el trabajo que se presenta en esta tesis se describen a continuación.

Un primer trabajo evaluó a partir de ensayos de doble híbrido las regiones involucradas en la interacción entre Efl1 y Sdo1, usando como señuelo tanto a la proteína Sdo1, como una construcción consistente únicamente de los dominios 2+3 [56]. Las dos proteínas de Sdo1 fueron fusionadas al dominio de unión a ADN que reconoce la secuencia promotora *LexA* que a su vez controlaba la expresión del gen reportero *LacZ*, mientras que la Efl1 fue fusionada al dominio de transactivación Gal4. De tal modo, que la interacción entre las proteínas se evaluó mediante la expresión del gen reportero siguiendo la actividad de β -galactosidasa. En este trabajo se demostró que los dominios 2-

3 de Sdo1 interaccionan directamente con los dominios 1-2 de Efl1(Figura 13).

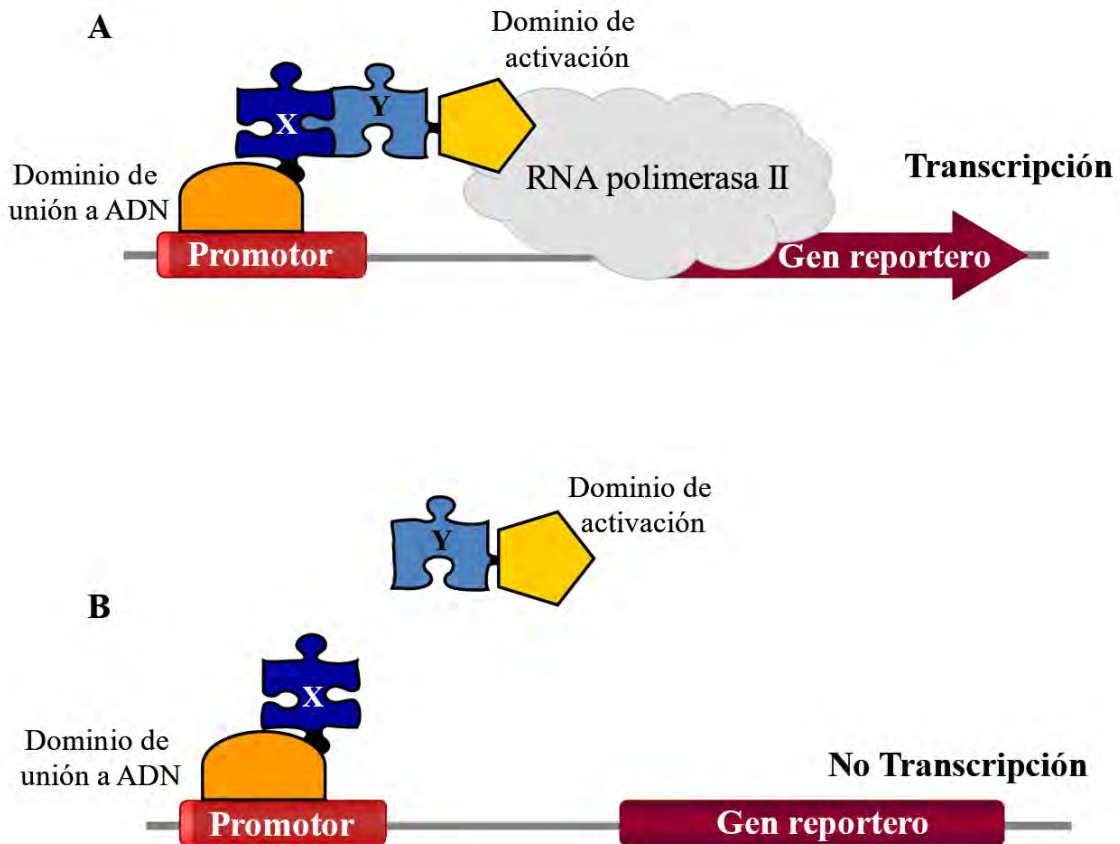


Figura 13. Sistema de doble híbrido. [A] Cuando la proteína Y (Efl1 silvestre y sus dominios estructurales) es capaz de interactuar con la proteína señuelo, representada por X (la proteína Sdo1 completa y una proteína Sdo1 trunca que comprende los dominios 2+3 (Sdo1 D2-D3), el factor de transcripción se reconstituye, quien se encarga de reclutar a la RNA polimerasa II y transcribir el mRNA del gen mensajero. (B) Representa el caso 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 (imagen modificada de Brückner 2009 [58]).

Un segundo trabajo realizado en el grupo de investigación se enfocó en estudiar el efecto de las mutaciones no-sinónimas en el Síndrome Shwachman-Diamond en la interacción con la GTPasa EFTUD1 mediante anisotropía de fluorescencia.[57] Los resultados mostraron que la interacción entre SBDS y EFTUD1 se describe adecuadamente mediante un modelo de unión a dos sitios distintos con cooperatividad positiva. La interacción de EFTUD1 con las distintas mutantes no-sinónimas evaluadas (R19Q, K67E, R126T, S143L, I167T, R175W y I212T) se vio debilitada en todos los casos. Los cambios en la magnitud de las constantes de disociación de las diferentes

mutantes resultaron informativos para entender el modo de unión entre ambas proteínas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Constantes de disociación de la interacción entre EFTUD1 y mutantes no-sinónimas (aquellas que produce una alteración en el polipéptido codificado) en la proteína SBDS descritas en pacientes con el Síndrome de Shwachman-Diamond.

Dominio en donde se localiza la mutación	SBDS	K _{d1} (μM)	K _{d2} (μM)
-	Silvestre	5.4 ± 1	0.4 ± 0.04
1	R19Q	4.4 ± 1.5	3.4 ± 0.9
1	K67E	7.2 ± 2	3 ± 1
2	R126I	9.3 ± 1.7	2.5 ± 0.2
2	S143L	≥ 1.85	≥ 93.8
2	I167T	10.1 ± 3	1.4 ± 0.2
3	R175W	4.2 ± 0.7	1.8 ± 0.4
3	I212T	ND	ND

Los datos de la **Tabla 1** muestran que el primer evento de unión es de menor afinidad que el segundo lo cual se explica debido al fenómeno de cooperación positiva. Sin embargo, al comparar los órdenes de magnitud de las constantes de disociación entre la proteína silvestre y las mutantes en el dominio 1 (R19Q y K67E) observamos que el primer evento de unión no se ve modificado, pero hay una disminución en un orden de magnitud de la afinidad en el segundo sitio de interacción. Puesto que estas mutaciones se encuentran en el dominio 1 sugiere que el segundo sitio de unión ocurre en este dominio de la proteína. Para el caso de las mutantes R126I, S143L y I167T localizadas en el dominio 2 de SBDS se observa que ambos eventos de unión se ven alterados. Lo que sugiere que el primer sitio de unión de SBDS con EFTUD1 ocurre en su dominio 2 y al verse debilitada la interacción en esta región también repercute en el segundo evento de unión en el dominio 1 por efecto de cooperatividad. Por otra parte, para el caso de la mutación I212T localizada en el dominio 3 no se obtuvo respuesta alguna por anisotropía de fluorescencia asumiendo que se debe a la falta de unión con este dominio. Así, los datos sugerían que todos los dominios de SBDS participaban en la interacción EFTUD1, pero solo se evidenciaban dos sitios de interacción a pesar de que SBDS está compuesta por tres dominios (ver **Figura 14**). Por ello, en este trabajo se decidió disectar a la proteína SBDS en sus diferentes dominios y, combinaciones entre ellos para entender mejor su interacción con EFTUD1.

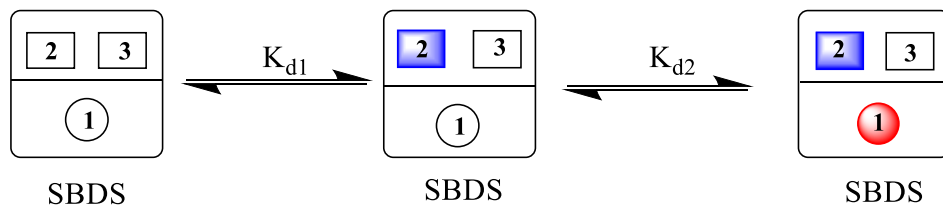


Figura 14. Representación de los sitios de interacción de la SBDS con la EFTUD1. El primer evento de unión se cree, esta ubicado en el dominio 2 de SBDS, mientras el segundo sitio de unión se encuentra en el dominio 1 (Se omite la participación de EFTUD1 para dar más simplicidad al esquema).

3 HIPÓTESIS

Si la proteína SBDS silvestre muestra una unión a dos sitios distintos con cooperatividad positiva, como se encontró en estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación (5,43 μM y 0,42 μM , respectivamente), se esperaría que el dominio 2 exhibiera una fuerte unión, mientras la segunda unión con el dominio 1 de SBDS ocurriera bajo una afinidad menor y el dominio 1+2 de SBDS mostraría constantes de disociación K_{d1} y K_{d2} cercanos a los enunciados anteriormente para la SBDS silvestre.

4 OBJETIVOS

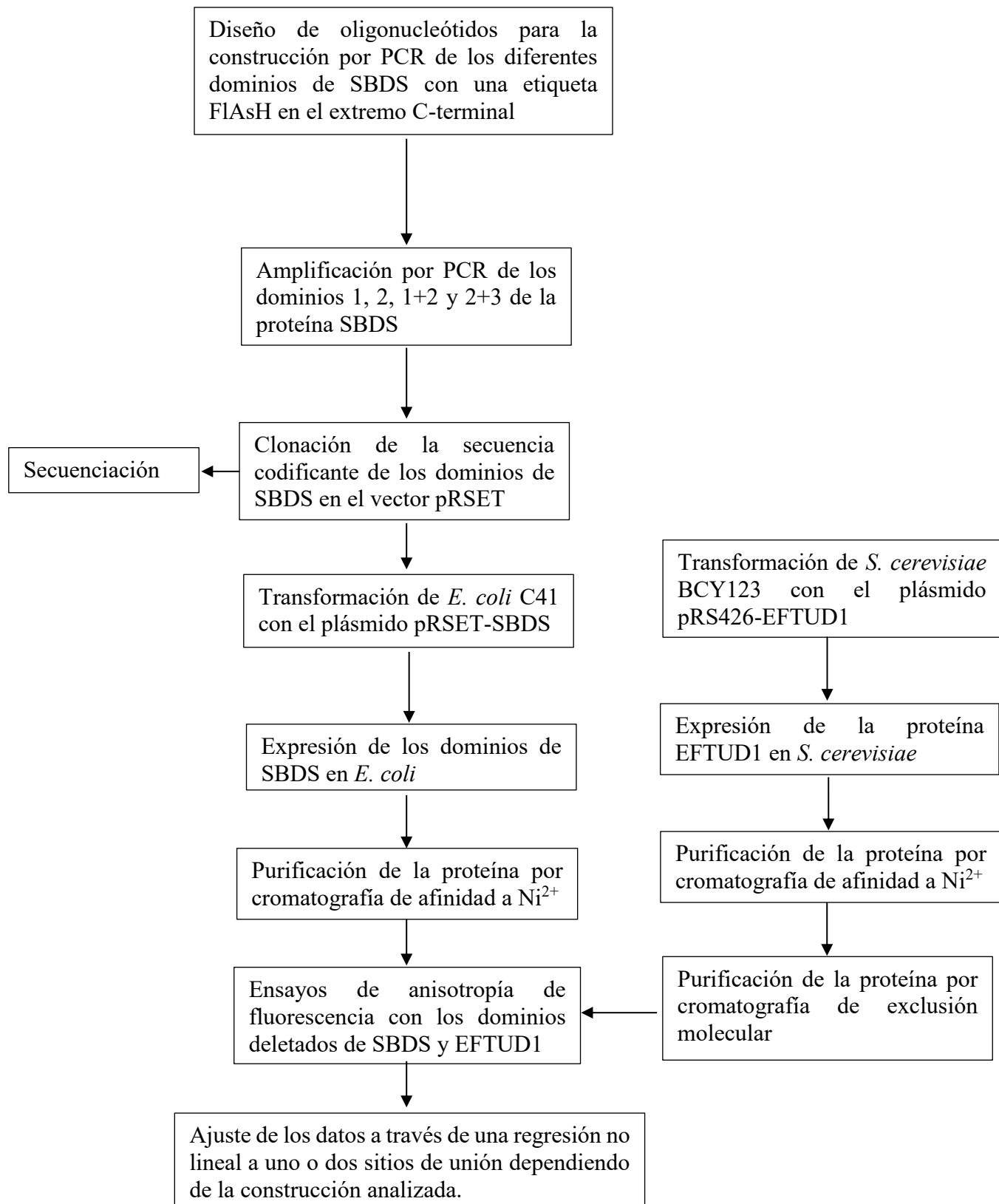
4.1 Objetivo general

Identificar los dominios de SBDS involucrados en la interacción con la GTPasa EFTUD1 mediante ensayos por anisotropía de fluorescencia.

4.2 Objetivos específicos

- Diseñar construcciones de la proteína SBDS correspondientes únicamente a las secuencias codificantes para el dominio 1, el dominio 2, el dominio 1+2 y por último el dominio 2+3, a partir de la SBDS silvestre.
- Clonar los dominios anteriores en vectores que permitan expresarlos en células bacterianas con una etiqueta FLAsH en el extremo C-terminal.
- Sobre-expresar en *Escherichia coli* los dominios 1,2, 1+2 y 2+3 de SBDS, y purificarlos mediante técnicas convencionales de cromatografía de proteínas.
- Sobre-expresar en *Saccharomyces cerevisiae* a la GTPasa EFTUD1, y purificarla mediante técnicas convencionales de cromatografía de proteínas.
- Describir las constantes de disociación de EFTUD1 con los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 de SBDS mediante anisotropía de fluorescencia.

5 ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos químicos

Los reactivos químicos y el antibiótico usado (ampicilina), se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). Los componentes de los medios de cultivo se compraron a ForMedium. El inhibidor de proteasas de amplio espectro, ProBlock sin EDTA, así como el IPTG se obtuvieron de la compañía GoldBio Technology. Los aminoácidos no naturales se adquirieron de la compañía Bachem Americas, Inc (Torrance, CA, EUA). Las unidades para concentración de proteínas por centrifugación, Centricon y Centriprep, fueron comprados a Merck Millipore.

6.2 Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo líquido, utilizado en este trabajo se enlista en la **Tabla 2**. Para los medios de cultivos sólidos se adicionó 1.5% de agar a la composición descrita en los medios líquidos.

Tabla 2. Componentes de los diferentes medios de cultivo usados durante el proyecto.

Medio de cultivo	Composición
SD-URA líquido	Se disolvió en 1.5 L de agua destilada (dH_2O) 12 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 16.5 g de casaminoácidos, 200 mg de adenina y 150 mg de tirosina.
LB líquido	Se disolvió en 1 L de agua destilada 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona.

6.3 Microorganismos

Las cepas de *E. coli* y *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se describen a continuación:

- *S. cerevisiae* BCY123: *MATa*, *CAN1*, *ade2*, *trp1*, *ura3-52*, *his3*, *leu2-3, 112*, *pep4::HIS⁺*, *prb1::LEU⁺*, *bar1::HisG⁺*, *lys2::pGAL1/10-GAL4*

Esta cepa es deficiente en proteasas y permite la selección de cepas auxótrofa a uracilo y adicionalmente sobre-expresa el activador transcripcional Gal4 durante la inducción con galactosa.

- *E. coli* C41 (DE3): *F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)*

Esta cepa puede expresar proteínas que estén bajo el control del promotor del *gen1* del bacteriófago T7 ya que a su vez contiene en su genoma una copia del gen de la ARN polimerasa T7, bajo el control de promotor lactosa. El gen de interés a su vez bajo el control

del operador *lac* también por lo que su expresión es inducida por isopropil- β -D1-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG no es parte de ninguna vía metabólica y por lo tanto no es utilizado por la célula, lo que asegura que la concentración de IPTG añadida permanece constante, haciéndolo un inductor gratuito del operón *lac*.

6.4 Soluciones y amortiguadores de pH

Los reguladores de pH y soluciones usadas durante el proyecto se describen en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de los reguladores de pH y diferentes amortiguadores usados durante el proyecto.

Purificación de la proteína EFTUD1	
Lisis	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM β -mercaptoetanol, 30 mM imidazol.
Alta sal	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl
Elución de la columna Ni ²⁺	50 mM Tris-HCl pH 6.0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 500 mM imidazol.
Cromatografía de exclusión molecular	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EDTA.
Purificación de la proteína SBDS-Flash	
Lisis	50 mM HPO ₄ ⁻² /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 20 mM imidazol.
Lisis con baja concentración de sal	50 mM HPO ₄ ⁻² /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 20 mM imidazol.
Elución de la columna Ni ²⁺	50 mM HPO ₄ ⁻² /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 6.0, 250 mM NaCl, 300 mM imidazol
Columna de intercambio iónico	50 mM HPO ₄ ⁻² /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 6.0, 50 mM NaCl
Elución de columna de intercambio iónico	50 mM HPO ₄ ⁻² /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 6.0, 1.0 M NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol
Diferentes amortiguadores	
Para el gel concentrador de electroforesis SDS-PAGE	0.5 M Tris-HCl pH 6.8
Para el gel separador de electroforesis SDS-PAGE	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
Amortiguador de corrida para electroforesis SDS-PAGE 10X	30.0 g de Tris-base, 144.0 g de glicina y 10.0 g de SDS en 1 L de dH ₂ O
Experimentos de dicroísmo circular	50 mM HPO ₄ ⁻² /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 7.4, 50 mM de NaCl
Experimentos de anisotropía	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol

6.5 Plásmidos

Los plásmidos utilizados para la expresión de la proteína EFTUD1 fueron derivados del vector pRS426, mientras que para los vectores usados para la expresión de las proteínas SBDS-Flash silvestre y sus diferentes dominios fueron derivados del vector pRSET-A (Invitrogen). A continuación, se describen sus principales características.

6.5.1 Vector pRS426-EFTUD1

En este plásmido la secuencia codificante de EFTUDI isoforma 1 se encuentra fusionada a un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y una etiqueta de 6 histidinas (6XHis) en la región C terminal. La construcción esta insertada en el plásmido pRS426 entre los sitios NcoI y BamHI, y su expresión es regulada por el promotor GAL1 y la secuencia terminadora MAT α .

6.5.2 Vector pRSET-SBDS FIAsh

Los vectores para expresar las secuencias codificantes de los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 de la proteína SBDS humana fueron derivados del vector pRSET-A (invitrogen), y contiene además la etiqueta FIAsh (Fluorescein Arsenical Hairpin binding) formada por el péptido Cys-Cys-Pro-Gly-Cys- Cys en el extremo C-terminal y 6 histidinas (6XHis) en la región N-terminal. La principal ventaja del vector pRSET, es que permite que la proteína de interés se exprese únicamente cuando se encuentran en una célula hospedera que contenga el gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7, ya que se encuentran bajo el control de un promotor del bacteriófago T7. Debido a que la ARN polimerasa del bacteriófago T7 es inducida mediante la adición de IPTG, la mayoría de los recursos de la célula son destinados a la producción de nuestro gen de interés. Para ello nosotros usamos como célula hospedera a la cepa de *E. coli* C41.

6.6 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de las secuencias que codifican nuestras proteínas de interés se muestran en **Tabla 4**.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este proyecto.

Oligo	Secuencia 5'-3'
SBDS-D1FlashR	CGGAATTCTCATCAGCAGCAGCCCGGGCAACATACTTGAACTTCTCCTTTAGTC
His-SBDS-D2F	GGAGATATACATATGCATCACCATCACCATCACCAAGTATCAGATAAAGAAAGAC
SBDS-D2FlashR	CCGGAATTCTCAGCAGCAGCCGGGCAGCACCGAAGCCTCATGTGAGCACG

6.7 Transformación de células bacterianas

50 μ L de células competentes DH5 α o C41 se descongelaron durante 5 min en hielo. Posteriormente se les añadió 100 ng de ADN plasmídico y se colocaron en hielo por 30 min, para luego ser sometidas a un choque térmico a 42°C por 45 segundos (AccuBlock™ Digital Dry Bath) seguido de un reposo por 2 min en hielo. Las células se recuperaron en 500 μ L de medio LB mediante incubación con agitación por una hora a 37°C. Posterior a la incubación, las células se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm en una centrífuga Jouan MR1812, se decantó el medio y el botón de células se resuspendió en 100 μ L de LB para ser plaqueadas en medio sólido LB suplementado con ampicilina e incubadas durante 18 horas a 37°C.

6.8 Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

Para la purificación de ADN plasmídico a partir de células bacterianas, se obtuvo el paquete celular de 1.5 mL de cultivo crecido previamente toda la noche a 37°C. El botón celular se obtuvo por centrifugación (8000 rpm, 1 min), y las células se trataron como se describe a continuación: se agregó 100 μ L de la solución S1 (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA pH 8, RNAsa 10 mg/mL) y se resuspendió con el vórtex hasta obtener una mezcla homogénea. Después se adicionaron 1500 μ L de la solución S2 (0.2 M NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y en seguida se agregaron 150 μ L de la solución S3 (Acetato de potasio 5 M pH 4.8) agitando de igual forma por inversión. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm 10 min para eliminar restos celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo con 400 μ L de isopropanol. Esta mezcla se centrifugó a 12000 rpm 15 min y el botón se limpió con 500 μ L de una solución de etanol al 70% v/v. Finalmente, el etanol se eliminó por evaporación y el botón se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas.

6.9 Restricción de ADN

El ADN resultante de las PCR fue transformado en células de *E. coli*, de las colonias transformadas se extrajo el ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina. El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio. Las clonas que presentaron una banda en el peso esperado, fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *NdeI*, agregando 400 ng de plásmido, 1U de enzima y el amortiguador recomendado por el fabricante en un volumen final de 10 μ l. Las clonas cuyo patrón de restricción experimental coincidió con el patrón de restricción esperado se les extrajo nuevamente el ADN plasmídico, pero esta vez con el Kit de extracción Fast-n-Easy Plasmid MiniPrep (Jena Bioscience).

6.10 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis de ADN se realizó en gel de agarosa al 1% la cual se vertió en un dispositivo previamente armado, y una vez finalizada la gelificación, se retiraron los peines que dan lugar a los pozos para cargar la muestra. La electroforesis se realizó aplicando un potencial eléctrico de 90 V por hora y media. El gel se reveló colocándolo en una solución de 0.5 µg/mL de bromuro de etidio por 5 min, posteriormente en dH₂O por 10 min y exponiéndolo a la luz UV con un equipo de transiluminación Bio-Rad.

6.11 Expresión de la proteína EFTUD1

Se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* BCY123 previamente transformada con el plásmido pRS426-EFTUD1 en 20 mL de medio SD-URA suplementado con 2% de glucosa y Drop out-Ura. Este cultivo se dejó crecer toda la noche con agitación constante de 200 rpm a 30 °C. Posteriormente, se tomaron 10 mL de estas células y se inoculó 1.5 L del mismo medio hasta alcanzar una DO_{600nm} de aproximadamente 0.05 UA. Se dejó crecer sin agitación por 19 h para posteriormente incubarse con agitación constante de 200 rpm a 30 °C por 5 h más o hasta alcanzar una DO_{600nm} de 2.0 UA. Una vez alcanzado este valor, la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de 2.8% de galactosa y se incubó con agitación constante a 200 rpm y 30 °C por 16-18 h. Pasado este tiempo se colectaron las células por centrifugación a 5,000 rpm por 6 min en una centrifuga Beckman-Coulter, con rotor JA-14, finalmente el paquete celular se guardó a -20 °C. La manipulación de reactivos se llevó a cabo en zona estéril en campana de flujo laminar ESCO.

6.12 Expresión de la proteína SBDS-FLASH y sus diferentes dominios

Se inoculó una colonia de *E. coli* C41 previamente transformada con el plásmido correspondiente en 5 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Este cultivo se dejó crecer toda la noche a 37 °C con agitación constante a 200 rpm. De este cultivo, se tomaron 2 mL para inocular 1 L de medio LB suplementado con ampicilina y se incubó con agitación constante de 200 rpm a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5-0.7 UA. Alcanzado este punto, la expresión de las proteínas se indujo con 0.5 mM de IPTG para luego ser incubado nuevamente por 4-5 h. Al término de esta etapa se colectaron las células mediante centrifugación por 5 min a 6,000 rpm en una centrifuga Beckman-Coulter con un rotor JA-14. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se guardó a -20 °C. El manejo de reactivos se realizó en zona estéril en campana de flujo laminar.

6.13 Purificación de la proteína EFTUD1

Se descongeló el pellet de células provenientes del cultivo de 1.5 L y se resuspendió en 15 mL de solución amortiguadora para lisis, suplementado con 150 μ L de inhibidor de proteasas ProBlock-EDTA. La suspensión de células se vació en el contenedor de un equipo BeadBeater previamente llenado $\frac{3}{4}$ de su volumen total con perlas de vidrio ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) humedecidas con la misma solución amortiguadora hasta llenar el contenedor. Las células se lisaron por 2 min, se desmontó el contenedor y se metió al congelador por 15 min. Este proceso se repitió en dos ocasiones más aumentando el tiempo de lisis por 2.5 min obteniendo un tiempo total de ruptura de 7 min. El lisado se recuperó en tubos y se centrifugó a 15,500 rpm durante 55 min en una centrífuga Beckman-Coulter, rotor JA-17. El sobrenadante se filtró por una membrana hidrofílica de 0.45 μm (Merck Millipore).

La solución obtenida y previamente filtrada se purificó a través de cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} en una columna GE Healthcare, con un volumen de cama de 5 mL. La cual se equilibró pasando 15 mL de dH_2O , seguidos de 15 mL de la solución amortiguadora de lisis (composición descrita en la **Tabla 3**). Luego se pasó el volumen de muestra a través de la columna y se hizo un lavado de 10 mL con amortiguador para lisis. Para mejorar el proceso de purificación se pasaron 30 mL de una solución amortiguadora de alta sal (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl) seguido de 15 mL del amortiguador de lisis. Por último, la proteína se eluyó con 20 mL del amortiguador correspondiente y un lavado de 10 mL con el mismo amortiguador. Para la recuperación de la columna, se hizo un lavado de 15 mL de agua y 15 mL de etanol al 20% para su almacenamiento. Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada previamente por una membrana hidrofílica con un poro de 0.45 μm . Posteriormente, a partir de la elución en la columna de Ni^{2+} , descrita anteriormente, se concentró en un Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel de celulosa regenerada con un límite nominal de peso molecular de 100 kDa hasta obtener 1 mL de la muestra.

Posteriormente la solución se pasó por una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG (GE Healthcare), la cual se equilibró con 150 mL de solución amortiguadora para exclusión molecular, luego se inyectó el mililitro obtenido después de concentrar la proteína eluida de la columna de afinidad a Ni^{2+} a un flujo de 1 mL/min.

6.14 Purificación de la proteína SBDS-FIAsH y sus diferentes dominios

El paquete celular correspondiente se resuspendió en 20 mL de amortiguador de fosfatos para su ruptura y se sonicó en hielo por 5 min totales con ciclos de 10 s encendido y 50 s apagado en un Misonix Sonicator 3000. La solución anterior se centrifugó a 15,000 rpm por 50 min, la fase soluble se filtró por una membrana de 0.22 μm (Merck Millipore) y la proteína se purificó a través de una columna de afinidad a Ni^{2+} como se describe en la **Sección 6.13** con la diferencia de los tipos de amortiguadores que se usaron, así como la eliminación del paso de alta concentración de sal. Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada previamente por una membrana hidrofílica de un poro de 0.45 μm .

Las diferentes construcciones de la proteína SBDS (dominios D1, D2, D1+2, D2+3) se purificaron a través de una columna de afinidad a Ni^{2+} como se describe en la **Sección 6.13**, con la diferencia de los tipos de amortiguadores que se usaron, así como la eliminación del paso de alta concentración de sal y la adición de un lavado con un amortiguador compuesto por 50 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 20 mM imidazol (baja concentración de sal). Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada previamente por una membrana hidrofílica de un poro de 0.45 μm . La muestra obtenida de la cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} de los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 se filtraron a través de una membrana hidrofílica de 0.22 μm (Merck Millipore) para ser purificadas por una columna de intercambio catiónico HiTrap SP FF (GE Healthcare) de 5 mL. La columna se lavó con 15 mL de dH_2O y se equilibró 15 mL del amortiguador correspondiente. Se pasó la muestra a través de la columna y luego se hizo un lavado con 15 mL del mismo amortiguador. Por último, la proteína se eluyó con 10 mL del amortiguador de elución.

6.15 Electroforesis de proteína en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para evaluar el proceso de purificación de las proteínas se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 7.5% para las proteínas EFTUD1 y al 15% para los dominios de la SBDS. Para visualizar las proteínas los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250. El gel separador se preparó mezclando 2763 μL de agua dH_2O , 1250 μL de la respectiva solución amortiguadora de pH, 50 μL de SDS 10%, 937 μL de acrilamida 40% para el gel de 7.5% ó 1250 μL para el gel de 12%, 8 μL de TEMED y 50 μL de persulfato de amonio. El gel concentrador se preparó mezclando 1267 μL de agua dH_2O , 500 μL de la solución amortiguadora de pH

correspondiente, 20 μL de SDS 10%, 203 μL de acrilamida 40%, 6 μL de TEMED y 50 μL de persulfato de amonio. Una vez mezclados los componentes del gel separador, la mezcla se vertió en el dispositivo previamente armado y en la superficie se agregaron 100 μL de isopropanol 60% para evitar que el borde superior fuese irregular. Al finalizar la polimerización, se retiró el isopropanol realizando un lavado con agua, se vertió la mezcla del gel concentrador hasta el borde del dispositivo y se insertaron los peines que darían lugar a los pozos para cargar las muestras. La electroforesis se realizó aplicando un potencial eléctrico de 100 V durante aproximadamente 80 minutos. El gel se reveló colocándolo primero en solución fijadora (40% etanol, 10% ácido acético) por 15 min y posteriormente en solución teñidora con Azul de Coomassie por 15 min. Finalmente, el gel se destiñó con agua destilada durante una hora para permitir una buena visualización de las bandas de proteína.

6.16 Espectrometría de masas

La masa molecular de los diferentes dominios de SBDS se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-time of flight). Las proteínas se prepararon a una concentración de 1 mg/mL y se mezclaron en proporción 1:1 con una matriz de ácido sinapínico (ácido 3-(4-hidroxi-3,5dimetoxifenil) pro-2-enóico) en 30% acetonitrilo, 70% agua y 0.1% TFA. Los espectros de masas fueron adquiridos con el equipo Microflex Bruker Daltonics. Los controles utilizados para calibrar el equipo son proteínas estándar que poseen una masa por arriba y una por debajo de la esperada. se utilizó el modo lineal positivo, donde los iones viajan por una trayectoria de vuelo lineal y su relación masa/carga (m/z) se determina por el tiempo que tardan en llegar al detector. De esta forma aquellas proteínas de mayor masa deben tener velocidades más bajas y por lo tanto requerirán tiempos más largos para alcanzar el detector, formando así la base para la determinación m/z . La potencia del láser fue del 50% y se realizaron 200 disparos por muestra.

6.17 Cuantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína se determinó mediante espectrofotometría de absorción en el UV a 280 nm en un espectrofotómetro Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies). Para la determinación se ajustó como blanco el buffer en el que se encontraban cada proteína y a partir de la ecuación (45) correspondiente a la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración.

$$A = \varepsilon * L * C \quad (45)$$

Donde A corresponde a la luz absorbida, C la concentración de la muestra (M), ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), L corresponde a la longitud que recorre la luz a través de la muestra (cm). Los valores de los coeficientes de extinción molar a 280 nm se calcularon a partir de la composición de aminoácidos de la proteína a través del software ExpASy-ProtParam tool,^a los cuales se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 5**).

Tabla 5. Coeficientes de extinción molar de los diferentes dominios de SBDS y de la proteína EFTUD1.

	SBDS-D1	SBDS-D2	SBDS-D1+2	SBDS-D2+3	EFTUD1	Lumio Green
$\varepsilon_{280nm} (M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	6990	2980	9970	4470	105,770	12,500
$\varepsilon_{508nm} (M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	-	-	-	-	-	41,000

Para la cuantificación de proteínas marcadas con el reactivo biarsénico Lumio Green se obtuvo la absorbancia a dos longitudes de onda, 508 nm y 280 nm, debido a que este reactivo absorbe a ambas longitudes de onda. La absorción a 280 nm se describe como la ecuación (46).

$$A_{280 \text{ nm}} = C * L * \varepsilon_{280 \text{ nm}}^{SBDS-DX} + C * L * \varepsilon_{280 \text{ nm}}^{lumio} \quad (46)$$

Conociendo la concentración de proteína total, por sustitución de la ecuación anterior (2), y la concentración de proteína marcada con Lumio Green a partir de la ecuación 1 a una longitud de onda de 508 nm, podemos determinar el porcentaje de proteína marcada a través de la siguiente ecuación (47):

$$\frac{[Proteína \text{ marcada}]_{508 \text{ nm}}}{[Proteína \text{ total}]_{280 \text{ nm}}} * 100 = \% \text{ proteína marcada} \quad (47)$$

6.18 Dicroísmo circular (CD)

El contenido de estructura secundaria de las proteínas se analizó por dicroísmo circular en la región del UV lejano. La muestra se preparó dializando los cuatro dominios evaluados contra el amortiguador de fosfatos de 25 mM PO_3^{4-} (pH 7.4) a 25°C. Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM, en un espectropolarímetro Chirascan V100 en el UV lejano (190-260nm), a temperatura constante de 20 °C, utilizando una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y una concentración de 6,17, 8 y

^a <http://web.expasy.org/protparam/>

9 μM de las proteínas SBDS-D1, 2, 1+2 y 2+3, respectivamente. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido de 20 nm/min. Los resultados se expresan en valores de elipticidad molar, en unidades de $\cdot\text{grados} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$ (48):

$$\theta_{Molar} = \frac{\theta_{obs} * Mw}{[P] \cdot d} \quad (48)$$

Donde θ_{Molar} es la elipticidad molar, θ_{obs} es el valor de elipticidad en grados, Mw es el peso molecular de los aminoácidos, [P] es la concentración de proteína en g/cm^3 y d es el paso óptico. La determinación del porcentaje del contenido de estructura secundario se estimó utilizando el programa de deconvolución BeStSel^b [59].

6.19 Ensayos de anisotropía de fluorescencia

6.19.1 Marcaje con el reactivo Lumio Green

La proteína SBDS silvestre y sus respectivas mutantes se diseñaron de tal forma que en el extremo C-terminal tuvieran un motivo de seis residuos (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) conocido como etiqueta FLAsH (Fluorescein Arsenical Hairpin binding) capaz de unirse al reactivo 4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il)fluoresceína (LumioTMGreen) y emitir una fluorescencia característica (**Figura 15**).

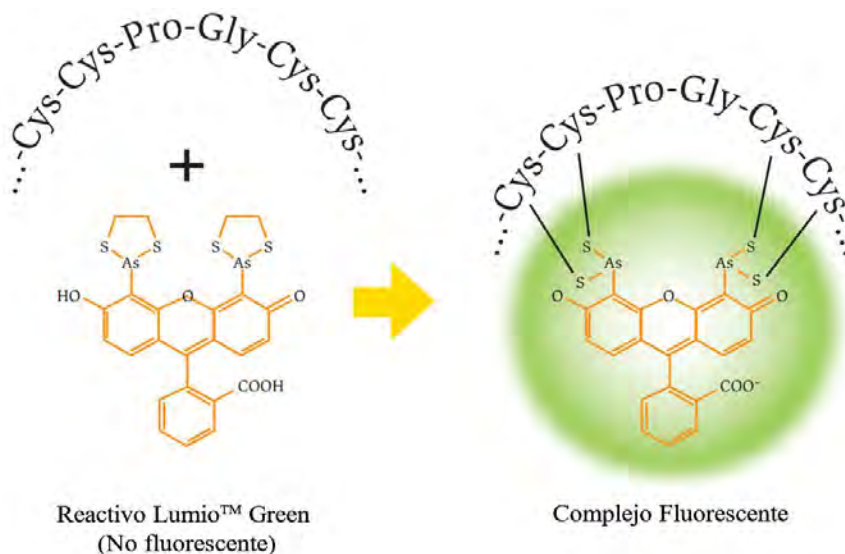


Figura 15. Interacción esperada entre la etiqueta FLAsH con el reactivo Lumio Green.

^b <http://bestsel.elte.hu/information.php>

Para la reacción de marcaje se mezclaron 3 nmol de proteína y 6 nmol del reactivo Lumio™ Green en el amortiguador para experimentos de anisotropía descrito en la **Tabla 3**, con 5 mM de β -mercaptoetanol para mantener reducidos los residuos de cisteínas por 16 horas y luego se dializó toda la noche en el mismo amortiguador.

6.19.2 Experimentos de anisotropía de fluorescencia

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM, en un espectrofluorómetro de ISS. Se tituló a través de adiciones de 1 μ L de EFTUD1 con una concentración variable de (80-100 μ M) a una disolución 0.1 μ M de los diferentes dominios de SBDS marcados. La medición se realizó a 25°C en el amortiguador correspondiente con un tiempo de agitación de 30 s y 5 min de incubación. Las mediciones se hicieron excitando a una longitud de onda de 495 nm y una emisión de 540 nm. Las resoluciones espectrales de excitación y de emisión fueron de 8 nm. El valor de anisotropía (r) se obtuvo de relacionar el valor de la intensidad de emisión en paralelo y en perpendicular a partir de la siguiente ecuación (49):

$$r = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2G * I_{VH}} \quad (49)$$

donde I_{VV} es la intensidad con una excitación y emisión en vertical, I_{VH} es la intensidad con una excitación en vertical y una emisión en horizontal y G es el factor G , el cual es una corrección experimental por la desviación de la polarización y se describe como la ecuación (50):

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (50)$$

donde I_{HV} es la intensidad con una excitación horizontal y una emisión vertical, y I_{HH} es la intensidad con una excitación y emisión en horizontal. El factor G se calculó al inicio de cada experimento. Los datos de anisotropía de fluorescencia fueron analizados a través de una regresión no lineal con el programa OriginPro 2017.

6.19.3 Análisis de datos

Los datos experimentales se ajustaron al modelo más simple que mejor los describió, mostrados en la **Tabla 6** y desarrollados de forma individual en la **Sección 1.7**.

Tabla 6. Modelos de unión para la interacción proteína-ligando.

Modelo de unión	Equilibrio	Ecuación
Un sitio de unión	$P + L \xrightleftharpoons{K_{d1}} PL$	$r_{obs} = r_i + \frac{[P]_0 \Delta r_{PL}}{K_1 + [P]_0}$
Dos sitios de unión idénticos	$P + 2L \xrightleftharpoons{K_{d1}} PL_2$	$r_{obs} = r_i + \frac{\Delta r_{PL} [P]_0^2}{K_{d1} + [P]_0^2}$
Dos sitios de unión diferentes	$P + L \xrightleftharpoons{K_{d1}} PL + L \xrightleftharpoons{K_{d2}} PL_2$	$r_{obs} = r_i \left(\frac{\Delta r_{PL} [P]_0 K_2 + \Delta r_{PL_2} [P]_0^2}{K_1 K_2 + K_2 [P]_0 + [P]_0^2} \right)$

Donde r_{obs} corresponde a los valores de anisotropía observada, r_i es el valor inicial de anisotropía de la SBDS-FIAsH libre, $[P]_0$ es la concentración inicial de EFTUD1, K_{d1} y K_{d2} corresponden a las constantes de disociación para el primero y segundo evento de unión [60].

7 RESULTADOS

7.1 Amplificación por PCR de la secuencia codificante de los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 de SBDS

Las secuencias codificantes de los diferentes dominios de SBDS fueron amplificadas por PCR con los oligonucleótidos mencionados en la **Tabla 4**. Los productos de la amplificación fueron visualizados y purificados directamente de gel de agarosa debido a que presentaba una banda adicional de mayor peso, muy probablemente productos inespecíficos de la PCR. En la **Figura 16**, se observan las diferentes bandas correspondientes a los dominios 1 de 384pb, el dominio 2 de 240 pb, el dominio 1+2 de 624pb y el dominio 2+3 de 577 pb.

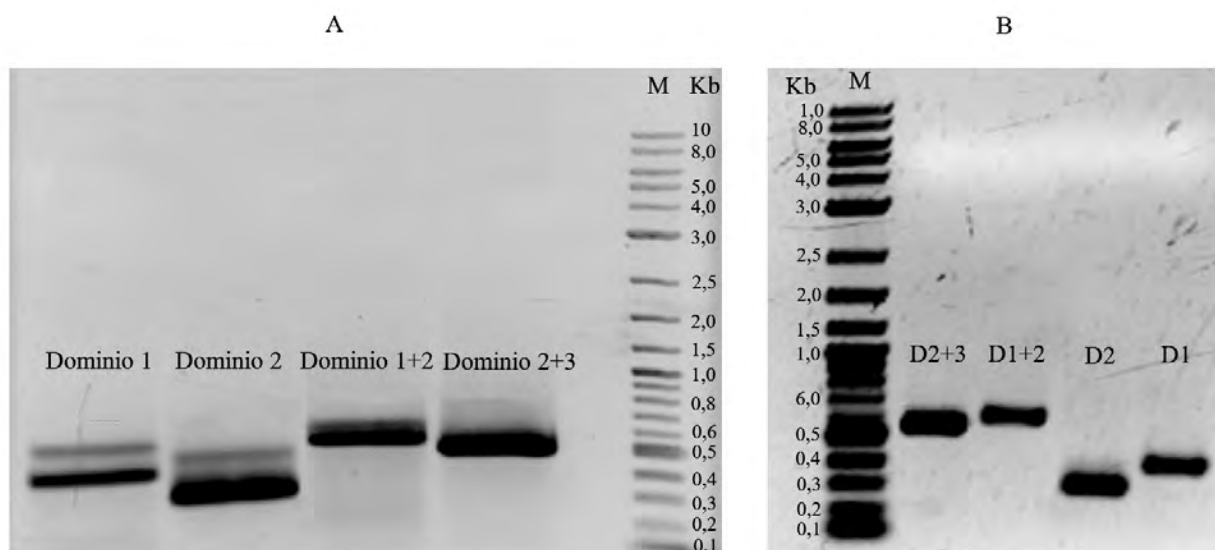


Figura 16. Amplificación de los dominios 1, 2, 1+2, 2+3 de la proteína SBDS por PCR. (A) Amplicones antes de purificar. (B) Amplicones después de purificar.

7.2 Restricción de la secuencia codificante de los dominios 1, 2, 1+2 y 2+3 de SBDS

Los amplicones con las cuatro construcciones de interés y el vector pRSET-A fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI*, purificados y ligados (cada reacción de ligación fue transformada en células de *E. coli* DH5 α). En la **Figura 17** se observa en todos los carriles una banda cercana a 3 kb que corresponde al vector pRSET abierto, y para cada construcción observamos los fragmentos de ADN que corresponden al dominio 1 (384 pb, **Figura 17A**), dominio 2 (240 pb, **Figura 17B**), dominio 1+2 (624 pb, **Figura 17C**) y dominio 2+3 (577 pb, **Figura 17D**). A partir de las clonas identificadas como portadoras de las construcciones de interés se procedió a

extraer ADN plasmídico utilizando el Kit Plasmid Mini-Prep

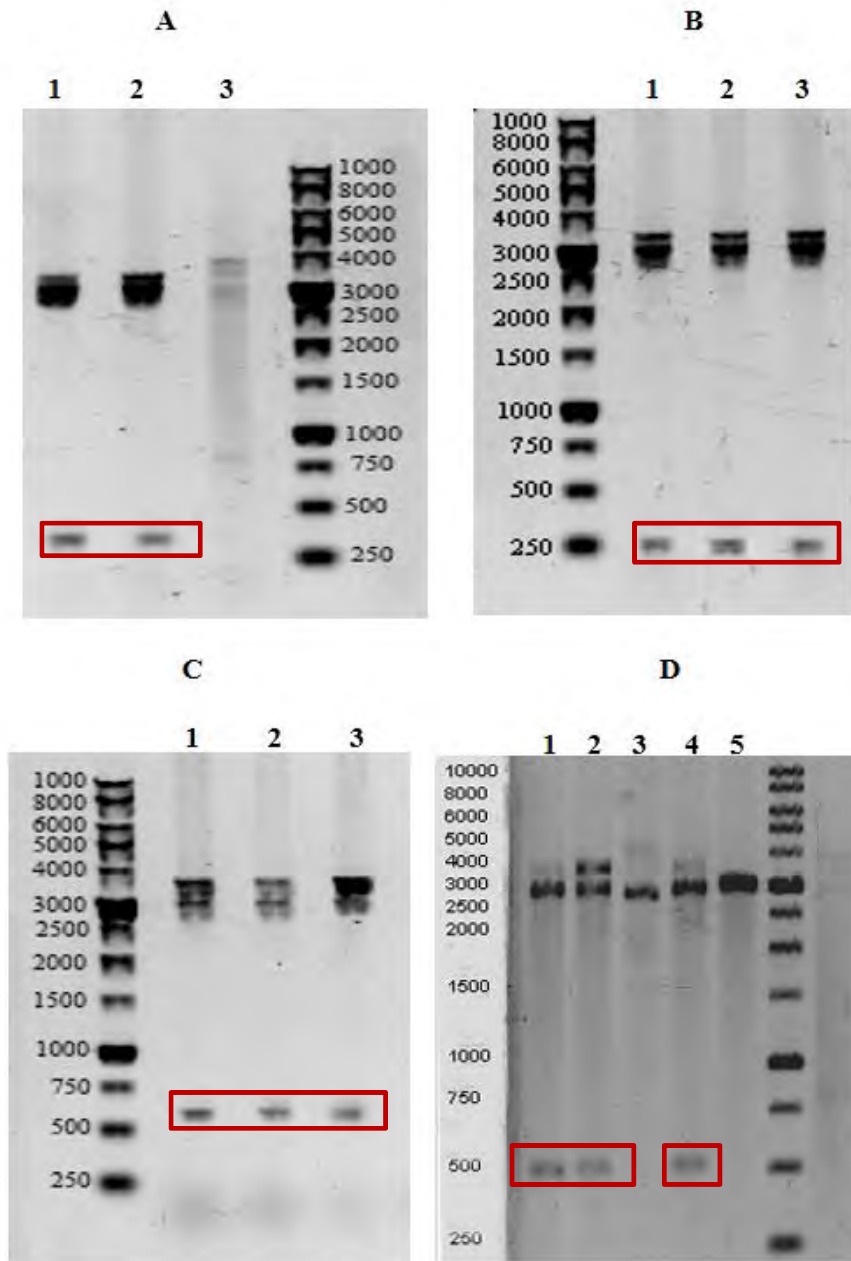


Figura 17. Patrones de restricción con *EcoRI* y *NdeI* de las construcciones de interés en el vector pRSET. (A) pRSET-D1, clonas 1 y 2 positivas y el carril 3 el vector pRSET más inserto. (B) pRSET-D2, clonas 1, 2 y 3, positivas. (C) pRSET-D1+2, clonas 1,2 y 3 positivas (D) pRSET-D2+3 clonas 1,2 y 4 positivas mientras los carriles 3 y 5 son negativas.

7.3 Purificación de los dominios de la proteína SBDS

Para el dominio 1 se tomaron muestras de cada paso realizado durante la purificación, desde la cantidad no retenida en la columna, los lavados realizados para eliminar las proteínas inespecíficas,

la elución en la columna de afinidad a iones Ni^{2+} y los lavados y elución de la columna de intercambio iónico. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE (**Figura 18**) al 15% (D1 12,060 kDa).

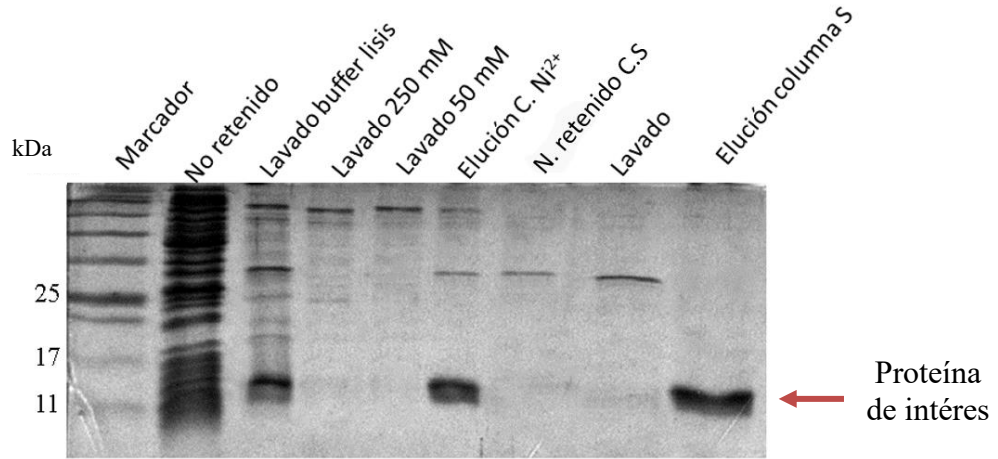


Figura 18. Purificación del dominio 1 (D1) de la proteína SBDS mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel seguida de una purificación por una columna de intercambio catiónico.

La purificación del dominio 2 no requirió el segundo paso de purificación por la columna de intercambio catiónico, pues se obtuvo pura luego de la purificación en la columna de Ni^{2+} (D2 10,13 kDa, **Figura 19**).

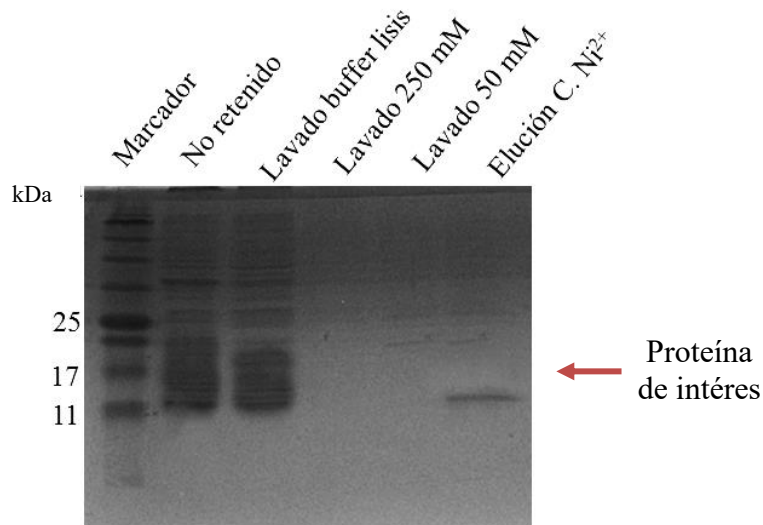


Figura 19. Purificación del dominio 2 de la proteína SBDS (D2) mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel.

El dominio 1+2 de SBDS (21,58 kDa) fue purificado a través de la columna de afinidad a iones Ni^{2+} seguido de una columna de intercambio iónico S FF (**Figura 20**).

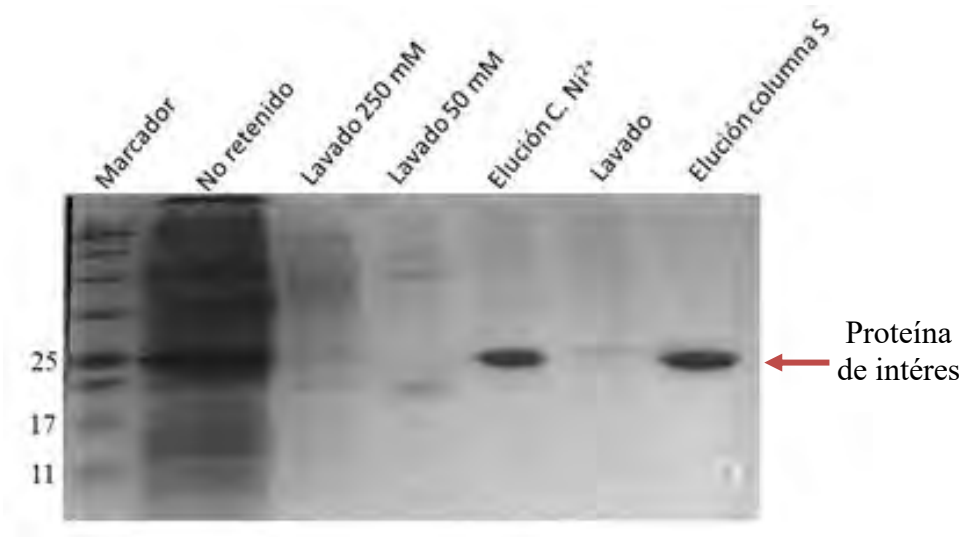


Figura 20. Purificación del dominio 1+2 de la proteína SBDS (D1+2) mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel, seguida por una columna de intercambio catiónico.

Por último, se muestra la purificación del dominio 2+3 (19,85 kDa) de la proteína SBDS junto con los dos lavados correspondientes para disminuir la concentración de sal y la elución de la columna de intercambio catiónico (**Figura 21**).

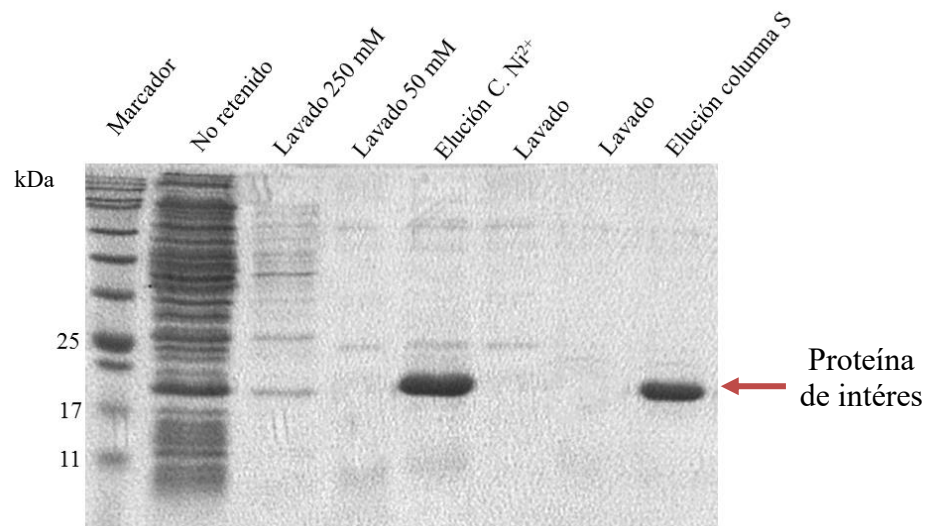


Figura 21. Purificación del dominio 2+3 de SBDS (D2+3) mediante una cromatografía de afinidad a iones níquel seguida por una columna de intercambio catiónico.

Para confirmar la identidad de las proteínas purificadas se determinó la masa de cada una de ellas

mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, las cuales se presentan en el Anexo A.

7.4 Purificación de la proteína EFTUD1

La expresión de la proteína EFTUD1 se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* BCY123. El paquete celular, cuya obtención se describe en la **Sección 6.11**, se descongeló y se resuspendió en 15 mL de solución amortiguadora para lisis. La suspensión de células se vació en el contenedor de un equipo BeadBeater previamente llenado hasta la mitad con perlas de vidrio ($\varnothing = 500 \mu\text{m}$) humedecidas con la misma solución amortiguadora hasta llenar el contenedor. Las células se lisaron en cuatro ciclos de 2 min con el equipo prendido, seguido de un reposo en el congelador por 15 min para evitar el calentamiento de la muestra. El lisado se recuperó en tubos y se centrifugó a 15,000 rpm durante 1 h en una centrífuga Beckman-Coulter, rotor JA-17. El sobrenadante se filtró por una membrana hidrofílica de $0.45 \mu\text{m}$ (Merck Millipore) y se pasó por una columna de afinidad a iones Ni^{2+} . Para cada uno de los pasos descritos, se tomaron muestras y se analizaron mediante un gel SDS-PAGE de 7.5% (**Figura 22**)

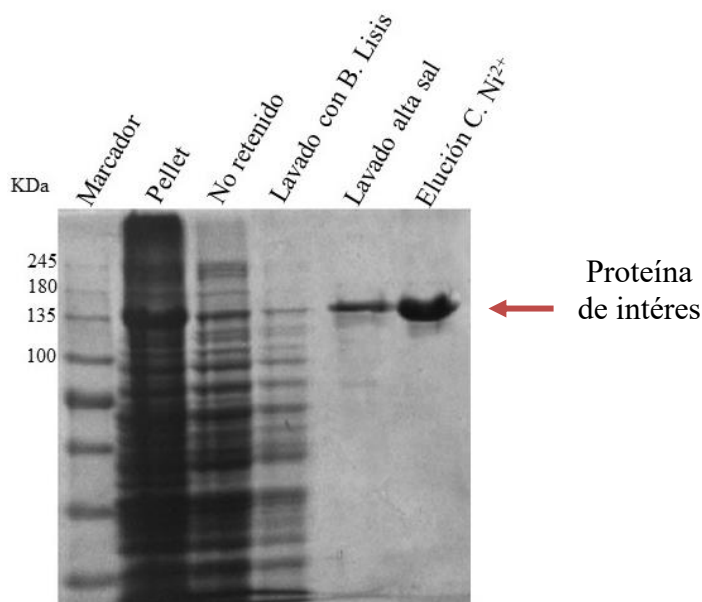


Figura 22. Purificación de la proteína EFTUD1 mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} .

Posteriormente a la elución de la columna de afinidad a Ni^{2+} , la muestra se introdujo a una columna de exclusión molecular. Las fracciones obtenidas de esta cromatografía muestran una proteína correspondiente al peso molecular esperado de 127.5kDa EFTUD1 (**Figura 23**). Por último, las fracciones se juntaron y se concentraron hasta alcanzar una concentración aproximada de $90 \mu\text{M}$. Se alicuotaron y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso.

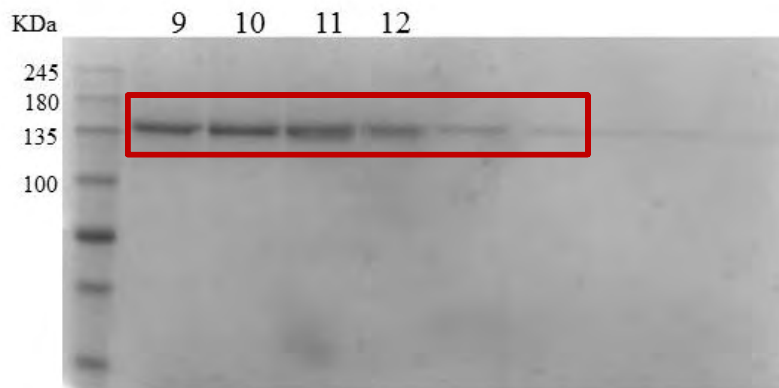


Figura 23. Purificación de la proteína EFTUD1 mediante cromatografía de exclusión molecular. En la parte superior se muestra el número de las fracciones en las que se encontraba la proteína EFTUD1 y que corresponden a un volumen de elución de 63-71 mL.

7.5 Caracterización estructural

7.5.1 Dicroísmo circular

Con el objetivo de certificar que las diferentes proteínas con dominios deletados mantuvieran su estructura secundaria se corrió un espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano. La **Figura 24A** muestra el espectro de dicroísmo circular del dominio 1 de la proteína SBDS en el que se observa un máximo positivo entre 190 y 205 nm, el cual corresponde a la suma de hélices alfa y hebras beta, lo cual es coherente con lo esperado según la secuencia de la proteína humana (**Figura 24B**) [28]. Mientras, la banda negativa cerca de 217 es característica de una proteína que posee hojas beta, sin embargo los péptidos que adoptan la conformación de hojas β , presentan un espectro de CD menos intenso y más simple, por lo que las señales de las hélices alfa tienden a ser más representativas en la proteínas que poseen ambas conformaciones [61].

El dominio 2 posee tres hélices α , por lo que el espectro CD presenta un doble mínimo intenso a 222 nm y 208 nm. Así mismo, las intensidades de estas bandas reflejarán el grado de abundancia de la estructura helicoidal en la proteína, así el CD para el dominio 2 (**Figura 25A**) muestra los dos valores esperados a 208 y 222 nm aproximadamente.

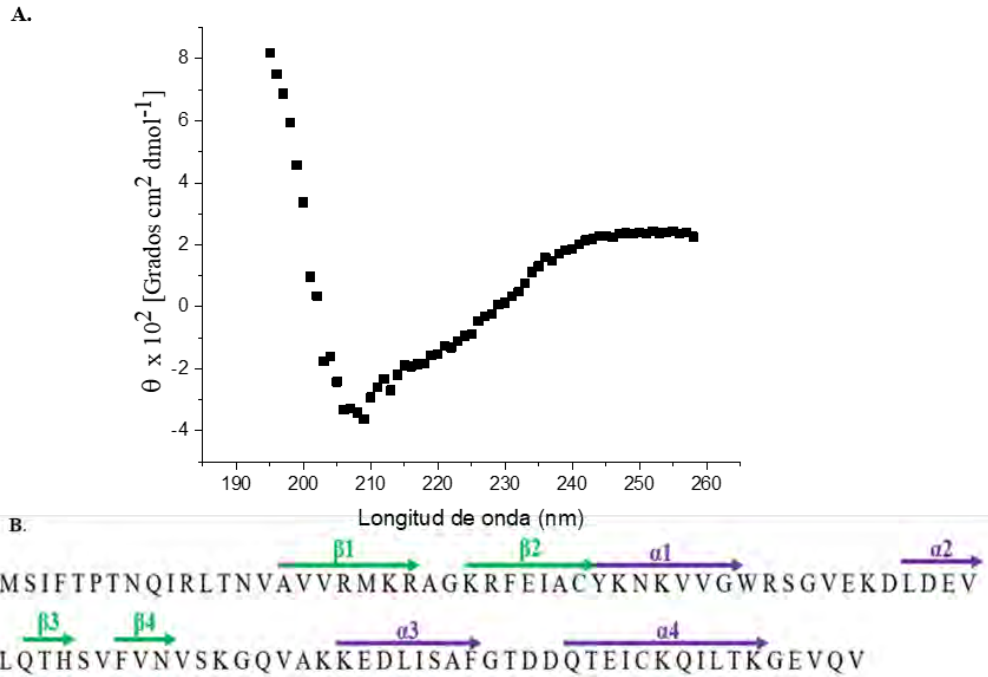


Figura 24. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 1 (D1) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 1 de SBDS (PDB 2L9N), donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores.

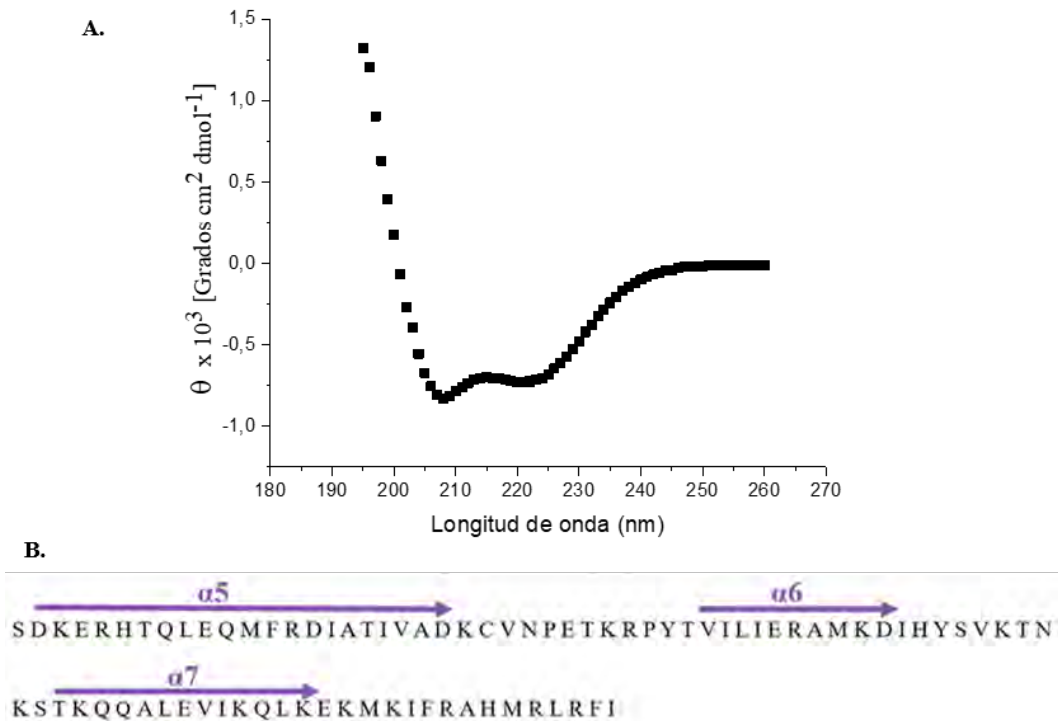


Figura 25. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 2 (D2) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 2 de SBDS (PDB 2L9N), donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores.

Los dominios 1+2 y 2+3 de SBDS presentan un espectro de DC característico de estructuras proteicas con mezcla de α/β . En el espectro de CD del dominio 1+2 de SBDS se observan los mínimos intensos entre 208 y 222 nm característicos de una proteína rica en hélices alfas [62]. Sin embargo, en la región entre 195 y 200 nm se observa un máximo característico de hélices alfa pero de menor intensidad lo que sugiere la presencia de hojas β (**Figura 26A**), lo cual se confirma con el contenido de estructura secundaria observado en la estructura tridimensional obtenida por resonancia magnética nuclear (**Figura 26B**)[31].

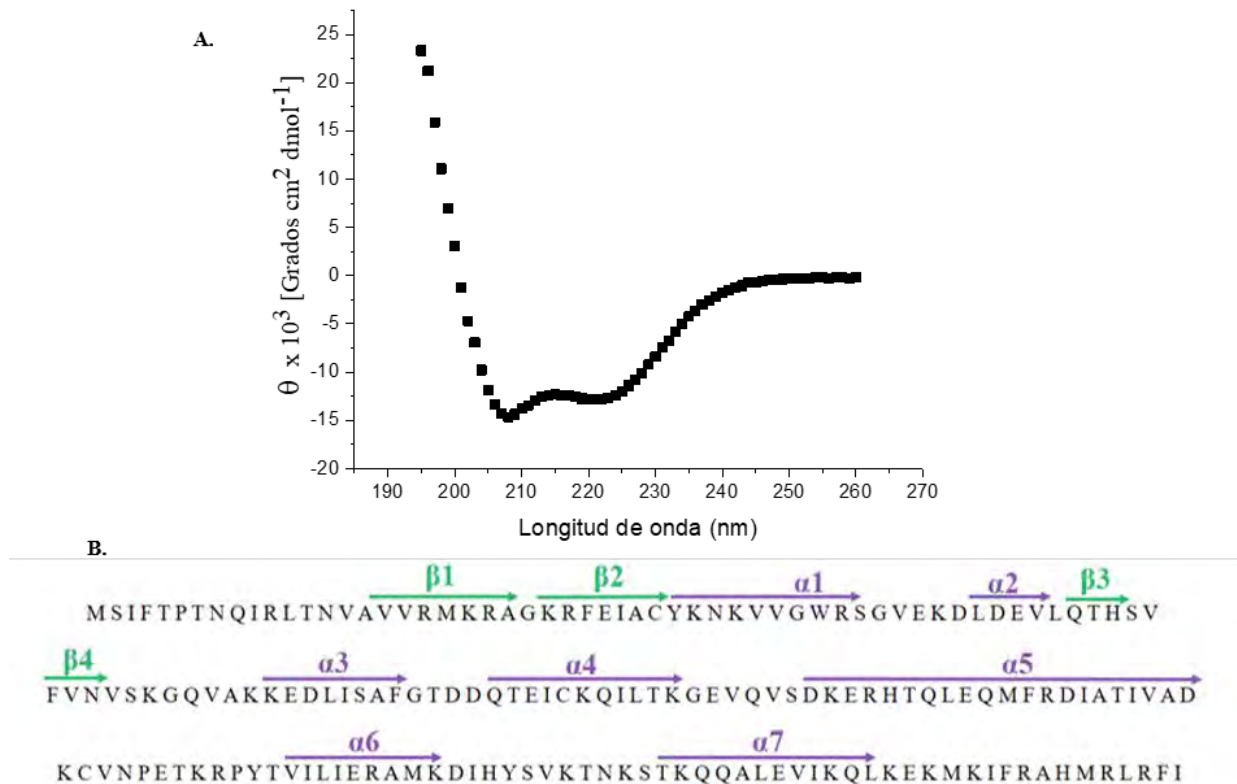


Figura 26. (A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 1+2 (D1+2) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 1+2 de SBDS, donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores (PDB 2L9N).

El espectro de DC para el dominio 2+3 presenta un mínimo a 208 nm característico de hélices α . Sin embargo, la otra señal característica de hélices α a 222 nm no es tan marcada y se observa más como una meseta que podría ser la combinación de la señal a 218 nm característica de hojas β . Por lo que el espectro de CD de este dominio sugiere una mezcla de ambos tipos de estructura, pero en proporción diferentes al dominio 1+2 (**Figura 27A**).

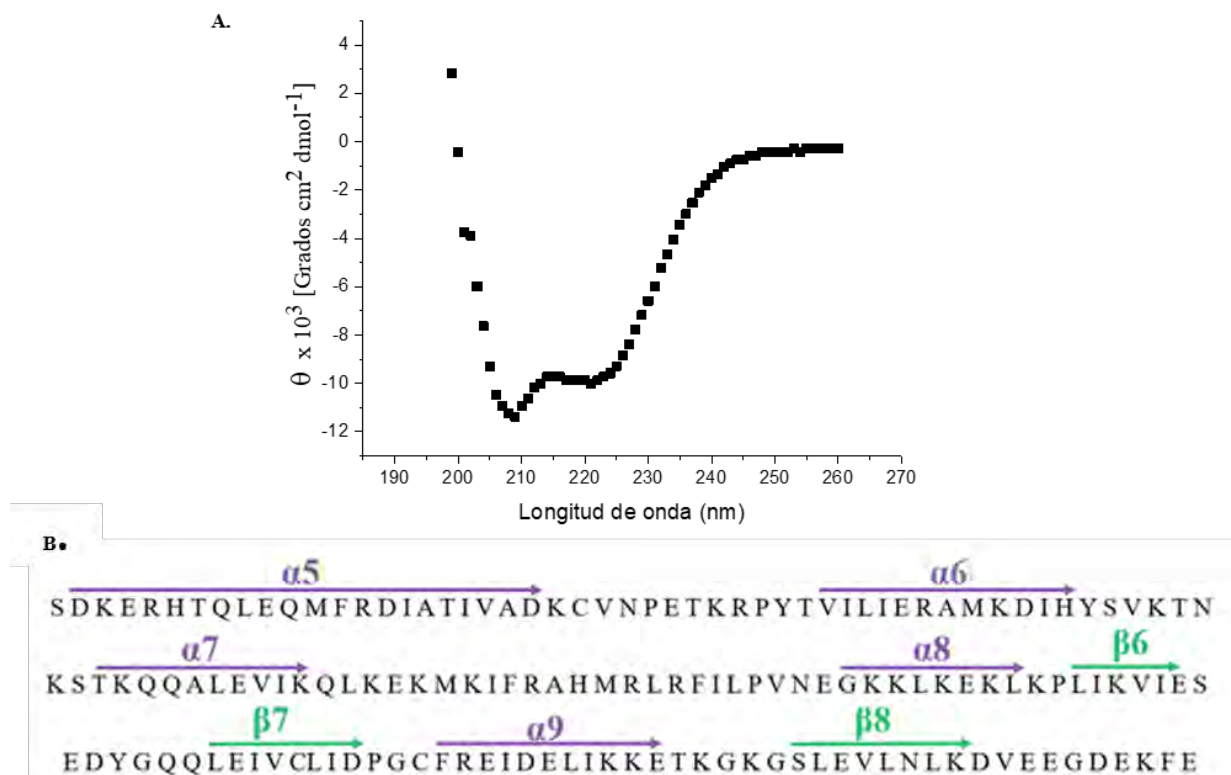


Figura 27. A) Espectro de Dicroísmo circular del dominio 2+3 (D2+3) de la proteína SBDS en un ultravioleta lejano. (B) Secuencia del dominio 2+3 de SBDS, donde se resalta el contenido de estructura secundaria a través de las fechas superiores (PDB 2L9N).

Analizando los espectros de las **Figuras 24-27**, con el programa de deconvolución BeStSel [59], el cual emplea un algoritmo que caracteriza la estructura secundaria de proteínas mediante el uso de ocho componentes dimensionales (**Tabla 7**).

Tabla 7. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de los diferentes dominios de SBDS-FlAsH

	Dominio 1	Dominio 2	Dominio 1+2	Dominio 2+3
Hélice alfa	33,1%	55,4	39,6%	33,1
Hoja antiparalela	18,3%	8,4	14,4%	18,8
Hoja paralela	0,0%	0	0,0%	0,0
Giro beta	0,0%	13,6	20,9%	16,7
Hebra al azar	48,1%	22,6	25,1%	31,4
Total	99,5%	100	100%	100

7.6 Ensayos de anisotropía de fluorescencia

Una vez purificados los diferentes dominios de la proteína SBDS se realizaron los experimentos de interacción con EFTUD1 mediante anisotropía de fluorescencia. Previo a los ensayos, las proteínas se marcaron con el reactivo biarsénico Lumio Green, alcanzando un marcaje promedio de 70-80% (Sección 6.17) a las 16 h de reacción. De acuerdo con información previa del grupo de trabajo (ver Sección 2), la interacción de EFTUD1 con SBDS es un evento de dos sitios distintos de interacción, donde el segundo evento de unión ocurre en el dominio 1 de SBDS y se ve favorecido por un efecto de cooperatividad. Sin embargo, estos experimentos no clarificaron qué dominio(s) están involucrados en el primer evento de unión con EFTUD1.

La interacción entre el dominio 1 de SBDS (residuos 1-94) y la GTPasa EFTUD1 se muestra en la **Figura 28**. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de un sitio de unión con una K_d de 15 μM . Este valor es casi dos órdenes de magnitud mayor que el obtenido en el contexto de la proteína completa correspondiente a 0.4 μM . Esta diferencia de afinidad se puede explicar debido a la pérdida de cooperatividad positiva, ya que no están presentes los otros dominios de la proteína.

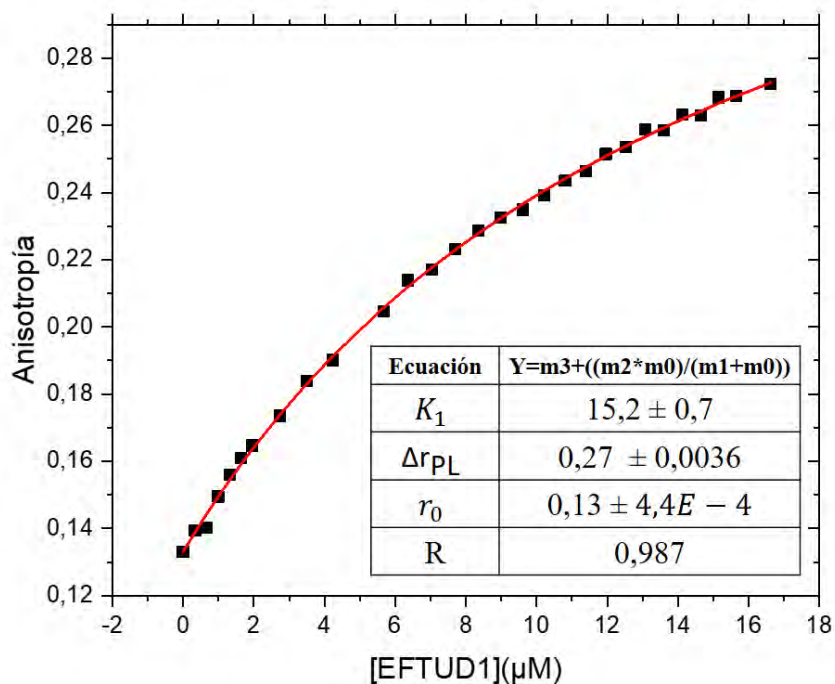


Figura 28. Interacción entre EFTUD1 y el dominio 1 de SBDS (D1 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.

Para la interacción del dominio 2 de SBDS (residuos 95-174) con EFTUD1 se obtuvo, al igual que el dominio 1, una hipérbola. Así, los datos se ajustaron a un sitio de unión con un K_d de 11 μM (**Figura 29**). Sin embargo, esta constante es ligeramente mayor que el valor obtenido para el primer evento de unión de la proteína silvestre de 5.4 μM o inclusive mayor que el valor obtenido para la mutante R19Q en el dominio 1 de 4.4 μM . Lo anterior sugiere que el primer evento de unión no ocurre exclusivamente en el dominio 2 de SBDS y tal vez el dominio 3 también participa en la interacción. Esta idea es apoyada por estudios previos de doble híbrido en levadura realizados en el laboratorio (ver **Sección 2**) donde se comparó la interacción entre el ortólogo de levadura EFL1 con la proteína Sdo1 (ortólogo de levadura de SBDS) completa y una construcción consistente de los dominios 2+3. Aún en ausencia del dominio 1 existe una interacción, que se favorece por la presencia del dominio 1.

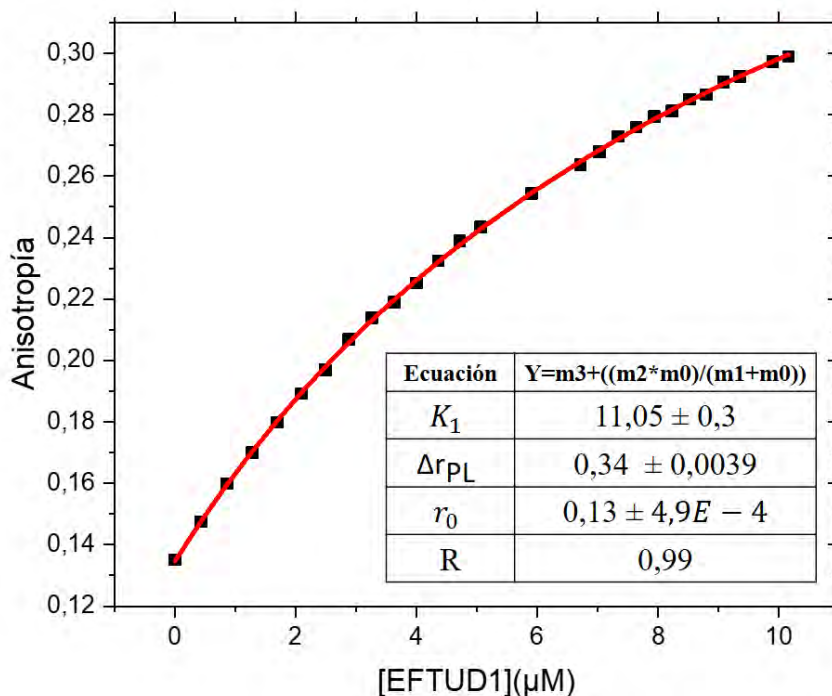


Figura 29. Interacción entre EFTUD1 y el dominio 2 de SBDS (D2 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.

El gráfico de interacción entre EFTUD1 y la construcción consistente de los dominios 1+2 de SBDS muestra una tendencia sigmoide similar a la mostrada por la SBDS silvestre (**Figura 30**). Esta forma sugiere que, al igual que con la proteína SBDS silvestre, existe más de un sitio de unión con EFTUD1. Los datos se ajustaron a un modelo de unión de dos sitios distintos de interacción con

valores de K_{d1} y K_{d2} de 11 μM y 4 μM , respectivamente. Estos valores son ligeramente mayores que aquellos obtenidos para la proteína silvestre ($K_{d1}=5.4 \mu\text{M}$ y $K_{d2}=0.4 \mu\text{M}$, **Tabla 1**) apoyando la idea que el dominio 3 de SBDS juega un papel relevante en la interacción. Interesantemente, la constante de disociación del primer evento de unión en esta construcción es idéntica a la constante de disociación del dominio 2 aislado.

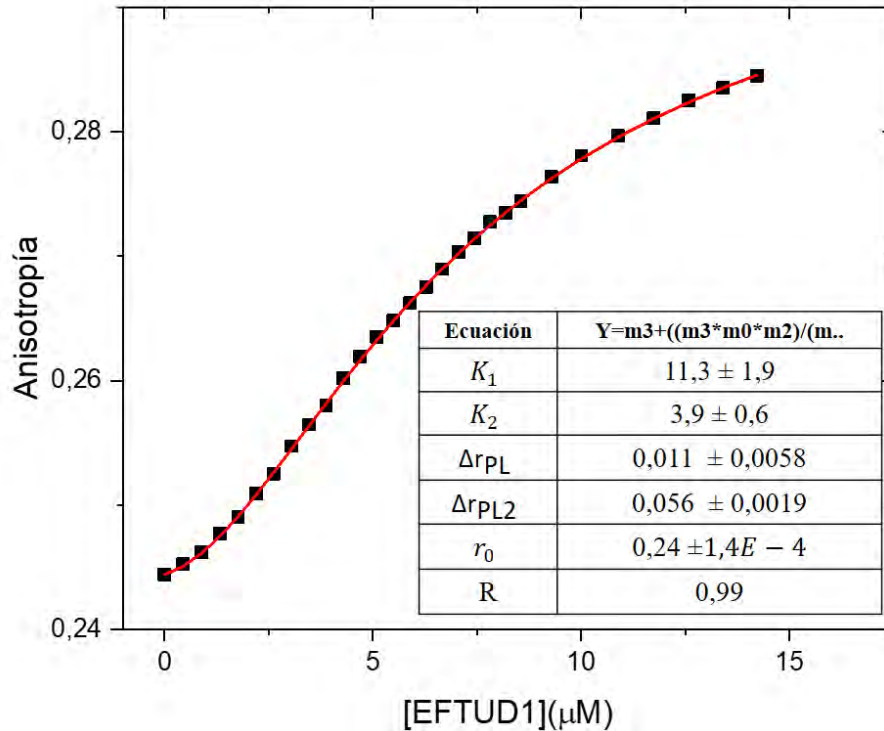


Figura 30. Interacción entre EFTUD1 y la construcción consistente de los dominios 1+2 de SBDS (D1+2 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión.

Debido a la tendencia sigmoide de la interacción entre esta construcción de SBDS y EFTUD1, se evaluó si la unión presentaba cooperatividad y de serlo resolver si es positiva o negativa. Para ello se analizaron los resultados obtenidos a través de las gráficas de Hill y de Scatchard. Considerando que un coeficiente de Hill (n_H) con valores mayor a 1 refleja una unión con cooperatividad positiva (la interacción en un sitio incrementa la afinidad de otros). Por el contrario, un coeficiente de Hill con valores menores a 1 sugieren una cooperatividad negativa (la interacción en un sitio disminuye la afinidad de los otros) [48,63]. La **Figura 31** muestra los gráficos de Hill y Scatchard para la interacción entre los dominios 1-2 de SBDS y EFTUD1. El coeficiente de Hill calculado fue de 1.88

± 0.01 , lo cual nos indica que la unión de EFTUD1 a SBDS-D1+2 constituye un evento de cooperatividad positiva. Esto, además, se confirmó mediante el gráfico de Scatchard que mostró una curva cóncava hacia abajo característica de un sistema cooperativo [49].

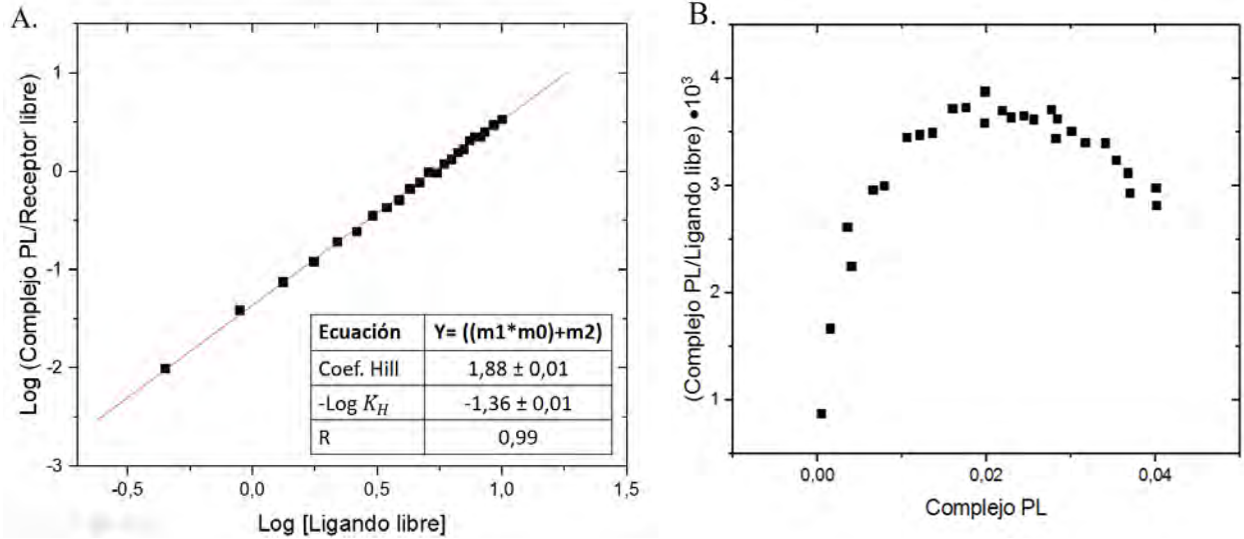


Figura 31. Análisis de la cooperatividad en la interacción entre los dominios 1+2 de SBDS y EFTUD1 mediante el (A) gráfico de Hill y de (B) Scatchard. Donde el coeficiente de Hill es n_H y la constante de unión aparente del sustrato es K_H , mientras que PL es la proteína-ligando.

Finalmente, la interacción entre EFTUD1 y una construcción consistente de los dominios 2+3 de SBDS se describió mediante una hipérbola a pesar, de que los datos anteriores sugerían la participación de ambas regiones de la proteína en la interacción y por tanto se podía pensar en dos sitios distintos de unión. Los datos fueron mejor descritos mediante un modelo de un sitio de unión con una constante de disociación de $4.6 \mu\text{M}$. Este valor muestra una afinidad mayor comparada con aquella del dominio 2 aislado. Lo anterior establece que el dominio 3 de SBDS participa de la interacción con EFTUD1, pero de manera conjunta con el dominio 2 en una interacción tipo cuerpo rígido (**Figura 32**).

En conjunto, todos estos resultados de interacción entre EFTUD1 y los diferentes dominios de SBDS establecen que el primer evento de unión se desarrolla en el dominio 2 + 3 como un cuerpo rígido y, el segundo evento de unión se lleva a cabo en el dominio 1 favorecido por cooperatividad positiva.

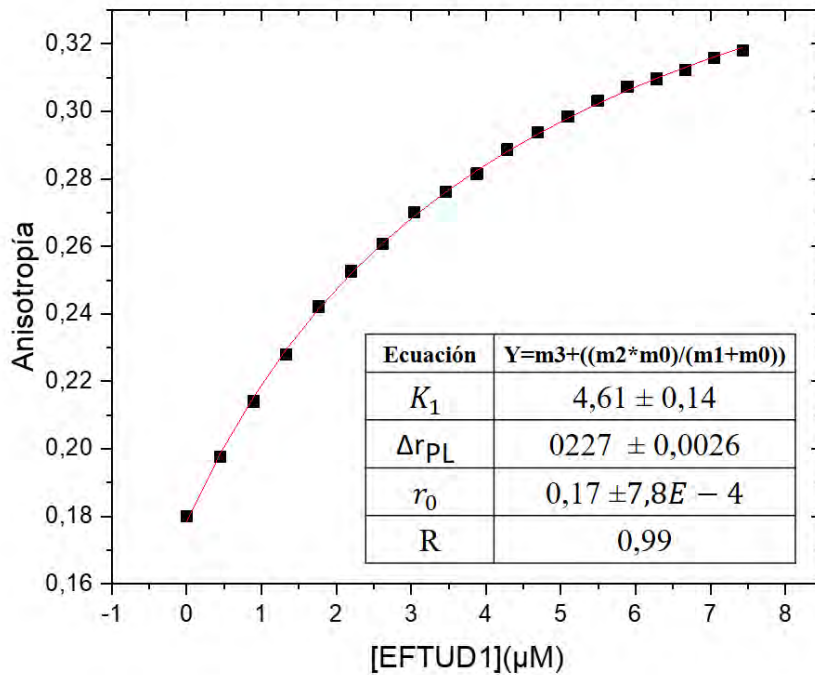


Figura 32. Interacción entre EFTUD1 y la construcción consistente de los dominios 2+3 de SBDS (D2+3 SBDS) evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.

7.7 SAXS: Dispersión de rayos X a ángulo bajo

Con el fin de evaluar la flexibilidad de la proteína SBDS que pudiera contribuir a los diferentes eventos de unión que presenta con EFTUD1 se realizaron estudios de dispersión de rayos X a ángulo bajo (SAXS). Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Dritan Siliqi, y analizados con el software EOM (paquete ATSAS) en el marco del proyecto bilateral MX14MO05 México-Italia, en la propuesta del EMBL SAXS-440 en las instalaciones de la línea 12 del Petra III, sincrotrón DESY de Hamburgo, Alemania.

La **Figura 33** muestra los ensayos de SAXS de la proteína Sdo1 silvestre, una construcción con los dominios 2+3 de Sdo1 y BSA (proteína banco) donde es posible visualizar las diferencias en la flexibilidad de las proteínas. El gráfico de Kratky mostró que la proteína Sdo1 y la construcción con los dominios 2+3 son menos compactos que una proteína globular como BSA sin ser desestructuradas. Pero la proteína carente del dominio 1 adquiere una tendencia similar a la mostrada por BSA, la cual es más compacta que la proteína completa, sugiriendo que este dominio le proporciona mayor flexibilidad a SBDS. Mientras que estudios de la proteína SBDS humana por

resonancia magnética nuclear demostraron que el dominio 1 de SBDS presenta una alta movilidad respecto de los dominios 2-3 [29]. A partir de lo anterior es posible proponer que la interacción entre EFTUD1 y SBDS ocurre mediante un primer evento de unión con los dominios 2-3 de SBDS seguido de la interacción con el dominio 1.

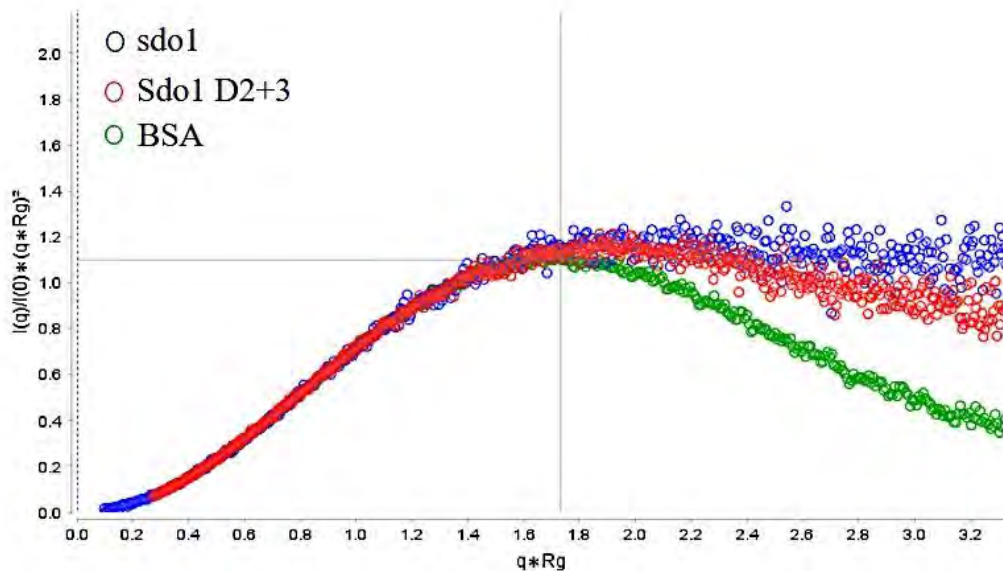


Figura 33. Experimentos de SAXS de la proteína Sdo1 silvestre y sus dominios 2+3. Gráfico adimensional de Kratky de las proteínas Sdo1 silvestre (azul), construcción de los dominios 2-3 de Sdo1 (rojo) y albúmina bovina sérica (BSA) como proteína control (verde).

8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El síndrome de Shwachman-Diamond (SSD) es una rara enfermedad autosómica recesiva, con una incidencia aproximada de 1 en cada 160,000 nacimientos y con una relación hombre/mujer de 1,7/13,4. También es la segunda causa de insuficiencia pancreática exocrina congénita en la infancia después de la fibrosis quística. De ahí surge nuestro interés por comprender el mecanismo envuelto en la generación del SSD, para lo cual se han llevado a cabo estudios de interacción entre SBDS y EFTD1. En dichos estudios se evaluó el efecto que tienen las mutaciones puntuales responsables de la generación de proteína truncada, desestabilizada o que causen la desnaturalización de la SBDS, y en donde se encontró que éstas afectaban la unión entre la SBDS y la EFTD1, al disminuir las constantes de disociación en diferentes magnitudes. Con el fin de consolidar los resultados previamente obtenidos, se decidió realizar un análisis más detallado acerca de la interacción de los dominios separados de SBDS (1 y 2) y compararlo con el par de dominios 1+2 y 2+3 frente a EFTUD1.

Inicialmente los dominios codificantes de SBDS (1, 2, 2+3 y 2+3) fueron amplificados mediante PCR, utilizando como molde la construcción pRSET-HisSBDS-FIAsH.

Luego se expresaron y purificaron los diferentes dominios de la proteína humana SBDS-FIAsH y de la proteína EFTUD1. Para esto y con base en estudios previos del laboratorio [64] se escogió el sistema más adecuado de expresión heteróloga, que en el caso de los dominios de la SBDS-Flash fue la *E. coli*, mientras que para la proteína EFTUD1 fue la *S. cerevisiae*. Cuando se empleó la *E. coli* como sistema de expresión para la EFTUD1 se encontró que la proteína formaba agregados solubles y, por lo tanto, no presentaba buen plegamiento, haciendo inviable el uso de éste sistema. Por otra parte, se empleó la etiqueta FIAsH, compuesto orgánico derivado de la fluoresceína que exhibe una señal de emisión a 528 nm, con el fin de marcar las proteínas recombinantes que contienen el fragmento de tetracisteína (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys), lo que permite la evaluación de la interacción entre las proteínas recombinantes de la SBDS y la EFTUD1 por anisotropía de fluorescencia.

Seguidamente se evaluó el contenido de estructura secundaria de las proteínas SBDS-D1, SBDS-D2, SBDS-D1+2 y SBDS-D2+3 por DC, esperando que la delección de dominios específicos no la alterará de ninguna forma. Lo cual se demostró ampliamente en la **Sección 7.5.1**, donde se aprecia una relación coherente entre la forma del espectro DC y su estructura. En la tabla **Tabla 8**, se muestra una relación entre los valores obtenidos para la cantidad de helices alfa y hojas beta, frente a la estructura secundaria esperada de la proteína (de acuerdo con el PBD 2L9N), considerando el número de aminoácidos totales de cada dominio de SBDS como el 100% y relacionándolo con el número de aminoácidos que conforman las hojas y helices de la proteína (calculados a partir de la estructura mostrada en las **Figuras 24-27B**),). Donde se observa una relación equiparable entre los valores obtenidos de la deconvolución del espectro vs la calculada.

Existen pequeñas diferencias entre los valores anteriores, que pueden corresponder a variables como, el número de aminoácido diferentes, su movilidad, la naturaleza de su entorno (enlace H, grupos polares y polaridad) y su disposición espacial en la proteína, las cuales no podemos distinguir en los valores calculados a partir de la estructura secundaria conocida, de igual forma la deconvolución obtenida a partir de los espectros de DC de la proteína, se basan en una combinación de diferentes espectros base, característicos de los elementos estructurales secundarios que se

encuentren presentes en la proteína, los cuales se solapan en varias regiones dificultando el análisis del espectro.

Tabla 8. Comparación de contenido de estructura secundaria entre los valores obtenidos del espectro de DC (deconvolución) entre los calculados a partir de la estructura conocida de la proteína.

Dominio		Hélice α	hoja β
1	Espectro	33,1%	18,3
	Calculado	28,03	18,99
2	Espectro	55,4	8,4
	Calculado	46,31	0
1+2	Espectro	39,6	14,4
	Calculado	39,15	10,58
2+3	Espectro	33,1	18,8
	Calculado	37,5	13,09

Una de las diferencias más notorias son los valores obtenidos para el dominio 2, cuyo espectro muestra un porcentaje de helices alfa de 55,4% frente a un valor calculado de 46,31%, mientras el porcentaje de helices beta es de 8,4%, cuando se considera que este dominio únicamente esta compuesto por helices alfas, lo cual puede deberse al solapamiento de sus señales características.

Posteriormente a los espectros de DC, los ensayos de anisotropía de fluorescencia, donde se evaluó la interacción de la proteína SBDS (purificada y analizada por DC) frente a la proteína EFTUD1 (**Tabla 9**), donde se evaluaron las constantes de disociación a partir de la diferencia entre la anisotropía inicial (SBDS libre) y su efecto frente a EFTUD1. Considerando que la proteína con únicamente el dominio 2 de SBDS, es la más pequeña con un peso aproximado de 10,13 kDa frente a la del dominio 1 (12,06 kDa), presentan el mismo valor de anisotropía inicial (0,13), pese a que los tiempos de correlación rotacional dependen del tamaño de la molécula y su forma, podemos inferir que probablemente uno de los parámetros puede verse afectado por el otro, obteniendo así valores tan cercanos. Para el caso del dominio 1+2 de 21,58 kDa, la anisotropía inicial es de 0,24, mientras que el dominio 2+3 (19,85 kDa) muestra un valor de anisotropía inicial (proteína libre) de 0,17, para este caso se esperaría que aquella molécula con menor tamaño presentará un valor de anisotropía baja, mientras aquella de tamaño superior presentará un valor de anisotropía mayor.

Estos valores iniciales de anisotropía junto a las diverentes constantes de disociación evaluadas,

demuestran que el dominio 3 de SBDS participa en la interacción con EFTUD1(**Sección 2**), cuyo primer evento de unión ocurre entre el dominio 2+3 de SBDS y su posterior unión (con cooperatividad positiva) con el dominio 1 de SBDS. Esto es posible certificarlo a través de los datos de SAXS, los cuales muestran que la ausencia del 1 de Sdo1 (ortólogo de levadura de SBDS), los dominios 2+3 de la misma muestran una “compactación” de la proteína, al compararla con la forma globular presentada de BSA.

Mientras los valores de K_{d1} para el dominio 2 ($11,05 \pm 0,43 \mu\text{M}$) presenta un valor cercano al dominio 1+2 ($11,3055 \pm 0,43 \mu\text{M}$), lo que demuestra que posiblemente, la ausencia del dominio 3 afecte de igual forma el primer evento de unión, a diferencia del dominio 2+3 ($4,61 \pm 0,14 \mu\text{M}$) cuyo valor de K_{d1} es similar al mostrado por la SBDS silvestre ($5.4 \pm 1\mu\text{M}$), confirmando así que posiblemente el dominio 3 participa en esta interacción (**Tabla 1**).

Tabla 9. Constantes de disociación de la interacción entre EFTUD1 y los diferentes dominios de SBDS. Los dominios 1, 2 y 2+3 se ajustan al modelo de unión de un solo sitio, por lo que no presentanda valores de K_{d2} .

Dominio	K_{d1} (μM)	K_{d2} (μM)
1	$15,22 \pm 0,72$	-
2	$11,05 \pm 0,25$	-
1+2	$11,30 \pm 1,86$	$3,909 \pm 0,62$
2+3	$4,61 \pm 0,14$	-

También es importante destacar que los valores de K_{d1} presentados por el dominio 2 ($15,55 \pm 0,43 \mu\text{M}$) y 1+2 ($11,30 \pm 1,86$) son similares, lo cual nuevamente corrobora el efecto negativo que se produce debido a la ausencia del dominio 3. Considerando lo anteriormente mencionado, el esquema esperado de la interacción entre SBDS y EFTUD1 mostrado en la **Figura 1**, podría eventualmente ser transformado por el siguiente (**Figura 34**):

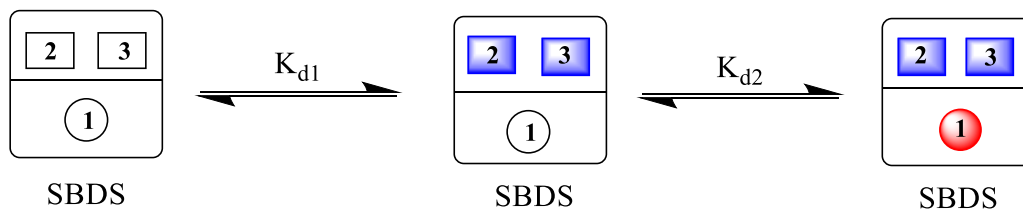


Figura 34. Representación de los sitios de interacción de la SBDS con la EFTUD1. En el primer evento de unión participan los dominios 2+3 (representados en azul), mientras el segundo sitio de unión se encuentra en el dominio 1 (representando por un círculo rojo).

De esta forma no solo los ensayos de SAXS y los ajustes a modelos de unión nos muestran el rol que desarrolla el dominio 3 de SBDS, también podemos observarlo por los valores de anisotropía inicial de cada una de las graficas. Retomando los valores de anisotropía inicial, el dominio 1, presenta un valor de 0,13, al adicionarle a la construcción la presencia del dominio 2 este muestra un valor de 0,24. Al comparar la diferencia entre los valores de anisotropía del dominio 1+2 y el dominio 1 (u.a. son las unidades de anisotropía) respecto al aumento en el peso (kDa), tendríamos un aumento de $0,0115 \text{ kDa}^{-1}$, mientras que el dominio 2 con una anisotropía inicial de 0,13, en comparación con el dominio 2+3 de 0,17, tendría una relación (u.a/kDa) de $4,2 \times 10^{-3} \text{ kDa}^{-1}$, donde claramente se observa un aumento significativo entre 1 y 1+2, a diferencia del presentado entre 2 y 2+3. Lo que nuevamente nso confirma que la adición del dominio 3 a la construcción repercute en la flexibilidad de la misma.

9 CONCLUSIONES

- La proteína SBDS utiliza todos sus dominios para interactuar con EFTUD1, ya que en ausencia de uno de ellos la afinidad decrece en diferentes magnitudes.
- La interacción de los dominios 2+3 de SBDS con EFTUD1 presenta un único sitio de unión y ocurre mediante una interacción de tipo cuerpo rígido.
- La interacción de EFTUD1 con el dominio 1 de SBDS se ve favorecida por cooperatividad positiva con los dominios 2+3.
- La interacción entre EFTUD1 y SBDS ocurre mediante dos eventos de unión donde el primer evento de unión ocurre entre el dominio 2+3 y el segundo con el dominio 1.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] P.C. Yelick, P.A. Trainor, Ribosomopathies: Global process, tissue specific defects, *Rare Dis.* 3 (2015) 1–11.
- [2] K.A. Ganapathi, K.M. Austin, C.S. Lee, A. Dias, M.M. Malsch, R. Reed, A. Shimamura, The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA, *Blood.* 110 (2007) 1458–1465.
- [3] J. Armistead, B. Triggs-Raine, Diverse diseases from a ubiquitous process: The ribosomopathy paradox, *FEBS Lett.* 588 (2014) 1491–1500.
- [4] C. Orelia, T.W. Kuijpers, Shwachman-diamond syndrome neutrophils have altered chemoattractant-induced F-actin polymerization and polarization characteristics, *Haematologica.* 94 (2009) 409–413.
- [5] K.I. Watanabe, C. Ambekar, H. Wang, A. Ciccolini, A.D. Schimmer, Y. Dror, SBDS-deficiency results in specific hypersensitivity to Fas stimulation and accumulation of Fas at the plasma membrane, *Apoptosis.* 14 (2009) 77–89.
- [6] K.M. Austin, M. Gupta, S.A. Coats, A. Tulpule, G. Mostoslavsky, A.B. Balazs, R.C. Mulligan, G. Daley, D. Pellman, A. Shimamura, Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond syndrome, *J. Clin. Investig.* 118 (2008) 1511–1518.
- [7] N. Danilova, H.T. Gazda, Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies, *Dis. Model. Mech.* 8 (2015) 1013–1026.
- [8] K.L. McCann, S.J. Baserga, Mysterious Ribosomopathies, *Science.* 341 (2013) 849–850.
- [9] E.F. Freed, F. Bleichert, L.M. Dutca, S.J. Baserga, When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis, *Mol. Biosyst.* 6 (2010) 481–493.
- [10] P.A. Trainor, A.E. Merrill, Ribosome biogenesis in skeletal development and the pathogenesis of skeletal disorders, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842 (2014) 769–778.
- [11] D.N. Wilson, J.H.D. Cate, The Structure and Function of the Eukaryotic, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012) 1–18.
- [12] D.L. Lafontaine, D. Tollervy, The function and synthesis of ribosomes., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 514–520.
- [13] The royal Swedish Academy of sciences, Structure and function of the ribosome, 2009.
- [14] R.K. Agrawal, P. Penczek, R.A. Grassucci, Y. Li, A. Leith, K.H. Nierhaus, J. Frank, Direct

- visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the Escherichia coli ribosome, *Science*. 271 (1996) 1000–1002.
- [15] M. Fromont-Racine, B. Senger, C. Saveanu, F. Fasiolo, Ribosome assembly in eukaryotes, *Gene*. 313 (2003) 17–42.
- [16] B.A. Peculis, Ribosome biogenesis: Ribosomal RNA synthesis as a package deal, *Curr. Biol*. 12 (2002) 623–624.
- [17] D.L.J. Lafontaine, Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function, *Nat. Struct. Mol. Biol*. 22 (2015) 11–19.
- [18] J.M. Hughes, M. Ares, Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA, *EMBO J*. 10 (1991) 4231–4239.
- [19] J.M. Hughes, Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA., *J. Mol. Biol*. 259 (1996) 645–654.
- [20] J.L. Woolford, S.J. Baserga, Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*. 195 (2013) 643–681.
- [21] D.L.J. Lafontaine, A “garbage can” for ribosomes: how eukaryotes degrade their ribosomes, *Trends Biochem. Sci*. 35 (2010) 267–277.
- [22] I. Zemp, U. Kutay, Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits, *FEBS Lett*. 581 (2007) 2783–2793.
- [23] C. Orelia, R.M. van der Sluis, P. Verkuijlen, M. Nethe, P.L. Hordijk, T.K. van den Berg, T.W. Kuijpers, Altered intracellular localization and mobility of SBDS protein upon mutation in Shwachman-Diamond syndrome, *PLoS One*. 6 (2011) 1–12.
- [24] H. Shwachman, L. Diamond, F. rank Oski, K.-T. Khaw, The Syndrome of Pancreatic Insufficiency and Bone Marrow Dysfunction, *J. Pediatr*. 65 (1964) 645–663.
- [25] G.R.B. Boocock, J.A. Morrison, M. Popovic, N. Richards, L. Ellis, P.R. Durie, J.M. Rommens, Mutations in SBDS are associated with Shwachman – Diamond syndrome, *Nat. Genet*. 33 (2003) 97–101.
- [26] H. Nakhoul, J. Ke, X. Zhou, W. Liao, S.X. Zeng, H. Lu, *Clinical Medicine Insights : Blood Disorders Ribosomopathies : Mechanisms of Disease*, Lib. Acedemica. (2014) 7–16.
- [27] C. Plisson-chastang, N. Larburu, P. Gleizes, Ribosomal 60S-subunit production : the final scene, *Nat. Struct. Mol. Biol*. 22 (2015) 837–838.

- [28] C. Shammas, T.F. Menne, C. Hilcenko, S.R. Michell, B. Goyenechea, G.R.B. Boocock, P.R. Durie, J.M. Rommens, A.J. Warren, Structural and mutational analysis of the SBDS protein family: Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19221–19229.
- [29] A.J. Finch, C. Hilcenko, N. Basse, L.F. Drynan, P. Simpson, B. Goyenechea, T.F. Menne, C.S.D. Santos, M.J. Arends, J. Donadieu, C. Bellanne, M. Costanzo, C. Boone, A.N. McKenzie, S.M. V. Freund, A.J. Warren, Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome, *Genes Dev.* 6 (2011) 917–929.
- [30] A. Gijbsbers, A. García-Márquez, A. Luviano, N. Sánchez-Puig, Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond Syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437 (2013) 349–354.
- [31] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2876–2890.
- [32] S.R. Martin, P.M. Bayley, Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy, in: H.J. Vogel (Ed.), *Methods Mol. Biol.*, 2002: pp. 43–55.
- [33] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta.* 1751 (2005) 119–139.
- [34] C. Wiedemann, P. Bellstedt, M. Görlach, CAPITO - A web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data, *Bioinformatics.* 29 (2013) 1750–1757.
- [35] P. Cheng, J. Peng, Z. Zhang, SAXS-Oriented Ensemble Refinement of Flexible Biomolecules, *Biophys. J.* 112 (2017) 1295–1301.
- [36] K. Fukuyama, Y. Hatakeyama, *Materials Science and Engineering of Carbon. Chapter 3: Small-Angle X-ray Scattering*, Tsinghua University Press Limited, 2016, pp 27-43.
- [37] A.G. Kikhney, D.I. Svergun, A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins, *FEBS Lett.* 589 (2015) 2570–2577.
- [38] D. Waugh, Protein-protein Interactions, in: *Adv. Protein Chem.*, M.L. Anson, 1954: pp. 325–437.
- [39] S. Dwane, P.A. Kiely, Tools used to study how protein complexes are assembled in signaling cascades, *Bioeng. Bugs.* 2 (2011) 247–259.
- [40] E. Phizicky, S. Fields, Protein-protein interactions: methods for detection and analysis, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 94–123.
- [41] T. Nishigaki, C.L. Treviño, Study of protein-protein interactions by fluorescence

- spectroscopy, in: *Tools to Understand Protein-Protein Interact.*, 2012: pp. 87–100.
- [42] J.C. Sutherland, Measuring fluorescence polarization with a dichrometer, *Anal. Biochem.* 532 (2017) 9–11.
- [43] W.A. Lea, A. Simeonov, Fluorescence Polarization Assay, *Expert Opin. Drug. Discov.* 6 (2012) 17–32.
- [44] D. Canet, K. Doering, C.M. Dobson, Y. Dupont, High-sensitivity fluorescence anisotropy detection of protein-folding events: application to alpha -lactalbumin, *Biophys. J.* 80 (2003) 1996–2003.
- [45] V. LeTilly, C.A. Royer, Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding, *Biochemistry.* 32 (1993) 7753–7758.
- [46] T. Heyduk, J.C. Lee, Application of fluorescence energy transfer and polarization to monitor Escherichia coli cAMP receptor protein and lac promoter interaction., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 1744–1748.
- [47] A.. Benight, J. Langowski, P.. Wu, J. Wilcoxon, J.H. Shibata, N.S. Fujimoto, N.S. Ribeiro, J.M. Schurr, *Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects*, Elsevier S, 1987, pp. 407-422.
- [48] Invitrogen Corporation, Chapter 7. Theory of binding data analysis, in: *Tech. Resour. Guid. Fluoresc. Polariz.*, Fourth edi, 2008: pp. 1–18.
- [49] A.A. Sabouri, A.A. Moosavimovahedi, Evaluation of the Hill Coefficient from Scatchard and Klotz Plots, *Biochem. Educ.* 22 (1994) 48–49.
- [50] M.A. Barcroft, B.A. Hill, The nature of oxyhaemoglobin, with a note on its molecular weight, *J. Physiol.* 39 (1910) 411–428.
- [51] M.I. Stefan, N. Le Le Novère, Cooperative Binding, *PLoS Comput. Biol.* 9 (2013) 2–7.
- [52] F.W. Dahlquist, The quantitative interpretation of maximum in Scatchard plots, *FEBS Lett.* 49 (1974) 267–268.
- [53] M. Root-bernstein, R. Root-bernstein, The ribosome as a missing link in the evolution of life, *J. Theor. Biol.* 367 (2015) 130–158.
- [54] C. Dez, D. Tollervey, Ribosome synthesis meets the cell cycle, *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (2004) 631–637.
- [55] A. Fatica, D. Tollervey, Making ribosomes, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 313–318.
- [56] A. Méndez Godoy, *Estudios de la interacción entre las proteínas Efl1 y Sdo1 mediante doble híbrido en levadura*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.

- [57] A. Gijbers Alejandro, Caracterización de la interacción entre la proteína EFL1 y la proteína del síndrome Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [58] A. Brückner, C. Polge, N. Lentze, D. Auerbach, U. Schlattner, Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 2763–2788.
- [59] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E3095–E3103.
- [60] A. Gijbers, T. Nishigaki, N. Sánchez-Puig, Fluorescence anisotropy as a tool to Study protein-protein interactions, *J. Vis. Exp.* (2016) 1–2.
- [61] R.W. Woody, Circular dichroism, *Methods Enzymol.* 246 (1995) 34–71.
- [62] B.A. Wallace, R.W. Janes, Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectroscopy: An emerging method in structural biology for examining protein conformations and protein interactions, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 649 (2011) 177–178.
- [63] K.D. Wilkinson, Quantitative Analysis of Protein – Protein Interactions, *Protein-Protein Interact. Methods Appl.* 261 (2004) 15–31.
- [64] B. Salguero, Expresión y purificación de proteínas recombinantes humanas involucradas en la biogénesis ribosomal, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.

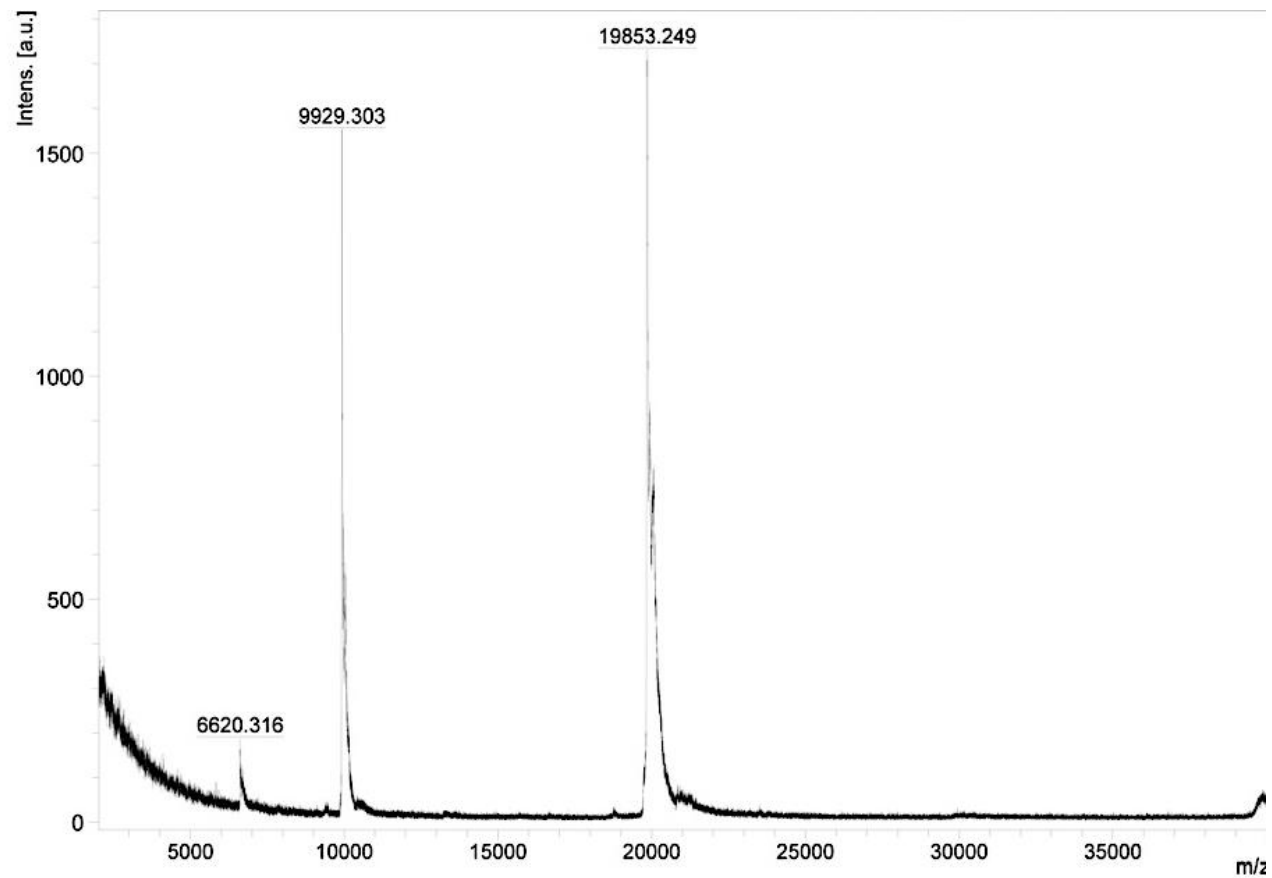
ANEXO A

Espectrofotometría de masas MALDI-TOF

Después de purificados los diferentes dominios y combinaciones de la proteína SBDS, se caracterizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, para obtener su relación masa/carga. El valor experimental de la proteína recombinante se comparó contra el teórico que fué calculado a partir de la secuencia primaria con el programa ExPaSY- ProtParam.

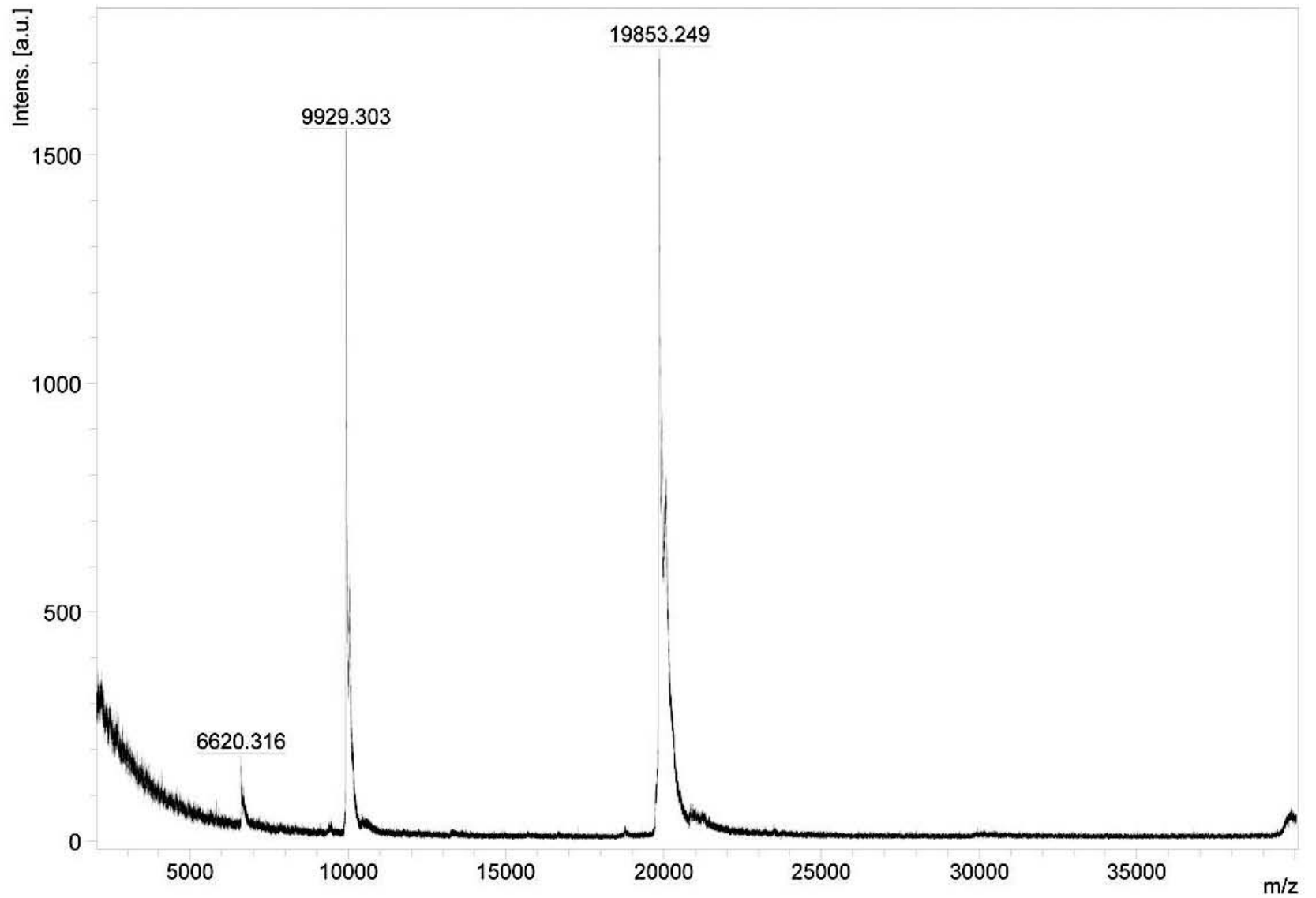
His-SBDS D2+D3 - FIAsh (Dominios 2+3 SBDS)

Masa teórica = 19,858.19 Da



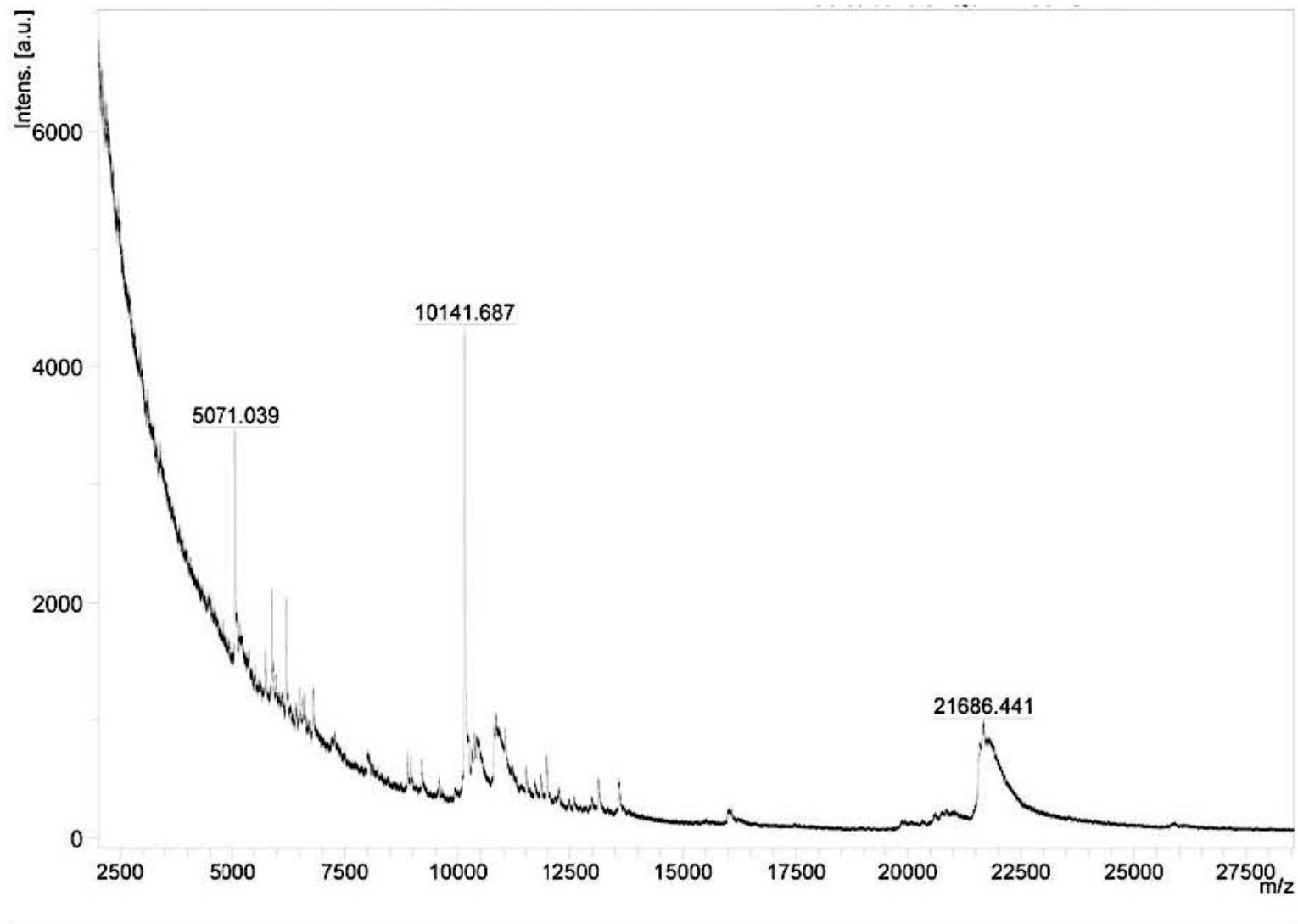
His SBDS D1+D2 Flash (Dominios 1+2 SBDS)

Masa teórica = 21,581.11 Da



His-SBDS D2 – Flash (Dominio 2 SBDS)

Masa teórica = 10,137.56 Da



His-SBDS D1 –Flash (Dominio 1 SBDS)

Masa teórica = 12,060.93 Da

