



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**FUNCIÓN DE LAS MUTACIONES EN SDO1 QUE RESCATAN ALTERACIONES
EN LA PROTEÍNA RPL10**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MARÍA ISABEL MARTÍNEZ ÁNGELES

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE 2020



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. José Federico del Rio Portilla	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Carmen Nina Pastor Colón	UAE Morelos
Vocal	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio 7 del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutela de la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo a la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Así como al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría (Número de CVU 719283). Al financiamiento otorgado en el proyecto CONACyT 283909 “*Escrutinio de moléculas orgánicas pequeñas contra la GTPasa EFL1 como blanco en el Síndrome Shwachman-Diamond*” para la realización de este trabajo. Por otro lado, se agradece al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química de la UNAM por el uso del espectropolarímetro JASCO J-1500 para la realización de los estudios de dicroísmo circular. Además, al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco por el apoyo para la realización de los estudios de anisotropía de fluorescencia en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM. Por otro lado, agradezco al Dr. Arlen Johnson de la Universidad de Austin-Texas por la colaboración para este trabajo de investigación, Finalmente, se agradece a la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig por la asesoría y el patrocinio en la investigación para poder llevar a cabo este trabajo.

DEDICATORIAS

El presente trabajo lo dedico con mucho cariño,

A Alejandra Ángeles y Juan Martínez, por el amor, el apoyo, las enseñanzas y la confianza que me han brindaron durante este tiempo. Gracias por tomar mi mano y acompañarme en el viaje de la vida, han sido mi soporte e inspiración para perseguir mis sueños, gracias por ser mis padres.

A Rodolfo Martínez y Juan Carlos Martínez, que me han dado los mejores ejemplos de fortaleza, hermandad, carácter y sobre todo de perseverancia. Gracias por siempre cuidar de mí.

A Alix, Karla, Elena y Eris, que me impulsan a dar lo mejor de mí para ser el mejor ejemplo para ustedes, las mujeres del mañana. A Yaya, por animarme siempre y ser una parte fundamental de mi familia.

A Ernesto Cázares, por todo el amor, el apoyo y la confianza que me has brindado. Gracias por ser mi compañero de vida, de sueños, de sonrisas, de fracasos y de éxitos. Porque hay una cosa que todos buscan y nosotros la encontramos. Juntos, rumbo al infinito.

A Martha Vargas y Vicente Cázares, por el apoyo y la confianza que me han brindado.

A las Dra. Mary Rosales, Mayra Cuellar y Nuria Sánchez, extraordinarias científicas quienes aprecio y admiro, a las cuales agradezco ser mis mentoras, mis amigas y mi inspiración en el camino de la vida y de la ciencia.

A Diana carolina, Fabiola, Nancy, Juliana, Samantha, Leidi, Diana y Lore, por ser parte de mi historia, de mis alegrías y de mis momentos de sollozo, nuestra amistad perdurará en nuestros corazones.

A Carlos Cal, Josh, Erick Gustavo, David, Carlos Calcines, Arnulfo, Jesús, Eddie y Juan Carlos, que bastó sólo un saludo para encontrar a grandes amigos. Aristóteles explica la amistad como una virtud en su frase "Sin amigos nadie querría vivir. Aunque poseyera los demás bienes, porque la prosperidad no sirve de nada si se está privado de la posibilidad de hacer el bien, la cual se ejercita, sobre todo, respecto de los amigos", con la que me identifico, gracias por todo amigos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

1. ESTADO DEL ARTE _____	1
1.1. El ribosoma _____	1
1.2. Biogénesis ribosomal _____	2
1.3. Ribosomopatías _____	5
1.3.1. Síndrome de Shwachman-Diamond _____	6
1.3.2. Ribosomopatía causada por la disfunción de RPL10 _____	7
1.4. Último paso de maduración citoplasmática de la subunidad 60S _____	8
1.4.1. SBDS Y EFL1 _____	10
1.4.2. Ensamblaje del tallo P _____	10
1.5. Análisis de interacciones proteína-ligando por anisotropía de fluorescencia 13	
1.5.1. Análisis de datos _____	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS _____	22
2.1. Planteamiento del problema _____	22
2.2. Objetivos _____	23
2.2.1. Objetivo general _____	23
2.2.2. Objetivos particulares _____	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS _____	24
3.1. Amplificación y purificación de los vectores de interés _____	24
3.1.1. Características de los plásmidos que presentan las secuencias génicas de las proteínas recombinantes _____	24
3.1.2. Cepa de <i>Escherichia coli</i> C41 (DE3) _____	26
3.1.3. Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BCY123 _____	27
3.1.4. Mutagénesis sitio-específica en el vector de expresión de la proteína Sdo1 silvestre _____	27
3.1.5. Transformación de DNA plasmídico en células bacterianas _____	30
3.1.6. Aislamiento de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina _____	31
3.1.7. Restricción del DNA plasmídico con la enzima de restricción <i>Xba</i> I _____	32

3.1.8.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa _____	32
3.1.9.	Transformación de DNA plasmídico en levadura _____	33
3.2.	Expresión de las proteínas recombinantes _____	34
3.2.1.	Expresión de las proteínas recombinantes Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH _____	34
3.2.2.	Expresión de la proteína recombinante scEFL1 _____	35
3.3.	Purificación de las proteínas recombinantes _____	35
3.3.1.	Lisis bacteriana mediante sonicación _____	35
3.3.2.	Purificación de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes _____	36
3.3.3.	Lisis de células de levadura mediante fricción _____	38
3.3.4.	Purificación de la proteína scEFL1 _____	39
3.4.	Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE	40
3.5.	Cuantificación de la concentración de proteínas _____	42
3.6.	Caracterización estructural de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH por dicroísmo circular (DC) _____	43
3.6.1.	Análisis de la estabilidad térmica de las proteínas por DC _____	44
3.6.2.	Determinación de la reversibilidad del proceso de desnaturización térmica _____	44
3.7.	Estudios de unión de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes con scEFL1 por anisotropía de fluorescencia _____	45
3.7.1.	Marcaje con el reactivo Lumio™Green _____	45
3.7.2.	Experimentos de anisotropía de fluorescencia _____	46
4.	RESULTADOS _____	48
4.1.	Construcción de los vectores de expresión para las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH _____	48
4.2.	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes _____	51
4.2.1.	Expresión y purificación de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes _____	51
4.2.2.	Expresión y purificación de la proteína scEFL1 _____	53

4.3. Caracterización estructural de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y mutantes mediante dicroísmo circular _____	54
4.3.1. Análisis de estabilidad térmica de las proteínas por CD _____	57
4.3.2. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas a 20 °C después de la desnaturalización térmica _____	59
4.4. Interacción de Sdo1-FIAsh silvestre y mutantes con scEFL1 mediante anisotropía de fluorescencia _____	61
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS _____	66
6. CONCLUSIONES _____	69
7. PERSPECTIVAS _____	70
ANEXOS	
BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Å	Ángstrom
aa	Aminoácido
AFs	Factores de ensamblaje del inglés assembly factors
AML	Leucemia mieloide aguda del inglés acute myeloid leukemia
cDNA	DNA complementario
cm	Centímetros
CV	Volúmenes de columna del inglés column volumen
DBA	Anemia de Diamond-Blackfan del inglés Diamond Blackfan Anemia
DC	Dicroísmo circular
DNA	Ácido desoxirribonucleico del inglés deoxyribonucleic acid
E	Ácido glutámico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético del inglés ethylenediaminetetraacetic acid
EF-2	Factor de elongación 2 del inglés elongation factor 2
EF-G	Del inglés elongation factor G
EFL1	Proteína tipo factor de elongación 1 del inglés elongation factor- like 1
eIF6	Factor de iniciación eucarionte 6 del inglés eukaryotic initiation factor 6
FIAsh	Fluorescein Arsenical Hairpin binding
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
H69	Hélice 69
H93	Hélice 93

hsEFL1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor-like 1” de <i>Homo sapiens</i>
HSQC	Espectroscopia de correlación cuántica única heteronuclear del inglés heteronuclear simple quantum correlation
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
<i>K</i>	Constante de asociación
<i>K_d</i>	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero del inglés messenger ribonucleic acid
MRW	Peso medio de los residuos del inglés mean residue weight.
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
Nmd3	Del inglés Nonsense mediated mRNA decay 3
OD _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
OMIM	Herencia Mendeliana en el Hombre
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa del inglés polymerase chain reaction
PDB	Base de Datos de Proteínas del inglés protein data bank
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pre-rRNPs	Pre-ribonucleoproteínas
PSA	Persulfato de amonio
PTC	Centro peptidil transferasa del inglés peptidyltransferase center
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosomal del inglés ribosomal deoxyribonucleic acid
Rf	Movilidad electroforética

RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico del inglés ribonucleic acid
RPL10	Proteína ribosomal L10 del inglés ribosomal protein L10
RPL10 S104D	Mutación S104D en el asa-P de RPL10
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal del inglés ribosomal ribonucleic acid
s	Segundo
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAXS	Dispersión de rayos X en ángulo bajo del inglés Small Angle X-ray Scattering
SBDS	Proteína mutada en el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond del inglés Shwachman-Bodian-Diamond syndrome (o también llamado SDS del inglés Shwachman-Diamond syndrome)
scEFL1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor-like 1” de <i>S. cerevisiae</i>
SDM	Mutagénesis sitio-específica del inglés Site-directed mutagenesis
Sdo1	Ortólogo en levadura de la proteína SBDS
Sdo1 K175E	Mutación K175E en Sdo1
Sdo1 P144R	Mutación P144R en Sdo1
Sdo1 V36A	Mutación V36A en Sdo1
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida
SD-URA	Medio Synthetic Drop-out sin uracilo
snoRNAs	RNAs nucleolares pequeños del inglés small nucleolar RNAs
snRNPs	Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas del inglés small nuclear ribonucleoproteins
SRL	Asa sarcina-ricina del inglés Sarcin-Ricin Loop
SRP54	Partícula de reconocimiento de señal 54 de inglés Signal Recognition Particle 54
T-ALL	Leucemia linfoblástica aguda de células T del inglés T-cell acute lymphocytic leukemia

TEMED	Tetrametilendiamina
Tif6	Ortólogo en levadura de la proteína eIF6
Tm	Temperatura de desnaturalización del inglés Temperature of Melting
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia del inglés transfer ribonucleic acid
UV	Ultravioleta
WT	Silvestre del inglés Wild Type

RESUMEN

Los ribosomas son las máquinas moleculares encargadas de la síntesis de proteínas en las células mediante un proceso bioquímico complejo y altamente regulado denominado traducción. Defectos en el ensamblaje de los ribosomas causan un subconjunto heterogéneo de enfermedades, nombradas como ribosomopatías. En *Saccharomyces cerevisiae*, el último paso de la maduración citoplasmática de la subunidad ribosomal mayor requiere de la liberación del factor de iniciación eucarionte 6 (eIF6 del inglés eukaryotic initiation factor 6, o su ortólogo en levadura Tif6) de su superficie. Este paso es desencadenado por la acción conjunta de la proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS del inglés Shwachman-Bodian-Diamond syndrome, o su ortólogo en levadura Sdo1), y la proteína tipo factor de elongación 1 (EFL1 por sus siglas en inglés Elongation Factor Like 1). Por esta razón, mutaciones bialélicas en el gen de SBDS o en el gen de EFL1 causan el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS del inglés Shwachman-Bodian-Diamond syndrome o también llamado SDS del inglés Shwachman-Diamond syndrome), debido a que se interrumpen la liberación de eIF6 de las subunidades pre-60S. Por otra parte, el asa-P de la proteína ribosomal L10 (RPL10 del inglés ribosomal protein L10) es también necesaria para la activación de EFL1 y la subsecuente liberación de eIF6/Tif6. En previos estudios, mutaciones en el asa-P de la proteína ribosomal RPL10, impiden la liberación de eIF6/Tif6. Algunas de estas mutaciones se han identificaron como mutaciones con una alta probabilidad de desarrollar leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL).

Johnson, A. y colaboradores¹⁰ identificaron una clase de mutaciones dentro del asa-P de RPL10 que impiden la liberación de Tif6, afectando así la biogénesis de la subunidad 60S. Las mutantes incluidas en esta clase son RPL10 S104D, C105G y A106R. La mutación RPL10 S104D presentó el fenotipo más fuerte de esta clase. Sin embargo, este defecto es corregido a su vez por mutaciones supresoras en Tif6 y en EFL1, que se predice desestabilizan interacciones intra-dominio facilitando el cambio conformacional necesario para la liberación de Tif6. Datos preliminares en colaboración con el Dr. Arlen Johnson, University of Texas-Austin, sugieren que mutaciones supresoras en Sdo1 (ortólogo en levadura de SBDS) también son capaces de revertir el defecto observado por la mutación S104D, antes mencionada,

en el asa-P de RPL10. La mutante RPL10 S104D inhibe específicamente la liberación de Tif6, a lo que se cree que es resultado de una unión defectuosa de Sdo1, a la subunidad 60S. Este grupo de trabajo identificó un total de 8 alelos independientes de Sdo1 que suprimen el defecto de crecimiento de RPL10 S104D; Sdo1 V36A, K62R, K106R, E110G, I114R, P144R, K175E Y V238I.¹³ En este trabajo de investigación, se seleccionaron tres de estas mutantes supresoras: Sdo1 V36A (dominio I), P144R (dominio II) y K175E (dominio III), para su estudio, con el fin de entender la función de las mutaciones de Sdo1 capaces de aliviar el lento crecimiento observado en células de levadura con mutaciones en el asa-P de RPL10. Para comprender el efecto de estas mutaciones a nivel molecular, se evaluaron cambios estructurales y de estabilidad térmica en las mutantes supresoras de Sdo1 mediante dicróismo circular. Además, se evaluó la interacción entre estas mutantes supresoras con scEFL1 mediante anisotropía de fluorescencia. La interacción entre las mutantes supresoras con scEFL1 se describió como una unión a dos sitios distintos con cooperatividad positiva. Los resultados mostraron una disminución de la afinidad de las mutantes por scEFL1 aproximadamente en un orden de magnitud. Con base en los resultados obtenidos, se propone que el mecanismo que siguen las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E para rescatar el lento crecimiento provocado por la mutación S104D en el asa-P de RPL10 es desestabilizando las interacciones intra-dominio entre Sdo1 y scEFL1 facilitando así el cambio conformacional para la liberación de Tif6.

CAPÍTULO 1

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. El ribosoma

Los ribosomas son las máquinas moleculares que producen todas las proteínas celulares mediante un proceso bioquímico complejo y altamente regulado denominado traducción.¹ La formación correcta del ribosoma es esencial para la síntesis de proteínas en las células.² Los ribosomas constan de un núcleo universalmente conservado que se describió por primera vez a detalle a partir de estructuras cristalinas de los ribosomas procariotas. Está conformado por el centro peptidil transferasa (PTC) que cataliza la formación de enlaces peptídicos, el túnel polipeptídico por donde los péptidos nacientes salen del ribosoma y el centro de decodificación que decodifica el ARNm. Sin embargo, las células eucariotas y procariotas difieren notablemente en otros procesos de la traducción, especialmente en el inicio de esta. Los ribosomas eucariotas son al menos un 40% más grandes y complejos que sus contrapartes procariotas debido a elementos adicionales de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) llamados segmentos de expansión, proteínas ribosomales adicionales e inserciones en proteínas existentes. Todos los ribosomas constan de dos subunidades, ambas compuestas por ARNr y proteínas ribosomales (r-proteínas). El ribosoma eucariota 80S (**figura 1**) consta de una subunidad menor 40S (SSU) y una subunidad mayor 60S (LSU). La subunidad 40S consta de un ARNr 18S y 33 r-proteínas diferentes (en la SSU las r-proteínas se denominan Rps). En cambio, la subunidad 60S consta de ARNr 25S (en levadura/28S en humano), 5.8S y 5S junto con 46 r-proteínas en levadura y 47 r-proteínas en humano (en la LSU las r-proteínas se denominan Rpl). Por otro lado, el ribosoma procariota 70S consta de una subunidad menor 30S y una subunidad mayor 50S. La subunidad 30S consta de un ARNr 16S y 21 r-proteínas. Por otro lado, la subunidad 50S consta de ARNr 23S y 5S junto con 34 r-proteínas.^{1,2,14-17} Durante la síntesis de proteínas, la SSU funciona como centro de decodificación para unir el ARNm y los ARN de transferencia aminoacilados. Mientras que la LSU es donde se produce la reacción de la peptidiltransferasa para catalizar la formación de enlaces peptídicos.^{15,18} En el dominio Eukarya, la variabilidad más notable se encuentra en ciertos segmentos de expansión de ARNr, mientras que, en los componentes proteicos de los ribosomas,

desde la levadura, hasta el ser humano, son muy similares³. Las estructuras de los ribosomas eucariotas y procariotas obtenidas por Difracción de Rayos-X y Criomicroscopía Electrónica de los ribosomas eucariotas y procariotas han proporcionado una gran cantidad de información sobre el orden temporal, la distribución y las funciones moleculares de muchos factores de ensamblaje, de r-proteínas y de ARNr. Sin embargo, todavía hay mucha información por conocer de dichos ribosomas.^{3,5,14}

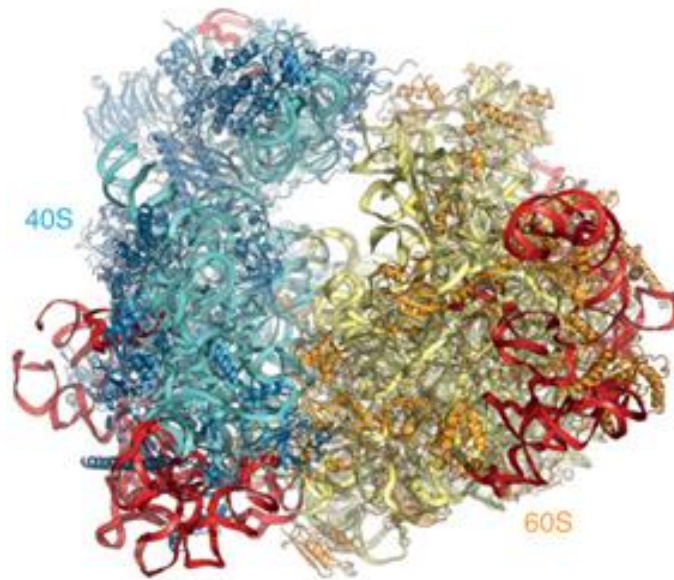


Figura 1. Estructura del ribosoma eucariota (80S) de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida por Ben-Shem, A. y colaboradores¹⁹ a una resolución de 3 Å por difracción de rayos X (PDB:4V88).

1.2. Biogénesis ribosomal

Los ribosomas se ensamblan de forma jerárquica durante un proceso denominado biogénesis ribosomal. Históricamente, los enfoques bioquímicos y de biología molecular han revelado cómo las partículas preribosomales se forman y maduran en pasos consecutivos, comenzando en el nucleolo y terminando después de la exportación nuclear al citoplasma.³ La síntesis y maduración de las subunidades ribosomales eucariotas es un proceso complejo, multidimensional y que consume energía. Además, requiere ~80 de RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs del inglés small nucleolar RNAs), ~200 factores de ensamblaje conservados (AFs del inglés assembly factors) y las tres RNA polimerasas. La RNA polimerasa II genera ARNm de las proteínas ribosomales y factores de ensamblaje, mientras que las

RNA polimerasas I y III transcriben precursores de RNA ribosomal (rRNA) a partir del loci de DNA ribosomal. En levadura, la RNA polimerasa I sintetiza el pre-rRNA 35S, que contiene rRNA de SSU (rRNA 18S), así como de LSU (rRNA 5.8S y 25S) separados por varios espaciadores transcritos externos e internos (5' ETS, ITS1, ITS2, 3' ETS). EL pre-rRNA 35S sufre reacciones de metilación y pseudouridilación co-transcripcionales catalizadas por ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snRNPs del inglés small nuclear ribonucleoproteins) y se asocia con muchos factores de ensamblaje y proteínas ribosomales estructurales (principalmente de SSU) para formar la partícula pre-90S. Posteriormente, el procesamiento del pre-ARNr implica una serie de eventos de endo- y exonucleasas para eliminar los rRNA espaciadores transcritos externos e internos. Los eventos de escisión dentro de ITS1 (ente los ARNr 18S y 5.8S) en el sitio A2 conduce a la formación de las partículas pre-40S y pre-60S. Mientras que el procesamiento co-transcripcional del pre-rRNA 35S está asociado con la escisión del RNA en el sitio A2, el procesamiento postranscripcional se produce mediante la escisión del RNA en el sitio A3. En paralelo, la RNA polimerasa III transcribe el rRNA 5S que luego pasa a formar parte de la subunidad pre-60S. Después de la separación de la partícula 90S en una partícula pre-60S y una pre-40S, los dos precursores continúan vías de biogénesis y exportación independientes (**figura 2**).^{1,16,20}

La maduración final de las subunidades se produce en el citoplasma. Varios factores de ensamblaje y factores de exportación asociados con las partículas pre-60S y pre-40S se liberan antes de que las subunidades alcancen la competencia de traducción. Además, los pasos finales del procesamiento del rRNA ocurren en el citoplasma. Estos incluyen el "corte" final del extremo 3' del rRNA 5.8S en la subunidad 60S, además de la dimetilación y escisión del pre- rRNA 20S para producir rRNA 18S maduro en la subunidad 40S.¹⁶

Más de 2000 ribosomas se ensamblan cada minuto en una célula de levadura de rápido crecimiento. La síntesis de ribosomas también está sujeta a una inspección rigurosa en células eucariotas y procariontas. Se han desarrollado elaborados mecanismos para monitorear la calidad de los ribosomas nacientes para su correcto ensamblaje. Este control de calidad está acoplado a la exportación nuclear de pre-ribonucleoproteínas (pre-rRNPs) e incluye notablemente la prueba de ribosomas

citoplasmáticos “inmaduros” para un ensamblaje adecuado, inmediatamente antes de los últimos pasos de construcción de las subunidades.¹⁵

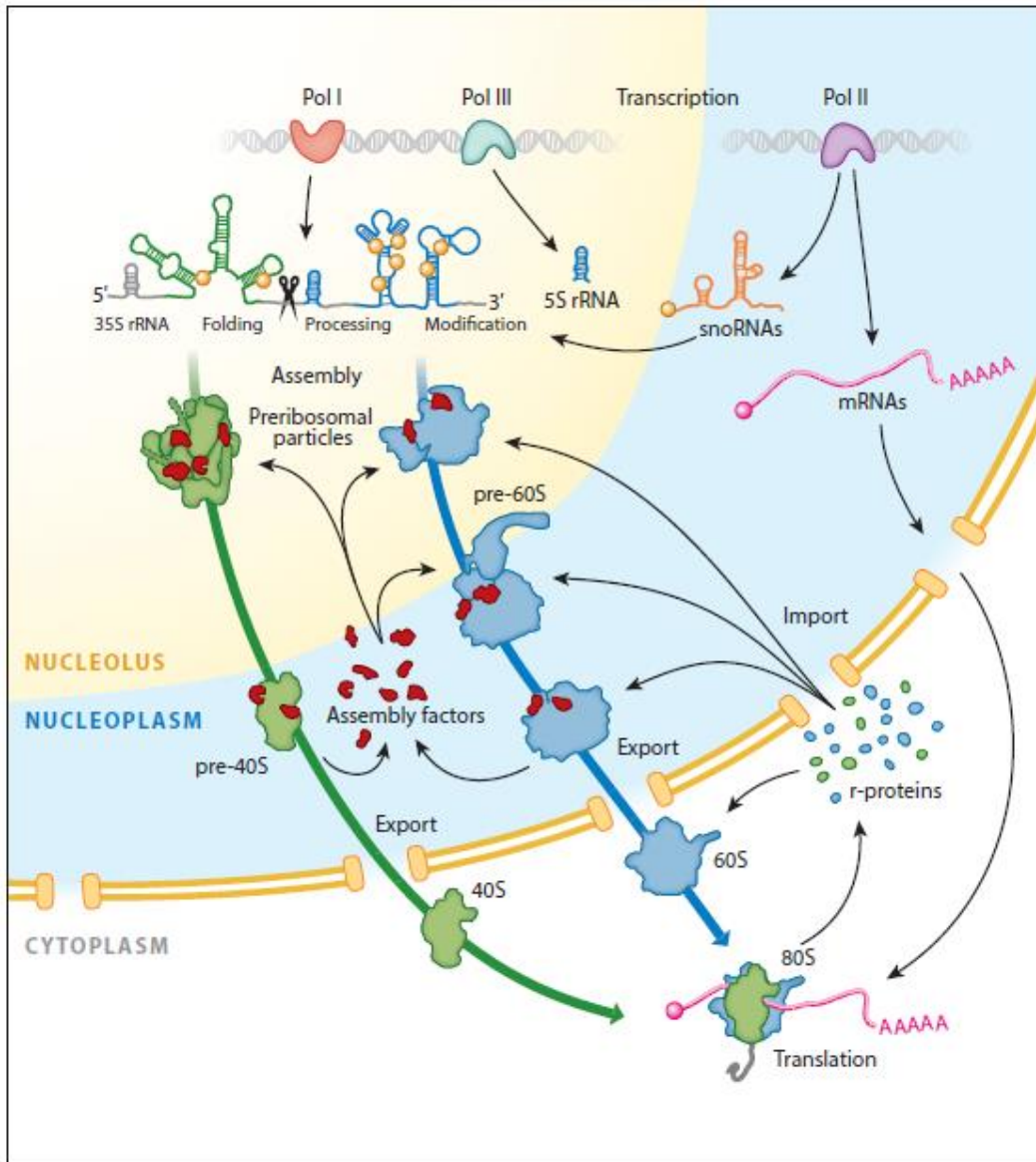


Figura 2. Descripción general del proceso de ensamblaje del ribosoma eucariota. El ensamblaje del ribosoma requiere las tres RNA polimerasas: Pol I que sintetiza el precursor del rRNA 35S, Pol III que sintetiza el rRNA 5S y Pol II que sintetiza snoRNAs y mRNA de proteínas ribosomales, que también codifican las proteínas ribosomales (r-proteínas). Durante la transcripción, el pre-rRNA se pliega, se procesa nucleolíticamente y se modifica (p. Ej., metilado o pseudouridinilado). Ya en esta etapa temprana, los factores de ensamblaje de ribosomas y las r-proteínas se ensamblan con el pre-rRNA naciente para formar partículas preribosomales que, posteriormente, atraviesan por más etapas de maduración, pasando así desde el nucleolo y a través del nucleoplasma al citoplasma, donde las subunidades maduras 60S y 40S se unen para formar a los ribosomas 80S, que traducen los mRNA en proteínas.¹

1.3. Ribosomopatías

El ensamblaje de ribosomas es el proceso que más consume energía en una célula en crecimiento, y que requiere una amplia regulación y coordinación con otras vías celulares.¹ La importancia de obtener una comprensión integral del ensamblaje de ribosomas ha sido impulsada principalmente por el reconocimiento de una familia de enfermedades, denominadas como ribosomopatías. Las ribosomopatías son un subconjunto diverso de enfermedades causadas por defectos en el ensamblaje de los ribosomas; entre ellas una expresión reducida o mutaciones en genes que codifican r-proteínas, factores de ensamblaje o componentes de la maquinaria de transcripción del rDNA. Aunque todas las ribosomopatías comparten defectos en la producción de ribosomas, no todas son causadas por defectos en el mismo paso del proceso.^{4,5}

Cuando se descubrió por primera vez que las dificultades en la producción de ribosomas podían conducir al síndrome de insuficiencia de médula ósea, comúnmente llamada como anemia de Diamond-Blackfan (DBA del inglés Diamond Blackfan Anemia)⁴, no estaba claro cómo un defecto en el proceso ubicuo de fabricación de ribosomas podría conducir a una enfermedad tejido-específico. Desde entonces, se han identificado nuevas ribosomopatías, cada una con manifestaciones específicas de tejido.²¹ La diversidad de presentaciones clínicas de las ribosomopatías hace que sea difícil unificarlas. Sin embargo, la mayoría comparten características clínicas comunes que incluyen insuficiencia de la médula ósea, retraso mental, anomalías esqueléticas y cutáneas y algunas, pero no todas, predisposición al desarrollo de cáncer.^{5,21,22} Las variaciones en la composición de los ribosomas entre diferentes tipos de células y/o en diferentes tejidos conducen a una traducción especializada; las mutaciones que disminuyen los niveles de proteínas ribosomales específicas o deterioran la maquinaria de modificación del rRNA pueden, por tanto, reducir o alterar la producción de proteínas particularmente requeridas en ciertos tipos de células, induciendo así el fenotipo de la enfermedad. Otra posible base molecular de los defectos específicos de tejido observados en las ribosomopatías pueden ser las alteraciones en la traducción provocadas por la alta demanda de ribosomas en los tejidos de rápida proliferación.⁵

Con base en el conocimiento actual, Farley-Barnes, K. I. y colaboradores²² proponen la siguiente clasificación de las ribosomopatías por el paso en que se ve afectada la síntesis de los ribosomas. Ribosomopatías que resultan de defectos en (I) la transcripción y modificación del pre-rRNA, (II) el procesamiento de pre-rRNA y (III) en el ensamblaje de los ribosomas.²²

En las siguientes dos secciones se describirá brevemente cómo mutaciones en la proteína SBDS y RPL10 están involucradas en el desarrollo de ribosomopatías. Según la clasificación anterior estas pertenecen a las ribosomopatías que resultan de defectos en el ensamblaje de los ribosomas. Esto se debe, a que SBDS es un factor de ensamblaje que participa en el último paso de maduración citoplasmática de la subunidad pre-60S y RPL10 es una proteína ribosomal de la subunidad 60S.

1.3.1. Síndrome de Shwachman-Diamond

El síndrome de Shwachman-Diamond (SDS del inglés Shwachman-Diamond syndrome; OMIM 260400) es un trastorno autosómico recesivo²² causado en el 90 % por mutaciones bialélicas en el gen homónimo del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS). Sin embargo, aproximadamente el 10% de las personas con SDS carecen de mutaciones en el gen SBDS, por lo que se ha informado recientemente que otros genes, incluido el miembro C21 de la familia de proteínas de choque térmico DNAJ (DNAJC21), el tipo factor de elongación 1 (EFL1) y la partícula de reconocimiento de señal 54 (SRP54), también están asociados con un fenotipo similar al de SDS. Curiosamente, SBDS, DNAJC21, EFL1 y SRP54 están involucrados en la biogénesis del ribosoma. SBDS, a través de la interacción directa con EFL1, promueve la liberación del factor de iniciación eucariota 6 (eIF6) durante la maduración del ribosoma, DNAJC21 estabiliza el ribosoma 80S y SRP54 facilita el tráfico de proteínas. Estos hallazgos refuerzan el postulado de que SDS es una ribosomopatía.²³ SDS es una enfermedad multiorgánica caracterizada principalmente por insuficiencia de la médula ósea, malformaciones óseas (que incluyen condrodisplasia metafisaria, displasia de la caja torácica y osteopenia), disfunción hematológica, insuficiencia pancreática y trastornos cognitivos.^{21,23,24} Casi el 15-20% de los pacientes con SDS presentan síndrome mielodisplásico con alto riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda (AML).²³ Un desafío clave

que queda por resolver es explicar cómo las mutaciones que afectan la síntesis de proteínas en todas las células causan tales anomalías específicas de tejido.²¹ Desafortunadamente, además del trasplante de médula ósea, aún no se ha desarrollado una terapia basada en genes para el SDS.²³ Por lo tanto, es necesario aprovechar nuevos conocimientos mecánicos para desarrollar terapias novedosas que mejoren los resultados para los pacientes con SDS. Los datos registrados indican que el espectro fenotípico de esta rara enfermedad es amplio, con una prevalencia estimada de 1 en 77,000 nacimientos.²¹ La proteína SBDS funciona como un cofactor para EFL1 al liberar el factor anti-asociación eIF6 de la interfase de unión de la subunidad ribosomal pre-60S en el último paso de la maduración citoplásmica. Por esta razón, mutaciones bialélicas en el gen de SBDS⁷ o en el gen EFL1 causan SDS, debido a que se interrumpen la liberación de eIF6 de las subunidades pre-60S. En conclusión, SDS se ha definido como una ribosomopatía causada por la corrupción de un mecanismo fundamental conservado, que autoriza la entrada de la subunidad ribosomal mayor a la traducción.⁸

1.3.2. Ribosomopatía causada por la disfunción de RPL10

El gen RPL10 (OMIM # 312173) se encuentra en el cromosoma Xq28 y codifica para la proteína ribosomal L10 (RPL10 del inglés ribosomal protein L10 o uL16 según la nueva nomenclatura⁹), un componente multifuncional altamente conservado, desde la levadura hasta el ser humano, de la subunidad mayor (60S).²⁵ RPL10 es una proteína ribosomal que realiza una multitud de funciones asociadas a los ribosomas; entre ellas se encuentra la maduración de la subunidad mayor, la unión de las subunidades ribosomales y la expresión diferencial de mRNA.²⁵ Aunque, originalmente RPL10 se informó como un locus de susceptibilidad al autismo, publicaciones recientes han sugerido que las variantes patogénicas en RPL10 también pueden conferir un síndrome de ribosomopatía multisistémica. La característica común del fenotipo relacionado con mutaciones en RPL10 es la discapacidad intelectual o del desarrollo. Sin embargo, varios estudios han demostrado que las mutaciones en el extremo C-terminal de la proteína (L206M y H213Q) parecen estar asociadas con: la susceptibilidad al autismo y discapacidad intelectual de moderada a grave.²⁵ Por otro parte, las mutaciones en el extremo N-

terminal (A64V, K78E y G161S) dan lugar a un síndrome que incluye microcefalia, anomalías genitourinarias (como criptorquidia e hipospadias) y problemas neurológicos que incluyen convulsiones, hipotonía y ataxia con y sin atrofia cerebelosa.^{25,26} Ensayos genéticos, funcionales y bioquímicos combinados sugieren que la mutación sin sentido K78E causa defectos graves en la formación y función del cerebro, probablemente debido a defectos en la traducción masiva y el aumento de la apoptosis en el cerebro.²⁷ Además, mutaciones en RPL10, que se encuentran en el asa del sitio P, se han identificado como mutaciones con alta predisposición de desencadenar leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Las mutantes T-ALL, incluida la mutante RPL10-R98S, exhibe un gran defecto en la biogénesis de las subunidades en el que se bloquean la liberación de Tif6 y Nmd3. De manera similar, las mutaciones en el asa P de RPL10 (RPL10-S104) bloquean la liberación de Tif6 y Nmd3.¹⁰ Los defectos del desarrollo neurológico en humanos representan un grupo de trastornos clínicamente heterogéneo.²⁷ La frecuencia de mutaciones de RPL10 en trastornos del neurodesarrollo sigue siendo baja, sin embargo, están empezando a surgir temas fenotípicos comunes, así como la correlación genotipo-fenotipo específica de una mutación. La genética ribosomal y la contribución del ribosoma a los trastornos del neurodesarrollo es un campo que avanza rápidamente y RPL10 representa solo uno, de los muchos genes en la vía de la biogénesis del ribosoma, que pueden desempeñar un papel en el neurodesarrollo.²⁶

1.4. Último paso de maduración citoplasmática de la subunidad 60S

Después del preensamblaje en el núcleo, los precursores de las subunidades ribosómicas grandes 60S y pequeñas 40S se exportan al citoplasma, donde se completan los pasos finales de la maduración.²¹ La subunidad ribosomal mayor naciente (60S) se somete a una serie ordenada de pasos finales de maduración en el citoplasma antes de que sea competente para entrar en la traducción.²⁸ De manera similar, la subunidad 40S durante los pasos finales de maduración está sujeta a un paso de revisión final.²⁸ En *Saccharomyces cerevisiae*, el último paso de la maduración citoplasmática de la subunidad ribosomal mayor requiere de la liberación del factor de iniciación eucarionte 6 (eIF6, o su ortólogo en levadura Tif6) de su superficie. Esta proteína bloquea estéricamente la asociación prematura de

ambas subunidades dentro del núcleo al unirse a la superficie de la intersubunidad 60S en el puente B6, estableciendo contactos con el asa de sarcina-ricina (SRL del inglés Sarcin-Ricin Loop), uL14 y eL24 (nomenclatura unificada para proteínas ribosomales⁹) bloqueando así la unión de 40S.²⁸ Por lo tanto, su remoción es fundamental para permitir la formación de ribosomas (80S) traduccionalmente competentes. Este paso es desencadenado por la acción conjunta de la proteína mutada en el síndrome de Shwachman-Diamond, SBDS (o su ortólogo en levadura Sdo1), y la GTPasa EFL1 (por sus siglas en inglés Elongation Factor Like 1).^{6,7}

La liberación de eIF6 requiere de un cambio conformacional en EFL1, quien compite por un sitio común con eIF6 favoreciendo su liberación.^{7,28} Este mecanismo de liberación inicia cuando la proteína SBDS (estado cerrado) se recluta en una subunidad citoplasmática inmadura, pre-60S cargada con eIF6, después del ensamblaje de la base del tallo P y el reclutamiento de RPL10 (uL16). Posteriormente, EFL1 se une al centro asociado de GTPasas, en contacto directo con SBDS y eIF6, en un estado de unión a GTP inactivo y de baja afinidad. Compitiendo con SBDS por un sitio de unión superpuesto, el dominio V de EFL1 promueve un desplazamiento rotacional de 180 ° del dominio III de SBDS desde la base del tallo P (estado cerrado) hacia la hélice 69 (estado abierto), lo que hace que la proteína SBDS adopte una conformación que es estabilizada por interacciones entre los residuos de SBDS K151 y R218 y la hélice 69. Continuamente, en el estado abierto, SBDS impulsa el equilibrio de EFL1 unido a GTP hacia una conformación unida a SRL activa de alta afinidad (acomodada) que compite con eIF6 por un sitio de unión superpuesto en la SRL y promueve el desplazamiento de eIF6 de la subunidad 60S. En el paso final del ciclo catalítico, la interacción de EFL1 con SRL promueve la hidrólisis de GTP, cambiando así el equilibrio conformacional de EFL1 de un estado de unión a ribosoma de alta a baja afinidad y promoviendo la disociación, tanto de EFL1 como de SBDS, de la subunidad 60S. La maduración del ribosoma eucariota es similar estructuralmente al reciclaje del ribosoma procarriota.²⁸ La imposibilidad de liberar a eIF6 por EFL1 y SBDS es la principal alteración molecular en el síndrome de Shwachman-Diamond.⁷ Adicionalmente, SBDS y EFL1 también se encargan de evaluar el correcto ensamblaje de estructuras funcionalmente importantes del ribosoma durante la traducción. SBDS

evalúa la integridad del sitio peptidil²⁸, mientras que EFL1 lo hace para el tallo ribosomal.¹⁰

1.4.1. SBDS Y EFL1

Como eIF6, la proteína SBDS es compartida por eucariotas y arqueas. La cristalografía de rayos X y la espectroscopia de RMN en solución han revelado la arquitectura tripartita conservada de la proteína SBDS.²⁹⁻³¹ La proteína humana SBDS comprende los dominios I (dominio FYSH, residuos S2-S96), II (residuos D97-A170) y III (residuos H171-E250). El dominio I de SBDS protege y potencialmente corrige el túnel de salida del péptido y el PTC; el dominio II promueve la conmutación conformacional de EFL1 y, junto con el dominio I, media la unión 60S y el movimiento dinámico entre dominios. El dominio III protege primero el sitio de unión a la GTPasa de traducción en la base del tallo P y luego, en la conformación abierta, promueve el cambio conformacional de EFL1.²⁸

EFL1 es homóloga a la translocasa ribosomal EF-G (del inglés Elongation factor G) en células procariontas y al factor de elongación 2 (EF-2 del inglés Elongation factor 2) en células eucariotas.³² Al igual que EF-2, EFL1 tiene una arquitectura general de cinco dominios, incluido el dominio I, que contiene los motivos G1-G5 que unen e hidrolizan GTP y comparten un 40 % de identidad de secuencia, que se extiende a lo largo de toda la proteína. Curiosamente, el pliegue de tipo ferredoxina del dominio III de SBDS está más estrechamente relacionado con el dominio V de EF-2, que también se encuentra en EFL1 ^{10,12,29}. La presencia de una inserción de longitud variable dentro del dominio II distingue a EFL1 de otras translocasas ribosómicas.²⁸

1.4.2. Ensamblaje del tallo P

El tallo ribosomal es una estructura vital para el funcionamiento de los ribosomas, ya que de ella depende el reclutamiento y activación de factores involucrados en la traducción. Los factores de translocación eEF-2/EF-G son reclutados por el tallo para su interacción en el centro asociado de GTPasas del ribosoma, tal que la hidrólisis de GTP resulta en un cambio conformacional que transloca al peptidil-ARNt del sitio A/P al P/P. El tallo está formado por las proteínas uL16/uL30/uL11

(según la nomenclatura unificada para proteínas ribosomales⁹) y es ensamblado de forma independiente al resto de la subunidad 60S. La proteína uL16 (en la nomenclatura unificada para proteínas ribosomales⁹), antes llamada RPL10 (del inglés Ribosomal Protein L10), se encuentra en una hendidura entre la protuberancia central y el tallo del ribosomal. El asa-P de la proteína uL16 es también necesaria para la activación de EFL1 y la subsecuente liberación de eIF6/Tif6. Se conoce que el asa del sitio P (aa 102-112) se extiende hacia el centro catalítico del ribosoma (sitio P) y abarca el ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) del sitio P. Mutaciones en el asa-P de la proteína ribosomal uL16, a 13 Å del centro catalítico de la subunidad 60S, impiden la liberación de eIF6/Tif6 a 90 Å de distancia.^{10,11}

El Dr. Arlen Johnson y colaboradores¹⁰ identificaron una clase de mutaciones dentro del asa-P de RPL10 (uL16) que impiden la liberación de Tif6, afectando así la biogénesis de la subunidad 60S. Las mutantes incluidas en esta clase son RPL10-S104D, C105G y A106R. Estas mutaciones presentan halmers, es decir, complejos de mRNAs unidos a las subunidades 40S que aún no se han unido a las subunidades 60S. La mutación RPL10 S104D presento el fenotipo más fuerte de esta clase. Sin embargo, este defecto es corregido a su vez por mutaciones supresoras en Tif6 y en EFL1, que se predice desestabilizan interacciones intra-dominio facilitando el cambio conformacional necesario para la liberación de Tif6.^{10,12} Datos preliminares en colaboración con el Dr. Arlen Johnson, University of Texas-Austin, sugieren que mutaciones supresoras en Sdo1 (ortólogo en levadura de SBDS) también son capaces de revertir el defecto observado por la mutación S104D antes mencionada en el asa-P de RPL10 (uL16). La mutante RPL10 S104D inhibe específicamente la liberación de Tif6, resultado de una unión defectuosa de Sdo1 a la subunidad 60S. El planteamiento fue que si la activación de EFL1 falla en RPL10 S104D como resultado de la unión defectuosa de Sdo1 a la subunidad 60S, los alelos de Sdo1 dominantes que promueven la unión de Sdo1 deberían suprimir el efecto de la mutación RPL10 S104D. Por lo tanto, analizaron las mutaciones en Sdo1 que podrían suprimir el defecto de crecimiento de RPL10 S104D. Tras una mutagenesis aleatoria de Sdo1, aislaron las transformantes de rápido crecimiento, de las cuales 40 clonas albergaban mutaciones sin sentido en Sdo1. Diversas

mutaciones se identificaron varias veces, por ejemplo, Sdo1 K175E estuvo presente en 8 aislamientos y Sdo1 V36A estuvo presente en 12 aislamientos. Después de subclonar y reintroducir los plásmidos de Sdo1 mutantes en células RPL10 S104D, se identificaron un total de 8 alelos independientes de Sdo1 que suprimen el defecto de crecimiento de RPL10 S104D; Sdo1 V36A, K62R, K106R, E110G, I114R, P144R, K175E y V238I.¹³ Interesantemente, los aminoácidos afectados por estas mutaciones supresoras en Sdo1 (proteína de 250 residuos) se localizan a lo largo de los tres dominios estructurales de la proteína.²⁹ Por lo que se cree que las mutaciones supresoras en el dominio N-terminal modifican la unión con el sitio peptidil, mientras que las mutaciones en el C-terminal se localizan en la interfase de la interacción entre Sdo1 y el dominio IV de EFL1, por lo que también podrían favorecer su unión.²⁸ Las mutaciones en el dominio central de Sdo1 resultan más difíciles de explicar, sin embargo, podrían alterar su flexibilidad.^{31,33} En este trabajo de investigación se seleccionaron tres de estas mutantes supresoras: Sdo1 V36A (dominio I), P144R (dominio II) y K175E (dominio III), para su estudio. Las mutantes Sdo1 V36A y K175E se seleccionaron para este trabajo, debido a que fueron las mutantes con mayor frecuencia identificadas en la mutagenesis aleatoria de sdo1 realizada por Johnson, A. y Patchett, S. A., en el 2016. Por otro lado, la mutante P144R se seleccionó aleatoriamente entre las mutantes que se identificaron en el dominio II, del mismo estudio. Los residuos de aminoácidos correspondientes en la proteína SBDS son V36, V144 y R173, respectivamente (**figura 3**).

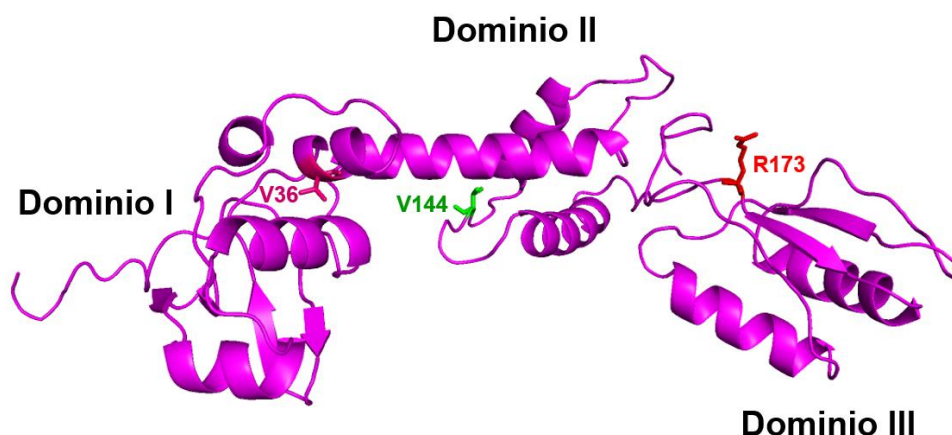


Figura 3. Ubicación de los residuos de aminoácidos V36 (dominio I), V144 (dominio II) y R173 (dominio III) en la estructura de SBDS humana obtenida por Finch, A. J. y colaboradores⁷ por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (PDB:2L9N). Estructura modificada usando el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

1.5. Análisis de interacciones proteína-ligando por anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia proporciona una herramienta poderosa en la investigación bioquímica y en las pruebas médicas para la determinación precisa de parámetros de unión de ligandos a proteínas cuando se une un fluoróforo al ligando. Para las biomoléculas, la anisotropía disminuye debido tanto a la difusión rotacional como a la flexibilidad interna. Como ejemplos, observamos que las mediciones de anisotropía de fluorescencia se han utilizado para cuantificar la desnaturalización de proteínas, que generalmente da como resultado: una mayor flexibilidad de la estructura del péptido y la asociación de proteínas con otras macromoléculas; lo que cambia la velocidad general de rotación. Ya que la tasa de difusión rotacional depende de la viscosidad del solvente, del tamaño y forma de la molécula rotatoria, en soluciones de una viscosidad determinada, las moléculas más pequeñas girarán más rápido que las más grandes como se ejemplifica en la **figura 4**.³⁴⁻³⁶

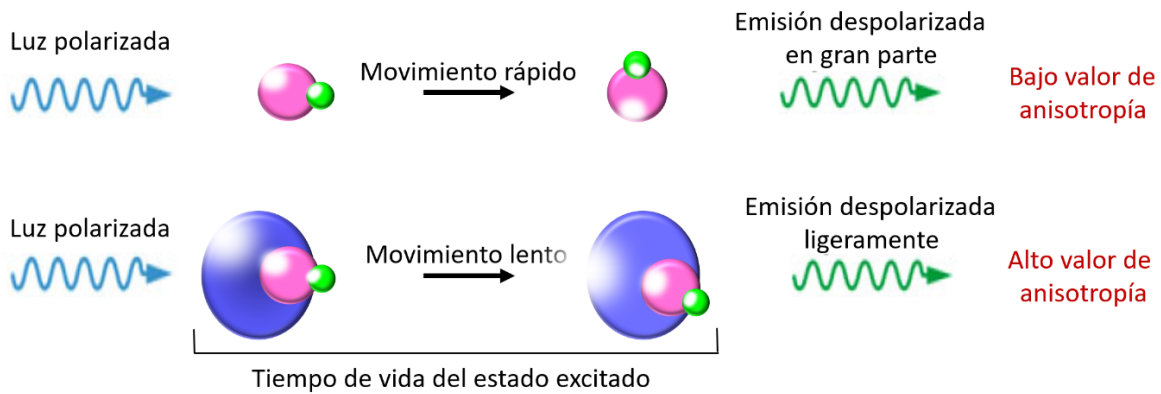


Figura 4. Esquema conceptual del uso de la anisotropía para medir la unión de una molécula con otra molécula de mayor tamaño. La esfera rosa es una molécula que se encuentra etiquetada con un fluoróforo (esfera verde). En la molécula marcada con un fluoróforo, tanto los movimientos de giro segmentarios como los globales contribuirán a la movilidad del fluoróforo en la solución. Ambos tipos de movimiento estarán restringidos al unirse a la molécula de mayor tamaño (elipsoide azul). Imagen modificada de.³⁵

La medición de la anisotropía de fluorescencia se ilustra en la **figura 5**. Para la mayoría de los experimentos, la muestra se excita con luz polarizada verticalmente. El vector eléctrico de la luz de excitación está orientado en paralelo a la vertical o al eje z. La intensidad de la emisión se mide mediante un polarizador. Cuando el polarizador de emisión está orientado en paralelo (\parallel) a la dirección de la excitación polarizada, la intensidad observada se denomina I_{\parallel} . Asimismo, cuando el polarizador es perpendicular (\perp) a la excitación, la intensidad se llama I_{\perp} . Estos valores de intensidad se utilizan para calcular la anisotropía:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

La anisotropía es una cantidad adimensional que es independiente de la intensidad total de la muestra. Esto se debe a que la diferencia ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) está normalizada por la intensidad total, que es ($I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$).³⁴

Tras la excitación con luz polarizada, la emisión de muchas muestras también se polariza. El grado de polarización de la emisión se describe en términos de anisotropía (r). Se dice que las muestras que presentan anisotropías distintas de cero presentan una emisión polarizada. El origen de la anisotropía es la existencia

de momentos de transición para la absorción y la emisión que se encuentran en direcciones específicas dentro de la estructura del fluoróforo. En solución homogénea, los fluoróforos en estado fundamental están todos orientados aleatoriamente. Cuando se exponen a luz polarizada, los fluoróforos que tienen sus momentos de transición de absorción orientados a lo largo del vector eléctrico de la luz incidente se excitan preferentemente. Por tanto, la población del estado excitado está parcialmente orientada.³⁴

Teóricamente, cuando toda la emisión es paralela al eje z ($I_{\parallel} = 1$ e $I_{\perp} = 0$, dando $r = 1$), significa que la sonda está inmóvil ya que la excitación y la emisión están ambas en el mismo plano. Por el contrario, si la sonda gira a una velocidad infinita, I_{\parallel} será igual a I_{\perp} , dando $r = 0$. Por lo tanto, se espera que A caiga entre 1 y 0 para los fluoróforos más comúnmente utilizados en disolución, lo que indica una polarización y despolarización completa, respectivamente. En algunas circunstancias, es posible observar $r < 0$, aunque esto requiere que la población de dipolos de emisión esté fuertemente sesgada en el plano perpendicular a la excitación, limitando donde $I_{\parallel} = 0$ e $I_{\perp} = 1$, dando $r = -0.5$. Sin embargo, valores en el máximo y mínimo de anisotropía, comúnmente, solo se encuentran en muestras muy estructuradas, como los cristales, pero raramente se observan en mediciones realizadas con disoluciones. En la práctica, los valores máximo y mínimo de anisotropía para los fluoróforos más comunes son 0.4 y 0, respectivamente.³⁵

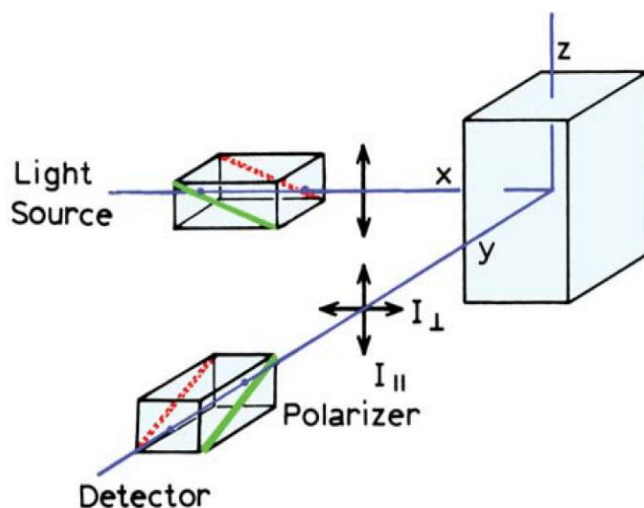


Figura 5. Diagrama esquemático para la medición de anisotropías de fluorescencia.³⁴

1.5.1. Análisis de datos

1.5.1.1. Aditividad de la anisotropía de fluorescencia

Las aplicaciones más comunes de la anisotropía de fluorescencia al estudio de los eventos de unión proteína-ligando son medir cuantitativamente las afinidades de estas interacciones. Habitualmente, se mide la anisotropía de concentraciones limitantes de un ligando fluorescente a través de una titulación a su supuesta pareja de unión (por ejemplo, una proteína). Así mismo, se mide la anisotropía de concentraciones limitantes de un ligando a través de una titulación a su supuesta pareja de unión fluorescente (por ejemplo, una proteína). Para obtener las constantes de unión en equilibrio de estas isothermas de unión, en condiciones de rendimiento cuántico de la fluorescencia constante, la anisotropía total medida de una muestra (r) es una función aditiva de la anisotropía intrínseca de cada especie fluorescente (r_i) y la fracción en concentración de cada especie fluorescente (f_i).

$$r = \sum_{i=1}^n f_i r_i$$

En la práctica, por tanto, r disminuye linealmente desde un máximo de 0.4 a un valor mínimo de 0 a medida que aumenta la fracción de moléculas reorientadas. Para una molécula esférica, el tiempo de relajación rotacional (ρ) se describe mediante la ecuación de Stokes:

$$\rho = \frac{3\eta V}{RT}$$

Donde ρ , es el tiempo de relajación de la rotación (tiempo que tarda la molécula en girar 68.5°); V , es el volumen molecular; η , es la viscosidad; R , es la constante universal de los gases ideales y T , es la temperatura. Con otras condiciones constantes, la velocidad de giro está inversamente relacionada con el volumen molecular. Por tanto, es probable que una molécula grande retenga la misma orientación durante el intervalo entre la absorción y la emisión de un fotón (~ 4 ns para la fluoresceína), mientras que una más pequeña es más probable que se reoriente (figura 4). Por tanto, la unión de una proteína marcada con un fluoróforo (P) a un ligando (L) aumenta la anisotropía (r). La r medida es entonces la suma de todas las especies con anisotropía como se explicó anteriormente. En este caso, es

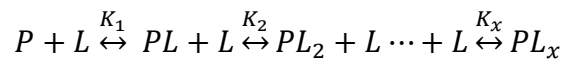
la suma de la anisotropía debida a la proteína fluorescente libre (r_P) y la debida a la proteína fluorescente unida PL (r_{PL}):

$$r = f_P r_P + f_{PL} r_{PL}$$

Donde f_P y f_{PL} son las concentraciones fracciones de la proteína libre (marcada con un fluoróforo) y unida, respectivamente ($f_P + f_{PL} = 1$). Lo anteriormente descrito es la base para los modelos analíticos de los equilibrios de unión proteína-ligando que se estudiarán a continuación.^{35,37,38}

1.5.1.2. Derivación y análisis de los modelos de unión

Los modelos de unión se obtienen a partir de un modelo de reacción de asociación secuencial mediante el cual las proteínas se unen sucesivamente a un ligando con forme al siguiente esquema general:



Donde P es la proteína marcada con un fluoróforo, L es el ligando asociado y los valores de K_x representa las constantes de asociación de equilibrio que describen cada evento de unión ($K = 1 / K_d$). En consecuencia, se utilizó este marco genérico para desarrollar algoritmos de elucidación de las constantes de unión en equilibrio a partir de los datos generados por las mediciones de anisotropía de fluorescencia. En la práctica, se pueden considerar una amplia variedad de eventos de unión proteína-ligando, utilizando subconjuntos de este modelo general. La concentración en estado estacionario de cada complejo de proteína:ligando ($[PL_x]$) está relacionada con las concentraciones del ligando libre ($[L]$), de la proteína libre ($[P]$) y las constantes de equilibrio de asociación relevantes por medio de:

$$\begin{aligned} [PL] &= [L][P]K_1 \\ [PL_2] &= [P][L]^2 K_1 K_2 \\ &\downarrow \\ [PL_x] &= [P][L]^x \prod_{i=1}^x K_i \end{aligned}$$

En condiciones de rendimiento cuántico de fluorescencia constante, la anisotropía medida (r) de una mezcla de especies fluorescentes marcadas con un fluoróforo puede interpretarse mediante la ecuación (1).

$$r = \sum_{i=1}^n f_i r_i \quad (1)$$

Aquí, r_i representa la anisotropía intrínseca de cada especie fluorescente y f_i representa la fracción en concentración de cada especie fluorescente. Aplicando esta función a las reacciones de unión que contienen la proteína marcada con un fluoróforo y los ligandos no marcados, las concentraciones fraccionarias relevantes de los componentes de reacción fluorescentes están dadas por la ecuación (2), donde $[P]_t$ es la concentración total de la proteína marcada con un fluoróforo en la reacción de unión.

$$f_P = \frac{[P]}{[P]_t}; f_{PL} = \frac{[PL]}{[P]_t}; \dots; f_{PL_x} = \frac{[PL_x]}{[P]_t} \quad (2)$$

Si sustituimos ecuación (2) en ecuación (1) obtenemos:

$$r = \frac{1}{[P]_t} (r_P [P] + r_{PL} [PL] + \dots + r_{PL_x} [PL_x]) \quad (3)$$

Incorporando el esquema general (mencionado al inicio) y la ley de conservación de la masa, la ecuación (4) describe la relación general entre r y la concentración total del ligando $[L]_t$ dada en la ecuación (5)

$$[P]_t = [P] + [PL] + \dots + [PL_x] \quad (4)$$

$$r = \frac{r_P + r_{PL} [L]_t K_1 + \dots + r_{PL_x} [L]_t^x \prod_{i=1}^x K_i}{1 + [L]_t K_1 + \dots + [L]_t^x \prod_{i=1}^x K_i} \quad (5)$$

Donde r es la anisotropía medida, r_P , r_{PL} , etc. representan los valores intrínsecos de anisotropía de la proteína libre (marcada con un fluoróforo) o de los complejos específicos proteína:ligando designados por los subíndices. La expresión general de la ecuación 5 relaciona la anisotropía medida r con la concentración total del ligando, las constantes de asociación de equilibrio y la anisotropía intrínseca de cada especie fluorescente. Para la aplicación práctica de este algoritmo, $[P]_t$ debe ser limitante y, en general, debe ser al menos 5 veces menor que cualquier valor de $K_d (= 1/K)$. En estas circunstancias, la concentración del ligando libre en solución ($[L]$) se aproxima a la concentración total del ligando en el sistema de reacción ($[L]_t$), lo que permite la solución de los parámetros de reacción mediante regresión no lineal de conjuntos de datos r versus $[L]_t$.^{35,39}

1.5.1.2.1. Modelo de un sitio de unión

La relación más simple de unión entre el ligando y la proteína puede describirse mediante la unión reversible en un solo paso. Resolviendo la ley de conservación de la masa se obtiene el modelo de un sitio de unión ecuación (6).

$$P + L \xrightleftharpoons{K} PL$$
$$r = \frac{r_p + r_{PL}K[L]_t}{1 + K[L]_t} \quad (6)$$

Donde P es la proteína, L es el ligando, r es la anisotropía medida, r_p es la anisotropía de la proteína libre (marcada con un fluoróforo); r_{PL} es la anisotropía del complejo proteína:ligando, K es la constante de afinidad y $[L]_t$ es la concentración total del ligando.

1.5.1.2.2. Modelo de dos sitios distintos de unión

Para las reacciones que se describen mejor mediante dos sitios distintos de unión reversible proteína: ligando, resolviendo la ley de conservación de la masa se obtiene el modelo de dos sitios distintos de unión ecuación (7).

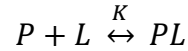
$$P + L \xrightleftharpoons{K_1} PL + L \xrightleftharpoons{K_2} PL_2$$
$$r = \frac{r_p + r_{PL}K_1[L]_t + r_{PL_2}K_1K_2[L]_t^2}{1 + K_1[L]_t + K_1K_2[L]_t^2} \quad (7)$$

Donde P es la proteína, L es el ligando, r es la anisotropía medida, r_p es la anisotropía de la proteína libre (marcada con un fluoróforo); r_{PL} es la anisotropía del complejo PL , r_{PL_2} es la anisotropía del complejo PL_2 , K_1 es la constante de afinidad del primer evento de unión, K_2 es la constante de afinidad del segundo evento de unión y $[L]_t$ es la concentración total del ligando.^{35,39}

1.5.1.2.3. Modelo de un sitio de unión con efecto de agotamiento de ligando

Hasta este punto, todos los algoritmos de unión descritos han supuesto que las concentraciones de la proteína son limitantes, lo que permite la aproximación $[L] \approx [L]_t$. Sin embargo, en algunas circunstancias, la afinidad de proteínas de unión a un ligando puede exceder este límite. En tales situaciones, los eventos de unión

binarios reversibles pueden resolverse en términos de las concentraciones totales del ligando y de la proteína en el sistema. Resolviendo el balance de masa, los resultados se pueden ajustar a un modelo de un sitio de unión con efecto de agotamiento de ligando ecuación (8).



$$r = r_p + \frac{(r_{PL} - r_p)}{2K[P]_t} \times \left((1 + K[P]_t + K[L]_t) - \sqrt{(1 + K[P]_t + K[L]_t)^2 - 4K^2[P]_t[L]_t} \right) \quad (8)$$

Donde P es la proteína marcada con un fluoróforo, L es el ligando, r es la anisotropía medida, r_p es la anisotropía de la proteína marcada con un fluoróforo; r_{PL} es la anisotropía del complejo PL , K es la constante de afinidad, $[P]_t$ es la concentración total de la proteína marcada con un fluoróforo y $[L]_t$ es la concentración total del ligando.^{38,39}

La derivación para obtener la ecuación (8) a partir de la ecuación (1) se desarrolla a continuación:

Reescribiendo la ecuación (1) como:

$$r = f_P r_p + f_{PL} r_{PL} \quad (9)$$

Donde r_p y r_{PL} representan la anisotropía intrínseca de la proteína libre (marcada con un fluoróforo) y unida, respectivamente, f_P y f_{PL} representan la fracción en concentración de la proteína libre (marcada con un fluoróforo) y unida respectivamente. Aplicando esta función a las reacciones de unión que contienen la proteína marcada con un fluoróforo y el ligando no marcado, las concentraciones fraccionarias relevantes de los componentes de reacción fluorescentes están dadas por la ecuación (10) y (11):

$$f_P = \frac{[P]}{[P] + [PL]} = \frac{[P]}{[P]_t} \quad (10)$$

$$f_{PL} = \frac{[PL]}{[P] + [PL]} = \frac{[PL]}{[P]_t} \quad (11)$$

Donde $[P]$ y $[PL]$ representan la concentración de la proteína libre (marcada con un fluoróforo) y unida, respectivamente. Ahora, definimos que la suma de las especies libre y unida es igual a la concentración total:

$$[P]_t = [P] + [PL] \quad (12)$$

$$[L]_t = [L] + [PL] \quad (13)$$

Donde $[P]_t$ y $[L]_t$ representan la concentración total de la proteína marcada con un fluoróforo y del ligando, respectivamente. Ahora, resolveremos la ecuación (9) en términos de $[P]_t$ y $[L]_t$. Rearreglando la ecuación (9) obtenemos:

$$r = (1 - f_{PL})r_P + f_{PL}r_{PL} \quad (14)$$

$$r = r_P + (r_{PL} - r_P) \quad (15)$$

y sustituyendo f_{PL} de la ecuación (11) obtenemos:

$$r = r_P + f_{PL}(r_{PL} - r_P) \frac{[PL]}{[P]_t} \quad (16)$$

La constante de afinidad puede ser calculada por:



Donde P representa la proteína libre (marcada con un fluoróforo), L representa el ligando libre, y PL es el complejo formado por la unión del ligando a la proteína.

La constante de afinidad puede escribirse como:

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (18)$$

Rearreglando esta ecuación obtenemos

$$[P][L]K = [PL] \quad (19)$$

Ahora sustituimos $[P]$ de la ecuación (12) y $[L]$ de la ecuación (13) en la ecuación (19):

$$([P]_t - [PL])([L]_t - [PL])K = [PL] \quad (20)$$

$$K[PL]^2 - (1 + K[P]_t + k[L]_t)[PL] + K[P]_t[L]_t = 0 \quad (21)$$

Resolviendo esta ecuación cuadrática obtenemos:

$$[PL] = \frac{\left((1 + K[P]_t + K[L]_t) - \sqrt{(1 + K[P]_t + K[L]_t)^2 - 4K^2[P]_t[L]_t} \right)}{2K} \quad (22)$$

Sustituyendo la ecuación (22) en la ecuación (16) obtenemos la ecuación (8).

CAPÍTULO 2

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento del problema

En este trabajo se busca entender la función de las mutaciones de Sdo1 capaces de aliviar el lento crecimiento observado en células de levadura con mutaciones en el asa-P de la proteína ribosomal RPL10. Para comprender el efecto de estas mutaciones a nivel molecular se evaluarán cambios estructurales y de estabilidad térmica en las mutantes supresoras de Sdo1 mediante dicroísmo circular. También se evaluará la interacción entre estas mutantes supresoras con scEFL1 mediante anisotropía de fluorescencia. Lo anterior nos permitirá ampliar nuestro conocimiento en la función molecular de Sdo1/SBDS, scEFL1 y RPL10, y su participación en un proceso fundamental, como lo es la biogénesis ribosomal y su posible impacto en el proceso de traducción cuando hay fallas en el ensamblaje de los ribosomas, como resultado de la incapacidad de liberar a eIF6/Tif6, lo cual origina ribosomas anormales con capacidades alteradas de traducción, que es la principal causa del desarrollo del Síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond y de otras ribosomopatías.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

- ❖ Entender la función de las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E capaces de restituir el defecto originado por mutaciones en el asa-P de la proteína ribosomal L10 (RPL10) en términos de la constante de disociación.

2.2.2. Objetivos particulares

- ❖ Obtener las construcciones de Sdo1 y las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E en el vector pRSET con una etiqueta FIASH en el extremo N-terminal.
- ❖ Expresar las proteínas Sdo1-FIASH silvestre y las mutantes de las Sdo1 V36A-FIASH, P144R-FIASH y K175E-FIASH de forma recombinante en células de Escherichia coli y purificarlas mediante técnicas convencionales de cromatografía de proteínas.
- ❖ Expresar de forma recombinante en Saccharomyces cerevisiae la proteína scEFL1 silvestre y purificarla mediante técnicas convencionales de cromatografía de proteínas.
- ❖ Caracterizar estructuralmente las proteínas Sdo1-FIASH silvestre y las mutantes de las Sdo1 V36A-FIASH, P144R-FIASH y K175E-FIASH por Dicroísmo circular.
- ❖ Obtener las constantes de disociación de scEFL1 con las proteínas Sdo1-FIASH silvestre y las mutantes de las Sdo1 V36A-FIASH, P144R-FIASH y K175E-FIASH.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada para desarrollar este trabajo de investigación se dividió en 7 etapas:

- 1) Amplificación y purificación de los vectores que presentan las secuencias génicas que codifican las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre, las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH y la proteína scEFL1.
- 2) Expresión de las proteínas recombinantes Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH.
- 3) Expresión de la proteína recombinante scEFL1.
- 4) Purificación de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH mediante cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} , cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión molecular.
- 5) Purificación de la proteína scEFL1 mediante cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} y cromatografía de exclusión molecular.
- 6) Caracterización estructural de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH por dicroísmo circular.
- 7) Estudios de unión de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH a scEFL1 por anisotropía de fluorescencia.

3.1. Amplificación y purificación de los vectores de interés

3.1.1. Características de los plásmidos que presentan las secuencias génicas de las proteínas recombinantes

El esqueleto de los plásmidos utilizados para la expresión de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH corresponde a el pRSET-A de Invitrogen (**figura 6**) y para la proteína scEFL1 contiene el esqueleto del vector pRS426 (**figura 7**). A continuación, se describen sus principales características.

El plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His codifica para una construcción que tiene una cola de seis histidinas en el carboxilo terminal de la proteína Sdo1 (ortólogo en levadura de la proteína SBDS) y una etiqueta FIAsH en el amino terminal. La etiqueta FIAsH corresponde a la secuencia Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys. Esta secuencia reacciona con el colorante fluorescente 4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il)fluoresceína, lo que da como resultado una señal fluorescente brillante, que es necesaria para realizar los estudios de anisotropía de fluorescencia como se describe en la sección 3.7. La construcción se encuentra clonada entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* en el esqueleto del vector pRSET-A. Este vector está diseñado para una expresión en procarionota controlada por el promotor del bacteriófago T7/lac que es un promotor fuerte inducible con IPTG. La expresión es inducida por la producción de la ARN polimerasa de T7 en cepas de *E. coli* BL21(DE3) o derivadas. Además, posee un sitio de clonación múltiple; el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina, el cual permite la selección del plásmido; tiene un origen de replicación en *E. coli* y el terminador transcripcional T7.⁴⁰

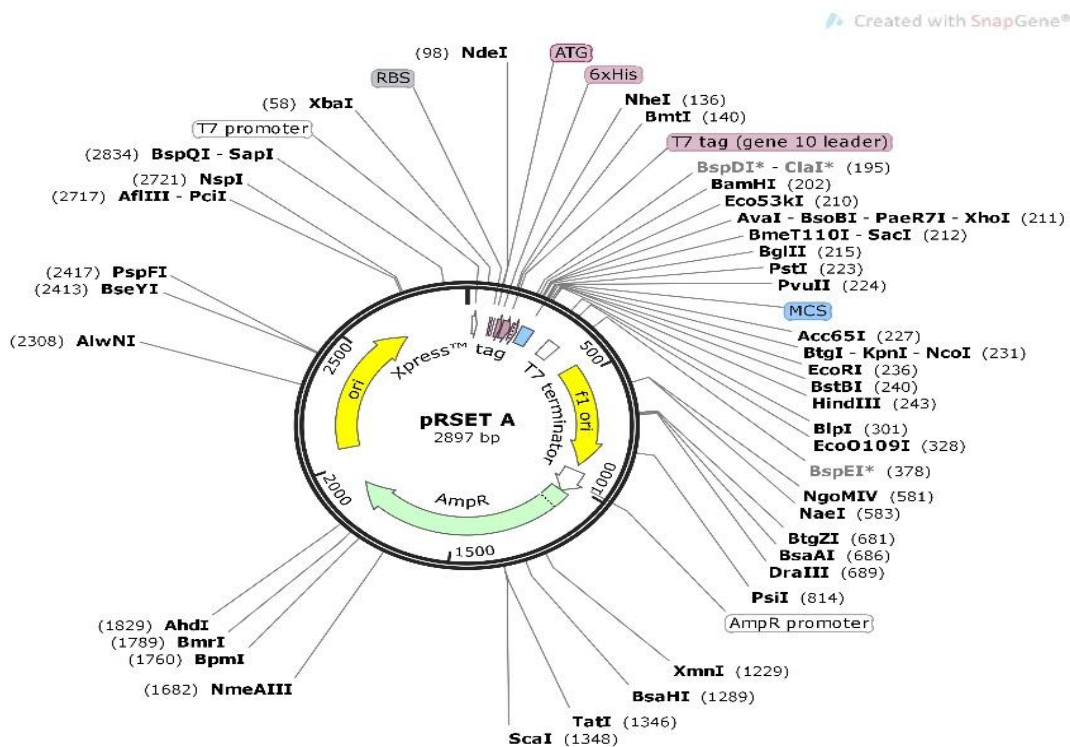


Figura 6. Mapa del vector de expresión pRSET A utilizado para la inserción de la secuencia de DNA que codifica para la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH. El mapa se realizó con el programa SnapGene.

El plásmido pRS426-scEFL1His codifica para una construcción que tiene una cola de seis histidinas en el carboxilo terminal de la proteína scEFL1 de levadura. Esta construcción se encuentra insertada en el plásmido pRS426 entre los sitios *NcoI* y *BamHI* y su expresión es regulada por el promotor *GAL1/10* y la secuencia terminadora *MAT α* . 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. Además, contiene las secuencias de REP3 y FRT necesarias para la propagación de alta copia en levadura.⁴¹

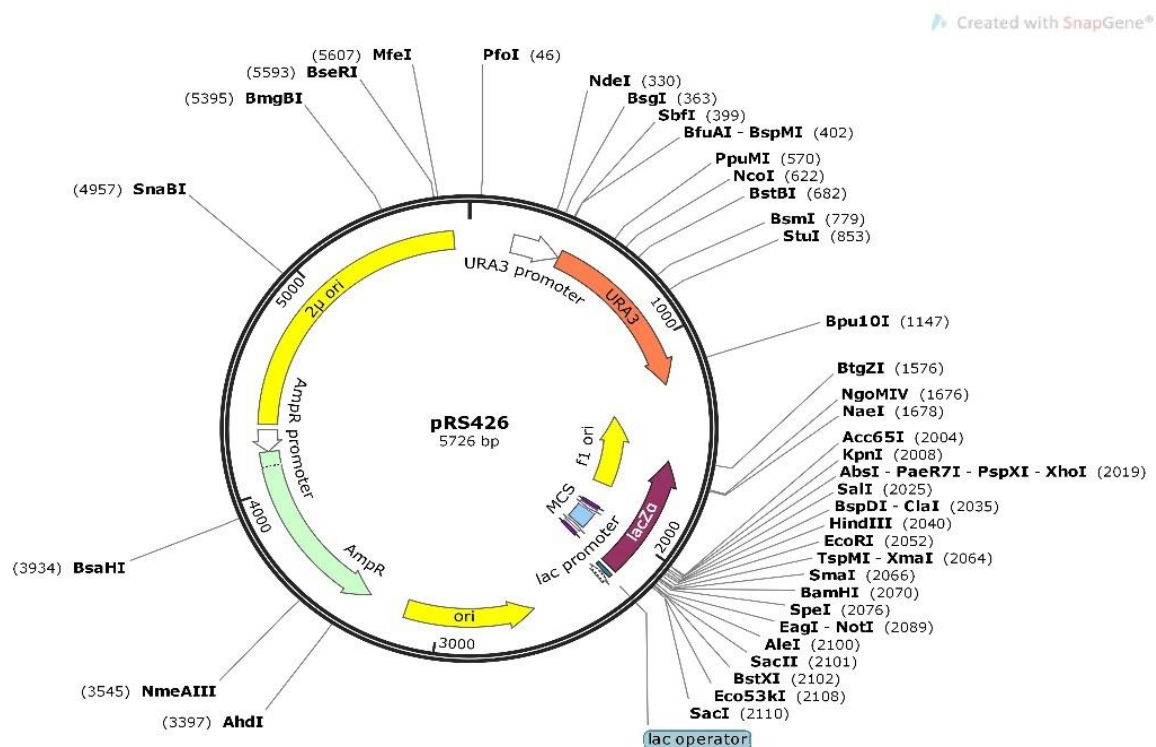


Figura 7. Mapa del vector de expresión pRS426 utilizado para la inserción de la secuencia de DNA que codifica para la proteína scEFL1. El mapa se realizó con el programa SnapGene.

3.1.2. Cepa de *Escherichia coli* C41 (DE3)

La cepa de *Escherichia coli* C41 (DE3) tiene el genotipo $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3). Esta cepa es efectiva para expresar proteínas tóxicas y de membrana de toda clase de organismos, incluidas bacterias, levaduras, plantas, virus y mamíferos. Esta cepa contiene mutaciones genéticas seleccionadas fenotípicamente para conferir tolerancia a las proteínas tóxicas. Tiene una eficiencia

de transformación $\geq 1 \times 10^6$ cfu/ μ g pUC19 y es deficiente en las proteasas Lon y ompT. Esta cepa tiene una mutación que reduce el nivel de actividad de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, evitando así la muerte celular asociada con la sobreexpresión de muchas proteínas tóxicas recombinantes. Esta cepa es adecuada para la expresión de proteínas a partir de genes diana clonados en sistemas de expresión impulsados por el bacteriófago T7.⁴² El gen que codifica para la ARN polimerasa de T7 en sí mismo se ha diseñado en estas cepas de *E. coli* bajo el sistema del operón lac modificado. Con frecuencia es llamado DE3 en el nombre de la cepa de *E. coli*. Una vez que la proteína de ARN polimerasa de T7 se expresa, se une a la secuencia promotora T7 corriente arriba de su gen de interés en el inserto del plásmido y transcribe su gen objetivo. El gen de interés está bajo el control del operador lac, por lo que su expresión es inducida por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, análogo sintético de la lactosa). Por lo general, dentro de una o dos horas, la proteína de interés es la proteína más común en la célula.⁴³

3.1.3. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BCY123

La cepa de *S. cerevisiae* BCY123 haploide (tipo a) tiene el genotipo *pep4::HIS3 prb::LEU2 bar1::HISG lys2::GAL1/10-GAL4 can1 ade2 ura3 leu2-3, 112*. Esta cepa es deficiente en proteasas disminuyendo el riesgo de proteólisis de las proteínas de interés. Además, permite la selección de auxótrofos a uracilo y adicionalmente expresa el activador transcripcional Gal4 durante la inducción con galactosa.⁴⁴

3.1.4. Mutagénesis sitio-específica en el vector de expresión de la proteína Sdo1 silvestre

Se empleó el método de mutagénesis sitio-específica (SDM del inglés Site-directed mutagenesis) que incluye dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction) ejecutadas en paralelo con cada uno de los cebadores directo e inverso. Al final de la PCR, las reacciones se combinan y después de tres pasos; desnaturalización, realineación y digestión del DNA plasmídico parental metilado con *DpnI*, los productos se transformaron directamente en células huésped (**figura 8**).⁴⁵

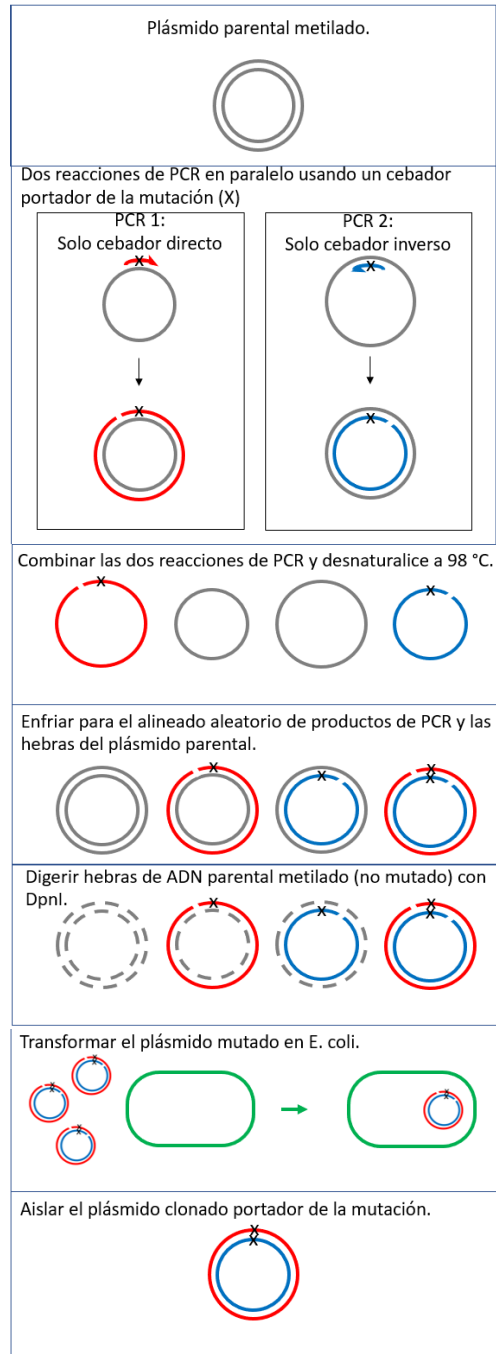


Figura 8. Diagrama de flujo del método de mutagénesis sitio-específica de un solo cebador. El plásmido parental se muestra en color gris y las dos cadenas sintetizadas por PCR se muestran en rojo y azul. La letra x marca la posición de la mutación. Imagen modificada de.⁴⁵

Los cebadores mutagénicos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co. Estos contenían el cambio de secuencia que permitió la introducción de las mutaciones al

vector pRSET-FIAsHSdo1-His correspondiente para ambas direcciones. Estos cebadores 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-FIAsHSdo1-His con cebadores mutagénicos que se alineaban en la misma región, pero en direcciones opuestas de la cadena de DNA (**figura 8**).

Para la SDM se realizaron dos reacciones de PCR por separado en paralelo con los cebadores directo e inverso en tubos separados (ver los componentes de reacción y concentraciones en la **tabla 1**). Las condiciones de amplificación para cada reacción de PCR (**tabla 2**) están conformadas por una etapa de desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s. Posteriormente, por una etapa de veinticinco ciclos de PCR. Se realizaron ciclos sucesivos de desnaturalización a 98 °C durante 10 s y de un paso combinado de alineamiento/extensión que se realizó a 72 °C durante 30 s por cada 1 kb de secuencia de cDNA plasmídico, esta etapa se repitió veinticinco veces. Posteriormente, una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min. Por último, la mezcla de reacción de PCR se llevó a una temperatura de 4 °C. La DNA polimerasa utilizada fue la Phusion™ Hot Start II (Thermo Scientific).

Después de las PCR realizadas en paralelo, los dos productos de PCR se combinaron (dando un volumen total de 40 µL) y se calentaron a 98 °C para separar el producto de PCR del molde del plásmido. Luego, el tubo se enfrió lentamente a 37 °C, para promover el realineamiento de los moldes del plásmido desnaturalizados y los productos de PCR (**figura 8**). Posteriormente, agregamos 0.2 µL de la enzima *DpnI* (Thermo Scientific), 2.5 µL de la solución amortiguadora 10X Tango y 2.3 µL de agua libre de nucleasas a los productos de PCR realineados (como se indicó anteriormente, en 40 µL) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. La enzima de restricción *DpnI* digiere las cadenas de plásmidos parentales metiladas, dejando el recién sintetizado con las cadenas intactas que contienen las mutaciones deseadas (**figura 8**).

El producto obtenido de la PCR previamente digerido por la endonucleasa *DpnI* fue transformado en células de *E. coli* DH5α de acuerdo con la metodología que se muestra en la siguiente sección. Por último, cabe mencionar que el DNA obtenido

en la PCR corresponde a un fragmento pseudo-circular debido a la complementación de partes de bases en la región de los oligos (**figura 8**) que terminó de ser ligado por la maquinaria de la célula, por lo que no requirió un tratamiento de ligación previo a la transformación.

Tabla 1. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales empleadas para las reacciones de PCR.

	Reacción de PCR 1	Reacción de PCR 2	Concentración Final para cada reacción
Solución amortiguadora 5X Phusion HF	4 µL	4 µL	1X
10 mM dNTPs	0.5 µL	0.5 µL	250 µM
Cebador directo (10 µM)	1.0 µL	-	0.5 µM
Cebador inverso (10 µM)	-	1.0 µL	0.5 µM
DNA molde pRSET-FIAsHSDo1-His	2.0 µL	2.0 µL	15 ng
Enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µL)	0.2 µL	0.2 µL	0.02 U/ µL
H ₂ O (libre de nucleasas)	12.3 µL	12.3 µL	n/a
Volumen final	20 µL	20 µL	

Tabla 2. Condiciones de amplificación de la PCR

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicio	98 °C	30 s	1
Desnaturalización			
Desnaturalización	98 °C	10 s	
Alineamiento	-	-	25
Extensión	72 °C	30 s/kb	
Extensión final	72 °C	10 min	1
	4 °C	Fin	

3.1.5. Transformación de DNA plasmídico en células bacterianas

La transformación de DNA plasmídico para su propagación se realizó en células competentes de *E. coli* DH5α y para la expresión de proteína se realizó en células competentes de *E. coli* C41 por el método de choque térmico. Inicialmente, se descongelaron 50 µL de células competentes DH5α o C41 en hielo durante 5 min. Una vez descongeledas las células competentes, se adicionaron 100 ng de ADN

plasmídico y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se incubó la reacción de transformación a 42 °C durante 45 s en un termobloque (AccuBlock™ Digital Dry Bath) y en seguida se colocó la reacción en hielo durante 2 min. Después se adicionaron 500 µL de medio de cultivo LB (5.0 g/L NaCl, 5.0 g/L extracto de levadura y 10.0 g/L peptona de caseína) y se incubaron las reacciones a 37 °C con agitación constante a 200 rpm durante 1 hora. Finalizado el tiempo de incubación, el cultivo celular se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min en una centrifuga MiniSpin® plus (Eppendorf AG, Germany). Se desechó el sobrenadante por decantación y el pellet de células se resuspendió en 100 µL de medio LB. Se plaqueó todo el volumen de la muestra de transformación en una placa de medio sólido LB con 1.5 % agar y suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Finalmente, se dejó incubando la placa de transformación: a 37 °C, sin agitación y durante 16 horas.

3.1.6. Aislamiento de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina

Una vez realizada la transformación del DNA plasmídico en células competentes de *E. coli* DH5α o C41 se seleccionaron algunas colonias resistentes a ampicilina y se les extrajo el DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina. Las colonias seleccionadas se inocularon por separado en 1.5 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Los cultivos se incubaron: a 37 °C, con agitación constante, a 200 rpm y durante 12 horas. Finalizado el tiempo de incubación, cada cultivo celular se centrifugó a 8,000 rpm durante 2 min en una centrifuga MiniSpin® plus (Eppendorf AG, Germany). Se desechó el sobrenadante por decantación y se adicionaron 100 µL de la solución S1 (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 10 mg/mL RNAsa) al pellet celular. Esta mezcla se resuspendió hasta observar una mezcla homogénea. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de la solución S2 (200 mM NaOH y 1 % SDS) y se mezcló suavemente por inversión. Esta mezcla se dejó reposar en hielo durante 5 min. Después se adicionaron 150 µL de la solución S3 (5 M Acetato de potasio pH 4.8) y se mantuvo en hielo durante 5 min. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente, se

adicionaron 400 μL de isopropanol al sobrenadante y se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador por 30 min. De esta forma se permitió la precipitación del plásmido. Esta mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min en la centrifuga mencionada, se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μL de etanol absoluto. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y los residuos de etanol se eliminaron por evaporación. Finalmente, se resuspendió el pellet en 30 μL de agua libre de nucleasas.

3.1.7. Restricción del DNA plasmídico con la enzima de restricción *Xba*I

El ADN plasmídico purificado por la técnica de lisis alcalina se analizó mediante la técnica de electroforesis, en un gel de agarosa al 1.0 % como se explica en la sección 3.1.8. Posteriormente, los plásmidos de las clonas que presentaron una banda con el peso molecular esperado (3553 pb) se analizaron mediante un ensayo de restricción con la enzima *Xba*I. La preparación de las muestras se realizó mezclando 3 μL del plásmido de interés (400 ng), 0.3 μL de la enzima de restricción (1 U), 1 μL de la solución amortiguadora 10X Tango y 5.7 μL de agua libre de nucleasas, con un volumen final de la mezcla de reacción de PCR de 10 μL . Esta mezcla se dejó incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin agitación, durante 3 horas. Finalizado el tiempo de la restricción, los productos se analizaron mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 %, como se explica en la sección 3.1.8. Las clonas cuyo patrón de restricción experimental coincidió con el patrón de restricción esperado (dos bandas; una con un peso de 2944 pb y otra de 609 pb) se les extrajo nuevamente ADN plasmídico, pero esta vez con el Kit de extracción Fast-n-Easy Plasmid Miniprep (Jena Bioscience). Cada plásmido purificado con este Kit se envió a secuenciar a la compañía Gen Script USA Inc.

3.1.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis de DNA se realizó en un gel de agarosa al 1%, en una solución amortiguadora TAE 1X (40 mM Tris-acetato pH 8.0, 1 mM de EDTA). El gel de agarosa a una concentración de 1 % proporciona un rango de separación de tamaños de DNA de 250 pb-12 kb. Para la preparación del gel, se disolvieron 0.5 g

de agarosa en 49.71 mL de solución amortiguadora TAE 1X. La mezcla se calentó en un horno de microondas, hasta que se observó que toda la agarosa se había fundido. Posteriormente, la solución de agarosa se dejó enfriar, hasta una temperatura de unos 50 °C. Alcanzada esta temperatura, la solución de agarosa se vertió sobre el molde del gel; con el peine previamente colocado y se dejó solidificar, durante 30 min. Por otra parte, la preparación de las muestras se realizó mezclando 3 μ L de cada DNA a estudiar con 3 μ L de solución amortiguadora de carga tipo II 6X (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xileno cianol y 30% glicerol) y 3 μ L de agua destilada estéril. Una vez solidificado el gel y colocado en la cámara de electroforesis se añadió la solución amortiguadora TAE 1X hasta cubrir el gel unos 5 mm. Se retiró el peine y se cargaron en los pocillos las muestras previamente preparadas, así como el marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA). Por último, la electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 90 V durante una hora y media. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) durante 5 min. Posteriormente, el DNA se visualizó el gel a luz ultravioleta ($\lambda \approx 300 \text{ nm}$) en un transiluminador de Bio-Rad®.

3.1.9. Transformación de DNA plasmídico en levadura

Se preparó un pre-inóculo de 2 mL con células BCY123 de *S. cerevisiae* en medio YEPD. 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 YEPD, se pusieron a incubar con agitación a 30 °C por 3-5 h o hasta lograr una DO 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 centrifuga 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 μ L de células, 100 μ g de espermatozoos de salmón que nos servirá como DNA acarreador y 200 ng de DNA plasmídico. Se agregaron 600 μ L 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 μ L de

DMSO antes de dar un choque térmico a 43 °C por 15 min. Las células se colectaron por centrifugación a 3500 rpm por 5 min y se resuspendieron en 100 µL de 1X TE y se sembraron en medio sólido SD-URA (8.0 g/L base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 11 g/L casaminoácidos, 134 mg/L adenina, 100 mg/L tirosina, 60 mg/L leucina y 40 mg/L de triptófano suplementado con 2% de glucosa para incubarse por 1-2 días a 30 °C.

3.2. Expresión de las proteínas recombinantes

3.2.1. Expresión de las proteínas recombinantes Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli*, C41(DE3) debido a su efectividad para expresar proteínas tóxicas y de membrana de toda clase de organismos, incluidas de levaduras, así como es deficiente en la expresión de proteasas disminuyendo así el riesgo de proteólisis de las proteínas de interés. Además, contiene el gen que codifica para la RNA polimerasa de T7 indispensable para la expresión del vector pRSET-FIAshSdo1-His.^{42,43}

Después de transformar las bacterias C41(DE3) con cada uno de los plásmidos, se procedió a inducir la expresión de cada una de las proteínas recombinantes. Se inoculó una colonia de la cepa transformada con el plásmido correspondiente en 5 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Este cultivo se incubó a 37 °C, con agitación constante, a 200 rpm, durante 12 horas. Posteriormente, se adicionaron 2 mL del cultivo anterior a 1 L de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37 °C, con agitación constante, a 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica OD_{600nm} de 0.5-0.7 UA correspondiente a la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Posteriormente, se adicionó el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM y se incubó a 37 °C, con agitación constante, a 200 rpm, durante 4-5 horas. Finalizado el tiempo de inducción, el cultivo celular se centrifugó a 4,500 rpm, durante 10 min, en una centrifuga Thermo Scientific™ Heraeus™ Megafuge™ 16. Se desechó el sobrenadante por decantación y el pellet de células se guardó a -20 °C.

3.2.2. Expresión de la proteína recombinante scEFL1

Para la expresión de la proteína scEFL1 se empleó la cepa de *S. cerevisiae* BCY123, ya que es deficiente en proteasas disminuyendo así el riesgo de proteólisis de las proteínas de interés. Además, permite la selección de auxótrofos al gen *URA3* y adicionalmente expresa el activador transcripcional Gal4 durante la inducción con galactosa.⁴⁴

Se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* BCY123 previamente transformado con el plásmido pRS426-scEFL1His en 50 mL de medio SD-URA. Este cultivo se incubó a 30 °C, con agitación constante, a 200 rpm, durante 12 horas. Posteriormente, se adicionó el cultivo anterior a 1 L de medio SD-URA suplementado con 2% de glucosa y Drop Out-Ura y se incubó a 30 °C, con agitación constante, a 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica OD_{600nm} de 2.0 UA. Posteriormente, la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de galactosa al 2.8 % y se incubó a 30 °C, con agitación constante, a 200 rpm, durante 20 horas. Finalizado el tiempo de inducción, el cultivo celular se centrifugó a 4,500 rpm, durante 10 min, en una centrifuga Thermo Scientific™ Heraeus™ Megafuge™ 16. Se desechó el sobrenadante por decantación y el pellet de células se guardó a -20 °C.

3.3. Purificación de las proteínas recombinantes

3.3.1. Lisis bacteriana mediante sonicación

Cada pellet de células bacterianas obtenido de la expresión de las proteínas recombinantes Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh de 1 L de cultivo se descongeló y fue resuspendido en 20 mL de solución amortiguadora para lisis (50 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol y 20 mM imidazol). A la suspensión anterior se le adicionó 1 mM de PMSF, 1 mM de benzamidina y 10mM de β-mercaptoetanol. Posteriormente, la suspensión de células se vertió en un contenedor de 50 mL y se aforó hasta ¾ de su volumen total, con solución amortiguadora para lisis. La suspensión final fue sonicada durante 5 ciclos de 10 s de encendido y 50 s de apagado, en un Misonix Sonicator 3000 a 6.5 V; el contenedor con la suspensión final se sumergió en hielo durante la sonicación. Finalmente, el lisado se centrifugó a 11,000 rpm, durante 50 min, en una centrifuga Thermo Scientific™ Heraeus™

Megafuge™ 16. El sobrenadante obtenido, es decir, la fracción (fase) soluble, se filtró por una membrana hidrofílica con un tamaño de poro de 0.45 µm (Merck Millipore).

3.3.2. Purificación de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes

Las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH expresadas en la cepa de *E. coli*, C41(DE3) con el plásmido pRSET-FIAsHSdo1His presentan en su carboxilo terminal, una cola de seis histidinas que interaccionan con níquel (Ni^{2+}), propiedad que fue utilizada para el primer paso de purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} . Por otro lado, se empleó cromatografía de intercambio iónico separando la proteína de interés por intercambio catiónico. Finalmente, se empleó cromatografía de exclusión molecular como último paso de purificación considerando que el peso molecular de dicha proteína es de 29.542 kDa.

3.3.2.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+}

La proteína de interés se purificó a través de cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} en una columna QIAGEN, con un volumen de cama de 5 mL. Inicialmente, la columna se equilibró con 3 volúmenes de columna (CV del inglés de column volume) de agua destilada, seguidos de 3 CV de la solución amortiguadora para lisis. Posteriormente, el volumen de la fracción soluble del lisado celular se adicionó a la columna cromatográfica a un flujo de 1 mL/min. Después, se realizó un lavado con 2 CV de solución amortiguadora para lisis, seguido de 3 CV de una solución amortiguadora de baja sal (50 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol y 20 mM imidazol). Acto seguido, se procedió a la elución de la proteína con 4 CV de una solución amortiguadora para elución (50 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 6.0, 50 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol y 300 mM imidazol) a un flujo de 1 mL/min. Finalmente, se realizó un lavado con 3 CV de la solución amortiguadora para elución. Para la recuperación de la columna, se hizo un lavado de 3 CV de agua destilada y 3 CV de una solución de etanol al 20 % para su almacenamiento. Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada

previamente por una membrana hidrofílica con un tamaño de poro de 0.45 μm . Cada una de las fracciones obtenidas en el tren cromatográfico, entre ellas: fracción insoluble, fracción soluble, no retenido, lavado con solución amortiguadora para lisis, lavado con solución amortiguadora de baja sal, elución de la proteína de interés y el lavado con solución amortiguadora de elución fueron analizadas por SDS-PAGE.

3.3.2.2. Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico

Como segundo proceso de purificación de la proteína de interés, la muestra obtenida de la elución de la columna de afinidad a Ni^{2+} , se purificó a través de cromatografía de intercambio catiónico en una columna HiTrap SP Fast Flow (GE Healthcare) de 1 mL. Inicialmente, la resina se equilibró con 3 volúmenes de columna de agua destilada, seguidos de 3 CV de la solución amortiguadora de equilibrio (50 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 6.0 y 50 mM NaCl). Posteriormente, el volumen de la fracción de elución de la columna de afinidad a Ni^{2+} se adicionó a la resina en la columna cromatográfica a un flujo de 1 mL/min. Luego se realizó un lavado con 3 CV de solución amortiguadora de equilibrio. Se procedió a la elución de la proteína con 10 CV de una solución amortiguadora para elución (50 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 6.0, 1.0 M NaCl y 5 Mm β -mercaptoetanol) a un flujo de 1 mL/min. Finalmente, se realizó un lavado con 10 CV de la solución amortiguadora para elución. Para la recuperación de la resina, se hizo un lavado de 3 CV de agua destilada y 3 CV de una solución de etanol al 20% para su almacenamiento. Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada, previamente, por una membrana hidrofílica con un tamaño de poro de 0.45 μm . Cada una de las fracciones obtenidas en el corrido cromatográfico, entre ellas: fracción de elución de la columna de afinidad a Ni^{2+} , no retenido, lavado con solución amortiguadora de equilibrio, elución de la proteína de interés y lavado con solución amortiguadora de elución fueron analizadas por SDS-PAGE.

3.3.2.3. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular

Para finalizar el proceso de purificación de las proteínas Sdo1 de interés, la fracción de la elución de la columna intercambio catiónico se concentró en un Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel de celulosa regenerada, con un límite nominal de peso molecular de 10 kDa hasta un volumen de 1 mL. La muestra se aplicó a la columna HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) que tiene una matriz de agarosa-dextrano, equilibrada con solución amortiguadora para exclusión molecular (50 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ pH 6.0, 250 mM NaCl y 5 mM β -mercaptoetanol), a un flujo de 0.5 mL/min. Los picos de elución se colectaron en fracciones de 2 mL. El proceso cromatográfico se realizó a temperatura ambiente. Las fracciones colectadas de la cromatografía de exclusión molecular fueron analizadas por SDS-PAGE (imágenes no mostradas).

3.3.3. Lisis de células de levadura mediante fricción

El pellet de células de levadura obtenido de la expresión de la proteína recombinante scEFL1 de 1 L de cultivo se descongeló y fue resuspendido en 20 mL de solución amortiguadora para lisis (50 mM Hepes pH 8.0, 2 M NaCl, 5 mM MgCl_2 , 40 mM imidazol y 10 % glicerol). A la suspensión anterior se le adicionaron 1 mM de PMSF, 1 mM de benzamidina y 10mM de β -mercaptoetanol. Posteriormente, la suspensión de células se vertió en el depósito de un equipo BeadBeater previamente llenado $\frac{3}{4}$ de su volumen total, con perlas de vidrio ($\phi=500 \mu\text{m}$) humedecidas, previamente, con solución amortiguadora para lisis. El depósito fue aforado, hasta su volumen máximo, con la solución amortiguadora para lisis y se selló. Las células fueron lisadas en el equipo BeadBeater durante 6 ciclos de 2 min de encendido y 15 min de reposo, a 4 °C. Finalmente, el lisado se centrifugó a 11,000 rpm, durante 50 min, en una centrifuga Thermo Scientific™ Heraeus™ Megafuge™ 16. El sobrenadante obtenido, es decir, la fracción soluble, se filtró por una membrana hidrofílica con un tamaño de poro de 0.45 μm (Merck Millipore).

3.3.4. Purificación de la proteína scEFL1

La proteína scEFL1 expresada en la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 con el plásmido pRS426-scEFL1His presenta en su carboxilo terminal, una cola de seis histidinas que interaccionan con níquel (Ni^{2+}), propiedad que fue utilizada para el primer paso de purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} . Por otro lado, se empleó cromatografía de exclusión molecular como segundo paso de purificación considerando que el peso molecular de dicha proteína es de 127.33 kDa.

3.3.4.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+}

Inicialmente, la columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de agua destilada, seguidos de 3 CV de la solución amortiguadora para lisis (50 mM Hepes pH 8.0, 2 M NaCl, 5 mM MgCl_2 , 40 mM imidazol y 10 % glicerol). Posteriormente, el volumen de la fracción soluble del lisado celular se adicionó a la columna cromatográfica a un flujo de 1 mL/min. Después, se realizó un lavado con 2 CV de solución amortiguadora para lisis, seguido de 3 CV de una solución amortiguadora de alta sal (50 mM Hepes pH 8.0 y 2 M NaCl) y después 3 CV de una solución amortiguadora de baja sal (50 mM Hepes pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 40 mM Imidazol y 10 % glicerol). Acto seguido, se procedió a la elución de la proteína con 4 CV de una solución amortiguadora para elución (50 mM Hepes pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 250 mM Imidazol y 10 % glicerol) a un flujo de 1 mL/min. Finalmente, se realizó un lavado con 3 CV de la solución amortiguadora para elución. Para la recuperación de la columna, se hizo un lavado de 3 CV de agua destilada y 3 CV de una solución de etanol al 20% para su almacenamiento. Toda solución utilizada en este procedimiento fue filtrada, previamente, por una membrana hidrofílica con un tamaño de poro de 0.45 μm . Cada una de las fracciones obtenidas en el corrido cromatográfico, entre ellas: fracción insoluble, fracción soluble, no retenido, lavado con solución amortiguadora para lisis, lavado con solución amortiguadora de alta sal, lavado con solución amortiguadora de baja sal, elución de la proteína de interés y el lavado con solución amortiguadora de elución fueron analizadas por SDS-PAGE.

3.3.4.2. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular

Para finalizar el proceso de purificación de la proteína scEFL1, la fracción de la elución de la columna de afinidad a Ni²⁺ se concentró en un Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel de celulosa regenerada, con un límite nominal de peso molecular de 100 kDa hasta un volumen de 1 mL. La muestra de 1 mL se aplicó a la columna HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) que tiene una matriz de agarosa-dextrano, equilibrada con solución amortiguadora para exclusión molecular (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % glicerol y 5 mM β-mercaptoetanol), a un flujo de 0.5 mL/min. Los picos de elución se colectaron en fracciones de 2 mL. El proceso cromatográfico se realizó a temperatura ambiente. Las fracciones colectadas de la cromatografía de exclusión molecular fueron analizadas por SDS-PAGE.

3.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

Las fracciones obtenidas en cada uno de los procesos de purificación se analizaron y caracterizaron por la técnica de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Esta técnica permite separar las proteínas cargadas negativamente en función del tamaño, de tal forma se puede determinar el peso molecular aparente de las proteínas. Por ende, se compara la movilidad electroforética (Rf) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido.

Se realizó una electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida al 12 % para las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh, y al 7.5 % para la proteína scEFL1. Para la visualización de las proteínas en el gel de poliacrilamida se utilizó el método de tinción con azul de coomassie G-250.

Preparación del gel separador al 12 %

El gel separador (0.75 mm de espesor) se preparó mezclando 2200 µL de agua destilada, 1250 µL de una solución amortiguadora de 1.5 M TrisHCl pH 8.8, 50 µL

SDS 10 %, 1500 μ L acrilamida/bisacrilamida 40%, 10 μ L TEMED y 50 μ L persulfato de amonio 10 %.

Preparación del gel separador al 7.5 %

El gel separador (0.75 mm de espesor) se preparó mezclando 2763 μ L de agua destilada, 1250 μ L de una solución amortiguadora de 1.5 M TrisHCl pH 8.8, 50 μ L SDS 10 %, 937 μ L acrilamida/bisacrilamida 40%, 10 μ L TEMED y 50 μ L persulfato amonio 10 %.

Preparación del gel concentrador al 3 %

El gel concentrador se preparó mezclando 1267 μ L de agua destilada, 500 μ L de una solución amortiguadora de 0.5 M TrisHCl pH 6.8, 20 μ L SDS 10 %, 203 μ L acrilamida/bisacrilamida 40%, 5 μ L TEMED y 25 μ L persulfato de amonio 10 %.

Una vez mezclados los componentes del gel separador, la mezcla se vertió en el dispositivo previamente armado y se cubrió la superficie del gel con isopropanol. Esto evitó el contacto del oxígeno con el gel que inhibe la reacción de polimerización y homogenizó el borde superior del mismo. Alcanzado el punto de polimerización, se eliminó el isopropanol y se lavó la parte superior del gel con agua destilada para elimina cualquier residuo de acrilamida no polimerizada. Posteriormente, se vertió la mezcla del gel concentrador sobre la superficie del gel separador y inmediatamente se insertó el peine en la solución concentradora. Al finalizar la polimerización, se retiró el peine y quedaron listos los pocillos para cargar las muestras. Las muestras se prepararon adicionando 20 μ L cada fracción a analizar y 5 μ L de solución amortiguadora de carga 4X (200 mM TrisHCl pH 6.8, 400 mM DTT, 40 % glicerol, 8% SDS y 0.4% azul de bromofenol) en un tubo eppendorf y se calentaron a 100 °C durante 5 min. La electroforesis se realizó sumergiendo el sistema conteniendo el gel polimerizado en un tanque previamente llenado con una solución amortiguadora de electroforesis 1X (25 mM Tris base, 200 mM glicina y 0.1 % SDS). Se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 80-90 min. El gel se reveló colocándolo primero en solución fijadora (40% etanol y 10 % ácido acético) por 10

min y después en una solución de tinción de azul de coomassie, por 15 min. Finalmente, el gel se destiño, con agua destilada, durante 1 h.

3.5. Cuantificación de la concentración de proteínas

La cuantificación de la concentración de las proteínas se determinó mediante espectrofotometría UV-visible debido a la propiedad de las proteínas de absorber luz en el UV a una longitud de 280nm. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible Cary® 50 (Agilent Technologies). Para la determinación de la concentración de las soluciones proteicas se aplicó la ley de Lambert-Beer (ecuación (23)) una vez obtenido el valor de la cantidad de luz absorbida por las mismas.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (23)$$

Donde A corresponde a la luz absorbida, C la concentración de la solución proteica (M), 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 (24),

$$\varepsilon_{280 nm} = a \cdot \varepsilon_{280 nm}^{Trp} \cdot b \cdot \varepsilon_{280 nm}^{Tyr} \cdot c \cdot \varepsilon_{280 nm}^{Cys} \quad (24)$$

Donde a , b y c corresponde al número de triptófanos, tirosinas y cistina presentes en la proteína. $\varepsilon_{280 nm}^{Trp}$, $\varepsilon_{280 nm}^{Tyr}$ y $\varepsilon_{280 nm}^{Cys}$ corresponden a los coeficientes de extinción molar del triptófano ($5500 M^{-1}cm^{-1}$), tirosina ($1490 M^{-1}cm^{-1}$) y cistina ($125 M^{-1}cm^{-1}$) a 280 nm respectivamente ⁴⁶. De acuerdo con lo anterior, los coeficientes de extinción molar de las proteínas usadas en este trabajo se encuentran listadas en **tabla 3**.

Tabla 3. Coeficientes de extinción molar de las proteínas scEFL1, Sdo1 silvestre y las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E.

Proteína	$\varepsilon_{280 nm} (M^{-1}cm^{-1})$	$\varepsilon_{508 nm} (M^{-1}cm^{-1})$
scEFL1	83770	-
Sdo1 silvestre	11460	-
Sdo1 V36A	11460	-
Sdo1 P144R	11460	-
Sdo1 K175E	11460	-
Lumio™Green	12500	41000

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

$$A_{280\text{ nm}} = C \cdot l \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{\text{Sdo1}} + C \cdot l \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}^{\text{lumio}} \quad (25)$$

Sabiendo la concentración de proteína total, por sustitución de la ecuación 3, y la concentración de proteína marcada con Lumio™Green a partir de la ecuación 1 a una longitud de onda de 508 nm, podemos determinar el porcentaje de proteína marcada (ecuación (26))

$$\frac{[\text{Proteína marcada}]_{508\text{ nm}}}{[\text{Proteína total}]_{280\text{ nm}}} \cdot 100 = \% \text{ Proteína marcada} \quad (26)$$

3.6. Caracterización estructural de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh por dicroísmo circular (DC)

Se analizó el contenido de estructura secundaria de las proteínas por dicroísmo circular (DC) en la región del UV lejano y se analizó la estabilidad térmica de las mismas. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) del instituto de Química de la UNAM, en un espectropolarímetro JASCO J-1500 equipado con un módulo Peltier para el control de la temperatura. Para la determinación del contenido de estructura secundaria cada una de las proteínas se preparó en una solución amortiguadora de fosfatos (25 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ pH 7.4) a una concentración de 2.9 μM. La colección de datos se realizó en un rango de las longitudes de onda de 195-260 nm a una temperatura constante de 20 °C empleando una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria de 0.2 cm. Además, se utilizó una velocidad de muestreo de 20 nm/min, una constante de tiempo experimental de 2 s, una amplitud de la banda espectral de 1.0 nm y finalmente el número de mediciones a ser promediadas fue de 3. Los valores de la señal de DC observada se transformaron a valores de elipticidad molar media por residuo (MRW del inglés mean residue weight) utilizando la ecuación (27)

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta_{obs} \cdot MRW}{10 \cdot [P] \cdot d} = \frac{(\text{miligrados}) \cdot \left(\frac{g}{mol}\right)}{10 \cdot \left(\frac{mg}{cm^3}\right) \cdot (cm)} \quad (27)$$

$$[\Theta]_{MRW} = [\text{grados} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}]$$

Donde $[\Theta]_{MRW}$ es la elipticidad molar media por residuo en grados·cm²/dmol, Θ_{obs} es la elipticidad observada en miligrados, MRW es el peso molecular medio de los residuos en g/mol, $[P]$ es la concentración de la proteína en mg/mL (o mg/cm³) y d es la longitud de trayectoria de la celda en cm.

La deconvolución de los datos se llevó a cabo con los softwares DichroWeb^{47,48} (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) en un rango de 195-260 nm y BeStSel⁴⁹ (<http://bestsel.elte.hu>) en un rango de 200-250 nm.

3.6.1. Análisis de la estabilidad térmica de las proteínas por DC

Se realizó un análisis de la estabilidad térmica para cada una de las proteínas en una solución amortiguadora de fosfatos (25 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ pH 7.4) a una concentración de 2.9 μM empleando una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria de 0.2 cm. Además, la colección de datos se realizó a una temperatura inicial de 10 °C y una temperatura final de 90 °C con un intervalo de 1 °C, un gradiente de 1.0 °C/min, un tiempo de espera de 5 s, una constante de tiempo experimental de 2 s, una amplitud de la banda espectral de 1.0 nm a una longitud de onda de 208 nm. Los datos fueron procesados a valores de elipticidad media por residuo como fue explicado anteriormente. La fracción desnaturalizada en función de la temperatura ($f_U(T)$) fue calculada de la siguiente manera:

$$f_U(T) = \frac{\theta(T) - \theta_N(T)}{\theta_U(T) - \theta_N(T)} \quad (28)$$

Donde $\theta(T)$, $\theta_N(T)$ y $\theta_U(T)$ son los valores de elipticidad observada, nativa y desnaturalizada, respectivamente.

3.6.2. Determinación de la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica

La determinación del contenido de estructura secundaria de cada una de las proteínas después de su desnaturalización por calor se realizó en un rango de las

longitudes de onda de 195-260 nm a una temperatura constante de 20 °C empleando una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria de 0.2 cm. Además, se utilizó una velocidad de muestreo de 20 nm/min, una constante de tiempo experimental de 2 s, una amplitud de la banda espectral de 1.0 nm y finalmente el número de mediciones a ser promediadas fue de 3. Los datos fueron procesados a valores de elipticidad molar media por residuo como fue explicado inicialmente. Para realizar este experimento después del análisis de la estabilidad térmica la muestra se enfrió bajo las mismas condiciones en las que fue calentado, hasta llegar a una temperatura de 20 °C. Una vez alcanzada esta temperatura, se procedió a obtener el espectro en la región del UV-lejano para determinar la estructura secundaria de la muestra.

3.7. Estudios de unión de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y mutantes con scEFL1 por anisotropía de fluorescencia

3.7.1. Marcaje con el reactivo LumioTMGreen

Las proteínas Sdo1 silvestre y las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E presentan en su amino terminal una secuencia de reconocimiento pequeña de seis residuos (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys), nombrada como etiqueta FIAshTM (Fluorescein Arsenical Hairpin binding) o etiqueta LumioTM. Esta secuencia reacciona con el colorante fluorescente 4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il)fluoresceína (LumioTMGreen), de forma altamente específica y con gran afinidad, lo que da como resultado una señal fluorescente brillante (**figura 9**).

Se mezcló 1 nmol de proteína con 2 nmol del reactivo LumioTMGreen en una solución amortiguadora para ensayos de anisotropía de fluorescencia (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % glicerol y 5 mM β-mercaptoetanol) en un volumen de 10 μL. El β-mercaptoetanol se empleó para mantener reducidos los residuos de cisteínas, para una adecuada unión de la etiqueta FIAsh y el reactivo LumioTMGreen. Se dejó incubando la reacción durante 8 h a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación, se dializó la muestra contra la misma solución amortiguadora durante toda la noche para eliminar el reactivo LumioTMGreen libre. Finalmente, se utilizó la ley de Lambert-Beer para cuantificar el % de proteína marcada con el reactivo LumioTMGreen como se indica en la sección 2.5.

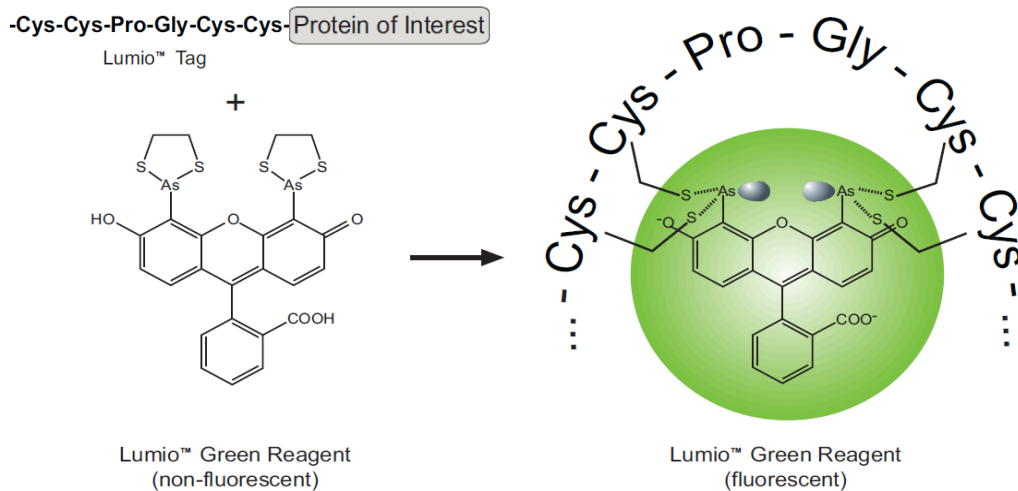


Figura 9. El reactivo de Lumio™ Green fluoresce al unirse a la etiqueta Lumio™⁵⁰.

3.7.2. Experimentos de anisotropía de fluorescencia

Se estudió la unión de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes a scEFL1 usando anisotropía de fluorescencia en un espectrofluorómetro de ISS, en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para determinar la constante de unión de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre, se tituló una solución stock de scEFL1 en una solución amortiguadora para ensayos de anisotropía (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % glicerol y 5 mM β-mercaptoetanol) que contenía 0.1 μM de Sdo1-FIAsH silvestre marcada. Cada adición fue de 2 μL con un tiempo de agitación de 30 s y 4.5 min de incubación. Finalizado el tiempo de incubación se midió la anisotropía de fluorescencia a 25 °C. Las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas fueron 500 y 535 nm, respectivamente, usando una resolución espectral de 2 nm para ambos casos.

El valor de la constante de disociación (K_d) para la proteína Sdo1-FIAsH silvestre se obtuvo a partir de la inversa de la constante de asociación (K). El valor de K se determinó ajustando los datos de anisotropía a un modelo de un sitio de unión con efecto de agotamiento de ligando^{35,38} (considerando las condiciones experimentales) como se describe en la sección 1.5.1.2.3 empleando la ecuación 8. En ésta ecuación, P es la proteína Sdo1-FIAsH silvestre, L es el ligando scEFL1, r

es la anisotropía medida, r_p es la anisotropía de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre libre; r_{pL} es la anisotropía del complejo Sdo1-FIAsH silvestre:scEFL1, K es la constante de afinidad, $[P]_t$ es la concentración total de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y $[L]_t$ es la concentración total del ligando scEFL1.

En el caso de las proteínas mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH el valor de K se determinó ajustando los datos de anisotropía a un modelo de un sitio de unión y a un modelo de dos sitios distintos de unión^{35,39}, como se describe en las secciones 1.5.1.2. (empleando la ecuación 6) y 1.5.1.2.2 (empleando la ecuación 7), respectivamente. Con base en las condiciones experimentales, para los estudios de estas mutantes, se puede asumir que la concentración del ligando es por lo menos 5 veces mayor a la concentración de la proteína ($[L] \gg [P]$) en cualquier momento de la titulación, por ende, se puede inferir que la concentración del ligando scEFL1 libre es casi igual a la concentración total del mismo ($L \approx L_t$), condiciones necesarias para emplear los modelos de un sitio de unión y de dos sitios distintos de unión.^{35,39} En la ecuación 6, P es la proteína Sdo1-FIAsH silvestre, L es el ligando scEFL1, r es la anisotropía medida, r_p es la anisotropía de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre libre; r_{pL} es la anisotropía del complejo Sdo1-FIAsH silvestre:scEFL1, K es la constante de afinidad y $[L]_t$ es la concentración total del ligando scEFL1. Por otro lado, en la ecuación 7, P es la proteína Sdo1-FIAsH silvestre, L es el ligando scEFL1, r es la anisotropía medida, r_p es la anisotropía de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre libre; r_{pL} es la anisotropía del complejo Sdo1-FIAsH silvestre:scEFL1, r_{pL_2} es la anisotropía del complejo Sdo1-FIAsH silvestre:2scEFL1, K_1 es la constante de afinidad del primer evento de unión, K_2 es la constante de afinidad del segundo evento de unión y $[L]_t$ es la concentración total del ligando scEFL1.

CAPITULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Construcción de los vectores de expresión para las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH

El vector que presenta la secuencia génica que codifica la proteína mutada en el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond de la levadura (Sdo1) -FIAsH silvestre y los vectores que presentan las secuencias génicas que codifican las proteínas mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH (obtenidos empleando el método de mutagénesis sitio-específica) fueron amplificados mediante la transformación de estos en células competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente, el plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His y los plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-His con las mutaciones respectivas insertadas fueron purificados por la técnica de lisis alcalina como se describe en la sección 3.1.5. Los productos de las purificaciones fueron analizados por la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. En la **figura 10** en el carril nombrado como WT (del inglés Wild-type) se corrió el plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His purificado, en los carriles nombrados como V36A, P144R y K175E, se corrieron lo plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-His con las mutaciones respectivas insertadas purificados, en el cual se puede observar para los cuatro casos una banda de DNA con un peso molecular de aproximadamente 3553 pb, correspondiente al peso molecular esperado. Además, se puede observar un tenue barrido en la parte superior de nuestra banda de interés, que se debe a los topoisómeros del DNA plasmídico. Por otro lado, para confirmar que las bandas de nuestro interés son del plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His y de los plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-His con las mutaciones respectivas insertadas puros se realizó el corte de los plásmidos con la enzima de restricción *Xba*I. Los productos de la digestión fueron analizados por la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. En la **figura 11**, se puede observar en los carriles nombrados como WT, V36A, P144R y K175E las muestras que fueron digeridas. Los plásmidos al ser digeridos con la enzima de restricción *Xba*I generaron para cada uno de los casos dos fragmentos con pesos moleculares de 2944 y 609 pb. Esto se debe a que la secuencia que

codifica cada una de las proteínas de Sdo1-FIAsH mutadas presenta dos sitios de corte para esta enzima.

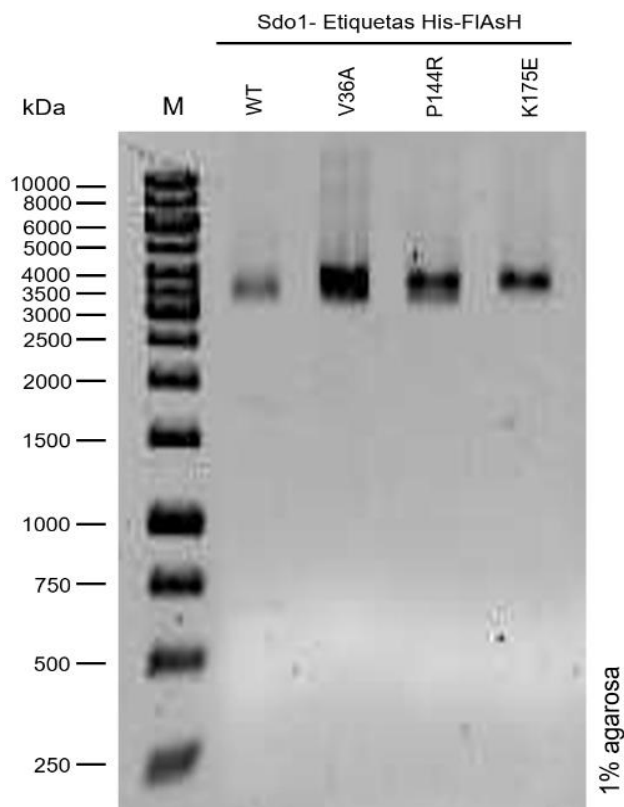


Figura 10. Purificación de los plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-His que presentan las secuencias que codifican de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH. Carril M, marcador de peso molecular; WT, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His; V36A, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-V36A-His; P144R, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-P144R-His; K175E, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-K175E-His.

Finalmente, las clonas cuyo patrón de restricción experimental coincidió con el patrón de restricción esperado (dos bandas; una con un peso de 2944 pb y otra de 591 pb) se secuenciaron con la compañía Gen Script USA Inc. para verificar la correcta inserción de las mutaciones deseadas.

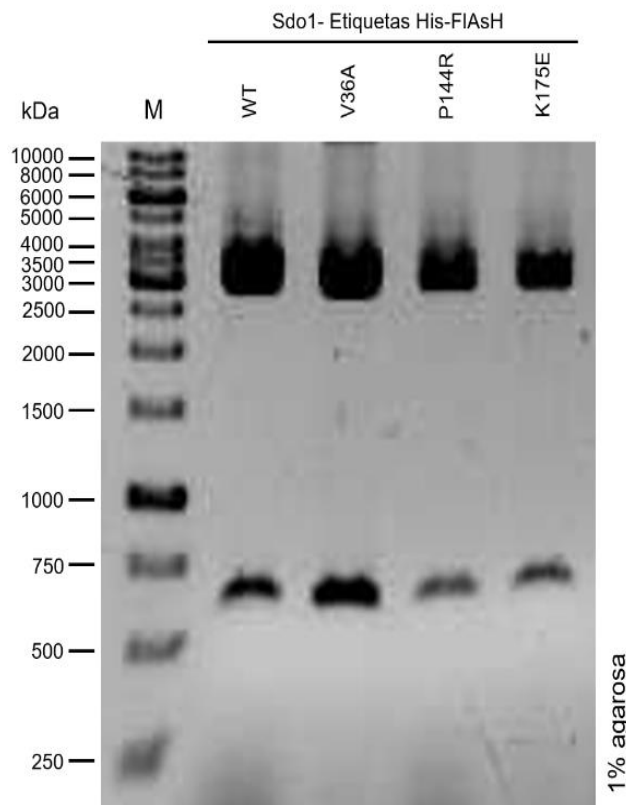


Figura 11. Restricción de los plásmidos pRSET-FIAshSdo1-His que presentan las secuencias que codifican la proteína Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh con la enzima *Xba*I.

Las secuenciaciones de los plásmidos pRSET-FIAshSdo1-His con las mutaciones respectivas insertadas se analizaron con el programa SerialCloner 2.6.1. Mediante el alineamiento de la secuencia del plásmido pRSET-FIAshSdo1-His (proteína Sdo1-FIAsh silvestre) contra la secuencia de los plásmidos pRSET-FIAshSdo1-V36A-His (**figura 12 A**), pRSET-FIAshSdo1-P1445-His (**figura 12 B**) y pRSET-FIAshSdo1-K175E-His (**figura 12 C**) se identificó el cambio del codón original por el mutante, así como el cambio del residuo de aminoácido original por el mutado. Además, a través del análisis se confirmó la secuencia respectiva para la etiqueta de seis histidinas (necesaria para realizar el proceso de purificación) en el extremo C-terminal y la secuencia para la etiqueta FIAsh (Fluorescein Arsenical Hairpin binding) de seis residuos (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) en el extremo N-terminal (necesaria para realizar los estudios de unión por anisotropía de fluorescencia). No se encontró ninguna otra mutación en la secuencia de los plásmidos analizados.

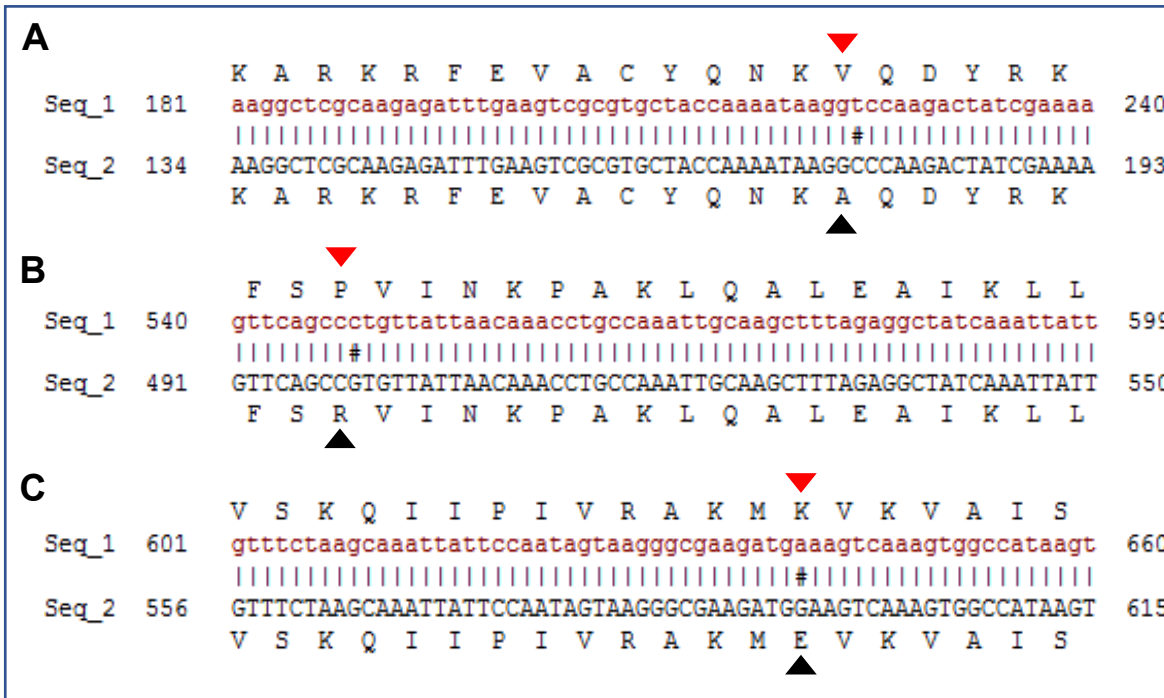


Figura 12. Alineamiento con el programa SerialCloner 2.6.1 de la secuencia del plásmido pRSET-FIAshSdo1-His (proteína Sdo1-FIAsh silvestre) contra la secuencia de los plásmidos pRSET-FIAshSdo1-V36A-His (**figura 12 A**), pRSET-FIAshSdo1-P1445-His (**figura 12 B**) y pRSET-FIAshSdo1-K175E-His (**figura 12 C**). En estos alineamientos, se señala el cambio del codón original (▽) por el mutante (▲), así como el cambio del residuo de aminoácido original por el mutado.

4.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

4.2.1. Expresión y purificación de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y mutantes

Las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh fueron expresadas en la cepa de *E. coli* C41(DE3) como se describió en la correspondiente sección de metodologías. Las proteínas fueron purificadas mediante tres técnicas de cromatografía secuencialmente. Inicialmente se empleó una cromatografía de afinidad a iones Ni²⁺, posteriormente una cromatografía de intercambio catiónico y, finalmente, una cromatografía de exclusión molecular. En la **figura 13**, se observa la proteína Sdo1-FIAsh silvestre pura obtenida mediante cromatografía exclusión molecular, la banda observada tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa lo que concuerda con el peso molecular de nuestra proteína que es de (29.542 kDa). En la **figura 14**, se muestran

los resultados de la purificación de las proteínas mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH puras obtenidas mediante cromatografía exclusión molecular, las bandas observadas en los tres casos tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa lo que concuerda con el peso molecular de nuestras proteínas (29.542 kDa).

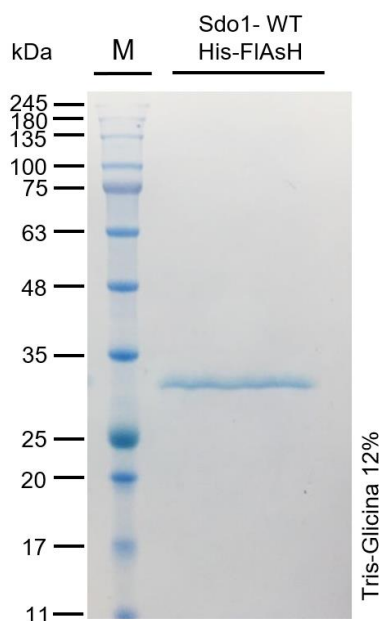


Figura 13. Proteína recombinante Sdo1-FIAsH silvestre pura obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular y analizada por SDS-PAGE.

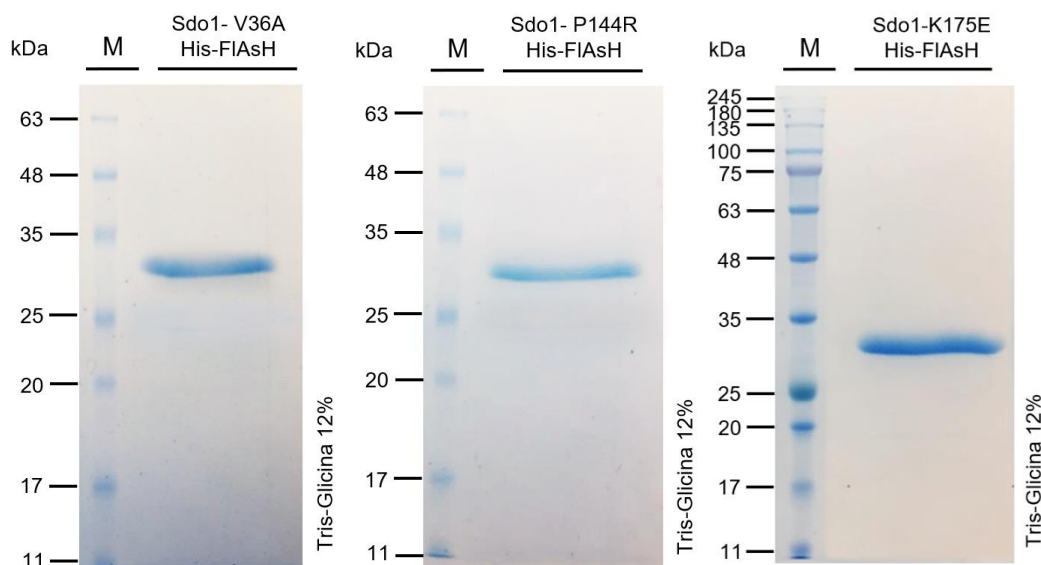


Figura 14. Proteínas mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH puras obtenidas mediante cromatografía exclusión molecular y analizadas por SDS-PAGE.

4.2.2. Expresión y purificación de la proteína scEFL1

La proteína scEFL1 expresada en la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 con el plásmido pRS426-scEFL1His fue purificada mediante dos técnicas de cromatografía secuencialmente. Inicialmente se empleó una cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} y posteriormente una cromatografía de exclusión molecular. En la **figura 15**, se observa la proteína scEFL1 purificada mediante cromatografía afinidad a iones de níquel (Ni^{2+}), la banda principal en el carril de elución tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa lo que concuerda con el peso molecular de nuestra proteína que es de (127.33 kDa). Sin embargo, se observa una gran cantidad de bandas contaminantes de menor peso molecular, es por ello que se procedió a un segundo paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. En la **figura 16**, se observa la proteína scEFL1 pura obtenida mediante cromatografía exclusión molecular, la banda observada tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa lo que concuerda con el peso molecular de nuestra proteína que es de (127.33 kDa).

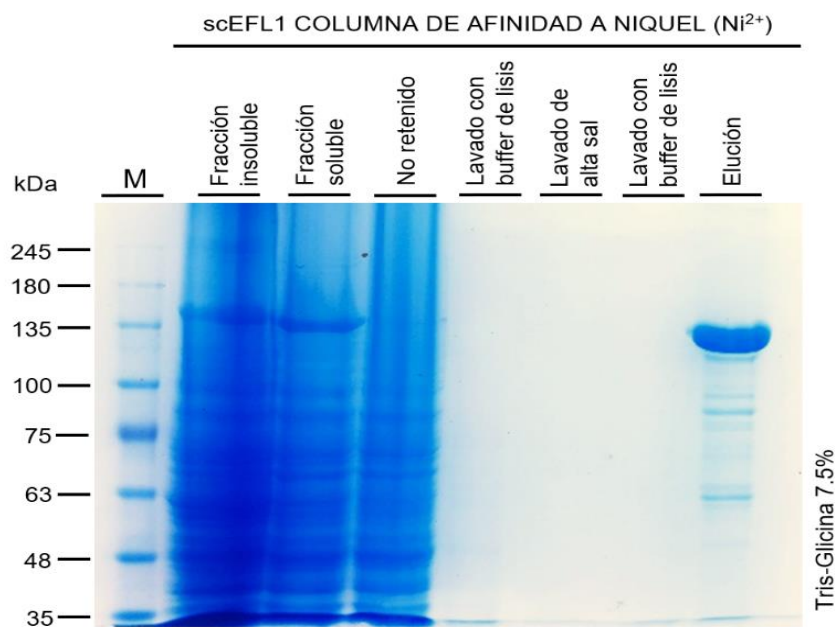


Figura 15. Proteína recombinante scEFL1 purificada mediante cromatografía de afinidad a iones de níquel (Ni^{2+}) y analizada por SDS-PAGE.

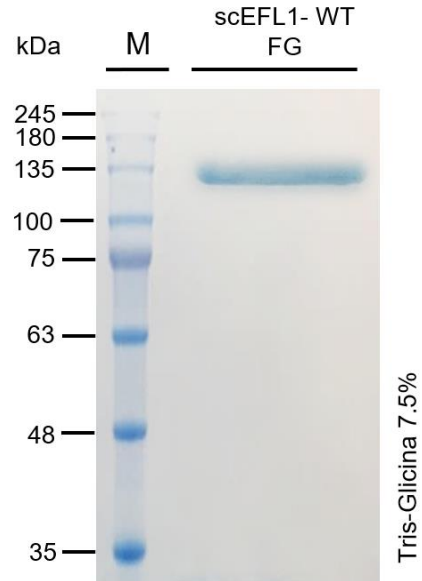


Figura 16. Proteína recombinante scEFL1 pura obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular y analizada por SDS-PAGE.

4.3. Caracterización estructural de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes mediante dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (DC) en la región del UV lejano es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas ⁵¹. Por esto se utilizó esta técnica para verificar el correcto plegamiento de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes, y hacer una comparación estructural entre ellas. En la **figura 17** se presenta el traslape de los espectros de DC en el UV lejano de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH Y K175E-FIAsH. Se observa claramente que tanto la proteína silvestre como las mutantes tienen el mismo espectro de DC en el UV lejano, lo que sugiere que el contenido de estructura secundaria se conserva. Los espectros de DC presentan las señales de un mínimo a 208 nm y a 222, así como un máximo a 195 nm. Estas señales son características de una proteína que contiene una mezcla de α -hélices y hojas β . Este dato concuerda con la estructura de SBDS humana obtenida por Finch, A. J. y colaboradores⁷, por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (PDB:2L9N).

Se han desarrollado numerosos algoritmos para la estimación de la composición de la estructura secundaria a partir de los espectros de DC. Estos métodos a menudo

no brindan resultados aceptables en proteínas mixtas α / β o ricas en estructura β .⁵² En este trabajo de investigación la deconvolución de los datos se llevó a cabo con los programas DichroWeb^{47,48}, en un rango de 195-260 nm y BeStSel⁴⁹, en un rango de 200-250 nm. El programa BeStSel emplea un algoritmo que caracteriza la estructura secundaria de proteínas mediante el uso de ocho componentes dimensionales.⁴⁹ Por otro lado, el programa DichroWeb emplea un método de deconvolución de datos basado en redes neuronales que implican el algoritmo de propagación inversa.^{47,48} Además, se realizó la predicción de la estructura secundaria de proteínas de Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes partiendo de su secuencia de aminoácidos mediante el programa RaptorX Property.⁵³ El programa RaptorX Property emplea un modelo de aprendizaje automático emergente llamado DeepCNF (campos neuronales convolucionales profundos del inglés Deep Convolutional Neural Fields) para predecir la estructura secundaria.⁵³

En las **tablas 4 y 5** se muestran los porcentajes de cada tipo de estructura secundaria para las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH obtenidos mediante los programas DichroWeb y BeStSel, respectivamente. Estos resultados obtenidos por los dos diferentes programas de deconvolución nos permiten confirmar que el contenido de estructura secundaria se conserva. Ya que las diferencias de los porcentajes de cada tipo de estructura secundaria de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes entran dentro del error experimental, como se puede observar en las tablas 4 y 5, respectivamente. Cabe mencionar que los porcentajes para cada tipo de estructura secundaria obtenidos mediante los dos programas son distintos, ya que los algoritmos que emplean para obtener estos valores son diferentes. Por otra parte, en la tabla 6, se encuentran los porcentajes predichos de cada tipo de estructura secundaria para las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes mediante el programa RaptorX Property. Entre los porcentajes de cada tipo de estructura secundaria obtenidos mediante los programas de deconvolución se observan diferencias significativas respecto a los porcentajes predichos a partir de las secuencias de las proteínas (así como, respecto al contenido porcentual de 39 % de hélices alfa y 15 % de hojas beta observados en las estructuras obtenidas por

crio-EM de la proteína SBDS humana unida a la subunidad ribosomal 60S). Esta diferencia se puede atribuir a la falta precisión de los programas empleados.

Tabla 4. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes mediante el programa DichroWeb.

Proteína	Hélice alfa	Hoja beta	Hebra al azar
Sdo1-FIAsH silvestre	26 %	21 %	53 %
Sdo1 V36A-FIAsH	25 %	21 %	55 %
Sdo1 P144R-FIAsH	23 %	22 %	54 %
Sdo1 K175-FIAsH	25 %	22 %	54 %

Tabla 5. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes mediante el programa BeStSel.

Proteína	Hélice alfa	Hoja antiparalela	Hoja paralela	Giro beta	Hebra al azar
Sdo1-FIAsH silvestre	18 %	24.9 %	0.1 %	14.1 %	42.9 %
Sdo1 V36A-FIAsH	15.5 %	23.1 %	0.4 %	14.3 %	46.6 %
Sdo1 P144R-FIAsH	20.9 %	22.4 %	0 %	14.3 %	42.4 %
Sdo1 K175-FIAsH	18.8 %	25.5 %	0 %	13.8 %	41.9 %

Tabla 6. Predicción de la estructura secundaria de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes partiendo de su secuencia de aminoácidos mediante el programa RaptorX Property.

Proteína	Hélice alfa	Hoja beta	Hebra al azar
Sdo1-FIAsH silvestre	38 %	16 %	45 %
Sdo1 V36A-FIAsH	38 %	17 %	44 %
Sdo1 P144R-FIAsH	38 %	16 %	45 %
Sdo1 K175-FIAsH	38 %	17 %	44 %

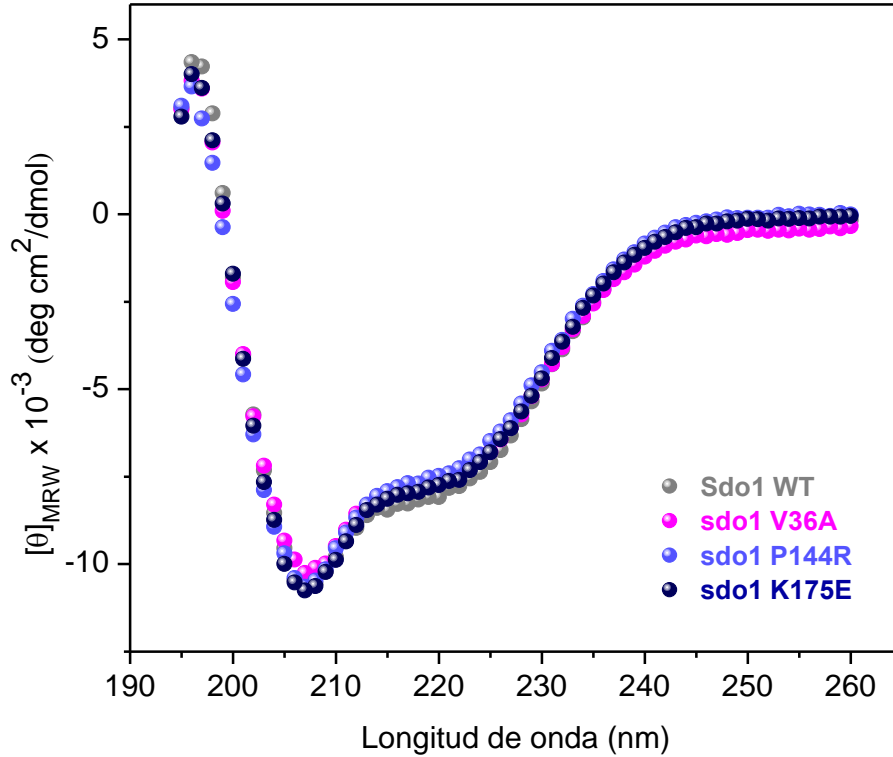


Figura 17. Espectros de DC en el UV-lejano a 20 °C de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre (●) y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh (●), P144R-FIAsh (●) y K175E-FIAsh (●).

4.3.1. Análisis de estabilidad térmica de las proteínas por CD

La estabilidad térmica de las proteínas las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh, P144R-FIAsh y K175E-FIAsh se evaluó usando dicroísmo circular (DC) siguiendo los cambios en el espectro con el aumento de temperatura a una longitud de onda de 208 nm como se describe en la sección 3.6.2. Los datos de elipticidad experimental fueron convertidos a la fracción desnaturada en función de la temperatura ($f_U(T)$) como se explica en la sección 3.6.2 (ecuación 28).

En la **figura 18**, se traslaparon los perfiles de desnaturación térmica obtenidos de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y mutantes mediante DC. En todos los casos, la desnaturación térmica indicó que la transición de las proteínas fue sigmoidea con un punto medio en la temperatura de desnaturación (T_m). Se observó que la proteína Sdo1-FIAsh silvestre fue más resistente a la perturbación térmica en comparación con las mutantes, con un inicio de despliegue de ~ 48 ° C, mientras que para la mutante Sdo1 P144R-FIAsh fue de ~ 40 ° C, para la mutante Sdo1

V36A-FIAsH fue de ~ 31 °C y para la mutante Sdo1 K175E-FIAsH fue de ~ 30 °C. A pesar de esto, la temperatura de desnaturalización (T_m) determinada para la proteína Sdo1-FIAsH silvestre es la misma que para las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH y Sdo1 P144R-FIAsH, siendo esta de 60 °C. Mientras que para la mutante Sdo1 K175E-FIAsH fue de 55 °C (**tabla 7**). Con base a esto se puede concluir que la estabilidad térmica de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre no es igual a la estabilidad térmica de las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH y Sdo1 P144R-FIAsH. Aunque tienen el mismo valor de T_m , las mutantes son menos resistente a la perturbación térmica, ya que estas comienzan a desplegarse a una temperatura mucho menor que la proteína Sdo1-FIAsH silvestre. Por otro lado, la estabilidad térmica para la mutante Sdo1 K175E-FIAsH es menor que la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y que las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH y Sdo1 P144R-FIAsH. Esta mutante es la menos estable frente a la perturbación térmica, ya que comienza a desplegarse aproximadamente a 30 °C y su T_m es de 55 °C.

En conclusión, las mutaciones introducidas en la proteína Sdo1-FIAsH disminuyen la estabilidad térmica de esta. De modo que el despliegue térmico de estas mutantes no sigue la misma transición que la proteína Sdo1-FIAsH silvestre como se observa en la **figura 18**. La mutación K175E que se encuentra localizada en el dominio III es la que más afecta (disminuye) la estabilidad térmica de la proteína. En comparación, la mutación V36A que se encuentra localizada en el dominio I tiene un efecto intermedio en la disminución de la estabilidad térmica de la proteína. Finalmente, la mutación P144R que se encuentra ubicada en el dominio II es la mutación que menos efecto provoca en la estabilidad térmica de la proteína.

Tabla 7. Temperaturas de desnaturalización (T_m) de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes obtenidas a partir del análisis de estabilidad térmico por DC a una longitud de onda de 208 nm.

Proteína	T_m (°C)
Sdo1-FIAsH silvestre	60
Sdo1 V36A-FIAsH	60
Sdo1 P144R-FIAsH	60
Sdo1 K175E-FIAsH	55

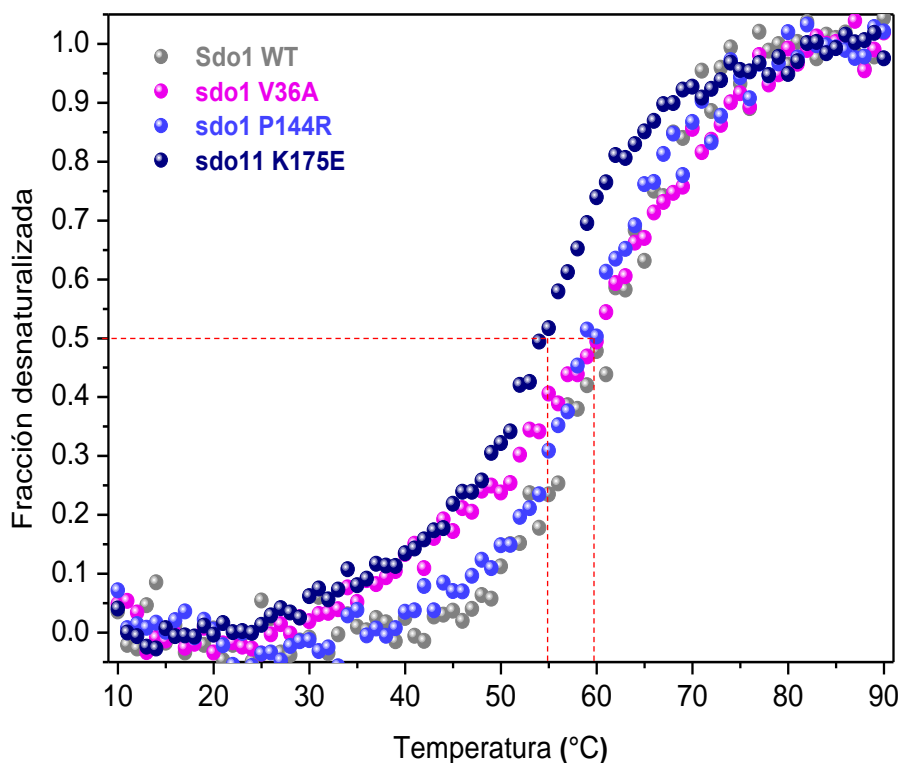


Figura 18. Perfiles de desnaturalización térmica de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre (●) y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsh (●), Sdo1 P144R-FIAsh (●) y Sdo1 K175E-FIAsh (●) a partir del cambio de elipticidad a 208 nm.

4.3.2. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas a 20 °C después de la desnaturalización térmica

Se determinó el contenido de estructura secundaria de cada una de las proteínas en estudio después de haber sido calentadas a 90 °C para evaluar si el proceso de desnaturalización térmica reversible. En la **figura 19**, se presenta la superposición de los espectros de DC en el UV lejano de las proteínas Sdo1-FIAsh silvestre y las mutantes estudiadas a 20 °C antes y después de haber sido calentadas a 90 °C. Se observa en los espectros de todas las proteínas estudiadas una disminución significativa en la intensidad de las señales después del tratamiento con calor, sin que su valor en las regiones indicativas de estructura secundaria, por ejemplo a 220 nm, haya tomado valores cercanos a cero. Lo anterior sugiere que el contenido de estructura secundaria no se recupera en su totalidad en consecuencia, el proceso de desnaturalización térmica no es reversible. La presencia de señal significativa de

elipticidad molar se puede deber a que en ocasiones la forma desplegada de una proteína posee una estructura secundaria definida, pero totalmente diferente a la forma nativa.⁵¹ Además, es de resaltar que los espectros de DC de las proteínas desnaturalizadas concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis de estabilidad térmica, ya que la mutante Sdo1 K175E-FIAsH presenta el espectro con mayor pérdida de estructura secundaria en comparación con las otras dos mutantes y la proteína silvestre. Esto se podría deber a que la mutación K175E localizada en el dominio III afecta en mayor medida la estabilidad térmica de la proteína. Por otro lado, las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH y P144R-FIAsH desnaturalizadas presentan espectros casi iguales al de la proteína silvestre desnaturalizada. Esto concuerda, con que las mutaciones V36A (dominio I) y P144R (dominio II) afectan en menor medida la estabilidad térmica de la proteína.

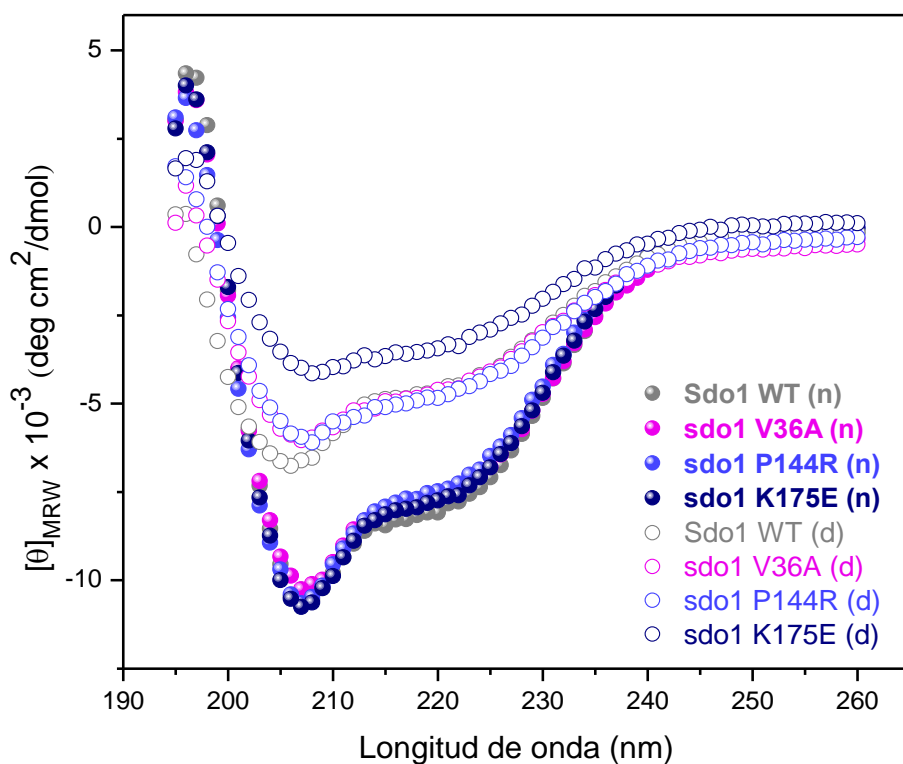


Figura 19. Comparación de los espectros de DC en el UV-lejano de las proteínas nativas (n) Sdo1-FIAsH silvestre (●) y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH (●), P144R-FIAsH (●) y K175E-FIAsH (●) respecto al de la proteína correspondiente después de haber sido sometidas a un tratamiento térmico (d).

4.4. Interacción de Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes con scEFL1 mediante anisotropía de fluorescencia

Se estudió la unión de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes a scEFL1 usando anisotropía de fluorescencia. Previo a los ensayos, las proteínas se marcaron con el reactivo LumioTMGreen, alcanzando al menos un porcentaje de marcación del 80 % a las 8 horas de reacción. De acuerdo con información previa de nuestro grupo de trabajo la interacción del ortólogo humano de EFL1 con la proteína SBDS consta de dos eventos distintos y cooperativos de unión, donde los dominios II-III de SBDS dirigen la interacción inicial con hsEFL1 como un cuerpo rígido, seguido del acoplamiento del dominio I.⁵⁴

La interacción entre scEFL1 y Sdo1-FIAsH silvestre se muestra en la **figura 20**. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de un sitio de unión con efecto de agotamiento de ligando con una K_d de 0.11 μM (**tabla 8**). Para introducir el agotamiento de ligando, la ecuación que describe la unión en el modelo está en función de la concentración total de Sdo1-FIAsH silvestre. Cabe mencionar que la K_d de 0.11 μM obtenida en este trabajo concuerda con la K_d obtenida por Luviano, A. y colaboradores⁴⁶ de $0.3 \pm 0.07 \mu\text{M}$ en el estudio de unión entre scEFL1 y Sdo1 silvestre realizado por ITC.

De acuerdo con la información previa de nuestro grupo de trabajo la interacción de hsEFL1 humana con la proteína SBDS humana consta de dos eventos distintos y cooperativos de unión (5.43 μM y 0.4 μM , respectivamente).^{54,55} En consecuencia, se esperaría que la interacción entre Sdo1 silvestre (ortólogo de levadura de SBDS) y scEFL1 (EFL1 en levadura) siga un mecanismo de interacción similar. Sin embargo, en este trabajo obtuvimos una K_d de 0.11 μM . Esto se debe a que las constantes de disociación de la interacción entre scEFL1 y Sdo1-FIAsH silvestre son muy altas y debido las condiciones experimentales empleadas solo pudimos ajustar los datos de anisotropía a una modelo de un sitio de unión con efecto de agotamiento de ligando, es decir, solo pusimos determinar la unión de scEFL1 y Sdo1-FIAsH silvestre como un evento de un solo paso.

En este trabajo de investigación los datos no se pudieron ajustar a un modelo de dos sitios de unión distintos, ya que este tipo de modelo, con efecto de agotamiento

de ligando, solo se han realizado mediante simulaciones teóricas por computadora, debido a la complejidad del análisis en sí. Por lo que, la literatura recomienda que, para el caso de las investigaciones experimentales se deben modificar las condiciones experimentales para evitar el agotamiento de ligando.⁵⁶ Por lo cual, dentro de las perspectivas de este trabajo se propone modificar las concentraciones empleadas en el experimento para evitar el efecto de agotamiento de ligando y así poder ajustar los datos experimentales a un modelo de dos sitios distintos de unión y poder verificar si la interacción de scEFL1 con la proteína Sdo1-FIAsH silvestre consta de dos eventos distintos y cooperativos como en el caso de la interacción entre hsEFL1 con la proteína SBDS humana.

Los datos obtenidos de la interacción de las mutantes Sdo1-FIAsH a scEFL1 se ajustaron a un modelo de un sitio de unión y a uno de dos sitios distintos de unión. Para todas las mutantes de Sdo1-FIAsH el ajuste que mejor describió su interacción con scEFL1 fue el modelo de dos sitios distintos de unión con cooperatividad positiva, ya que para todos los casos la $K_{d2} < K_{d1}$ como se puede observar en la **tabla 8**. En las **figuras 21, 22 y 23** se muestra el gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 V36A-FIAsH, scEFL1 y la mutante Sdo1 P144R-FIAsH, y scEFL1 y la mutante Sdo1 K175E-FIAsH, respectivamente. Por otra parte, los ajustes a un modelo de un sitio de unión que no describieron bien las interacciones de las mutantes de Sdo1-FIAsH con scEFL1 se pueden consultar en el **anexo B**.

En conclusión, los valores de las constantes de disociación K_{d1} y K_{d2} obtenidas para las mutantes de Sdo1-FIAsH se encuentran en el mismo orden de magnitud, ya que se encuentran dentro de la incertidumbre en ambos casos. Sin embargo, estas constantes de disociación son al menos un orden de magnitud más débiles que la constante de disociación de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre. Por otro lado, el hecho de que la interacción de scEFL1 y las mutantes de Sdo1-FIAsH se ajustaron mejor al modelo de dos sitios distintos de unión nos da un indicio de que la interacción de scEFL1 y Sdo1-FIAsH silvestre también consta de dos eventos distintos y cooperativos.

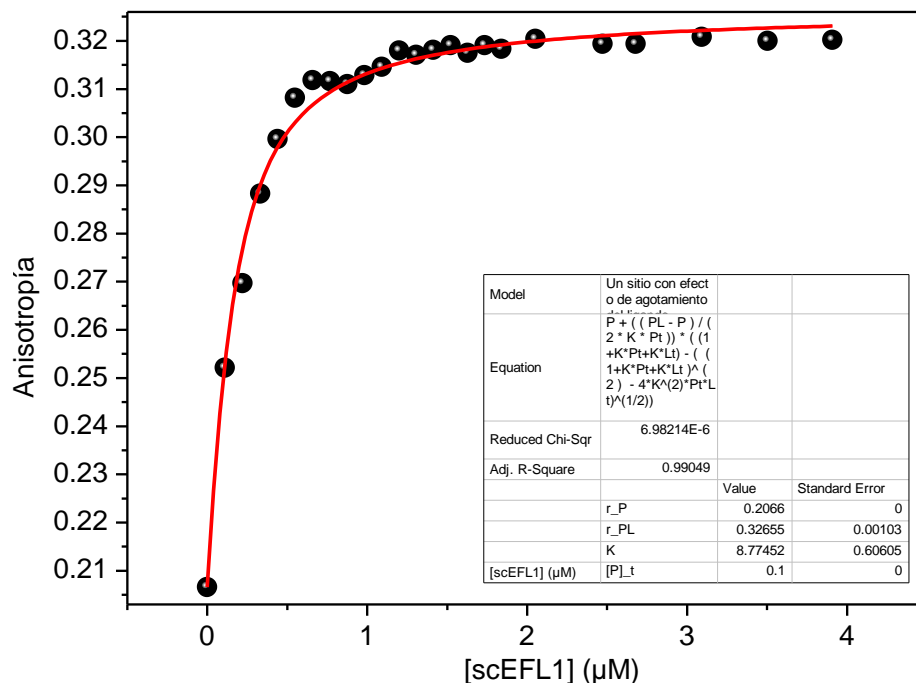


Figura 20. Interacción entre scEFL1 y Sdo1-FIAsH silvestre evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de unión de un sitio con efecto de agotamiento de ligando.

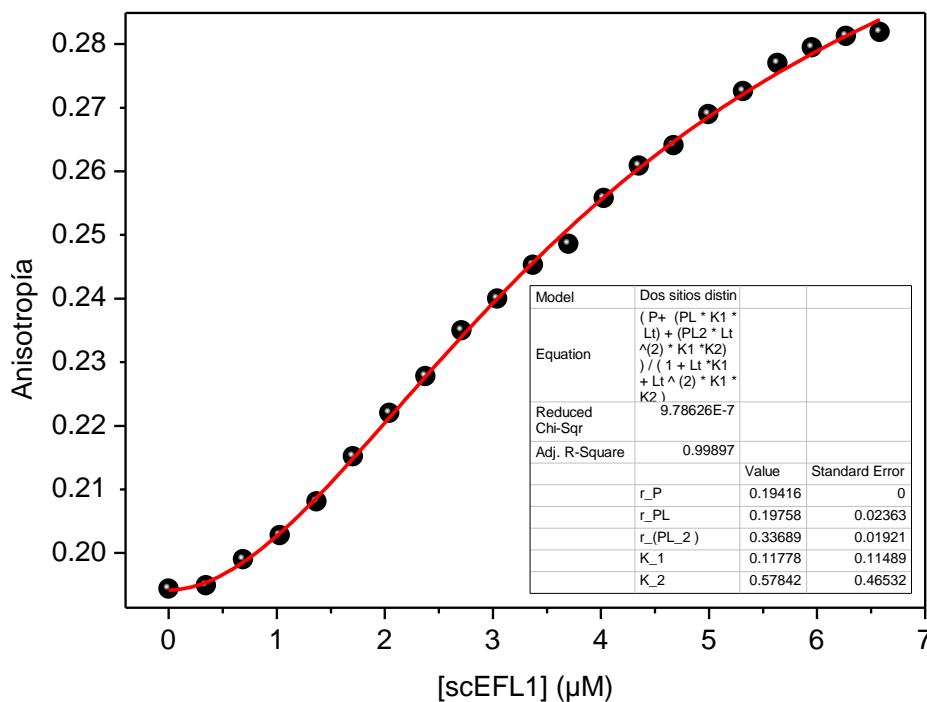


Figura 21. Interacción entre scEFL1 y la mutante Sdo1 V36A-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión.

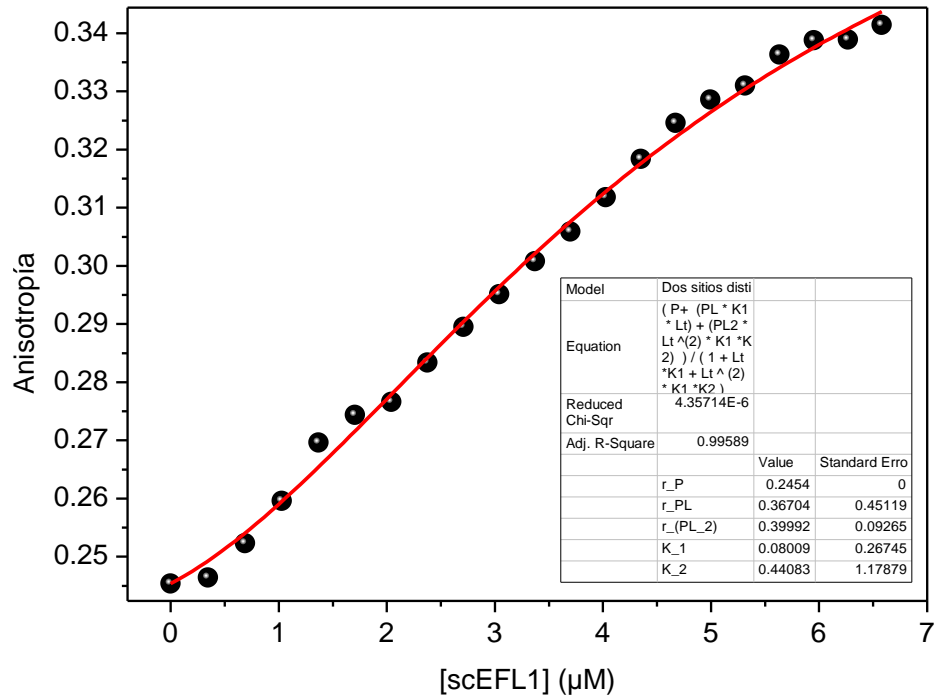


Figura 22. Interacción entre scEFL1 y la mutante Sdo1 P144R-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión.

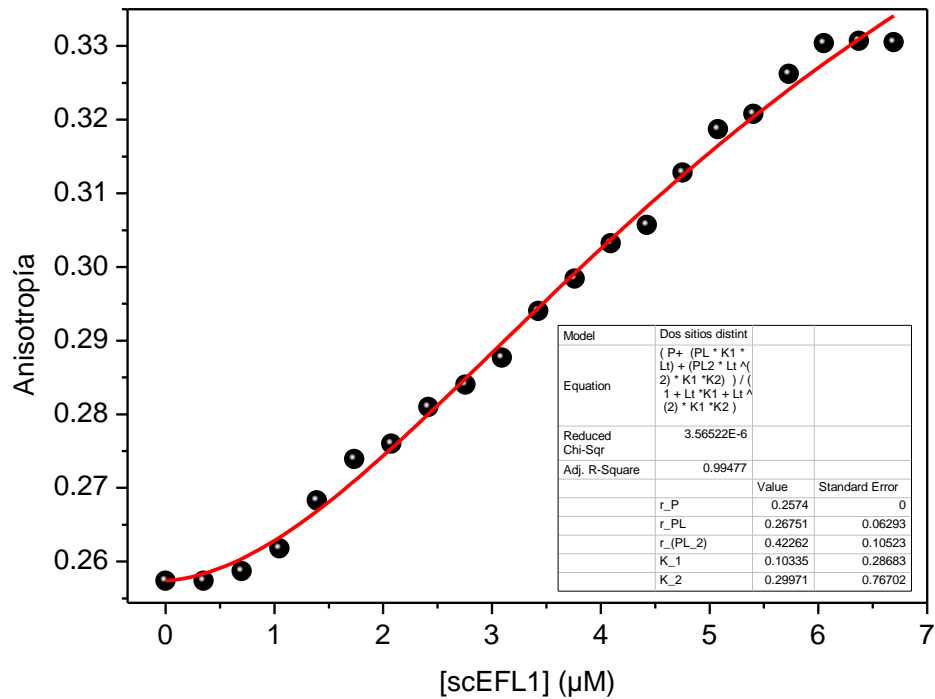


Figura 23. Interacción entre scEFL1 y la mutante Sdo1 K175E-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión.

Tabla 8. Constantes de disociación de la interacción entre scEFL1 y las proteínas Sdo1 silvestre y mutantes que rescatan el lento crecimiento de células con mutaciones en el asa-P de la proteína RPL10.

Dominio	Proteína	K_{d1} (μM)	K_{d2} (μM)
---	Sdo1-FIAsH silvestre	0.11 ± 0.008	---
I	Sdo1 V36A-FIAsH	8.49 ± 4.07	1.73 ± 0.92
II	Sdo1 P144R-FIAsH	12.49 ± 2.88	2.27 ± 0.62
III	Sdo1 K175E-FIAsH	9.68 ± 2.56	3.34 ± 0.94

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se buscó entender la ganancia de función de las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E, que Johnson, A. y colaboradores¹³ identificaron como mutaciones capaces de revertir el defecto de lento crecimiento observado por la mutación S104D, en el asa-P de RPL10. La mutante RPL10 S104D inhibe específicamente la liberación de Tif6, lo que sugiere una unión defectuosa de Sdo1 a la subunidad 60S.^{10,13} Para comprender el efecto de estas mutaciones a nivel molecular se evaluaron los cambios estructurales y de estabilidad térmica en las mutantes supresoras de Sdo1 mediante dicroísmo circular. Así como, se evaluó la interacción entre estas mutantes supresoras con scEFL1, mediante anisotropía de fluorescencia.

Los espectros de dicroísmo circular y la deconvolución de estos mostraron que las mutantes estudiadas conservan el contenido de estructura secundaria de la proteína Sdo1 silvestre. Es así como estas mutaciones mantienen su función original y, a la vez, rescatan el lento crecimiento ocasionado por la mutación RPL10 S104D.¹³ Por otro lado, los estudios de estabilidad térmica demostraron que la mutación K165E que se encuentra en el dominio III tiene un gran efecto en la disminución de la estabilidad térmica de la proteína, en comparación con las mutaciones V36A y P144R que se encuentran en el dominio I y II, respectivamente, ya que afectan en menor medida la estabilidad térmica de la proteína. Con el objetivo de caracterizar como esta disminución de la estabilidad térmica de la proteína, debido a las mutaciones localizadas en los tres dominios afecta la unión con la proteína scEFL1, se llevaron a cabo los ensayos de interacción.

Los resultados de la interacción de las mutantes con scEFL1 indicaron una constante de disociación un orden de magnitud mayor para todas las mutantes estudiadas, comparadas con la K_d obtenida para la proteína Sdo1 silvestre. Estos resultados se pueden explicar de la siguiente manera:

El dominio I, que ancla el extremo N-terminal de Sdo1 en el sitio P, es necesario para la unión de Sdo1 a la subunidad 60S.²⁸ Varias mutaciones asociadas a enfermedades en SBDS, el ortólogo humano de Sdo1, se presentan en el dominio I, lo cual disminuye la unión de Sdo1. Johnson, A. y Patchett, S. A., en el 2016,

predicen que las mutaciones en el dominio I de Sdo1 que suprimen RPL10 S104D mejoran la unión de Sdo1 en el sitio P. Las estructuras de crio-EM que han obtenido de Sdo1 unida a la subunidad 60S muestran que el residuo conservado K62 está ubicado entre el asa-P de RPL10 y H93 del ARNr 25S, lo que potencialmente hace una interacción electrostática con H93. Por tanto, las mutaciones supresoras que se encuentra en el dominio I podrían mejorar esta interacción. A lo que nosotros complementamos con base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación que la mutación Sdo1 V36A que se encuentra localizada en el dominio I, disminuye su afinidad por scEFL1 en un orden de magnitud aproximadamente. Por lo tanto, Sdo1 V36A probablemente aumenta su afinidad a la subunidad 60S y desestabiliza interacciones intra-dominio con scEFL1, como lo demuestran los resultados de este trabajo, facilitando el cambio conformacional necesario para la liberación de Tif6.

La reorganización de Sdo1 de una conformación "cerrada" a una "abierta" es facilitada por el dominio II, que sufre una rotación de 60 grados, con respecto al dominio I cuando se une a scEFL1. Este cambio conformacional es necesario para la unión y activación de scEFL1.^{15,31,33} Por lo tanto, las mutaciones en el dominio II podrían influir en la rotación y estabilizar la conformación "abierta" funcionalmente importante. Por lo que la mutación Sdo1 P144R probablemente aumenta su flexibilidad y actúa debilitando su interacción con scEFL1 en un orden de magnitud aproximadamente, promoviendo así la conformación abierta y facilitando, así, el cambio conformacional necesario para la liberación de Tif6.

En un inicio se pensó que la mutación K175E que se localiza en el dominio III podría favorecer la unión con scEFL1, debido a que esta mutación en el C-terminal se localiza en la interfase de interacción entre Sdo1 y el dominio IV de scEFL1. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que la interacción entre Sdo1 K175E y scEFL1 es debilitada en un orden de magnitud aproximadamente. Por lo que se propone que el mecanismo por el cual esta mutante suprime el defecto de RPL10 S104D es diferente. Debido a que se conoce que tras la unión de scEFL1, el dominio III se desplaza de su posición cerca del tallo P y gira en una conformación "abierta", uniéndose cerca de la hélice 69, la transición de Sdo1 de "cerrado" a "abierto" permite que scEFL1 se asocie con el centro de unión de GTPasa desocupado en la

base del tallo P. Algunos estudios han propuesto que esto impulsa a scEFL1 hacia una conformación que es incompatible con Tif6²⁸, induciendo así la liberación de Tif6. Con base en nuestros resultados se propone que la mutación K175E debilita su interacción con scEFL1, aproximadamente en un orden de magnitud, promoviendo así la conformación abierta de Sdo1 y, en consecuencia, facilitando así el cambio conformacional necesario para la liberación de Tif6. Cabe resaltar, que este mecanismo, aparentemente, sigue la misma vía que la mutante P144R, ya que ambas probablemente promueven la conformación abierta de Sdo1, facilitando así el cambio conformacional necesario para la liberación de Tif6.

Finalmente, con base en estos resultados, se propone que el mecanismo que siguen las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E para rescatar el lento crecimiento provocado por la mutación S104D en el asa-P de RPL10 es desestabilizando las interacciones intra-dominio entre Sdo1 y scEFL1 facilitando así el cambio conformacional para la liberación de Tif6. Por lo cual, las mutaciones supresoras en Sdo1, que se encuentran localizadas a lo largo de sus tres dominios, siguen el mismo mecanismo de debilitamiento de interacciones intra-dominio que siguen las mutaciones supresoras de Tif6 y scEFL1, para rescatar el lento crecimiento provocado por la mutación RPL10 S104D.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se propuso un mecanismo por el cual las mutaciones de Sdo1, que se encuentran localizadas a lo largo de los tres dominios de ésta, son capaces de aliviar el lento crecimiento observado en células de levadura con mutaciones en el asa-P de la proteína RPL10. Esto nos permitió ampliar nuestro conocimiento acerca de la función molecular de Sdo1/SBDS, scEFL1 y RPL10, y su participación en un proceso fundamental, como lo es la biogénesis ribosomal y su posible impacto en el proceso de traducción cuando hay fallas en el ensamblaje de los ribosomas, como resultado de la incapacidad de liberar a eIF6/Tif6, lo cual origina ribosomas anormales con capacidades alteradas de la traducción, que es la principal causa del desarrollo del Síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond y de otras ribosomopatías.

CAPÍTULO 7

7. PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos de la interacción entre scEFL1 y Sdo1-FIAsh silvestre por anisotropía de fluorescencia no se pudieron ajustar a un modelo de dos sitios de unión debido a que las condiciones experimentales empleadas se encontraban bajo el efecto de agotamiento de ligando. Por esta razón, se propone evaluar la interacción de scEFL1 con Sdo1-FIAsh silvestre mediante anisotropía de fluorescencia, a menores concentraciones, 10 nM y 30 μ M, respectivamente, para determinar si la interacción de scEFL1 con Sdo1-FIAsh silvestre consta de dos sitios distintos y cooperativos de unión, como en el caso de la interacción entre hEFL1 con SBDS humana.

ANEXOS

ANEXO A

Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados en la parte experimental de este trabajo de investigación fueron adquiridos por 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 antibiótico ampicilina se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El IPTG se adquirió de la compañía GoldBio Technology. Los aminoácidos no naturales se adquirieron de la compañía Bachem Américas, Inc. (Torrance, CA, EUA). Las unidades para concentración de proteínas por centrifugación, Centricon® y Centriprep®, fueron comprados a la compañía Merck Millipore. Finalmente, El reactivo Lumio Green se adquirió de Invitrogen™.

ANEXO B

Ajustes a un modelo de un sitio de unión de las interacciones de las mutantes de Sdo1-FIAsH con scEFL1.

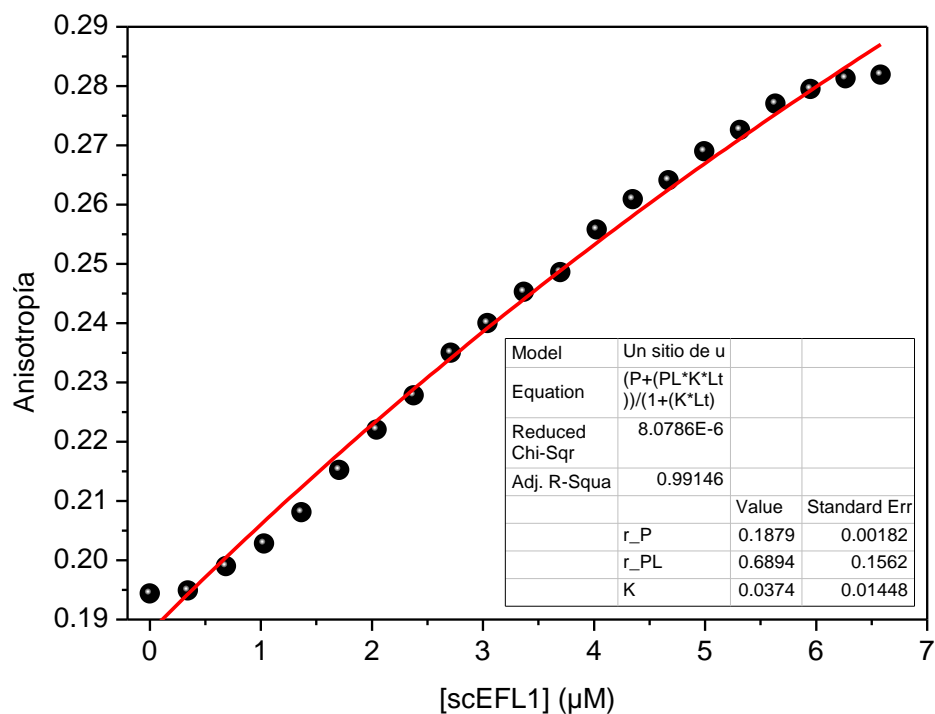


Figura 24. Gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 V36A-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.

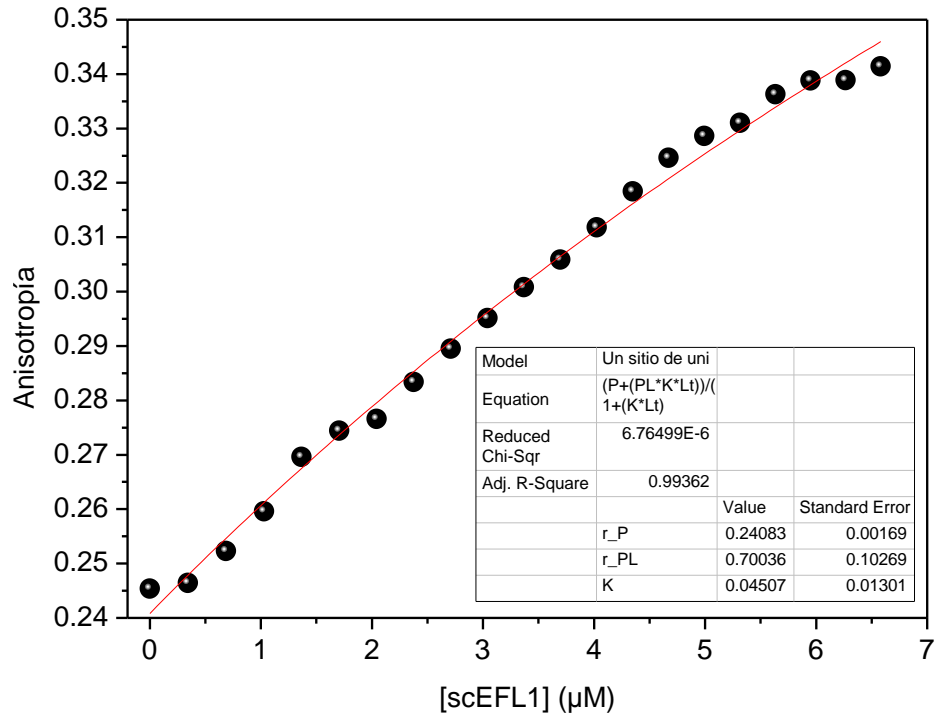


Figura 25. Gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 P144R-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.

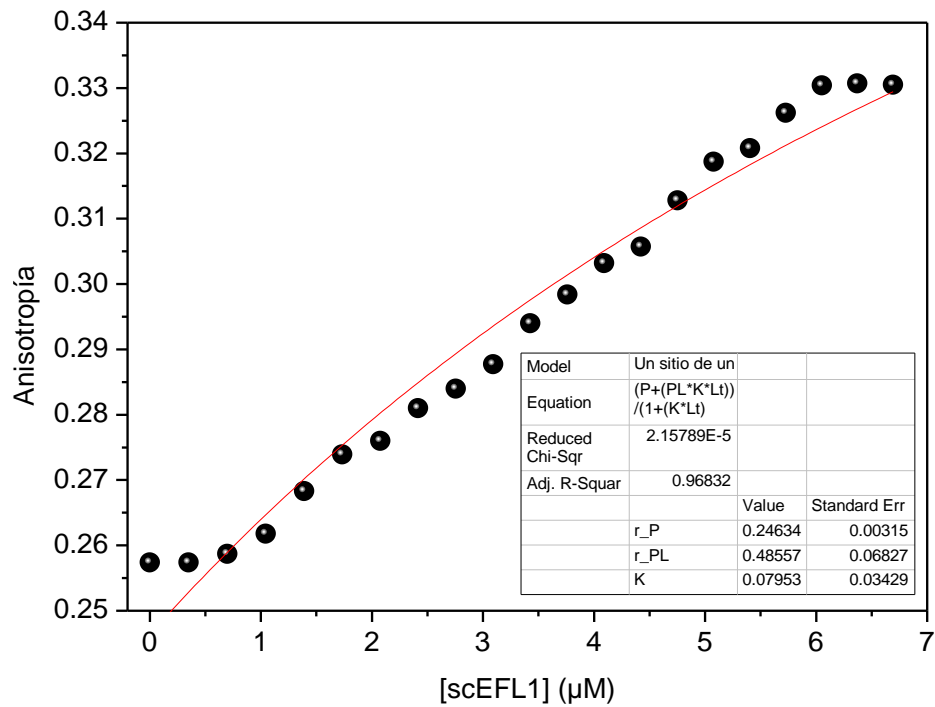


Figura 26. Gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 K175E-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ribosoma eucariota (80S) de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida por Ben-Shem, A. y colaboradores¹⁹ a una resolución de 3 Å por difracción de rayos X (PDB:4V88). _____ 2

Figura 2. Descripción general del proceso de ensamblaje del ribosoma eucariota. El ensamblaje del ribosoma requiere las tres RNA polimerasas: Pol I que sintetiza el precursor del rRNA 35S, Pol III que sintetiza el rRNA 5S y Pol II que sintetiza snoRNAs y mRNA de proteínas ribosomales, que también codifican las proteínas ribosomales (r-proteínas). Durante la transcripción, el pre-rRNA se pliega, se procesa nucleolíticamente y se modifica (p. Ej., metilado o pseudouridinilado). Ya en esta etapa temprana, los factores de ensamblaje de ribosomas y las r-proteínas se ensamblan con el pre-rRNA naciente para formar partículas preribosomales que, posteriormente, atraviesan por más etapas de maduración, pasando así desde el nucleolo y a través del nucleoplasma al citoplasma, donde las subunidades maduras 60S y 40S se unen para formar a los ribosomas 80S, que traducen los mRNA en proteínas.¹ _____ 4

Figura 3. Ubicación de los residuos de aminoácidos V36 (dominio I), V144 (dominio II) y R173 (dominio III) en la estructura de SBDS humana obtenida por Finch, A. J. y colaboradores⁷ por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (PDB:2L9N). Estructura modificada usando el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>). _____ 13

Figura 4. Esquema conceptual del uso de la anisotropía para medir la unión de una molécula con otra molécula de mayor tamaño. La esfera rosa es una molécula que se encuentra etiquetada con un fluoróforo (esfera verde). En la molécula marcada con un fluoróforo, tanto los movimientos de giro segmentarios como los globales contribuirán a la movilidad del fluoróforo en la solución. Ambos tipos de movimiento estarán restringidos al unirse a la molécula de mayor tamaño (elipsoide azul). Imagen modificada de.³⁵ _____ 14

Figura 5. Diagrama esquemático para la medición de anisotropías de fluorescencia.³⁴ _____ 15

Figura 6. Mapa del vector de expresión pRSET A utilizado para la inserción de la secuencia de DNA que codifica para la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las

mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH. El mapa se realizó con el programa SnapGene. _____	25
Figura 7. Mapa del vector de expresión pRS426 utilizado para la inserción de la secuencia de DNA que codifica para la proteína scEFL1. El mapa se realizó con el programa SnapGene. _____	26
Figura 8. Diagrama de flujo del método de mutagénesis sitio-específica de un solo cebador. El plásmido parental se muestra en color gris y las dos cadenas sintetizadas por PCR se muestran en rojo y azul. La letra x marca la posición de la mutación. Imagen modificada de. ⁴⁵ _____	28
Figura 9. El reactivo de Lumio™Green fluoresce al unirse a la etiqueta Lumio™ ⁵⁰ . _____	46
Figura 10. Purificación de los plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-His que presentan las secuencias que codifican de la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH. Carril M, marcador de peso molecular; WT, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His; V36A, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-V36A-His; P144R, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-P144R-His; K175E, plásmido pRSET-FIAsHSdo1-K175E-His. _____	49
Figura 11. Restricción de los plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-His que presentan las secuencias que codifican la proteína Sdo1-FIAsH silvestre y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH con la enzima XbaI. _____	50
Figura 12. Alineamiento con el programa SerialCloner 2.6.1 de la secuencia del plásmido pRSET-FIAsHSdo1-His (proteína Sdo1-FIAsH silvestre) contra la secuencia de los plásmidos pRSET-FIAsHSdo1-V36A-His (figura 12 A), pRSET-FIAsHSdo1-P1445-His (figura 12 B) y pRSET-FIAsHSdo1-K175E-His (figura 12 C). En estos alineamientos, se señala el cambio del codón original (∇) por el mutante (Δ), así como el cambio del residuo de aminoácido original por el mutado. _____	51
Figura 13. Proteína recombinante Sdo1-FIAsH silvestre pura obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular y analizada por SDS-PAGE. _____	52
Figura 14. Proteínas mutantes Sdo1 V36A-FIAsH, P144R-FIAsH y K175E-FIAsH puras obtenidas mediante cromatografía exclusión molecular y analizadas por SDS-PAGE. _____	52

- Figura 15. Proteína recombinante scEFL1 purificada mediante cromatografía de afinidad a iones de níquel (Ni^{2+}) y analizada por SDS-PAGE. _____ 53
- Figura 16. Proteína recombinante scEFL1 pura obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular y analizada por SDS-PAGE. _____ 54
- Figura 17. Espectros de DC en el UV-lejano a 20 °C de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre (●) y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH (●), P144R-FIAsH (●) y K175E-FIAsH (●). _____ 57
- Figura 18. Perfiles de desnaturalización térmica de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre (●) y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH (●), Sdo1 P144R-FIAsH (●) y Sdo1 K175E-FIAsH (●) a partir del cambio de elipticidad a 208 nm. _____ 59
- Figura 19. Comparación de los espectros de DC en el UV-lejano de las proteínas nativas (n) Sdo1-FIAsH silvestre (●) y las mutantes Sdo1 V36A-FIAsH (●), P144R-FIAsH (●) y K175E-FIAsH (●) respecto al de la proteína correspondiente después de haber sido sometidas a un tratamiento térmico (d). _____ 60
- Figura 20. Interacción entre scEFL1 y Sdo1-FIAsH silvestre evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de unión de un sitio con efecto de agotamiento de ligando. _____ 63
- Figura 21. Interacción entre scEFL1 y la mutante Sdo1 V36A-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión. _ 63
- Figura 22. Interacción entre scEFL1 y la mutante Sdo1 P144R-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión. _ 64
- Figura 23. Interacción entre scEFL1 y la mutante Sdo1 K175E-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de dos sitios distintos de unión. _ 64
- Figura 24. Gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 V36A-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión. _____ 72

Figura 25. Gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 P144R-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión. _____ 73

Figura 26. Gráfico de unión entre scEFL1 y la mutante Sdo1 K175E-FIAsH evaluado mediante anisotropía de fluorescencia. La línea roja corresponde al ajuste mediante regresión no lineal a un modelo de un sitio de unión. _____ 73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales empleadas para las reacciones de PCR. _____	30
Tabla 2. Condiciones de amplificación de la PCR _____	30
Tabla 3. Coeficientes de extinción molar de las proteínas scEFL1, Sdo1 silvestre y las mutantes Sdo1 V36A, P144R y K175E. _____	42
Tabla 4. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes mediante el programa DichroWeb. _____	56
Tabla 5. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes mediante el programa BeStSel. _____	56
Tabla 6. Predicción de la estructura secundaria de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes partiendo de su secuencia de aminoácidos mediante el programa RaptorX Property. _____	56
Tabla 7. Temperaturas de desnaturalización (T_m) de las proteínas Sdo1-FIAsH silvestre y mutantes obtenidas a partir del análisis de estabilidad térmico por DC a una longitud de onda de 208 nm. _____	58
Tabla 8. Constantes de disociación de la interacción entre scEFL1 y las proteínas Sdo1 silvestre y mutantes que rescatan el lento crecimiento de células con mutaciones en el asa-P de la proteína RPL10. _____	65

BIBLIOGRAFIA

1. Baßler, J. and Hurt, E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **88**, 8.1-8.26 (2019).
2. Zhou, D., Zhu, X., Zheng, S., Tan, D., Dong, M. and Ye, K. Cryo-EM Structure of an Early Precursor of Large Ribosomal Subunit Reveals a Half-Assembled Intermediate. *Protein Cell.* **10**, 120–130 (2019).
3. Jenner, L., Melnikov, S., de Loubresse, N. G., Ben-shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G. and Yusupov, M. Crystal Structure of the 80S Yeast Ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 759–767 (2012).
4. Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B. and Dahl, N. The Gene Encoding Ribosomal Protein S19 is Mutated in Diamond-Blackfan Anaemia. *Nat. Genet.* **21**, 169–175 (1999).
5. Bohnsack, K. E. and Bohnsack, M. T. Uncovering the Assembly Pathway of Human Ribosomes and its Emerging Links to Disease. *EMBO J.* **38**, 1–20 (2019).
6. Menne, T. F., Goyenechea, B., Sánchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Brost, R. L., Costanzo, M., Boone, C. and Warren, A. J. The Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Protein Mediates Translational Activation of Ribosomes in Yeast. *Nat. Genet.* **39**, 486–495 (2007).
7. Finch, A. J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L. F., Simpson, P., Goyenechea, B., Menne, T. F., Santos, C. S. D., Arends, M. J., Donadieu, J., Bellanne, C., Costanzo, M., Boone, C., Mckenzie, A. N., Freund, S. M. V. and Warren, A. J. Uncoupling of GTP Hydrolysis from eIF6 Release on the Ribosome Causes Shwachman-Diamond Syndrome. *Genes Dev.* **25**, 917–929 (2011).
8. Tan, S., Kermasson, L., Hoslin, A., Jaako, P., Faille, A., Acevedo-Arozena, A., Lengline, E., Ranta, D., Poirée, M., Fenneteau, O., Ducou le Pointe, H., Fumagalli, S., Beaupain, B., Nitschké, P., Bóle-Feysot, C., de Villartay, J. P., Bellanné-Chantelot, C., Donadieu, J., Kannengiesser, C., Warren, A. J. and

- Revy, P.. EFL1 Mutations Impair eIF6 Release to Cause Shwachman-Diamond Syndrome. *Blood*. **134**, 277–290 (2019).
9. Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H.D., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Lafontaine, D. L.J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, C. M.T., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A. J., Williamson, J. R., Wilson, D., Yonath, A. and Yusupov, M. A New System for Naming Ribosomal Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 165–169 (2014).
 10. Bussiere, C., Hashem, Y., Arora, S., Frank, J. and Johnson, A. W. Integrity of the P-Site is Probed During Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *J. Cell Biol.* **197**, 747–759 (2012).
 11. Sulima, S. O., Gülay, S. P., Anjos, M., Patchett, S., Meskauskas, A., Johnson, A. W. and Dinman, J. D. Eukaryotic RPL10 Drives Ribosomal Rotation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2049–2063 (2014).
 12. Lo, K. Y., Li, Z., Bussiere, C., Bresson, S., Marcotte, E. M. and Johnson, A. W. Defining the Pathway of Cytoplasmic Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *Mol. Cell.* **39**, 196–208 (2010).
 13. Patchett, S. A. Investigating the Consequences of Human Disease Related Mutations on 60S Ribosome Assembly and Function in Yeast. (The University of Texas at Austin, 2016).
 14. Taylor, D. J., Devkota, B., Huang, A. D., Topf, M., Narayanan, E., Sali, A., Harvey, S. C. and Frank, J. Comprehensive Molecular Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Structure*. **17**, 1–29 (2009).
 15. Woolford, J. L. J. and Baserga, S. J. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **195**, 643–681 (2013).
 16. Panse, V. G. and Johnson, A. W. Maturation of Eukaryotic Ribosomes : Acquisition of Functionality. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 260–266 (2010).
 17. de la Cruz, J., Karbstein, K. and Woolford Jr., J. L. Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. *Annu Rev Biochem.* **84**, 93–129 (2016).
 18. Klinge, S. and Woolford Jr, J. L. Ribosome Assembly Coming into Focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 116–131 (2019).

19. Ben-Shem, A., de Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*. **334**, 1524–1529 (2011).
20. Barandun, J., Hunziker, M. and Klinge, S. Assembly and Structure of the SSU Processome - A nucleolar Precursor of the Small Ribosomal Subunit. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **49**, 85–93 (2018).
21. Warren, A. J. Molecular Basis of the Human Ribosomopathy Shwachman-Diamond Syndrome. *Adv. Biol. Regul.* **67**, 109–127 (2018).
22. Farley-barnes, K. I., Ogawa, L. M. and Baserga, S. J. Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. *Trends Genet.* **35**, 754–767 (2019).
23. Bezzerri, V. and Cipolli, M. Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives. *Mol. Diagnosis Ther.* **23**, 281–290 (2019).
24. Boocock, G. R. B., Morrison, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. R. and Rommens, J. M. Mutations in SBDS Are Associated with Shwachman–Diamond Syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 97–101 (2003).
25. Zanni, G., Kalscheuer, V. M., Friedrich, A., Barresi, S., Alfieri, P., Capua, M. D., Haas, S. A., Piccini, G., Karl, T., Klauck, S. M., Bellacchio, E., Emma, F., Cappa, M., Bertini, E. and Breitenbach-Koller, L. A Novel Mutation in RPL10 (Ribosomal Protein L10) Causes X-Linked Intellectual Disability , Cerebellar Hypoplasia, and Spondylo-Epiphyseal Dysplasia. *Hum. Mutat.* **36**, 1155–1158 (2015).
26. Bourque, D. K., Bourque, D. K., Hartley, T., Nikkel, S. M., Pohl, D., Tétreault, M., Kernohan, K. D. and Dymont, D. A. A de Novo Mutation in RPL10 Causes a Rare X-Linked Ribosomopathy Characterized by Syndromic Intellectual Disability and Epilepsy: A New Case and Review of the Literature. *Eur. J. Med. Genet.* **61**, 89-93 (2017).
27. Brooks, S. S., Wall, A. L., Golzio, C., Reid, D. W., Kondyles, A., Willer, J. R., Botti, C., Nicchitta, C. V., Katsanis, N. and Davis, E. E. I. A Novel Ribosomopathy Caused by Dysfunction of X-Linked Microcephaly in Humans. *Genetics*. **198**, 723–733 (2014).

28. Weis, F., Giudice, E., Churcher, M., Jin, L., Hilcenko, C., Wong, C. C., Traynor, D., Kay, R. R. and Warren, A. J. Mechanism of eIF6 Release from the Nascent 60S Ribosomal Subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 914–919 (2015).
29. Shamma, C., Menne, T. F., Hilcenko, C., Michell, S. R., Goyenechea, B., Boocock, G. R. B., Durie, P. R., Rommens, J. M. and Warren, A. J. Structural and Mutational Analysis of the SBDS Protein Family Insight into the Leukemia-Associated Shwachman-Diamond Syndrome. *J. Biol. Chem.* **280**, 19221–19229 (2005).
30. Savchenko, A., Krogan, N., Cort, J. R., Evdokimova, E., Lew, J. M., Yee, A. A., Sa, 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. The Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Protein Family is Involved in RNA Metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**, 19213–19220 (2005).
31. Ng, C. L., Waterman, D. G., Koonin, E. V., Walters, A. D., Chong, J. P. J., Isupov, M. N., Lebedev, A. A., Bunka, D. H. J., Stockley, P. G., Ortiz-lombardía, M. and Antson, A. A. Conformational Flexibility and Molecular Interactions of an Archaeal Homologue of the Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Protein. *BMC Struct. Biol.* **9**, 1–5 (2009).
32. Senger, B., Lafontaine, D. L. J., Graindorge, J. S., Gadai, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J. M., Breitenbach, M., Hurt, E. and Fasiolo, F. The Nucle (ol) ar Tif6p and EFL1p Are Required for a Late Cytoplasmic Step of Ribosome Synthesis. *Mol. Cell.* **8**, 1363–1373 (2001).
33. Siliqi, D., Foadi, J., Mazzorana, M., Altamura, D., Méndez-Godoy, A. and Sánchez-Puig, N. Conformational Flexibility of Proteins Involved in Ribosome Biogenesis: Investigations via Small Angle X-ray Scattering (SAXS). *Crystals.* **8**, 1–12 (2018).
34. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).
35. *Biophysical Approaches to Translational Control of Gene Expression*. (Springer, 2013).
36. Rasmussen, T. Ligand Binding Assays on the Basis of Fluorescence Anisotropy. *Edinburgh Instruments.* **2**, 1–2 (2018).

37. Rossi, A. M. and Taylor, C. W. Analysis of Protein-Ligand Interactions by Fluorescence Polarization. *Nat. Protoc.* **6**, 365–387 (2011).
38. Jiang, B., Aliyan, A., Cook, N. P., Augustine, A., Bhak, G., Maldonado, R., McWilliams, A. D. S., Flores, E. M., Mendez, N., Shahnawaz, M., Godoy, F. J., Montenegro, J., Moreno-gonzalez, I. and Mart, A. A. Monitoring the Formation of Amyloid Oligomers Using Photoluminescence Anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 15605–15610 (2019).
39. Wilson, G. M. RNA Folding and RNA-Protein Binding Analyzed by Fluorescence Anisotropy and Resonance Energy Transfer. *Rev. Fluoresc.* **2**, 223–243 (2005).
40. Addgene. Plasmid: pRSET-A. <https://www.addgene.org/vector-database/3990/>. [10 de marzo de 2020].
41. Addgene. Plasmid: pRS426. <https://www.addgene.org/vector-database/3989/>. [10 de marzo de 2020].
42. Glenn, K. OverExpress™ C41(DE3) and C43(DE3) Competent Cells. *Lucigen* <https://www.lucigen.com/OverExpress-C41-DE3-and-C43-DE3-Competent-Cells/> [11 de marzo de 2020].
43. Bell, C. E. and Lewis, M. A Closer View of the Conformation of the Lac Repressor Bound to Operator. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 209–214 (2000).
44. Macbeth, M. R. and Bass, B. L. Large-Scale Overexpression and Purification of ADARs from *Saccharomyces cerevisiae* for Biophysical and Biochemical Studies. *Methods Enzymol.* **424**, 319–331 (2007).
45. Edelheit, A., Hanukoglu, A. and Hanukoglu, I. Simple and Efficient Site-Directed Mutagenesis Using Two Single-Primer Reactions in Parallel to Generate Mutants for Protein Structure-Function Studies. *BMC Biotechnol.* **9**, 1–8 (2009).
46. Luviano, A., Cruz-Castañeda, R., Sánchez-Puig, N. and García-Hernández, E. Cooperative Energetic Effects Elicited by the Yeast Shwachman-Diamond Syndrome Protein (Sdo1) and Guanine Nucleotides Modulate the Complex Conformational Landscape of the Elongation Factor-Like 1 (Efl1) GTPase. *Biophys. Chem.* **247**, 13–24 (2019).
47. Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein Secondary Structure Analyses from

- Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers*. **89**, 392–400 (2007).
48. Whitmore, L. and Wallace, B. A. DICHROWEB, an Online Server for Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopic Data. *Nucleic Acids Res.* **32**, 668–673 (2004).
 49. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M. and Kardos, J. BeStSel: A Web Server for Accurate Protein Secondary Structure Prediction and Fold Recognition from the Circular Dichroism Spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**, W315–W322 (2018).
 50. Life technologies. *Lumio™ Green Detection Kit*. (2012).
 51. Ranjbar, B. and Gill, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A review. *Chem. Biol. Drug Des.* **74**, 101–120 (2009).
 52. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M. and Kardos, J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3095–E3103 (2015).
 53. Wang, S., Li, W., Liu, S. and Xu, J. RaptorX-Property: A Web Server for Protein Structure Property Prediction. *Nucleic Acids Res.* **44**, W430–W435 (2016).
 54. Gijsbers, A., Montagut, D. C., Méndez-Godoy, A., Altamura, D., Saviano, M., Siliqi, D. and Sánchez-Puig, N. Interaction of the GTPase Elongation Factor Like-1 with the Shwachman-Diamond Syndrome Protein and Its Missense Mutations. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–16 (2018).
 55. Méndez-Godoy, A. Estudios de Interacción Entre las Proteínas EFL1 y Sdo1 Mediane Doble Híbrido en Levadura. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2015).
 56. Scaramellini-Carter, C. M., Leighton-Davies, J. R. and Charlton, S. J. Miniaturized Receptor Binding Assays: Complications Arising from Ligand Depletion. *J. Biomol. Screen.* **12**, 255-266 (2007).