



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la interacción entre la proteína EFL1 y la proteína del
síndrome Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ABRIL GIJSBERS ALEJANDRE

Nuria V. Sánchez Puig (tutor)
[Instituto de Química, UNAM](#)

León Patricio Martínez Castilla
[Facultad de Química, UNAM](#)

Lilian González Segura
[Facultad de Química, UNAM](#)

MÉXICO, D. F. noviembre, 2015



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.

Agradecimientos

A la coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

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 proyectos 166472 y 167359 por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto.

Al CONACyT por la beca otorgada para mis estudios de Maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir al XXX Congreso Nacional de Bioquímica, Guadalajara, 2014.

“I have found from experience that atypical cases usually turn out to be typical cases of something else. The job is to identify the something else”

L. Diamond

AGRADECIMIENTOS	2
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
1 ANTECEDENTES	9
1.1 INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA	9
1.1.1 MODELOS DE UNIÓN.....	10
1.1.1.1 Interacción a un sitio de unión.....	10
1.1.1.2 Interacción a múltiples sitios de unión independiente.....	13
1.1.2 COOPERATIVIDAD.....	13
1.2 EL RIBOSOMA	15
1.2.1 BIOGÉNESIS RIBOSOMAL Y RIBOSOMOPATÍAS.....	16
1.2.1.1 Ribosomopatías debido a mutaciones en proteínas estructurales.....	18
1.2.1.2 Ribosomopatías debido a mutaciones en proteínas accesorias.....	19
1.2.2 EL SÍNDROME SHWACHMAN-DIAMOND Y LA PROTEÍNA SBDS.....	21
1.2.2.1 SBDS.....	22
1.2.3 EFL1.....	24
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
3 HIPÓTESIS	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVOS GENERALES	30
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
4.2.1 ENSAYOS DE FOTO-ENTRECruzAMIENTO.....	30
4.2.2 ENSAYOS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA.....	30
5 METODOLOGÍAS	31
5.1 REACTIVOS QUÍMICOS	31
5.2 DISOLUCIONES Y AMORTIGUADORES DE PH	31
5.3 MEDIOS DE CULTIVO	33
5.4 PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN	33
5.4.1 PLÁSMIDO PRSET-HISSBDS-FLASH.....	33
5.4.2 PLÁSMIDOS PRSET-HISSBDS / PRSET-SD01HIS.....	33

5.4.3	PLÁSMIDOS PRS426-sCEFL1TevHis / PRS426- hSEFL1TevHis	34
5.4.4	PLÁSMIDOS pEVOL-pAZF Y pEVOL-pBpF	34
5.5	MUTAGÉNESIS SITIO-ESPECÍFICA EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SDO1 Y SBDS 34	
5.5.1	PCR INVERSA	35
5.6	TRANSFORMACIÓN DE ADN PLASMÍDICO EN CÉLULAS BACTERIANAS	36
5.7	AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO POR LA TÉCNICA DE LISIS ALCALINA.....	37
5.8	PATRÓN DE RESTRICCIÓN PARA LA SELECCIÓN DE MUTANTES.....	37
5.9	ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	38
5.10	TRANSFORMACIÓN DE ADN PLASMÍDICO EN LEVADURA	38
5.11	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	39
5.11.1	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	39
5.11.2	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	39
5.11.2.1	Expresión de mutantes Sdo1 y SBDS modificadas con los aminoácidos H-4-Azido-Fenilalanina-OH y H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH	39
5.11.2.2	Expresión de mutantes SBDS-FLASH	40
5.12	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	40
5.12.1	PURIFICACIÓN DE EFL1	40
5.12.1.1	Purificación por cromatografía por afinidad a iones Ni ²⁺	40
5.12.1.2	Purificación por cromatografía de exclusión molecular	41
5.12.2	PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SDO1 Y SBDS	41
5.12.2.1	Purificación por cromatografía de intercambio catiónico	41
5.13	ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)..	42
5.14	CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	42
5.15	EXPERIMENTOS DE FOTO-ENTRECRUZAMIENTO	44
5.16	DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	44
5.17	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)	45
5.18	ENSAYOS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA.....	45
5.18.1	MARCAJE CON EL REACTIVO LUMIO™ GREEN	45
5.18.2	EXPERIMENTOS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	46
6	RESULTADOS	48
6.1	CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUTANTES	49
6.2	SOBRE-EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	52
6.2.1	PROTEÍNAS PARA EL ENSAYO DE FOTO-ENTRECRUZAMIENTO	52
6.2.2	PROTEÍNAS PARA EXPERIMENTOS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	54

6.3	ENSAYOS DE FOTO-ENTRECruzAMIENTO DE PROTEÍNAS CON RESIDUOS DE P-AZIDO-L-FENILALANINA Y P-BENZOIL-L-FENILALANINA	55
6.4	DICROÍSMO CIRCULAR.....	56
6.5	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	58
6.6	ENSAYOS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	59
7	<u>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</u>	<u>65</u>
7.1	FOTO-ENTRECruzAMIENTO EN RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS.....	65
7.2	CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS SBDS Y HSEFL1 POR ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	67
7.3	DISCUSIÓN GENERAL	73
8	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>76</u>
9	<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>77</u>
	<u>APÉNDICE.....</u>	<u>84</u>

Abreviaturas

Amp	Ampicilina
dH ₂ O	Agua destilada
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
scEFL1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor-like 1” de <i>S. cerevisiae</i>
hsEFL1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 1” de <i>Homo sapiens</i>
GAP	Del inglés GTPase-activating Protein
GEF	Del inglés Guanine Exchange Factor
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
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
SBDS	Proteína mutada en el Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond
SD-URA	Synthetic Drop-out sin uracilo
SDS	Síndrome Shwachman-Diamond / Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond
OMIM	Herencia Mendeliana en el Hombre
5q ⁻	Enfermedad por la pérdida del brazo largo del cromosoma 5
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida
snoRNP	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares
TEMED	Tetrametilendiamina

Resumen

Los ribosomas son la maquinaria molecular esencial que decodifica el ARNm en proteínas en la célula y, por lo tanto, su producción es fundamental para el desarrollo de ésta. En organismos eucariontes, los ribosomas están compuestos por una subunidad 40S y una 60S, que se asocian para generar un complejo 80S capaz de llevar a cabo la traducción. La biogénesis del ribosoma comienza en el nucléolo finalizando en el citoplasma y es un proceso que involucra la síntesis, modificación, ensamblaje y transporte de 4 ARNr y 78 proteínas ribosomales. Para que este proceso se lleve a cabo de manera correcta en tiempo y espacio se requiere de la participación de cerca de 200 proteínas accesorias y 75 snoRNPs. Entre estas proteínas accesorias encontramos a la GTPasa EFL1 que a través de la energía de hidrólisis de GTP promueve la liberación del factor de anti-asociación Tif6/eIF6, el cual se encuentra unido a la subunidad mayor del ribosoma para evitar la unión prematura de las dos subunidades. Para llevar a cabo su función, EFL1 requiere de la actividad de la proteína Sdo1 en levadura y su ortólogo en humanos, SBDS, quien actúa como un factor intercambiador de nucleótidos (GEF). Fallas en la síntesis de ribosomas o en su estructura resultan en un conjunto de enfermedades que se conocen como ribosomopatías, y entre éstas se encuentra el síndrome Shwachman-Diamond. El 90% de los pacientes que sufren esta enfermedad contienen mutaciones en el gen que codifica para la proteína SBDS. Existen mutaciones que truncan o desestabilizan a la proteína generando un partícula disfuncional, sin embargo existen mutaciones puntuales que no han sido estudiadas. Con el fin de estudiar la interacción entre las proteínas EFL1 y SBDS, en este trabajo se llevaron a cabo ensayos de foto-entrecruzamiento en residuos específicos de SBDS con aminoácidos no naturales. Los resultados indican que los residuos P122, K177, P168, K126, K141 y L152 de SBDS participan directamente en la interacción con la proteína EFL1. Debido a que algunos de estos residuos se encuentran mutados en pacientes con el Síndrome de Shwachman-Diamond, se buscó caracterizar el efecto de estas mutaciones en la interacción con EFL1. La interacción se describió como una unión a dos sitios distintos con cooperatividad positiva. Los resultados mostraron que las mutaciones presentes en la enfermedad debilitan la interacción con EFL1.

1 Antecedentes

Las proteínas son las biomoléculas más versátiles existentes en los sistemas vivos y juegan un papel central en todo proceso biológico. Las proteínas son polímeros de aminoácidos con distintos niveles de organización estructural que le proveen una función específica llevada a cabo por medio de interacciones físicas con metabolitos, lípidos, ácidos nucleicos y otras proteínas. Se estima que hay cerca de 19,000 genes (1) que codifican un millón de diferentes proteínas (2,3), y que expresadas en distintas proporciones representan el 50% del peso seco de una célula (bacteria: 3×10^6 , levadura: 1×10^8 , humano: 1×10^{10} proteínas por célula) (4). Debido a la cantidad y variedad de proteínas presentes en la célula, las interacciones proteína-proteína juegan un papel fundamental en cada vía o señal presente en la célula. Actualmente se reconoce que los procesos celulares no son aislados y que más bien están interconectados haciendo una red de vías de interacción, lo que convierte a la célula en un sistema altamente organizado y dinámico. Por tal razón, para entender la función de una proteína es crítico el estudio de sus interacciones con otras moléculas (5).

1.1 Interacciones proteína-proteína

Una de las maneras en las que la química biológica se diferencia de la química tradicional es porque la bioquímica se basa en uniones no covalentes y reversibles, característica esencial para la vida. En las proteínas, las uniones no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos son las responsables de la estructura, ensamblaje y función de la proteína (6). No es de sorprenderse que el 80% de las proteínas forman complejos proteicos (2), y su estudio constituye un área de intenso trabajo para la comunidad científica. En la actualidad, existen diversos tipos de métodos que se han desarrollado para estudiar las interacciones entre dos proteínas, sin embargo no siempre es posible estudiarlas por más de un método como forma de comparación debido a las limitaciones de cada método y las características de la interacción. Las técnicas espectroscópicas se usan de manera extensiva con el requisito de tener una respuesta diferente entre el componente libre y el complejo. Una de las ventajas con mayor peso de estos métodos es que el estudio puede ser cuantitativo (2).

1.1.1 Modelos de unión

Para hacer el análisis de la interacción entre un receptor y su ligando de manera simplificada es necesario asumir ciertos criterios como los que se muestran a continuación:

1. Se asume que las interacciones son reversibles. En el caso más simple, la asociación es bimolecular y la disociación es unimolecular.
2. Todos los receptores son equivalentes e independientes.
3. La respuesta a medir es proporcional al número de sitios ocupados en el receptor.
4. La interacción se encuentra en equilibrio.
5. Los componentes no llevan a cabo otras reacciones químicas, y sólo existen en estado libre y unido.

Se entiende como receptor a la proteína con una concentración fija y limitada, y aquella en cantidades variable como el ligando. Estas suposiciones pueden no ser verdad en casos más complejos. A continuación se hará el desarrollo del análisis de la unión de un ligando a un solo sitio en el receptor, y el análisis cuando el receptor une ligando(s) a dos sitios idénticos o diferentes.

1.1.1.1 Interacción a un sitio de unión

La unión de una molécula de ligando (L) a un solo sitio en el receptor (R) está descrita de acuerdo al equilibrio que se muestra a continuación,



donde R_f es la concentración del receptor libre, L_f es la concentración del ligando libre, RL la concentración del complejo, k_1 es la constante microscópica de velocidad de asociación, y k_2 es la constante microscópica de velocidad de disociación. Cuando el sistema se encuentra al equilibrio se puede describir como,

$$\frac{[R_f][L_f]}{[RL]} = K_d \quad (2)$$

donde K_d es la constante de equilibrio de disociación.

Si sustituimos los términos libres por concentraciones totales aplicando la ley de conservación de masas, donde $[L_t]=[L_f]+[RL]$ y $[R_t]=[R_f]+[RL]$, obtenemos la siguiente ecuación:

$$\frac{([L_t] - [RL])([R_t] - [RL])}{[RL]} = K_d \quad (3)$$

Para arreglar la ecuación tal que quede en términos de saturación fraccional $[RL]/[R_t]$ se siguen los siguientes pasos:

- $\frac{([R_t] - [RL])}{[RL]} = \frac{K_d}{([L_t] - [RL])}$
- $\frac{([R_t] - [RL])}{[RL]} = \frac{[R_t]}{[RL]} - \frac{[RL]}{[RL]} = \frac{[R_t]}{[RL]} - 1$
- $\frac{([R_t] - [RL])}{[RL]} = \frac{K_d}{([L_t] - [RL])} + 1$

Donde 1 puede ser el cociente de cualquier valor sobre sí mismo,

- $1 = \frac{([L_t] - [RL])}{([L_t] - [RL])} \Rightarrow \frac{K_d + [L_t] - [RL]}{([L_t] - [RL])}$
- $\frac{[R_t]}{[RL]} = \frac{K_d + [L_t] - [RL]}{([L_t] - [RL])}$

Si sacamos el recíproco de la ecuación llegamos a la expresión que se buscaba, la cual puede ser expresada en términos de $[L_f]$ sustituyendo $([L_t] - [RL])$,

$$\frac{[RL]}{[R_t]} = \frac{[L_t] - [RL]}{K_d + [L_t] - [RL]} = \frac{[L_f]}{K_d + [L_f]} \quad (4)$$

Al graficar la saturación fraccional en función de la concentración de ligando libre se obtiene una hipérbola rectangular (Figura 1A), o si se grafica la saturación fraccional en función del $\log[L_f]$ (gráfica de Klotz) se obtiene una sigmoide (Figura 1B). Sin embargo, para ambos gráficos los valores de la ecuación que describen a estas funciones sólo se obtienen a partir de una regresión no lineal por iteraciones, y para eso se requiere de un programa de computo. Un análisis más simple se puede llevar a cabo por linealizaciones de este modelo como la gráfica de Scatchard que relaciona el $[LR]/[L_f]$ en función del $[L_f]$, y de donde se obtiene las variables a partir de una regresión lineal por las intersecciones con los ejes (Figura 1C). Si este comportamiento no se observa hay que sospechar de un sistema más complejo.

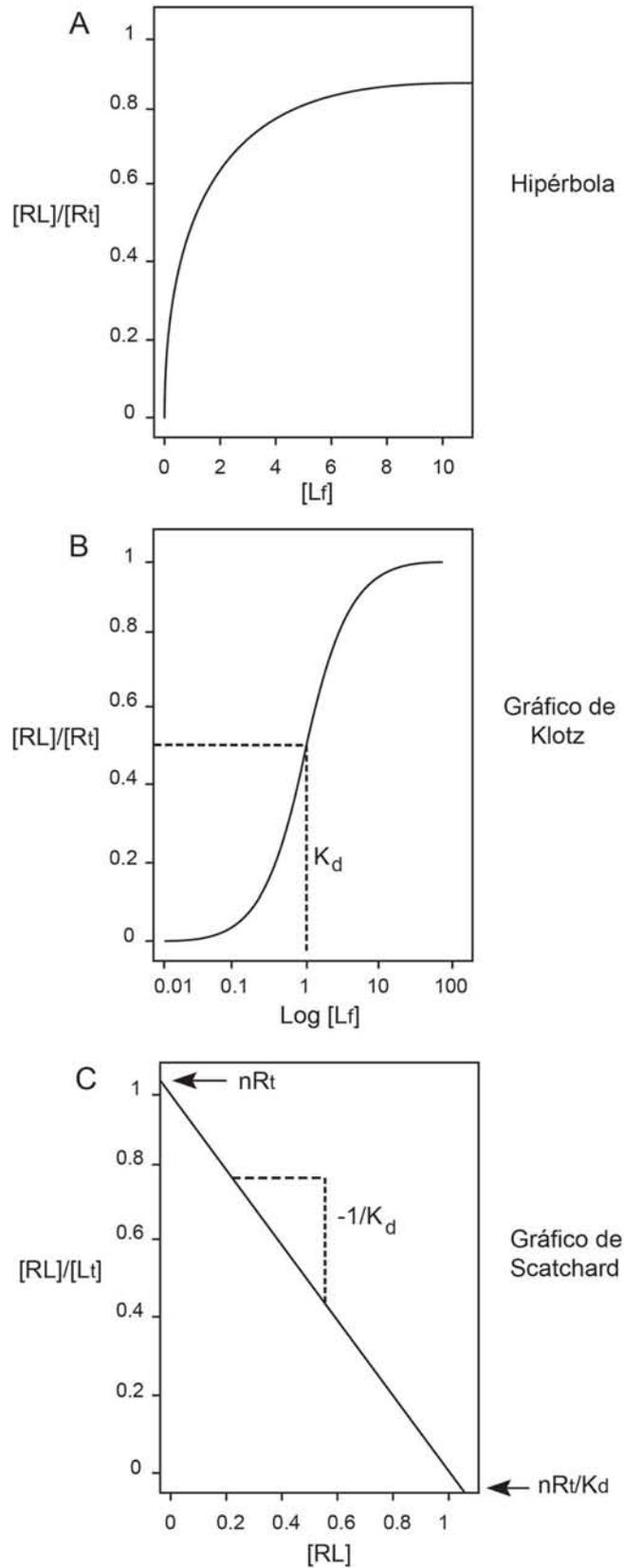


Figura 1. Simulación de los gráficos para la interacción de un solo sitio unión. (A) Gráfico de la saturación fraccional en función de la concentración del ligando libre. (B) Gráfico de Klotz y (C) gráfico de Scatchard de los mismos datos.

1.1.1.2 Interacción a múltiples sitios de unión independientes

Cuando hay más de una molécula de ligando que se une al receptor, la ecuación se complica obteniendo la siguiente ecuación para n sitios de unión:

$$[RL] = [RL_1] + [RL_2] + \dots + [RL_n] = \frac{[R_t][L_f]}{K_{d1} + [L_f]} + \frac{[R_t][L_f]}{K_{d2} + [L_f]} + \dots + \frac{[R_t][L_f]}{K_{dn} + [L_f]} \quad (5)$$

Si los sitios son idénticos (misma K_d), la ecuación 5 se puede simplificar a

$$\frac{[RL]}{n[R_t]} = \frac{[L_f]}{K_d + [L_f]} \quad (6)$$

Una descripción completa de la unión requiere que la concentración de ligando libre varíe dos unidades logarítmicas por abajo y por arriba de la K_d , sin embargo no siempre es posible abarcar este rango de concentraciones. En el límite inferior podemos tener problemas con la sensibilidad del equipo, mientras que concentraciones muy altas pueden ser difíciles de alcanzar por la falta de solubilidad del ligando.

Existe la posibilidad de que los sitios de unión no tengan la misma afinidad por sus ligandos (diferente K_d), y aunque muchos de estos casos son debidos a una interacción no específica, no siempre es así. Un gráfico de Scatchard nos permite discernir entre un sitio de unión o un modelo más complejo y de qué tipo (Figura 2). Si el gráfico de Scatchard que se obtiene es una curva cóncava, entonces el modelo de unión corresponde a más de un sitio con sitios distintos con cooperatividad negativa o unión inespecífica (7). En contraparte, si se trata de un modelo de unión a más de un sitio con sitios distintos pero con cooperatividad positiva o si el ligando es inestable, entonces el gráfico de Scatchard será convexo. No importa cual sea el caso, se requiere información adicional para poder concluir el tipo de interacción que ocurre entre las proteínas (8).

1.1.2 Cooperatividad

El proceso de cooperatividad puede ocurrir si existen dos o más sitios de interacción. Se dice que hay cooperatividad si la afinidad de un sitio de unión por su ligando cambia cuando otro sitio se encuentra ocupado. Si bien el coeficiente de Hill es la descripción más común de la cooperatividad, su valor no se relaciona directamente con el influencia de un sitio sobre otro. La definición correcta de cooperatividad se

debe de dar en términos de energía libre (ΔG), sin embargo, en situaciones donde sólo las constantes macroscópicas de unión son obtenidas no es posible calcular dicho valor (9).

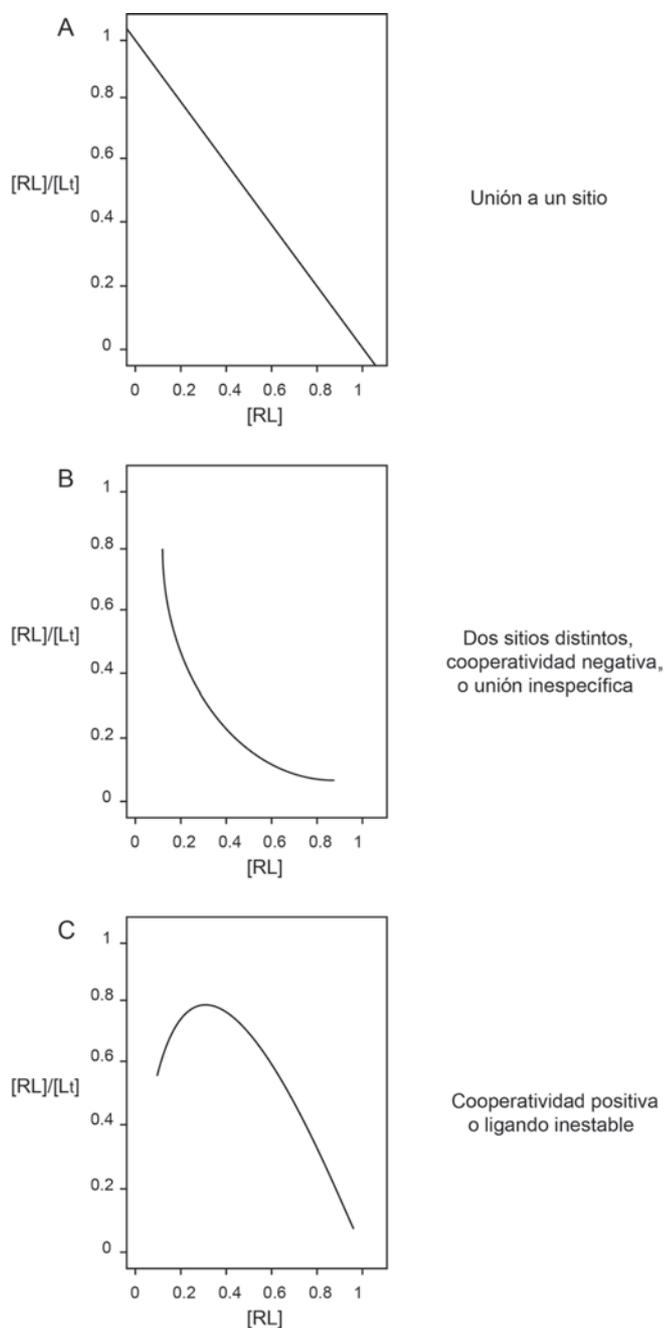


Figura 2. Gráficos de Scatchard simulando los distintos tipos de unión. (A) Gráfico de Scatchard para un solo sitio de unión o sitios idénticos sin interacción. (B) Gráfico de Scatchard con una desviación cóncava que representa la unión en sitios distintos, cooperatividad negativa o interacción no específica. (C) Gráfico de Scatchard con una desviación convexa que representa la unión de sitios distintos con cooperatividad positiva.

1.2 El ribosoma

El ribosoma es la maquinaria molecular encargada de la síntesis de proteínas en la célula, por lo que entender su mecanismo de acción y ensamblaje han sido de gran interés biológico y farmacológico (10). Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos compuestos de dos subunidades, que en eucariontes se conocen como 60S (subunidad mayor) y 40S (subunidad menor) (Figura 3). La subunidad mayor del ribosoma de levadura cuenta con tres ARNr (5.8S, 5S y 25S) y 46 proteínas, mientras que la menor consta de un ARNr (18S) y 32 proteínas. En el proceso de traducción cada subunidad tiene funciones diferentes: la mayor tiene actividad de peptidil-transferasa formando la cadena de aminoácidos a partir de la decodificación del ARNm, llevada a cabo por la subunidad menor (11,12).

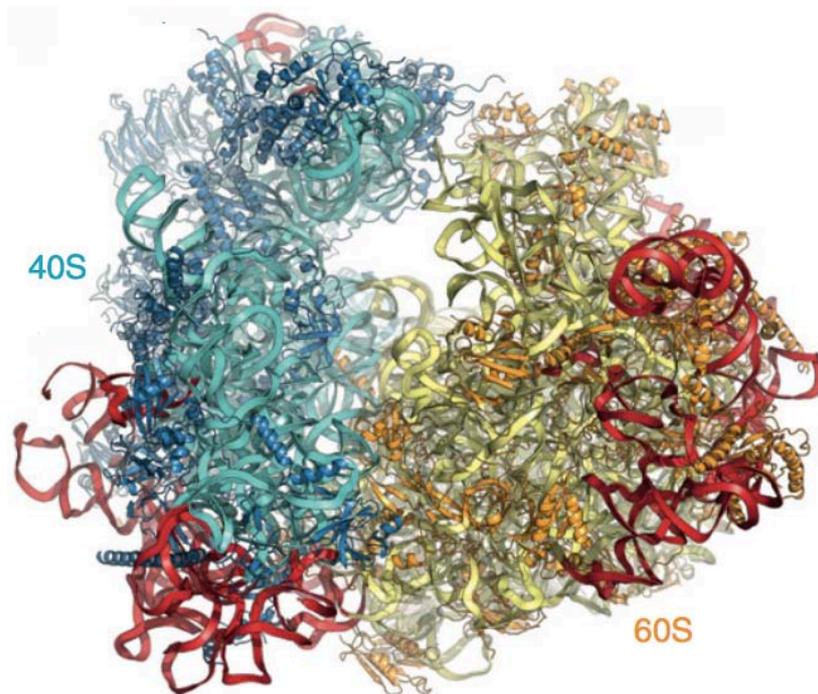


Figura 3. Estructura cristalográfica de la partícula ribosomal eucarionte 80S. En la figura se representa la subunidad mayor en amarillo con sus respectivas proteínas en naranja, mientras que la subunidad menor se encuentra en color cian con sus proteínas en azul. En rojo se muestran los segmentos de expansión de eucariontes, los cuales no se mencionan en este trabajo (11).

Al proceso en el cual se sintetizan los ribosomas se le conoce como biogénesis ribosomal. Este proceso constituye un gasto energético y de biomateriales considerable para la célula. Para llegar a una partícula ribosomal madura se requiere de la síntesis, modificación, ensamblaje y transporte de las partículas estructurales, tarea que debe ser coordinada de manera correcta en tiempo y espacio. Para que este proceso se lleve a cabo se necesita la participación de las tres ARN polimerasas, más

de 200 proteínas accesorias y 75 ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs). Incrementando la dificultad de la vía, se necesitan cerca de 200,000 ribosomas para mantener los niveles proteicos en la célula, y si tomamos en cuenta que el tiempo de duplicación de una levadura es de ~100 min, la célula necesita sintetizar 2,000 ribosomas cada minuto. Como si no fuera suficiente, este es un proceso que inicia en el nucléolo y finaliza en el citoplasma, por lo que se requiere la exportación de las subunidades por poros nucleares. Siendo aproximadamente 150 poros nucleares en una célula, cada poro debe importar cerca de 1,000 proteínas ribosomales por minuto que se ensamblarán en las pre-subunidades ribosomales, y la subsecuente exportación de 25 de éstas últimas cada minuto para terminar su proceso de maduración en el citoplasma. Con esta información uno pensaría que la célula sólo hace ribosomas, y no es tan erróneo, pues el 60% del transcrito total es destinado al ribosoma, incluso el 50% del transcrito que lleva a cabo la ARN polimerasa II es para la síntesis de proteínas ribosomales (13). A continuación se hablará con más detalle sobre la biogénesis ribosomal y de las consecuencias que genera un error en este complejo rompecabezas.

1.2.1 Biogénesis ribosomal y ribosomopatías

Debido a su extenso uso por la facilidad de manejo, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido un modelo clave para el estudio de la biogénesis ribosomal, por lo que la información que aquí se presenta corresponderá a levadura a menos que se especifique lo contrario. A pesar del amplio y detallado conocimiento que se tiene sobre la estructura y función del ribosoma, falta mucha información sobre su vía de síntesis.

Se sabe que proceso de biogénesis ribosomal comienza en el nucléolo con la síntesis de una molécula de ARN precursora 35S por la ARN polimerasa I. Este pre-ARN contiene a los ARNr 18S, 5.8S y 25S, así como regiones no codificantes que deben ser removidas para su respectiva maduración. Para ello, este ARN policistrónico sufre reacciones de corte endo- y exonucleolíticas, y modificaciones post-transcripcionales tales como metilación de la ribosa o de la base nitrogenada y pseudouridinilación por proteínas accesorias (14). Hasta la fecha se han descrito cerca de 100 sitios de modificación post-transcripcional, y aunque la función de ellas se desconoce parecen ser importantes durante el proceso de traducción (15). Al mismo tiempo que el ARN se modifica, proteínas ribosomales y accesorias se van ensamblando para formar el complejo pre-90S que es procesado rápidamente para formar las subunidad pre-60S y

pre-40S, quienes siguen un proceso de maduración independiente. La ARN polimerasa III sintetiza al ARNr 5S que se integra posteriormente a la partícula pre-60S (Figura 4) (14,16,17). La ARN polimerasa II se encarga de crear a los ARNm de cada proteína que participa en la vía, ya sea estructural o accesoria. Las proteínas accesorias son las encargadas de darle tiempo y dirección al proceso; se han encontrado cerca de 200 proteínas con diversas funciones, tales como endo- y exonucleasas, helicasas, ATPasa, GTPasas, chaperonas y proteínas de exportación, entre otras (14,18).

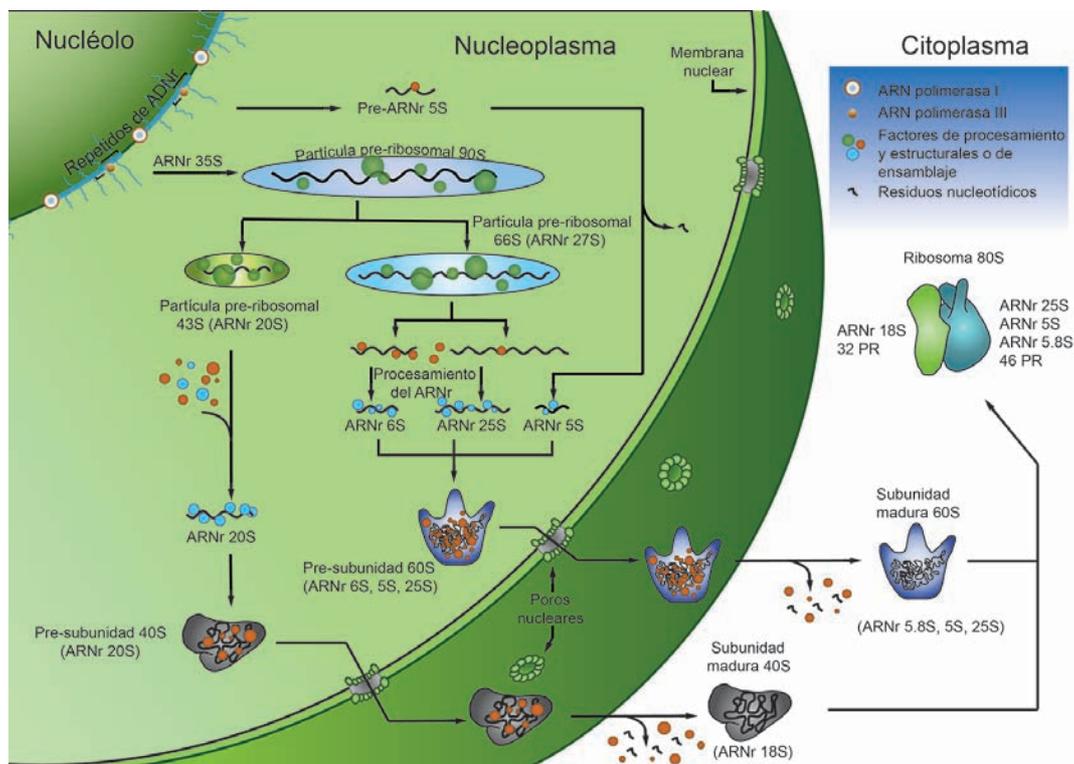


Figura 4. Diagrama del proceso de biogénesis ribosomal en *Saccharomyces cerevisiae*. Inicio en el nucléolo con la síntesis del ARN ribosomal 35S quien se acopla con factores modificadores para formar el procesoma pre-90S. El procesamiento de partícula pre-90S da lugar a las subunidades pre-60S y pre-40S que llevan procesos de maduración independiente finalizando en el citoplasma. En el proceso, proteínas accesorias con diversas funciones se asocian a las partículas ribosomales para darle dirección y tiempo a la vía (modificado de (19))

Debido a la función esencial del ribosoma, un error en su estructura o en su vía de ensamblaje compromete la viabilidad de la célula. Al conjunto de enfermedades relacionadas con deficiencias en la biogénesis ribosomal y función del ribosoma se les conocen como ribosomopatías. Éstas son enfermedades con cuadros clínicos heterogéneos (incluso entre pacientes con la misma enfermedad) pero que

comúnmente presentan fallas en la médula ósea, anormalidades esqueléticas y predisposición a desarrollar cáncer (20). Debido a que este trabajo se centra en sólo una ribosomopatía, mencionaré de manera breve las causas y consecuencias de la aberración ribosomal en las distintas enfermedades, y describiré con más detalle la información que se tiene sobre el Síndrome Shwachman-Diamond.

Según la proteína afectada, las ribosomopatías las podemos dividir en aquellas que alteran la síntesis, el procesamiento o la maduración de la partícula ribosomal por mutaciones en proteínas accesorias, y aquellas que comprometen al ribosoma por mutaciones en proteínas estructurales.

1.2.1.1 Ribosomopatías debido a mutaciones en proteínas estructurales

Dentro de las enfermedades con mutaciones en proteínas estructurales, se encuentran la anemia Blackfan-Diamond, el síndrome causado por la pérdida del brazo largo del cromosoma 5 (5q⁻) y la asplenia congénita. La anemia Blackfan-Diamond (OMIM #105650) es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por una anemia macrocítica, es decir, incremento en el tamaño de los eritrocitos, y una insuficiencia en sus precursores. Los pacientes también presentan malformaciones óseas y un crecimiento deficiente, así como un aumento en la predisposición a desarrollar leucemia mieloide aguda (AML). Esta enfermedad es causada, en el 70% de los pacientes, por mutaciones en proteínas estructurales tanto de la subunidad mayor como de la menor. Hasta el momento se desconoce la relación entre proteínas mutadas y el cuadro clínico del paciente, sólo se han asociado mutaciones en las proteínas L11 y L5 con anormalidades en el pulgar y en el paladar (21), y mutaciones en S19 y L11 generan una deficiencia en la traducción de ARNm dependientes de IRES implicados en la vía hematopoyética (22).

El síndrome 5q⁻ (OMIM #153550) se asemeja a la Anemia de Blackfan-Diamond, sin embargo este síndrome es causado, como su nombre lo indica, por la delección del brazo largo del cromosoma 5. Entre los genes que se pierden en esta región se encuentra el de la proteína S14, quien parece ser responsable de la anemia macrocítica en los pacientes (23).

La última de las ribosomopatías que afectan proteínas estructurales es la asplenia congénita aislada (OMIM #271400). Esta enfermedad tiene como única característica la ausencia de bazo por lo que se tiene un alto riesgo de infecciones. Más de la mitad

de los pacientes presentan mutaciones en el gen *RPSA* por lo que se considera a la proteína codificada el blanco de estudio para entender esta enfermedad (24).

1.2.1.2 Ribosomopatías debido a mutaciones en proteínas accesorias

Dentro de las enfermedades con mutaciones en proteínas accesorias, se encuentran el síndrome Treacher Collins, la cirrosis en niños indios norteamericanos, síndrome Bowen-Conradi, la disqueratosis congénita, la hipoplasia cartílago cabello y el síndrome Shwachman-Diamond.

El síndrome Treacher Collins (OMIM #154500 y #613717) es un desorden autosómico dominante que se caracteriza por un deficiente desarrollo craneofacial. Este síndrome es causado por mutaciones en el gen *TCOF1*, el cual codifica para una fosfoproteína nucleolar llamada Treacle. La función exacta de esta proteína no se conoce, sin embargo, se encuentra afectada la síntesis de ARNr por la interacción con un factor de transcripción de la ARN polimerasa I (25). También se han encontrado mutaciones en los genes *POLRIC* y *POLRID* en pacientes con esta enfermedad, los cuales codifican para subunidades de la ARN polimerasa I y III respectivamente (26).

La cirrosis en niños indios norteamericanos (OMIM: 604901) es una enfermedad autosómica recesiva que sólo se ha encontrado en niños Ojibway-Cree en Canadá. Comienza como una ictericia neonatal que evoluciona a cirrosis biliar e hipertensión en la vena porta, siendo el trasplante de hígado el único tratamiento. La causa de esta enfermedad se relaciona con la mutación R565W del gen *CIRH1A* (27) que codifica para la proteína Utp4/Cirhin, un elemento del procesoma de la subunidad menor (SSU, de sus siglas en inglés Small SubUnit processome) (28). Modelos de pez cebra registran una alta expresión del gen en el hígado cuando el organismo está en desarrollo, por lo que se infiere que mutaciones en el gen hacen más susceptible al hígado a presentar deficiencias (29). Otro gen mutado involucrado con el procesoma SSU es el que codifica para la proteína Emg1, que en levaduras se ha demostrado que tiene función de pseudouridin-N1-metiltransferasa. Esta mutación es la causa del síndrome Bowen-Conradi en humanos (OMIM #211180), que se caracteriza por el retraso de crecimiento pre- y post-natal, microcefalia, así como muerte en edad temprana. Curiosamente, la mutación en pacientes Bowen-Conradi parece afectar sólo su localización en la célula (30).

La disqueratosis congénita (DC, OMIM #127550) es un desorden caracterizado por pigmentación anormal de la piel, leucoplaquia y distrofia en la uñas. Como otras

ribosomopatías, presenta fallas en la médula ósea, deficiencias inmunológicas y un aumento en la predisposición de desarrollar leucemia. De acuerdo a su modelo de herencia existen tres tipos: la ligada al cromosoma X, la autosómica dominante y la recesiva. En pacientes con DC ligada al X se encuentra mutado el gen *DKC1* que codifica para la proteína disquerina, que junto con la proteína GAR1, NHP2 y NOP10, proteína mutada en la DC recesiva, componen el complejo asociado a ARN H/ACA (31). Estos complejos, conocidos como snoRNPs, son ribonucleoproteínas con función de pseudouridinilación y maduración del ARNr, llevado a cabo por apareamiento de bases del ARNr y del ARN del complejo H/ACA. Modificaciones en la pseudouridinilación del ARNr parecen afectar la afinidad del ribosoma por ARNm cuya traducción depende de IRES (sitios internos de traducción) entre los que se incluyen supresores de tumores como p27. Este complejo parece también relacionarse con el mantenimiento celular al unirse al ARN de la telomerasa. Los pacientes con DC dominante presentan mutaciones en TERC o TERT (subunidad catalítica de la telomerasa) (32).

La hipoplasia cartílago cabello (OMIM #250250) es la última de las ribosomopatías que involucran una modificación en el procesamiento del ARNr. Este síndrome se describió por primera vez en la comunidad Amish, aunque también se han reportado casos en Finlandia. Es un desorden autosómico recesivo, las principales características son enanismo, disostosis metafiseal, cabello fino y escaso, y disfunciones gástricas. La causa de este desorden es la mutación del gen *RMRP* que codifica para el ARN catalítico de la RNasa MRP, dicho complejo está encargado de cortes nucleolíticos en el ARNr y degradación de ARNm (33). La alta predisposición a desarrollar cáncer se atribuye a la acumulación de la ciclina B, por falta de degradación de su ARNm, siendo esta proteína importante en el ensamblaje mitótico (34).

La última ribosomopatía de la cual voy a hablar está relacionada con el penúltimo paso de la maduración de la subunidad 60S, y debido a que es el tema central de este trabajo dedicaré una sección completa para hablar de ella a detalle. Para más información relacionada con la biogénesis del ribosoma y ribosomopatías referirse a (35-38).

1.2.2 El Síndrome Shwachman-Diamond y la proteína SBDS

El síndrome Shwachman-Diamond (SDS, OMIM #260400) es una enfermedad autosómica recesiva (39) que se caracteriza por insuficiencia pancreática exocrina, disfunción de la médula ósea y anomalías esqueléticas. El SDS es un síndrome multisistémico con fenotipo variable y una incidencia aproximada de 1:168,000 en nacimientos vivos (40). A pesar de ser una enfermedad poco común, el SDS es considerado como la causa más común de insuficiencia pancreática en niños junto con la fibrosis quística. El 86% de los pacientes tiene mala absorción y diarrea con grasa en las heces (esteatorrea) conduciendo a una mala nutrición y deficiencia de vitaminas liposolubles. Las manifestaciones más severas ocurren en la infancia, sin embargo, conforme pasan los años más del 50% de los pacientes mejoran la producción enzimática y generan suficiencia pancreática con absorción normal de grasas (41).

El SDS es el tercer síndrome más común de disfunción medular después de la anemia de Fanconi y la anemia Blackfan-Diamond. Uno de los requisitos para el diagnóstico de SDS es el bajo número de neutrófilos (neutropenia) en los niños, ésta es la anomalía más común con una incidencia entre 88-100% en los pacientes (42). Los neutrófilos son el primer tipo celular que responde a una infección y, por ende, los pacientes con SDS son susceptibles a infecciones bacterianas, virales o micóticas. Complicaciones con una sepsis es la causa más común de muerte en los primeros años de vida. Esta susceptibilidad existe por el bajo número de células y una deficiencia en la movilidad y migración en las células existentes (43). También es común tener bajos niveles de reticulocitos y plaquetas, pero si se presenta hipoplasia de las tres líneas celulares (pancitopenia) hay un mal pronóstico por una elevada probabilidad de desarrollar síndrome mielodisplásico (de sus siglas en inglés, MDS) o leucemia (42). La leucemia o cáncer de la sangre es una enfermedad que afecta a la médula ósea. El Instituto Nacional de Cáncer de EUA registró 54,270 nuevos casos de leucemia en el 2015 y 24,450 muertes. Con esta incidencia, la leucemia se considera un cáncer relativamente raro (11° lugar), sin embargo, la tasa de muerte la pone entre los cinco cánceres más peligrosos (el 42.5 % de las pacientes morirán en 5 años o menos). En los últimos 20 años, los avances en la ciencia no han logrado disminuir el número de muertes debido a la complejidad y variedad de la enfermedad, por lo que SDS juega un papel importante como modelo de estudio (44).

El sistema óseo es el más afectado después del pancreático y el hematopoyético en pacientes con SDS. Las anomalías en este sistema son muy variadas, sin embargo,

más de la mitad de los pacientes tienen disostosis metafiseal, generalmente de la cabeza femoral. Otros órganos o estructuras afectadas son el hígado, cerebro, riñones, ojos, piel, testículos, corazón, sistema pancreático endócrino y nervioso, y la estructura craneofacial (41,45).

1.2.2.1 SBDS

Como en el resto de las ribosomopatías, la causa de la enfermedad no se sabe con seguridad, sin embargo, la mayoría de las personas que padecen el síndrome Shwachman-Diamond presentan mutaciones en un gen, el cual actualmente se conoce como *SBDS* debido al síndrome. Este gen se compone de cinco exones con una longitud de 7.9 kb y un transcrito de 1.6 kb que codifica para una proteína de 250 aminoácidos (46). Sólo el 90% de los pacientes contienen al gen *SBDS* mutado en uno o ambos alelos alterando la función del producto (ver APÉNDICE), del 10% restante se desconoce la partícula afectada. Se infiere que este porcentaje corresponde a afecciones en el ribosoma o la proteína EFL1 debido a la función conjunta que llevan a cabo (ver más adelante), pero hasta hace poco no se tenía un caso que lo confirmara (47). Ahora se sabe de un paciente que no presenta mutaciones en *SBDS* sino en el gen que codifica para la proteína EFL1 (Dra. Katherine Kim, Ann & Robert H. Lurie Children's Hospital of Chicago, comunicación personal). De los pacientes con mutaciones en *SBDS*, la mayoría (75%) presentan mutaciones ocasionadas por la conversión con un pseudogen (*SBDSP*) adyacente con 97% de identidad y que predice la síntesis de una proteína truncada (46). Estas mutaciones son la 183-184TA→CT, que genera un codón de paro (X) en el aminoácido 62 (K62X), y la 258+2T→C que interrumpe el sitio donador del empalme en el intrón 2 generando otro en el sitio 251-252. Este cambio en el sitio de empalme produce un corrimiento en el marco de lectura (frameshift, fs) que codifica para un codón de paro tres residuos después del aminoácido 84 (C84fsX3) (46). El 25% de los pacientes restantes contienen mutaciones que resultan de la inserción o eliminación de nucleótidos en el gen o a cambios que codifican para aminoácidos distintos (Figura 5) (ver APÉNDICE). El 60% de los pacientes presentan mutaciones en ambos alelos y generalmente uno de ellos es a causa de la conversión con *SBDSP*, incluso se han detectado más de una mutación en el mismo alelo. La mayor parte de estos pacientes son heterocigotos, sin embargo, se han presentado pacientes homocigotos con la mutación del sitio de empalme, lo interesante es que no existen homocigotos con la mutación K62X

presumiblemente letal. Hasta ese punto se desconocía la función del gen pero era claro que este síndrome debía tener más factores involucrados, ya que, pacientes con las mismas mutaciones no presentan el mismo fenotipo (48). Entre las mutaciones que presentan pacientes con SDS se puede hacer una clasificación según el efecto que tengan sobre la proteína: 1) mutaciones que truncan a la proteína, 2) mutaciones puntuales que desestabilizan a la proteína causando su desnaturalización y 3) mutaciones puntuales que afectan epítomos en la superficie de la proteína (49) (Figura 5).

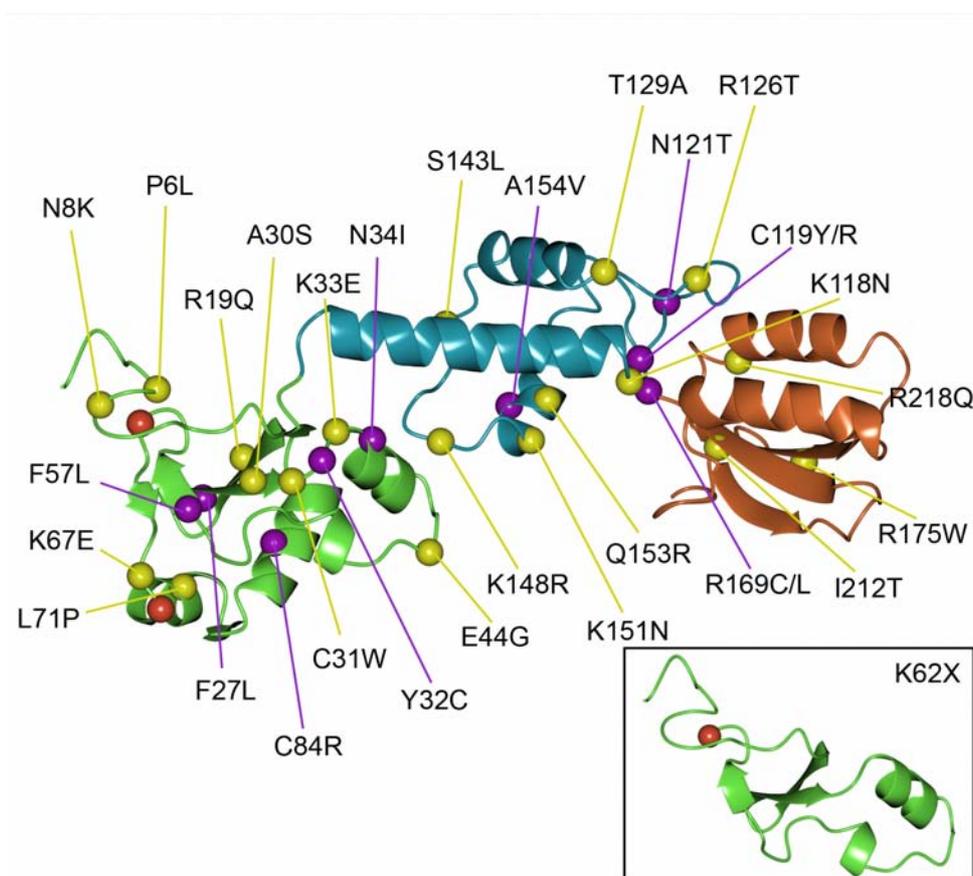


Figura 5. Estructura cristalográfica de la proteína humana SBDS. Distribución en el espacio de los tres dominios (I: verde; II: azul, y III: naranja). Mutaciones presentes en pacientes con SDS que afectan la superficie de la proteína se resaltan con esferas de color amarillo, mientras que las que afectan la estabilidad de la proteína son marcadas de color morado. Esferas rojas representan residuos donde es truncada la proteína por mutaciones. En el interior del rectángulo se presenta el péptido que se sintetiza cuando se presenta la mutación K62X (PDB 2L9N).

En condiciones normales, el gen *SBDS* codifica para una proteína de 250 aminoácidos conocida por el mismo nombre y que se expresa en todos los tejidos del cuerpo humano (46). Esta proteína forma parte de una familia altamente conservada en el dominio *Archaea* y *Eucarya*, pero no en *Bacteria* (50). Las estructuras cristalinas de ortólogos de SBDS de *Archaeoglobus fulgidus* (51,52) y *Methanothermobacter*

thermautotrophicus (53), así como la estructura de la proteína humana obtenida por RMN (49) (Figura 5) muestran una estructura tridimensional muy similar entre ellas a pesar de la poca identidad (22%) (49). SBDS está formada por tres dominios: un dominio N-terminal con un plegamiento denominado FYSH (por su homología con un dominio de la proteína de levadura Yhr087wp; Fungal, Yhr087wp, Shwachman), el cual parece contribuir al plegamiento y estabilidad de la proteína; un dominio central que confiere especie-especificidad a la proteína; y el C-terminal con una estructura del tipo ferredoxina con homología estructural al dominio V del factor de elongación 2 de levadura, dominio de unión a ARN (50-52).

SBDS es un gen cuasi-esencial, modelos en ratones (54) y levadura (55) muestran la pérdida de viabilidad al eliminar el gen, hasta que se generan mutaciones supresoras que recuperan la capacidad celular. La proteína SBDS se localiza tanto en citoplasma como en núcleo, con altas concentraciones en el nucléolo (47). Evidencias por estudios en ortólogos de SBDS sugieren su participación en la biogénesis ribosomal. En *Archaea*, el gen se encuentra en un operón que contiene genes procesadores de ARN (56). De igual forma, diversos ensayos en *Saccharomyces cerevisiae* relacionan a Sdo1, ortólogo de SBDS, en el procesamiento de ARN y biogénesis ribosomal (52,57). Menne et al. (55) demostraron su participación en la maduración de la subunidad 60S al liberar al factor de anti-asociación Tif6; esta información fue confirmada posteriormente por Finch et al (49).

La biogénesis ribosomal es una vía esencial para la célula, pero no explica todas las características clínicas que presentan los pacientes con el síndrome Shwachman-Diamond. Además de biogénesis ribosomal, otros estudios han relacionado a la proteína SBDS con múltiples vías tales como motilidad celular (58), regulación de especies reactivas de oxígeno (59), estabilizando el huso mitótico (60,61), y función mitocondrial (62).

1.2.3 EFL1

EFL1 (Elongation Factor-Like 1) es una proteína de levadura con función de GTPasa presente en la biogénesis ribosomal. Su ortólogo en humano se le conoce con el mismo nombre, por lo que se usará los prefijo sc (*Saccharomyces cerevisiae*) o hs (*Homo sapiens*) para diferenciarlas. Esta proteína es homóloga a la GTPasa EF-G/eEF2, que es un factor de elongación de la traducción que utiliza la energía de

hidrólisis del GTP para generar un re-arreglo conformacional que facilita el traspaso del aminoacil-ARNt del sitio A al sitio P. Modelos estructurales proponen que EFL1 presenta la estructura básica de los factores de elongación EF-G/eEF2, es decir, cinco dominios siendo el dominio de unión a nucleótidos de guanina el I y los restantes enumerados del II-V. Estas GTPasas presentan una alta homología, sin embargo, EFL1 se distingue por tener una inserción de aproximadamente 160 residuos en el dominio II (Figura 6).

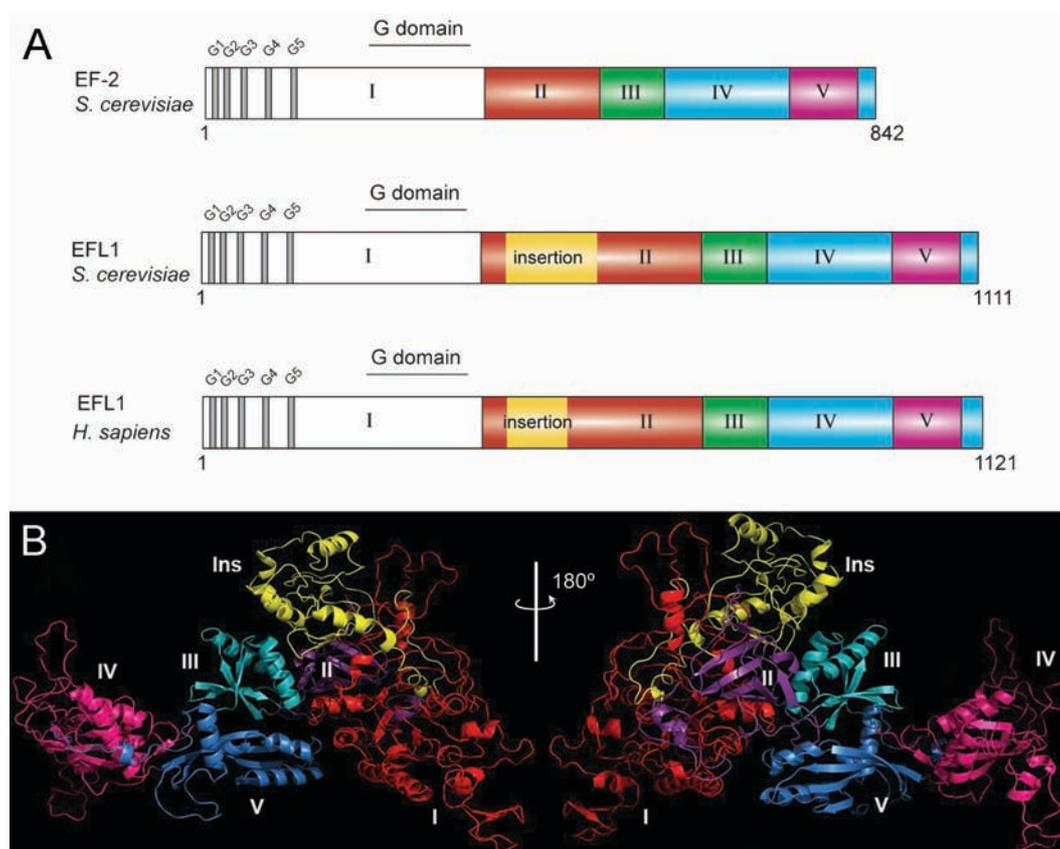


Figura 6. Organización estructural de la GTPasa EF-2 y sus homólogas EFL1. A) Distribución de los dominios estructurales de la proteína EFL1 de levadura y humana, y la proteína EF-2. B) Modelo tridimensional de scEFL1 obtenida por homología a la proteína EF-2 (Modelo de Alfonso Méndez-Godoy).

Así como para la proteína Sdo1, se describió la interacción genética que existe entre esta GTPasa y la proteína Tif6 (63,64). Basándose en esta información, se propuso un modelo en el que Sdo1 y EFL1 se unen al ribosoma para liberar a Tif6 mediante un re-arreglo conformacional promovido por la energía de hidrólisis de GTP, así la subunidad ribosomal pre-60S sufre un último paso de maduración por la GTPasa Lsg1 antes de estar listas para participar en el proceso de traducción (Figura 7). Para

empezar a entender cómo es que EFL1 y Sdo1 llevan a cabo esta función se obtuvieron los parámetros cinéticos de EFL1 (65). Es bien sabido que las GTPasas relacionadas con el ribosoma no se caracterizan por llevar a cabo una función eficiente, incluso se acostumbra llamarlas proteínas unidoras de nucleótidos de guanina en vez de enzimas. Para que estas proteínas puedan hidrolizar GTP de manera eficiente se necesita la participación de una o varias biomoléculas efectoras que modifiquen los parámetros cinéticos de la enzima. Existen factores que favorecen la catálisis (GAP, **GTPase Activating Proteins**) o que intervienen en el recambio de los nucleótidos de guanina (GEF, **Guanine nucleotide Exchange Factors**) (66). Si bien el papel de Sdo1/SBDS en la liberación de Tif6 (eIF6 en humanos) se desconocía, era claro que algún efecto debía tener en la función de EFL1. Dicho esto, se demostró que tanto la proteína SBDS de levadura como la humana disminuyen a la mitad la constante de Michaelis-Menten de EFL1 por GTP debido a un aumento en la constante de disociación por GDP (ver Tabla 1) (65,67). De tal modo que SBDS es una proteína efectora de EFL1 que actúa como su intercambiador de nucleótidos de guanina. La relación intracelular de GDP/GTP en condiciones normales es 1:10 (68), por lo que la proteína EFL1 libre se encuentra preferentemente en un estado inactivo unido a GDP con una relación de 2:1 con respecto al estado activo unido a GTP. Esta situación cambia cuando EFL1 se encuentra en complejo con SBDS donde la relación se invierte a 1:50.

Tabla 1. Constantes de disociación de la interacción entre análogos fluorescentes de guanina y EFL1 sola o en complejo con SBDS (67).

Complejo	Nucleótido	K _d (μM)
EFL1	Mant-GDP	9.7
EFL1•SBDS	Mant-GDP	618
EFL1	Mant-GTP	171
EFL1•SBDS	Mant-GTP	231

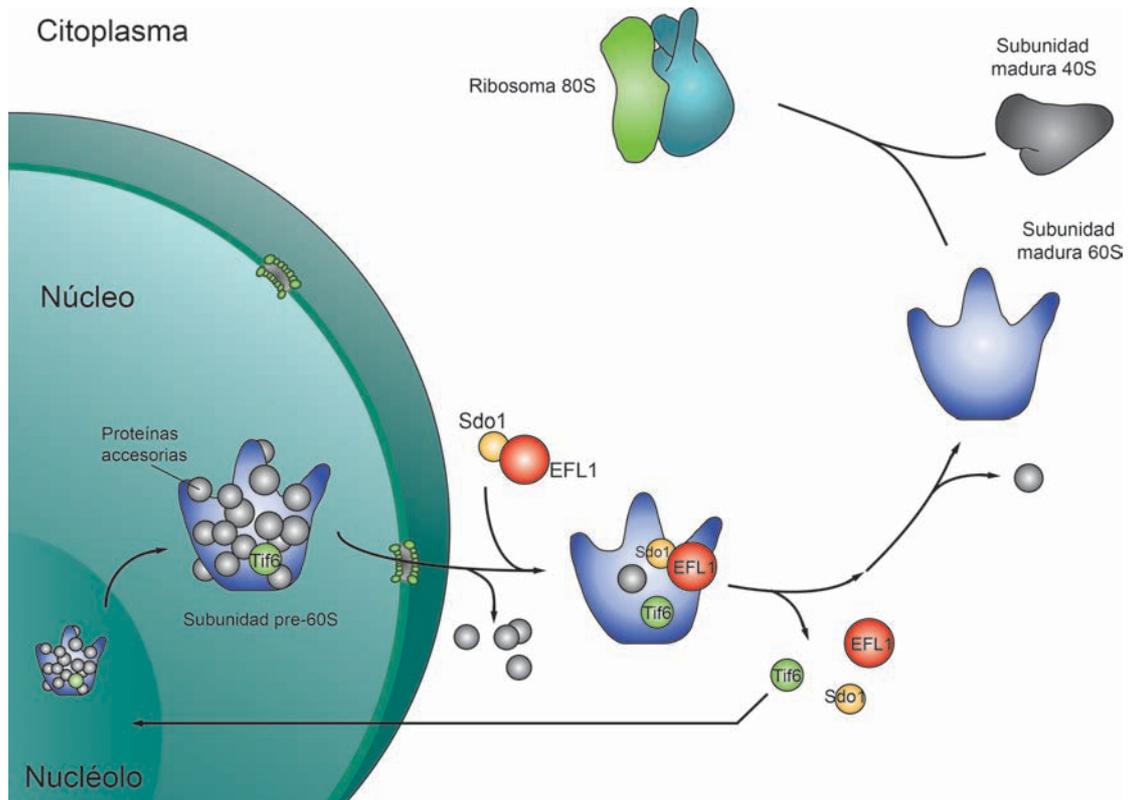


Figura 7. Modelo de la función de la proteína Efl1 y Sdo1. Efl1, unida a Sdo1, interaccionan con la subunidad 60S y a partir de la fuerza de hidrólisis de GTP liberan al factor de anti-asociación Tif6 que se encuentra generando un impedimento estérico entre las subunidades ribosomales.

2 Planteamiento del problema

Las proteínas son las biomoléculas encargadas de un sin fin de actividades dentro y fuera de la célula. Los ribosomas son la maquinaria celular encargada de la síntesis de estas biomoléculas y por eso son elementos esenciales para la vida, tal que, parecería impensable errores graves en la estructura o en la vía de síntesis del ribosoma. Sin embargo, se han reportado mutaciones ribosomales en organismos vivos, lo cual resulta en un fenómeno complejo. Mutaciones en una proteína específica afectan tejidos específicos causando un tipo de enfermedad. Pero si los ribosomas están presentes en todos los tejidos, ¿por qué el defecto en una proteína ribosomal se relaciona con la disfunción de un solo tejido? Más aún, diferentes mutaciones en la misma proteína resultan en diferentes fenotipos. Hasta la fecha, esta observación sigue siendo un misterio.

Al conjunto de enfermedades causadas por defectos en la estructura o en la biogénesis ribosomal se le conoce como ribosomopatías. El ejemplo más claro de este misterio es la asplenia congénita causada por mutaciones en el gen que codifica a la proteína RPSA. Aunque esta proteína estructural está mutada en todas las subunidades menores del ribosoma, pacientes con esta enfermedad carecen de bazo como única anomalía.

Entre la lista de ribosomopatías también se encuentra el síndrome Shwachman-Diamond causado por defectos en la proteína SBDS. Ahora se sabe que esta proteína es un factor intercambiador de nucleótidos de la GTPasa EFL1, la cual remueve al factor de antiasociación eIF6. Que esta disociación se lleve a cabo es crucial para la maduración de la subunidad 60S, de lo contrario las subunidades ribosomales no serán capaces de unirse para llevar a cabo el proceso de traducción. Desde el descubrimiento del gen *SBDS*, se han descrito múltiples mutaciones, siendo las más comunes por la conversión con el pseudogen *SBDSP*. La mayoría de las mutaciones resultan en una pérdida de función por la desestabilización de la proteína; sin embargo, hay mutaciones puntuales de las cuales no se conoce su efecto. Debido a que la función de SBDS se lleva a cabo por la unión con EFL1, se espera entender el efecto funcional de las mutaciones en SBDS observadas en pacientes.

3 Hipótesis

- Si un residuo de la proteína SBDS/Sdo1 participa en la interacción con la proteína EFL1, entonces al sustituirlo por H-4-Azido-Fenilalanina-OH o H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH se producirá un foto-entrecruzamiento entre estas proteínas que podrá ser detectado por Western Blot.

- Si residuos de la proteína SBDS mutados en pacientes con el Síndrome Shwachman-Diamond están involucrados en la interacción con la proteína EFL1, entonces sus constantes de disociación medidas por anisotropía de fluorescencia se verán disminuidas con respecto a la proteína silvestre.

4 Objetivos

4.1 Objetivos generales

Identificar los residuos involucrados en la interacción entre la proteína SBDS/Sdo1 y la GTPasa EFL1 y determinar el efecto de las mutaciones en SBDS en el Síndrome Shwachman-Diamond en términos de la constante de disociación.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Ensayos de foto-entrecruzamiento

- Obtener las construcciones de SBDS y Sdo1 en el vector pRSET mutadas con el codón ámber en diferentes residuos.
- Sobreexpresar en *Escherichia coli* y purificar las proteínas SBDS y Sdo1 recombinantes sustituidas con los amino ácidos no-naturales H-4-Azido-Fenilalanina-OH o H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH.
- Sobreexpresar en *Saccharomyces cerevisiae* y purificar las proteínas EFL1 recombinantes de humano y de levadura.
- Realizar ensayos de entre-cruzamiento entre EFL1 y mutantes de SBDS y evaluar la interacción mediante Western Blot.

4.2.2 Ensayos de anisotropía de fluorescencia

- Obtener las construcciones de SBDS en el vector pRSET con una etiqueta FAsH y con mutaciones observadas en pacientes con el síndrome Shwachman-Diamond.
- Transformar la cepa C41 de *Escherichia coli* con las construcciones de las mutantes de la proteína SBDS modificadas con una etiqueta FAsH en el extremo C-terminal.
- Sobreexpresar en *Escherichia coli* y purificar las proteínas SBDS.
- Sobreexpresar en *Saccharomyces cerevisiae* y purificar la proteína EFL1 de humano.
- Obtener las constantes de disociación de EFL1 con las mutantes de SBDS por anisotropía de fluorescencia.

5 Metodologías

5.1 Reactivos químicos

Los antibióticos ampicilina y cloranfenicol se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). Los reactivos químicos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., BD (Becton, Dickinson and Company) y Merck & Co. (New Jersey, 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.

5.2 Disoluciones y amortiguadores de pH

La composición de las soluciones y amortiguadores de pH comúnmente usados en este trabajo se encuentran enlistados en las Tabla 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Composición de las disoluciones utilizadas en este trabajo.

DISOLUCIONES	COMPONENTES
Glucosa al 20%	100 g de glucosa y aforar a 0.5 L de dH ₂ O
Galactosa al 20%	200 g de galactosa y aforar a 1 L de dH ₂ O
Solución Drop Out 100X	0.6 g de leucina y 0.4 g de triptófano en 100 mL de dH ₂ O
10X TE	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA
1X TE/LiAc	4 mL dH ₂ O, 0.5 mL TE 10X, 0.5 mL LiAc 1 M
1X TE/LiAc/PEG	4 mL PEG 50%, 0.5 mL TE 10X, 0.5 mL LiAc 1 M
Solución S1	50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8, RNAsa 10 mg/mL
Solución S2	0.2 M NaOH, 1% SDS
Solución S3	Acetato de potasio 5 M pH 4.8
Solución fijadora de SDS-PAGE	40% etanol, 10% ácido acético
Solución de Coomassie	0.025% Azul Brillante Coomassie G-250, 10% ácido acético
Inhibidor de proteasas	100 µL de solución amortiguadora para reconstitución de un vial ProBlock® libre de EDTA
Solución 20X de H-4-Azido-Fenilalanina-OH	20 mM de H-4-Azido-Fenilalanina-OH pH 5.0
Solución 20X de H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH	20 mM de H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH pH 11.0

Tabla 3. Amortiguadores utilizados en este trabajo.

Purificación de proteínas EFL1	Para lisis	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM β-mercaptoetanol, 30 mM imidazol.
	De alta sal	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl
	Para elución de columna de Ni ²⁺	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl ₂ , 500 mM imidazol.
	Para cromatografía por exclusión molecular	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EDTA.
Purificación de proteínas SBDS/Sdo1	Para lisis	50 mM HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 7.0, 250 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 20 mM imidazol.
	Para elución de columna de Ni ²⁺	50 mM HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 6.0, 250 mM NaCl, 300 mM imidazol
	Para columna de intercambio iónico	50 mM HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 6.0, 50 mM NaCl
	Para 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.
Amortiguadores de los diferentes experimentos	Para el gel concentrador de electroforesis SDS-PAGE 1X	0.5 M Tris-HCl pH 6.8
	Para el gel separador de electroforesis SDS-PAGE 1X	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
	Amortiguador de transferencia para Western Blot 1X	12 mM Tris-base, 90 mM glicina *Agregar metanol 20% antes de su uso
	Amortiguador Tris salino con Tween (TBST) 1X	100 mM Tris-base, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20 pH 8.0
	Para experimentos de dicroísmo circular y dispersión dinámica de luz	50 mM HPO ₄ ²⁻ /H ₂ PO ₄ ⁻ pH 7.4
	Para experimentos de anisotropía	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol

5.3 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo sólido y líquido utilizados en este trabajo se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos.

MEDIO DE CULTIVO	COMPONENTES
SD-URA líquido	Se disolvió en 1.5 L de agua destilada 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.
2xTY líquido	Se disolvió en 1 L de agua destilada 16 g de triptona, 5 g de NaCl y 10 g de extracto de levadura.
YEP(D) líquido	Se disolvió en 1 L de agua destilada 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, y 20 g de glucosa.

Para el correspondiente medio de cultivo sólido se adicionó 1.5% de agar a la composición antes mencionada.

5.4 Plásmidos de expresión

Los plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas EFL1 fueron derivados del vector pRS426 y para las proteínas Sdo1/SBDS fueron derivados del vector pRSET-A (Invitrogen). A continuación se describen sus principales características.

5.4.1 Plásmido pRSET-HisSBDS-FIAsH

Este plásmido codifica para una construcción que contiene una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína humana SBDS seguido de una etiqueta FIAsH en el extremo C-terminal. La etiqueta FIAsH corresponde a la secuencia Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys. La construcción se encuentra clonada entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* en el esqueleto del vector pRSET-A.

5.4.2 Plásmidos pRSET-HisSBDS / pRSET-Sdo1His

Estos plásmidos codifican para una construcción que contiene una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína humana SBDS y el ortólogo de levadura Sdo1 con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal, respectivamente. Ambas construcciones se encuentran clonadas entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* en el esqueleto del vector pRSET-A.

5.4.3 Plásmidos pRS426-scEFL1TevHis / pRS426- hsEFL1TevHis

En estos plásmidos, las secuencias codificantes de los ortólogos de levadura y humano de EFL1 se encuentra fusionadas al sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal. Adicionalmente, las construcciones utilizadas en los ensayos de foto-entrecruzamiento cuentan con una etiqueta V5 en el extremo N-terminal para inmuno-detección. Estas construcciones se encuentran insertadas en el plásmido pRS426 entre los sitios *NcoI* y *BamHI*, y su expresión es regulada por el promotor *GALI* y la secuencia terminadora *MAT α* . El plásmido pRS426 es un vector cuyo marcador de selección en bacteria es la resistencia a ampicilina y en levadura es la complementación genética de la auxotrofia a uracilo por la presencia del gen *URA3* que le confiere la capacidad de crecer en medio sin uracilo. También contiene las secuencias de REP3 y FRT necesarias para la propagación de alta copia en levadura.

5.4.4 Plásmidos pEVOL-pAzF y pEVOL-pBpF

Los plásmidos pEVOL-pAzF y pEVOL-pBpF se adquirieron de la compañía Addgene, Inc. para la expresión del par ortogonal tARN/aminoacil tARN sintetasa y la incorporación en una proteína del aminoácido no natural H-4-Azido-Fenilalanina-OH y H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH, respectivamente (69). Este es un plásmido de alta copia que le confiere resistencia a cloranfenicol a la bacteria.

5.5 Mutagénesis sitio-específica en el vector de expresión de las proteínas Sdo1 y SBDS

Para la construcción de los plásmidos utilizados para la sobreexpresión de las proteínas SBDS/Sdo1 mutadas, ya sea con el codón de término ámber (TAG) u otro, se hizo mutagénesis sitio-específica. Se sintetizaron oligonucleótidos, por Sigma-Aldrich Co., que tuvieran el cambio de secuencia correspondiente para ambas direcciones. Estos oligonucleótidos se diseñaron con el programa SerialCloner 2.6.1 y se analizaron con OligoAnalyzer 3.1. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Techne TC-512 que amplificó el vector pRSET-SBDS/Sdo1 con oligonucleótidos mutagénicos que se alinean en la misma región pero en direcciones opuestas de las cadenas de ADN (Figura 8).

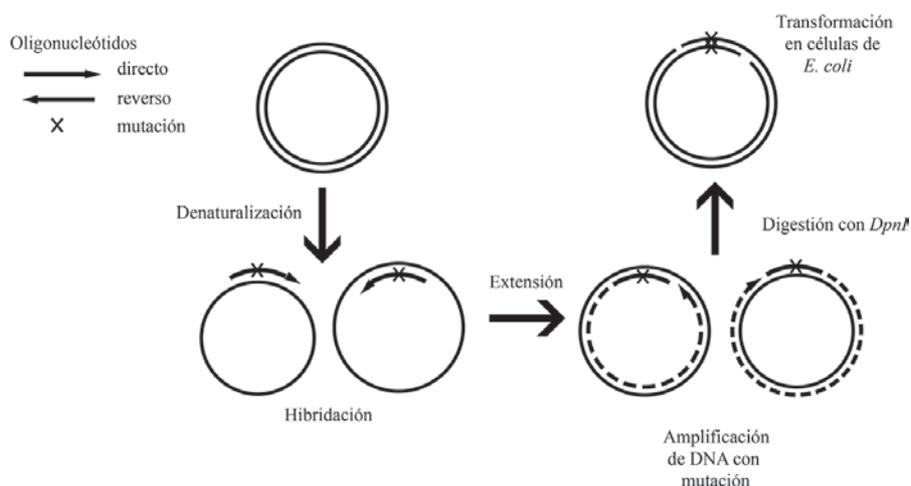


Figura 8. Esquema del proceso de mutagénesis sitio-específica por PCR inversa utilizada para la introducción de mutantes sencillas en los vector de expresión que se usaron en este trabajo.

5.5.1 PCR inversa

La composición de la reacción, así como las condiciones ocupadas para la PCR inversa se muestran en la Figura 9 y Tabla 5. La adición de DMSO facilitó la separación de regiones ricas en GC reduciendo la posibilidad de formación de estructuras secundarias en el ADN.

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción para la PCR.

PCR inversa	
Amortiguador 10X KOD	5.0 µL
MgSO ₄ (25 mM)	3.0 µL
dNTP (10 mM)	15.0 µL
Oligo 1 (10 µM)	1.0 µL
Oligo 2 (10µM)	1.0 µL
Molde pRSET-SBDS/Sdo1	15.0 ng
Enzima KOD (U/µL)	1.0 µL
DMSO	2.5 µL
dH ₂ O	Cbp 50.0 µL

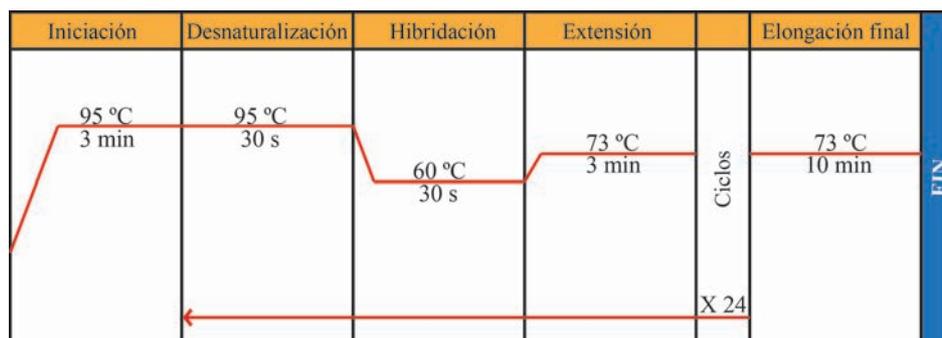


Figura 9. Condiciones de reacción para la PCR inversa.

El producto obtenido de la PCR inversa previamente digerido por la endonucleasa *DpnI* fue transformado en células de *E. coli* DH5 α de acuerdo a la metodología que se muestra a continuación. La restricción con *DpnI* se realizó para destruir el ADN molde que carece de mutación. Asimismo, el ADN obtenido en la PCR corresponde a un fragmento pseudo-circular debido a la complementación de pares de bases (ver Figura 8) que terminará de ser ligado por la maquinaria de la célula, por lo que no requiere un tratamiento de ligación previa a la transformación.

5.6 Transformación de ADN plasmídico en células bacterianas

La transformación de ADN plasmídico para su propagación se realizó en células bacterianas DH5 α por el método de choque térmico a 42°C por 45 segundos (AccuBlock™ Digital Dry Bath) y 2 min en hielo seguido de una incubación con agitación por una hora en medio LB para la recuperación celular. Posteriormente, las células fueron plaqueadas en medio sólido LB suplementado con el antibiótico adecuado según el(los) plásmido(s) en cuestión, e incubadas durante 18 horas a 37°C. Para la expresión de las proteínas SBDS/Sdo1, mutadas con el aminoácido no-natural, utilizados en los ensayos de foto-entrecruzamiento se realizó la co-transformación de las cepas *E. coli* C41 y Tuner con los plásmidos pRSET-sdo1/SBDS y pEVOL-pAzF/pBpF. Mientras que para los experimentos de anisotropía con las mutantes SBDS-Flash sólo se transformó la cepa *E. coli* C41 con los plásmidos pRSET-SBDS de las mutantes correspondientes. La cepa C41 tiene una alta eficiencia de transformación ($1-3 \times 10^7$ ufc/ μ g DNA), la expresión de la ARN polimerasa T7, deficiencia de proteasas Lon y OmpT. La cepa Tuner, además de tener el mismo

trasfondo genómico que C41, presenta mutación en la permeasa Lac (*lacY*) que permite la entrada uniforme de IPTG a todas las células, lo cual genera una expresión con dependencia homogénea a la concentración de inductor. Esta capacidad le permite a la célula variar los niveles de expresión de robusta a muy baja ayudando a la solubilidad de la proteína.

5.7 Aislamiento de ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina

Las colonias transformadas con ADN plasmídico se inocularon por separado en 5 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 18 h con agitación constante (200 rpm). De cada cultivo se obtuvo el botón celular por centrifugación (8000 rpm, 1 min), y se trataron como se describe a continuación: se agregaron 100 µL de la solución S1 y se resuspendió con el vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Después se adicionaron 100 µL de la solución S2, se mezcló por inversión y en seguida se agregaron 120 µL de la solución S3. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm 15 min para eliminar restos celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo con 400 µL de isopropanol. Esta mezcla se centrifugó a 12000 rpm 15 min y el botón se limpió con 500 µL de una solución de etanol al 70% v/v. Finalmente, el etanol se eliminó por evaporación y el botón se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas.

5.8 Patrón de restricción para la selección de mutantes

El ADN resultante de las PCR realizadas para introducir las mutaciones ámber o las mutaciones puntuales en el gen *Sdo1* o *SBDS* 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 de bromuro de etidio. Las clonas que presentaron una banda en el peso esperado se les llevó a cabo un ensayo de restricción con la enzima *XbaI* que constó de 400 ng de plásmido, 1U de enzima y el amortiguador recomendado por el fabricante en un volumen final de 10 µl. 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). Los

productos se mandaron a secuenciar a la compañía Laragen Inc. o Gen Script USA Inc.

5.9 Electroforesis en geles de agarosa

La visualización de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0%. Para ello se disolvieron 0.5 g de agarosa en 50 mL de dH₂O; la mezcla se calentó hasta obtener una solución translúcida. La mezcla se vertió en el 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®.

5.10 Transformación de ADN plasmídico en levadura

Se preparó un pre-inóculo de 2 mL con células BCY123 de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YEP(D). Se dejó crecer en agitación toda la noche a 30°C en un equipo Excella E24 Incubator Shaker (New Brunswick®). Se tomaron 1.5 mL de este cultivo y se inocularon en 50 mL de medio YEP(D), se pusieron a incubar con agitación a 30°C por 3-5 h o hasta lograr una DO_{600nm} de 0.6-0.7 UA. Logrado esto, se colectaron las células por centrifugación a 5,000 rpm por 6 min a 21°C en una centrífuga Beckman-Coulter rotor JA-14. El paquete celular se resuspendió en 3 mL de agua estéril y se volvieron a centrifugar de la misma forma. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de una solución estéril recién hecha 1X TE/LiAc. De esta forma obtuvimos células competentes. Para el proceso de transformación se mezclaron 100 µL de células, 100 µg de esperma de salmón que nos servirá como ADN acarreador y 200 ng de ADN plasmídico. Se agregaron 600 µL de una solución estéril recién hecha de 1X TE/LiAc/PEG y se incubó a 30°C en agitación por 2 h. Se agregó 30 µL de DMSO antes de dar un choque térmico a 43°C por 15 min. Las células se colectaron por centrifugación a 3,500 rpm por 5 min y se resuspendieron en 100 µL de 1X TE y se sembraron en medio SD-URA para incubarse por 1-2 días a 30°C.

5.11 Expresión de proteínas recombinantes

5.11.1 Expresión de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*

Se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* BCY123 previamente transformada con el plásmido correspondiente en 20 mL de medio SD-URA suplementado con 2% de glucosa y Drop out-Ura. Se dejó crecer toda la noche con agitación constante de 200 rpm a 30°C. 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. Este cultivo 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 el cultivo se indujo con una concentración final 2.8% de galactosa y se incubó con agitación constante de 200 rpm a 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. 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®.

5.11.2 Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

5.11.2.1 Expresión de mutantes *Sdo1* y *SBDS* modificadas con los aminoácidos *H-4-Azido-Fenilalanina-OH* y *H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH*

Se inoculó una colonia de *E. coli* C41 o *E. coli* Tuner previamente transformada con los plásmidos correspondientes en 5 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 25 µg/mL de cloranfenicol, y se incubó toda la noche a 37°C. Se tomó este cultivo para inocular 100 mL de medio 2xTY suplementado con ampicilina y cloranfenicol, 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, se indujo la expresión de nuestra proteína con 1.0 mM de IPTG y la expresión del par tARN/aminoacil tARN sintetasa con 0.02% de arabinosa. A su vez, se adicionó una concentración final de 1 mM del aminoácido sintético H-4-Azido-Fenilalanina-OH/H-p-Benzoil-Fenilalanina-OH para luego ser incubado nuevamente por 4-5 h. Al término de esta etapa se centrifugó el cultivo por 5 min a 6,000 rpm en una centrifuga Beckman-Coulter, con 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.

5.11.2.2 Expresión de mutantes SBDS-FLASH

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, y se incubó toda la noche a 37°C. Se tomó este cultivo 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, se indujo con 0.5 mM de IPTG para luego ser incubado nuevamente por 4-5 h. Al término de esta etapa se centrifugó el cultivo por 5 min a 6,000 rpm en una centrifuga Beckman-Coulter, con 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.

5.12 Purificación de proteínas recombinantes

5.12.1 Purificación de EFL1

Se descongeló el pellet de células provenientes de 1.5 L de cultivo y se resuspendió en 15 mL de solución amortiguadora para lisis suplementado con 150 µL de inhibidor de proteasas ProBlock™-EDTA. 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 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).

5.12.1.1 Purificación por cromatografía por afinidad a iones Ni^{2+}

La purificación por cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} se llevó a cabo en una columna (GE Healthcare) de 5 mL. Se equilibró la columna pasando 15 mL de dH_2O seguidos de 15 mL de la solución amortiguadora de lisis. 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 hizo pasar 30 mL de una solución amortiguadora de alta sal seguido de 15 mL del amortiguador de lisis. Por último se hizo la elución 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 de 0.45 μm .

5.12.1.2 Purificación por cromatografía de exclusión molecular

La purificación se llevó a cabo en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 PG (GE Healthcare). Se equilibró la columna con 150 mL de solución amortiguadora para exclusión molecular. Se inyectó 1 ml de la muestra obtenida de la elución de la columna de afinidad a Ni^{2+} a un flujo de 0.7 mL/min. Este proceso de purificación sólo se aplicó a la hsEFL1 que se utilizaría en experimentos de anisotropía de fluorescencia. Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada previamente por una membrana de 0.45 μm .

5.12.2 Purificación de las proteínas Sdo1 y SBDS

El paquete celular correspondiente se resuspendió en 20 mL de amortiguador de fosfatos para su ruptura y se sonicó en hielo por 4 min totales con ciclos de 10 s prendido 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 5.12.1.1 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 .

5.12.2.1 Purificación por cromatografía de intercambio catiónico

La muestra obtenida de la cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} se diluyó 1:6 con un amortiguador de 50 mM fosfatos pH 6.0, se volvió a ajustar el pH a 6.0 y se filtró por membrana hidrofílica de 0.22 μm (Merck Millipore). Para la purificación se utilizó

una columna S FF (GE Healthcare) de 1 mL, la cual se equilibró con 5 mL de dH₂O y 5 mL del amortiguador correspondiente. Se pasó la muestra a través de la columna y luego se hizo un lavado con 5 mL del mismo amortiguador. Por último, se realizó la elución con 3 mL del amortiguador de elución, finalizando con un segundo lavado pasando 5 mL del último amortiguador. Sólo las proteínas mutantes SBDS utilizadas para anisotropía de fluorescencia fueron purificadas con esta metodología.

5.13 Electroforesis 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 EFL1 y al 12% para las proteínas SBDS/Sdo1. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250. El gel separador se preparó mezclando 2763 µL de agua dH₂O, 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 de 12%, 8 µL de TEMED y 50 µL de persulfato de amonio. El gel concentrador se preparó mezclando 1267 µL de agua dH₂O, 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 por 15 min y posteriormente en solución teñidora 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.

5.14 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 con agua el blanco y a partir de la ecuación 7 correspondiente a la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (7)$$

donde A corresponde a la luz absorbida, C la concentración de la muestra (M^{-1}), ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$), 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 las proteínas usando la ecuación 8,

$$\varepsilon_{280\text{ nm}} = a \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{Trp} \cdot b \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{Tyr} \cdot c \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{Cys} \quad (8)$$

donde a, b y c corresponden al número de triptofanos, tirosinas y cistinas presentes en la proteína. $\varepsilon_{280\text{ nm}}^{Trp}$, $\varepsilon_{280\text{ nm}}^{Tyr}$ y $\varepsilon_{280\text{ nm}}^{Cys}$ corresponden a los coeficientes de extinción molar del triptofano ($5,500 M^{-1}cm^{-1}$), tirosina ($1,490 M^{-1}cm^{-1}$) y cistina ($125 M^{-1}cm^{-1}$) a 280 nm respectivamente (70). De acuerdo con lo anterior, los coeficientes de extinción molar de las proteínas usadas en este trabajo se encuentran listadas en Tabla 6.

Tabla 6. Coeficientes de extinción molar de las moléculas usadas en este trabajo.

$\varepsilon_{280\text{ nm}} (M^{-1}cm^{-1})$				
hsEFL1	scEFL1	SBDS	Sdo1	Lumio™Green
105,770	83,770	11,460	11,460	12,500
$\varepsilon_{508\text{ nm}} (M^{-1}cm^{-1})$				
Lumio™Green			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

$$A_{280\text{ nm}} = C \cdot l \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{SBDS} + C \cdot l \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{lumio} \quad (9)$$

Sabiendo la concentración de proteína total, por sustitución de la ecuación 9, y la concentración de proteína marcado con Lumio™Green a partir de la ecuación 7 a una longitud de onda de 508 nm, podemos determinar el porcentaje de proteína marcada (ecuación 10).

$$\frac{[Proteína\ marcada]_{508\ nm}}{[Proteína\ total]_{280\ nm}} \cdot 100 = \% Proteína\ marcada \quad (10)$$

5.15 Experimentos de foto-entrecruzamiento

Se incubó 0.5-2 mg de SBDS/Sdo1 con 5 mg de EFL1 por 20 min a 4°C a una exposición de luz ultravioleta de longitud 254 nm. Se corrieron geles NuPAGE® Novex® Bis-Tris desnaturalizante con gradiente de 4-12%. La electroforesis se realizó en un amortiguador MOPS SDS por 50 min a 200 V. Concluida la electroforesis se transfirieron las muestras por 30 min a 20 V a una membrana PVDF previamente activada en metanol. Para asegurar que la transferencia fuera eficiente ésta se tiñó con rojo de Ponceau y destiñó con el amortiguador TBST. Se bloqueó la membrana con leche al 1.0 % en TBST durante la noche a 4°C para después ser lavada con TBST por 30 min tres veces para posteriormente agregar el anticuerpo anti-V5 ó anti-His e incubar 3 h a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó la membrana tres veces por 30 min con TBST para remover el anticuerpo que no interaccionara. Se colocó la mezcla del sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific) recién preparado y se reveló por exposición durante 10 s.

5.16 Dicroísmo circular (CD)

Los experimentos de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectropolarímetro JASCO J-720 equipado con un peltier para el control de la temperatura. Se prepararon las muestras de la proteínas SBDS silvestre y las mutantes FIAsh en el amortiguador correspondiente (ver Tabla 3) a una concentración de 3 µM. Se obtuvo el espectro de dicroísmo circular de las proteínas y los blancos a longitudes de onda de 195 – 260 nm a 25°C en una celda de cuarzo con un paso de luz de 2 mm. Los valores de CD se transformaron a valores de elipticidad molar utilizando la ecuación 11,

$$[\Theta] \times 10^3 (\text{mili grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{CD_{obs} \cdot 10^3}{PL (mm) \cdot [Proteína] (\mu M) \cdot R} \quad (11)$$

Donde Θ es la elipticidad molar, CD las unidades obtenidas del equipo, PL el paso de luz, y R el número de residuos de aminoácidos en la proteína. La deconvolución de los datos se llevó a cabo con el software CDNN en un rango de 195 – 260 nm (71).

5.17 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los experimentos de dispersión dinámica de luz fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Abel Moreno Cárcamo, en el Instituto de Química de la UNAM, en un equipo Malvern Nano S (Malvern Ltd) equipado con un controlador de temperatura y con tecnología de láser NIBS (de sus siglas en inglés, Non Invasive Back Scattering). Se obtuvieron las distribuciones de volumen en función del radio hidrodinámico a una temperatura de 25°C y con una celda de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. Las muestras fueron centrifugadas 5 min a 14,000 rpm y filtradas por membrana de 0.22 µm previas al experimento. El radio hidrodinámico se calculó con el programa ZetaSizer.

5.18 Ensayos de anisotropía de fluorescencia

5.18.1 Marcaje con el reactivo Lumio™ Green

A la proteína SBDS silvestre y sus respectivas mutantes se les diseñó 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 (**F**luorescein **A**rsenical **H**airpin binding) que se usa comúnmente para detección en geles de proteínas por fluorescencia al unirse al reactivo 4',5''-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il)fluoresceína (Lumio™Green) (Figura 10). Utilizamos la cualidad de este motivo proteico de unir de manera específica a dicho fluoróforo para llevar a cabo pruebas de anisotropía. Para ello, se dejó reaccionando 3 nmol de proteína y 3 nmol del reactivo en el amortiguador para experimentos de anisotropía con 5 mM de β-mercaptoetanol para mantener reducidos los residuos de cisteínas por 8 horas y luego se dializó toda la noche en el mismo amortiguador (ver Tabla 3).

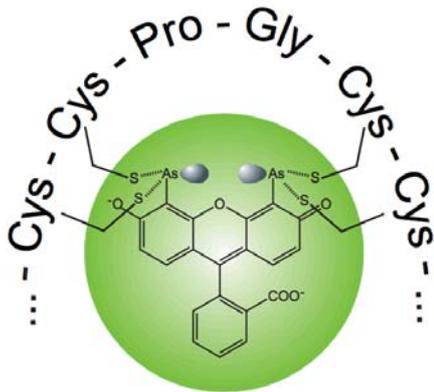


Figura 10. Interacción de la etiqueta FLAsH con el reactivo Lumio™Green (72).

5.18.2 Experimentos de anisotropía de fluorescencia

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en un espectrofluorómetro de Olis, Inc. Se tituló hsEFL1 (30.16 μM) a 15 nM de SBDS silvestre marcada 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 espectral 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:

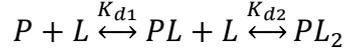
$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad (12)$$

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 no se relaciona con las propiedades de la muestra sino es una corrección experimental por la desviación de la polarización, y se describe como

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (13)$$

Donde I_{HV} es la intensidad con una excitación en horizontal y una emisión en 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 experimentos con las mutantes de SBDS siguieron el mismo protocolo con la diferencia de un aumento en la concentración de la muestra de hsEFL1 de 75 μM . Los datos de anisotropía de fluorescencia fueron analizados por una regresión no lineal con el programa KaleidaGraph 4.1.3 (Synergy

Software). El análisis de los datos se llevó a cabo usando un modelo de unión de dos sitios distintos debido a los resultados que se discutirán más adelante.



donde P representa una molécula de SBDS-FlAsH silvestre o mutante y L representa una molécula de hsEFL1. La constante de disociación para el primer y el segundo evento de unión corresponden a K_{d1} y K_{d2} , respectivamente. La ecuación 14 describe este equilibrio:

$$r_{obs} = r_0 + \frac{\Delta r_{PL}K_{d2}[L]_T + \Delta r_{PL_2}[L]_T^2}{K_{d1}K_{d2} + K_{d2}[L]_T + [L]_T^2} \quad (14)$$

donde r_{obs} corresponde al valor de anisotropía observada, r_0 la anisotropía inicial de la especie libre, $[L]_T$ es la concentración total de hsEFL1, y donde Δr_{PL} y Δr_{PL_2} proviene de la sustitución de $(r_{PL} - r_P)([P]_T)$ y $(r_{PL_2} - r_P)([P]_T)$, respectivamente.

El análisis de la cooperatividad en la unión se realizó mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill (ecuación 15)

$$\log \frac{Y}{1-Y} = h \log[L] - \log K_H \quad (15)$$

donde Y y $(1-Y)$ representan la fracción unida y la fracción libre de SBDS-FlAsH, respectivamente, y K_H es la concentración de ligando a la que se ocupa la mitad de los sitios de unión. La proporción de SBDS-FlAsH unida comparada con la libre se relaciona con la señal de anisotropía de acuerdo con la ecuación 16

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[SBDS-FlAsH]_{unida}}{[SBDS-FlAsH]_{libre}} \approx \frac{r - r_0}{r_f - r} \quad (16)$$

donde r_f es la anisotropía al final de la titulación y se calcula mediante la ecuación 17

$$r_f = r_0 + \Delta r \quad (17)$$

sustituyendo en la ecuación de Hill, la ecuación 18 correlaciona la cooperatividad (h) con la señal de anisotropía medida

$$\log \frac{r - r_0}{r_f - r} = h \log[L] - \log K_H \quad (18)$$

6 Resultados

Debido a la cantidad de mutantes obtenidas en el proyecto, para distinguir entre las utilizadas para los dos tipos de experimentos, a las mutantes de foto-entrecruzamiento se denominarán mutantes ÁMBER, mientras que, las utilizadas para anisotropía de fluorescencia se llamarán mutantes FLASH (motivo de unión a reactivo biarsérmico). En la Tabla 7 y Tabla 8 se enlistan las mutantes que se evaluaron a lo largo de este proyecto.

Tabla 7. Mutantes ámber de las proteínas SBDS y Sdo1 utilizadas en este trabajo para los ensayos de foto-entrecruzamiento.

	Mutantes con aminoácido no natural		Mutantes con aminoácido no natural	
	p-Azido-Fenilalanina		p-Benzoil-Fenilalanina	
SBDS	K118amb	K151amb	K118amb	K151amb
	R126amb	Q153amb	R126amb	Q153amb
	T129amb	R169amb	T129amb	R169amb
	S143amb	R175amb	S143amb	R175amb
	K148amb	R218amb	K148amb	R218amb
Sdo1	R100amb	K148amb	K21amb	A179amb
	K118amb	L152amb	E92amb	S181amb
	P122amb	E156amb	Q94amb	E208amb
	V123amb	K159amb	S96amb	R224amb
	K126amb	L160amb	N109amb	T228amb
	M132amb	S163amb	T113amb	
	E139amb	Q165amb	V123amb	
	K141amb	P168amb	M132amb	
	S143amb	R171amb	K141amb	
	V145amb	K177amb	S143amb	
	N147amb		E156amb	

Tabla 8. Mutantes FIAsH presentes en la proteína SBDS utilizadas en los ensayos de anisotropía de fluorescencia.

Mutantes presentes en la proteína SBDS descritas en pacientes con el Síndrome Shwachman-Diamond			
R19Q	R126T	S143L	R175W
E67K	I212T	I167T	

6.1 Construcción de los vectores de expresión de proteínas mutantes

Las mutaciones de la proteína SBDS/Sdo1, tanto para las pruebas de foto-entrecruzamiento como de anisotropía de fluorescencia, se llevaron a cabo por mutagénesis sitio-dirigida con una PCR inversa.

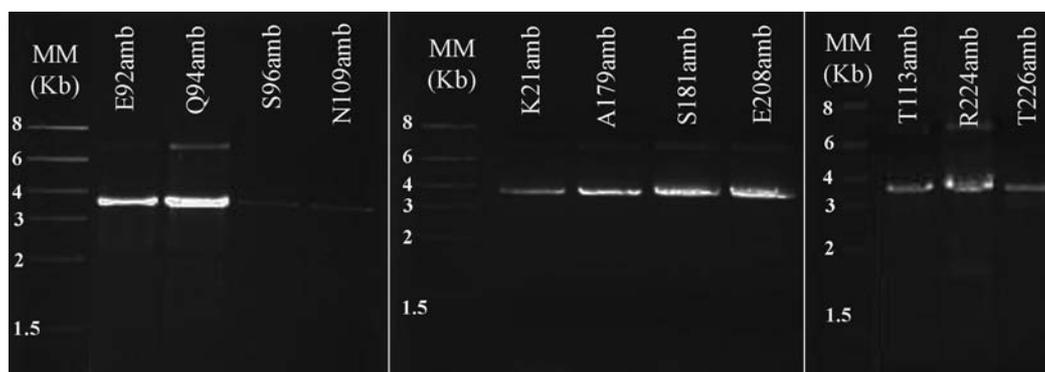


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR inversa de mutantes ámber de la proteína Sdo1.

La Figura 11 muestra el producto de la PCR inversa de algunas de las mutantes ámber, esperando una banda de aproximadamente 3.5 Kb (tamaño del vector 2,897 pb y tamaño del gen 750 pb). Lo mismo se percibe en la Figura 12 con las mutantes FIAsH.

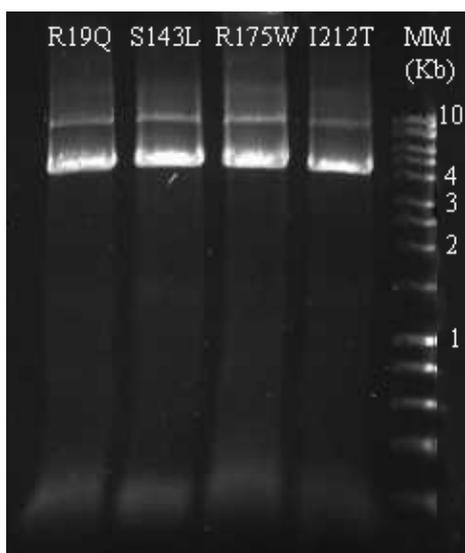


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR inversa de mutantes SBDS FLAsH.

Sin embargo, la presencia del plásmido en el peso esperado no garantiza una mutación exitosa, por lo que se mandó a secuenciar por la compañía Laragen Inc. y GenScript USA Inc., no sin antes haberle hecho un patrón de restricción con la enzima *XbaI* a las clonas para prever que se trataba de nuestro plásmido (Figura 13).

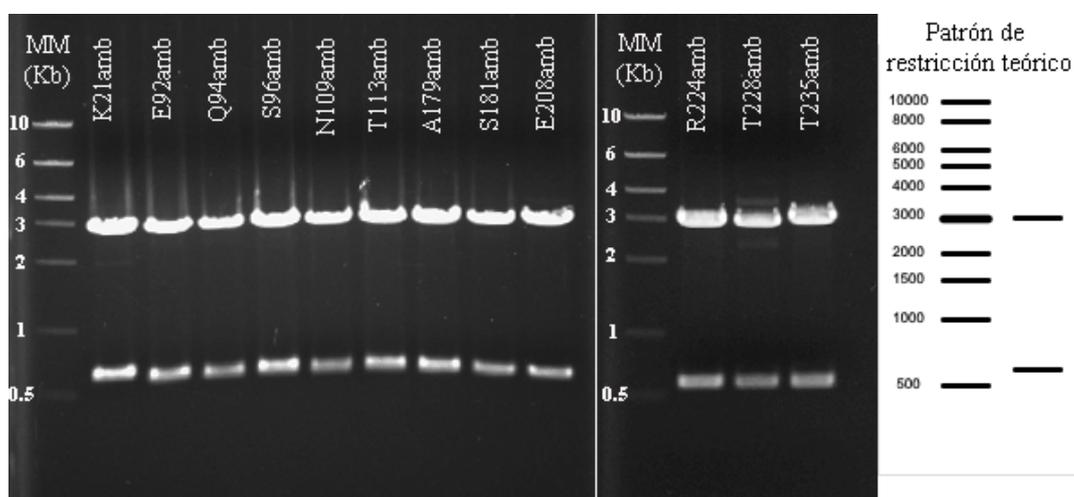


Figura 13. Patrón de restricción de clonas de mutantes Sdo1 ámber en gel de agarosa al 1%. Patrón de restricción teórico al cortar el plásmido pRSET-Sdo1 con la enzima de restricción *XbaI*.

Las secuenciaciones se analizaron con el programa 4peaks 1.7.1 y SerialCloner 2.6.1. En la Figura 14-A se destaca la presencia del codón de término ámber (TAG), sombreado en azul. Después de hacer una alineamiento contra la secuencia de la

proteína silvestre (Figura 14-B) se observa el reemplazo del residuo de Lisina (K) por un codón de término. Este es una ejemplificación de lo que se observa para cada una de las mutantes ámber que fueron secuenciadas.

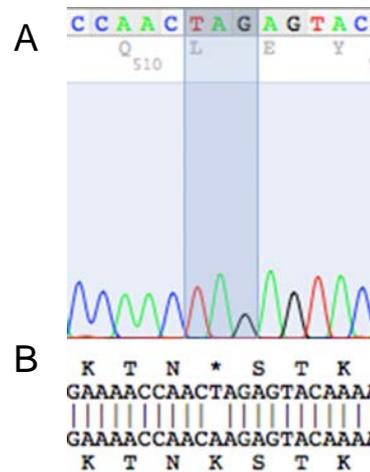


Figura 14. Análisis de secuencia de nucleótidos de la mutante SBDS K148amb. A) Cromatograma de la secuenciación. B) Alineamiento de secuencias de proteína mutante y silvestre. Las letras unidas por líneas representan la secuencia de nucleótidos alineados, las letras en los extremos corresponden a los aminoácidos codificados.

En lo que respecta a las secuenciaciones hechas para las mutantes FIAsh, en la Figura 15 se muestra el cambio del codón original por el mutante. Resaltado con una sombra azul se encuentra el codón nuevo y bajo éste se colocó el codón original como una manera más sencilla de visualizar el cambio de nucleótidos.

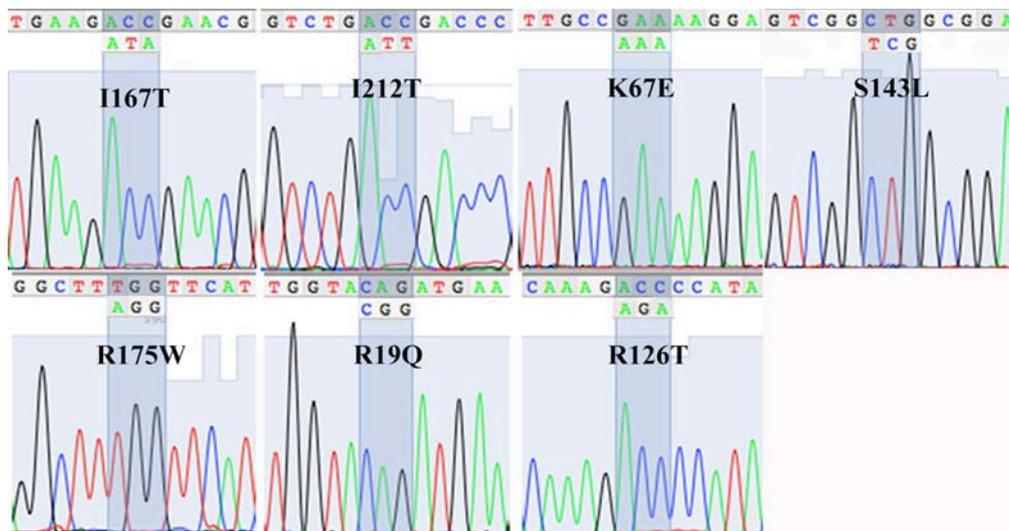


Figura 15. Análisis de secuencia de nucleótidos de las mutantes FIAsh de la proteína SBDS.

Para comprobar que el plásmido adquirido por Addgene, Inc. correspondiera al vector de expresión del par ortogonal tARN/aminoacil tRNA sintetasa para la incorporación del aminoácido no natural H-4-Azido-Fenilalanina-OH y H-p-Benzoil-Fenilalanina-

OH se llevó a cabo una electroforesis en agarosa (Figura 16) y un patrón de restricción (dato no mostrado), los cuales nos corroboraron la correcta adquisición del producto.

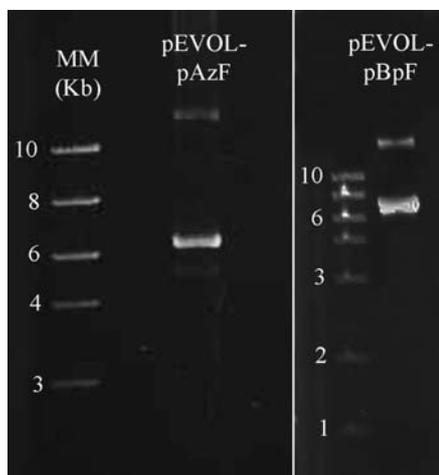


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos pEVOLV-pAzF y pEVOLV-pBpF adquiridos con la compañía Addgene, Inc.

6.2 Sobre-expresión y purificación de las proteínas recombinantes

6.2.1 Proteínas para el ensayo de foto-entrecruzamiento

Se transformaron células de la cepa C41 (DE3) de *E. coli* con las construcciones de las mutantes ámber de Sdo1 y SBDS, teniendo una exitosa transformación de las 57 proteínas. Se intentó expresarlas y purificarlas siguiendo el protocolo descrito en la sección de metodologías, sin embargo, sólo algunas de ellas expresaron. Debido a esto, se planteó usar otra cepa bacteriana y se escogió Tuner (DE3) por su capacidad de regular la expresión de proteínas recombinantes para mejorar la solubilidad (Figura 17).

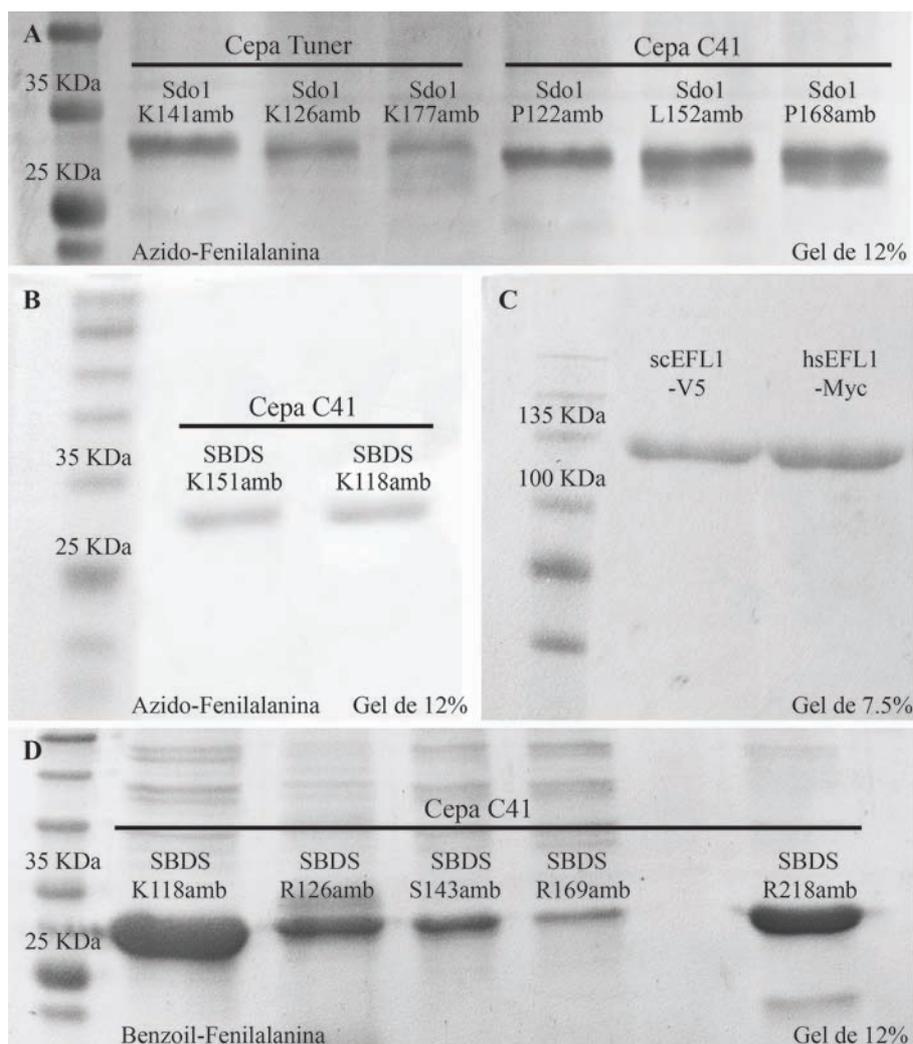


Figura 17. Geles de electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de la sobre-expresión y purificación de mutantes ámber. A) Expresión de mutantes de Sdo1 con el aminoácido Azido-fenilalanina en cepas C41 y Tuner. B) Expresión de mutantes de SBDS con el aminoácido Azido-fenilalanina en cepas C41. C) Expresión de proteínas ligando EFL1 en levadura. D) Expresión de mutantes de SBDS con el aminoácido Benzoil-fenilalanina en cepas C41.

Se transformaron las mutantes, que no se expresaron en C41, en la cepa Tuner exitosamente. Los resultados de la expresión se presentan en la Figura 17-A y Figura 17-B donde se observan las bandas correspondientes al peso de las proteínas (30 kDa). Debido a que los experimentos de foto-entrecruzamiento no se podrán llevar a cabo en todas las mutaciones por falta de expresión con el sistema del aminoácido 4-Azido-L-Fenilalanina, los experimentos también se llevaron a cabo con el aminoácido no natural p-Benzoil-L-Fenilalanina (Figura 17-D), teniendo como antecedentes experimentos llevados a cabo por la Dra. Nuria Sánchez Puig. De igual manera, se sobre-expresó la proteína ligando con el epítipo de interés que nos permitió la

identificación por Western Blot. En la Figura 17–C se observan las bandas que corresponden a las proteínas de interés con un peso aproximado de 130 kDa. Cabe recordar que todas las proteínas son expresadas con una cola de histidinas, por lo que también se llevaron a cabo ensayos de inmuno-detección contra esa etiqueta.

6.2.2 Proteínas para experimentos de anisotropía de fluorescencia

Se llevó a cabo la transformación exitosa de las mutantes FIAsH, además de la proteína silvestre SBDS-FIAsH, cuyo plásmido fue diseñado por la Dra. Nuria Sánchez Puig. Siguiendo el protocolo descrito en la sección de metodologías se sobre-expresaron y purificaron ocho proteínas (Figura 18). Asimismo, se purificó la proteína ligando (hsEFL1) que como se muestra en la Figura 19 se logra tener una banda en un peso aproximado a 130 kDa, correspondiente a nuestra proteína, con un alto grado de pureza.

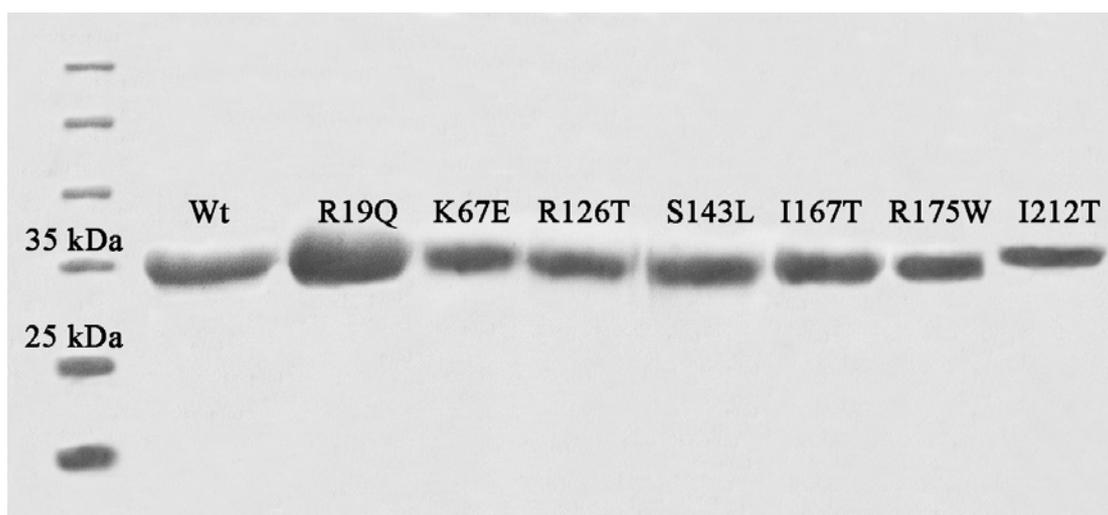


Figura 18. Sobre-expresión en células *E. coli* C41 y purificación de las proteínas SBDS silvestre y mutantes FIAsH. La electroforesis SDS-PAGE se realizó en un gel de 12%.

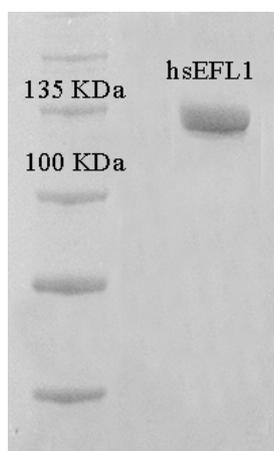


Figura 19. Sobre-expresión en células BCY123 de *S. cerevisiae* y purificación de la proteína EFL1 humana por medio de cromatografía de afinidad a Ni^{2+} seguido de cromatografía de exclusión molecular. La electroforesis SDS-PAGE se realizó en un gel de 7.5%.

6.3 Ensayos de foto-entrecruzamiento de proteínas con residuos de p-Azido-L-Fenilalanina y p-Benzoil-L-Fenilalanina

Para asegurar que el efecto de luz ultravioleta no genere entrecruzamientos inespecíficos se llevó a cabo un ensayo de inmuno-detección de las proteínas silvestres con y sin exposición a luz ultravioleta. En la Figura 20-A se observa que la banda que corresponde a EFL1 tiene el mismo peso a pesar de la exposición a luz UV lo cual significa que no hay interacción inespecífica y la ausencia del aminoácido no natural en la proteína silvestre de Sdo1 impide la formación del complejo en condiciones desnaturalizantes. En la Figura 20-B se muestra la detección por Western Blot de la proteína scEFL1 con una etiqueta V5 ó 6xHis, y del complejo scEFL1-Sdo1 que se forma por entrecruzamiento provocado por luz ultravioleta. Se llevó a cabo la prueba de las proteínas de levadura con ambos anticuerpos dando el mismo resultado, sin embargo, en el caso de las proteínas humanas de las que se tenían dos mutantes disponibles, se probó el anticuerpo para la etiqueta 6xHis y no se obtuvo un entrecruzamiento (dato no mostrado). La Figura 21 muestra el lugar que ocupan estos aminoácidos en el espacio así como los residuos que dieron un entrecruzamiento al sustituirlos con el aminoácido p-Benzoil-L-Fenilalanina, experimentos realizados por la Dra. Nuria Sánchez Puig. Como se puede observar, los residuos se encuentran casi en su totalidad en la parte externa del dominio II por lo que se sugiere que esa región interacciona con la proteína scEFL1.

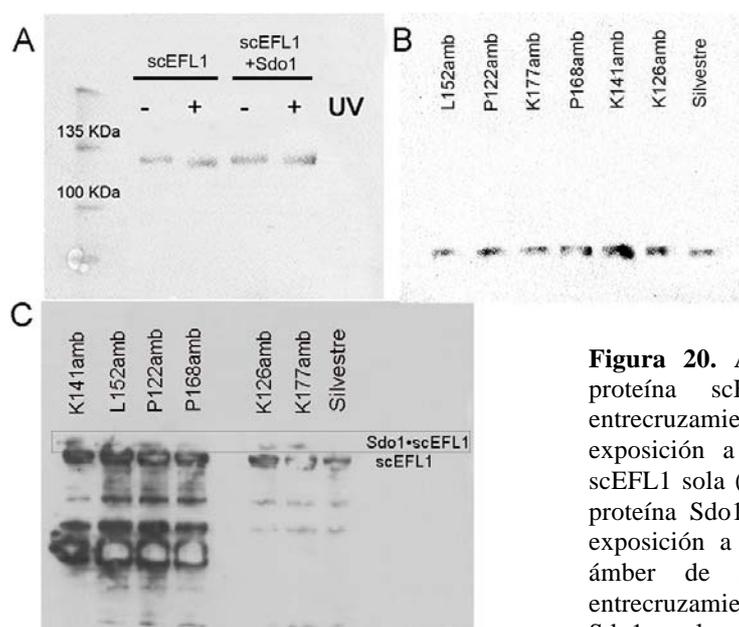


Figura 20. Análisis de Western Blot de la proteína scEFL1 y los complejos de entrecruzamiento con Sdo1. A) Controles de exposición a luz ultravioleta de la proteína scEFL1 sola (carril 1 y 2) y en presencia de la proteína Sdo1 (carril 3 y 4). B) Controles de exposición a luz ultravioleta de las mutantes ámber de Sdo1. C) Ensayos de foto-entrecruzamiento de las mutantes ámber de Sdo1 con la proteína scEFL1.

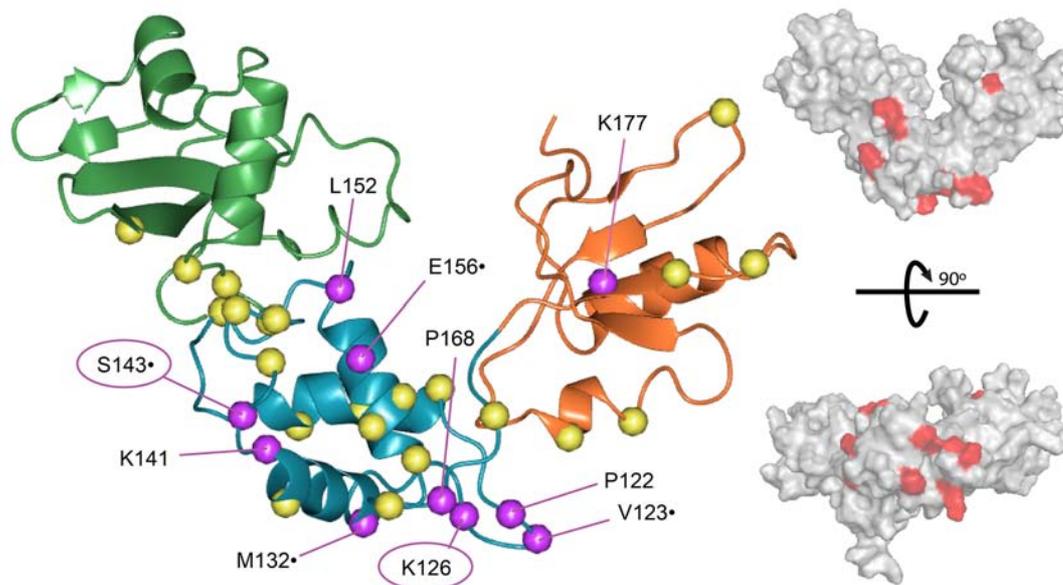


Figura 21. Modelo estructural de la proteína Sdo1. A la izquierda la distribución de los dominios de la proteína Sdo1, dominio I-verde, II-azul, III-naranja. Se resaltan en amarillo los residuos sustituidos por p-Azido-L-Fenilalanina o p-Benzoil-L-Fenilalanina y en morado aquellos que tuvieron un entrecruzamiento por exposición a luz ultravioleta. Se denotan con un (•) los ensayos llevados a cabo por la Dra. Nuria Sánchez Puig. Residuos resaltados con un círculo se encuentran mutados en la proteína SBDS en pacientes con el Síndrome Shwachman-Diamond. A la derecha vistas de la superficie de la proteína Sdo1 resaltando en rojo los residuos que tuvieron un entrecruzamiento por exposición a luz ultravioleta (modelo de Alfonso Méndez Godoy).

6.4 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que provee información sobre la estructura secundaria de una proteína. Para asegurarnos del correcto plegamiento de las proteínas mutadas en el síndrome Shwachman-Diamond que fueron estudiadas por anisotropía de fluorescencia, se corrió un espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano (Figura 22). El espectro característico de estas proteínas presenta un mínimo a 208 nm y una meseta a 218 nm que corresponde a una mezcla de hélices alfa y hojas beta, este dato concuerda con la estructura reportada por RMN (49). En la figura 22 se comparan los espectros de las distintas mutantes estudiadas y se observa que la forma es consistente, lo que sugiere la conservación de la estructura secundaria. Existen ligeras diferencias en la magnitud de la señal de elipticidad molar, que se atribuye a un error en la cuantificación de la proteína, sin embargo para asegurarnos de lo anterior se llevó a cabo la deconvolución de los espectros a través del programa CDNN. En la Tabla 9 podemos observar los porcentaje de cada tipo de estructura secundaria. Basándonos en el análisis que se hizo usando los datos de dicroísmo

circular que abarcan el intervalo de 195 nm – 260 nm podemos concluir que las diferencias que se presentan entran dentro del error experimental.

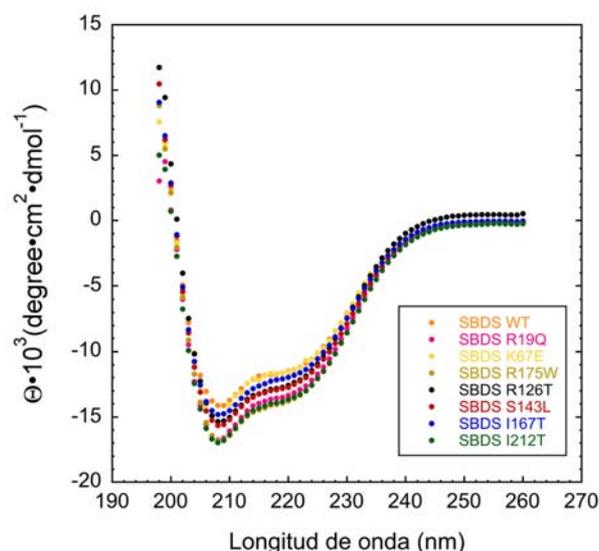


Figura 22. Evaluación de la estructura secundaria de la proteína SBDS-FIAsH nativa y mutantes presentes en el Síndrome de Shwachman-Diamond mediante dicroísmo circular en el UV-lejano. Condiciones: 25 mM PO_4^{3-} (pH 7.4) a 25°C.

Tabla 9. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de mutantes SBDS-FIAsH.

SBDS	195-260 nm
Hélice alfa	37.0%
Hoja antiparalela	8.3%
Hoja paralela	7.3%
Giro beta	16.4%
Hebra al azar	26.6%
Total	95.7%

SBDS R19Q	195-260 nm
Hélice alfa	32.3%
Hoja antiparalela	11.5%
Hoja paralela	7.9%
Giro beta	17.3%
Hebra al azar	27.0%
Total	96.1%

SBDS K67E	195-260 nm
Hélice alfa	32.2%
Hoja antiparalela	11.2%
Hoja paralela	8.2%
Giro beta	17.3%
Hebra al azar	28.2%
Total	97.1%

SBDS R175W	195-260 nm
Hélice alfa	38.5%
Hoja antiparalela	8.0%
Hoja paralela	6.8%
Giro beta	16.2%
Hebra al azar	24.5%
Total	94.0%

SBDS R126T	195-260 nm
Hélice alfa	36.5%
Hoja antiparalela	8.5%
Hoja paralela	7.4%
Giro beta	16.5%
Hebra al azar	26.8%
Total	95.7%

SBDS S143L	195-260 nm
Hélice alfa	39.9%
Hoja antiparalela	7.2%
Hoja paralela	6.7%
Giro beta	16.0%
Hebra al azar	24.6%
Total	94.4%

SBDS I167T	195-260 nm
Hélice alfa	33.9%
Hoja antiparalela	10.0%
Hoja paralela	7.9%
Giro beta	17.0%
Hebra al azar	27.7%
Total	96.5%

SBDS I212T	195-260 nm
Hélice alfa	35.1%
Hoja antiparalela	9.9%
Hoja paralela	7.4%
Giro beta	16.8%
Hebra al azar	25.5%
Total	94.6%

6.5 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz es una técnica que nos permite obtener el tamaño de una partícula al relacionar el movimiento Browniano de ésta y la luz que dispersa como resultado de dicho movimiento. El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio que presenta una partícula inmersa en un líquido, mientras más grande es la partícula más lento es el movimiento. Con el fin de conocer la calidad de nuestras muestras, así como descartar la formación de dímeros, las proteínas SBDS-FIAsH silvestre y mutantes se analizaron mediante DLS. La Figura 23 muestra la distribución de volumen en función del radio hidrodinámico de las proteínas, con un máximo alrededor de 3 nm, correspondiente a un monómero. Las muestras son polidispersas y presentan una distribución monomodal.

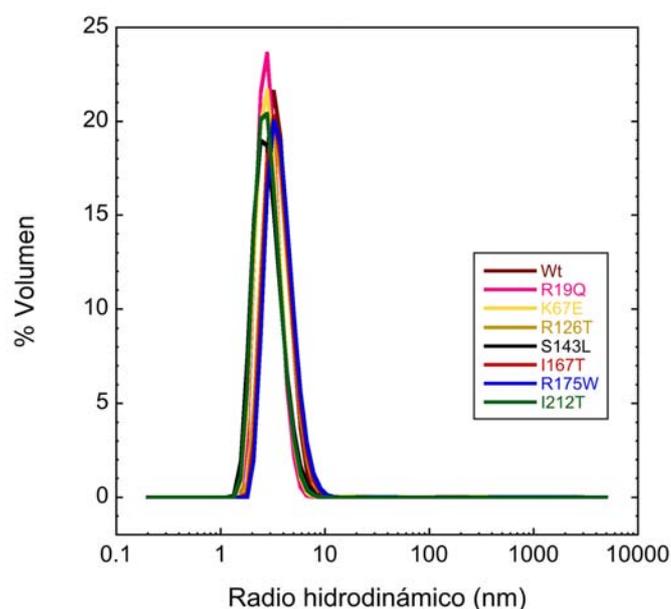


Figura 23. Dispersión dinámica de luz de las proteínas SBDS-FIAsH nativa y mutantes. Condiciones: 50 mM Tris•HCl (pH 7.4) a 25°C.

6.6 Ensayos de anisotropía de fluorescencia

Una vez que tuvimos las proteínas purificadas se llevaron a cabo los experimentos de anisotropía de fluorescencia en un espectrofluorómetro de la marca Olis. Previo a los ensayos, las proteínas se marcaron con el reactivo biarsénico Lumio™Green por distintos tiempos, alcanzando un marcaje máximo de 60-80% a las 8 h de exposición (dato no mostrado). Para llevar a cabo los ensayos de anisotropía de fluorescencia es necesario asegurarse que el cambio de la fluorescencia neta sea insignificante, ya que la anisotropía observada en una mezcla de especies está representada por la ecuación 19,

$$r = \sum_i F_i r_i \quad (19)$$

donde F_i es la fluorescencia fraccional y r_i es la anisotropía de cada componente. La fluorescencia fraccional de cada especie depende tanto de su concentración como de su fluorescencia relativa, que está definida por la ecuación 20,

$$F_i = \frac{X_i \phi_i}{\sum X_i \phi_i} \quad (20)$$

donde X_i es la fracción mol de la especie i y ϕ_i es el rendimiento cuántico de fluorescencia de la especie i .

De tal forma que, si la fluorescencia cambia a lo largo de la titulación es mejor medir la formación de complejo en función de fluorescencia y no de anisotropía, o bien, es necesario corregir el valor de anisotropía. Como control, la Figura 24 muestra que no hay cambio apreciable en la señal de fluorescencia a lo largo de la titulación por lo que el uso de la técnica de anisotropía es adecuado.

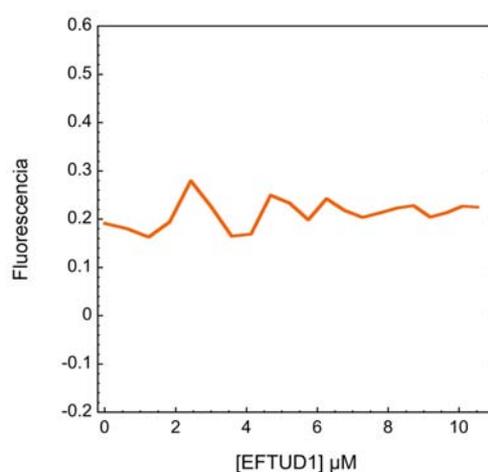


Figura 24. Control del cambio en la fluorescencia con respecto a la concentración de ligando en la titulación de hSEFL1 y SBDS-FIAs. Condiciones: 50 mM Tris•HCl (pH 7.4) a 25°C.

La unión entre las proteínas hsEFL1 y SBDS silvestre está representada por el gráfico ejemplificado en la Figura 25. A partir de los datos obtenidos se llevó a cabo el ajuste por una regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión, $P + L \rightleftharpoons PL$. Como se observa en la Figura 25, este modelo no describe adecuadamente a los datos experimentales y por tanto no se logra un buen ajuste. Por lo que la interacción entre hsEFL1 y SBDS no corresponde a un modelo de un sitio de unión y se optó por llevar a cabo un ajuste a otro modelo de unión.

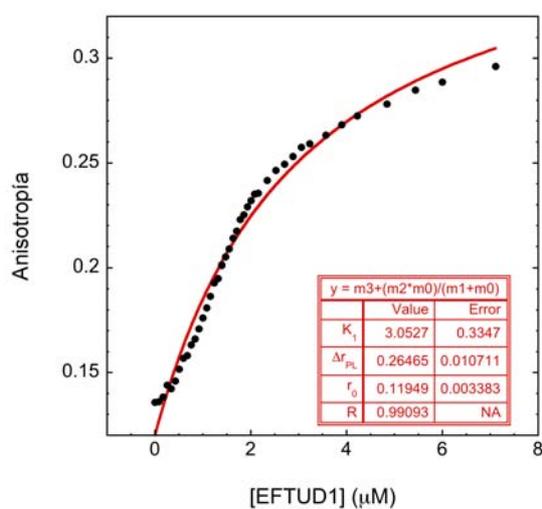


Figura 25. Gráfico de unión entre hsEFL1 y SBDS-FIAsH silvestre evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea sólida roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión. Condiciones: 50 mM Tris•HCl (pH 7.4) a 25°C.

Debido a que la unión no corresponde a un solo sitio existen dos posibilidades, que se presente la unión a múltiples sitios con la misma constante de disociación o que estos tengan constantes de disociación diferentes. En la Figura 26 se muestra el resultado del ajuste a un modelo de unión de dos sitios idénticos, $P + 2L \rightleftharpoons PL_2$, o bien un modelo secuencial de dos sitios distintos, $P + L \rightleftharpoons PL + L \rightleftharpoons PL_2$. El ajuste a ambos modelos mejora notablemente en comparación con aquel a un solo sitio. Sin embargo, la proteína SBDS es un monómero, por lo que el modelo de dos sitios idénticos es difícil de explicar en un sentido físico y por ende poco probable. En cambio, un modelo de unión a dos sitios distintos resulta más fácil de explicar. En nuestro grupo de trabajo se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido en levadura para evaluar la interacción entre SBDS y EFL1. Para ello, se ensayaron los cinco dominios de EFL1 de manera independiente con la proteína SBDS completa y con una construcción de SBDS que sólo contenía los dominios II-III. Los resultados sugieren que la

interacción entre SBDS y EFL1 ocurre en los dominios I y II de ésta última; mientras que en SBDS, el dominio I parece jugar un papel en la interacción así como el dominio II y/o III (73).

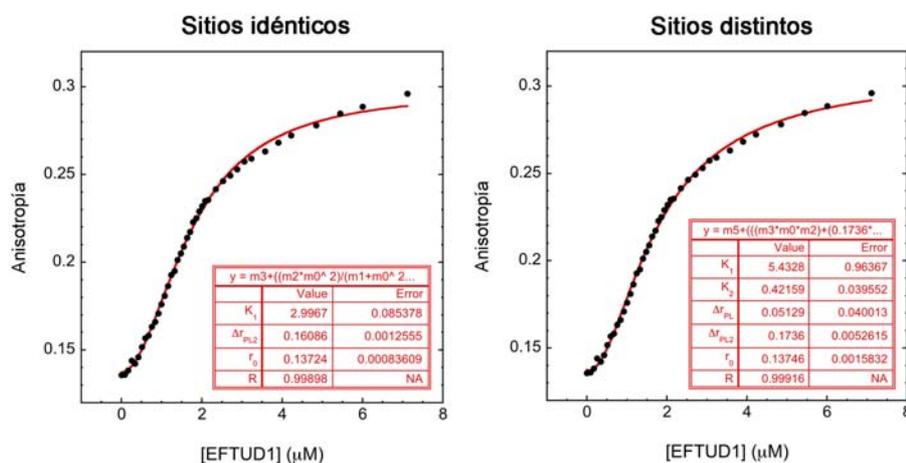


Figura 26. Gráfico de unión entre hsEFL1 y SBDS-FIAsH silvestre evaluado mediante anisotropía de fluorescencia ajustado por una regresión no lineal a un modelo de unión de dos sitios idénticos (izquierda) o a un modelo secuencial de dos sitios distintos de unión (derecha). El ajuste se denota con una línea roja sólida.

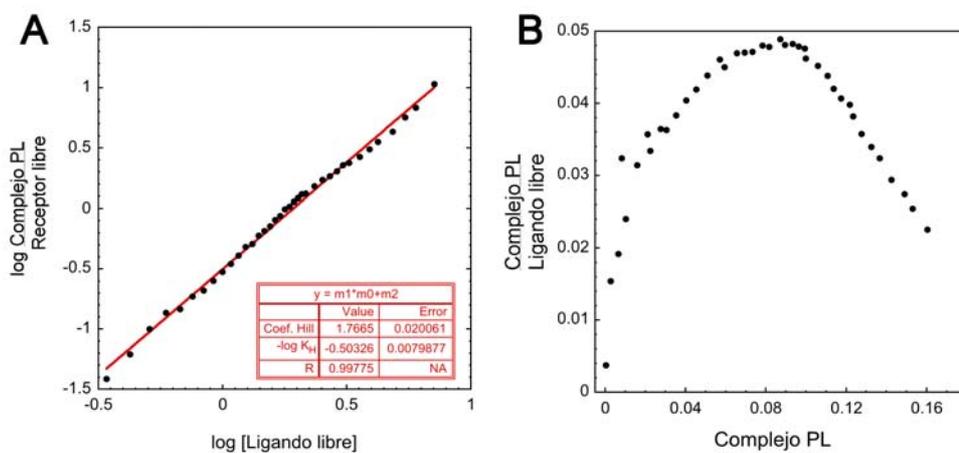
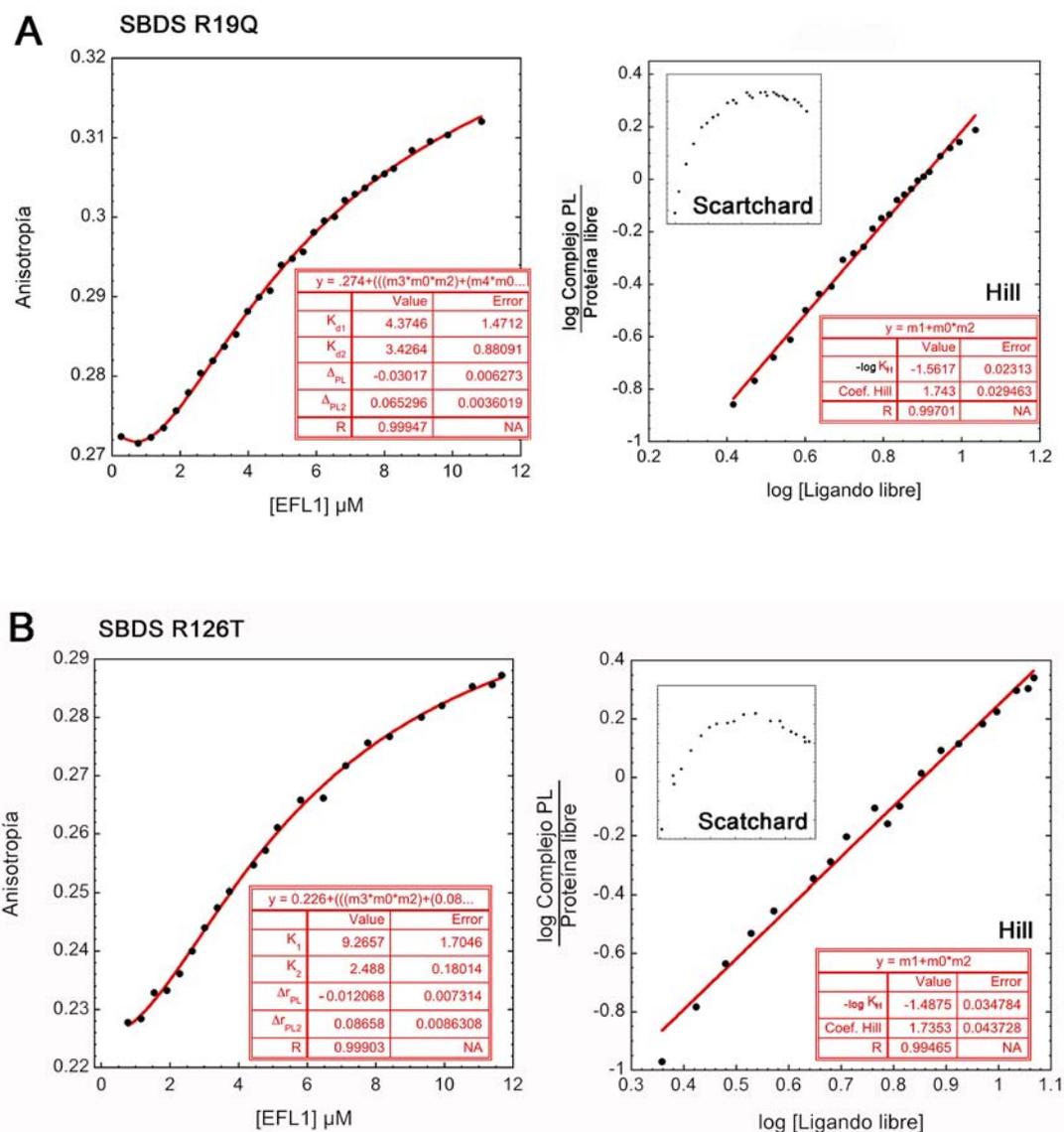
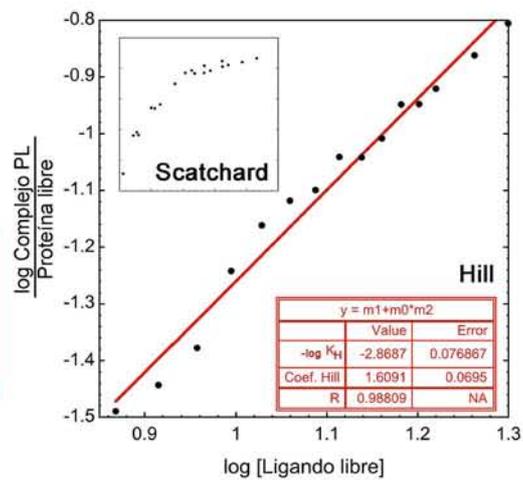
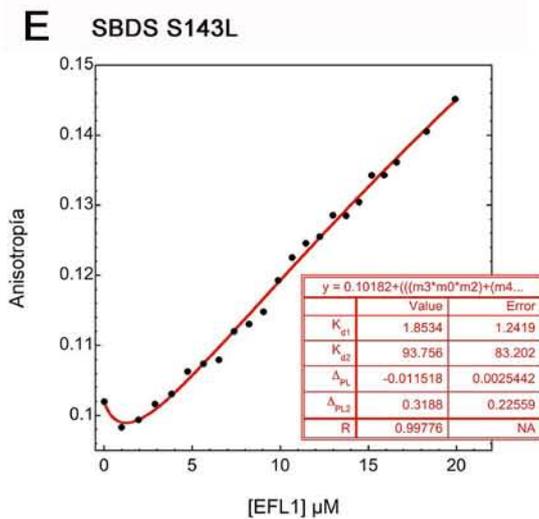
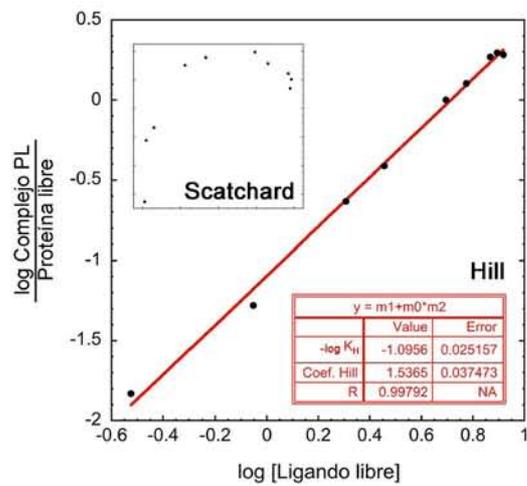
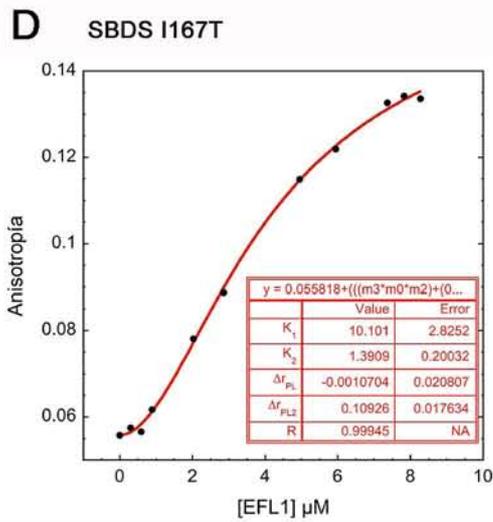
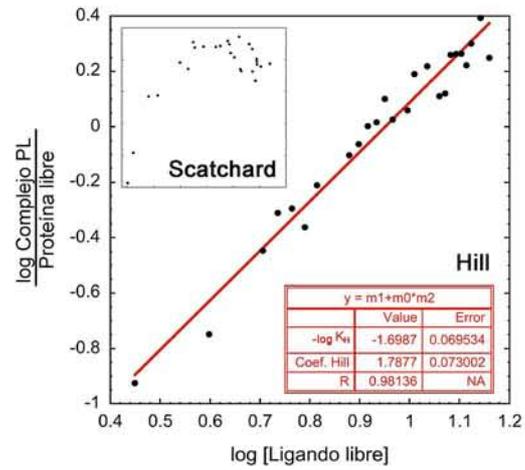
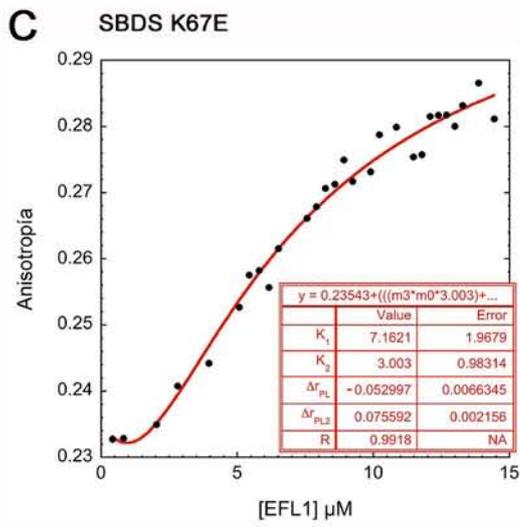


Figura 27. Gráfico de Hill (A) y Scatchard (B) de la unión de EFTUD1 y SBDS-FIAsH.

Debido a que los valores de las constantes de disociación en el modelo secuencial de dos sitios distintos de unión sugieren que la segunda unión ocurre con una afinidad mayor que la primera se llevó a cabo un análisis de cooperatividad ajustando los datos a la ecuación de Hill y a un gráfico de Scatchard. El coeficiente obtenido del análisis de la gráfica de Hill (Figura 27-A) corresponde a un valor de 1.8 ± 0.02 lo que

corroborar que la unión de hsEFL1 a SBDS constituye un evento de cooperatividad positiva y la unión al primer sitio causa un aumento en la afinidad del segundo. Más aún, la forma cóncava del gráfico de Scatchard apoya el fenómeno de cooperatividad positiva (Figura 27-B). El análisis de unión de las SBDS-FIAsH mutantes se realizó del mismo modo que para la proteína silvestre, en todos los casos la unión entre ambas proteínas se describió adecuadamente mediante un modelo de dos sitios distintos de unión con cooperatividad positiva (Figura 28). En la Tabla 10 se resumen los valores de las constantes de disociación obtenidas de la interacción entre hsEFL1 y SBDS mutantes.





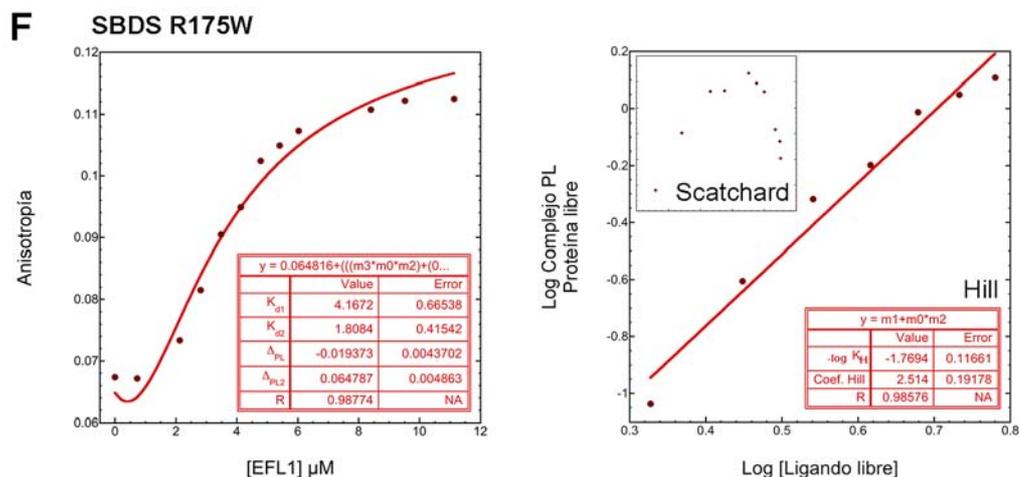


Figura 28. Gráficos de unión entre hEFL1 y SBDS-FIAsH mutantes evaluado mediante anisotropía de fluorescencia ajustado por una regresión no lineal a un modelo de unión a dos sitios distintos. Del lado izquierdo se presentan los gráficos de anisotropía de fluorescencia de las mutantes SBDS (A) R19Q, (B) R126T, (C) I167T, (D) K67E, (E) S143L y (F) R175W. Del lado derecho se presenta la respectiva cooperatividad de las mutantes por un ajuste a la ecuación de Hill y a la ecuación de Scatchard (gráfico interior). Condiciones: 50 mM Tris•HCl (pH 7.4) a 25°C.

Tabla 10. Constantes de disociación de la interacción entre las proteínas SBDS silvestre y mutantes asociadas con el Síndrome de Shwachman-Diamond y hEFL1.

Dominio	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	R126T	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

ND: no disponible por falta de unión

7 Discusión de resultados

7.1 Foto-entrecruzamiento en residuos de aminoácidos

Las proteínas constituyen un recurso esencial para la viabilidad celular siendo ellas las responsables de gran parte de las actividades que se llevan a cabo dentro y fuera de la célula. Para ello, la célula tiene a su disposición un menú de cerca de un millón diferentes proteínas. Tradicionalmente el estudio del interactoma se lleva a cabo través de métodos como el doble híbrido en levaduras o purificación por afinidad, a pesar de que estos métodos han sido de mucha ayuda presentan limitaciones por lo que desarrollar nuevas técnicas es crucial para abordar el problema.

Las proteínas son polímeros de aminoácidos, y a pesar de la vasta colección de proteínas sólo existen 20 aminoácidos en la naturaleza con grupos funcionales limitados. El grupo de Peter G. Schultz desarrolló una metodología para evolucionar un ARNt y su correspondiente aminoacil tRNA sintetasa capaz de incorporar aminoácidos no naturales en una proteína al reconocer el codón de término ámber (TAG) (Figura 29).

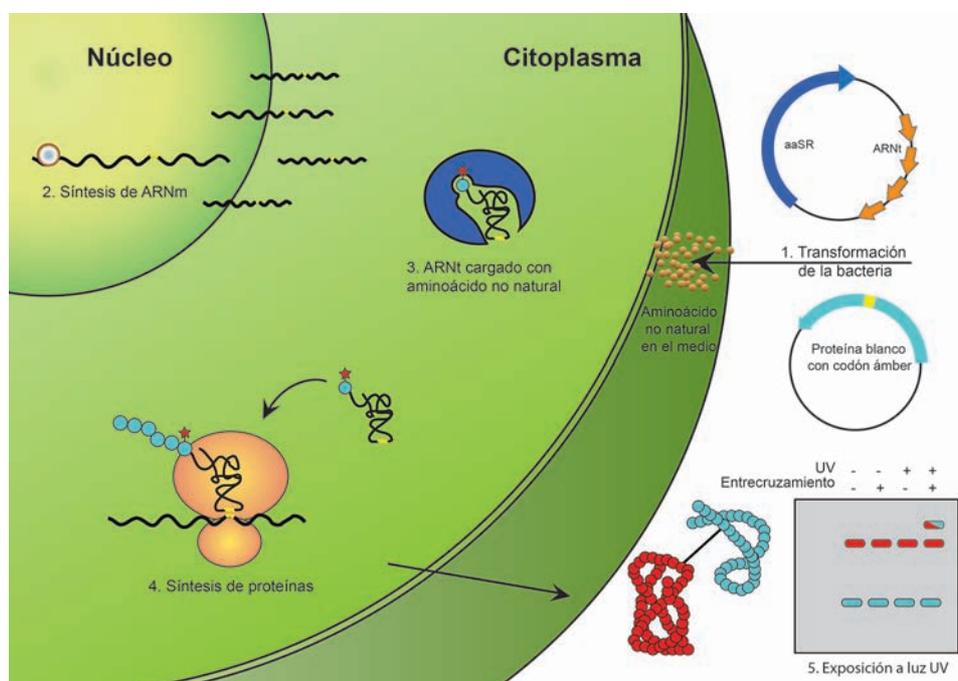


Figura 29. Incorporación de un aminoácido no natural a una proteína. 1. Co-transformación del ADN que codifica al par ortogonal ARNt/aminoacil tRNA sintetasa (aaSR) y a la proteína blanco en célula bacteriana. 2. Síntesis de los ARN correspondiente. 3. Acilación del ARNt con el aminoácido no natural por la enzima aminoacil tRNA sintetasa. 4. Reconocimiento del codón de paro ámber por ARNt cargado con aminoácido no natural en el proceso de traducción. 5. Entrecruzamiento por luz UV *in vivo* o *in vitro* e inmuno-detección.

Entre los aminoácidos que se pueden adicionar en proteínas hay de muy diversas funciones, los que utilizamos en este trabajo corresponden a aminoácidos con grupos funcionales que reaccionan formando enlaces covalentes ante la exposición a luz ultravioleta de 254 nm. Con el propósito de identificar los residuos de las proteínas Sdo1/SBDS involucrados en la interacción con la proteína scEFL1/hsEFL1 se sustituyeron sitios específicos con los aminoácidos no naturales H-4-Azido-L-Fenilalanina y/o H-p-Benzoil-L-Fenilalanina (Figura 30). La expresión de este tipo de mutantes requiere no solo de la sobre-expresión del ARNt y del aminoacil tRNA sintetasa, sino también de la sobre-expresión de la proteína de estudio. La introducción de un aminoácido no natural en la proteína puede provocar la desestructuración total o parcial de su plegamiento; razón por la cual la mayoría de las mutantes evaluadas se encontraban formando agregados insolubles. De las mutantes en que sí se logró una expresión exitosa se obtuvo un foto-entrecruzamiento con scEFL1 en los residuos P122, K177, P168, K126, K141 y L152 de la proteína Sdo1. Por comunicación personal de parte de la Dra. Nuria Sánchez Puig se sabe que los residuos M132, V123 y S143 también producen foto-entrecruzamiento con scEFL1. Si localizamos estos residuos en la proteína Sdo1 (Figura 21) se observa que la cara externa del dominio II forma parte de la región de interacción con scEFL1. Desafortunadamente no se cuentan con mutantes para evaluar la participación del dominio I ó III, sin embargo, ensayos de doble híbrido llevados a cabo por Alfonso Méndez Godoy marcan una gran diferencia en la unión entre la proteína de levadura Sdo1 y scEFL1 en ausencia del dominio I con respecto a la unión de la proteína completa (73).

El sistema de entrecruzamiento a través de aminoácidos no naturales con grupos funcionales reactivos presenta grandes ventajas que vale la pena resaltar. Entre los grupos funcionales que comúnmente se utilizan con estos fines se encuentra la azilazida y la benzofenona. Estos grupos funcionales son estables en ausencia de luz ultravioleta, y cuando son activados se produce un intermediario altamente reactivo que forma enlaces covalentes con los grupos funcionales adyacentes teniendo preferencia sobre aminas primarias. La vida media del intermediario es corta (ns- μ s) y cuando no se produce el enlace covalente el reactivo puede relajarse (benzofenona) o reaccionar con una molécula de agua o con ella misma (azil azida) lo cual limita la probabilidad de crear enlaces no específicos (74). No obstante, la introducción de este aminoácido no natural puede afectar la interacción pudiendo dar falsos negativos, por

lo que se sugiere que esta técnica se lleve a cabo en conjunto con otras que proporcionen información estructural o de interacción.

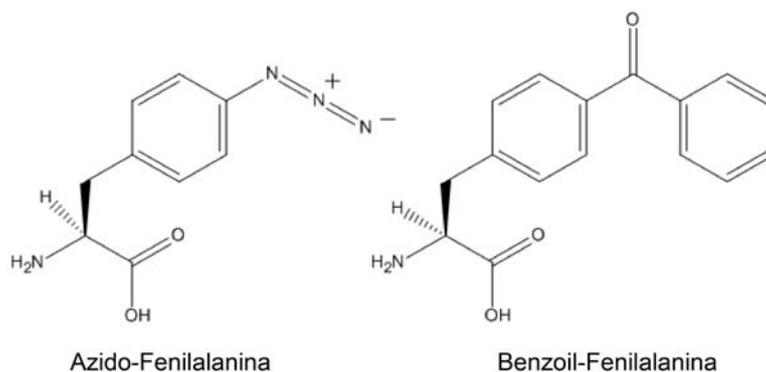


Figura 30. Estructura química de los aminoácidos no naturales con los que se sustituyeron residuos específicos en la proteína Sdo1 para los ensayos de foto-entrecruzamiento con EFL1.

Las familias de proteínas Sdo1/SBDS no tienen una alta identidad y sin embargo tridimensionalmente son muy similares. Se cree que el sistema EFL1/SBDS ha evolucionado de manera conjunta, por lo que a pesar de que los resultados de foto-entrecruzamiento sólo se hayan evaluado en el ortólogo de levadura es de esperar que residuos equivalentes en la proteína humana están involucrados en la interacción con la proteína hsEFL1. Entre estos residuos sobresalen K126 y S143, ya que los respectivos residuos en humano (R126 y S143) están mutados en pacientes con el Síndrome Shwachman-Diamond, siendo ésta posiblemente la razón de una pérdida de función de SBDS.

7.2 Caracterización de la interacción entre las proteínas SBDS y hsEFL1 por anisotropía de fluorescencia

El Síndrome Shwachman-Diamond es una enfermedad poco común dentro del conjunto de enfermedades conocidas como ribosomopatías debido a que la causa lo origina un defecto en la vía de síntesis del ribosoma. A pesar de que el ribosoma es una partícula esencial para la viabilidad de cualquier célula, los pacientes con este síndrome y otras ribosomopatías presentan cuadros clínicos característicos que sólo afectan tejidos específicos. El Síndrome Shwachman-Diamond es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por presentar insuficiencia pancreática exocrina, malformaciones esqueléticas y disfunción de la médula ósea (45). El 90% de los pacientes tienen mutaciones en el gen *SBDS* que se sabe que codifica para una

proteína involucrada en la maduración citoplasmática de la subunidad ribosomal 60S (46,49). Esta proteína, conocida como la proteína del Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), es un factor intercambiador de nucleótidos de la GTPasa EFL1, encargada de la remoción del factor de antiasociación eIF6 a través de la hidrólisis de GTP (67). Desde el descubrimiento del gen se han reportado diversas mutaciones que se resumen en la Tabla 11 (ver APÉNDICE), y de las cuales el 75% ocurren por conversión con el pseudogen *SBDSP* (183-184TA→CT y 258+2T→C) generando la síntesis de una proteína trunca en los primeros residuos (K62X y C84fsX3). No se ha llevado a cabo ningún estudio *in vitro* sobre estos péptidos pero debido a que no se han reportado casos de pacientes homocigotos para la mutación K62X se infiere que se pierde completamente la función proteica. Análisis sobre los niveles de expresión indican que esta mutación no genera productos completos (47). La mutación C84fsX3 es la más común de todas (75), ésta causa un corrimiento en la secuencia del gen que origina un codón de paro prematuro durante la traducción. Este corrimiento en la secuencia interrumpe el sitio de empalme en el intrón 2 del gen, sin embargo, se han registrado pacientes homocigotos para esta mutación y al analizar sus nivel de expresión se encontró que a pesar de ser bajos sí hay síntesis de proteína completa. Esto sugiere que de alguna forma la maquinaria celular es capaz de sobrepasar la mutación y realizar el empalme adecuado para producir un poco de proteína correcta. Existen otras mutantes menos comunes que perturban la estabilidad de la proteína y mutaciones puntuales de quienes no se conoce el efecto, razón por la cual se tomó la decisión de llevar a cabo ensayos de interacción con el fin de caracterizar el efecto que podrían tener en la unión con hsEFL1. Más aún, conociendo los resultados del foto-entrecruzamiento que demostraron que los residuos K126 y S143 en SBDS, mutados en pacientes con el síndrome, participaban directamente en la interacción con hsEFL1 (Figura 21). Para estudiar de forma cuantitativa la interacción proteína-proteína se utilizó la anisotropía de fluorescencia. En este tipo de experimentos se hace incidir una luz polarizada sobre una muestra que contenga una molécula capaz de fluorecer (fluoróforo), sin embargo, sólo aquellas moléculas que tengan su momento dipolar de transición orientado en paralelo al pulso de luz serán excitadas. Este proceso se llama foto-selección. Durante el tiempo de vida de la señal de fluorescencia, el fluoróforo sufre movimientos rotacionales de difusión emitiendo la luz a distintas direcciones. La rotación que ocurre es registrada por dos detectores que

miden la señal en paralelo y en perpendicular con respecto a la polaridad del pulso de luz (76).

Las curvas de unión obtenidas de la interacción de hEFL1 y SBDS se ajustan a un modelo de unión a dos sitios distintos con cooperatividad positiva. Cuando se presenta la unión a dos sitios distintos, esto se puede deber a la unión de dos ligandos distintos o a una sola cadena polipeptídica interaccionando en dos regiones (9). Existen a su vez dos tipos de efectos cooperativos, el sistema alostérico y la selección conformacional. El alostérico implica un cambio conformacional después de la primera unión aumentando la afinidad al segundo sitio, mientras que en la selección conformacional, después de la primera unión la estructura está en un arreglo tal que reduce el número de configuraciones no funcionales. Este efecto se describe claramente para el plegamiento de una proteína (paradoja de Levinthal) aunque también aplica en modelos de unión (77). Sin embargo, los estudios de interacción en equilibrio realizados en este trabajo no permiten esclarecer cual de los dos modelos es el que describe la unión de hEFL1 y SBDS. Para ello se tendrían que realizar estudios de unión mediante técnicas de cinética rápida.

Las constantes de disociación obtenidas en los ensayos de interacción entre hEFL1 y las diferentes mutantes de SBDS demostraron la perturbación de la unión. En todos los casos la unión se ve disminuida en diferente constante y diferente magnitud. El caso de las mutantes R19Q y K67E presentan una disminución de la afinidad en un orden de magnitud en el segundo sitio mientras que la constante de disociación del primer sitio se mantiene igual, dentro del error experimental. Como se observa en la Figura 31, estas mutaciones se encuentran en el dominio I lo que podría sugerir que el segundo sitio de unión ocurre en esta región de la proteína. Por ensayos de foto-entrecruzamiento se vio que en levadura el residuo 126 participaba directamente en la interacción con EFL1 del mismo organismo, por lo que la disminución de la afinidad en la mutante R126T humana no fue de sorprenderse. En este caso, la mutación cae en el dominio II de la proteína y sin embargo el segundo sitio de interacción sigue siendo el más afectado, pero esto se debe posiblemente a la pérdida de unión en el primer sitio y por tanto la cooperatividad de unión al segundo sitio también se ve afectada y en mayor proporción. El mismo efecto se observa en la mutación I167T. A partir de esta información es posible inferir que el primer sitio de unión de SBDS con EFL1 ocurre en su dominio II y por efecto de cooperatividad se da la unión al segundo sitio que corresponde al dominio I. La existencia de dos sitios de unión en SBDS por EFL1

concuera con resultados publicados por otros grupos de investigación. Ensayos de complementación genética descritos por Boocock et al. (50) reportan que el dominio I de Sdo1 es indispensable para la viabilidad celular, pero su función puede ser sustituida por el dominio I de otros ortólogos, y el dominio III no es requerido para la viabilidad celular. La complementación con quimeras en el dominio II de Sdo1 demostraron que es una región indispensable para la función de la proteína y además es especie-específico. Por otro lado, estudios de doble híbrido en levadura realizados en nuestro grupo de trabajo, compararon la interacción entre scEFL1 y la proteína Sdo1 completa y el dominio II-III. Este ensayo, al ser semi-cuantitativo, permite comparar el efecto de la ausencia del dominio I en el caso de no producir una pérdida total de la interacción. Los resultados indicaron que a pesar de que la interacción ocurre, la presencia del dominio I produce una unión más fuerte.

Muchas de las mutantes evaluadas abatieron la interacción de SBDS con EFL1, sin embargo para la mutación S143L la interacción se encuentra debilitada a tal grado que no fue posible realizar un correcto ajuste de los datos experimentales debido a que no se logró llegar a niveles de saturación. Por último tenemos a la mutación R175W que se encuentra en el dominio III. No queda muy claro el efecto de esta mutación, las diferencias en las constantes de disociación parecen caer dentro del error experimental debido al ajuste. El paciente que presenta esta mutación es heterocigoto con un alelo con la mutación R175W y en el otro con la mutación N121T, residuo del dominio II (ver APÉNDICE). Es posible que el fenotipo que se presenta es debido a una haploinsuficiencia provocada por la mutación N121T y no por la R175W. Futuros ensayos con esta nueva mutación serán necesarios para responder este problema.

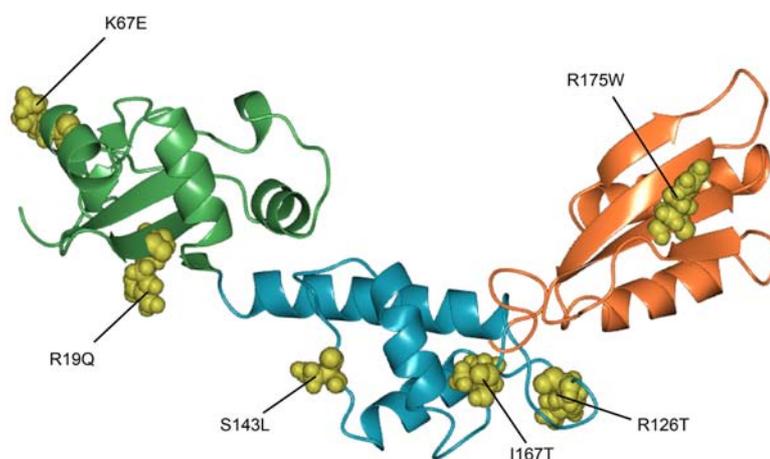


Figura 31 Estructura tridimensional de la proteína humana SBDS. Distribución en el espacio de los tres dominios (I: verde; II: azul, y III: naranja). Mutaciones presentes en pacientes con SDS estudiadas en este trabajo se resaltan de color amarillo (PDB 2L9N).

Ajustando las curvas de unión a un modelo de dos sitios distintos obtenemos como información el cambio de anisotropía debido a la primera unión (Δ_{PL}) y el cambio producido por la unión al segundo sitio (Δ_{PL2}). En todos los casos, el cambio en la señal de anisotropía ocurre al ocuparse el segundo sitio, obteniendo para la primera unión un valor cercano a cero lo cual sugiere que el fluoróforo sigue presentando gran movimiento. Esto se podría explicar debido a la flexibilidad de la molécula. El motivo de unión al compuesto biarsénico se encuentra en el extremo C-terminal, dominio que se ha visto por ensayos de SAXS presenta la mayor flexibilidad en la proteína (comunicación personal del Dr. Dritan Siliqi). El SAXS es una técnica utilizada para la caracterización estructural de baja resolución de partículas desde kDa hasta GDa. En un experimento de SAXS, un haz de luz se hace incidir en la muestra, la cual va a dispersar la luz dependiendo de la forma que tenga. Esta dispersión de luz se mide en términos del momentum transferido (s). Relacionando el logaritmo de la intensidad en función del momentum transferido y ajustando la curva por iteraciones a estructuras de alta resolución se puede obtener un modelo. Uno de los parámetros que se obtiene de la molécula es el radio de giro (R_g) que sirve para generar el gráfico normalizado (adimensional) de Kratky ($R_g^2 I$ vs R_g). Este gráfico se emplea para analizar la flexibilidad de una proteína. En la Figura 32 se observa que los datos de la proteína Sdo1 no presentan una estructura globular, es decir un máximo (línea verde), como el gráfico de la proteína BSA usada como parámetro control en el experimento. La forma que presenta la proteína Sdo1 es característica de una proteína con dominios flexibles, sin embargo no es posible determinar qué región(es) de la molécula presenta esta característica a partir de este gráfico. En la Figura 32 se superponen cuatro modelos de la proteína Sdo1 obtenidas del software EOM (78) (paquete ATSAS (79)) que mejor representan a la curva de SAXS, y se observa que el dominio I y III son muy flexibles. Estos experimentos se llevaron a cabo dentro del proyecto bilateral MX14MO05 México-Italia, en la propuesta del EMBL SAXS-440 en las instalaciones de la línea 12 (80) del Petra III, sincrotrón DESY de Hamburgo, Alemania.

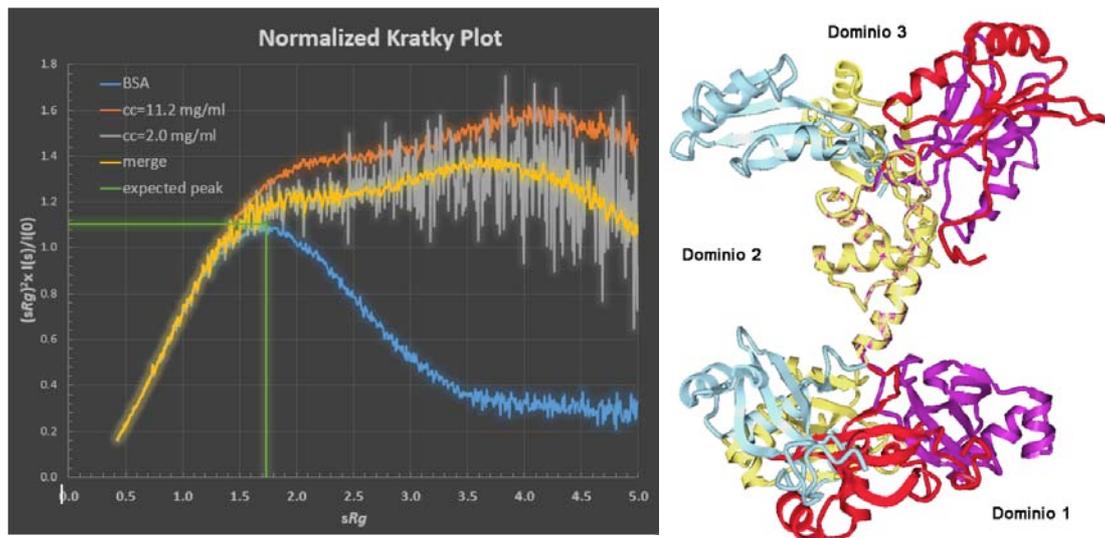


Figura 32. Análisis de la flexibilidad de la proteína Sdo1. A la izquierda se encuentra el gráfico de Kratky de la proteína Sdo1 y de la proteína BSA como control (azul). En naranja se muestran los datos de la proteína Sdo1 a una concentración de 11.2 mg/mL y en gris a una concentración de 2.0 mg/mL que al combinarse generan el gráfico representado en amarillo. Del lado izquierdo se encuentran superpuestos los modelos que mejor representan los datos de SAXS.

Finalmente, es claro que los residuos mutados en el Síndrome de Shwachman-Diamond evaluados en este trabajo participan directamente en la interacción con EFL1 (Figura 33), y el efecto inmediato de la mutación es abatir la interacción entre ambas proteínas. A nivel biológico, la relevancia de la pérdida de esta interacción es que se pierde la regulación de intercambiador de nucleótidos que SBDS ejerce sobre la actividad de GTPasa de EFL1 y por ende la liberación de eIF6 de la superficie de la subunidad 60S es deficiente, lo cual a su vez repercute en la formación de ribosomas traduccionalmente competentes.

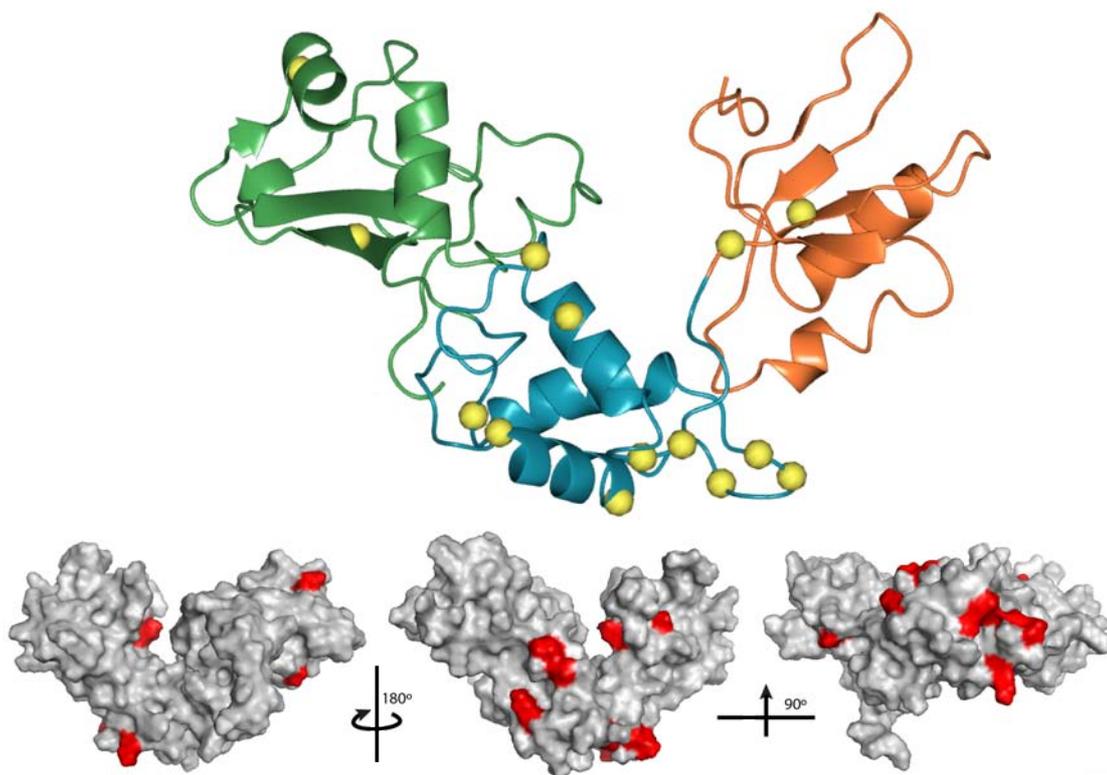


Figura 33. Estructura tridimensional de la proteína SBDS. Figura superior muestra la distribución en el espacio de los tres dominios (I: verde; II: azul, y III: naranja). Residuos de la proteína SBDS involucrados en la interacción con la proteína EFL1, obtenidos por ensayos de anisotropía de fluorescencia y de foto-entrecruzamientos, se resaltan de color amarillo. Figuras inferiores muestran la superficie de la proteína SBDS vista desde distintos ángulos resaltando en rojo los residuos involucrados en la interacción con la proteína EFL1 (Modelo de Alfonso Méndez Godoy).

7.3 Discusión general

Las ribosomopatías son uno más de los misterios en la biología y su completo entendimiento podría cambiar el concepto que tenemos del ribosoma y su función.

- Siendo una misma vía, y si al final las ribosomopatías afectan una misma función que es el proceso de traducción, ¿por qué depende del paso afectado la enfermedad que desarrolla?
- Si todas las células requieren de traducción para su viabilidad, ¿por qué las ribosomopatías afectan tejidos específicos?
- ¿Por qué distintas mutaciones en la misma proteína genera distintos síntomas?
- Y más aún, ¿por qué una mutación particular genera fenotipos clínicos con distinta severidad?

Estas son algunas de las preguntas que no han podido ser respondidas, pero que sugieren que se tratan de enfermedades multifactoriales. Ya son más de 50 años que Jacob y Monod describieron por primera vez la regulación de expresión en bacteria, ahora se sabe que los niveles de expresión cambian dependiendo del tipo celular, respuestas al ambiente y el grado de desarrollo del tejido/organismo. Con esta premisa, una traducción deficiente podría provocar un nivel inferior al umbral que amortigua la célula de ciertas proteínas. Esto también explica los cambios en el fenotipo conforme se desarrolla el paciente. En los pacientes con el síndrome Shwachman-Diamond se ha visto que con la edad el paciente presenta una mejora en las anomalías pancreáticas y esqueléticas (41,81). Se reconoce que los ribosomas pueden llevar a cabo el proceso de traducción de una manera no convencional, como es el caso de los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES; **I**nternal **R**ibosome **E**ntry **S**ite). Se ha visto que modificaciones en la pseudouridinilación del ARNr en pacientes con disqueratosis congénita ligada al cromosoma X modifica la afinidad por ARNm dependientes de IRES (82). Esta información apoya la idea de que la disminución del nivel celular de ciertas proteínas afectaría el desarrollo o la función de un tejido/órgano en particular.

Hasta ahora la importancia de los ribosomas estaba dada por su función en la síntesis de proteínas pero cada vez más se detectan funciones de regulación a distintos niveles. Contrario a lo que se creía, estudios han demostrado diferencias en la expresión de proteínas ribosomales, enriquecidas en tejidos específicos (83), esta información se relaciona con funciones extraribosomales descritas en múltiples proteínas ribosomales estructurales o accesorias (84). Esto no hace la tarea más sencilla para entender el escenario de una ribosomopatía. En la actualidad existe la hipótesis sobre ribosomas especializados debido a diferencias en su composición. De manera general se dice que las proteínas ribosomales en mamíferos sólo presentan una copia en el genoma, sin embargo, hay casos como RPS4 que es codificada por tres genes localizados en el cromosoma X y Y (*RPS4X*, *RPS4Y1*, *RPS4Y2*). En el hombre, *RPS4X* y *RPS4Y1* se expresa en todos los tejidos, sin embargo *RPS4Y2* sólo en testículos y próstata, lo que podría resultar en ribosomas especializados en la traducción de proteínas necesarias en sólo esos órganos (85). Por último, el proceso de biogénesis ribosomal tiene múltiples puntos de control, relacionándose directamente con vías de regulación como la de p53, mTOR y Myc para evitar la prevalencia de células con ribosomas que no estén correctamente ensamblados (86). Así, las interacciones entre proteínas no

pueden verse de manera individual, cada vez es más claro como la célula es una red de interacciones, y que para entender el fenotipo provocado por una enfermedad hay que analizarlo de manera global.

8 Conclusiones

- Los residuos L152, P122, P168, K141, K171 y K126 de la proteína Sdo1 tienen una participación directa en la interacción con la GTPasa scEFL1.
- La interacción de la proteína SBDS y hEFL1 se da a través de dos sitios distintos con cooperatividad positiva.
- Las mutaciones R19Q, K67E, I167T, R126T, S143L, R175W o I212T asociadas con el Síndrome de Shwachman-Diamond no alteran la estructura secundaria de la proteína SBDS.
- Las mutaciones R19Q, K67E, I167T, R126T, S143L, R175W asociadas con el Síndrome de Shwachman-Diamond abaten la interacción con hEFL1.
- Los residuos R19, K67, I167, R126, S143 y R175 de la proteína SBDS participan directamente en la interacción con hEFL1.

9 Bibliografía

1. Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., and Tress, M. L. (2014) Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* **23**, 5866-5878
2. Berggard, T., Linse, S., and James, P. (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**, 2833-2842
3. Legrain, P., Aebersold, R., Archakov, A., Bairoch, A., Bala, K., Beretta, L., Bergeron, J., Borchers, C., Corthals, G. L., Costello, C. E., Deutsch, E. W., Domon, B., Hancock, W., He, F., Hochstrasser, D., Marko-Varga, G., Salekdeh, G. H., Sechi, S., Snyder, M., Srivastava, S., Uhlen, M., Hu, C. H., Yamamoto, T., Paik, Y. K., and Omenn, G. S. (2011) The human proteome project: Current state and future direction. *Mol Cell Proteomics*
4. Milo, R. (2013) What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *Bioessays* **35**, 1050-1055
5. Braun, P., and Gingras, A. C. (2012) History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics* **12**, 1478-1498
6. Ofra, Y., and Rost, B. (2003) Analysing six types of protein-protein interfaces. *J Mol Biol* **325**, 377-387
7. Mendel, C. M., and Mendel, D. B. (1985) 'Non-specific' binding. The problem, and a solution. *Biochem J* **228**, 269-272
8. Wilkinson, K. D. (2004) Quantitative Analysis of Protein-Protein Interactions. in *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications* (Fu, H. ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey. pp 15-31
9. Forsen, S., and Linse, S. (1995) Cooperativity: over the Hill. *Trends Biochem Sci* **20**, 495-497
10. Karbstein, K. (2007) Role of GTPases in ribosome assembly. *Biopolymers* **87**, 1-11
11. Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012) Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 759-767
12. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 560-567
13. Warner, J. R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**, 437-440
14. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**, 17-42
15. Decatur, W. A., and Fournier, M. J. (2002) rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* **27**, 344-351
16. Panse, V. G., and Johnson, A. W. (2010) Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci* **35**, 260-266
17. Tschochner, H., and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* **13**, 255-263
18. Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010) Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 673-683

19. Bautista-Santos, A., Zinker, S. (2012) Ribosomas en el núcleo y en el citoplasma. *Horizonte Ciencia*
20. Ruggero, D., and Shimamura, A. (2014) Marrow failure: a window into ribosome biology. *Blood* **124**, 2784-2792
21. Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choemmel, V., O'Donohue, M. F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Zaucha, J. M., Glader, B., Niemeyer, C., Meerpohl, J. J., Atsidaftos, E., Lipton, J. M., Gleizes, P. E., and Beggs, A. H. (2008) Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* **83**, 769-780
22. Horos, R., Ijspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I. P., and von Lindern, M. (2012) Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* **119**, 262-272
23. Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D., Attar, E., Ellis, S. R., and Golub, T. R. (2007) Identification of RPS14 as the 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Blood* **110**, 8a-8a
24. Bolze, A., Mahlaoui, N., Byun, M., Turner, B., Trede, N., Ellis, S. R., Abhyankar, A., Itan, Y., Patin, E., Brebner, S., Sackstein, P., Puel, A., Picard, C., Abel, L., Quintana-Murci, L., Faust, S. N., Williams, A. P., Baretto, R., Duddridge, M., Kini, U., Pollard, A. J., Gaud, C., Frange, P., Orbach, D., Emile, J. F., Stephan, J. L., Sorensen, R., Plebani, A., Hammarstrom, L., Conley, M. E., Selleri, L., and Casanova, J. L. (2013) Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science* **340**, 976-978
25. Liu, J. M., and Ellis, S. R. (2006) Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood* **107**, 4583-4588
26. Dauwerse, J. G., Dixon, J., Seland, S., Ruivenkamp, C. A. L., van Haeringen, A., Hoefsloot, L. H., Peters, D. J. M., Boers, A. C. D., Daumer-Haas, C., Maiwald, R., Zweier, C., Kerr, B., Cobo, A. M., Toral, J. F., Hoogeboom, A. J. M., Lohmann, D. R., Hehr, U., Dixon, M. J., Breuning, M. H., and Wiczorek, D. (2011) Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat Genet* **43**, 20-22
27. Chagnon, P., Michaud, J., Mitchell, G., Mercier, J., Marion, J. F., Drouin, E., Rasquin-Weber, A., Hudson, T. J., and Richter, A. (2002) A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *Am J Hum Genet* **71**, 1443-1449
28. Freed, E. F., and Baserga, S. J. (2010) The C-terminus of Utp4, mutated in childhood cirrhosis, is essential for ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* **38**, 4798-4806
29. Wilkins, B. J., Lorent, K., Matthews, R. P., and Pack, M. (2013) p53-mediated biliary defects caused by knockdown of cirh1a, the zebrafish homolog of the gene responsible for North American Indian Childhood Cirrhosis. *PLoS One* **8**, e77670
30. Meyer, B., Wurm, J. P., Kotter, P., Leisegang, M. S., Schilling, V., Buchhaupt, M., Held, M., Bahr, U., Karas, M., Heckel, A., Bohnsack, M. T., Wohnert, J., and Entian, K. D. (2011) The Bowen-Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1)

- has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Psi1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic Acids Res* **39**, 1526-1537
31. Walne, A. J., Vulliamy, T., Marrone, A., Beswick, R., Kirwan, M., Masunari, Y., Al-Qurashi, F. H., Aljurf, M., and Dokal, I. (2007) Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* **16**, 1619-1629
 32. Vulliamy, T. J., and Dokal, I. (2008) Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex. *Biochimie* **90**, 122-130
 33. Ridanpaa, M., van Eenennaam, H., Pelin, K., Chadwick, R., Johnson, C., Yuan, B., van Venrooij, W., Pruijn, G., Salmela, R., Rockas, S., Makitie, O., Kaitila, I., and de la Chapelle, A. (2001) Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell* **104**, 195-203
 34. Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S., and Schmitt, M. E. (2004) RNase MRP cleaves the CLB2 mRNA to promote cell cycle progression: novel method of mRNA degradation. *Mol Cell Biol* **24**, 945-953
 35. Méndez-Godoy, A., Gijbers, A., and Sánchez-Puig, N. (2015) Biogénesis ribosomal y ribosomopatías. in *Mensaje Bioquímico* (A. Butanda, M. G. a. R. G. ed.), XXXIX Ed., Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp
 36. Narla, A., and Ebert, B. L. (2010) Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* **115**, 3196-3205
 37. Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., and Hurt, E. (2013) Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J Cell Sci* **126**, 4815-4821
 38. Woolford, J. L., Jr., and Baserga, S. J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**, 643-681
 39. Ginzberg, H., Shin, J., Ellis, L., Goobie, S., Morrison, J., Corey, M., Durie, P. R., and Rommens, J. M. (2000) Segregation analysis in Shwachman-Diamond syndrome: evidence for recessive inheritance. *Am J Hum Genet* **66**, 1413-1416
 40. Minelli, A., Nicolis, E., Cannioto, Z., Longoni, D., Perobelli, S., Pasquali, F., Sainati, L., Poli, F., Cipolli, M., and Danesino, C. (2012) Incidence of Shwachman-Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer* **59**, 1334-1335
 41. Ginzberg, H., Shin, J., Ellis, L., Morrison, J., Ip, W., Dror, Y., Freedman, M., Heitlinger, L. A., Belt, M. A., Corey, M., Rommens, J. M., and Durie, P. R. (1999) Shwachman syndrome: phenotypic manifestations of sibling sets and isolated cases in a large patient cohort are similar. *J Pediatr* **135**, 81-88
 42. Dror, Y., and Freedman, M. H. (2002) Shwachman-diamond syndrome. *Br J Haematol* **118**, 701-713
 43. Dror, Y., Ginzberg, H., Dalal, I., Cherepanov, V., Downey, G., Durie, P., Roifman, C. M., and Freedman, M. H. (2001) Immune function in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* **114**, 712-717
 44. Department of Health and Human Services (2015) Leukemia - SEER Stat Fact Sheets. Government of United States of America. Available from: <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>>. [10 November 2015].
 45. Aggett, P. J., Cavanagh, N. P., Matthew, D. J., Pincott, J. R., Sutcliffe, J., and Harries, J. T. (1980) Shwachman's syndrome. A review of 21 cases. *Arch Dis Child* **55**, 331-347

46. Boocock, G. R., Morrison, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. R., and Rommens, J. M. (2003) Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* **33**, 97-101
47. Austin, K. M., Leary, R. J., and Shimamura, A. (2005) The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood* **106**, 1253-1258
48. Kuijpers, T. W., Alders, M., Tool, A. T., Mellink, C., Roos, D., and Hennekam, R. C. (2005) Hematologic abnormalities in Shwachman Diamond syndrome: lack of genotype-phenotype relationship. *Blood* **106**, 356-361
49. Finch, A. J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L. F., Goyenechea, B., Menne, T. F., Gonzalez Fernandez, A., Simpson, P., D'Santos, C. S., Arends, M. J., Donadieu, J., Bellanne-Chantelot, C., Costanzo, M., Boone, C., McKenzie, A. N., Freund, S. M., and Warren, A. J. (2011) Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev* **25**, 917-929
50. Boocock, G. R., Marit, M. R., and Rommens, J. M. (2006) Phylogeny, sequence conservation, and functional complementation of the SBDS protein family. *Genomics* **87**, 758-771
51. Shammas, C., Menne, T. F., Hilcenko, C., Michell, S. R., Goyenechea, B., Boocock, G. R., Durie, P. R., Rommens, J. M., and Warren, A. J. (2005) Structural and mutational analysis of the SBDS protein family. Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *J Biol Chem* **280**, 19221-19229
52. Savchenko, A., Krogan, N., Cort, J. R., Evdokimova, E., Lew, J. M., Yee, A. A., Sanchez-Pulido, L., Andrade, M. A., Bochkarev, A., Watson, J. D., Kennedy, M. A., Greenblatt, J., Hughes, T., Arrowsmith, C. H., Rommens, J. M., and Edwards, A. M. (2005) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *J Biol Chem* **280**, 19213-19220
53. Ng, C. L., Waterman, D. G., Koonin, E. V., Walters, A. D., Chong, J. P., Isupov, M. N., Lebedev, A. A., Bunka, D. H., Stockley, P. G., Ortiz-Lombardia, M., and Antson, A. A. (2009) Conformational flexibility and molecular interactions of an archaeal homologue of the Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein. *BMC Struct Biol* **9**, 32
54. Zhang, S., Shi, M., Hui, C. C., and Rommens, J. M. (2006) Loss of the mouse ortholog of the shwachman-diamond syndrome gene (*Sbds*) results in early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **26**, 6656-6663
55. Menne, T. F., Goyenechea, B., Sanchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Brost, R. L., Costanzo, M., Boone, C., and Warren, A. J. (2007) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* **39**, 486-495
56. Koonin, E. V., Wolf, Y. I., and Aravind, L. (2001) Prediction of the archaeal exosome and its connections with the proteasome and the translation and transcription machineries by a comparative-genomic approach. *Genome Res* **11**, 240-252
57. Ganapathi, K. A., Austin, K. M., Lee, C. S., Dias, A., Malsch, M. M., Reed, R., and Shimamura, A. (2007) The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood* **110**, 1458-1465
58. Wessels, D., Srikantha, T., Yi, S., Kuhl, S., Aravind, L., and Soll, D. R. (2006) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene encodes an RNA-binding

- protein that localizes to the pseudopod of Dictyostelium amoebae during chemotaxis. *J Cell Sci* **119**, 370-379
59. Ambekar, C., Das, B., Yeger, H., and Dror, Y. (2010) SBDS-deficiency results in deregulation of reactive oxygen species leading to increased cell death and decreased cell growth. *Pediatr Blood Cancer* **55**, 1138-1144
 60. Austin, K. M., Gupta, M. L., Jr., Coats, S. A., Tulpule, A., Mostoslavsky, G., Balazs, A. B., Mulligan, R. C., Daley, G., Pellman, D., and Shimamura, A. (2008) Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond syndrome. *J Clin Invest* **118**, 1511-1518
 61. Orelia, C., Verkuijlen, P., Geissler, J., van den Berg, T. K., and Kuijpers, T. W. (2009) SBDS expression and localization at the mitotic spindle in human myeloid progenitors. *PLoS One* **4**, e7084
 62. Henson, A. L., Moore, J. B. t., Alard, P., Wattenberg, M. M., Liu, J. M., and Ellis, S. R. (2013) Mitochondrial function is impaired in yeast and human cellular models of Shwachman Diamond syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **437**, 29-34
 63. Becam, A. M., Nasr, F., Racki, W. J., Zagulski, M., and Herbert, C. J. (2001) Rialp (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **266**, 454-462
 64. Senger, B., Lafontaine, D. L., Graindorge, J. S., Gadai, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J. M., Breitenbach, M., Hurt, E., and Fasiolo, F. (2001) The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell* **8**, 1363-1373
 65. Gijsbers, A., Garcia-Marquez, A., Luviano, A., and Sanchez-Puig, N. (2013) Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **437**, 349-354
 66. Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* **93**, 269-309
 67. Garcia-Marquez, A., Gijsbers, A., de la Mora, E., and Sanchez-Puig, N. (2015) Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *J Biol Chem* **290**, 17669-17678
 68. Traut, T. W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**, 1-22
 69. Wang, L., and Schultz, P. G. (2005) Expanding the genetic code. *Angew Chem Int Edit* **44**, 34-66
 70. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-2423
 71. CDNN courtesy of and written by Dr. Gerald Böhm, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, who has kindly agreed to let Applied Photophysics distribute the software.
 72. Lumio™Green Kit (2012) For specific and sensitive detection of Lumio™ fusion proteins. Life technologies.
 73. Méndez-Godoy, A. (2105) *Estudios de interacción entre las proteínas EFL1 y Sdo1 mediante doble híbrido en levadura*. Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Universidad Nacional Autónoma de México

74. Pham, N. D., Parker, R. B., and Kohler, J. J. (2013) Photocrosslinking approaches to interactome mapping. *Curr Opin Chem Biol* **17**, 90-101
75. Hashmi, S. K., Allen, C., Klaassen, R., Fernandez, C. V., Yanofsky, R., Shereck, E., Champagne, J., Silva, M., Lipton, J. H., Brossard, J., Samson, Y., Abish, S., Steele, M., Ali, K., Dower, N., Athale, U., Jardine, L., Hand, J. P., Beyene, J., and Dror, Y. (2011) Comparative analysis of Shwachman-Diamond syndrome to other inherited bone marrow failure syndromes and genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* **79**, 448-458
76. Shröder, G. (2004) *Simulation of Fluorescence Spectroscopy Experiments*. Doktorgrades, Georg-August-Universität
77. Whitty, A. (2008) Cooperativity and biological complexity. *Nat Chem Biol* **4**, 435-439
78. Tria, G., Mertens, H. D., Kachala, M., and Svergun, D. I. (2015) Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering. *IUCrJ* **2**, 207-217
79. Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D., Konarev, P. V., and Svergun, D. I. (2012) New developments in the program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **45**, 342-350
80. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., Jeffries, C. M., Franke, D., Mark, D., Zengerle, R., Cipriani, F., Fiedler, S., Roessle, M., and Svergun, D. I. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J Appl Crystallogr* **48**, 431-443
81. Makitie, O., Ellis, L., Durie, P. R., Morrison, J. A., Sochett, E. B., Rommens, J. M., and Cole, W. G. (2004) Skeletal phenotype in patients with Shwachman-Diamond syndrome and mutations in SBDS. *Clin Genet* **65**, 101-112
82. Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., and Ruggero, D. (2006) Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* **312**, 902-906
83. Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011) Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**, 383-397
84. Warner, J. R., and McIntosh, K. B. (2009) How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* **34**, 3-11
85. Lopes, A. M., Miguel, R. N., Sargent, C. A., Ellis, P. J., Amorim, A., and Affara, N. A. (2010) The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC Mol Biol* **11**, 33
86. Armistead, J., and Triggs-Raine, B. (2014) Diverse diseases from a ubiquitous process: The ribosomopathy paradox. *Febs Lett* **588**, 1491-1500
87. Nakashima, E., Mabuchi, A., Makita, Y., Masuno, M., Ohashi, H., Nishimura, G., and Ikegawa, S. (2004) Novel SBDS mutations caused by gene conversion in Japanese patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Hum Genet* **114**, 345-348
88. Costa, E., and Santos, R. (2008) Hematologically important mutations: Shwachman-Diamond syndrome. *Blood Cells Mol Dis* **40**, 183-184
89. Taneichi, H., Kanegane, H., Futatani, T., Otsubo, K., Nomura, K., Sato, Y., Hama, A., Kojima, S., Kohdera, U., Nakano, T., Hori, H., Kawashima, H.,

- Inoh, Y., Kamizono, J., Adachi, N., Osugi, Y., Mizuno, H., Hotta, N., Yoneyama, H., Nakashima, E., Ikegawa, S., and Miyawaki, T. (2006) Clinical and genetic analyses of presumed Shwachman-Diamond syndrome in Japan. *Int J Hematol* **84**, 60-62
90. Nicolis, E., Bonizzato, A., Assael, B. M., and Cipolli, M. (2005) Identification of novel mutations in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Hum Mutat* **25**, 410
91. Horne, G. A., and Chevassut, T. (2012) Pregnancy in Shwachman-Diamond syndrome: a novel genetic mutation with minimal consequence. *BMJ Case Rep* **2012**
92. Carvalho, C. M., Zuccherato, L. W., Williams, C. L., Neill, N. J., Murdock, D. R., Bainbridge, M., Jhangiani, S. N., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ip, W., Guillerman, R. P., Lupski, J. R., and Bertuch, A. A. (2014) Structural variation and missense mutation in SBDS associated with Shwachman-Diamond syndrome. *BMC Med Genet* **15**, 64
93. Erdos, M., Alapi, K., Balogh, I., Oroszlan, G., Rakoczi, E., Sumegi, J., and Marodi, L. (2006) Severe Shwachman-Diamond syndrome phenotype caused by compound heterozygous missense mutations in the SBDS gene. *Exp Hematol* **34**, 1517-1521

APÉNDICE

Tabla 11. Mutaciones asociadas con el Síndrome Shwachman-Diamond.

Mutaciones silenciosas			
Sustitución en DNA			Referencia bibliográfica
141C→T			(87)
201A→G			(46)
Mutaciones sin sentido o cambio en el marco de lectura			
Sustitución en DNA	Sustitución en el otro alelo	Sustitución en proteína	Referencia bibliográfica
96-97insA	ND	N34fsX15	(46)
119delG	258+2T→C	S34fsX17	(46,81)
123delC	258+2T→C	S41fsX17	(51)
183-184TA→CT	258+2T→C	K62X	(46)
258+2T→C modifica el sitio de empalme alternativo en el intrón 2	Homocigoto 258+2T→C Heterocigoto compuesto 183-184TA→CT (p.K62X) 505C→T (p.R169C) 258+374_459+250del 95A→F (p.Y32C)	C84fsX3	(46)
258+1G→C	258+2T→C	C84fsX3	(46)
258+374-459+250del deleción interna del polipéptido que elimina el dominio 2 y parte del dominio 1	258+2T→C	I87-Q153del	(88)

259-1G→A mutación en el sitio aceptor de empalme del exón 3	258+2T→C	ND	(89)
279_284delTCAAAGT	258+2T→C	Q94_V95del	(51)
291-293TAAdelinsAGTTCAAGTATC	ND	D97-K98delinsEVQVS	(46)
292-295delAAAAG	258+2T→C	E99fsX20	(87)
307-308delCA	201A→G;258+2T→C	Q103fsX8	(90)
624+1G→C mutación en el sitio de empalme del intrón 4	ND	ND	(90)
652C→T	258+2T→C	R218X	(90)
Mutación con cambio de aminoácido o contrasentido			
Sustitución en DNA	Sustitución en el otro alelo	Sustitución en proteína	Referencia bibliográfica
24C→A	ND	N8K	(46)
32G→A + 35T→C	258+2T→C	R11H + L12P	(91)
56G→A	258+2T→C	R19Q	(51)
93C→G	258+2T→C	C31W	(51)
95A→G	258+2T→C	Y32C	(90)
97A→G	258+2T→C	K33E	(51)
98A→C	Variación estructural en el locus <i>SBDS</i>	K33T	(92)
101A→T	258+2T→C	N34I	(51)
131A→G	258+2T→C	E44G	(46,81)
199A→G	ND	K67E	(46)
212T→C	258+2T→C	L71P	(51)
250T→C	258+2T→C	C84R	(48)
260T→G	ND	I87S	(46)
260 T→C	258+2T→C	I87T	(81)
354A→C	183-184TA→CT (K62X)	K118N	(51)
362A→C	523C→T (R175W)	N121T	(93)

377G→C	ND	R126T	(46)
428C→G	258+2T→C	S143W	(89)
428C→T + 443A→G	258+2T→C	S143L + K148R	(51)
458A→G	258+2T→C	Q153R	(51)
505C→T	ND	R169C	(46)
506G→T	258+2 T→C	R169L	(51)
523C→T	362A→C (N121T)	R175W	(93)
635T→C	ND	I212T	(46)

ND-No determinado, en el trabajo de Boocock y colaboradores (46) no se presenta la información desglosada de cada mutación.

Adicionalmente Finch y colaboradores (49) reportan como comunicación personal de otros autores las siguientes mutaciones puntuales: P6L, C119Y, C119R, T129A, K151N, R169L, R218Q, A154V y A30S.