

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biología

Instituto de Fisiología

“Acoplamiento molecular proteína-proteína del complejo

“Ubiquitina E2 E3/ pRCBTB1/Culina-3”.

Tesis para obtener el Título de Licenciado en Biología

Presenta: C. Julio Cesar Cordero Olivares

Directora de Tesis:

Dra. Claudia Mancilla Simbro

Codirector de Tesis:

Dr. Alberto Ramírez Mata

Otoño 2025

Puebla Pue. México

Agradecimientos

Esta tesis de licenciatura no habría sido posible sin el apoyo invaluable de muchas personas. En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis papas quienes me motivaron a seguir adelante y me brindaron su respaldo a lo largo de toda mi carrera profesional y personal ya que sin ellos no lo hubiera logrado y a mis hermanos por estar siempre conmigo en cada momento.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Claudia Mancillo Simbro, por su invaluable guía, compromiso y paciencia a lo largo de este proceso. Su conocimiento, dedicación y apoyo constante fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por enseñarme con exigencia y generosidad, y por brindarme siempre un espacio para crecer tanto académica como personalmente. Su ejemplo profesional y humano ha dejado una huella imborrable en mi formación.

Este logro no habría sido posible sin su acompañamiento. Gracias infinitas, doctora.

Sin olvidar a Fernando parte fundamental en mi asesoramiento de nuevas técnicas y enfoques que yo desconocía y motivarme a seguir adelante cuando yo no sabía que más hacer, por enseñarme y dedicar parte de su valioso tiempo.

Índice de contenido

Contenido

1. Resumen	9
2. Introducción	11
3. Antecedentes	18
3.1 Distrofias de retina hereditaria (Inherited retinal dystrophies: IRDs)	18
3.2 RCBTB1 y su función en la retina	19
3.3 Importancia del análisis bioinformático en el estudio de las distrofias de retina .	21
3.4 Antecedentes directos de RCBTB1	22
4. Planteamiento del problema	26
5. Justificación	28
6. Hipótesis	30
7. Objetivos	31
7.1 Objetivo general.....	31
7.2 Objetivos particulares	31
8. Material y métodos	32
8.1 Búsqueda de las estructuras experimentales molde	32
8.2 Búsqueda de las secuencias fasta de proteínas	32
8.3 Modelado <i>in silico</i>	32
8.5 Minimización de los modelos estructurales	33
8.6 Acoplamiento molecular proteína/proteína	34
8.7 Minimización de las interfaces predichas por el AMPP	35
8.10 Determinación de propiedades quimiométricas.....	35
8.11 Simulación de la energía de interacción	36
9. Resultados	37
9.1 Búsqueda de las estructuras experimentales molde	37
9.2 Modelos <i>in silico</i> generados de los dominios RCC1, BTB y proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3.	39
9.3 Minimización de estructuras	41
9.4 Acoplamiento molecular.....	48
9.6 Quimiometría de las interfaces predichas por el docking	53
9.7 Enlaces proteína/proteína en las interfaces	57
9.8 Área enterrada de superficie en la interfaz	61
10. Discusión	66

11.	Conclusiones	70
12.	Referencias	72

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la retina.	12
Figura 2. Herencia autosómica dominante (Terese Winslow, 2020) herencia autosómica recesiva. (Definición de herencia autosómica recesiva - Diccionario de cáncer del NCI - NCI).....	13
Figura 4. RPE65 - R pacientes con degeneración retiniana - Gene Vision. (Cataract and lens associated - Gene Vision).....	18
Figura 6. Modelos de los dominios RCC1, BTB y proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3. En azul cielo, rosa fuerte, verde esmeralda y naranja, se presentan los modelos de los dominios RCC1, BTB y proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3 (asa modelada), respectivamente; en Kaki, se muestran las estructuras molde: a) Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (PDB: 6W68), b) Ligasa de proteína ubiquitina E3 HERC2 (Código PDB: 4O2W), c) proteína ubiquitina E2 E2 (Código PDB: 3BZH) y d) proteína 1 asociada a Cul-3 y disociada por neddilación en interfaz con Cul-3 y RBX1 (Código PDB: 4EOZ).	39
Figura 7. Energía de minimización del modelo estructural pRCBTB1 a) Grafico de minimización del modelo estructural pRCBTB1; b) Modelo estructural pRCBTB1 en su conformación más estable. Representación alfa hélice, hojas beta y asas (cyan); carbonos (Azul agua marina), nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), amarillo (azufre).	43
Figura 8. Energía de minimización del modelo estructural Ubi-E2E3 a) Grafico de minimización del modelo estructural Ubi-E2E3; b) Modelo estructural Ubi-E2E3 en su conformación más estable. Representación alfa hélice, hojas beta y asas (amarillo); carbonos (Azul agua marina), nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), amarillo (azufre).	44
Figura 10. Gráfico de RMSD de la proteína pRCBTB1	46
Figura 11. Gráfico de RMSD de la proteína Ubi-E2E3	47
Figura 12. Gráfico de RMSD de la proteína Cul-3	47
Figura 13. Acoplamiento molecular de la mejor interfaz del complejo pRCBTB1/Cul-3/RBX1 Se muestran dos aristas de la interfaz respecto al dominio RCC1 que se encuentra por encima de la proteína RBX1 (Imágenes a y b). Modelo de pRCBTB1 (Azul cielo); modelo de Cul-3/RBX1 (verde).	50
Figura 14. Acoplamiento molecular de la mejor interfaz del complejo pRCBTB1/Ubi-E2E3. Se muestran dos aristas de la interfaz respecto al dominio RCC1 (Imágenes a y b). Modelo de pRCBTB1 (Azul cielo); modelo de Ubi-E2E3 (Amarillo).	51
Figura 15. Acoplamiento molecular de la mejor interfaz del complejo Ubi-E2E3/Cul-3/RBX1. Se muestran dos aristas de la interfaz respecto a la proteína Ubi-E2E3 que se encuentra por encima de la proteína RBX1 (Imágenes a y b). Modelo de Ubi-E2E3 (Amarillo); modelo de Cul-3/RBX1 (verde).	51
Figura 16. Acoplamiento molecular de las mejores interfaces del complejo pRCBTB1/Ubi-E2E3/Cul-3/RBX1.	52
Figura 17. Total, de residuos que realizan interfaz en la SAS.....	56
Figura 18. Residuos que realizan interfaz en la SAS	57
Figura 19. Interfaz quimiométrica de los modelos Ubi-E2E3/pRCBTB1.....	58
Figura 20. Interfaz quimiométrica de los modelos pRCBTB1/Cul3-RBX1.	59
Figura 21. Interfaz quimiométrica de los modelos Ubi-E2E3/ Cul3-RBX1.	60
Figura 22. Área enterrada de superficie de residuos en la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1.	62

Figura 23. Área enterrada de superficie de residuos en la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1	63
Figura 24. Área enterrada de superficie de residuos en la interfaz Ubi-E2E3/Cul3-RBX1	63
Figura 25. Área enterrada de superficie de atómica en las interfaces de los modelos. ...	65
Figura 26. PES en la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1	68
Figura 27. PES en la interfaz Ubi-E2E3/Cul3-RBX1.	69

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Nombre
RD	Distrofia de retina (retinal dystrophies)
RP	Retinosis pigmentosa
STDG	Enfermedad de Starfardt
MD	Distrofia macular
CRD	Distrofia de conos y bastones
LCA	Amaurosis congénita de leber
pRCBTB1	Proteína1 que contiene los dominios RCC1 y BTB
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
DHR	Distrofias hereditarias de la retina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ER	Enfermedad de la retina
ERC	Enfermedad renal crónica
PR	Retinitis Pigmentaria o Desprendimiento de Retina
DR	Distrofias de la retina
UPS	Ubiquitina-Proteosoma
CUL	Culina
BTB	Bric-a-bric
RCC1 RLD	Regulador de la condensación cromosómica 1
RPE	Células epiteliales pigmentarias de la retina
iPSC	Células pluripotenciales inducidas
tBHP	Hidroperóxido de terc-butulio
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
UB	Ubiquitina
IMBOA	Algoritmo de optimización evolutiva inteligentes basado en mutaciones

Índice de tablas

Tabla 1A. Identificación de genes asociados a distrofias de retina.	15
Tabla 2B. Identificación de genes asociados a distrofias de retina.	16
Tabla 3. Estructuras experimentales con secuencias similares al dominio RCC1	37
Tabla 4. Resultado de la búsqueda de estructuras experimentales con secuencias similares al dominio BTB.....	38
Tabla 5. Resultado de la búsqueda de estructuras experimentales con secuencias similares la proteína Ubi-E2 E3.....	38
Tabla 6. Valores de RMSD y ZDOPE de los cinco mejores modelos generados	41
Tabla 7. Resultados del acoplamiento molecular de los modelos modelados.....	49
Tabla 8. Enlaces de la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1.	59
Tabla 9. Enlaces de la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1.	60
Tabla 10. Enlaces de la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1.	61

1. Resumen

Las distrofias hereditarias de retina (IRD) son un grupo de enfermedades degenerativas que afectan progresivamente a los fotorreceptores, causando pérdida de visión y, en muchos casos, ceguera. Estas patologías muestran una gran heterogeneidad genética, con más de 340 genes implicados. Sin embargo, aún existe un número considerable de casos sin diagnóstico molecular preciso, especialmente en regiones poco estudiadas como el norte de México. Uno de los genes recientemente asociados a IRD es RCBTB1, que codifica una proteína con funciones relacionadas con la vía de ubiquitinación y la respuesta al estrés oxidativo. Mutaciones bialélicas en este gen han sido vinculadas a formas recesivas de retinopatía. No obstante, los mecanismos moleculares y funcionales por los cuales RCBTB1 contribuye a la degeneración de conos y bastones permanecen poco claros. Este estudio se enfoca en caracterizar la estructura y función de la proteína RCBTB1, identificar dominios funcionales, analizar sus interacciones proteína-proteína, y evaluar su expresión génica en tejidos oculares mediante herramientas bioinformáticas y análisis ómicos. Se realizó una búsqueda de estructuras molde para los dominios RCC1 y BTB de la proteína RCBTB1 mediante DELTA-BLAST, usando como referencia bases de datos como NCBI, PDB y UniProt (Ubi-E2E3, Cul-3, RBX1) y se construyeron modelos 3D con Modeller, seleccionando el de menor RMSD y ZDOPE. Estos modelos se prepararon y minimizaron con VMD y NAMD para obtener su conformación más estable. Se llevaron a cabo acoplamiento proteína-proteína con el software Hex 8.0 y posteriormente se realizaron minimizaciones adicionales, correcciones moleculares con VegaZZ y Discovery Studio, y análisis quimiométricos con PDBePISA. Finalmente, se calcularon las energías de interacción en las interfaces usando APBS y archivos PQR generados con PARSE. Se modelaron *in silico* las estructuras de los dominios RCC1 y BTB de la proteína pRCBTB1, así como de las proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3, utilizando estructuras experimentales como molde. Se seleccionaron los modelos óptimos con base en los valores de RMSD y ZDOPE, seguidos por procesos de minimización energética para alcanzar conformaciones estables. Los resultados mostraron que el modelo de pRCBTB1 requirió más pasos de minimización por su menor identidad con las estructuras molde. En contraste, Ubi-E2E3 mostró menor variación estructural debido a su alta identidad con el molde experimental. Cul-3, aunque parcialmente modelada, presentó estabilidad aceptable considerando su mayor tamaño y complejidad. Estos hallazgos

contribuirán al conocimiento de las IRD y podrán apoyar el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas de precisión en poblaciones subrepresentadas.

2. Introducción

Las distrofias hereditarias de retina (Inherited retinal dystrophies, por sus siglas en inglés: IRDs), se caracterizan por la degeneración progresiva de los fotorreceptores, lo que resulta una pérdida de visión que puede desarrollarse desde el nacimiento hasta finales de la edad mediana (Cremers, F.P.M., et al., 2018; Farrar, G.J., et al., 2017; Rattner et al., 1999). Las IRDS, comprenden una variedad de afecciones superpuestas, que incluyen retinosis pigmentaria (RP), enfermedad de Stargardt/distrofia macular (STGD/MD), distrofias de conos y bastones (CRD), amaurosis congénita de Leber (LCA) y formas sindrómicas como el síndrome de Usher (O'Neal, T. B., et al 2024). En conjunto, tienen una prevalencia de aproximadamente de 1 de cada 2000 – 3000 personas (Farrar, G.J., et al., 2017; Hashem et al., 2024; Moore & Evans, 1996; Rattner et al., 1999; Talib, M., & Boon, C. J. F. 2020; Villanueva-Mendoza et al., 2021) y se estima que afectan hasta a 5.5 millones de personas en todo el mundo (Hanany, M., et al., 2020, 2023; Inglehearn, 1998). Las distrofias dominantes de bastones, como la RP, se presentan con pérdida de visión periférica y ceguera nocturna (Cremers, F.P.M., et al., 2018) y, en las distrofias dominantes de cono, como STGD/MD y CRD, se presentan con pérdida de la visión central y deterioro de la percepción del color, fotofobia y nistagmo (Cremers, F.P.M., et al., 2018; Nash, B. M., et al., 2015). A medida que ambos tipos de distrofias progresan, los bastones y los conos pueden sufrir una degeneración que compromete la visión central y periférica en las etapas finales. La LCA es el tipo más grave de IRD, que afecta tanto a los fotorreceptores como al epitelio pigmentario de la retina, y los síntomas aparecen durante el primer año de vida.

En la figura 1, se muestra la anatomía del sistema visual, en la cual se muestra la retina, esta compuesta por una capa de células nerviosas que recubren la pared posterior en el interior del ojo. Esta capa detecta la luz y envía señales al cerebro para que usted pueda ver. Partes del ojo están asociadas con la retina. Incluyen: Retina periférica: El área de retina externa a la mácula. La retina periférica nos da la visión lateral (periférica) y la visión nocturna. Mácula: Zona pequeña pero importante en el centro de la retina. La mácula es necesaria para ver con claridad los detalles de objetos frente a usted. Fóvea: La fóvea es la depresión que se encuentra en el centro de la mácula, donde la visión es más nítida. También se conoce como fóvea centralis. Fotorreceptores: Los fotorreceptores son células especializadas de la retina del ojo responsables de convertir la luz en señales que son enviadas al cerebro. Los fotorreceptores nos dan la visión de color y la visión nocturna. Hay dos tipos de células fotorreceptoras: los bastones y los conos. Bastones: Los bastones son uno de los dos tipos de células fotorreceptoras de la retina. Son sensibles a los

niveles de luz y ayudan a darnos buena visión en baja iluminación. Se concentran en las áreas externas de la retina y nos dan la visión periférica. Conos: Los conos son una especie de células fotorreceptoras de la retina. Nos dan la visión de los colores. Los conos se concentran en el centro de la retina en un área conocida como la mácula, permite visualizar los detalles (Retina - American Academy of Ophthalmology).

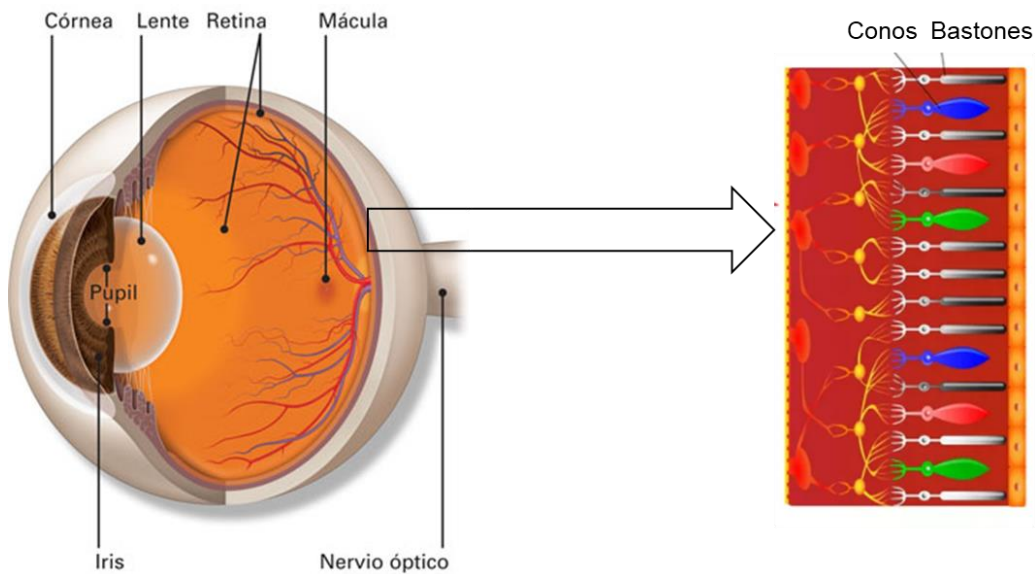


Figura 1. Anatomía de la retina. Donde se indican las estructuras y las células fotorreceptoras de la retina (Retina - American Academy of Ophthalmology).

Las IRDs presentan heterogeneidad genética y clínica, así mismo, se han descrito los patrones de herencia entre las IRD, incluidos los patrones autosómicos, ligados al cromosoma X, mitocondriales o digénicos (Farrar, G.J., et al., 2017; Garafalo, A.V., et al., 2020). En la actualidad, se han identificado más de 200 genes causales, siendo la mayoría de ellos enfermedades autosómicas recesivas (Farrar, G.J., et al., 2017; Garafalo et al., 2020). Las IRDs muestran una considerable heterogeneidad genética y alélica. Como las mutaciones en el gen ABCA4, donde se ha asociado con el desarrollo de STGD, RP, CRD y degeneración macular relacionada con la edad (Figura 2). La herencia autosómica recesiva, presenta una afección genética, se presenta cuando el niño hereda una copia de un gen mutado (cambiado) de cada uno de los padres (Villanueva-Mendoza et al., 2021). La herencia autosómica recesiva es una de las formas en que un rasgo o una afección genética pasa de padres a hijos. El niño presenta la afección genética cuando hereda dos copias de un gen mutado, una del padre y otra de la madre. Por lo general, la madre y el padre no presentan la afección que se hereda de manera autosómica recesiva. Se dice que la madre y el padre no afectados son portadores porque cada uno tiene una

copia del gen mutado que puede pasar a sus hijos (Definición de herencia autosómica recesiva - Diccionario de cáncer del NCI - NCI).

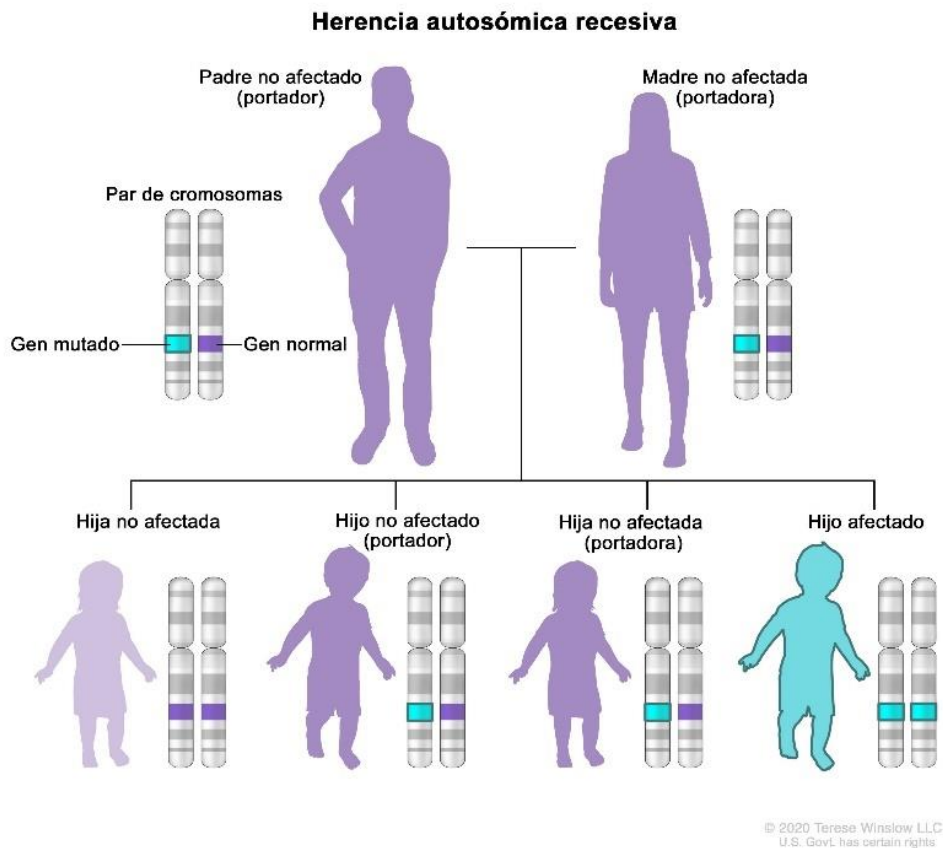


Figura 2. Herencia autosómica dominante (Terese Winslow, 2020) herencia autosómica recesiva. (Definición de herencia autosómica recesiva - Diccionario de cáncer del NCI - NCI)

La identificación de las variantes genéticas causantes de IRDs, es esencial para garantizar un diagnóstico preciso y proporcionar una referencia para el asesoramiento genético (Garafalo et al., 2020). Además, la comprensión del mecanismo molecular de las IRDs está llevando al desarrollo de intervenciones terapéuticas que buscan detener la pérdida de fotorreceptores y la preservación de la visión (Talib, M., & Boon, C. J. F. 2020; Villanueva - Mendoza et al., 2021). Varios estudios han empleado técnicas de secuenciación de nueva generación en múltiples estudios de cohortes de pacientes con ER, con tasas de detección de defectos moleculares en aproximadamente el 60% de los casos (Farrar, G.J., et al., 2017; Nash, B.M., et al., 2015). La tasa de detección general no es tan alta como se esperaba por varias razones, que incluyen entre otras, variantes en secuencias intrónicas, genes no caracterizados, variantes que afectan el empalme del ARN mensajero (ARNm) y variantes estructurales, como variaciones, duplicaciones, inversiones, inserciones en el número de copias (Cremers, F.P.M., et al., 2018; Garafalo

et al., 2020). Existe, una variedad de genes y mutaciones causantes de IRDs entre diferentes poblaciones y análisis molecular (Figura 3).

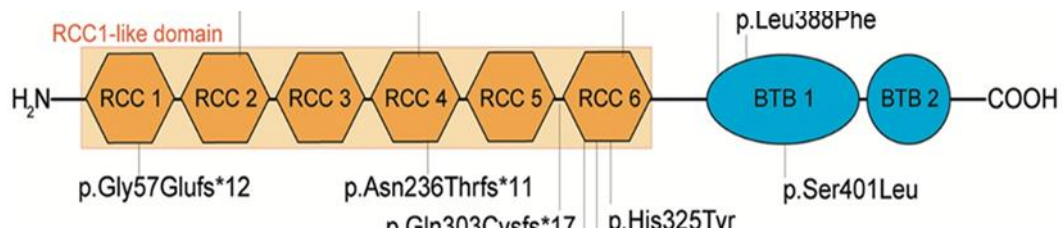


Figura 3. La proteína 1, que contiene los dominios RCC1 y BTB (pRCBTB1). La proteína 1 que contiene el dominio RCC1 y BTB es una proteína que en los seres humanos está codificada por el gen RCBTB1. Este gen codifica una proteína con un dominio RCC1 N-terminal y un dominio BTB C-terminal (Catomeris et al., 2022).

Villafuerte-de la Cruz et al., 2024, realizaron un estudio de cohorte genético a un total de 126 pacientes (74 mujeres y 52 hombres dando un total para Nuevo León (94), Tamaulipas (20) y Coahuila (12) con un promedio de edad de 39.06 y 18.64 %; iniciando con los síntomas a una edad promedio de 4-13 años) los resultados del estudio, indican lo siguiente: PR:53; STGD/DM:21; ERC:15; LCA:3; Retinosis ligada a X:4; IRD síndrónica de Usher; síndrome de Bardet Biedl:2; síndrome de Alstrom:1, discapacidad intelectual, talla baja, sordera, atrofia óptica y RP:1: y discapacidad intelectual, sordera, facies gruesa y PR de inicio tardío:1.

Así mismo, Talib, M., & Boon, C. J. F. (2020), indican que las DR comprenden causas relativamente raras, pero devastadoras de pérdida progresiva de la visión, las cuales representan un espectro de enfermedades con marcada heterogeneidad genética y clínica. Las mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a diferentes diagnósticos, ya sean retinosis pigmentosa o distrofia de conos. Por el contrario, las mutaciones en diferentes genes (RPE65) pueden conducir al mismo fenotipo, debido a que a edad de inicio de los síntomas y la velocidad y las características de la disminución de la visión periférica y central, pueden variar ampliamente según el grupo de enfermedades e incluso dentro de las familias. Para la mayoría de los casos de IRD, no se dispone de un tratamiento eficaz. Sin embargo, se están llevando a cabo estudios preclínicos y ensayos de terapia génica de las fases I, II y III para varios subtipos de RD, recientemente, la DFA de EUA (Talib, M., & Boon, C. J. F. 2020), ha aprobado la primera terapia génica de retina para las RD asociados a RPE65: voretigene neparvovec -rzl (Luxturna). Con los avances en los estudios de terapia génica, el conocimiento del espectro fenotípico y el curso de largo plazo de la enfermedad es una información crucial para varios tipos de IDR. La vasta heterogeneidad clínica presenta otro desafío importante en la evaluación de la eficacia

potencial en futuros ensayos de tratamiento y en el establecimiento de criterios de candidatura para el tratamiento. Esta perspectiva describe estos desafíos, proporcionando descripciones clínicas detalladas de varias formas de IRD que son causadas por genes de interés para los ensayos de terapia basados en genes o células en curso y futuros (Tabla 1A, 1B y 1C).

Tabla 1A. Identificación de genes asociados a distrofias de retina.

Nombre	Gen	Localización Cromosómica	Localización	Incidencia	Bibliografía
Distrofia Muscular de Duchenne	DMD	Xp21.2	Cromosoma X, brazo corto	1 de cada 3,500 varones	Smith et al., 2020
Distrofia Muscular de Becker	DMD	Xp21.2	Cromosoma X, brazo corto	1 de cada 18,000 varones	Johnson et al., 2018
Distrofia Miotónica tipo 1	DMPK	19q13.32	Cromosoma 19, brazo largo	1 de cada 8,000	Miller et al., 2019
Distrofia Miotónica tipo 2	CNBP	3q21.3	Cromosoma 3, brazo largo	1 de cada 10,000	Davis et al., 2017
Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss	EMD, LMNA	Xq28, 1q21.2	Cromosoma X y cromosoma 1	1 de cada 100,000	Harris et al., 2021
Distrofia Muscular Facioescapulohumeral	DUX4	4q35	Cromosoma 4, brazo largo	1 de cada 20,000	Rodriguez et al., 2022
Distrofia Muscular Congénita	COL6A1, LAMA2	21q22.3, 6q22-q23	Cromosoma 21 y cromosoma 6	1 de cada 30,000	Wilson et al., 2015
Distrofia Muscular de Cinturas tipo 2A	CAPN3	15q15.1-q21.1	Cromosoma 15, brazo largo	1 de cada 100,000	Brown et al., 2016
Distrofia Muscular de Cinturas tipo 2B	DYSF	2p13	Cromosoma 2, brazo corto	1 de cada 200,000	Green et al., 2017
Distrofia Muscular Oculofaríngea	PABPN1	14q11.2	Cromosoma 14, brazo corto	1 de cada 100,000	Taylor et al., 2018

Tabla 2B. Identificación de genes asociados a distrofias de retina.

Nombre	Gen	Localización Cromosómica	Localización	Incidencia	Bibliografía
Distrofia Muscular de Steinert (DM1)	DMPK	19q13.32	Cromosoma 19, brazo largo	1 de cada 8,000	Miller et al., 2019
Distrofia Muscular Ullrich	COL6A1, COL6A2, COL6A3	21q22.3, 21q22.3, 2q37	Cromosomas 21 y 2	1 de cada 100,000	White et al., 2017
Distrofia Muscular Congénita con Deficiencia de Merosina	LAMA2	6q22-q23	Cromosoma 6, brazo largo	1 de cada 50,000	Harris et al., 2015
Distrofia Muscular Fukuyama	FKRP	19q13.32	Cromosoma 19, brazo largo	1 de cada 50,000	Kimura et al., 2019
Distrofia Muscular Bethlem	COL6A1, COL6A2, COL6A3	21q22.3, 21q22.3, 2q37	Cromosomas 21 y 2	1 de cada 200,000	White et al., 2017
Distrofia Muscular Limb-girdle	RCTB1	5q33.3	Cromosoma 5, brazo largo	1 de cada 150,000	Zhang et al., 2020
Distrofia Muscular Distal	GNE, MYH7	9p13.3, 14q11.2	Cromosoma 9 y cromosoma 14	1 de cada 100,000	Lee et al., 2018
Distrofia Muscular Congénita tipo 1C	FKRP	19q13.3	Cromosoma 19, brazo largo	1 de cada 50,000	Kimura et al., 2019
Distrofia Muscular Miotubular	MTM1	Xq28	Cromosoma X, brazo largo	1 de cada 50,000 varones	Herman et al., 2016
Distrofia Muscular Oculomotor Nuclear	PABPN1	14q11.2	Cromosoma 14, brazo corto	1 de cada 100,000	Taylor et al., 2018

Por lo cual, realizar un análisis de los grupos genéticos, permitirán la reclasificación de variantes patógenas de las IRD, hasta el momento se cuentan con mínimas investigaciones de las familias de ascendencia mexicana. También, las investigaciones disponibles se han centrado en pacientes con IRD del centro y sur de México. (Villanueva-Mendoza et al., 2021; Zenteno et al., 2020)

La proteína RCBTB1, al realizar una interacción con culina-3 y ubiquitina E2 E3, desencadena una cascada de activación enzimática, en el cual se activa el complejo Ubiquitina-Proteasoma (UPS). Este complejo es crucial para la degradación selectiva de proteínas en las células eucariotas (Callis J, 2014) Sin embargo, se han identificado mutaciones en el gen RCBTB1, las cuales provocan una disfunción muscular identificada en enfermedades que causan debilidad y pérdida de masa muscular. Algunas de estas enfermedades, como la distrofia muscular de Duchenne, son causadas por mutaciones en genes específicos, como el gen DMD (Bharucha-Goebel 2020). Sin embargo, actualmente se desconoce la interfaz entre las proteínas Ubi-E2E3/RCBT1/Cul-3, la cual es clave fundamental para el entendimiento de sus interacciones mecánicas, estructurales, funcionales y moleculares en las disfunciones musculares.

Por tal motivo, en el presente estudio se llevaron a cabo simulaciones moleculares computacionales para resolver la interfaz Ubi-E2E3/RCBT1/Cul-3, en donde se determinó por medio de acoplamiento molecular la interfaz putativa entre las tres proteínas descritas, se llevaron a cabo dinámicas moleculares para la minimización de estructuras en la interfaz y finalmente, se llevaron a cabo cálculos quimiométricos con simulaciones: la energía de unión, los residuos que participan en la interfaz, los enlaces químicos que se forman en las interfaces y el área de interfaz atómica, así como de residuos.

3. Antecedentes

3.1 Distrofias de retina hereditaria (Inherited retinal dystrophies: IRDs)

Las distrofias de retina (IRDs), son un grupo de enfermedades causadas por mutaciones genéticas. Estas mutaciones, afectan a 1 de cada 3000 personas, pueden tener un impacto significativo en la vida diaria, como en el estudio, trabajo, social y emocional.

Hasta el momento, se han realizado innumerables investigaciones para mejorar las condiciones de salud o retrasar la progresión de las IRD por diferentes métodos. No obstante, hasta el momento no se ha logrado de manera definitiva, aunque existen en este momento herramientas prometedoras como la terapia génica, debido a la aprobación del Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl). Este fármaco se emplea para el tratamiento de amaurosis congénita de Leber (LCA), es la más grave de las IRD ya que provoca e induce una rápida degeneración de la retina (edad temprana de la infancia). En el desarrollo de la LCA están implicados cuatro genes, pero el principal es el gen AIPL1 (9 – 11% autosómica recesiva en conos y bastones) que aproximadamente representa el 5% de todas las IRD (Sohocki et al., 2001).

Los pacientes con degeneración retiniana relacionada con RPE65 pueden ahora recibir un tratamiento llamado Luxturna (voretigene neparvovec) bajo el NHS. En Luxturna, una copia normal del gen RPE65 se "empaqueta" en un virus inofensivo llamado virus adenomiano asociado (AAV), que luego se inyecta quirúrgicamente en la retina (inyección subretinal). De este modo, las células retinianas afectadas están expuestas al máximo a los virus que contienen el gen normal (Figura 4).

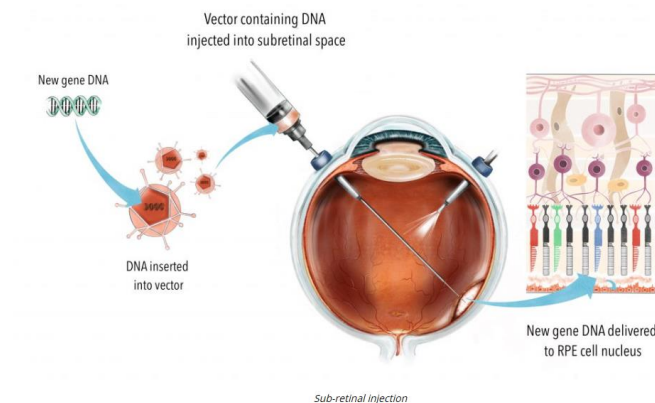


Figura 4. RPE65 - R pacientes con degeneración retiniana - Gene Vision. (Cataract and lens associated - Gene Vision).

El estudio de las terapias génicas ha gozado de especial interés en las últimas décadas debido a su prometedor potencial para retrasar o incluso rescatar la degeneración de la retina en las IRD. Al respecto, los ensayos donde se usa la terapia génica en IRD que incluyen los estudios en modelos animales, abren ventanas para el diseño de vectores virales requeridos para estrategias terapéuticas en donde se puede modular las dosis para mejores tratamientos. Modelos animales, como los ratones son de primera elección, así como agentes virales como rAAV-sero8, el cual es el vector de preferencia para las IRD, es de suma importancia la valoración científica para garantizar la eficacia de la terapéutica para evitar la degeneración de la retina en lo más posible. (Xia et al., 2023)

La terapia génica tiene el potencial de permitir el tratamiento de enfermedades complejas, un gran número de investigadores están investigando en la terapia génica en IRD, lo que convierte a la terapia génica en un posible punto de inflexión para los pacientes y cuidadores de los IRD.

3.2 RCBTB1 y su función en la retina

RCBTB1, es una proteína que comprende un dominio similar al de un regulador de la condensación cromosómica 1 (RCC1 RLD) y dos dominios amplios complejos bric-a-bric (BTB), cuya función es la regulación del ciclo celular y algunas evidencias apuntan a su potencial papel como gen supresor de tumores, así mismo los datos de la matriz de expresión de muestras totales de RNA han mostrado una expresión ubicua en todos los tejidos de adultos humanos (Coppieters et al., 2016). Un análisis de transcripción genética ha revelado una expresión relativamente alta de mRNA de RCTB1 en retina neural humana en comparación con el epitelio pigmentario de retina, específicamente en retina se ha planteado la hipótesis de que RCBTB1 puede actuar como un adaptador de sustrato en la vía de ubiquitinación (Plafker et al., 2009) y posiblemente modificar la localización de los factores de transcripción en respuesta al estrés oxidativo. (Catomeris et al., 2022; Plafker & Plafker, 2015)

Por otra parte, se conoce que las mutaciones en el gen RCTB1 genera una IRD, sin embargo, los mecanismos patogénicos asociados a la deficiencia de RCBTB1 continúan siendo poco conocidos (Hanany, M., et al., 2023; Huang et al., 2023; Zenteno et al., 2020).

Huang Z. et al (Huang et al., 2023), investigaron la deficiencia de RCBTB1 en mitocondrias y la respuesta al estrés oxidativo en células epiteliales pigmentaria de retina (RPE) de células pluripotenciales inducidas (iPSC) de sujetos control y un paciente con retinopatía asociada a RCBTB1, donde el estrés oxidativo se generó ante la exposición de hidroperóxido de terc-butulio (tBHP), En éste estudio revelaron que las células RPE derivadas de pacientes tenían una ultraestructura mitocondrial anormal y redujeron la fluorescencia de MitoTracker en comparación de los controles. Así mismo las células RPE de pacientes, mostraron un aumento en especies reactivas de oxígeno y fueron más sensibles a la generación de ROS inducida por tBHP que el RPE control. Además, se demostró que el RPE controló el aumento de la expresión de RCBT1 y NFE2L2 en respuesta al tratamiento con tBHP, sin embargo, esta respuesta fue atenuada en el RPE del paciente. También, se encontró que RCBTB1 fue coimmunoprecipitado a partir de lisados de proteínas RPE controles por anticuerpos para UBE2E3 o CUL3, ello demostró que la deficiencia de RCBTB1 en las RPE derivadas de pacientes se asocia con daño mitocondrial, aumentando el estrés oxidativo y una respuesta atenuada al estrés oxidativo (Huang et al., 2023).

Sin embargo, Wu et al. (Wu et al., 2016), demostraron que la eliminación de RCBTB1 redujo la acumulación nuclear de beta-catenina en las células ARPE19, lo que sugiere que la deficiencia de RCBTB1 puede causar una desregulación de la vía de señalización de RPE. Por lo tanto, los fenotipos de ciliopatía y de función de barrera alterados, podrían, relacionarse con una diferenciación alterada de RPE debido a la reducción de la señalización canónica de WNT sin embargo, esta hipótesis requerirá más investigación, ya sea que estos efectos directos o indirectos como la longitud del cilio proporciona una métrica útil para evaluar las estrategias de tratamiento destinadas a restaurar la expresión de RCBTB1 en las células RPE.

El gen RCBTB1 (Receptor C-Terminal Binding Protein 1) se localiza en el cromosoma 5q33.3 y codifica una proteína implicada en procesos fundamentales de regulación del crecimiento y la diferenciación celular. La proteína resultante, conocida como RCTB1, participa en rutas de señalización celular y contribuye a la estabilidad del citoesqueleto, lo que la convierte en un elemento relevante para el mantenimiento de la función celular. Las alteraciones en RCBTB1 se han asociado con diversas patologías, particularmente distrofias musculares y miopatías congénitas, donde las mutaciones afectan la estructura o función de la proteína. Entre las variantes moleculares descritas destacan las mutaciones

puntuales, así como deleciones e inserciones en regiones críticas como el exón 3, que suelen producir proteínas truncadas y, por lo tanto, no funcionales.

En cuanto a su mecanismo de acción, RCBTB1 interactúa con distintos factores de transcripción para modular la expresión génica en respuesta a señales externas, lo que subraya su papel en la regulación fina de los procesos celulares. Su patrón de expresión muestra una presencia predominante en tejidos musculares esqueléticos y cardíacos, tanto durante el desarrollo fetal como en la etapa adulta, lo que concuerda con las consecuencias observadas cuando este gen presenta alteraciones. El gen RCBTB1 [Gene ID 55213, MIM 607867] codifica una proteína de 531 aminoácidos con un dominio RCC1 N-terminal y un dominio BTB C-terminal, que desempeñan un papel potencial en la regulación de los ciclos celulares. Inicialmente fue clonada y caracterizada como implicada en la región de deleción 13q14 para la leucemogénesis (Mabuchi, H., et al 2001).

3.3 Importancia del análisis bioinformático en el estudio de las distrofias de retina

El análisis bioinformático, es lo más aproximado a identificar mutaciones en los exomas por medio del modelaje *in silico*, por lo cual, puede decirse que la bioinformática es el área del conocimiento que analiza e interpreta los experimentos a gran volumen que recaban información del comportamiento celular mediante una visión global de sus elementos regulares, como, por ejemplo: los genomas, genes, proteínas. Donde, la genómica y la medicina de precisión han progresado notablemente con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y los avances en el análisis de datos.

Aunado a ello, la gran dimensionalidad y complejidad de los datos, el procesamiento y la interpretación de los datos genómicos a gran escala presentan grandes desafíos, para ello, la investigación sugiere que se utilice el algoritmo de optimización evolutiva inteligentes basados en mutaciones (IMBOA), creado especialmente para aplicaciones en genómica y medicina de precisión. IMBOA, utiliza un operador de la mutación y se guía por información basada en el genoma, lo que permite la introducción de variantes en soluciones candidatas que son consistentes con los procesos biológicos conocidos (Singh et al., 2024), este programa sustenta que el análisis *in silico* de genes obtenidos de los repositorios, son imprescindibles para la investigación básica y clínica de las diferentes enfermedades que se presentan en el ser humano.

3.4 Antecedentes directos de RCBTB1

Según Berger y O'neil, 2010-2020, las IRDs son un grupo de enfermedades genéticas y fenotípicamente diversas que afectan a más de 2 millones de individuos en todo el mundo y resultan en discapacidad visual y ceguera significativas. Se ha propuesto que tiene una función en la regulación del ciclo celular, y algunas evidencias apuntan a su papel potencial como gen supresor de tumores (Zhou, 2010).

Los primeros conocimientos sobre la función molecular de RCBTB1 proceden de la oncología y se centran en la regulación del ciclo celular. La identificación de RCBTB1 en 2001 se vio facilitada por la delección común del cromosoma 13q14, la región en la que se encuentra, en la leucemia linfocítica crónica de células B (Mabuchi, H., et al 2001). De acuerdo, a la función de RCBTB1 como gen supresor de tumores (Zhou, 2010) se ha visto respaldada por hallazgos que incluyen la disminución de los niveles de transcripción de RCBTB1 en múltiples líneas celulares de cáncer y la activación de las vías de reparación del ADN tras su expresión. RCBTB1 interactúa con esta vía de dos maneras: se propone que es un adaptador de sustrato para una E3 ligasa cullin3 (CUL3), y también se une al homólogo de ratón de UBE2E3, una enzima E2 de conjugación de ubiquitina, a través de una interacción facilitada por el dominio BTB (Plafker K.S., et al. 2009). UBE2E3, al igual que RCBTB1 (Plafker, 2015), se expresa en la retina y es importante para mediar en la localización y actividad del factor de transcripción NRF2 de respuesta al estrés.

Por lo que, las distrofias hereditarias de retina son una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. Constituyendo un grupo de trastornos oculares genéticos con un amplio espectro fenotípico y una edad de aparición variable, y están causadas por la degeneración progresiva de los fotorreceptores de bastones y conos y/o del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Berger 2010). RCBTB1 tiene un dominio similar al regulador de la condensación cromosómica 1 (RCC1) y dos amplios dominios complejo, tramtrack y bric-a-brac (BTB) (UniProt: Q8NDN9) (Mabuchi, H., et al 2001). El gen de delección 7 de la leucemia linfocítica crónica (Clld7) (también denominado RCBTB1, CLLL7, E4.5 (Zhou, X., & Münger, K. 2010) y GLP es un candidato a supresor tumoral que se mapea en el cromosoma 13q14 (Mabuchi, H., et al 2001). A pesar de que Clld7 es un candidato a supresor tumoral, existe poca información sobre las actividades biológicas de esta

proteína. El único estudio funcional con Clld7 hasta la fecha es un informe que relaciona la sobreexpresión de Clld7 con la hipertrofia celular en células cultivadas de músculo liso vascular y de túbulo proximal renal de rata (Guo, D. F., et al 2004). El gen de delección 7 de la leucemia linfocítica crónica o CLLD7 o gen RCBTB1 es un gen candidato a supresor tumoral localizado en el cromosoma 13q14 cerca del locus pRB (supresor tumoral de retinoblastoma). Fue aislado por primera vez por Mabuchi et al. en 2001 (Mabuchi, H., et al 2001) CLLD7, se localiza en la región del punto caliente de delección 13q14 del cromosoma y se infiere como un potencial gen supresor de tumores para varios tumores (Wistuba, I. I., et al 1999; Wistuba, I. I., et al 1999).

3.5 El proceso de la visión en el ojo humano

El proceso de la visión en el ojo humano comienza, con la absorción de la luz por los pigmentos visuales de los segmentos externos de los fotorreceptores, prolongaciones de las células de los bastones y los conos. Los bastones son los más numerosos, con 100 millones en cada ojo, mientras que los conos son mucho menos numerosos, con unos 6 millones (Curcio, C. A., et al 1990). Las mutaciones de ABCA4 causan una proteína mal localizada, alterada o no funcional que impide o inhibe la eliminación del exceso de los discos fotorreceptores (Molday R. S. 2015) sin embargo Wu et al. identificaron mutaciones heterocigotas en el gen RCBTB1 en dos individuos taiwaneses no emparentados con la enfermedad de Coats (OMIM #200216) y vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR, OMIM #133708) respectivamente (Criswick, V. G., & Schepens, C. L. 1969; Wu, J. H., et al 2016). Wu et al. (2016) describieron un caso de enfermedad de Coats con la variante RCBTB1 c.707delA, que se presentó a los 3 años con desprendimiento de retina exudativo en el ojo derecho (Wu, J. H., et al 2016). La literatura hay información relevante sobre fenotipos contrastados de la retinopatía asociada a RCBTB1; una vitreorretinopatía dominante debida a una presunta haploinsuficiencia frente a una coriorretinopatía recesiva o retinosis pigmentosa debida a mutaciones de pérdida de función bialélicas (Coppieters, F., et al 2016).

Se ha descrito que las variantes de truncamiento heterocigotas en RCBTB1 causan vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR) (Canny, C. L., & Oliver, G. L. 1976; Chung, M. Y., et al 2021). La vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR) es una afección hereditaria de vasculogénesis retiniana periférica aberrante y angiogénesis anormal

subsiguiente, con manifestaciones que varían desde portadores asintomáticos hasta ceguera resultante de desprendimientos de retina totales (Wu J-H, et al 2016). Donde, el término «portadores asintomáticos o portadores no penetrantes» es algo engañoso en la actualidad, ya que las formas leves de FEVR pueden progresar a lo largo de unos años a retinopatía grave, como desprendimiento de retina, especialmente en niños y adolescentes (Yang, J., et al 2021).

Se identificaron variantes bialélicas en un probando con RP, mientras que se detectaron 10 variantes de truncamiento heterocigotas en 28 familias no relacionadas. Además, seis de las 10 variantes de truncamiento heterocigotas se detectaron en siete miembros de familias no afectadas, y tres controles normales también presentaban dos de las seis variantes. Estos resultados advirtieron de la posible relación entre variantes en RCBTB1 y fenotipos oculares (Yang, J., et al 2021). Los resultados sugieren que las variantes de truncamiento heterocigotas en RCBTB1 no están asociadas con FEVR o IRDs relacionadas, mientras que las variantes de truncamiento bialélicas son responsables de RP autosómica recesiva (Yang, J., et al 2021).

La disfunción de estas células especializadas producen un grupo de diversas patologías IDR, las cuales se asocian a una pérdida progresiva de la agudeza visual y/o del campo visual de ambos ojos, estas enfermedades suelen progresar con el tiempo si no se diagnostican a tiempo ya que terminan provocando la disminución o hasta inclusive la pérdida total de la visión, las IDR, afectan a la retina y aunque todas las partes del ojo son importantes para lograr percibir información visual, la retina es la parte vital de este ya que tiene la función esencial de detectar la luz y transmitir imágenes al cerebro para ser procesada. (Auton, A., et al 2015)

Las enfermedades que afectan principalmente a los conos, son las distrofias progresivas de conos y distrofias progresivas de conos y bastones, las Disgenesias no progresivas de conos. Las distrofias Maculares como la mutación en ABCA4 que provoca la enfermedad de Stargardt y Funus Flavimaculatus, la Distrofia Coroidea Aerolar Central, Distrofia Viteloforme maculas de Best así como también las Distrofias en patrón del epitelio pigmentario de la retina. Las Distrofias Vitreoretinianas como el Complejo de Wagner-Stickler, Retinosquisis juvenil ligada a X y las vitreoretinopatias exudativa familiar (Criswick, V. G., & Schepens, C. L. 1969). Aunque los síntomas de las IDR varían de

distrofia en otra y de paciente en paciente, los síntomas más frecuentes son la ceguera nocturna, reducción del campo de visión periférica, la disminución de la visión, la alteración de la percepción de los colores, metamorfopsias como también deslumbramientos, fotopsias y fotofobia.

4. Planteamiento del problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), al 2020 más de 1,000 millones de personas que viven en todo el mundo tienen algún tipo de discapacidad, representando aproximadamente el 15 % de la población mundial. De estas personas, casi 190 millones tienen dificultades en su funcionamiento y requieren con frecuencia servicios de asistencia. El número de personas con discapacidad va en aumento debido al envejecimiento de la población y al incremento de enfermedades crónicas. Por lo cual, las Universidades, los centros de investigación y los investigadores debemos estar al día para tratar de solucionar estos problemas que aquejan al país y al mundo. En relación con estas necesidades, la bioinformática (big data) necesita de personal capacitado, pensante, creativo para encontrar las soluciones, estos puntos, las personas ciegas son clave para el desarrollo y aplicación de la bioinformática. Por lo que el estudio del complejo “Ubiquitina E2 E3/ pRCBTB1/Culina-3” es vital para comprender como funcionan los complejos proteicos aportando conocimiento sobre cómo se puede abordar el estudio de algún tipo de distrofia. Donde las IRD, constituyen un grupo de enfermedades genéticas altamente heterogéneas que provocan la degeneración progresiva de los fotorreceptores —bastones y conos— y, en consecuencia, una pérdida gradual de la visión. A pesar de que se han identificado más de 340 genes relacionados con distintos subtipos de IRD, una proporción significativa de pacientes aún carece de un diagnóstico genético preciso debido a la complejidad alélica, la presencia de variantes intrónica no caracterizadas y las limitaciones de las técnicas de secuenciación convencionales. Uno de los genes recientemente asociados a IRD es RCBTB1, el cual codifica una proteína que actúa como adaptador de sustrato en la vía de ubiquitinación, un proceso clave para la degradación proteica celular y la respuesta al estrés oxidativo. Aunque estudios recientes han sugerido su implicación en retinopatías recesivas y en la regulación de la función mitocondrial en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), los mecanismos moleculares, estructurales y funcionales por los cuales la deficiencia de RCBTB1 induce la degeneración retiniana permanecen escasamente comprendidos.

Además, la mayoría de los estudios genéticos se han centrado en poblaciones del centro y sur de México, dejando un vacío de conocimiento en poblaciones del norte del país, donde aún no se han caracterizado suficientemente las variantes genéticas asociadas a IRD. Esto limita tanto el diagnóstico como el diseño de estrategias terapéuticas basadas en la medicina genómica de precisión.

En este contexto, se requiere un análisis detallado del papel de RCBTB1 en las IRD mediante herramientas bioinformáticas y enfoques "ómicos" que permitan modelar sus interacciones moleculares, caracterizar sus variantes patogénicas y comprender su expresión diferencial en tejidos oculares. Abordar esta problemática es esencial para avanzar en el diagnóstico genético, el asesoramiento clínico y el desarrollo de terapias dirigidas en pacientes con distrofias de retina, especialmente en poblaciones subrepresentadas.

5. Justificación

En las IDR, pueden estar involucradas a un gran número de genes, ya que en la actualidad se han descubierto más de 340 genes implicados, ya que se heredan con base a todos los patrones de herencia posible y aunque no todas las formas hereditarias, así como también los defectos genéticos no tienen la misma gravedad de afectación. Alguna de las formas en las que se puede transmitir la enfermedad puede ser a través de uno de los patrones de herencia autosómica dominante o autosómica recesiva.

Las distrofias de conos y bastones son enfermedades hereditarias de la retina que resultan en una pérdida progresiva de la función de los fotorreceptores, primero de los bastones y luego de los conos. Estas distrofias presentan una secuencia de hechos opuesta a las distrofias de bastón-cono, con una implicación primaria de los conos o una pérdida concomitante de la función de los conos y los bastones. Los síntomas incluyen agudeza visual disminuida, defectos en la visión de los colores, sensibilidad a la luz y disminución de la sensibilidad en el centro del campo visual, seguidos de pérdida de la visión periférica y ceguera nocturna. Donde, el curso clínico de las distrofias de conos y bastones tiende a ser más grave y rápido que el de las distrofias de bastón-cono. Aunque no suelen ser sindrómicas, pueden formar parte de diversos síndromes. Estas distrofias tienen una prevalencia estimada de 1 de cada 40,000 personas y muestran una gran heterogeneidad en los genes responsables. Por lo anteriormente dicho, investigar, analizar, identificar y exponer los sitios donde se lleva a cabo el acoplamiento molecular proteína-proteína del complejo “Ubiquitina E2 E3/ pRCBTB1/Culina-3”, dará pauta entender de cómo funcionan los complejos proteicos del sistema visual. Empleando información derivada de técnicas “bioinformáticas” como la genómica, epigenética, exoma y proteómica para realizar análisis bioinformáticos, permitirá la identificación de genes y mutaciones presentes en personas ciegas y débiles visuales. Los genes identificados podrían ser propuestos como blancos importantes para desarrollar medidas diagnósticas y manejos terapéuticos personalizados de alta precisión. Por lo tanto, hallar variantes genéticas, mediante técnicas “bioinformáticas” contribuirá a un conocimiento del por qué se presentan una discapacidad visual, se tiene el reto de aportar mejoras en el sistema de salud del país por medio de la Biotecnología, Bioinformática, Biocomputación, Genética Molecular y BioNanoElectrónica (como sucede en otros países). Por tanto, estudiar, investigar y aplicar estas técnicas permitirá comprender la heterogeneidad en los genes

responsables de los mecanismos implicados en la ceguera, es vital para generar medicina preventiva y dirigida.

6. Hipótesis

La simulación por acoplamiento molecular proteína-proteína resuelve la interfaz putativa entre los modelos de las proteínas Ubi-E2E3, RCBT1 y Cul-3.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Determinar por medio de simulaciones moleculares computacionales el acoplamiento molecular entre los modelos de las proteínas Ubi-E2E3, pRCBTB1 y Cul-3 para determinar la quimiometría que subyace en las interfaces.

7.2 Objetivos particulares

- Realizar el modelado *in silico* y refinación de las proteínas Ubi-E2E3, pRCBTB1 y Cul-3.
- Efectuar la minimización de estructuras de las proteínas Ubi-E2E3, pRCBTB1 y Cul-3 por medio de dinámica molecular.
- Resolver por medio de acoplamiento molecular proteína-proteína el complejo entre los modelos Ubi-E2E3, pRCBTB1 y Cul-3.

Realizar cálculos quimiométricos entre la interfaz de las proteínas Ubi-E2E3, pRCBTB1 y Cul-3 para determinar los patrones de interacción putativos.

8. Material y métodos

8.1 Búsqueda de las estructuras experimentales molde

Se procedió a realizar una búsqueda de similitud de secuencia con la herramienta BLAST desde la base de datos NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (O'Leary et al., 2024) utilizando el software DELTA-BLAST (Tiempo de mejorado de búsqueda con aceleración de dominios BLAST, Boratyn et al., 2012) para encontrar estructuras molde determinadas experimentalmente correspondientes a Ubi-E2E3 y pRCBTB1.

En el caso de pRCBTB1, cada dominio RCC1 y BTB de secuencias se buscaron estructuras experimentales molde por separado, en donde se realizaron archivos fasta para cada uno de los dominios y hacer la búsqueda. Las estructuras experimentales encontradas se presentan en la Tabla 2. Derivado de dicho análisis se construyeron dos secuencias en formato fasta para los dominios RCC1 y BTB.

Posteriormente, se obtuvieron las estructuras de las coordenadas atómicas de las proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3 en la base de datos PDB (Berman et al., 2000) considerando la menor resolución atómica, en donde se descargaron los archivos PDB de las coordenadas atómicas, a los cuales se les removieron las impurezas como ácidos grasos, ligandos y moléculas de agua con el software VMD (Humphrey et al., 2000).

8.2 Búsqueda de las secuencias fasta de proteínas

Las secuencias las proteínas Ubi-E2E3, pRCBTB1 y Cul-3, se descargaron en formato fasta de la base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org>), a las cuales se les cambió el nombre fasta de acuerdo con la nomenclatura que se utiliza en este texto.

8.3 Modelado *in silico*

Se procedió a realizar el modelado *in silico* utilizando las estructuras molde descargadas, en donde se procedió a realizar la simulación con el software Modeller (Eswar et al., 2003) generando un total de 20 modelos de las estructuras proteicas, en donde se eligió el mejor modelo con el RMSD y ZDOPE más bajo en cuanto al total de átomos alineados.

8.5 Minimización de los modelos estructurales

Los modelos obtenidos con menor RMSD se prepararon con el software VMD (Humphrey et al., 1996), para dejar limpios los archivos en extensión pdb y asignar nombres de las cadenas correspondientes de la siguiente manera:

Cadena A: pRCBTB1, Cadena B: Ubi-E2E3, Cadena C: Cul-3 y Cadena D: RBX1.

Una vez preparados los archivos, se generaron una serie de scripts computacionales para ejecutarlos con el software VMD (Humphrey et al., 1996) para preparar los archivos de topología en formato PSF y las coordenadas atómicas en donde se consideraron los siguientes parámetros.

- Limpieza de los archivos PDB individuales (De acuerdo con las cadenas, incluyendo iones)
- Cambio de histidina HIS a HSE
- Cambio del átomo de isoleucina CD1 a CD
- Aplicación de parches para desprotonar cisteínas, las cuales forman enlaces con iones de zinc (Zn^{2+}) en la proteína RBX1)
- Combinar archivos de coordenadas atómicas y topología
- Mover el complejo combinado al centro de coordenadas
- Aplicar restricciones armónicas al backbone ó esqueleto de la proteína con un valor = 1

Una vez preparados los archivos de topología y las coordenadas atómicas con corrección en los ángulos diedros, impropios, correcciones atómicas (carboxilatos, grupos guanidinio, imidazol y otras características propias para la simulación), se elaboró un script computacional con las coordenadas muy aproximadas al origen con restricciones armónicas a una temperatura de 300 K, una frecuencia de 1000, un margen atómico de 3 Å y 50, 000 pasos de minimización para cada una de las proteínas.

Una vez establecidos los estándares para la simulación, se realizó una minimización del complejo estructural con el software NAMD (Phillips et al., 2020) para evitar colisiones entre los radios de Van der Waals y establecer la conformación más estable aplicando restricciones armónicas en el esqueleto ó backbone de las proteínas.

Al finalizar la minimización, se guardaron los archivos de topología y las coordenadas atómicas en su conformación más estable con el software VMD (Humphrey et al., 1996) para simulaciones posteriores.

8.6 Acoplamiento molecular proteína/proteína

El anclaje o acoplamiento molecular (AMPP) proteína/proteína se llevó a cabo con el software Hex 8.0 (Ghoorah et al., 2013), en donde se realizaron dos acoplamientos estableciendo el receptor el modelo con el mayor número de átomos:

1. Ubi-E2E3 (ligando) vs pRCBTB1 (receptor).
2. pRCBTB1 (ligando) vs Cul-3+RBX1 (receptor).
3. Ubi-E2E3 (ligando) vs Cul-3+RBX1 (receptor).

Una vez definidos los ligandos y receptores para la simulación, se definieron los parámetros del acoplamiento molecular en el software de la siguiente manera:

- El tipo de correlación: Forma y electro
- Dispositivo de cómputo: CPU
- El modo de interacción: 5D
- Método de muestreo: Ángulos de rango
- Post Processing: Minimización OPLS
- Número de soluciones: 50,000
- Escaneo estérico: N = 20
- Búsqueda final: N = 30

Al finalizar la simulación se guardaron los archivos con la información de los resultados que muestran la menor energía y los clusters. Además, se guardaron los archivos en formato PDB con la mejor posición y conformación para análisis quimiométricos posteriores.

Finalmente, se eligió la mejor posición y conformación de los dos complejos moleculares: Ubi-E2E3/pRCBTB1, pRCBTB1/Cul-3+RBX1 y Ubi-E2E3/Cul-3+RBX1 con la menor energía y mayor número de clústeres para análisis posteriores.

8.7 Minimización de las interfaces predichas por el AMPP

Los modelos obtenidos del resultado del AMPP que comprenden las interfaces Ubi- Ubi-E2E3/pRCBTB1, pRCBTB1/Cul-3+RBX1 y Ubi-E2E3/Cul-3+RBX1, se prepararon nuevamente con scripts computacionales y se sometió a una simulación de energía de minimización para obtener su conformación más estable en las interfaces Ubi-E2E3/RCBT1 y Mod-Cul-3+Asa/ RBX1 de acuerdo con el apartado 1. Al finalizar la minimización, se guardaron los archivos de topología y las coordenadas atómicas en su conformación más estable con el software VMD (Humphrey et al., 1996) para cálculos quimiométricos posteriores.

8.9 Corrección de errores moleculares

Como resultado de la simulación por minimización de estructura de las interfaces de los modelos Ubi- Ubi-E2E3/pRCBTB1, pRCBTB1/Cul-3+RBX1 y Ubi-E2E3/Cul-3+RBX1, se prepararon por separado realizando la corrección atómica correspondiente con los softwares VegaZZ (Pedretti et al., 2021) y Discovery Studio (BIOVIA Discovery Studio Visualizer, 2024), realizando modificaciones en los grupos guanidinio, carboxilato, aminas primarias y otros grupos funcionales aceptores y receptores de las cadenas R de los residuos, así como verificar la tautomería de grupos imidazol y verificar la hidrogenación de las cisteínas que forman enlace con iones, en este caso con Zn^{2+} , en donde los archivos se guardaron en .mol2 y pdb.

8.10 Determinación de propiedades quimiométricas

Una vez preparadas las interfaces de los modelos estructurales minimizados Ubi-E2E3/pRCBTB1, pRCBTB1/Cul-3+RBX1 y Ubi-E2E3/Cul-3+RBX1 se sometieron para calcular sus propiedades quimiométricas en la interfaz con el software PDBePISA (Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies) (Krissinel, 2010), en la cual se localizaron enlaces no covalentes, y enterrada de superficie accesible al disolvente.

8.11 Simulación de la energía de interacción

Para calcular la energía de interacción se utilizó el software Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (Konecny et al., 2012), en donde las interfaces previamente preparadas (cf. Apartado 1) de los modelos estructurales minimizados Ubi- Ubi-E2E3/pRCBTB1, pRCBTB1/Cul-3+RBX1 y Ubi-E2E3/Cul-3+RBX1 se prepararon por separado con la herramienta computacional PQR (Dolinsky et al., 2007), la cual realiza arreglos estructurales químicos para cálculos específicos para las ecuaciones no lineales de Poisson-Boltzmann, en donde se reconstruyen átomos faltantes, añade hidrógenos, asigna cargas y radios atómicos correspondientes para campos de fuerza y genera archivos .pqr (P: Formato PDB, Q: carga, R: Radio), en donde se utilizó el campo de fuerza PARSE (Sitkoff et al., 2007), sin modificar hidrógenos ni átomos faltantes en la interfaz. Una vez preparadas las interfaces en formato PQR, se sometieron a la simulación computacional con el solucionador APBS en donde se definieron las siguientes variables: un tamaño de cuadrícula de malla específica para cada interfaz, carga iónica de ± 1.0 y un radio de 2.0, temperatura 298.15 K y se estableció para la simulación la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann. Finalmente se registraron las energías de interacción en kJ/Mol para los modelos de las interfaces minimizadas.

9. Resultados

9.1 Búsqueda de las estructuras experimentales molde

Los resultados de la búsqueda de similitud de secuencia vs estructuras determinadas experimentalmente para el dominio RCC1 de la proteína pRCBTB1, se muestran en la tabla 3, las cuales se verificaron que carecieran de átomos faltantes. Las estructuras con el mayor porcentaje de identidad determinadas con el software DELTA-BLAST respecto a la secuencia de aminoácidos que pertenecen al dominio RCC1 fue la Ligasa de proteína ubiquitina E3 HERC2, con un porcentaje de identidad de 33.46, en donde la cadena A de la estructura determinada experimentalmente con código PDB: 4O2W, se utilizó para modelar el dominio RCC1 de la proteína debido a que presenta una estructura más completa respecto a los aminoácidos de la secuencia de RCC1.

Tabla 3. Estructuras experimentales con secuencias similares al dominio RCC1

Descripción	Porcentaje (%)	Código PDB	Cadena
Ligasa de proteína ubiquitina E3 HERC2	33.46	4O2W	A
Ligasa de proteína ubiquitina E3 HERC2	31.12	7Q40	A
Probable ligasa de proteína ubiquitina E3 HERC2	31.02	4QAM	A
Regulador de retinosis pigmentosa GTPasa	29.07	4L1M	A
Regulador de retinosis pigmentosa GTPasa	27.33	5GWN	A

Las estructuras determinadas por el software DELTA-BLAST, se presentan en la Tabla 4. La estructura con el mayor porcentaje de identidad determinada por el software respecto a la secuencia de aminoácidos que pertenecen al dominio BTB, es la cadena A de la Proteína subunidad SLX4 de estructura específica endonucleasa con código PDB: 4UYI. Sin embargo, la Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Código PDB: 6W68) (Mena, E.L., et al. 2020), presenta la estructura más completa respecto a los aminoácidos de la secuencia del dominio RCC1, por lo tanto, se utilizó para modelar el dominio BTB de la proteína pRCBTB1 (Tabla 4).

Tabla 4. Resultado de la búsqueda de estructuras experimentales con secuencias similares al dominio BTB

Descripción	Porcentaje (%)	Código PDB	Cadena
Subunidad SLX4 de estructura específica endonucleasa	29.63	4UYI	A
Dedo de Zinc y dominio BTB que contiene la proteína 7A	25.97	2IF5	A
Dedo de Zinc y dominio BTB que contiene la proteína 7A	23.71	2NN2	A
Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch	23.68	6W68	A
Dedo de Zinc y dominio BTB que contiene la proteína 5	22.22	9B9R	A

Los resultados de la búsqueda de similitud de secuencia vs estructuras determinadas experimentalmente para la proteína enzimática conjugada Ubi-E2E3, se muestran en la tabla 5, en donde las mejores estructuras completas determinadas experimentalmente encontradas por el algoritmo del software DELTA-BLAST, respecto a la secuencia de aminoácidos fueron las enzimas conjugadas ubiquitina E2 E2 y E2 E1, con porcentajes de identidad de 97.97 y 93.55, en donde se eligió la cadena A de la estructura determinada experimentalmente de la proteína ubiquitina E2 E2 (Código PDB: 3BZH) (Walker JR et al.; 2008) debido a que carece de menos átomos faltantes y presenta un mayor porcentaje de identidad.

Tabla 5. Resultado de la búsqueda de estructuras experimentales con secuencias similares la proteína Ubi-E2 E3

Descripción	Porcentaje (%)	Código PDB	Cadena
Enzima conjugada ubiquitina E2 E1	87.36	3BZH	A
Enzima conjugada ubiquitina E2 E2	85.92	9BJZ	A
*Enzima conjugada ubiquitina E2	66.21	2AYV	A
Enzima conjugada ubiquitina E2 D2	64.86	3L1Y	A
Enzima conjugada ubiquitina E2 D2	64.86	7BOL	A

**Toxoplasma gondii*

La estructura molde determinada experimentalmente Cul-3 se buscó en la base de datos PDB filtrando el parámetro: resolución atómica. Además, se priorizó que la estructura estuviera completa en adición a que contenga la proteína RBX1, en donde se eligió a criterio de investigador la estructura de la proteína 1 asociada a Cul-3 y disociada por

neddilación en interfaz con Cul-3 y RBX1 (Código PDB: 4EOZ) (Prive, G.G., et al. 2012), la cual se utilizó para modelar Cul-3/RBX1.

9.2 Modelos *in silico* generados de los dominios RCC1, BTB y proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3.

Los modelos *in silico* generados por el software *modeller* (Sali, A., & Blundell, T. L., 1993), en interfaz con UCSF Chimera (Pettersen, E.F., et al., 2004), se muestran en la Figura 5, considerando el parámetro Zdope. Utilizando la teoría de la probabilidad, se deriva un potencial estadístico dependiente de la distancia atómica a partir de una muestra de estructuras nativas que no depende de ningún parámetro ajustable (Energía Proteica Optimizada Discreta o DOPE) (Shen & Sali, 2006). Dicho parámetro se basa en un estado de referencia mejorado que corresponde a átomos no interactuantes en una esfera homogénea con un radio que depende de la estructura nativa de la muestra; por lo tanto, explica la forma finita y esférica de las estructuras nativas, en donde valores más negativos indican mejores modelos (Figura 5).

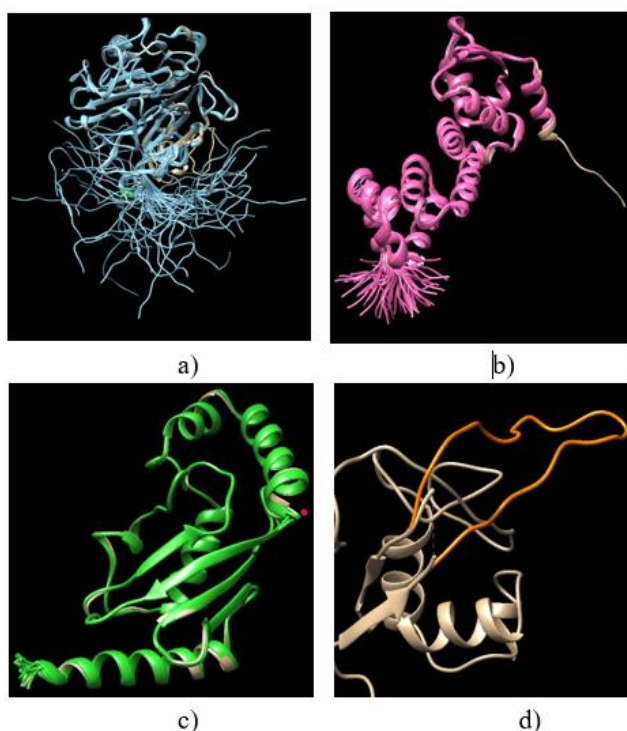


Figura 5. Modelos de los dominios RCC1, BTB y proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3. En azul cielo, rosa fuerte, verde esmeralda y naranja, se presentan los modelos de los dominios RCC1, BTB y proteínas Ubi-E2E3 y Cul-3 (asa modelada), respectivamente; en Kaki, se muestran las estructuras molde: a) Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (PDB: 6W68), b) Ligasa de proteína ubiquitina E3 HERC2 (Código PDB: 4O2W), c) proteína ubiquitina E2 E2 (Código PDB: 3BZH) y d) proteína 1 asociada a Cul-3 y disociada por *neddilación* en interfaz con Cul-3 y RBX1 (Código PDB: 4EOZ).

Además, se midió el parámetro RMSD, el cual es la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas, o simplemente desviación cuadrática media (RMSD), que concierne a la distancia media entre los átomos que no pertenecen a la cadena R de proteínas (Backbone) de dos ó más moléculas superpuestas. En el estudio de las conformaciones globulares de proteínas, se mide habitualmente la similitud en la estructura tridimensional por el RMSD de las coordenadas atómicas C α después de la superposición óptima de cuerpos rígidos (Eramian et al., 2008).

Predecir la precisión absoluta de un modelo es particularmente difícil debido a la falta de razones de principio por las que una puntuación de evaluación individual debería correlacionarse bien con medidas de precisión como RMSD, particularmente si los modelos no son nativos (Fiser et al. 2000).

En bioinformática, se utiliza la frase "precisión absoluta" para referirse a la precisión geométrica real, como RMSD y MaxSub (Siew et al. 2000), que podría calcularse si se conociera la verdadera estructura nativa. En ausencia de la estructura nativa, la precisión absoluta no se conoce y debe predecirse.

De un total de 50 modelos generados por el software *modeller*, se realizó un cluster, en donde se tomaron los primeros cinco menores valores para RMSD y ZDOPE, por lo que valores menores concierne a mejores modelos en relación con la estructura molde, los cuales se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de RMSD y ZDOPE de los cinco mejores modelos generados

Dominio	No.	ZDOPE	RMSD
RCC1	39	-1.28	0.578
	27	-1.26	0.321
	5	-1.15	0.728
	43	-1.11	0.886
	21	-0.94	0.427
BTB	50	-1.12	0.679
	2	-0.98	0.938
	8	-0.91	0.428
	28	-0.87	0.764
	12	-0.81	0.698
Ubi E2 E3	26	-0.154	0.125
	1	-0.151	0.122
	9	-0.128	0.139
	37	-0.12	0.141
	6	-0.989	0.131

En los resultados de los modelos generados, se eligieron los mejores modelos a criterio de investigador, se eligieron los modelos: 27, 8, 1 de RCC1, BTB y Ubi-E2E3, respectivamente presentando valores de RMSD óptimos para el modelado in silico.

Los dominios RCC1 y BTB se unieron mediante un enlace peptídico al realizar un “MatchMaker” (emparejamiento de estructuras con el software UCSF Chimera (Pettersen, E.F., et al. 2004). Sin embargo, todas las estructuras 3D modeladas carecen una conformación estable, por lo que fue necesario aplicar energías de minimización (Tabla 6).

9.3 Minimización de estructuras

La dinámica conformacional de las moléculas proteicas está codificada en sus estructuras y suele ser un elemento crítico de su función. Por lo tanto, una apreciación fundamental

de cómo funcionan las proteínas requiere una comprensión de la conexión entre la estructura tridimensional, obtenida cada vez con mayor rapidez por cristalografía de rayos X y RMN, y la dinámica, que es mucho más difícil de investigar experimentalmente. Las simulaciones de dinámica molecular proporcionan vínculos entre la estructura y la dinámica al permitir la exploración del panorama de energía conformacional accesible a las macromoléculas proteicas (Karplus et al., 2002; Wang et al., 200; Hansson et al., 2002).

La estructura de las proteínas determina en gran medida su función, de ahí la gran importancia de determinar su estructura tridimensional nativa. Para ello, los métodos de laboratorio tradicionales, como la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la microscopía de Crio-electrones, son costosos y requieren mucho tiempo. Como alternativa, los métodos computacionales de Predicción de la Estructura de las Proteínas (PSP) buscan reducir la diferencia entre el número de proteínas con secuencia conocida (del orden de millones) y el número de proteínas resueltas con estructura conocida (unas 200 000 en la base de datos del Banco de Datos de Proteínas - PDB (<http://www.wwpdb.org>)).

Las estructuras tridimensionales que conciernen a las posiciones atómicas de las biomoléculas para poder realizar análisis precisos, evitar colisiones atómicas (traslapeo o choques de radios de VDW) y correr dinámicas moleculares en sistemas biológicos. Es fundamental que estas estructuras se encuentren en su mínima energía conformacional (conformación más estable) para poder llevar a cabo anclajes moleculares, cribado virtual, análisis quimiométrico de propiedades atómicas, superficie, huellas dactilares, simulación de cavidades, fases inerciales iniciales de dinámicas moleculares como calentamiento del sistema, estabilización y corridas durante 50 ó más nanosegundos para obtener resultados experimentales más estables conforme al tiempo.

La minimización de las estructuras pRCBTB1, Ubi-E2E3 y Cul-3 se muestra en la figura XX, en donde se determinaron los pasos de minimización de 12000, 7000 y para pRCBTB1, Ubi-E2E3 y Cul-3, respectivamente.

El modelo pRCBTB1 presentó una mayor energía inicial de minimización, en donde se modelaron dos dominios con dos diferentes estructuras molde experimentales, debido a este arreglo molecular, el error aumenta considerablemente, por lo que fue necesario

aplicar un número mayor de pasos de minimización igual a 20000, en donde la dinámica parte de una la energía máxima de -3469.8638 kcal/mol y se comienza a establecer aproximadamente en 9000 pasos con una energía aproximada de -10250 kcal/mol en el cual su pendiente tiende a cero (Figura 6).

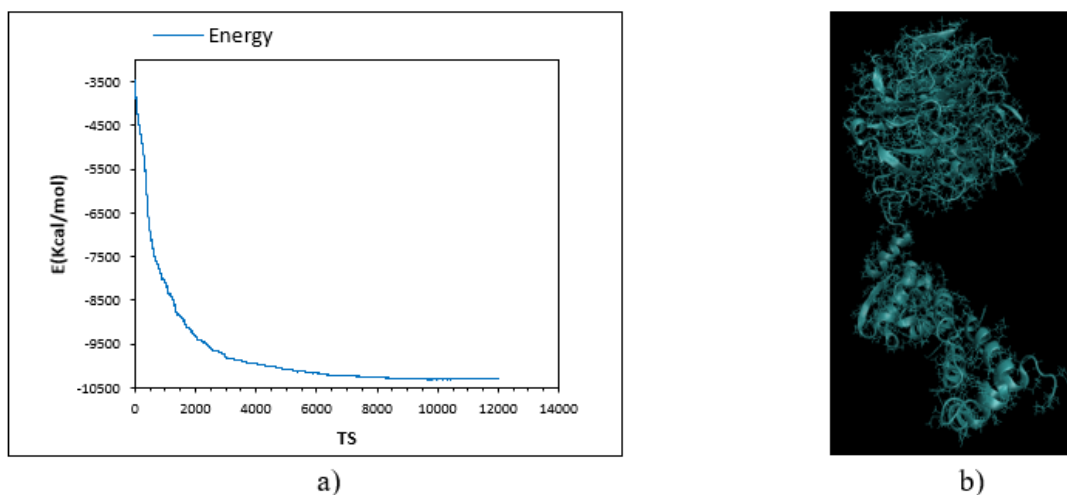


Figura 6. Energía de minimización del modelo estructural pRCBTB1 a) Grafico de minimización del modelo estructural pRCBTB1; b) Modelo estructural pRCBTB1 en su conformación más estable. Representación alfa hélice, hojas beta y asas (cyan); carbonos (Azul agua marina), nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), amarillo (azufre).

Sin embargo, en la proteína Ubi-E2E3 muestra una menor energía inicial de minimización, esto es debido a que el modelo presenta un RMSD de 0.122, el cual es muy bajo debido a que la estructura experimental molde tiene una identidad respecto a la secuencia de aminoácidos mayor al 95 %, muy por encima de la zona de *twilight* por lo tanto fue necesario reducir los pasos de minimización igual a 7000, en donde la dinámica parte de una la energía máxima de -1900 kcal/mol y se asienta aproximadamente en 5525 pasos con una energía aproximada de -3700 kcal/mol en el cual su pendiente tiende a cero. (Figura 7).

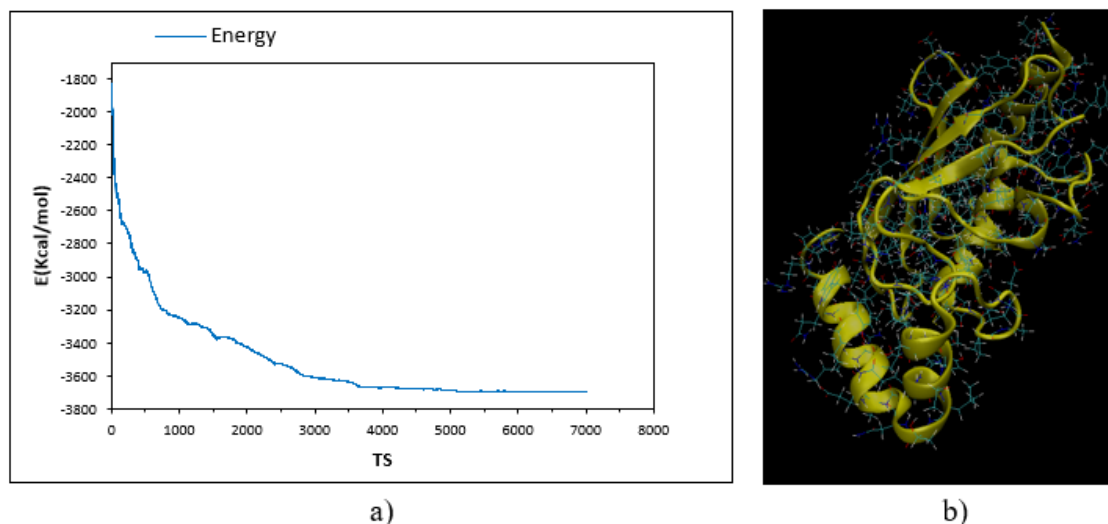


Figura 7. Energía de minimización del modelo estructural Ubi-E2E3 a) Grafico de minimización del modelo estructural Ubi-E2E3; b) Modelo estructural Ubi-E2E3 en su conformación más estable. Representación alfa hélice, hojas beta y asas (amarillo); carbonos (Azul agua marina), nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), amarillo (azufre).

Por otra parte, la proteína Cul-3 muestra una menor energía inicial de minimización que pRCBTB1 y Ubi-E2E3, esto es debido a que la estructura experimental es una estructura determinada experimentalmente y solo se está modelando una fracción reducida que comprende un asa extracelular. Sin embargo, se tuvieron que aumentar los pasos de minimización debido a que el número de átomos es mayor que pRCBTB1 y Ubi-E2E3, en donde la dinámica parte de una la energía máxima menor a -19000 kcal/mol y se asienta aproximadamente en 10200 pasos con una energía aproximada de -31000 kcal/mol en el cual su pendiente tiende a cero. (Figura 8).

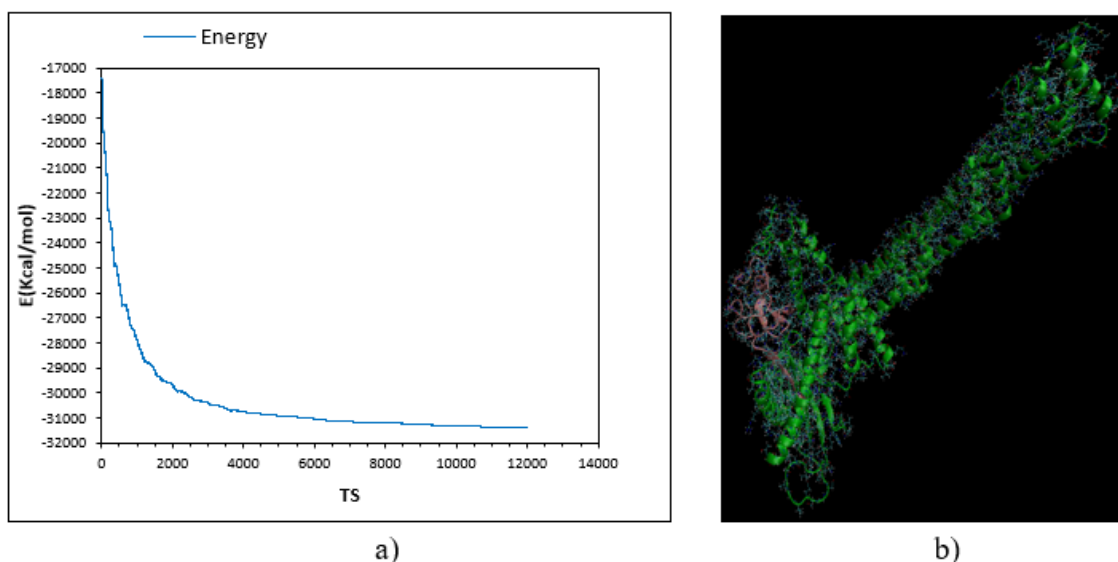


Figura 9. Energía de minimización del modelo estructural Cul-3/RBX1 a) Grafico de minimización del modelo estructural Cul-3/RBX1; b) Modelo estructural Cul-3/RBX1 en su conformación más estable. Cadena A: Representación alfa hélice, hojas beta y asas (verde) de Cul-3; Cadena C: Representación alfa hélice, hojas beta y asas (rosa) de RBX1 Representación alfa hélice, hojas beta y asas (verde) carbonos (Azul agua marina), nitrógeno (azul), oxígeno (rojo), amarillo (azufre).

Una de las variables de entorno que se integraron fue brindarle una considerable amplitud de energía conformacional a las proteínas en la minimización de estructuras; los carbonos alfa en la dinámica molecular tienen restricciones armónicas con un valor de 0.5, por lo que brinda mayor libertad de movimiento a la columna vertebral de la proteína si se le aplican restricciones fijas de valor igual a 1 en toda la columna vertebral, estos parámetros se establecieron con el fin de que los modelos estructurales tengan una menor energía de minimización debido a que el modelo de la proteína pRCBTB1 se modeló de dos diferentes estructuras experimentales molde con un porcentaje de identidad respecto a la proteína pRCBTB1 menor a un 50%, lo que conlleva a mayores errores moleculares y tendencia a colisiones de radios de van der Waals y posición y conformación atómica con inestabilidad energética, ya sea en cavidades, núcleos hidrófobos y otras regiones estructurales.

El RMSD de la proteína pRCBTB1, se calculó a través del tiempo definiendo el número de fotogramas que se obtuvieron en la minimización mostrando máximos y mínimos de 0.3203 y 0.810, respectivamente en donde se interpreta un cambio conformacional significativo de los átomos del modelo nativo vs la conformación final para la proteína pRCBTB1, una media de 0.743 y una desviación estándar de 0.130 (Figura de 9)

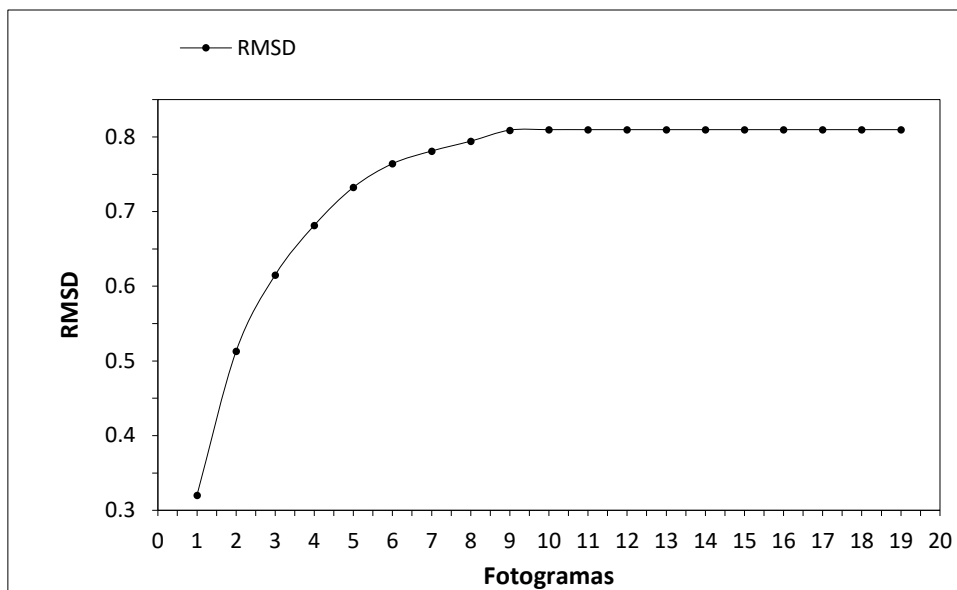


Figura 8. Gráfico de RMSD de la proteína pRCBTB1. Se muestran los valores de RMSD a lo largo del tiempo, los cuales confirman la estabilidad estructural de las proteínas durante la simulación.

Estos resultados validan la fiabilidad de los modelos para ser empleados en la siguiente etapa del trabajo: el acoplamiento molecular proteína-proteína, que permitirá determinar las posibles interfaces de interacción.

Por otra parte, debido al número atómico reducido de la proteína Ubi-E2E3, El RMSD del modelo de la proteína Ubi-E2E3, se calculó a través del tiempo definiendo el número de fotogramas que se obtuvieron en la minimización mostrando máximos y mínimos de 0.248 y 0.557, respectivamente con una media de 0.479 ± 0.120 mostrando diferencia respecto al modelo pRCBTB1 0.743 ± 0.130 , en donde se interpreta un reducido cambio conformacional de los átomos del modelo nativo vs la conformación final para la proteína Ubi-E2E3, una media de 0.743 y una desviación estándar de 0.130 se puede apreciar en el gráfico de la Figura 10.

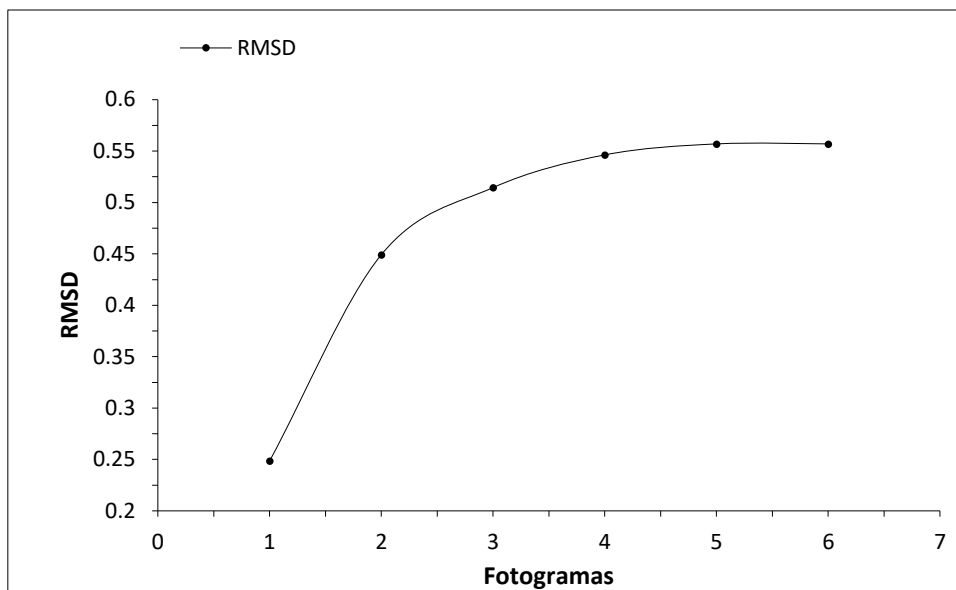


Figura 9. Gráfico de RMSD de la proteína Ubi-E2E3

El RMSD de la proteína Cul-3, se calculó a través del tiempo definiendo el número de fotogramas que se obtuvieron en la minimización mostrando máximos y mínimos de 0.362 y 0.823, respectivamente con una media de 0.686 ± 0.145 mostrando una similitud respecto al modelo pRCBTB1 0.743 ± 0.130 , por lo que Cul-3 tiene un número atómico más grande y una complejidad estructural mucho mayor que pRCBTB1 al estar en interfaz con RBX1 por lo que la diferencia es notoria debido a las condiciones espaciales x,y,x y el número atómico, así como la masa atómica de Ubi-E2E3 (Figura 11).

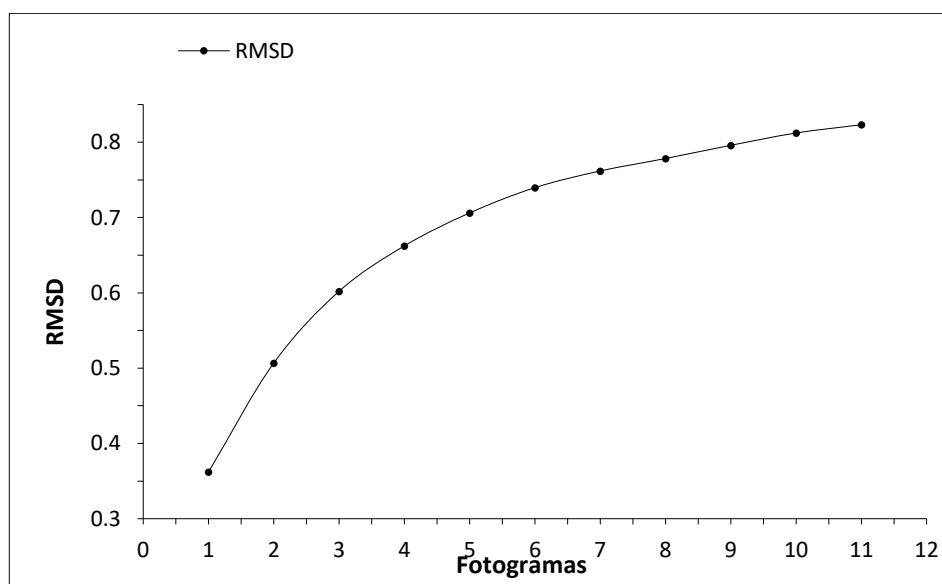


Figura 10. Gráfico de RMSD de la proteína Cul-3.

9.4 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se ha puesto en los ojos de los investigadores *in silico* en los últimos años en un aspecto esencial del desarrollo de fármacos *in silico*. Esta técnica consiste en predecir las interacciones entre una pequeña molécula y una proteína a nivel atómico (Sahoo et al., 2022), proteína vs proteína, proteína vs DNA ó RNA, proteína vs lípido, proteína vs péptido, etc. Esto permite a los investigadores estudiar el comportamiento de moléculas pequeñas, como los nutraceuticos, dentro del sitio de unión de una macromolécula objetivo y comprender los procesos bioquímico, quimiométrico y físico fundamentales que subyacen a esta interacción (Meng et al., 2011). La técnica está basada en la estructura y requiere una representación 3D de alta resolución de la estructura experimental de la macromolécula objetivo obtenida a través de técnicas como la cristalografía de rayos X, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear o la microscopia de crio electrones (Smyth et al., 2000; Sugiki et al., 2017; Nakane et al 2020).

En el descubrimiento moderno de fármacos, el acoplamiento proteína-ligando o proteína-proteína desempeña un papel importante en la predicción de la orientación del ligando cuando se une a un receptor proteico o enzima utilizando la forma y las interacciones electrostáticas para cuantificarlo. Las interacciones de van der Waals también juegan un papel importante, e. g. Las interacciones por Coulomb y la formación de enlaces de hidrógeno. La suma de todas estas interacciones se aproxima mediante una puntuación de acoplamiento, que representa la potencialidad del enlace (Alberg y Schreiber 1993). La superficie de área enterrada accesible al disolvente (SASA), la energía libre de solvatación, la energía de interacción electrostática o la energía total de la mecánica molecular (Shoichet y Kuntz 1991).

En los sistemas de cuerpo rígido más simples, los algoritmos del software resuelven una posición y conformación en coordenadas 3D del ligando, en donde se busca en un espacio rotacional o traslacional de seis dimensiones para que se ajuste al sitio de unión, que puede servir como compuesto principal para el diseño de fármacos (Alberg y Schreiber 1993).

Conocer la ubicación espacial del sitio de unión antes de los procesos de acoplamiento aumenta significativamente la eficiencia del acoplamiento. En muchos casos, el sitio de unión se conoce antes de acoplar ligandos en él. Además, se puede obtener información sobre los sitios mediante la comparación de la proteína objetivo con una familia de

proteínas que comparten una función similar o con proteínas co-cristalizadas con otros ligandos. En ausencia de conocimiento sobre los sitios de unión, se pueden utilizar programas de detección de cavidades o servidores en línea, por ejemplo, GRID (Goodford PJ. 1985; Kastenholz MA, 2000), POCKET (Levitt DG, Banaszak LJ. 1992), SurfNet (Laskowski, RA 1995; Glaser F, et al 2006) , PASS (Brady GP, Jr., Stouten PF. 2000) y MMC (Mezei M. 2003), para identificar sitios activos putativos dentro de las proteínas. El acoplamiento sin ninguna suposición sobre el sitio de enlace se denomina acoplamiento ciego (Meng et al., 2011).

9.5 Resultados del acoplamiento molecular proteína/proteína

Resultados del acoplamiento molecular proteína/proteína entre los modelos generados: pRCBTB1, Ubi-E2E3, y Cul-3, se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados del acoplamiento molecular de los modelos modelados.

A vs B			A vs C			B vs C		
Solución	Cluster	BE	Solución	Cluster	BE	Solución	Cluster	BE
13	2	-323.1	20	49	-492.4	6	12	-97.8
122	27	-318.9	16	29	-409.7	33	26	-88.4
181	12	-327.7	31	38	-456.1	51	57	-96.7

A: pRCBTB1; B: Ubi-E2E3; C: Cul-3/RBX1; BE: Binding Energy (kJ/mol)

El software de acoplamiento molecular tiene una función de puntuación de escaneo estérico, es decir, realiza una búsqueda conformacional rotacional de seis dimensiones mediante superficie que involucra radios de van der Waals. Además, busca sitios de interacción de acuerdo interacciones de baja energía de posiciones y conformaciones atómicas de grupos funcionales de átomos donadores y aceptores. En donde la interfaz predicha por el acoplamiento molecular pRCBTB1/Cul-3-RBX1 se presenta en la Figura 11.

En donde el dominio RCC1 del modelo pRCBTB1 en forma parecida a una “antena parabólica cilíndrica”, interactúa de manera “lateral” con Cul-3-RBX1.

Utilizando un criterio estricto respecto al número de clusters (solución del número de interacciones con una alta similitud de posición y conformación mostrando un RMSD

entre las mismas menor a 0.25 de acuerdo con el software Hex 8.0) y la energía de unión en la simulación, el acoplamiento molecular resolvió la interacción 20 (Tabla 6) La cual presenta un número de clusters igual a 49 en donde el cluster que presenta la menor energía entre ellos fue de -492.4 kJ/mol (Figura 12).

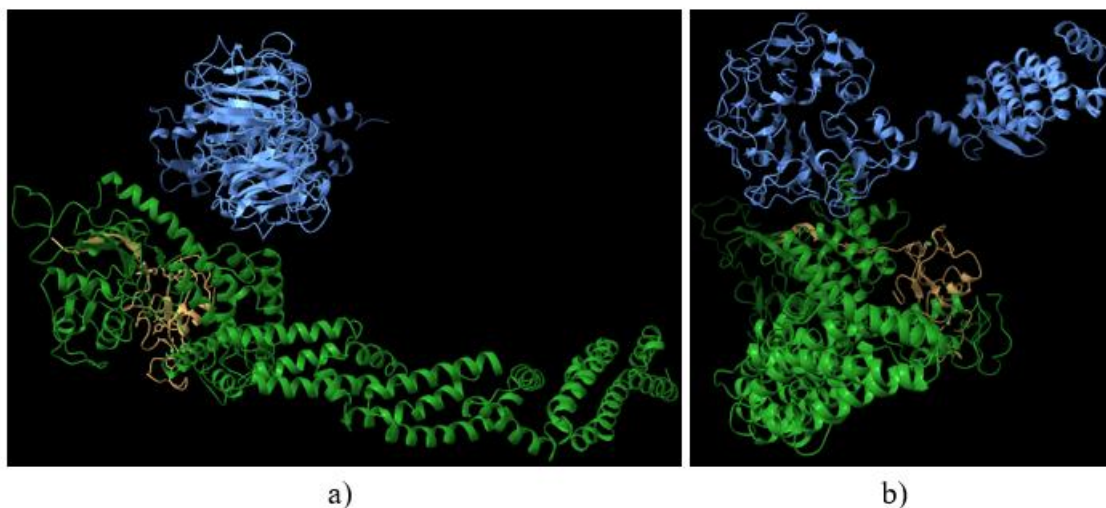


Figura 11. Acoplamiento molecular de la mejor interfaz del complejo pRCBTB1/Cul-3/RBX1 Se muestran dos aristas de la interfaz respecto al dominio RCC1 que se encuentra por encima de la proteína RBX1 (Imágenes a y b). Modelo de pRCBTB1 (Azul cielo); modelo de Cul-3/RBX1 (verde).

El acoplamiento molecular Ubi-E2E3/Cul-3-RBX1 se presenta en la Figura 13, 14) En donde el dominio RCC1 del modelo pRCBTB1 interactúa de manera con Ubi-E2E3. El acoplamiento molecular resolvió la solución 122 mostrando un clúster de 27 y una energía de unión de -318.9 kJ/mol, el cual es más bajo que la predicción pRCBTB1/Cul-3-RBX1 hecha por el acoplamiento molecular.

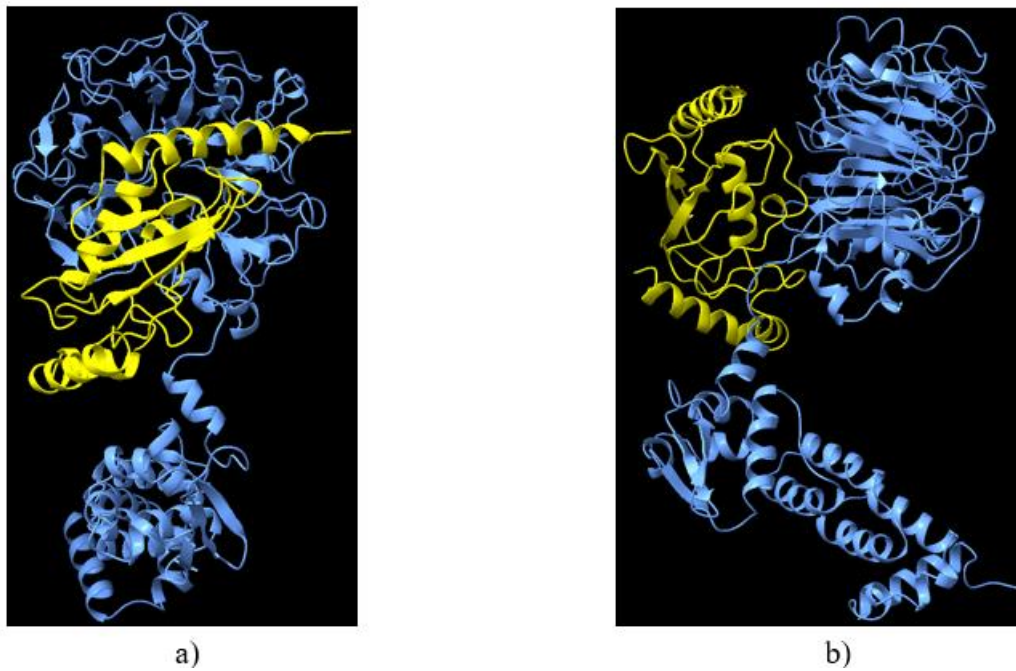


Figura 12. Acoplamiento molecular de la mejor interfaz del complejo pRCBTB1/Ubi-E2E3. Se muestran dos aristas de la interfaz respecto al dominio RCC1 (Imágenes a y b). Modelo de pRCBTB1 (Azul cielo); modelo de Ubi-E2E3 (Amarillo).

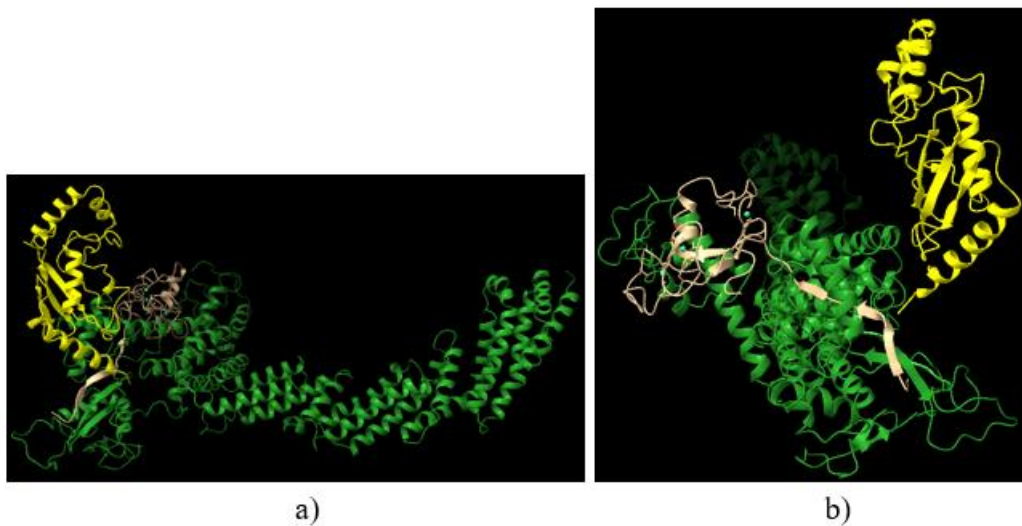


Figura 13. Acoplamiento molecular de la mejor interfaz del complejo Ubi-E2E3/Cul-3/RBX1. Se muestran dos aristas de la interfaz respecto a la proteína Ubi-E2E3 que se encuentra por encima de la proteína RBX1 (Imágenes a y b). Modelo de Ubi-E2E3 (Amarillo); modelo de Cul-3/RBX1 (verde).

El acoplamiento molecular pRCBTB1/Ubi-E2E3 se presenta en la Figura 14 y 15. En donde el modelo Ubi-E2E3 interactúa cerca de la proteína RBX1. El acoplamiento

molecular resolvió la solución 51, mostrando un clúster de 57 y una energía de unión de -96.7 kJ/mol, el cual es más bajo ambas predicciones pRCBTB1/Cul-3-RBX1 y Ubi-E2E3/Cul-3-RBX1 hecha por el acoplamiento molecular, en donde posiblemente no sea el sitio de interacción que se presenta en la naturaleza. Sin embargo, estas interacciones son actualmente desconocidas, en la actualidad no existe evidencia experimental de interfaces similares resueltas por cristalografía de rayos x, resonancia magnética nuclear ó microscopia de crio electrones, por lo que se puede inferir en compararlas sin estudios posteriores de dinámicas moleculares no se presentan en este estudio. Por lo que en los siguientes apartados se muestra un análisis quimiométrico detallado de todas las interfaces mostrando por primera vez esos “fingerprints” ó huellas dactilares, las cuales muestran esos “hotspots” o residuos calientes que podrían contribuir indicando en las proteínas mutantes cuales están relacionados a ciertas enfermedades genéticas relacionadas a la retina ocular.

Interesantemente, al realizar un ensamblaje molecular de los mejores resultados del docking elegidos por número de cluster y energía de interacción, se puede apreciar en la figura que las tres interacciones se encuentran muy cerca de las mismas. Sin embargo, en esta investigación no nos atrevemos a especular sin una amplia evidencia experimental de como se unen estas proteínas de una manera compleja en naturaleza y que residuos subyacen en la interfaz para considerarse como hotspots.

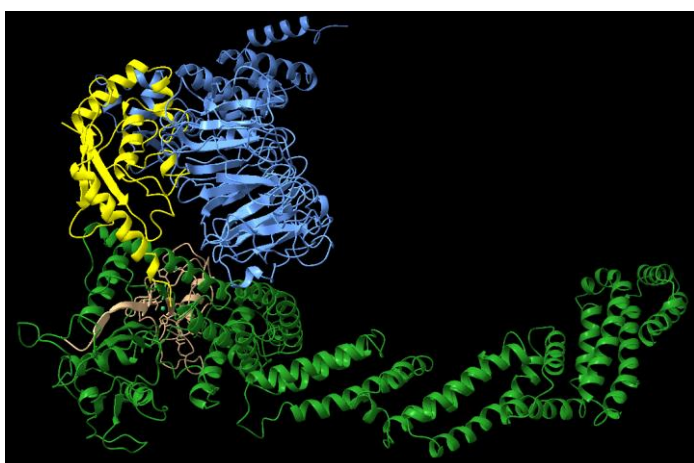


Figura 14. Acoplamiento molecular de las mejores interfaces del complejo pRCBTB1/Ubi-E2E3/Cul-3/RBX1. Se muestra la arista RBX1. Modelo de pRCBTB1 (Azul cielo); Modelo de Ubi-E2E3 (Amarillo); modelo de Cul-3/RBX1 (verde).

9.6 Quimiometría de las interfaces predichas por el docking

9.6.1 Propiedades de los residuos en la interfaz

Las proteínas son moléculas extremadamente heterogéneas, lo que les permite ejecutar una gran variedad de funciones biológicas. Las proteínas tienen funciones estructurales, realizan catálisis química y forman parte de máquinas moleculares complejas más grandes. Lo que es común a la mayoría de las proteínas es su capacidad para interactuar con otras moléculas. (Berggard et al 2007).

Las proteínas son los principales agentes catalíticos, elementos estructurales, transmisores de señales, transportadores y máquinas moleculares en las células (Nelson, Lehninger y Cox, 2008). Sin embargo, las proteínas individuales no funcionan solas; deben interactuar con otras moléculas para llevar a cabo sus funciones celulares. Las alteraciones en las interfaces proteína-proteína a menudo conducen a enfermedades y, por lo tanto, las interfaces de proteínas se han convertido en uno de los nuevos objetivos más populares para el diseño racional de fármacos (Jubb, et al., 2015; Rask-Andersen et al., 2011). Además de las aplicaciones prácticas en el diseño de fármacos, la identificación fiable de las interfaces proteína-proteína es importante para la investigación básica sobre los mecanismos de reconocimiento macromolecular.

Las proteínas asociadas, as su vez, incluyen otras proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, péptidos, carbohidratos, cadenas de ácidos grasos y más. Las proteínas realizan sus diversas actividades dentro del abarrotado entorno celular, donde mantienen la especificidad y la eficiencia. En general, el actual conocimiento de las interfaces de proteínas proviene de las entradas de la base de datos de PDB que contiene de miles de complejos y una gran cantidad de trabajo bioquímico, sobre todo la mutagénesis, que proporciona una descripción termodinámica y cinética de la interfaz de unión. Dichos resultados han sido ampliamente analizados y son objeto de numerosos trabajos y revisiones. En el nivel más básico, las interfaces proteína-proteína entierran entre 1200 y 5000 Å² de superficie, y los contactos directos constituyen el 70% de la interfaz. El resto de la interfaz está ocupada por moléculas de agua (Schreiber et al., 2020).

La arquitectura básica de interfaz sugiere que las proteínas que interactúan tienen un alto (pero no perfecto) grado de complementariedad de forma. Además, para que las proteínas

se unan, se requiere que los aminoácidos que hacen contactos entre proteínas tengan un buen grado de complementariedad química, lo que les permite formar interacciones hidrofóbicas, polares o cargadas entre ellas (Cohen et al., 2008).

Las interacciones proteína-proteína (IBP) se encuentran en el corazón de la maquinaria de la vida. Numerosos mecanismos celulares, como las vías metabólicas, el transporte o la respuesta inmunitaria, dependen en gran medida de las redes de interacción de proteínas (Alberts, et al., 1998; Robinso, et al., 2007; Braun P, et al., 2012.)

Los ensamblajes proteína-proteína cubren una amplia gama de tamaños y formas, desde simples dímeros hasta las grandes cápsidas virales que están formadas por más de mil cadenas de proteínas. Los complejos proteicos también se pueden distinguir en función de su vida útil en la célula, desde complejos transitorios débiles con afinidades de unión micromolares que solo durarán unos segundos, hasta complejos permanentes con afinidades de unión nanomolares (Karaca et al., 2022).

Para predecir de forma fiable los residuos interfaciales, es necesario identificar las características que distinguen la región de la interfaz del resto de las secuencias de proteínas o estructuras 3D. Tales características (o características) son críticas para el éxito de un predictor. Las características ampliamente utilizadas en la literatura incluyen:

Tipos de aminoácidos. La característica más sencilla es la identidad o el tipo de un aminoácido. En el caso de los clasificadores que solo pueden procesar características numéricas, cada tipo de aminoácido común se puede representar como un vector binario de tamaño 20 por 1. Por ejemplo, la alanina se puede representar como [1,0,0,...,0] (Xue et al., 2015).

Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. Las propiedades fisicoquímicas comúnmente utilizadas son la hidrofobicidad, la carga y las fuerzas de van der Waals. Una base de datos de índices numéricos que representan varias propiedades fisicoquímicas de aminoácidos y pares de aminoácidos se proporciona en AAindex (Kawashima y Kanehisa, 2000).

Propensión a la interfaz. Las diferentes propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos dan lugar a propensiones de interacción diferenciales. Por ejemplo, en los heterocomplejos, los residuos polares aparecen con más frecuencia que los residuos hidrofóbicos (Jones y Thornton, 1996) y los aminoácidos aromáticos tienden a formar

interacciones de apilamiento. Cuanto mayor sea su propensión a la interfaz, más probable es que un aminoácido aparezca en la interfase en lugar de en cualquier otra parte de la superficie de la proteína. Tales propensiones generalmente se derivan de un análisis de estructuras conocidas en el PDB.

Información evolutiva. Los residuos interfaciales son sitios funcionales importantes y tienden a conservarse entre homólogos (Xue et al., 2011) o sufren mutaciones correlacionadas (Hamer et al., 2010). Existen diferentes formas de codificar la conservación de secuencias, y un enfoque ampliamente utilizado es construir PSSM (Matrices de puntuación específicas de posición) a partir de alineaciones de secuencias múltiples (MSA). Cada puntuación en un PSSM es un cociente logarítmico de verosimilitud de la aparición de un aminoácido en una columna específica de un MSA con respecto a una distribución de fondo, que representa el grado de conservación del aminoácido en esa posición específica; Cuanto mayor sea la puntuación, mayor será el grado de conservación. Por lo tanto, los PSSM capturan información evolutiva importante explotando el gran número de secuencias de proteínas disponibles, que son mucho más fáciles de obtener que las estructuras de proteínas (Jones y Thornton, 1996).

Accesibilidad relativa a los solventes. La mayoría de las proteínas reconocen e interactúan con otras proteínas a través de sus residuos superficiales (es decir, residuos con un área superficial accesible al solvente relativamente alto) a menos que las proteínas que interactúan sufran grandes cambios conformacionales al unirse. Por lo tanto, el conocimiento de los residuos de la superficie de las proteínas puede reducir en gran medida el espacio de búsqueda de predicciones y aumentar la precisión de las predicciones (Miller et al., 1987).

Como resultado del acoplamiento molecular, los resultados totales que realizan interfaz con su accesibilidad relativa al solvente ó superficie accesible al solvente (SAS) se muestran en la figura 16. Los residuos totales en la interfaz del complejo pRCBTB1/Ubi-E2E3 (interfaz AB) muestran una mayor cantidad de residuos que se a diferencia de las interfaces pRCBTB1/Cul3-RBX1 (interfaz AB) y Ubi-E2E3/Cul3-RBX1 (interfaz BC). Todos los cálculos se realizaron con base al acoplamiento molecular del trímero (cf. Figura 16).

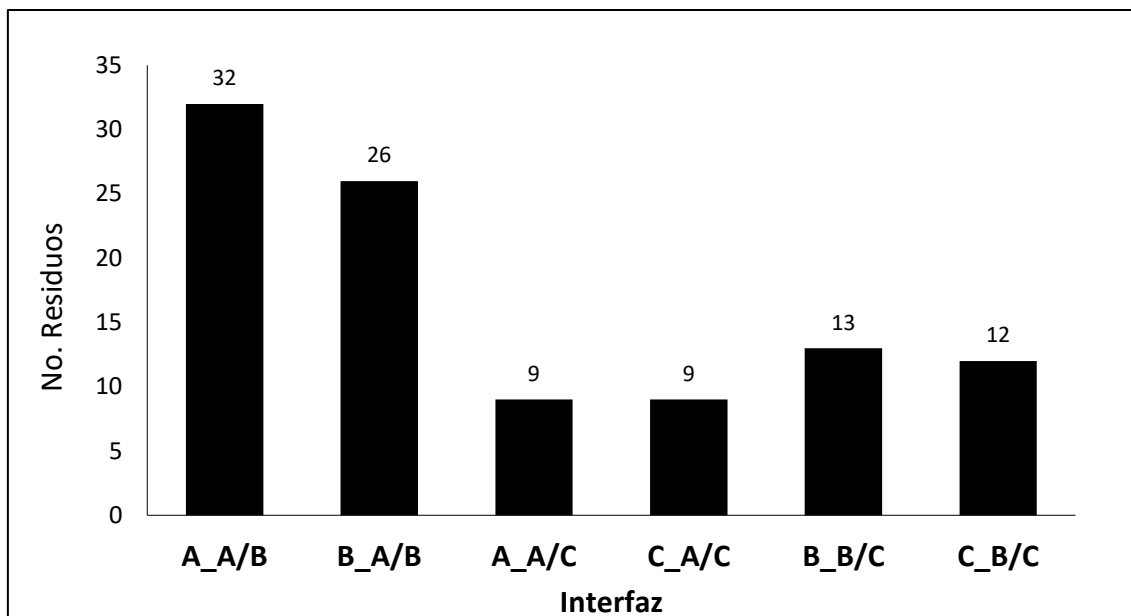


Figura 15. Total, de residuos que realizan interfaz en la SAS. Interfaz A/B: pRCBTB1/Ubi-E2E3, respectivamente; interfaz A/C: pRCBTB1/ Cul3-RBX1, respectivamente; interfaz BC: Ubi-E2E3/Cul3-RBX1, respectivamente. La cadena ó proteína en el análisis está definida por una letra X, la interfaz se define como X/Y.

Los residuos que participan en la interfaz como resultado del acoplamiento molecular se identificaron de acuerdo con su clasificación convencional que concierne a alifáticos no polares: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina; polares sin carga: metionina, cisteína, serina, treonina, asparagina y glutamina; cargados positivos: lisina y arginina; cargados negativos: triptófano, fenilalanina, tirosina. Histidina fue excepción en la clasificación de aromáticos. La tautomería de protonación del grupo imidazol de histidina en sistemas biológicos vuelve muy versátil a su cadena R lateral para interactuar con biomoléculas ó moléculas pequeñas similares ó no a fármacos; a un pH 7.4 y un $pK_a = 6.5$, la cual se puede coordinar con iones metálicos como Ca^{2+} y Zn^{2+} , al mismo tiempo funciona como donador y aceptor de puentes de hidrógeno. Además, se comporta como un anillo aromático el cual puede tomar parte en interacciones catión - π , interacciones apiladas $\pi - \pi$, interacciones en forma de $\pi - \pi$, entre otras (Liao et al., 2013).

El complejo estructural pRCBTB1/Ubi-E2E3, muestra la mayor cantidad de residuos polares en la interfaz para ambos modelos estructurales en donde se atribuye a que se puedan formar interacciones entre donadores y aceptores lo mismo se presenta en los demás complejos. Sin embargo, con base a que no existe evidencia experimental, el

software de acoplamiento molecular tiene una función de puntuación que realiza el acoplamiento molecular en base a la simetría y la optimización de la búsqueda donadores-aceptores.

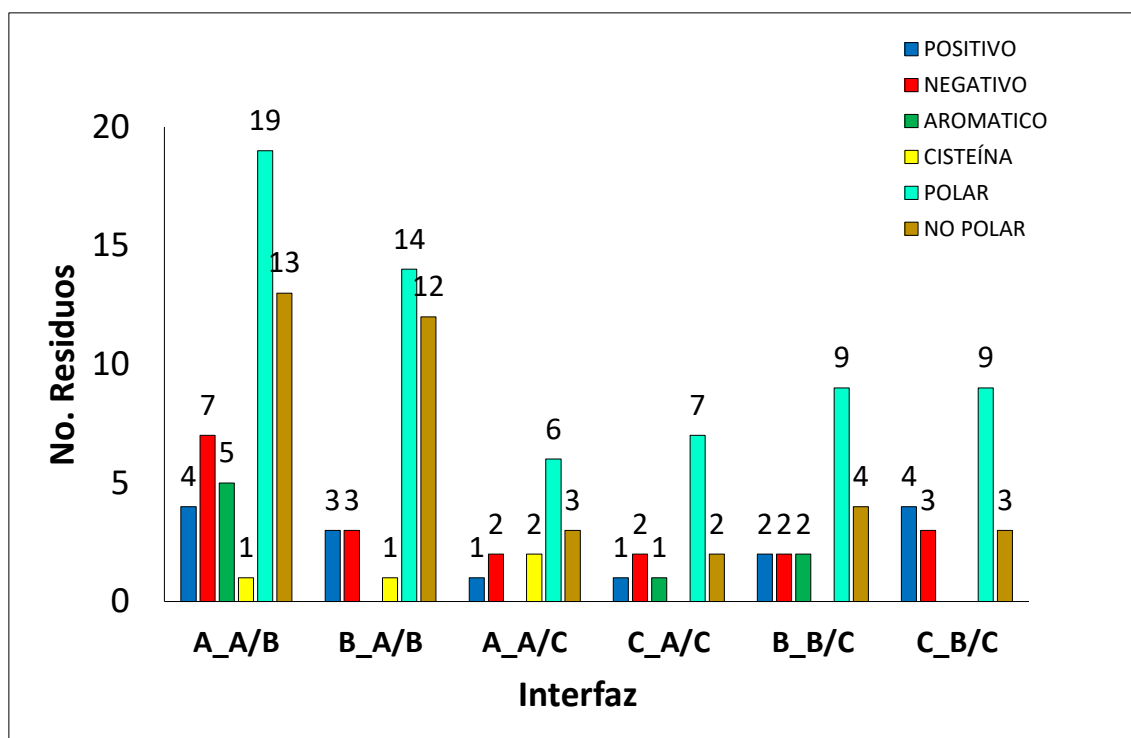


Figura 16. Residuos que realizan interfaz en la SAS. Interfaz A/B: pRCBTB1/Ubi-E2E3, respectivamente; interfaz A/C: pRCBTB1/ Cul3 RBX1, respectivamente; interfaz BC: Ubi-E2E3/ Cul3-RBX1, respectivamente. La cadena ó proteína en el análisis está definida por una letra X, la interfaz se define como X/Y.

9.7 Enlaces proteína/proteína en las interfaces

Por lo general, las interacciones proteína-proteína ocurren en varios residuos de aminoácidos en las regiones de interacción, teniendo roles críticos en la interacción. Las regiones de los residuos de aminoácidos en la interfaz de las proteína-proteína que contribuyen a la energía libre de unión se denominan puntos calientes ó "hotspots" (Shangary et al., 2009).

A medida que se expande el área de la interacción proteína-proteína, aumenta el número de puntos calientes. El área de todos los puntos calientes es de aproximadamente 600 Å², generalmente ubicado en o cerca de la interfaz la interacción proteína-proteína. Los puntos calientes en los IBP se identifican a través de un experimento de mutación puntual

(Geppert et al., 2011; Moreira et al., 2007). Específicamente, con métodos computacionales *in silico*, los residuos de aminoácidos en las interacciones proteína-proteína se silencian en alanina ó glicina, y se mide el cambio de la energía libre de unión (kcal/mol) para determinar los residuos que contribuyen significativamente a la energía libre de unión (Scott et al., 2016). Los puntos calientes se han definido como estos sitios donde las mutaciones de alanina causan un aumento significativo en la energía libre de unión a 2,0 kcal/mol.³² El triptófano, la arginina y la tirosina tienen más probabilidades de aparecer en los puntos calientes que otros aminoácidos. Debido al importante papel de estos “hotspots”, a menudo se utilizan para diseñar fármacos ó encontrar sitios proteicos de unión (Lu et al., 2020).

La caracterización quimiométrica respecto al número de residuos y su clasificación deja en claro que la forma que prevalece son las interacciones donadoras y receptoras. En este estudio mediante el software PDBePISA (Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies), se determinaron los enlaces en las estructuras los cuales se muestran en la Tabla 8, 9 y 10, y en la figura 18, 19, 20 y 21, en donde se puede apreciar la interfaz predicha por el acoplamiento molecular, así como sus enlaces a nivel atómico entre los átomos donadores y aceptores, así como el nombre atómico específico de acuerdo con el campo de fuerza CHARMM36 (Brooks et al., 2009).

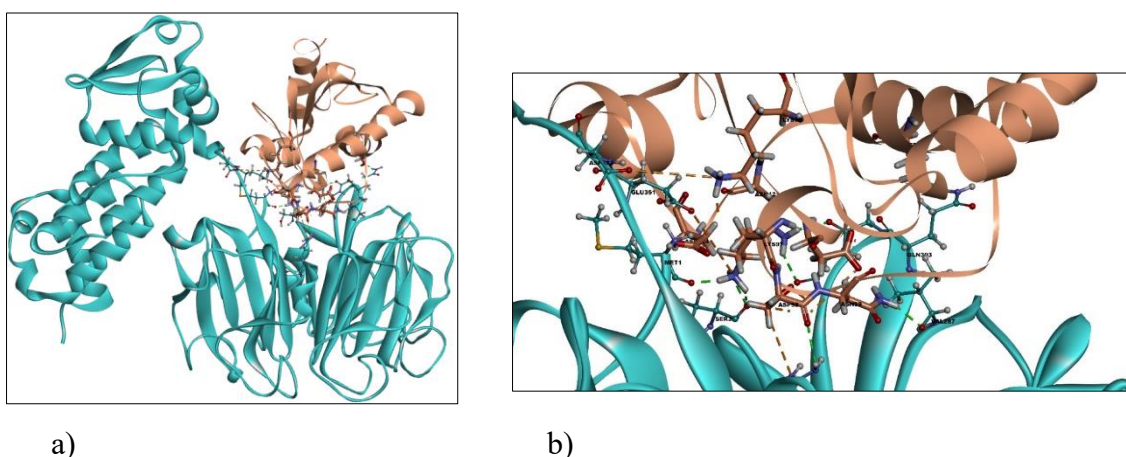
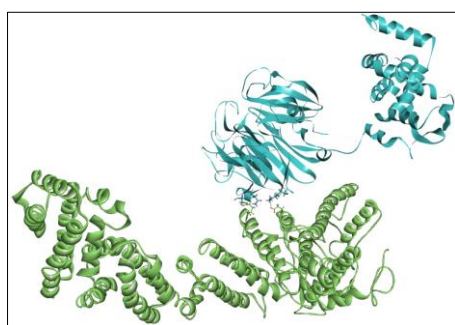


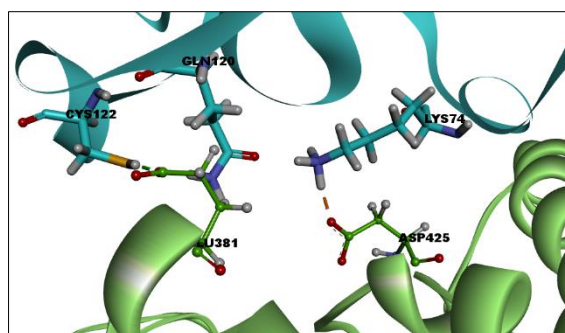
Figura 17. Interfaz quimiométrica de los modelos Ubi-E2E3/pRCBTB1 a) Vista enfocando a las proteínas completas, b) vista enfocando a las proteínas en su interfaz. Se presenta el ligando Ubi-E2E3 en forma de cintas bandera y el receptor pRCBTB1 en forma de cinta gruesa (Modelos: pRCBTB1 (azul agua marina), Ubi-E2E3 (samon); PPIs: Puentes de sal (naranja), puentes de hidrógeno (verde laser); Las etiquetas negras indican el nombre del residuo seguido por el número de aminoácido correspondiente a la secuencia nativa.

Tabla 8. Enlaces de la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1.

Donador o positivo	Aceptor o negativo	Tipo de enlace	Distancia Å
A:MET1:HT2	B:ASP124:OD1	Puente salino	1.88719
A:LYS301:HZ1	B:ASP98:OD2	Puente salino	2.02867
A:LYS301:HZ2	B:ASP98:OD1	Puente salino	2.16459
B:LYS73:HZ1	A:GLU349:OE1	Puente salino	1.79179
A:LYS301:NZ	B:ASP94:OD2	Puente salino	4.15003
A:ARG344:NH2	B:ASP98:OD1	Puente salino	3.80127
B:LYS73:NZ	A:ASP352:OD2	Puente salino	3.54923
B:LYS97:NZ	A:GLU351:OE2	Puente salino	3.32095
A:GLN303:HE22	B:SER115:OG	Puente de hidrógeno	2.31653
A:ARG344:HH12	B:ASP98:O	Puente de hidrógeno	2.55593
B:LYS97:HZ1	A:SER327:O	Puente de hidrógeno	2.56651
B:LYS97:HZ2	A:SER327:O	Puente de hidrógeno	2.45256
B:LYS97:HZ3	A:MET1:O	Puente de hidrógeno	1.81393
B:ASN99:HD21	A:VAL287:O	Puente de hidrógeno	2.09607
B:ASN121:HD21	A:GLY305:O	Puente de hidrógeno	2.35331
B:ASN121:HD22	A:GLY304:O	Puente de hidrógeno	2.07248



a)



b)

Figura 18. Interfaz quimiométrica de los modelos pRCBTB1/Cul3-RBX1. a) Vista enfocando a las proteínas completas A: pRCBTB1; B: Ubi-E2E3, b) vista enfocando a las proteínas en su interfaz. Se presenta el ligando pRCBTB1 en forma de cintas bandera y el receptor Cul3-RBX1 en forma de cinta gruesa (Modelos: pRCBTB1 (azul agua marina), Cul3-RBX1 (verde bosque); PPIs: Puentes de sal (naranja), puentes de hidrógeno (verde láser), las etiquetas negras indican el nombre del residuo seguido por el número de aminoácido correspondiente a la secuencia nativa.

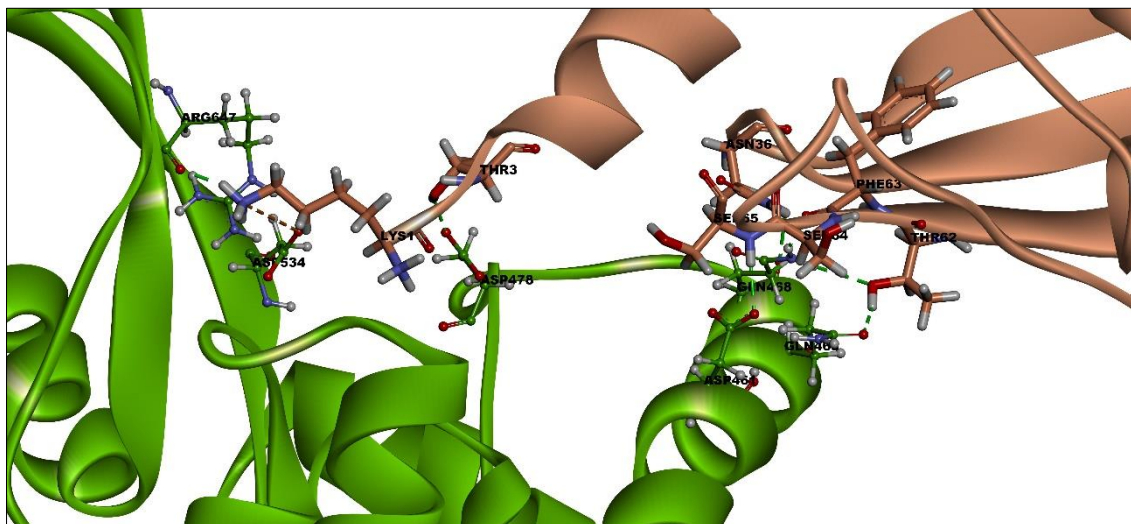
Tabla 9. Enlaces de la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1.

Donador o positivo	Aceptor o negativo	Tipo de enlace	Distancia Å
A:LYS74:HZ3	C:ASP425:OD2	Puente salino	1.83249
A:GLN120:HE22	C:GLU381:OE1	Puente de hidrógeno	2.18361
A:CYS122:HG	C:GLU381:OE1	Puente de hidrógeno	1.8416

A: pRCBTB1; C: Cul3-RBX1



a)



b)

Figura 19. Interfaz quimiométrica de los modelos Ubi-E2E3/ Cul3-RBX1. a) Vista enfocando a las proteínas completas, b) vista enfocando a las proteínas en su interfaz. Se presenta el ligando Ubi-E2E3 en forma de cintas bandera y el receptor Cul3-RBX1 en forma de cinta gruesa (Modelos: Ubi-E2E3 (salmón), Cul3-RBX1 (verde bosque); PPIs: Puentes de sal (naranja), puentes de hidrógeno (verde laser); Las etiquetas negras indican el nombre del residuo seguido por el número de aminoácido correspondiente a la secuencia nativa.

Tabla 10. Enlaces de la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1.

Donador o positivo	Aceptor o negativo	Tipo de enlace	Distancia Å
B:LYS1:NZ	C:ASP534:OD2	Puente salino	3.91011
B:LYS1:HZ1	C:ARG647:O	Puente de hidrógeno	1.90168
B:THR3:HG1	C:ASP478:OD2	Puente de hidrógeno	2.03347
B:ASN36:HD22	C:GLN468:O	Puente de hidrógeno	2.16388
B:THR62:HG1	C:GLN465:OE1	Puente de hidrógeno	2.23058
B:SER65:HN	C:ASP461:OD2	Puente de hidrógeno	2.08597
C:GLN468:HE21	B:PHE63:O	Puente de hidrógeno	2.17367
C:GLN468:HE22	B:THR62:OG1	Puente de hidrógeno	2.73315

A: pRCBTB1; C: Cul3-RBX1

9.8 Área enterrada de superficie en la interfaz

El área de superficie enterrada es uno de los principales predictores de la afinidad de unión y se correlaciona significativamente con la constante de disociación medida experimentalmente (K_d). Cuando una proteína forma un complejo con otra proteína, alguna fracción de su área de superficie accesible al solvente inicial queda enterrada dentro de la interfaz entre las proteínas, lo que se conoce como área enterrada de superficie (Lee y Richards, 1971). También se ha demostrado que el área enterrada de superficie está relacionada con la energía de interacción definida según el modelo de Chothia-Janin (Chothia y Janin, 1975; Miller et al., 1987). Es más probable que los residuos que están muy enterrados en la formación compleja sean los residuos de interfaz (IR) si no se producen cambios alostéricos. La identificación de los residuos que forman la interfaz y sus propiedades juegan un papel crucial en la determinación de la especificidad de unión del complejo y, posteriormente, en la predicción de PPI. (Belapure et al., 2023)

En la práctica, el área enterrada de superficie se calcula a partir de una estructura 3D de un complejo unido de las dos proteínas de interés. La diferencia entre la superficie accesible al solvente calculado primero tratando las proteínas componentes juntas y luego tratándolas como entidades separadas, da el valor del área enterrada de superficie.

Las proteínas componentes son cuerpos rígidos, lo que hace que el área enterrada de superficie calculado sea solo un valor único aproximado. (Belapure et al., 2023)

El área enterrada accesible al solvente de interfaz de los residuos del complejo pRCBTB1/Cul3-RBX1 se presenta en la Figura 21, y 22, en el modelo pRCBTB1 se presentan los residuos con la mayor superficie de interfaz 48.007 y 47.088 Å² para glutamina y lisina, respectivamente. Además, la mayor superficie de interfaz enterrada para el modelo Cul3-RBX1 es de 68.111 y 67.388 Å² para aspartato y glutamato, respectivamente.

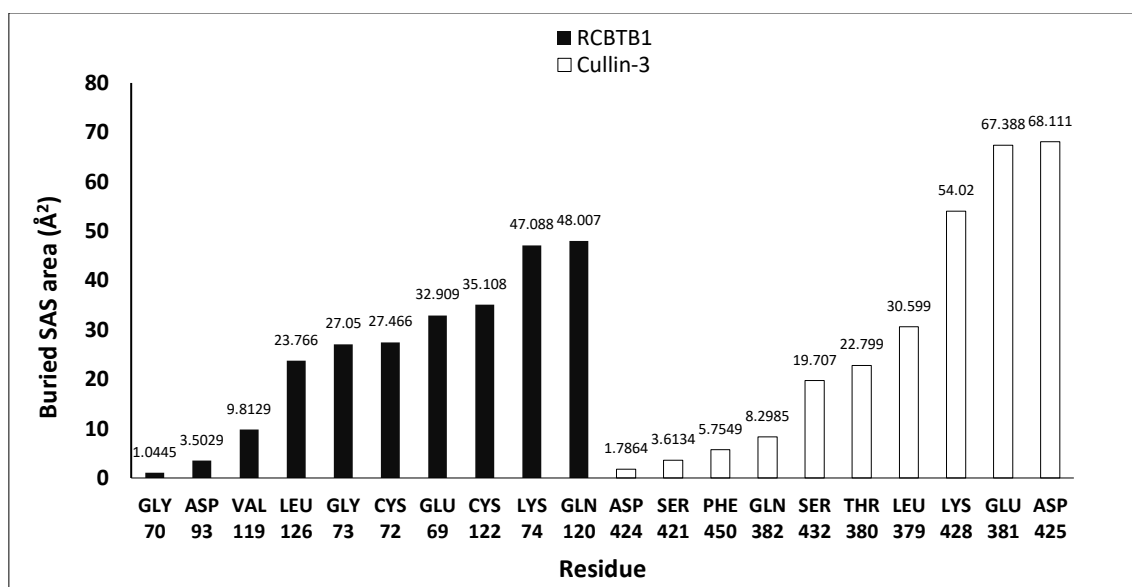


Figura 20. Área enterrada de superficie de residuos en la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1. El área enterrada accesible al solvente de interfaz de residuos en la interfaz se presenta en la Figura 22, en donde se presentan los residuos con mayor superficie de interfaz enterrada para pRCBTB1 forman puentes salinos, respectivamente con excepción de algunos residuos que forman un enlace muy cercano a 4 Å tal como ASP 352, en donde la superficie accesible al disolvente después restar la distancia de dos esferas de sonda (2.8 Å) es de 1.2 Å, por lo que de manera mínima la superficie de dicho residuo se entierra con un área de 3.2383 pero se logra formar el enlace electrostático por puente salino ≤ 4 Å.

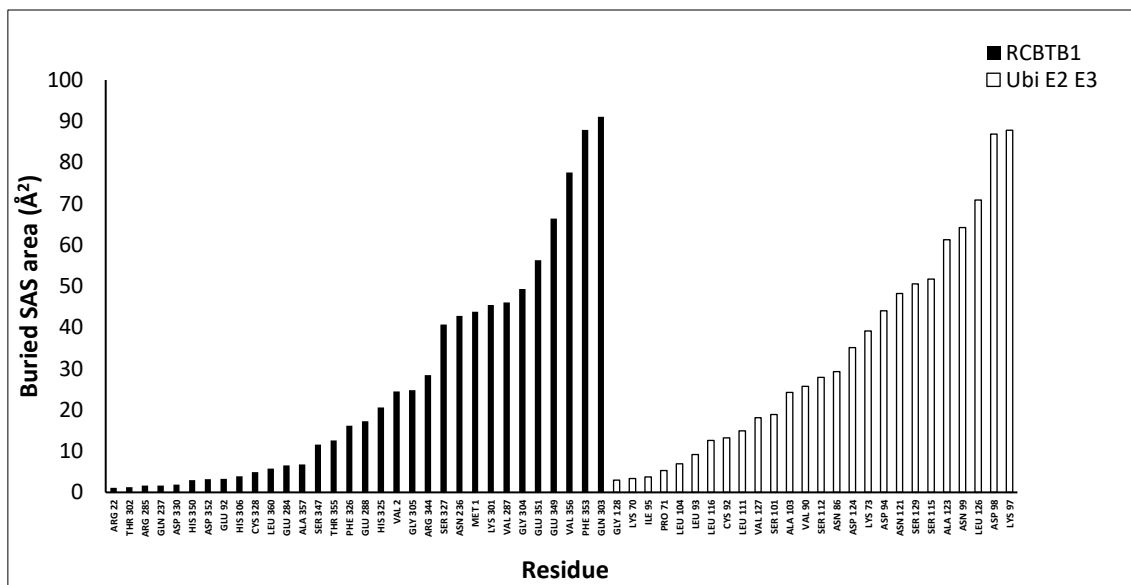


Figura 21. Área enterrada de superficie de residuos en la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1

En la Figura 23, se muestra la mayor área enterrada accesible al solvente de interfaz del complejo Ubi-E2E3/Cul3-RBX1 de los residuos LYS1 y GLN468 con 111.61 y 95.266, respectivamente.

LYS1 presenta un puente de sal y un enlace de hidrógeno, mientras que GLN468 presenta 3 puentes de hidrógeno, lo que indica que los cálculos quimiométricos de interfaz se realizaron con buenas aproximaciones respecto a la interacción de los residuos en respuesta a la dinámica molecular por minimización de estructuras.

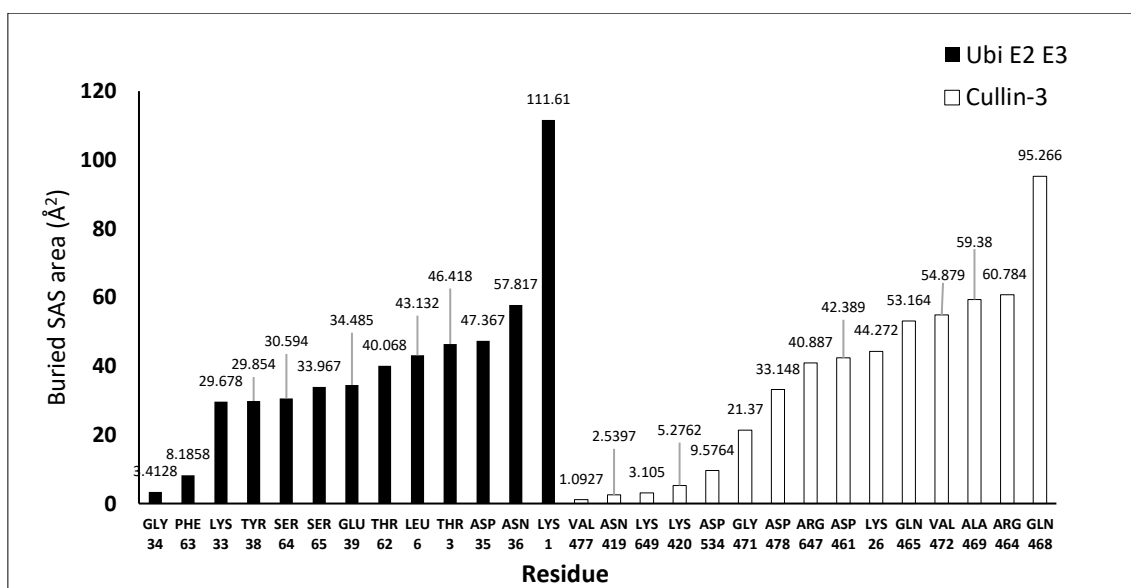
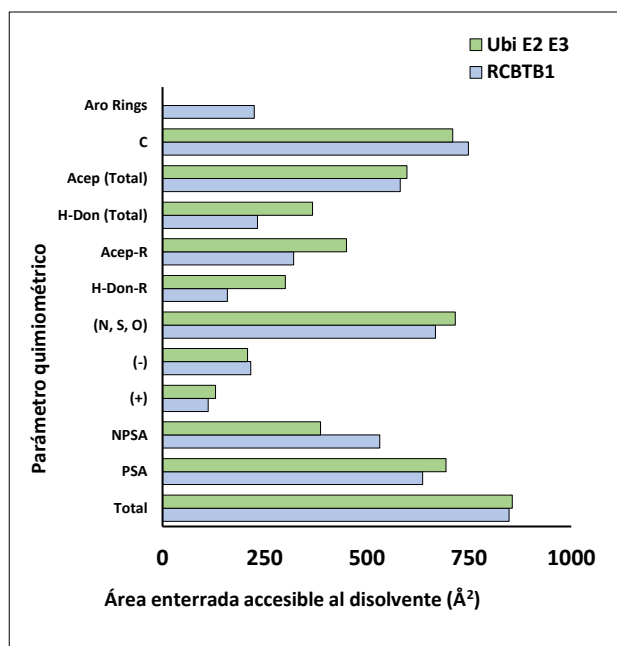


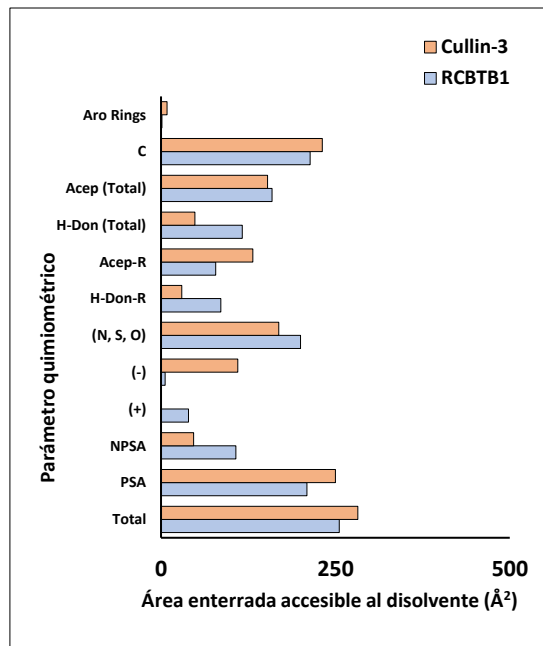
Figura 22. Área enterrada de superficie de residuos en la interfaz Ubi-E2E3/Cul3-RBX1

El área enterrada accesible al solvente de interfaz atómica se presenta en la figura 24. En donde se presentan las superficies enterradas accesibles al disolvente de interfaz total de cada una de las cadenas individuales: (sumatoria de todos los átomos) que tienen su superficie accesible al solvente enterrada, superficie polar por clasificación de residuos polares y no polares (**Propiedades de los residuos en la interfaz**), átomos donadores cargados positivos, átomos aceptores cargados negativos, átomos polares (N, O y S), átomos donadores y aceptores totales, átomos donadores y aceptores en la cadena R, carbonos totales y carbonos de los anillos aromáticos. Estas características propias de cada proteína identifican el comportamiento quimiométrico en el sitio de unión. En la Figura 24a, la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1 presenta una mayor superficie de interfaz de átomos donadores y aceptores en donde el arreglo espacial y estructural realizado por la dinámica molecular acerca electrostáticamente a los átomos en el sitio de interacción. En las interfaces pRCBTB1/Cul3-RBX1 se descartan posibles enlaces que involucran anillos aromáticos π - π , debido a que su superficie de interfaz es muy baja. Cabe resaltar que es necesario realizar dinámicas moleculares de al menos 1000 ns para descartar dichas interacciones por apilamiento de anillos aromáticos π - π , en donde estos análisis no se realizaron en esta investigación.

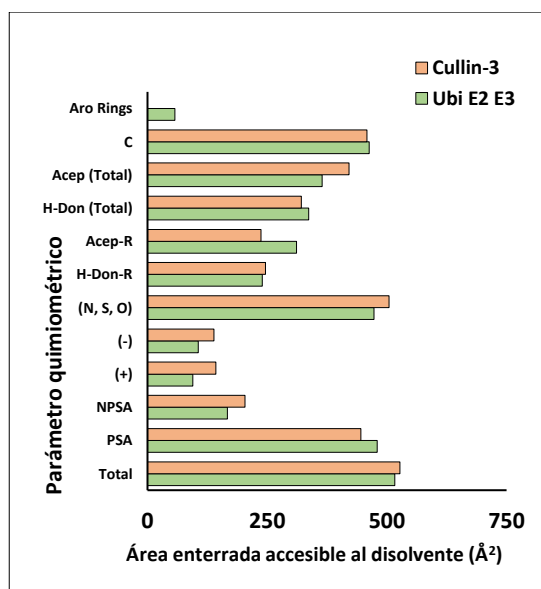
En las tres interfaces predominó el acercamiento en la interfaz de átomos polares, así como residuos polares, en donde las tres interfaces. Por lo general, los átomos donadores y aceptores de las cadenas R de los aminoácidos, los cuales forman patrones repetitivos en las interfaces y se mantienen entre isoformas y especies evolutivamente a lo largo del tiempo son considerados “hotspots”. En las interfaces predominaron los átomos aceptores para los tres modelos, por lo que predomina una superficie electrostática electronegativa generada por la nube de densidad de electrones en los sitios de unión, estos resultados se pueden consultar en el siguiente apartado (Figura 25).



a)



b)



c)

Figura 23. Área enterrada de superficie de atómica en las interfaces de los modelos. Interfaces de los modelos: a) Ubi-E2E3/ pRCBTB1, b) pRCBTB1/ y c) Ubi-E2E3/Cul3-RBX1. Total: Átomos totales; PSA: átomos de residuos polares; NPSA: átomos de residuos no polares; (+): Átomos donadores cargados positivos; (-) átomos aceptores cargados negativos; (N, S, O): átomos polares; Acep (Total): átomos aceptores totales; H-Don (Total): átomos donadores totales; (Acep-R): átomos aceptores en la cadena R; H-Don (Total): átomos donadores en la cadena R; C: carbonos totales; Aro Rings: carbonos de los anillos aromáticos.

10. Discusión

En análisis exhaustivo del complejo proteico asociado a las IRD por medio de simulaciones moleculares computacionales identificando el gen RCBTB1 el cual traduce la proteína RCBTB1 o proteína 1, la cual, probablemente participa en el proceso de pérdida gradual del sistema visual. Hasta el momento, no hay una evidencia fehaciente de cuáles son los genes determinantes para este evento. Por lo cual, el análisis bioinformático, nos da evidencia de que el gen RCBTB1, puede ser un blanco para este proceso (Tabla 1). Para ello, se emplearon herramientas de modelado molecular y se analizó el potencial electrostático de superficie en la interfaz del complejo de ubiquitina. Donde, la célula viva es un sistema extremadamente complejo y está compuesta por cientos de miles de tipos de macromoléculas biológicas, que interactúan constantemente entre sí para mantener la función celular, lo que refleja la dinámica de las redes celulares (Przytycka et al., 2010). Las interacciones son muy específicas y, con frecuencia, una macromolécula proteica particular es capaz de reconocer a su parte complementaria entre cientos de miles de moléculas candidatas (Berger-Wolf et al., 2010). Al mismo tiempo, el proceso de reconocimiento es rápido y, por lo tanto, algunas interacciones proteína-proteína pueden ser guiadas electrostáticamente, quizás a través de una fuerza de largo alcance que selecciona y une a los compañeros de interacción. El mejor candidato para tal fuerza de guía de largo alcance es la fuerza electrostática. Una estimación aproximada de la energía electrostática de interacción entre dos moléculas que llevan una carga neta unitaria y ubicadas a una distancia de 10 Å entre sí resulta en casi 1 kJ/mol, que es mucho más de lo que cualquier otro componente energético contribuye a la unión a tales distancias (Zhang et al., 2011). Las interacciones electrostáticas se encuentran entre los factores más importantes a considerar al analizar la función de las moléculas biológicas. Desde el trabajo pionero de LinderstrømLang, 1924, se han logrado avances significativos en la comprensión cualitativa y la evaluación cuantitativa de las interacciones electrostáticas. Las fuerzas electrostáticas afectan la unión molecular a través de interacciones no solo entre los enlaces, sino también con el solvente. Esto se debe a que las moléculas del solvente deben ser desplazadas de la interfaz de unión, lo que introduce una gran penalización por desolvatación que debe ser superada por una interacción de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas atractivas en la asociación proteína-proteína o proteína-ligando (Honegger et al., 2009).

Se han desarrollado diversos métodos y algoritmos computacionales para estudiar las proteínas y sus interacciones con otras moléculas. Diversos métodos como las simulaciones de dinámica molecular, las simulaciones de dinámica browniana, los cálculos del pKa de proteínas, los algoritmos de diseño de proteínas y los algoritmos de acoplamiento proteína-fármaco y proteína-proteína se utilizan ampliamente en la investigación biológica moderna. Todos estos algoritmos utilizan estructuras tridimensionales de moléculas proteicas para predecir y analizar características proteicas, como la actividad catalítica, la vía de plegamiento, la estabilidad, la solubilidad y la especificidad de unión entre ligando y fármaco (Jain et al., 2017).

Las energías electrostáticas desempeñan un papel fundamental en la determinación de todas las características mencionadas, y, por lo tanto, el potencial de los métodos para predecir las características físicas y bioquímicas solo se alcanzará una vez que seamos capaces de calcular con precisión las energías y fuerzas electrostáticas en y alrededor de las proteínas. El cálculo de las interacciones electrostáticas en biomoléculas presenta, sin duda, uno de los mayores obstáculos para mejorar la precisión y la utilidad de los algoritmos de cálculo de energía basados en la estructura (Kukić y Nielsen., 2017). El potencial electrostático en la superficie accesible al solvente presenta una mayor precisión en la detección de parámetros a la hora de evaluar la quimiometría en una huella dactilar “fingerprint” debido a que los aminoácidos presentan posiciones atómicas y la superficie accesible al disolvente presenta una superficie simulada en un software con cientos de miles de puntos de cuadrícula en donde el valor del potencial electrostático reside en muchos puntos dentro de cada punto de cuadrícula brindando un valor de alta precisión de las energías que residen en la superficie en un sitio de unión para una función biológica específica.

Los resultados del potencial electrostático de superficie se presentan en la figura 25, en donde los valores más altos para las interfaces se presentan de 0 a 5 y -5 a 0 kT/e⁻.

La interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1. En la figura 25, se puede identificar una superficie de 660.59 (valores de 0 a 5 kT/e⁻) para pRCBTB1 vs 754.51 (valores de -5 a 0 kT/e⁻) para Ubi-E2E3, en donde se puede ver que existe una relación en una superficie similar en las cargas complementarias. Sin embargo, en la misma interfaz se puede identificar una superficie de 1304.51 (valores de -5 a 0 kT/e⁻) para pRCBTB1 vs 961.87 (valores de 0 a 5 kT/e⁻) para Ubi-E2E3. Por lo que hay una diferencia en la complementariedad de superficies. Estos patrones podrían ser indicios de cómo se comporta el binding site en ambas proteínas.

Estos patrones electrostáticos deben interpretarse con cautela. En estudios previos sobre complejos E2/E3 y proteínas que contienen dominios BTB se ha reportado que la complementariedad de cargas contribuye al acoplamiento inicial, pero no constituye el factor determinante de la afinidad ni la estabilidad final del complejo. En muchos casos, las interacciones hidrofóbicas, los ajustes conformacionales inducidos por la unión y la participación de cofactores desempeñan un papel igualmente relevante. Por tanto, los valores obtenidos para pRCBTB1 parecen situarse dentro del espectro observado para proteínas con dominios similares, aunque la variabilidad en las superficies complementarias sugiere que el acoplamiento podría requerir reorganizaciones locales de la estructura.

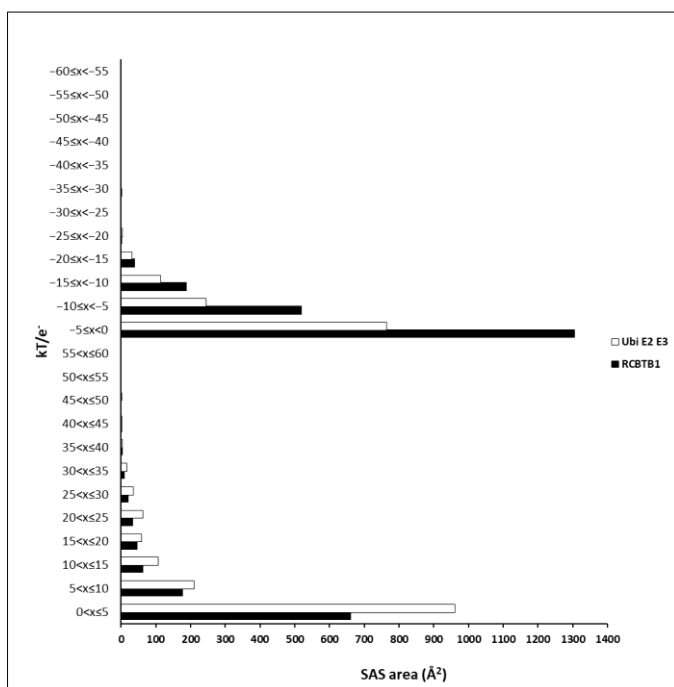


Figura 24. PES en la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1

En la figura 26 se determinó el PES de la interfaz pRCBTB1/Cul3-RBX1, en donde una superficie de 364.05 (valores de 0 a 5 kT/e^-) para pRCBTB1 vs 347.42 (valores de -5 a 0 kT/e^-) para Cul3-RBX1, en donde se puede discernir que existe una relación en una superficie similar en las cargas complementarias. También, en la misma interfaz se puede identificar una superficie de 317.95 (valores de -5 a 0 kT/e^-) para pRCBTB1 vs 355.22 (valores de 0 a 5 kT/e^-) para Cul3-RBX1. En donde hay una similitud en las superficies de interfaz de dichos valores. Estos patrones quimiométricos podrían brindar una idea de un mapa de la distribución de cargas en la superficie accesible al disolvente y por medio

de patrones colorimétricos y cuantitativos (valores en un área específica) se podría diseñar un fingerprint para dichas proteínas.

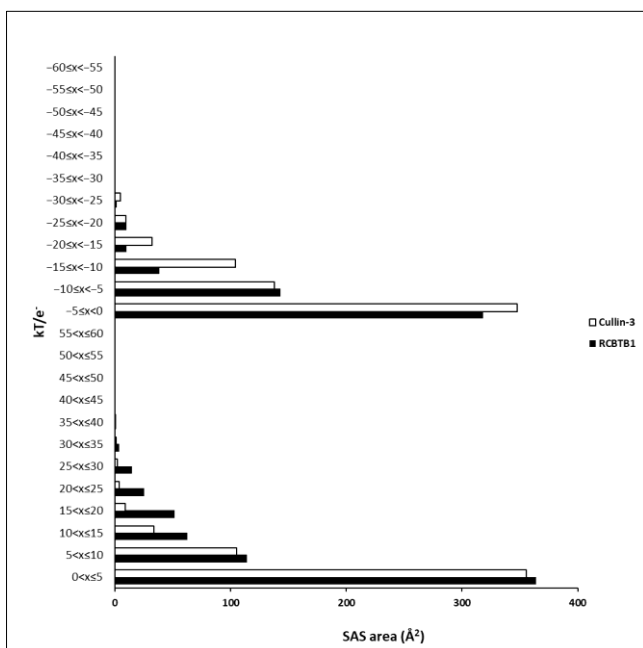


Figura 25. PES en la interfaz Ubi-E2E3/Cul3-RBX1.

En la figura 27 se determinó el PES de la interfaz Ubi-E2E3/Cul3-RBX1, en donde una superficie de 511.2 Å² (valores de 0 a 5 kT/e⁻) para Ubi-E2E3 vs 354.2 Å² (valores de -5 a 0 kT/e⁻) para Cul3-RBX1, en donde existe una diferencia de 150 Å². También, en la misma interfaz se puede identificar una superficie de 245.3 Å² (valores de -5 a 0 kT/e⁻) para Ubi-E2E3 vs 555.71 (valores de 0 a 5 kT/e⁻) para Cul3-RBX1. En donde no hay una similitud en las superficies de interfaz de dichos valores. Posiblemente se podría atribuir a que existe una débil complementariedad en la superficie electrostática para dichos valores. Sin embargo, al no existir una estructura experimental con evidencia practica de interfaces similares, todos los cálculos son putativos, los cuales podrían ser indicios para descartar sitios de unión.

11. Conclusiones

Los patrones quimiométricos de las interfaces revelan residuos específicos de interacción los cuales subyacen en una interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1/Cul3-RBX1 putativa explorada por primera vez. Dichos patrones brindan indicios de cómo se pueden unir estas tres moléculas para dar lugar a una función biológica específica.

- El modelo de la proteína pRCBTB1 tuvo ciertas limitantes debido a que tanto el dominio RCC1 como el dominio BTB, sus estructuras molde determinadas experimentalmente tenían un porcentaje de identidad menor al 35 % para ambos casos por debajo de la zona de twilight. Además, la orientación simétrica del dominio RCC1 respecto al dominio BTB carece de información, por lo que se orientó el dominio RCC1 hacia el dominio BTB de manera análoga a otras proteínas tales como ECH similar a Kelch unida a culina 3 (Código PDB: 6W68).
- Las energías de minimización para todas las proteínas se llevaron a cabo hasta llevar una minimización en donde la curva se asienta hasta formar una pendiente que tiende a cero, en dicho punto a la proteína se le evaluaron los choques atómicos en donde no existieron contactos desfavorables incluso para átomos cargados los cuales posteriores a la minimización se atraen hasta acercarse considerablemente.
- Los mejores acoplamientos moleculares para las interfaces fueron: un cluster de 27 y una energía de interacción de -318.9 kJ/mol para la interfaz Ubi-E2E3/pRCBTB1; un cluster de 49 y una energía de interacción de -492.4 kJ/mol para el complejo pRCBTB1/Cul3-RBX1; un cluster de 57 y una energía de interacción de -96.7 kJ/mol para el complejo Ubi-E2E3/Cul3-RBX1, lo que indica que la mejor interacción fue pRCBTB1/Cul3-RBX1 aún que los resultados son putativos, pueden ser un indicio de cómo pueden tener la posición y conformación dichas macromoléculas.
- Los residuos con mejores patrones quimiométricos que conllevan a interacciones electrostáticas de enlace, así como de superficie de interfaz son para Ubi-E2E3: ASP 98, LYS 301; pRCBTB1 LYS 97 y ASN 121; Cul3-RBX1: GLU 381; los cuales podrían ser hotspots importantes en el sitio de interacción para ambas proteínas.

- El potencial electrostático de superficie presenta una interfaz en todos los acoplamientos, en donde los valores se concentran de 0 a 5 y -5 a 0 kT/e⁻. Sin embargo, una limitante que no se realizó en este estudio fue agrupar valores del potencial electrostático de superficie en las superficies atómicas que realizan interfaz en los enlaces y realizar el cálculo con APBS para dichos sitios de interacción.
- Como futura perspectiva, estudios con más poder de cómputo que puedan realizar simulaciones moleculares computacionales de dinámicas moleculares en tiempos de 1000 ns o mayores para comprobar dichas interfaces y realizar cálculos respecto al RMSD y otros parámetros críticos en la simulación.
- En este trabajo no se evalúa directamente la posibilidad de participación de RCBTB1 y de las proteínas asociadas en las IRD desde un enfoque funcional o clínico. El análisis presentado se limita a describir patrones fisicoquímicos y características estructurales conservadas, los cuales permiten generar hipótesis iniciales sobre posibles interacciones o funciones, pero no constituyen evidencia experimental de su implicación en la fisiopatología de las distrofias hereditarias de retina.

12. Referencias

- Catomeris, A. J., Ballios, B. G., Sangermano, R., Wagner, N. E., Comander, J. I., Pierce, E. A., Place, E. M., Bujakowska, K. M., & Huckfeldt, R. M. (2022). Novel RCBTB1 variants causing later-onset non-syndromic retinal dystrophy with macular chorioretinal atrophy. *Ophthalmic Genetics*, 43(3). <https://doi.org/10.1080/13816810.2021.2023196>
- Coppieters, F., Ascari, G., Dannhausen, K., Nikopoulos, K., Peelman, F., Karlstetter, M., Xu, M., Brachet, C., Meunier, I., Tsilimbaris, M. K., Tsika, C., Blazaki, S. V., Vergult, S., Farinelli, P., Van Laethem, T., Bauwens, M., De Bruyne, M., Chen, R., Langmann, T., ... De Baere, E. (2016). Isolated and Syndromic Retinal Dystrophy Caused by Biallelic Mutations in RCBTB1, a Gene Implicated in Ubiquitination. *American Journal of Human Genetics*, 99(2). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.017>
- Cremers, F. P. M., Boon, C. J. F., Bujakowska, K., & Zeitz, C. (2018). Special issue introduction: Inherited retinal disease: Novel candidate genes, genotype-phenotype correlations, and inheritance models. In *Genes* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/genes9040215>
- Farrar, G. J., Carrigan, M., Dockery, A., Millington-Ward, S., Palfi, A., Chadderton, N., Humphries, M., Kiang, A. S., Kenna, P. F., & Humphries, P. (2017). Toward an elucidation of the molecular genetics of inherited retinal degenerations. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 26, Issue R1). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx185>
- Garafalo, A. V., Cideciyan, A. V., Héon, E., Sheplock, R., Pearson, A., WeiYang Yu, C., Sumaroka, A., Aguirre, G. D., & Jacobson, S. G. (2020). Progress in treating inherited retinal diseases: Early subretinal gene therapy clinical trials and candidates for future initiatives. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 77). <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100827>
- Hanany, M., Rivolta, C., & Sharon, D. (2020). Worldwide carrier frequency and genetic prevalence of autosomal recessive inherited retinal diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1913179117>

- Hanany, M., Yang, R. R., Lam, C. M., Beryozkin, A., Sundaresan, Y., & Sharon, D. (2023). An In-Depth Single-Gene Worldwide Carrier Frequency and Genetic Prevalence Analysis of CYP4V2 as the Cause of Bietti Crystalline Dystrophy. *Translational Vision Science and Technology*, 12(2). <https://doi.org/10.1167/tvst.12.2.27>
- Hashem, S. A., Georgiou, M., Fujinami-Yokokawa, Y., Laich, Y., Varela, M. D., de Guimaraes, T. A. C., Ali, N., Mahroo, O. A., Webster, A. R., Fujinami, K., & Michaelides, M. (2024). Genetics, Clinical Characteristics, and Natural History of PDE6B-Associated Retinal Dystrophy. *American Journal of Ophthalmology*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2024.02.005>
- Huang, Z., Zhang, D., Chen, S. C., Huang, D., Mackey, D., Chen, F. K., & McLenachan, S. (2023). Mitochondrial Dysfunction and Impaired Antioxidant Responses in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from a Patient with RCBTB1-Associated Retinopathy. *Cells*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/cells12101358>
- Inglehearn, C. F. (1998). Molecular genetics of human retinal dystrophies. *Eye (Basingstoke)*, 12(3). <https://doi.org/10.1038/eye.1998.147>
- Moore, A. T., & Evans, K. (1996). Molecular genetics of central retinal dystrophies. In *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* (Vol. 24, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.1996.tb01580.x>
- Nash, B. M., Wright, D. C., Grigg, J. R., Bennetts, B., & Jamieson, R. V. (2015). Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Translational Pediatrics*, 4(2). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.03>
- Plafker, K. S., & Plafker, S. M. (2015). The ubiquitin-conjugating enzyme UBE2E3 and its import receptor importin-11 regulate the localization and activity of the antioxidant transcription factor NRF2. *Molecular Biology of the Cell*, 26(2). <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1057>
- Plafker, K. S., Singer, J. D., & Plafker, S. M. (2009). The ubiquitin conjugating enzyme, UbcM2, engages in novel interactions with components of cullin-3 based E3 Ligases. *Biochemistry*, 48(15). <https://doi.org/10.1021/bi801971m>

- Rattner, A., Sun, H., & Nathans, J. (1999). Molecular genetics of human retinal disease. In Annual Review of Genetics (Vol. 33). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.89>
- Singh, S. P., Yadav, D. K., Chamran, M. K., & Perera, D. G. (2024). Intelligent mutation based evolutionary optimization algorithm for genomics and precision medicine. Functional & Integrative Genomics, 24(4), 128. <https://doi.org/10.1007/s10142-024-01401-3>
- Sohocki, M. M., Sullivan, L. S., Tirpak, D. L., & Daiger, S. P. (2001). Comparative analysis of aryl-hydrocarbon receptor interacting protein-like 1 (Aipl1), a gene associated with inherited retinal disease in humans. Mammalian Genome, 12(7). <https://doi.org/10.1007/s0033350020024>
- Talib, M., & Boon, C. J. F. (2020). Retinal dystrophies and the road to treatment: Clinical requirements and considerations. In Asia-Pacific Journal of Ophthalmology (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1097/APO.0000000000000290>
- Villafuerte-de la Cruz, R. A., Garza-Garza, L. A., Garza-Leon, M., Rodriguez-De la Torre, C., Parra-Bernal, C., Vazquez-Camas, I., Ramos-Gonzalez, D., Rangel-Padilla, A., Espino Barros-Palau, A., Nava-García, J., Castillo-Velazquez, J., Castillo-De Leon, E., Del Valle-Penella, A., Valdez-Garcia, J. E., & Rojas-Martinez, A. (2024). Spectrum of variants associated with inherited retinal dystrophies in Northeast Mexico. BMC Ophthalmology, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12886-023-03276-7>
- Villanueva-Mendoza, C., Tuson, M., Apam-Garduño, D., de Castro-Miró, M., Tonda, R., Trotta, J. R., Marfany, G., Valero, R., Cortés-González, V., & González-Duarte, R. (2021). The genetic landscape of inherited retinal diseases in a Mexican cohort: Genes, mutations and phenotypes. Genes, 12(11). <https://doi.org/10.3390/genes12111824>
- Wu, J. H., Liu, J. H., Ko, Y. C., Wang, C. T. C. T., Chung, Y. C., Chu, K. C., Liu, T. T., Chao, H. M., Jiang, Y. J., Chen, S. J., & Chung, M. Y. (2016). Haploinsufficiency of RCBTB1 is associated with Coats disease and familial exudative vitreoretinopathy. Human Molecular Genetics, 25(8). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw041>

- Xia, J., Gu, L., & Pan, Q. (2023). The landscape of basic gene therapy approaches in inherited retinal dystrophies. In *Frontiers in Ophthalmology* (Vol. 3). <https://doi.org/10.3389/fopht.2023.1193595>
- Zenteno, J. C., García-Montaño, L. A., Cruz-Aguilar, M., Ronquillo, J., Rodas-Serrano, A., Aguilar-Castul, L., Matsui, R., Vencedor-Meraz, C. I., Arce-González, R., Graue-Wiechers, F., Gutiérrez-Paz, M., Urrea-Victoria, T., de Dios Cuadras, U., & Chacón-Camacho, O. F. (2020). Extensive genic and allelic heterogeneity underlying inherited retinal dystrophies in Mexican patients molecularly analyzed by next-generation sequencing. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/mgg3.1044>
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., & Neidhardt, J. (2010). The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in retinal and eye research*, 29(5), 335–375. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.03.004>
- O'Neal, T. B., Tripathy, K., & Luther, E. E. (2024). Retinitis Pigmentosa. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Zhou, X., & Münger, K. (2010). Clld7, a candidate tumor suppressor on chromosome 13q14, regulates pathways of DNA damage/repair and apoptosis. *Cancer research*, 70(22), 9434–9443. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1960>
- Mabuchi, H., Fujii, H., Calin, G., Alder, H., Negrini, M., Rassenti, L., Kipps, T. J., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2001). Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*, 61(7), 2870–2877.
- Guo, D. F., Tardif, V., Ghelima, K., Chan, J. S., Ingelfinger, J. R., Chen, X., & Chenier, I. (2004). A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(20), 21109–21120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401544200guo>
- Wada, M., Okamura, T., Okada, M., Teramura, M., Masuda, M., Motoji, T., & Mizoguchi, H. (1999). Frequent chromosome arm 13q deletion in aggressive non-

- Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 13(5), 792–798.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401395>
- Wistuba, I. I., Behrens, C., Milchgrub, S., Bryant, D., Hung, J., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1999). Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*, 18(3), 643–650.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202349>
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., & Hendrickson, A. E. (1990). Human photoreceptor topography. *The Journal of comparative neurology*, 292(4), 497–523.
<https://doi.org/10.1002/cne.902920402>
- Molday R. S. (2015). Insights into the Molecular Properties of ABCA4 and Its Role in the Visual Cycle and Stargardt Disease. *Progress in molecular biology and translational science*, 134, 415–431. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.008>
- Wu, J. H., Liu, J. H., Ko, Y. C., Wang, C. T., Chung, Y. C., Chu, K. C., Liu, T. T., Chao, H. M., Jiang, Y. J., Chen, S. J., & Chung, M. Y. (2016). Haploinsufficiency of RCBTB1 is associated with Coats disease and familial exudative vitreoretinopathy. *Human molecular genetics*, 25(8), 1637–1647. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw041>
- Chung, M. Y., Chen, S. J., & Jiang, Y. J. (2021). Phenotype Variability in the Patients of Familial Exudative Vitreoretinopathy: the RCBTB1 case. *Current eye research*, 46(12), 1931. <https://doi.org/10.1080/02713683.2021.1924383>
- Yang, J., Xiao, X., Sun, W., Li, S., Jia, X., & Zhang, Q. (2021). Variants in *RCBTB1* are Associated with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa but Not Autosomal Dominant FEVR. *Current eye research*, 46(6), 839–844.
<https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1842457>
- Criswick, V. G., & Schepens, C. L. (1969). Familial exudative vitreoretinopathy. *American journal of ophthalmology*, 68(4), 578–594.
[https://doi.org/10.1016/0002-9394\(69\)91237-9](https://doi.org/10.1016/0002-9394(69)91237-9)
- Canny, C. L., & Oliver, G. L. (1976). Fluorescein angiographic findings in familial exudative vitreoretinopathy. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 94(7), 1114–1120. <https://doi.org/10.1001/archopht.1976.03910040034006>

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., Korbel, J. O., Marchini, J. L., McCarthy, S., McVean, G. A., & Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Mena, E.L., Jevtić, P., Greber, B.J. Gee C.L., Lew B.G., Akopian, D., Nogales, E., Kuriyan, J., Rape M. (2020). Structural basis for dimerization quality control. *Nature* 586, 452–456 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2636-7>
- Sali, A., & Blundell, T. L. (1993). MODELLER (versión 10.4) [Software]. Recuperado de salilab.org.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004). [UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/). *J Comput Chem*. 25(13):1605-12.
- Huang, Z., Zhang, D., Thompson, J. A., et al. (2021). Deep clinical phenotyping and gene expression analysis in a patient with RCBTB1-associated retinopathy. *Ophthalmic Genetics*, 42(3), 266–275. <https://doi.org/10.1080/13816810.2021.1891551>
- Wu, J. H., Liu, J. H., Ko, Y. C., et al. (2016). Haploinsufficiency of RCBTB1 is associated with Coats disease and familial exudative vitreoretinopathy. *Human Molecular Genetics*, 25(8), 1637–1647.
- Yang, J., Xiao, X., Sun, W., Li, S., Jia, X., & Zhang, Q. (2021). Variants in RCBTB1 are associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa but not autosomal dominant FEVR. *Current Eye Research*, 46(6), 839–844. <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1842457>
- Hamel, C. P., Tsilou, E., Pfeffer, B. A., Hooks, J. J., Detrick, B., & Redmond, T. M. (1993). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 15751–15757.
- Hamel, C. P., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., & Redmond, T. M. (1994). The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics*, 20, 509–512.

- Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J. M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., et al. (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 17, 139–141.
- Hamel, C. P., Griffoin, J. M., Laesquellec, L., Bazalgette, C., & Arnaud, B. (2001). Retinal dystrophies caused by mutations in RPE65: Assessment of visual functions. *British Journal of Ophthalmology*, 85, 424–427.
- Jin, M., Li, S., Moghrabi, W. N., Sun, H., & Travis, G. H. (2005). RPE65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell*, 122, 449–459.
- Redmond, T. M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J. Y., Lu, Z., & Gentleman, S. (2005). Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 13658–13663.
- Østerberg, G. (1935). Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmologica*, 13(S6), 1–103.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., & Hendrickson, A. E. (1990). Human photoreceptor topography. *Journal of Comparative Neurology*, 292, 497–523.
- Curcio, C. A., & Hendrickson, A. E. (1991). Organization and development of the primate photoreceptor mosaic. *Progress in Retinal Research*, 10, 89–120.
- Anderson, S. J., Mullen, K. T., & Hess, R. F. (1991). Human peripheral spatial resolution for achromatic and chromatic stimuli: Limits imposed by optical and retinal factors. *Journal of Physiology*, 442, 47–64.
- Van Hateren, J. H., & Lamb, T. D. (2006). The photocurrent response of human cones is fast and monophasic. *BMC Neuroscience*, 7, 34.
- Tyler, C. W., & Hamer, R. D. (1990). Analysis of visual modulation sensitivity. IV. Validity of the Ferry-Porter law. *Journal of the Optical Society of America A*, 7, 743–758.
- Burkhardt, D. A. (1994). Light adaptation and photopigment bleaching in cone photoreceptors in situ in the retina of the turtle. *Journal of Neuroscience*, 14, 1091–1105.

- Hecht, S., Schlaer, S., & Pirenne, M. (1942). Energy, quanta, and vision. *Journal of General Physiology*, 25, 819–840.
- Yau, K. W., Lamb, T. D., & Baylor, D. A. (1977). Light-induced fluctuations in the membrane current of single toad rod outer segments. *Nature*, 269, 78–80.
- Baylor, D. A., Lamb, T. D., & Yau, K. W. (1979). Responses of retinal rods to single photons. *Journal of Physiology*, 288, 613–634.