



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**BASES ENERGÉTICAS DEL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE  
NUCLEÓTIDOS DE GUANINA POR LA GTPASA EFL1 INVOLUCRADA EN  
LA MADURACIÓN RIBOSOMAL DE *Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**QFB. CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

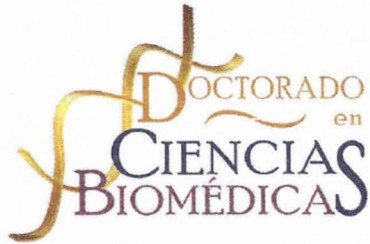




La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PAPIIT IN205018 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectos 235831 y 283909. Se agradece el apoyo de las técnico-académicas Dra. Patricia Cano Sánchez y Q. Rocío Patiño Maya del Instituto de Química, UNAM. Christian Axel Luviano Jardón recibió la beca no. 269390 otorgada por CONACyT para la realización de estudios de doctorado.

El artículo de investigación derivado de esta tesis como requisito parcial para la obtención del grado de doctor se encuentra publicado en:

Axel Luviano, Roberto Cruz-Castañeda, Nuria Sánchez-Puig, Enrique García-Hernández. Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase. *Biophysical Chemistry* **2019**; 247: 13-24.



INSTITUTO DE QUÍMICA



SECRETARÍA ACADÉMICA  
OFICIO: IQUI/SAC/CD/38

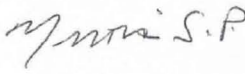
C.P. AGUSTÍN MERCADO  
DIRECTOR DE CERTIFICACION Y  
CONTROL DOCUMENTAL  
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEP el Comité Académico **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión núm. 445 del 27 de febrero de 2019, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del **Q.F.B. CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDON**, con número cuenta **403016525**, con la tesis **Bases energéticas del reconocimiento molecular de nucleótidos de guanina por la GTPasa EFL1 involucrada en la maduración ribosomal de *Saccharomyces cerevisiae*** dirigida por el **Dr. Enrique García Hernández**.

Presidente	Dr. Alejandro Fernández Velázquez
Secretario	Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal	Dra. Tzventanka Dimitrova Dinkova
Vocal	Dr. José Federico del Río Portilla
Vocal	Dra. María Soledad Funes Arguello

Atentamente  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx. a 11 de marzo de 2019

  
DRA. AUREA OROZCO RIVAS  
PUCOORDINADORA DEL PROGRAMA

  
Dra. VICTORIA NURIA SANCHEZ  
RESPONSABLE DE ENTIDAD

AOR/VNSP/gamm

Unidad de Posgrado Coordinación del Posgrado en Ciencias Biomédicas Edificio B, 1er. Piso Circuito de Posgrados Cd. Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel: 5623 0222 Ext. 37001  
<http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: [pdcb@unam.mx](mailto:pdcb@unam.mx)

## Dedicatorias

A mi madre Mirey Jardón Salgado *In Memoriam*, quien ha sido siempre luz en la oscuridad y una fuerza impulsora que me llevó siempre hacia adelante, a quien le debo lo que soy y de quien he recibido tanto apoyo y amor durante mi vida.

A mis hermanos Dante Valdemar Luviano Jardón *In Memoriam* y Danira Mirey Luviano Jardón, por todo el amor, apoyo y protección recibidos siempre.

A todos mis sobrinos, cariño y amistad que perdura: Dante Valdemar Luviano Avilez, José Luis Jiménez Luviano, Joselyn Jiménez Luviano, Johana Jiménez Luviano y Jessica Jiménez Luviano, Eddy Valdemar Luviano Morales y Yerick Damar Luviano Morales.

A mis papas académicos Mtra. Patricia Demare y Dr. Ignacio Regla quienes encendieron la llama académica en mí, llama que persiste. “Maestro no es el que enseña, sino el que inspira” -Osho.

A mi tutor y amigo Dr. Enrique García Hernández, de quien he aprendido no solo termodinámica sino también algunas lecciones importantes de la vida. Gracias Doc.

A mis amigos clave durante la etapa del doctorado: Salvador Valencia, Omar Collazo, Ricardo Anaya y Guillermo Salcedo. En pocas palabras, amigos increíbles.

A los que siempre están ahí: Pedro Cardoso, Oscar Figueroa, Lorena González, Heriberto Ramos, Gabriel Valdovines, Christian Velasco el Pollo y su séquito, Alonso y al Hitler.

A Eduardo Chino y Mario Trejo. Su amistad es como una lluvia fresca en tiempos de calor.

A la Dra. Patricia Cano, gran amiga de quien recibí apoyo experimental y muchas enseñanzas a mi llegada al instituto y durante mi estancia. Por su valiosa amistad.

A Joshua Benítez, poco tiempo de conocer, mucho que conocer.

A la Dra. Nuria Sánchez, por su amistad, enseñanzas y el apoyo académico que me brindó en todos estos años.

A la Mtra. Enriqueta Castrejón, siempre un gran ejemplo de humanidad a seguir.

Agradezco con mucho cariño y en sobremanera a mi comité tutor por todas sus enseñanzas: Dra. Xochitl Pérez Martínez y Dra. Adela Rodríguez Romero.

Al Dr. Federico del Río, por los breves chacoteos en los pasillos del Instituto, simplemente porque me cae bien.

A nuestra Universidad.

## TABLA DE CONTENIDO

Tabla de abreviaturas y símbolos .....	6
Resumen .....	7
<b>1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Visión general de la biogénesis ribosomal .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Generalidades estructurales de las GTPasas.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Función de la GTPasa Efl1 y su cofactor Sdo1 en la maduración de la subunidad 60S</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Reconocimiento molecular .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Principios de calorimetría de titulación isotérmica .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Objetivo General.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Objetivos particulares .....</b>	<b>26</b>
<b>5. Materiales y métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Tabla 2. Recetas de medios de cultivo y soluciones amortiguadoras .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Obtención de Efl1 recombinante .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.1 Vector de expresión de Efl1 .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.2 Cepa de expresión <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BCY123.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2.3 Transformación de levaduras.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2.4 Expresión y purificación de Efl1 .....</b>	<b>30</b>
<b>5.3 Expresión y purificación de Sdo1 recombinante.....</b>	<b>33</b>
<b>5.4 Preparación y cuantificación de las muestras proteicas para calorimetría.....</b>	<b>35</b>
<b>5.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF .....</b>	<b>35</b>
<b>5.6 Dicroísmo circular (DC).....</b>	<b>36</b>
<b>5.7 Calorimetría de titulación isotérmica .....</b>	<b>37</b>
<b>5.8 Determinación de cambios de área superficial de complejos GTPasa-nucleótido .....</b>	<b>40</b>
<b>6. Resultados .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1 Estabilidad térmica de Efl1 y Sdo1 .....</b>	<b>41</b>
<b>6.2 Termodinámica de unión de Efl1 a nucleótidos de guanina .....</b>	<b>42</b>
<b>6.3 Efecto de Sdo1 en el reconocimiento molecular de Efl1 a nucleótidos.....</b>	<b>49</b>
<b>7. Discusión .....</b>	<b>54</b>
<b>8. Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>58</b>

## Tabla de abreviaturas y símbolos

ASA	Área superficial accesible al solvente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Efl1	Del inglés, <i>Elongation factor-like 1</i> , proteína similar al factor de elongación 1 de levadura
EFL1	Del inglés, <i>Elongation factor-like 1</i> , proteína similar al factor de elongación 1 de humano
eIF6	Del inglés, <i>eukaryotic translation initiation factor 6</i> , proteína humana factor eucarionte de inicio de la traducción 6
GAP	Del inglés, GTPase Activating Protein, Proteína activadora de GTPasa
GDP	Guanosin difosfato
GEF	Del inglés, Guanine nucleotide Exchange Factor, factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GTP	Guanosin trifosfato
GTPasa	Guanosina Trifosfatasa
ITC	Del inglés, <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> , Calorimetría de titulación isotérmica
K <sub>a</sub>	Constante de asociación
MALDI-TOF	Del inglés, <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
NES	Del inglés <i>Nuclear Export Signal</i> , señal de exportación nuclear
PTC	Del inglés <i>Peptidyl Transferase Center</i> , centro peptidil transferasa
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA <sub>t</sub>	Ácido ribonucleico de transferencia
SBDS	Del inglés, <i>Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome protein</i> , proteína humana del Síndrome de Shwachman-Diamond.
Sdo1	Ortólogo de levadura de la proteína SBDS
snoRNPs	Del inglés, <i>small nucleolar RiboNucleoprotein Particles</i> ,
SRL	Del inglés <i>Sarcin Ricin Loop</i> , bucle sarcina-ricina
Tif6	Del inglés, <i>eukaryotic translation initiation factor 6</i> , proteína de levadura factor eucarionte de inicio de la traducción 6
ΔASA	Cambio de área superficial accesible al solvente
ΔC <sub>p</sub>	Cambio en la capacidad calorífica de asociación
ΔG <sub>a</sub>	Energía libre de asociación
Δh	Cambio de entalpía de cooperatividad heterotrópica
ΔH <sub>a</sub>	Cambio de entalpía de asociación
Δs	Cambio de entropía de cooperatividad heterotrópica
ΔS <sub>a</sub>	Cambio de entropía de asociación
κ	Constante heterotrópica de asociación



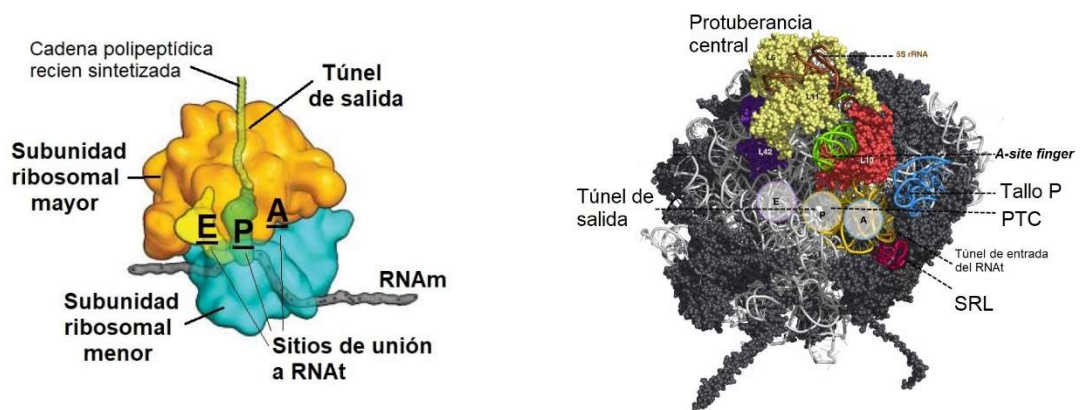
## Resumen

Uno de los pasos finales de maduración de la subunidad ribosomal mayor 60S requiere la acción conjunta de la GTPasa relacionada al factor de elongación 1 (*elongation factor-like 1*: humano EFL1, levadura Efl1) y la proteína del síndrome de Shwachman-Diamond (humano SBDS, levadura Sdo1) para liberar al factor eucariótico de inicio de traducción 6 (humano eIF6, levadura Tif6), evento que permite el ensamblaje final de ribosomas maduros. Estudios recientes de crio-microscopía electrónica han llevado a proponer un mecanismo por el cual SBDS recluta a EFL1 a la superficie de la subunidad 60S uniéndose de tal modo que los dominios III-IV de EFL1 contactan directamente a los dominios II-III de SBDS, mientras que los dominios I-II de EFL1 se sitúan lejos de la interfase de unión SBDS-EFL1 contactando al factor eIF6. Este modo de interacción del binomio EFL1-SBDS es opuesto al que se infiere a partir de experimentos en solución, los cuales muestran que la interacción entre las proteínas de levadura Efl1 y Sdo1 es mediada por un dominio de inserción en el dominio II de la GTPasa. Aún no se sabe la relevancia de la interacción de Efl1/EFL1 con Sdo1/SBDS fuera de la subunidad 60S, ni ha sido establecido el orden o jerarquía de unión de ambos factores a la subunidad 60S. En este sentido, también se carece de información sobre los efectos de Sdo1/SBDS en la unión de GT(D)P por parte de la GTPasa, o si Efl1/EFL1 se une a la subunidad 60S en complejo con GDP o GTP. Con la finalidad de obtener información que contribuya a esclarecer estas incógnitas, en este trabajo se caracterizó la unión de Efl1 a nucleótidos de guanina en presencia y ausencia de su cofactor Sdo1 mediante calorimetría de titulación isotérmica. Esta técnica permite la obtención de los parámetros termodinámicos de unión entre proteína y ligando sin la necesidad del uso de reporteros que pueden alterar la interacción, debido a que detecta una señal universal: el calor. Mediciones calorimétricas a diferentes temperaturas permitió la obtención de los valores de cambio en la capacidad calorífica, este parámetro es un excelente reportero de los cambios conformacionales en interacciones proteicas. Los cambios en la capacidad calorífica fueron utilizados para estimar los cambios conformacionales tras la unión de ligandos y establecer las distintas conformaciones que puede adquirir Efl1 en solución. Los resultados muestran que Efl1 tiene una alta plasticidad conformacional y que Sdo1 regula de manera específica este paisaje de conformaciones en Efl1 modificando su interacción con nucleótidos.

# 1. Introducción

## 1.1 Visión general de la biogénesis ribosomal

En todos los organismos los ribosomas realizan la biosíntesis de proteínas decodificando la información contenida en el RNA mensajero (RNAm) mediante el proceso de traducción. La estructura ribosomal universalmente conservada resulta de la unión de dos subunidades ribosomales de diferente tamaño que en eucariontes se denominan subunidad ribosomal mayor 60S y subunidad ribosomal menor 40S, ambas formadas por RNA ribosomal (RNAr) y proteínas ribosomales. Estructural y funcionalmente, el ribosoma consta de tres sitios de unión a RNA de transferencia (RNAt) denominados A, P y E ubicados en la interfase de ambas subunidades, un túnel de salida de donde nace la cadena polipeptídica recién sintetizada, un tallo P que recluta y activa a factores de traducción, un sitio SRL (del inglés *Sarcin Ricin Loop*) responsable de la activación de los factores de traducción, un centro peptidil-transferasa (PTC, del inglés *Peptidyl Transferase Center*) que cataliza la formación del enlace peptídico y un sitio de unión a RNAm (Figura 1). La subunidad 60S contiene los elementos necesarios para efectuar la actividad catalítica peptidil-transferasa en tanto que la subunidad 40S puede decodificar la secuencia de bases del RNAm.<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Esquema general del ribosoma (izquierda, adaptado de Martin Schmeing & Ramakrishnan<sup>3</sup>) y estructura cristalográfica PDB 4V88 de la subunidad 60S (derecha) que muestra los principales sitios funcionales en la subunidad 60S (adaptado de Konikkat & Woolford, Jr<sup>4</sup>).

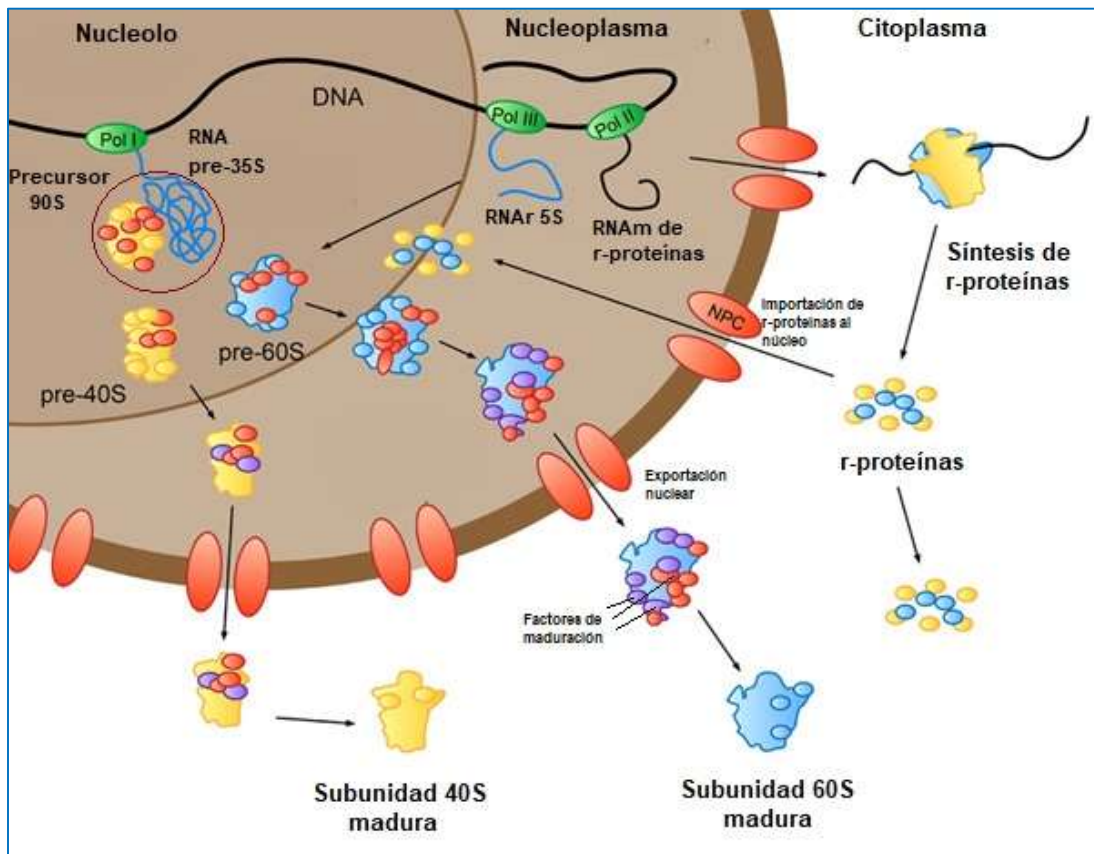
En eucariontes, la biogénesis ribosomal inicia en el nucleolo, continua en el nucleoplasma y finaliza en el citoplasma implicando la síntesis, procesamiento, modificación, ensamble y transporte de 4 moléculas de rRNA y 80 proteínas ribosomales. Lo anterior es realizado por  $\approx 350$  factores de ensamble que se asocian transitoriamente a las partículas pre-ribosomales marcando distintos estados de maduración y dirigiendo el ensamble de las subunidades en la dirección correcta. Después de completar sus tareas en los distintos estados de maduración, los factores de ensamble son liberados de las partículas pre-ribosomales y muchos de ellos son reciclados participando en nuevas rondas de biogénesis ribosomal. Los factores de ensamble incluyen GTPasas, cinasas, nucleasas, helicasas de RNA ATP-dependientes, AAA-ATPasas, ABC-ATPasas, factores de transporte intracelular, entre otros.<sup>5-7</sup>

En *S. cerevisiae*, la biogénesis ribosomal inicia en el nucleolo en donde la RNA polimerasa I (RNA pol I) transcribe un precursor de rRNA pre-35S a partir de repeticiones de DNA ribosomal (DNAr) dispuestas en tándem contenidas en el cromosoma XII.<sup>6</sup> Esta cadena de rRNA pre-35S contiene los fragmentos de rRNA 18S, 5.8S y 25S flanqueados por secuencias espaciadoras que participan en su procesamiento. La modificación de bases en el rRNA mediante reacciones de pseudouridilación y metilación es realizada por  $\approx 75$  factores denominados snoRNPs (del inglés, *small nucleolar RiboNucleoprotein Particles*) y da lugar a  $\approx 100$  bases modificadas en el rRNA.<sup>8,9</sup> Las bases modificadas en el pre-rRNA participan en el procesamiento nucleolítico<sup>6,8,9</sup> y en el correcto plegamiento de la partícula pre-35S/90S,<sup>10</sup> mientras que en el ribosoma ensamblado 80S parecen optimizar el funcionamiento y fidelidad de los ribosomas durante la síntesis de proteínas.<sup>11,12</sup> Simultáneamente con la modificación de las bases en el rRNA pre-35S y la unión de proteínas ribosomales 40S, se une un conjunto de factores de maduración de la subunidad 40S, lo que origina un precursor común denominado 90S que por corte sitio-específico da origen a las subunidades pre-ribosomales pre-40S y pre-60S las cuales continúan su maduración de forma independiente. Los transcritos de rRNA que codifican para proteínas ribosomales son sintetizados por la RNA pol II en el nucleoplasma y traducidos en el citoplasma de donde las proteínas ribosomales son importadas hacia el núcleo a nivel del nucleolo mediante importinas.<sup>5</sup>

La partícula pre-40S que contiene el segmento inmaduro de RNAr 20S sufre cambios en su composición durante su rápida travesía por el nucleoplasma antes de ser exportado al citoplasma. Las proteínas ribosomales 40S también se ven involucradas de forma importante en eventos de maduración favoreciendo el correcto plegamiento del RNAr, interactuando con factores de exportación nuclear o bien funcionan como plataformas de unión de factores transitorios de maduración. Ya en el citoplasma, su maduración finaliza tras dos eventos, el primero consiste en un cambio conformacional para la adquisición de la estructura característica “*beak structure*” de la subunidad 40S y el procesamiento del RNAr 20S para producir la molécula de RNAr 18S.<sup>7,13</sup>

La maduración de la subunidad 60S es mucho más compleja con respecto a la de la subunidad 40S.<sup>14,15</sup> En el nucleolo, la partícula pre-60S que contiene un precursor de RNAr 27S sufre una serie de eventos de procesamiento que originan los RNAr maduros 25S y 5.8S. El RNAr 5S que también forma parte de la partícula pre-60S, es transcrito por la RNA pol III y procesada de forma independiente. En su travesía del nucleolo al nucleoplasma, la partícula pre-60S se asocia por etapas y de forma transitoria a  $\approx$  150 factores que participan en su maduración nucle(ol)ar.<sup>16,17</sup> La salida al citoplasma de la partícula pre-60S se lleva a cabo por acción de varios factores. La proteína Nmd3 unida a la partícula pre-60S funciona como señal de exportación nuclear (NES, del inglés *Nuclear Export Signal*), e interactúa con la proteína Xpo1/Crm1 y la GTPasa Ran formando un complejo ternario esencial que promueve de forma eficiente la exportación nuclear a través del complejo de poro nuclear (NPC, del inglés *Nuclear Pore Complex*). Una vez en el citoplasma, además de los factores de exportación, la partícula pre-60S también contiene los factores de ensamble Rlp24, Tif6, Nog1 y Alb1 que se asociaron en la etapa nuclear de maduración. Durante la etapa citoplasmática, todos los factores de exportación y los factores de ensamble cargados a la partícula pre-60S son removidos por acción de las GTPasas Lsg1 (Kre35) y Efl1 (Elongation factor-like 1), las ATPasas Drg1 y Hsp70 (Ssa/Ssa2) y los cofactores Sdo1, Rei1 y Jjj1 para producir finalmente a la subunidad 60S madura.<sup>6,7,18</sup> Desde las etapas nucleares hasta las etapas finales de maduración citoplasmática, las GTPasas juegan un papel preponderante en la maduración de la subunidad 60S.<sup>19–22</sup> Este trabajo aborda el estudio de la GTPasa Efl1 involucrada en las

etapas finales de maduración de la subunidad 60S. Si bien la levadura ha sido el modelo principal para el estudio de la biogénesis ribosomal, se ha encontrado que la gran mayoría de los factores y eventos moleculares se recapitulan en humanos.<sup>23</sup> Un esquema general de la biogénesis ribosomal se muestra en la **Figura 2**.



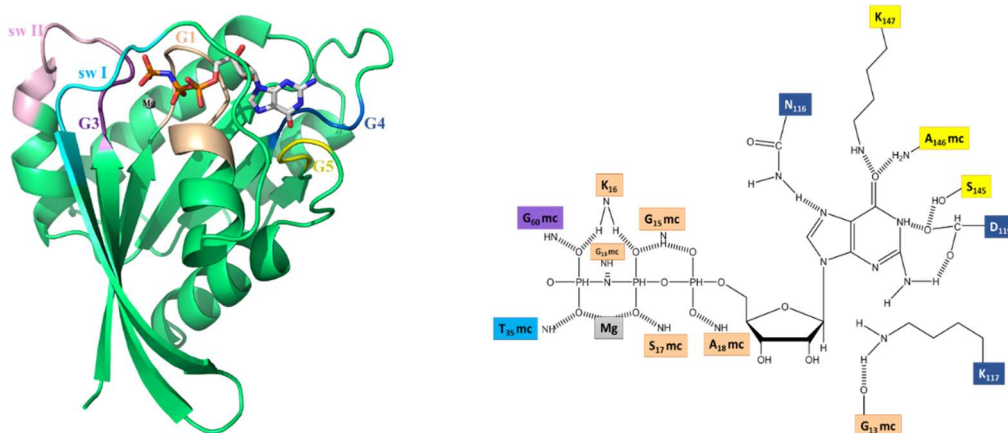
**Figura 2.** Esquema general de la biogénesis ribosomal. El precursor común 90S que da origen a ambas subunidades ribosomales es sintetizado en el nucleolo, esta partícula contiene al RNAr pre-35S y a proteínas ribosomales 40S de asociación temprana, entre otros factores. El fragmento de RNAr 5S es sintetizado independientemente por la RNA pol III. Las proteínas ribosomales son sintetizadas en el citoplasma e importadas al núcleo para su incorporación en las subunidades pre-ribosomales. Una vez dividido, las partículas inmaduras pre-40S y pre-60S continúan su maduración por caminos distintos hasta conformar las partículas maduras 60S y 40S capaces de asociarse e iniciar la síntesis de proteínas (adaptado de Mandira<sup>24</sup>).

## 1.2 Generalidades estructurales de las GTPasas

Las GTPasas (Guanosina Trifosfatasa<sup>25</sup>) son enzimas esenciales que hidrolizan GTP para producir GDP y fosfato inorgánico.<sup>26</sup> Se encuentran distribuidas de forma abundante en los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eucarya) y son responsables de una gran cantidad de procesos celulares fundamentales.<sup>26</sup> Algunos ejemplos son la biosíntesis de proteínas,<sup>27</sup> la señalización celular,<sup>28</sup> la motilidad y migración celular,<sup>29,30</sup> el transporte intracelular,<sup>31</sup> la división celular,<sup>32,33</sup> la biogénesis ribosomal<sup>19</sup> y la regulación de la respuesta inmune.<sup>34</sup> Incluso se ven involucradas en el desarrollo y progresión de cáncer y otras enfermedades.<sup>35-37</sup> Las GTPasas se han clasificado en dos grandes clases. La primera clase, denominada *TRAFAC* (por *TRAnslational FACTors*), incluye a 5 superfamilias (Factores de traducción, *OBG-HflX-like*, *TrmE-Era-EngA-YihA-Septin* o TEES, *Ras-like* y *Myosin-kinesin*). La segunda clase, denominada SIMIBI (por *Signal recognition particle, MInD* y *BIoD*), incluye a las superfamilias *MinD/Mrp-ETK*, *BioDFTHFS* y a las familias separadas de la clase SIMIBI, dentro de estas últimas se encuentra las GTPasas SRP (Signal Recognition Particle).<sup>38</sup>

Aunque en términos de secuencia y estructura tienen baja similitud entre ellas, las GTPasas poseen un sitio altamente conservado, el dominio G, donde se lleva a cabo el reconocimiento molecular de nucleótidos de guanina y la actividad catalítica. Canónicamente, el dominio G contiene cinco motivos funcionales (G1-G5), consta de alrededor de 250 aminoácidos y su plegamiento consiste en una mezcla de seis hebras- $\beta$  y cinco hélices- $\alpha$  (**Figura 3**). El motivo G1 o *P-loop* contacta a los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  del GDP o GTP (GD(T)P) y contiene una secuencia consenso A/GXXXXGKS/T. El motivo G2 o *switch I* (sw I) contiene una treonina altamente conservada que en los factores de traducción forma parte de la secuencia consenso RXITI. Esta treonina es responsable de la coordinación del ion Mg(II) esencial para la actividad catalítica. En la unión de GTP, el Mg(II) se encuentra coordinado por los átomos de oxígeno de los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$ . En los factores de traducción, la T es parte de una secuencia consenso RXITI. El motivo G3 o *Switch II* (sw II) participa en la unión selectiva del GTP por interacción de una G con el fosfato- $\gamma$  del GTP. Contiene una secuencia consenso D/EXXG, el D se sitúa cerca del ion

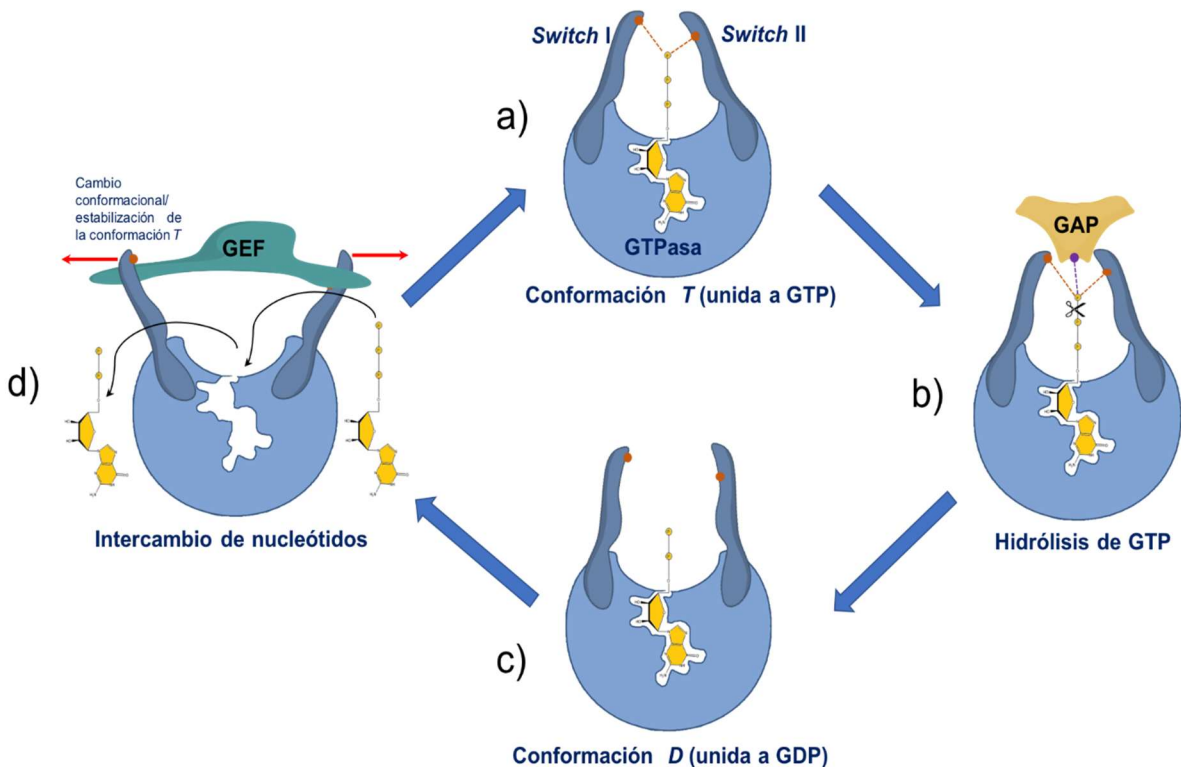
Mg(II) contactándolo directamente o indirectamente mediante una molécula de agua catalítica (Wcat). Los motivos G4 (T/NKXD) y G5 (SAL/K) participan en el reconocimiento y selectividad de los nucleósidos de guanosina. La A del motivo G5 se une al átomo de oxígeno-6 de la guanina impidiendo estéricamente y electrostáticamente la unión del grupo amino en la posición 6 de la adenina del GTP (**Figura 3**).<sup>39,40</sup>



**Figura 3.** Estructura general del dominio G. A la izquierda se muestra la estructura cristalográfica de la GTPasa Ras en complejo con GppNHp y el ion Mg(II) (PDB 5P21) en donde se indican los subdominios G1-G5: G1 o P-loop (beige), G2 o sw I (azul), el G3 o sw II (rosa) contiene a la G conservada (morado), G4 (azul marino) y G5 (amarillo). A la derecha se muestra la red de interacciones entre el nucleótido trifosfato y el sitio de reconocimiento de la GTPasa (Adaptado de Wittinghofer & Vetter<sup>40</sup>).

Estructuralmente, las GTPasas actúan como *switches* moleculares, oscilando entre dos conformaciones generalmente diferentes, una conformación D o inactiva, unida a GDP y otra conformación T o activa, unida a GTP.<sup>39-42</sup> En muchas GTPasas, la unión de uno u otro nucleótido comunica cambios conformacionales al resto de la proteína, alterando la unión a sus efectores y/o modificando la vía de señalización en la que participan.<sup>43-45</sup> Frecuentemente, las GTPasas de manera aislada, aun en conformación T, se caracterizan por poseer baja actividad enzimática hidrolítica sobre GTP. Dicha actividad se incrementa de forma importante ante la presencia de otros factores (como proteínas, iones metálicos o RNAr). A estos factores activadores se les conoce como proteínas activadoras de GTPasas (GAP, del inglés, *GTPase-Activating Protein*).<sup>42,46,47</sup>

Durante la síntesis de proteínas, el ribosoma realiza la función de GAP sobre las GTPasas traduccionales.<sup>48,49</sup> Algunas GTPasas poseen mayor afinidad por GDP que por GTP, de tal modo que el ciclo entre el estado inactivo y el estado activo es regulado por otras proteínas accesorias que promueven esta transición, a las cuales se les denomina factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, del inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*).<sup>50</sup> Los GEF funcionan favoreciendo la disociación de GDP del sitio activo (*Guanine nucleotide Dissociation Stimulator*, GDS) o estabilizando la unión de GTP (*GTP stabilizing factor*, GSF).<sup>42</sup> En la **Figura 4** se muestra un esquema general de la regulación de las GTPasas por factores GEF y GAP.



**Figura 4.** Participación de los factores GEF y GAP en el ciclo catalítico de una GTPasa. a) El mecanismo canónico implica la formación de puentes de hidrógeno entre los oxígenos del fosfato y con la Thr y Gly de los *switches* I y II respectivamente (conformación T). b) La hidrólisis del fosfato  $\gamma$  es favorecido por la asistencia de una GAP que disminuye la energía de activación de la reacción. c) Liberación de las regiones de *switch* después de la hidrólisis de GTP debido a la pérdida del fosfato  $\gamma$  y adquisición de la conformación D. d) Intercambio del GDP por GTP promovido por una proteína GEF (adaptado de Vetter & Wittinghofer<sup>39</sup>).



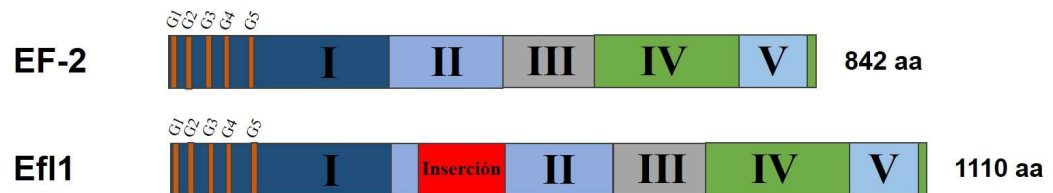
### 1.3 Función de la GTPasa Efl1 y su cofactor Sdo1 en la maduración de la subunidad 60S

En *S. cerevisiae*, Efl1 es una GTPasa de 1110 aminoácidos, homóloga a los factores de elongación EF-2 de eucariontes y EF-G de procariontes. El ortólogo humano de Efl1 se le denomina EFTUD1 o EFL1 y comprende 1120 aminoácidos. Efl1 está compuesta por cinco dominios estructurales (I-V), el dominio G está contenido en el dominio I y la región C-terminal se pliega formando parte del dominio IV (**Tabla 1**, **Figura 5**). El porcentaje de identidad de EFL1 con respecto a EF-2 (*S. cerevisiae*) y EF-G (*E. coli*) es de 47 y 38 % respectivamente. Una característica distintiva de Efl1 es un dominio de inserción de 160 aminoácidos (80 en EFTUD1) que no tiene equivalente en otros factores de elongación.<sup>51-53</sup>

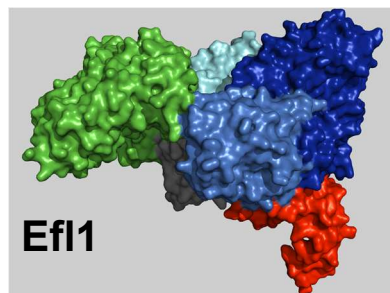
**Tabla 1.** Residuos que conforman los dominios de las GTPasas EFL1, EFTUD1 y EF-2.

Dominio	Residuos en Efl1	Residuos en EFTUD1	Residuos en EF-2
I	1-368	1-365	1-360
II	369-671	366-609	361-496
Inserción	418-577	424-502	-
III	672-748	610-687	497-574
IV	749-1110	688-1120	575-858
V	968-1049	983-1055	743-815

**A**



**B**



**Figura 5.** Organización estructural del factor de elongación EF-2 y de la GTPasa Efl1. **A.** Organización de dominios en EF-2 y Efl1. **B.** Estructura de criomicroscopía electrónica de Efl1 a partir de PDB 5AN9. En **A** y **B** se utiliza el mismo código de colores.

Sdo1 es una proteína constituida por 250 aminoácidos presente en arqueas y eucariontes. La proteína de levadura tiene un 47 % de identidad con respecto a su ortóloga humana SBDS. Ambas versiones poseen la misma organización y funcionalidad estructural, lo que sugiere una función conservada como factor de ensamble ribosomal.<sup>54</sup> Además de su papel como factor de maduración ribosomal, Sdo1/SBDS está involucrada en otros procesos celulares como maduración del huso mitótico, función mitocondrial, quimiotaxis y respuesta al estrés celular.<sup>55</sup> Mutaciones en SBDS son asociadas al síndrome de Shwachman-Diamond (SDS), una enfermedad hereditaria caracterizada por insuficiencia pancreática exocrina, malformaciones óseas, síndrome de falla medular y discapacidad cognitiva.<sup>56</sup> Estructuralmente, Sdo1/SBDS comprende el dominio I o FYSH (residuos 1-94/2-96), el dominio II (95-172/97-170) y el dominio III (173-250/171-250).<sup>52,53</sup> El dominio III tiene un plegamiento tipo ferredoxina muy similar al plegamiento del dominio V de EF-2 y Efl1. Experimentos estructurales por resonancia magnética nuclear (RMN) han revelado que Sdo1/SBDS posee una alta flexibilidad conformacional, en donde los dominios II y III rotan adquiriendo diversas conformaciones y comportándose como un módulo independiente del dominio I.<sup>54,55</sup>

Efl1 y Sdo1 actúan de forma conjunta para liberar al factor de antiasociación Tif6 (eIF6 en humano) de la superficie de la subunidad pre-60S.<sup>51,52,54,55,57</sup> El factor Tif6/eIF6 se une desde la etapa nuclear a la subunidad pre-60S bloqueando el sitio de unión con la subunidad 40S, evitando la asociación prematura de ambas subunidades en el citoplasma.<sup>51,58-60</sup> Una vez que la subunidad 60S se encuentra libre de Tif6/eIF6, puede asociarse con la subunidad 40S para conformar el ribosoma maduro 80S traduccionalmente competente.<sup>61,62</sup>

Mapas estructurales obtenidos por crio-microscopía electrónica de la subunidad 60S en complejo con SBDS-eIF6, SBDS-EFL1-eIF6 o SBDS-EFL1 han clarificado en cierto grado el mecanismo de liberación de eIF6. En este modelo, la liberación de eIF6 inicia con la unión de SBDS a la partícula pre-60S-eIF6 después de la incorporación de la última proteína ribosomal uL16 y de la liberación del factor Nmd3 por acción de la GTPasa Lsg1. De acuerdo con los mapas estructurales del complejo 60S-SBDS-eIF6, el dominio I de SBDS se ancla en el sitio P estableciendo contactos discretos con uL16, los

residuos 2-7 de la región N-terminal enterrándose en la parte superior del túnel de salida ribosomal y los residuos 8-15 interaccionando con el centro peptidil-transferasa. El dominio III de SBDS interacciona con el sitio SRL y el tallo P ribosomal, al igual que el dominio V de los factores de elongación EF-G/EF-2. El factor eIF6 se une a la subunidad 60S muy cerca de la región SRL, contactando al C-terminal de la proteína ribosomal uL14, al N-terminal de la proteína ribosomal eL24 y a los residuos 58-71 de la proteína ribosomal uL3, aunque no establece contactos directos con SBDS. En un siguiente paso, EFL1 se une en una región entre SBDS y eIF6, en el centro asociado a GTPasas (GAC, del inglés *GTPase-Associated Center*), un sitio altamente conservado donde se unen las GTPasas traduccionales.<sup>27</sup> De acuerdo con la estructura del complejo 60S-SBDS-EFL1-eIF6, los dominios III-IV de EFL1 contactan directamente a los dominios II-III de SBDS y los dominios I-II de EFL1 contactan a eIF6, lejos de la interfase de interacción con SBDS. En esta estructura, el dominio V de EFL1 desplaza rotacionalmente en 180° al dominio III de SBDS, debido a que, al tener un plegamiento similar, ambos dominios compiten por el mismo sitio de unión. Finalmente, el modelo propone que un cambio conformacional dependiente de SBDS, ocasiona un traslape de los dominios I-II de EFL1 promoviendo la liberación de eIF6. Las especulaciones a partir de este punto parecen indicar que debido a la interacción del dominio I de EFL1 ahora anclado al sitio SRL activa la hidrólisis de GTP alterando la unión a la subunidad 60S y promoviendo la disociación de EFL1 y SBDS. En este modelo propuesto, la unión de SBDS a la subunidad 60S también representa un control de calidad debido a que establece la integridad estructural de los principales sitios funcionales del ribosoma: el tallo P ribosomal, el sitio SRL, el GAC y el túnel de salida ribosomal.<sup>52,55,63</sup>

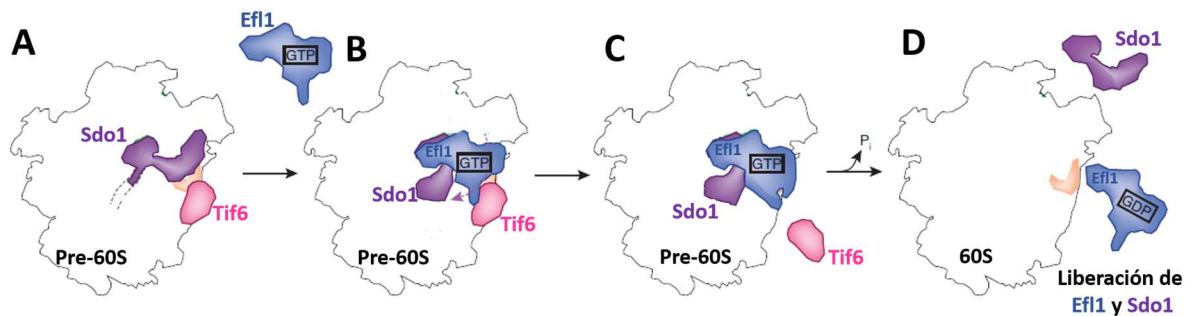


Figura 6. Modelo del funcionamiento de Efl1/EFL1 y Sdo1/SBDS en la liberación de eIF6. A. Unión de Sdo1/SBDS a la subunidad 60S. B. Sdo1/SBDS recluta a la GTPasa Efl1/EFL1 a la superficie de la subunidad 60S. C. Un cambio conformacional en Efl1/EFL1 debido a su interacción con Sdo1/SBDS produce la liberación de eIF6. D. Hidrólisis de GTP y liberación de EFL1 y SBDS (Adaptado de Plisson y col.<sup>63</sup>).

## 1.4 Reconocimiento molecular

Virtualmente, todos los procesos biológicos involucran eventos de asociación molecular no covalentes. Procesos como la replicación de DNA, la comunicación celular, la sinapsis neuronal, la acción de las hormonas, el ingreso y degradación de fuentes de energía son solo algunos ejemplos en los cuales las interacciones proteicas tienen un papel protagónico. La comprensión de la forma en que las proteínas son capaces de formar complejos estables a través de fuerzas no covalentes constituye una herramienta clave para la comprensión de las bases moleculares de los procesos celulares fundamentales, del funcionamiento proteico, de las enfermedades y del mecanismo de acción de fármacos.

El reconocimiento molecular está dictado por dos propiedades básicas: la especificidad y la afinidad. La especificidad se refiere a la capacidad de discriminación entre ligandos similares y depende de la complementariedad de la proteína con su ligando, en tanto que la afinidad involucra a la forma en la cual las fuerzas moleculares se combinan para hacer del reconocimiento un proceso espontáneo, es decir, la termodinámica del proceso de asociación. El objetivo de conocer la termodinámica de un proceso de asociación no está solo enfocado a incrementar el conocimiento sobre los factores subyacentes que contribuyen a la relación estructura-estabilidad-función proteica, triada central en la lógica molecular de la vida; a su vez, permite la construcción de un

marco lo suficientemente cuantitativo que conlleve el desarrollo de modelos energético-estructurales útiles en el diseño racional de fármacos, ligandos artificiales e ingeniería de proteínas.<sup>64-67</sup>

El marco cuantitativo que permite develar las bases de la estabilidad energética ( $\Delta G$ ) en el reconocimiento molecular puede ser descrito en términos de los parámetros termodinámicos de cambio de energía libre  $\Delta G_a$ , cambio de entalpía  $\Delta H_a$ , cambio de entropía  $\Delta S_a$  y cambio en la capacidad calorífica  $\Delta C p_a$ .

La formación de un complejo Proteína-Ligando puede ser expresado de la forma más simple por la relación  $[P] + [L] \leftrightarrow [PL]$ , donde  $[P]$  y  $[L]$  son las concentraciones de las especies reactantes de proteína y ligando libres, respectivamente y  $[PL]$  es la concentración del complejo formado en condiciones de equilibrio. Bajo estas condiciones, la distribución del complejo y de las moléculas libres está definida por la constante de asociación de equilibrio  $K_a$  o su expresión recíproca en términos de disociación  $K_d$ :

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad (Ec. 1)$$

A su vez, la estabilidad de un complejo proteico está dada por la diferencia en el  $\Delta G_a$  de las moléculas interactuantes y el complejo formado, por lo que, la  $K_a$  (o  $K_d$ ) depende directamente de esta función de estado mediante la relación:

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad (Ec. 2)$$

donde  $R$  es la constante de los gases ( $R=1.98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin.

El valor de  $\Delta G_a$  dicta la condición de equilibrio y determina la espontaneidad del proceso de unión, aportando información sobre cómo las fuerzas moleculares se combinan para hacer de la asociación un proceso favorable. En un proceso de asociación que se lleva a cabo a  $T$  constante, el  $\Delta G_a$  puede ser disecado en sus componentes termodinámicos de  $\Delta H_a$  y  $\Delta S_a$  mediante la relación:

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad (Ec. 3)$$

En un proceso de asociación molecular en medio acuoso,  $\Delta H_a$  es aproximadamente igual al cambio de energía interna de los solutos y el solvente. Para un proceso de asociación exotérmico,  $\Delta H_a$  es negativo e implica la formación de interacciones no

covalentes energéticamente favorables entre átomos. En cambio, para un proceso endotérmico,  $\Delta H_a$  es positivo debido a la eliminación de interacciones no covalentes energéticamente favorables.<sup>64,68</sup>

A su vez,  $\Delta H_a$  se puede disecar en dos componentes, uno intrínseco ( $\Delta H_{intr}$ ) y otro de solvatación ( $\Delta H_{solv}$ ):

$$\Delta H_a = \Delta H_{intr} + \Delta H_{solv} \quad (Ec. 4)$$

El primero de ellos ( $\Delta H_{intr}$ ) es relativo a la creación de nuevas interacciones electrostáticas y contactos de van der Waals entre P y L debido a su complementariedad estereoquímica, por lo que resulta un componente favorable en la formación del complejo proteico. El segundo componente ( $\Delta H_{solv}$ ) es relativo a la desolvatación de grupos polares y no polares del sitio de unión debido a la interacción P-L, en donde, son eliminadas interacciones electrostáticas establecidas entre moléculas del solvente y los reactantes. El costo energético de remover estas moléculas del solvente resulta en un componente entálpico desfavorable.<sup>68-70</sup>

La entropía está relacionada con la pérdida o ganancia de grados de libertad. Los grados de libertad son las trayectorias necesarias para describir un sistema termodinámico. Las principales contribuciones a  $\Delta S_a$  son la entropía de solvatación ( $\Delta S_{solv}$ ), la entropía conformacional ( $\Delta S_{conf}$ ) y la entropía roto-traslacional ( $\Delta S_{r/t}$ ):<sup>71</sup>

$$\Delta S_a = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r/t} \quad (Ec. 5)$$

El primero de ellos ( $\Delta S_{solv}$ ) es favorable para la asociación, y se origina de la liberación de las moléculas de agua al existir una desolvatación parcial o completa de la interfase de unión de la proteína y el ligando. Este efecto es el componente predominante de estabilización en la asociación de grupos hidrofóbicos. El  $\Delta S_{conf}$  casi siempre es desfavorable, ya que el proceso de unión por lo general involucra el congelamiento de enlaces rotables covalentes sencillos en la proteína y el ligando.  $\Delta S_{r/t}$  está asociado a la reducción del número de partículas en el medio debido a la asociación P-L, por lo que es una contribución siempre desfavorable y de la misma magnitud independientemente del tipo de complejo formado. Para un proceso de asociación bimolecular, diversos estudios tanto empíricos como teóricos han calculado el valor  $\Delta S_{r/t}$  entre -4 y -10 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, de

acuerdo a otros autores un valor de -8 cal/mol K es aceptable para interacciones proteicas.<sup>68-72</sup>

La asociación entre dos moléculas puede ser favorecida por contribuciones negativas de  $\Delta H$  (entálpicamente dirigida) y/o positivas de  $\Delta S$  (entrópicamente dirigida). Cuando los dos términos son favorables, pero uno de ellos es mucho más favorable que el otro, se dice que el parámetro que dirige la reacción es el que posee el valor más alto. Cuando los dos términos son favorables y de valores similares se dice que la asociación es tanto entálpica como entrópicamente dirigida.<sup>68</sup>

Los cambios conformacionales acoplados a la interacción proteína-ligando constituyen las bases estructurales y energéticas fundamentales de la cooperatividad, alosterismo y en general de la regulación de las proteínas.<sup>73</sup> En este sentido, el cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta Cp$ ) juega un papel primordial en la determinación de la energética asociada al plegamiento proteico y al reconocimiento molecular o interacción proteína-ligando ( $\Delta Cp_a$ ), ya que es un sensor de los rearrreglos del solvente inducidos por cambios en la exposición de solutos como producto de la interacción, en otras palabras, indica los cambios conformacionales que tienen lugar en la proteína tras la unión del ligando.<sup>68,69,73,74</sup>

$\Delta H_a$  y el  $\Delta S_a$  se relacionan con  $\Delta Cp_a$  de forma dependiente de la temperatura mediante:<sup>45</sup>

$$\Delta H_a^T = \Delta H_a^{T_0} + \Delta Cp_a(T - T_0) \quad (Ec. 6)$$

$$\Delta S_a^T = \Delta S_a^{T_0} + \Delta Cp_a \ln \frac{T}{T_0} \quad (Ec. 7)$$

Donde  $\Delta H_a^T$  y  $\Delta S_a^T$  son los cambios de entalpía y entropía de asociación a una determinada temperatura respectivamente,  $\Delta H_a^{T_0}$  y  $\Delta S_a^{T_0}$  son los cambios de entalpía y entropía de asociación a una temperatura de referencia  $T_0$ , respectivamente. Debido a que  $\Delta H_a$  es una función lineal simple con respecto a la  $T$ , la dependencia térmica del  $\Delta H_a$  nos proporciona directamente el valor de  $\Delta Cp_a$ , que corresponde al valor de la pendiente en una regresión lineal.<sup>73</sup>

Grandes cambios en  $\Delta C_{p_a}$  dan evidencia de la existencia de numerosas interacciones hidrofóbicas en un proceso de asociación molecular. En el caso de la exposición de un residuo hidrofóbico u ocultamiento de un residuo polar en un medio acuoso, la estructuración de moléculas de agua alrededor del residuo es desestabilizada a medida que se aumenta la temperatura, absorbiendo la energía térmica, lo que resulta en un aumento de la capacidad calorífica ( $\Delta C_{p_a} > 0$ ), y experimentalmente será más difícil el incremento de la  $T$  del medio acuoso. Por el contrario, el ocultamiento de residuos hidrofóbicos o exposición de residuos polares da lugar a un  $\Delta C_{p_a}$  negativo, debido a la desaparición de puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura del agua solvatante, y la  $T$  aumenta más fácilmente.<sup>68</sup>

En interacciones P-L,  $\Delta C_{p_a}$  conecta los parámetros termodinámicos con información estructural debido a que se asocia al cambio de áreas superficiales accesibles al solvente polares ( $\Delta ASA_p$ ) y no polares ( $\Delta ASA_{np}$ ), en otras palabras, el ocultamiento o exposición al solvente de residuos polares y no polares.<sup>73,74</sup>

Diversos estudios sobre compuestos modelo y datos de proteínas han relacionado la solvatación de  $ASA_{np}$  y  $ASA_p$  con el incremento y decremento del valor  $\Delta C_{p_a}$ , respectivamente, de acuerdo con la parametrización:<sup>75</sup>

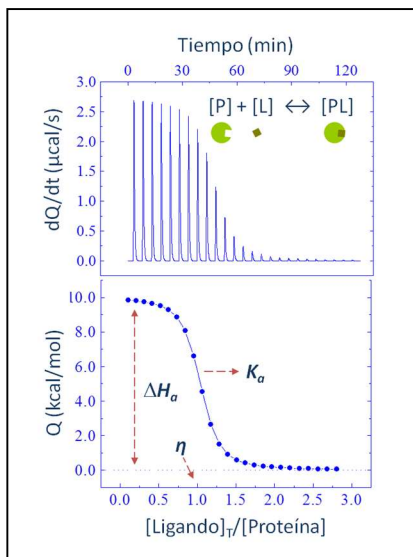
$$\Delta C_{p_a} = \alpha \Delta ASA_{np} + \beta \Delta ASA_p \quad (Ec. 8)$$

donde  $\alpha$  y  $\beta$  son coeficientes de área para la solvatación de grupos no polares y polares respectivamente. De acuerdo con Murphy y Freire la transferencia de áreas no polares de un estado expuesto al solvente a un estado no expuesto ( $\alpha$ ) ocasiona un decremento del  $\Delta C_{p_a}$  de  $0.45 \text{ cal (K mol } \text{Å}^2)^{-1}$ , mientras que el ocultamiento de áreas polares ( $\beta$ ) genera un decremento de  $-0.26 \text{ cal (K mol } \text{Å}^2)^{-1}$ .<sup>75</sup>



## 1.5 Principios de calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (CTI) es una de las herramientas más poderosas y precisas en la actualidad para caracterizar termodinámicamente la formación de complejos de proteína. Esta técnica permite determinar en un solo experimento los valores  $K_a$ , estequiometría ( $n$ ),  $\Delta G_a$ ,  $\Delta H_a$  y  $\Delta S_a$ .  $\Delta C_p$  puede ser determinado realizando mediciones a diferentes temperaturas mediante la dependencia térmica del  $\Delta H_a$  o  $\Delta S_a$ . El calorímetro de titulación isotérmica está compuesto de dos celdas idénticas rodeadas por una cubierta adiabática. Un sensor detecta la diferencia de temperatura entre las celdas y a su vez entre las celdas y la cubierta. En el experimento, la muestra de proteína por lo general es colocada en la celda de muestra y la celda de referencia es llenada con solución amortiguadora o agua. En una jeringa acoplada se coloca el ligando. Antes de comenzar la titulación, una potencia constante es aplicada a la celda de referencia, esta señal activa el circuito de alimentación eléctrica localizado en la celda de muestra y representa la línea base. Experimentalmente, se observa la diferencia de potencias aplicadas para mantener la temperatura de las dos celdas igual (isotérmicamente) en función del tiempo. Durante la titulación, después de cada inyección de ligando, el calor absorbido o liberado en la celda de muestra es medido con respecto a la celda de referencia. Para cada inyección es posible obtener el calor asociado ( $Q$ ) a la reacción integrando el área bajo la curva de cada pico, que es proporcional a la fracción de ligando unido. El análisis de este calor en función de la concentración de los reactantes provee los valores de  $K_a$ ,  $\Delta H_a$ , y  $n$ , a partir de los cuales se puede determinar el  $\Delta G_a$  y  $\Delta S_a$  (**Figura 7**).



**Figura 7. Experimento típico de ITC.** En la parte superior se muestran los datos crudos de una reacción endotérmica de la titulación de una proteína [P] con un ligando [L]. Al normalizar estos datos en función de la concentración se obtiene una isoterma de unión. El ajuste no lineal a un modelo de unión permite determinar el valor de  $\Delta H_a$  asociado a la altura de la isoterma, el valor de  $n$  es indicado en el punto de inflexión de la curva y la  $K_a$  dada por lo abrupto de la inclinación de la curva. Para una reacción exotérmica, la  $T$  de la celda de muestra se incrementará, y la potencia de alimentación será desactivada para mantener la  $T$  entre las dos celdas igual. Para una reacción endotérmica, la  $T$  de la celda de muestra disminuye, por lo que el instrumento incrementa el poder de alimentación. El  $\Delta G_a$  se calcula a partir de la  $K_a$  según la ecuación 2 y el valor de  $\Delta S_a$  se calcula a partir de la ecuación 3.

## 2. Planteamiento del problema

EFL1 es una GTPasa citoplasmática que actúa de forma conjunta con el cofactor SBDS para promover la liberación del factor eIF6 de la subunidad 60S durante las últimas etapas de la maduración ribosomal. Estudios recientes de crio-microscopía electrónica han mostrado detalles relevantes sobre este proceso, y han establecido un modelo del funcionamiento del binomio GTPasa-cofactor en el cual SBDS recluta a la proteína EFL1 a la superficie de la subunidad ribosomal 60S, causando la disociación del factor eIF6 debido a que EFL1 compite por el mismo sitio de unión que el factor de anti-asociación; la posterior hidrólisis de GTP por parte de EFL1 provoca la liberación de ambos factores de maduración. Sin embargo, aún hay diversas incógnitas por responder, con el fin de entender aspectos claves de la maduración ribosomal en su última etapa. ¿Cuál es la relevancia y naturaleza de la interacción de SBDS y EFL1 en ausencia de la partícula 60S?, ¿Cuál es el paisaje conformacional de EFL1 al unir nucleótidos de guanina y a la proteína SBDS?, ¿Cómo influye el cofactor SBDS en la unión de nucleótidos por EFL1?, ¿EFL1 se une a la partícula pre-60S en complejo con GD(T)P y/o SBDS? Con la finalidad de obtener información que contribuya a esclarecer estas incógnitas, en este trabajo se caracterizó mediante calorimetría de titulación isotérmica la unión de Efl1 a nucleótidos de guanina en presencia y ausencia de Sdo1 en función de la temperatura. Los cambios en la capacidad calorífica fueron utilizados para estimar los cambios conformacionales que Efl1 exhibe en solución. Los datos muestran con claridad que Sdo1 y los nucleótidos regulan de manera específica y robusta el complejo paisaje conformacional de Efl1, de manera similar a como son reguladas otras GTPasas traduccionales por sus respectivos ligandos/sustratos.

### **3. Hipótesis**

El complejo paisaje conformacional exhibido por Efl1 fuera del ribosoma es regulado de manera específica por el cofactor Sdo1 y los nucleótidos de guanina, ejerciendo efectos energéticos que conducen a la GTPasa a adquirir conformaciones particulares y funcionalmente relevantes, de manera análoga a lo observado con otras GTPasas traduccionales y sus respectivos ligandos.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Elucidar las bases energéticas de la regulación del paisaje conformacional de Efl1 por parte de sus contrapartes moleculares Sdo1 y nucleótidos de guanina, con el fin de arrojar nueva luz sobre la última etapa de maduración de la subunidad ribosomal 60S.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Determinar los parámetros termodinámicos de interacción de Efl1 con nucleótidos de guanina en presencia y ausencia de Mg(II) en función de la temperatura.
- Determinar los parámetros termodinámicos de interacción de Efl1 y la proteína Sdo1 en función de la temperatura.
- Determinar los parámetros termodinámicos de interacción del complejo Efl1-Sdo1 con nucleótidos de guanina.
- Inferir la extensión de los cambios conformacionales en cada evento de unión mediante un análisis energético-estructural de los parámetros termodinámicos correspondientes.
- Proponer escenarios funcionales probables fuera del ribosoma de la interacción de Sdo1, nucleótidos y Efl1.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Tabla 2. Recetas de medios de cultivo y soluciones amortiguadoras

Medio LB (Luria-Bertani)	10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 15 g de agar (solo para medio solido), 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Medio YEP(D) liquido	16 g de triptona, 5 g de NaCl y 10 g de extracto de levadura, 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Medio SD-Ura líquido	12 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos. 16.5 g de casaminoácidos, 200 mg de adenina y 150 mg de tirosina, 1.5 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Glucosa al 20%	100 g de glucosa, completar a 0.5 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Galactosa al 20%	200 g de galactosa, completar a 1 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Solución Drop Out 100X	0.6 g de Leucina y 0.4 g de Triptófano en 100 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración.
10X TE	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA. Esterilizar por filtración.
1X TE/LiAc	4 mL de agua desionizada, 0.5 ml TE 10X, 0.5 mL Li/Ac 1 M. Esterilizar por filtración.
1X TE/LiAc/PEG	4 mL de PEG 50%, 0.5 ml TE 10X, 0.5 mL Li/Ac 1 M. Esterilizar por filtración.
Amortiguador de lisis	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl <sub>2</sub> , 30 mM de Imidazol, 1 mM de PMSF.

Amortiguador A-Ni	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl <sub>2</sub> , 30 mM de Imidazol.
Amortiguador B-Ni	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl <sub>2</sub> , 500 mM de Imidazol.
Amortiguador A-S	16 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl, 1.6 % de Glicerol, 1.6 mM de MgCl <sub>2</sub> .
Amortiguador B-S	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl <sub>2</sub> .
Amortiguador de calorimetría	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl <sub>2</sub> , 0.1 mM de DTT.
Amortiguador de calorimetría sin Mg(II)	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 2 mM de EDTA, 0.1 mM de DTT.
Amortiguador de calorimetría de Hepes	50 mM Hepes pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 2 mM de EDTA, 0.1 mM de DTT.
Amortiguador de calorimetría de Tricina	50 mM Tricina pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 2 mM de EDTA, 0.1 mM de DTT.
Amortiguador de dicroísmo circular	15 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl, 0.01 mM DTT.
Amortiguador de fosfatos	15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8.0, 50 mM de NaCl, 0.01 mM DTT.

## 5.2 Obtención de Efl1 recombinante

### 5.2.1 Vector de expresión de Efl1

El vector de expresión pRS426-Efl1 que codifica para la proteína Efl1 fue proporcionado por la Dra. Nuria Sánchez Puig del Instituto de Química, UNAM. En la **Figura 8** se muestra un esquema de la construcción recombinante de Efl1, la cual contiene una secuencia de reconocimiento para la proteasa TEV seguida de una etiqueta de histidinas (8xHis Tag) en el extremo C-terminal para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad. El marcador de selección para su replicación en bacteria es la resistencia a ampicilina y para levadura es la complementación genética de la auxotrofia

a uracilo conferida por la presencia del gen *URA3*, lo que permite a la cepa huésped crecer en medio carente de uracilo. La expresión de la proteína está bajo el control del promotor *GAL1* y el terminador *MAT $\alpha$* , por lo que se utilizó galactosa como agente inductor.



**Figura 8.** Esquema de la construcción recombinante de la proteína Efl1.

### 5.2.2 Cepa de expresión *Saccharomyces cerevisiae* BCY123

*S. cerevisiae* BCY123 es una cepa deficiente en proteasas que sobreexpresa al factor de transcripción *GAL4*, por lo que es una cepa idónea para la expresión de proteínas presentes en plásmidos *URA3+* y cuya expresión sea controlada por el promotor *GAL1*. El genotipo relevante de BCY123 es *MAT $\alpha$  pep4::HIS3 pbr1::LEU2 bar1::HISG lus2::GAL1/10-GAL4 can1 ade2 trp1 ura3 his3 leu2-3*.

### 5.2.3 Transformación de levaduras

Células de *S. cerevisiae* BCY123 fueron transformadas con el plásmido pRS426-Efl1 mediante el procedimiento descrito por Gietz & Schiestl.<sup>76</sup> En breve, un preinóculo de 100 mL con células *S. cerevisiae* BCY123 en medio YEP(D) se creció durante toda la noche a 35°C/200 rpm. Al día siguiente, 1.5 mL de este cultivo fue sembrado en 50 mL de medio YEP(D) e incubado a 30°C por 4-5 h hasta una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.6-0.7. Después, las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm/5 min y lavadas con 3 mL de agua estéril. El paquete celular fue resuspendido en 1 mL de una solución estéril 1X TE/LiAc. Para introducir el plásmido de interés se mezclaron 200  $\mu$ L de células, 200  $\mu$ L de DNA de esperma de salmón (DNA acarreador), 400  $\mu$ g de DNA plasmídico y 500  $\mu$ L de solución 1X TE/LiAc/PEG. La mezcla fue incubada a 30°C/200 rpm/1 h. Se agregaron 60  $\mu$ L de DMSO y las células fueron sometidas a un choque térmico incubándolas a 43 °C por 15 min. Finalmente, las células se colectaron por centrifugación, resuspendidas 100 L de 1X TE y sembradas en medio sintético sin uracilo (SD-Ura) sólido

suplementado con 2% de glucosa. Las colonias transformantes aparecieron 2 días después de incubación a 30 °C.

#### **5.2.4 Expresión y purificación de Efl1**

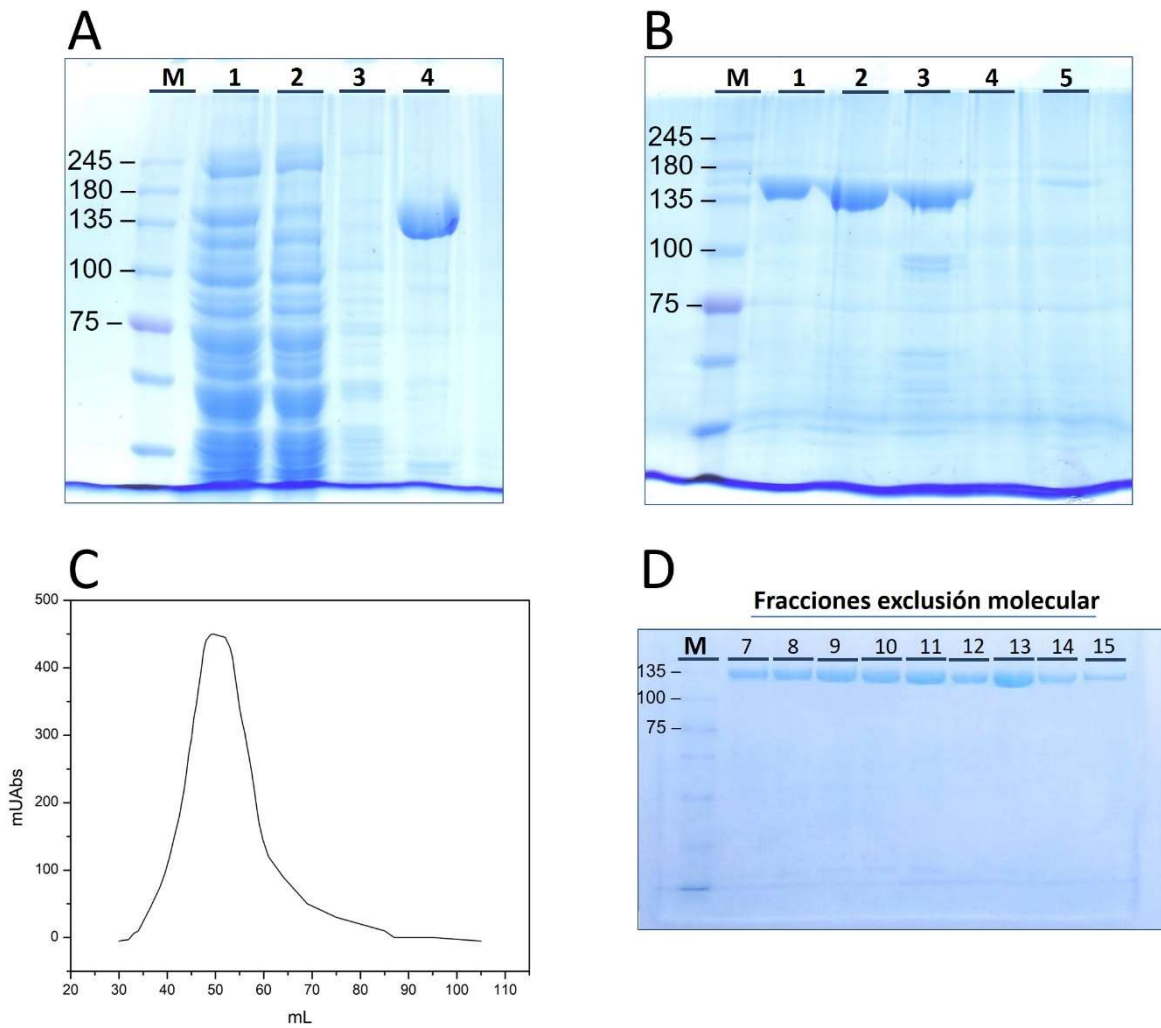
Una colonia de transformantes fue resuspendida en 50 mL de medio SD-Ura suplementado con 2 % de glucosa y se dejó crecer durante 12 h a 30 °C/200 rpm. Después, este preinóculo fue repartido en cuatro matraces que contenían 1.5 L de medio SD-ura suplementado con 0.4 % de glucosa c/u ajustándolos a una  $DO_{600} = 0.1$ . Los matraces fueron incubados a 30°C/200 rpm alrededor de 12 h hasta una  $DO_{600} \approx 2$ . A continuación, los cultivos fueron inducidos adicionando 250 mL de galactosa al 20 % a cada matraz y se incubaron por 18 h a 30°C/200 rpm. Finalmente, las células fueron colectadas por centrifugación (5000 rpm/5 min) y distribuidas en cuatro tubos falcon de 50 mL con 15 g de paquete celular c/u y almacenados a 18 °C o resuspendidos en amortiguador de lisis para su purificación.

El paquete celular recién cosechado o descongelado fue resuspendido en 30 mL de amortiguador de lisis y vertido en el contenedor del equipo Bead-Beater (BioSpec) previamente cargado con 50 mL de perlas humedecidas con amortiguador de lisis. La lisis celular procedió bajo el esquema de 1 min de encendido y 30 min de apagado hasta un total de 6 min de encendido. El detrito celular fue eliminado por centrifugación a 15000 rpm durante 30 min. El sobrenadante (extracto crudo) se filtró por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore) y se aplicó a una columna de afinidad a níquel HisTrap FF de 5 mL (GE Healthcare) acoplada a una bomba peristáltica (GE Healthcare). Este primer paso de purificación se realizó empleando el siguiente protocolo:

- i. 3 vol. de agua desionizada
- ii. 5 vol. de amortiguador A-Ni
- iii. Extracto crudo (se colecta la fracción No Retenido)
- iv. 5 vol. de amortiguador A-Ni (se colecta la fracción Lavado)
- v. 5 vol. de amortiguador B-Ni (se colecta la fracción Elución-Ni)
- vi. 5 vol. de amortiguador B-Ni
- vii. 3 vol. de agua desionizada
- viii. 3 vol. de etanol al 20 %



Para remover la etiqueta de histidinas, la fracción Elución-Ni fue suplementada con 0.1 mg/mL de proteasa TEV y dializada en un tubo de diálisis de 14 kDa (Spectra/Por 2 Dry Standard RC Dialysis Tubing, Spectra Labs) contra 1 L de amortiguador de lisis durante 18 h a 4 °C. El dializado se filtró por una membrana de 0.45 µm (Merck Millipore) y se aplicó a un segundo paso cromatográfico de afinidad empleando el mismo esquema anterior. Al no tener la etiqueta de histidinas, la proteína ahora se colecta en la fracción No Retenido (30 mL). Esta fracción se concentró a 2 mL empleando el sistema Amicon (Amicon Ultra 15 mL Centrifugal Filters, Merck Millipore) con membrana de 100 kDa y fue aplicada a una columna de exclusión molecular preparativa HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare) acoplada a un equipo FPLC. Previamente la columna fue equilibrada con 150 mL de amortiguador de calorimetría a un flujo de 0.5 mL/min. Se desecharon los primeros 30 mL y las fracciones fueron colectadas de forma automática por el carrusel del equipo en fracciones de 2 mL. Todas las fracciones obtenidas de los diferentes pasos cromatográficos fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones desnaturizantes (**Figura 9**).



**Figura 9. Diferentes pasos cromatográficos de la purificación de Efl1 recombinante.** **A)** Análisis de las fracciones en gel de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones desnaturalizantes del primer paso de cromatografía de afinidad a níquel: M: marcador de peso molecular, carril 1: extracto crudo, carril 2: no retenido, carril 3: lavado, carril 4: elución. **B)** Análisis de las fracciones en gel de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones desnaturalizantes del segundo paso de cromatografía de afinidad a níquel realizado después de la digestión con proteasa TEV: M: marcador de peso molecular, carril 1: muestra antes del corte, carril 2: muestra después del corte, carril 3: no retenido, carril 4: lavado, carril 5: elución. **C)** Cromatograma de exclusión molecular monitoreada a 280 nm. Las fracciones se colectaron desde el mililitro 42 al 60 correspondientes al pico principal. **D)** Análisis en gel de poliacrilamida al 12 % de las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular. M: marcador de peso molecular.

### 5.3 Expresión y purificación de Sdo1 recombinante

El vector de expresión pRSET-YLR022c que codifica para la proteína Sdo1 fue proporcionado por la Dra. Nuria Sánchez Puig del Instituto de Química, UNAM. El marcador de selección para bacteria es la resistencia a ampicilina. La construcción recombinante posee en el extremo C-terminal una etiqueta de histidinas para facilitar su purificación. El vector fue transformado en células quimiocompetentes de *E. coli* C41 mediante choque térmico. En breve, alícuotas de 50  $\mu$ L de células competentes almacenadas a  $-70$   $^{\circ}$ C fueron descongeladas en hielo por 5 min, se adicionó 1  $\mu$ L de DNA plasmídico ( $\approx 50$  ng) y se incubaron en un baño de hielo por 30 min. Al cabo de este tiempo fueron sometidas a choque térmico incubándolas a  $42$   $^{\circ}$ C por 45 s e inmediatamente enterradas en hielo por 2 min. A continuación, se adicionaron 200  $\mu$ L de medio LB y se dejaron recuperar por 1 h a  $37$   $^{\circ}$ C. Finalmente las células fueron sembradas en medio LB con 50 mg/mL de ampicilina (LBA) y se incubaron a  $37$   $^{\circ}$ C hasta el desarrollo visible de colonias transformantes ( $\approx 18$  h).

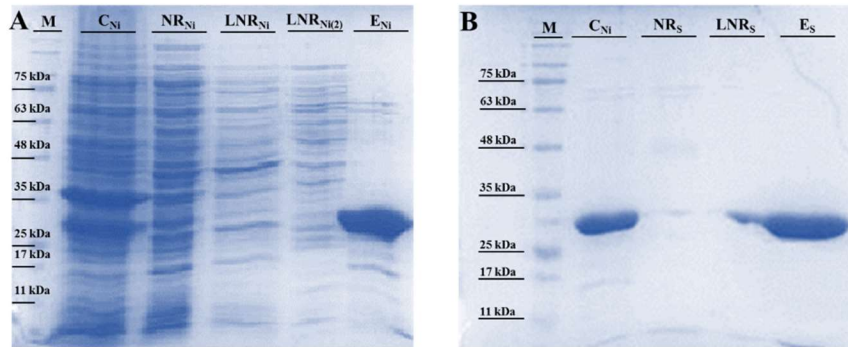
Para la expresión de Sdo1, un cultivo (50 mL) de células transformantes, fue repartido en cuatro matraces con 1.5 L de medio líquido LBA c/u. Estos matraces se incubaron a  $37$   $^{\circ}$ C/250 rpm alrededor de 6-8 h hasta alcanzar una  $DO_{600} \approx 1$ . Al cabo de este tiempo, la expresión de Sdo1 fue inducida con 1 mM de IPTG durante 18 h a  $18$   $^{\circ}$ C/200 rpm. Después, las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm/5 min, repartidas en cuatro tubos Falcon de 50 mL con la misma cantidad de paquete celular ( $\approx 5$  g c/u) y almacenadas a  $-18$   $^{\circ}$ C o resuspendidas en amortiguador de lisis para su purificación.

Para la purificación, los paquetes celulares fueron resuspendidos en 25 mL de amortiguador de lisis. Las células fueron lisadas por sonicación en un equipo Sonicator 3000 (Misonix, Inc) con una potencia de 5.5 watts y ciclos de 15 s en encendido y 90 s en apagado hasta acumular un total de 5 min de encendido. El detrito celular fue removido por centrifugación a 14000 rpm/30 min. Este extracto crudo se filtró por una membrana de  $0.45$   $\mu$ m (Merck Millipore) y fue aplicado a una columna de afinidad a níquel HisTrap FF de 5 mL (GE Healthcare) acoplada a una bomba peristáltica (GE Healthcare) siguiendo el mismo protocolo que para Efl1. La elución de la columna de níquel fue diluida tres

veces y aplicada a una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP (GE, Healthcare) de 5 mL empleando el siguiente protocolo:

- i. 3 vol. de agua desionizada
- ii. 5 vol. de amortiguador A-S
- iii. Elución-Ni (se colectó la fracción No Retenido-S, NR<sub>S</sub>)
- iv. 5 vol. de amortiguador A-S (se colectó la fracción Lavado del No Retenido-S, LNR<sub>S</sub>)
- v. 5 vol. de amortiguador B-S (se colectó la fracción Elución-S, E<sub>S</sub>)
- vi. 5 vol. de amortiguador B-S
- vii. 3 vol. de agua desionizada
- viii. 3 vol. de EtOH al 20 %

Las fracciones obtenidas de los dos pasos cromatográficos fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (**Figura 10**).



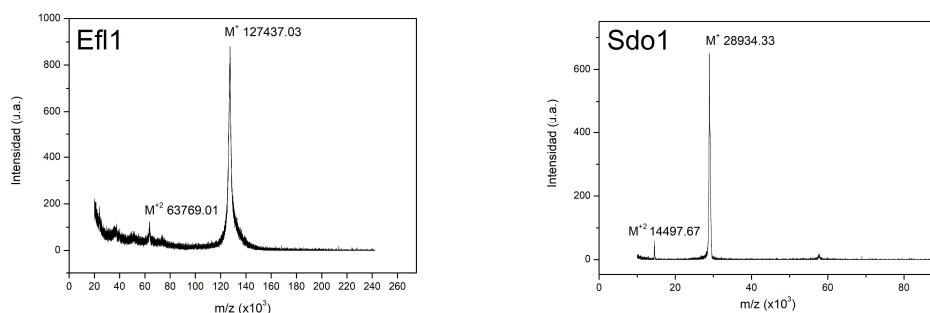
**Figura 10. Purificación de Sdo1 recombinante. A)** Análisis de las fracciones en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes del primer paso de cromatografía de afinidad a níquel: M: marcador de peso molecular, carril C<sub>Ni</sub>: extracto crudo, carril NR<sub>Ni</sub>: no retenido, carril LNR<sub>Ni</sub>: lavado de lo no retenido, carril LNR<sub>Ni(2)</sub>: lavado dos de lo no retenido, carril E<sub>Ni</sub>: elución. **B)** Análisis de las fracciones en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes del segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico, M: marcador de peso molecular, carril C<sub>Ni</sub>: elución de la columna de afinidad níquel diluida 3 veces, carril NR<sub>S</sub>: no retenido, carril LNR<sub>S</sub>: lavado de lo no retenido, carril E<sub>S</sub>: elución.

## 5.4 Preparación y cuantificación de las muestras proteicas para calorimetría

Las soluciones proteicas provenientes de los pasos de purificación fueron concentradas en el orden de 10-20  $\mu\text{M}$  de Efl1 y de 70-120  $\mu\text{M}$  para Sdo1 y dializadas exhaustivamente contra el amortiguador de calorimetría especificado empleando el sistema Amicon (Amicon Ultra 15 mL Centrifugal Filters, Merck Millipore) con membranas de corte de 100 y 10 kDa para Efl1 y Sdo1 respectivamente. La cuantificación se realizó por lectura de la absorción a 280 nm ( $A_{280}$ ) de las muestras proteicas en un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu de doble haz empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. El cálculo se realizó utilizando los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_{280}$ ) de 83770 y 11460  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para Efl1 y Sdo1 respectivamente, mediante la fórmula  $[P] = A_{280}/\epsilon_{280}$ . Los valores de  $\epsilon_{280}$  fueron obtenidos mediante el servidor ExPasy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) asumiendo que todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos.

## 5.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La identidad de las proteínas recombinantes fue corroborada por espectrometría de masas. Los espectros fueron obtenidos en el sistema MALDI-TOF (del inglés, Matriz Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) en un instrumento Microflex Bruker Daltonics a cargo de la Q. Eréndira García Ríos del Instituto de Química, UNAM. Las muestras proteicas fueron ajustadas a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y se suspendieron en una matriz de ácido sinapínico para tomar la lectura. En la **Figura 11** se muestran mediciones MALDI-TOF para Efl1 y Sdo1 recombinantes.



**Figura 11. Espectros de masas MALDI-TOF de Efl1 y Sdo1 recombinantes.** El peso molecular teórico para Efl1 y Sdo1 es de 127233 y 29106 Da, respectivamente. El peso de los iones moleculares  $m/z$  fue de 127437 Da para Efl1 y 28934 Da para Sdo1.

## 5.6 Dicroísmo circular (DC)

Los espectros de DC se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco-J700 (Jasco Inc) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier (PTC-348WI) a 20 °C y empleando una celda de cuarzo de 1 mm de paso de luz. Las muestras proteicas fueron intercambiadas al amortiguador de dicroísmo o de fosfatos y ajustadas a una concentración de 0.2 mg/mL empleando el sistema Amicon (Amicon Ultra 15 mL Centrifugal Filters, Merck Millipore). Las mediciones fueron realizadas a una velocidad de barrido de 20 nm/min con una resolución de 1 nm en el intervalo de 250 a 190 nm (región del UV lejano). El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales. Al espectro obtenido le fue restado el espectro del blanco que corresponde a la señal del amortiguador de dicroísmo circular sin muestra proteica. La elipticidad observada fue transformada a elipticidad molar promedio por residuo ( $[\theta]_M$ ) mediante:

$$[\theta]_M = \frac{\theta_{\text{obs}} \cdot MW}{[P] \cdot d} \quad (\text{ec. 9})$$

donde  $[\theta]_M$  es la elipticidad molar en grados  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ,  $\theta_{\text{obs}}$  es la elipticidad observada en grados, MW es el peso molecular promedio de los aminoácidos ( $\text{g mol}^{-1}$ ), [P] es la concentración de proteína en  $\text{mg/cm}^3$  y d es el paso óptico en cm. La estructura secundaria fue estimada mediante la deconvolución de los espectros usando el servidor K2D.<sup>77</sup>

Los barridos de temperatura se realizaron en el intervalo de 20-90 °C a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min monitoreando el cambio de elipticidad a 208 nm con una resolución de 1 °C. La fracción de proteína desplegada en función de la temperatura ( $f_U(T)$ ) se calculó mediante:

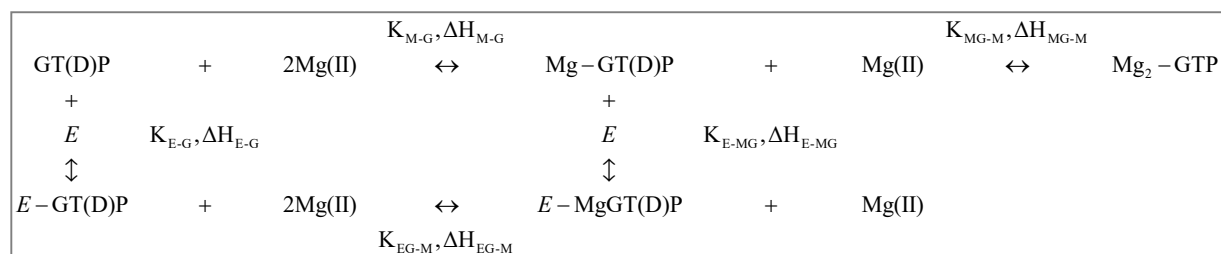
$$f_U(T) = \frac{\theta(T) - \theta_N(T)}{\theta_U(T) - \theta_N(T)} \quad (\text{ec. 10})$$

donde  $\theta(T)$ ,  $\theta_N(T)$  y  $\theta_U(T)$  son las elipticidades del valor observado, la forma nativa y la forma desplegada, respectivamente.

## 5.7 Calorimetría de titulación isotérmica

Las mediciones calorimétricas fueron realizadas en un equipo MicroCal™ iTC<sub>200</sub> System (GE Healthcare). La concentración de Efl1 (receptor) fue de 25-30 μM. Las concentraciones de los ligandos fueron 2 mM para GTP, 2 mM para MgGTP, 1 mM para GDP, 1.5 mM para MgGDP y 0.05-0.1 mM de Sdo1. Para las titulaciones de Efl1 con nucleótidos en presencia de Mg(II), tanto el ligando como el receptor fueron preparados (sección 5.4) en amortiguador de calorimetría (sección 5.1), mientras que para las mediciones en ausencia del metal, se utilizó amortiguador de calorimetría carente de MgCl<sub>2</sub> y suplementado con 2 mM de EDTA. El pH de las soluciones proteicas y de ligando fue verificado y en su caso ajustado a la temperatura de la medición calorimétrica correspondiente. Las titulaciones procedieron con un esquema de 15-20 inyecciones consecutivas de ligando con intervalos de 200-300 s entre inyecciones y velocidad de agitación de 750 rpm. El calor de dilución del ligando fue obtenido por titulación del amortiguador sin proteína con la solución de ligando correspondiente bajo el mismo esquema de inyecciones. Estos experimentos blancos fueron utilizados para corregir los experimentos de titulación proteica. Todas las muestras fueron desgastadas durante 10 min antes de cada experimento.

Las isotermas obtenidas de la titulación de Efl1 con nucleótidos en presencia de Mg(II) fueron analizadas utilizando un modelo ternario en el cual la enzima libre Efl1 (*E*) puede unir nucleótido libre GDP/GTP o al complejo nucleótido-metal MgGDP/MgGTP y el complejo MgGTP puede unir un segundo átomo de Mg(II) adquiriendo la forma Mg<sub>2</sub>GTP (Esquema 1).



Esquema 1. Modelo ternario de unión entre Efl1 (*E*), nucleótidos de guanina (GT(D)P) y Mg(II).

En el esquema 1, los subíndices M-G y MG-M representan la asociación secuencial de dos iones Mg(II) al GTP. E-G y E-MG indican la asociación de *E* al nucleótido libre de Mg(II) y en complejo con Mg(II), respectivamente. EG-M designa la asociación de Mg(II) al complejo preformado enzima-nucleótido. En este modelo, las formas libre y unida a Mg(II) del nucleótido compiten por el sitio de unión en Efl1. La derivación del modelo para este tipo de equilibrios acoplados ha sido descrita previamente por Pulido y col.<sup>78</sup> En breve, el calor asociado en cada etapa de la titulación está determinado por:

$$\begin{aligned}
 q_i = V_0 & \left( \left( [E \cdot GT(D)P]_i - [E \cdot GT(D)P]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) \right) \Delta H_{E-G} \right. \\
 & + \left( [E \cdot MgGT(D)P]_i - [E \cdot MgGT(D)P]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{E-MG} + \Delta H_{M-G}) \\
 & + \left( [MgGT(D)P]_i - [MgGT(D)P]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) - F_{MgGT(D)P} [GT(D)P]_0 \frac{v_i}{V_0} \right) \Delta H_{M-G} \\
 & \left. + \left( [Mg_2GTP]_i - [Mg_2GTP]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) - F_{Mg_2GTP} [GTP]_0 \frac{v_i}{V_0} \right) (\Delta H_{M-G} + \Delta H_{MG-M}) \right) + q_{dil}
 \end{aligned}$$

(ec. 11)

donde  $q_i$  es el calor involucrado en cada inyección  $i$ ,  $V_0$  es el volumen de la celda,  $v_i$  es el volumen de la alícuota adicionada en la inyección  $i$  y  $q_{dil}$  es un término de ajuste para tomar en cuenta los efectos de calor de dilución no corregidos experimentalmente. En el caso del GDP, los parámetros de la unión del segundo ion Mg(II) fueron ajustados a cero.  $F_{MgGT(D)P}$  y  $F_{Mg_2GTP}$  corresponden a las fracciones de los complejos MgGT(D)P y Mg<sub>2</sub>GTP contenidos en el volumen de inyección e inyectados a la celda. Finalmente,  $[GT(D)P]_0$  representa la concentración de GT(D)P en la jeringa.

La concentración total de cada especie en la ecuación 11 está relacionada con la concentración de sus contrapartes moleculares libres a través de la constante de equilibrio correspondiente:

$$[GT(D)P]_f = [GT(D)P] + K_{M-G} [GT(D)P][Mg(II)] + K_{M-G} K_{MG-M} [GT(D)P][Mg(II)]^2 + K_{E-G} [E][GT(D)P] + K_{E-MG} K_{M-G} [E][GT(D)P][Mg(II)] \quad (ec. 12)$$

$$[Mg]_f = [Mg(II)] + K_{M-G} [GT(D)P][Mg(II)] + 2K_{M-G} K_{MG-M} [GTP][Mg(II)]^2 + K_{E-G} K_{M-G} [E][GT(D)P][Mg(II)] \quad (ec. 13)$$

$$[E]_f = [E] + K_{E-G} [E][GT(D)P] + K_{E-MG} K_{M-G} [E][GTP][Mg(II)] \quad (ec. 14)$$



Durante el ajuste de las titulaciones de Efl1 con nucleótidos en presencia de Mg(II), los valores  $K_{E-G}$  y  $\Delta H_{E-G}$  que corresponden a la titulación de Efl1 con nucleótidos libres de Mg(II), los valores  $K_{M-G}$  y  $\Delta H_{M-G}$  que corresponden a la formación de los complejos nucleótido-Mg(II) y los valores  $K_{MG-M}$ ,  $\Delta H_{MG-M}$  que corresponden a la asociación de un segundo ion Mg(II) al complejo MgGTP son fijados, mientras que los valores  $K_{EG-M}$  y  $\Delta H_{EG-M}$  son los parámetros a ajustar. Los parámetros de unión de Efl1 con nucleótidos libres de Mg(II) fueron determinados ajustando las isotermas a un modelo de un solo sitio de unión:<sup>64,79</sup>

$$Q = \frac{M_t \Delta H_{E-G} V_0}{2} \left[ 1 + \frac{L_t}{M_t} + \frac{1}{K_{E-G} M_t} - \sqrt{\left( 1 + \frac{L_t}{M_t} + \frac{1}{K_{E-G} M_t} \right)^2 - \frac{4L_t}{M_t}} \right] \quad (ec. 14)$$

donde Q es el calor normalizado por mol de ligando al final de cada inyección (i),  $L_t$  y  $M_t$  son la concentración total de ligando y de enzima, respectivamente. El calor liberado en cada inyección i esta dado por:

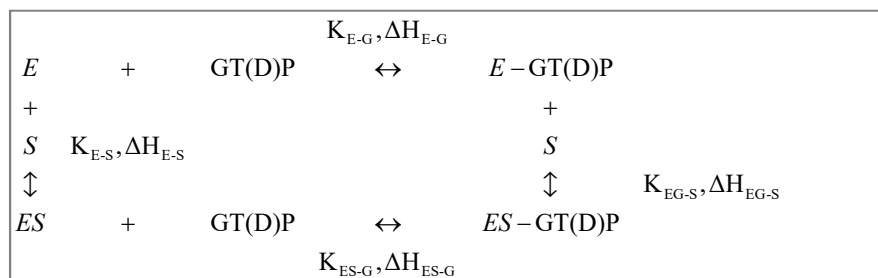
$$q_i = Q_i + \frac{v_i(Q_i + Q_{i-1})}{2V_0} - Q_{i-1} + q_{dil} \quad (ec. 15)$$

Finalmente, el ajuste de los datos experimentales incluyó al parámetro n como factor para corregir errores debido a la presencia de proteína inactiva y/o errores en la determinación de la concentración de proteína de tal modo que:

$$[E]_T = n[E]_0 \quad (ec. 16)$$

donde  $[E]_0$  es la concentración experimental de Efl1.

En el **Esquema 2** se muestra el modelo de equilibrios acoplados para las titulaciones del complejo Efl1-Sdo1 con nucleótidos en ausencia de Mg(II), en el cual Efl1 aislada (E) o en complejo con Sdo1 (ES) puede unir nucleótidos.



Esquema 2. Modelo ternario de unión entre Efl1 (E), nucleótidos de guanina (GT(D)P) y Sdo1 (S).

Los parámetros de unión de Efl1 con Sdo1 ( $K_{E-S}$ ,  $\Delta H_{E-S}$ ) fueron determinados por ajuste no lineal de experimentos de titulación de Efl1 con Sdo1 mediante las ecuaciones 14, 15 y 16. Para las titulaciones del complejo binario *E-S* con nucleótidos, Efl1 fue mezclada con 3 equivalentes molares de Sdo1. Esta proporción molar (1:3 Efl1:Sdo1) resulta en una cantidad > 99 % de Efl1 unida a Sdo1 de acuerdo a los parámetros de unión entre ambas proteínas.

Las regresiones lineales fueron realizadas utilizando el programa Origin 7.0 (OriginLab, Co) y corroboradas en el servidor de Affinimeter ([www.affinimeter.com](http://www.affinimeter.com)).

Los parámetros de cooperatividad heterotrópica fueron determinados mediante:<sup>80</sup>

$$\kappa = K_{E-GM}/K_{E-G} \quad (\text{ec. 16})$$

$$\Delta h = \Delta H_{E-GM} - \Delta H_{E-G} \quad (\text{ec. 17})$$

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT \ln \kappa \quad (\text{ec. 18})$$

donde los subíndices E-GM y E-G son los valores de la unión de Efl1 a MgGT(D)P y a nucleótido libre de metal, respectivamente.

### 5.8 Determinación de cambios de área superficial de complejos GTPasa-nucleótido

En la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) se buscaron estructuras de GTPasas traduccionales en complejo con GDP, MgGDP, GTP y MgGTP. Se encontraron tres estructuras con GDP (EF-G PDB:1DAR, eEF5B PDB:5IZK, Hbs1 PDB:3P27), cuatro con MgGDP (EF-G PDB:1FNM, EF-Tu PDB:1TUI, eIF5B PDB:4NCF y 4NCL), dos con GTP/GMPPNP (eIF5B PDB:4NCN y eEF2 PDB:2E1R) y tres con MgGMPPNP (EF-Tu PDB:1EFT, EF-Tu 1EXM y EF-Pyl PDB:3WNB). Para cada complejo se determinaron las áreas superficiales accesibles al solvente (ASA) empleando el programa NACCESS,<sup>81</sup> utilizando una sonda con radio de 1.4 Å y un ancho de corte de 0.25 Å. El programa asigna el ASA polar ( $ASA_p$ ) a partir de la accesibilidad de átomos de nitrógeno y oxígeno y el ASA no polar ( $ASA_{np}$ ) de la accesibilidad de átomos de azufre y carbono. Finalmente, el cambio de área superficial accesible al solvente polar ( $\Delta ASA_p$ ) y no polar ( $\Delta ASA_{np}$ ) de cada complejo GTPasa-nucleótido fue determinado mediante la diferencia de la correspondiente ASA del complejo y la correspondiente ASA de las especies libres ( $ASA_{p/np(\text{complejo})} - ASA_{p/np(\text{GTPasa})} - ASA_{p/np(\text{nucleótido})}$ ).

## 6. Resultados

### 6.1 Estabilidad térmica de Efl1 y Sdo1

Con la finalidad de comprobar el plegamiento de las proteínas recombinantes y establecer el intervalo de temperatura experimental para las mediciones calorimétricas, se obtuvieron espectros de dicroísmo circular y perfiles de desplegamiento térmico, respectivamente (**Figura 12**). Los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano obtenidos a 20 °C mostraron mínimos negativos en 208 y 222 nm característicos de proteínas  $\alpha/\beta$ . La deconvolución de los espectros indicó un contenido de estructura secundaria de 28% de hélices- $\alpha$  y de 14% de hebras- $\beta$  para Efl1 y de 36% de hélices- $\alpha$  y de 9% de hebras- $\beta$  para Sdo1. Estos valores son cercanos a los observados en estructuras de crio-microscopía electrónica para las proteínas humanas, 30% hélices- $\alpha$  y 9% hebras- $\beta$  para EFL1 y 39% hélices- $\alpha$  y 15% de hebras- $\beta$  para SBDS.<sup>52</sup> Barridos térmicos monitoreados a 208 nm mostraron transiciones monofásicas del desplegamiento para ambas proteínas. Sdo1 fue más termorresistente, empezándose a desplegar  $\approx 60$  °C, mientras que para Efl1 el inicio de desplegamiento fue  $\sim 40$  °C. Por tanto, el intervalo de temperatura de 20 a 30 °C fue establecido para las mediciones calorimétricas.

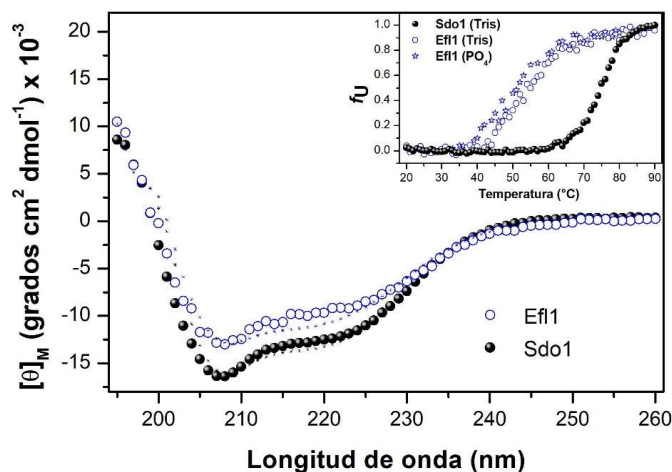


Figura 12. Espectros de dicroísmo circular a 20 °C y barridos de temperatura (inserto) para Efl1 y Sdo1 recombinantes. Las líneas punteadas indican el mejor ajuste del espectro calculado con el programa K2D3 para un contenido de estructura secundaria de 28/14 y 36/9 % de hélices- $\alpha$ /hebras- $\beta$  para Efl1 y Sdo1, respectivamente.<sup>77</sup> El inserto muestra la fracción de proteína desplegada ( $f_u$ ) en función de la temperatura en soluciones amortiguadoras de Tris (Efl1 y Sdo1) y de fosfatos (Efl1).

## 6.2 Termodinámica de unión de Efl1 a nucleótidos de guanina

La **Figura 13** muestra ejemplos representativos de la caracterización calorimétrica de la unión de Efl1 con nucleótidos de guanina libres (GDP/GTP) y en complejo con Mg(II) (MgGDP/MgGTP). Para la interacción de Efl1 con GD(T)P, un modelo de un solo sitio de unión fue ajustado a las curvas de titulación. En presencia de Mg(II), un modelo que considera la formación de todas las especies representadas en el **Esquema 1** se ajustó a los datos. La **Tabla 3** compendia los valores de los parámetros de unión en función de la temperatura. Mediciones empleando amortiguadores de diferente entalpía de ionización ( $\Delta H_{\text{ion}}$ )<sup>82</sup> arrojaron el mismo valor de  $\Delta H_a$ , lo que indica que no hay eventos de protonación asociados a la unión (**Figura 14**).

**Tabla 3.** Parámetros termodinámicos de la interacción de Efl1 a nucleótidos de guanina en función de la temperatura determinados mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Ligando	T (°C)	n	$K_a$ (mM <sup>-1</sup> )	$K_a$ ( $\mu$ M)	$\Delta G_a$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_a$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S_a$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta C_p a$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
GDP	20	0.90±0.05	272±11	4±0.2	-7.3	-3.5±0.2	-3.8	
	25	0.94±0.02	141±12	7±0.5	-7.0	-5.0±0.4	-2.0	-318±35
	30	0.91±0.02	64±9	16±2.2	-6.7	-6.7±0.3	0.0	
MgGDP	20	0.95±0.05	34±2	29±1.7	-6.1	-2.5±0.1	-3.6	
	25	0.91±0.02	32±3	31±2.9	-6.1	-4.0±0.1	-2.1	-310±5
	30	0.92±0.02	27±3	37±4.1	-6.1	-5.6±0.2	-0.5	
GTP	20	1.10±0.08	12±0.9	83±6.2	-5.5	-0.3±0.0	-5.2	
	25	1.01±0.05	8±0.7	125±11	-5.3	-3.5±0.3	-1.8	-700±34
	30	1.02±0.05	4±0.3	250±19	-5.0	-7.3±0.3	2.3	
MgGTP	20	1.20±0.08	45±5	22±2.4	-6.2	-0.8±0.0	-5.4	
	25	1.11±0.02	15±2	66±8.8	-5.7	-3.4±0.0	-2.3	-560±23
	30	1.09±0.02	8±0.7	125±11	-5.4	-6.4±0.4	1.0	

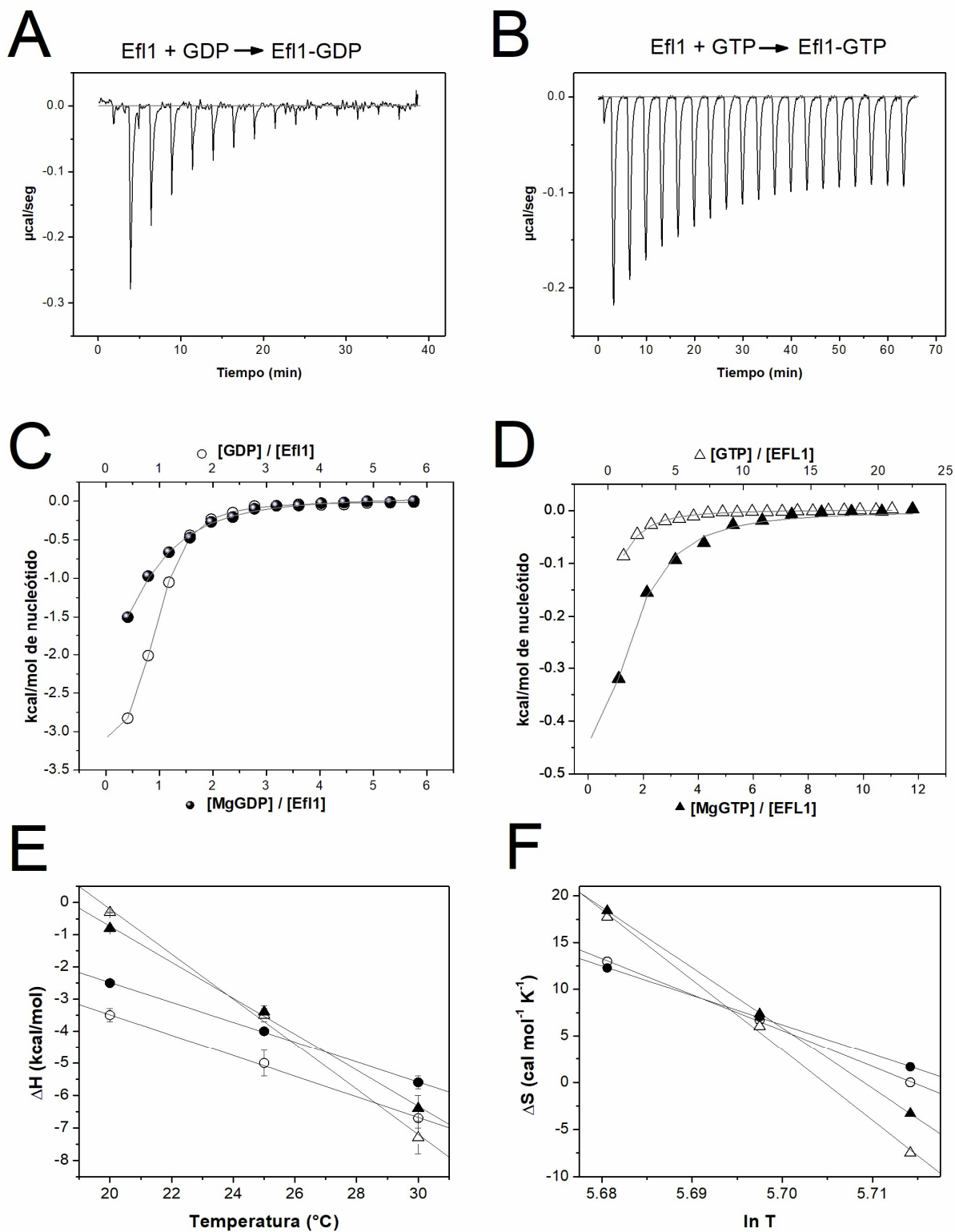
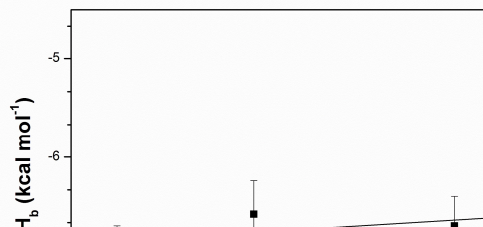


Figura 13. Caracterización calorimétrica de la unión de Efl1 a GDP ( $\circ$ ), MgGDP ( $\bullet$ ), GTP ( $\triangle$ ) y MgGTP ( $\blacktriangle$ ). A y B. Potenciogramas de la unión de Efl1 a GDP y GTP a 25 °C, respectivamente. C. Isothermas de unión de Efl1 a GDP/MgGDP a 20 °C. D. Isothermas de unión de Efl1 a GTP/MgGTP a 20 °C. E. Entalpía de unión en función de la temperatura. F. Entropía de unión en función de la temperatura.



**Figura 14. Entalpías de unión en función de la entalpía de ionización del amortiguador.** Valores  $\Delta H_a$  de titulaciones independientes de Efl1 con GDP realizadas en amortiguador de Hepes ( $\Delta H_{ion} = 4.88$  kcal mol<sup>-1</sup>), Tricina ( $\Delta H_{ion} = 7.5$  kcal mol<sup>-1</sup>), Tris ( $\Delta H_{ion} = 11.34$  kcal mol<sup>-1</sup>) a 30 °C. El análisis de regresión lineal muestra un intercambio neto de protones de  $0.03 \pm 0.05$ , lo cual es compatible con un evento en donde no hay intercambio de protones acoplados a la unión.

Como se puede observar en la **Tabla 3**, los parámetros de unión de Efl1 a nucleótidos mostraron una dependencia significativa con respecto a la temperatura. A 30 °C, la afinidad de Efl1 a MgGDP fue tres veces mayor que a MgGTP. Comparado con el nucleótido difosfato, el GTP mostró un  $\Delta H_a$  1 kcal/mol más favorable, el cual fue contrarrestado por un componente entrópico ( $-T\Delta S_a$ ) 1.5 kcal/mol menos favorable. Debido a la fuerte dependencia térmica, la unión de MgGTP pasó de ser un proceso entrópicamente dirigido a 20 °C a ser entálpicamente dirigido a 30 °C.

El efecto mutuo de los nucleótidos y el Mg(II) en la unión a Efl1 está contenido en la magnitud de la constante de asociación heterotrópica cooperativa ( $\kappa$ ), que es definida por la relación de los valores de  $K_a$  del nucleótido en complejo con Mg(II) ( $K_{E-GM}$ ) y del nucleótido libre del metal ( $K_{E-G}$ ) (ecs. 16-18). Como se muestra en la **Tabla 4**, el ion magnesio aumentó la afinidad de Efl1 por GTP, aunque este efecto se debilitó a medida que aumentó la temperatura ( $\kappa$  (20 ° C) = 3.8,  $\kappa$  (30 ° C) = 2). El efecto heterotrópico positivo entre Mg(II) y GTP también se ha observado para el factor de liberación eRF3 unido a su factor intercambiador eRF1 ( $\kappa$  (25 ° C) = 5.5).<sup>83</sup> Por el contrario, la presencia del ion metálico desestabilizó la interacción con GDP, como indican los valores de  $\kappa < 1$ ; este efecto decreció con la temperatura ( $\kappa$  (20 ° C) = 0.1,  $\kappa$  (30 ° C) = 0.4). Un efecto heterotrópico similar se ha observado en el factor de iniciación eIF5B ( $\kappa$  (5 ° C) = 0.3,  $\kappa$

(25 ° C) = 0.5)<sup>43</sup> y la GTPasa eRF3 aislada ( $\kappa$  (25 ° C) = 0.6)<sup>83</sup>. Estos datos indican que el fosfato  $\gamma$  es el responsable de la coordinación del Mg(II) en el sitio activo de Efl1 y otras GTPasas traduccionales. Sin embargo, cabe destacar que la interacción heterotrópica más fuerte con el GTP (30 °C) proviene principalmente de una entropía más favorable, lo que indica que distintos efectos de desolvatación y/o cambios en la flexibilidad conformacional de Efl1 también desempeñan un papel determinante en la afinidad.

**Tabla 4.** Parámetros de cooperatividad heterotrópica de la interacción entre Mg(II), nucleótidos de guanina y Efl1.

Receptor	Ligando	T (°C)	$\kappa$	$\Delta g$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta h$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-T $\Delta s$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
Efl1	GDP	20	0.1	1.2	1.0	0.2
		25	0.2	0.9	1.0	-0.1
		30	0.4	0.6	1.1	-0.5
	GTP	20	3.8	-0.7	-0.5	-0.2
		25	1.9	-0.4	0.1	-0.5
		30	2	-0.4	0.9	-1.3

Los cambios en la capacidad calorífica fueron determinados mediante la dependencia térmica del  $\Delta H_a$  y  $\Delta S_a$  (**Figura 12B y 12C**). Como se muestra en la **Tabla 3**, los valores de  $\Delta C_{p_a}$  fueron de -310 y -560 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> para la unión de Efl1 con MgGDP y MgGTP, respectivamente. Valores similares se obtuvieron para el caso de la unión de Efl1 a nucleótidos libres de Mg(II) (-318 y -700 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> para GDP y GTP, respectivamente).

En interacciones proteína-ligando o en fenómenos de plegamiento proteico, los cambios en la capacidad calorífica indican el grado de reorganización del solvente alrededor de los solutos, es decir, el grado de solvatación o desolvatación de las superficies interactuantes. Un valor negativo de  $\Delta C_{p_a}$  indica el ocultamiento de área no polar expuesta al solvente ( $\Delta ASA_{np}$ ); por el contrario, valores positivos indican el ocultamiento de área polar expuesta al solvente ( $\Delta ASA_p$ ). Debido a que el  $\Delta C_{p_a}$  se correlaciona con el cambio

de áreas expuestas al solvente (ec.8),<sup>75</sup> es un parámetro que se puede interpretar en términos de cambios de áreas expuestas al solvente o cambios conformacionales.

En interacciones proteicas, el  $\Delta C p_a$  puede ser particionado en dos contribuciones principales, una relativa al cambio conformacional inducido por el ligando ( $\Delta C p_a^{\text{conf}}$ ) y otra asociada con el ocultamiento de área expuesta al solvente (ASA) debido solo a la ocupación del ligando ( $\Delta C p_a^{\text{cr}}$ )<sup>84</sup> de tal modo que:

$$\Delta C p_a = \Delta C p_a^{\text{conf}} + \Delta C p_a^{\text{cr}} \quad (\text{ec.19})$$

Debido a que el valor de  $\Delta C p_a^{\text{cr}}$  excluye a los cambios en ASA debidos a rearrreglos conformacionales inducidos por el ligando, representa una asociación tipo cuerpo rígido.

El valor de  $\Delta C p_a^{\text{cr}}$  puede ser estimado a partir del análisis de la estructura tridimensional del complejo involucrado y modelando las especies libres como si adoptaran la misma forma que en el complejo. Sin embargo, debido a que no existen estructuras cristalográficas de Efl1 unida a nucleótidos, los valores de  $\Delta C p_a^{\text{cr}}$  para los diferentes complejos de Efl1-nucleótido fueron obtenidos del análisis de estructuras cristalográficas de otras GTPasas ribosomales obtenidas del PDB. Como se describe en materiales y métodos, mediante el uso de modelos de área superficial se determinaron los cambios de área expuesta al solvente  $\Delta A S A_{\text{np}}$  y  $\Delta A S A_{\text{p}}$  de los diferentes complejos GTPasa-nucleótido. El  $\Delta C p_a^{\text{cr}}$  asociado a la interacción de cada nucleótido fue obtenido mediante la parametrización de Murphy y Freire (ec.8).<sup>75</sup>

Como se muestra en la **Tabla 5**, los valores de  $\Delta C p_a^{\text{c.rig}}$  representan solo una pequeña parte del  $\Delta C p_a$ . Los valores de  $\Delta C p_a^{\text{cr}}$  y  $\Delta C p_a$  fueron utilizados para calcular el valor de  $\Delta C p_a^{\text{conf}}$  (ec.19). Estos últimos valores fueron transformados a cambios de área expuesta al solvente total ( $\Delta A S A_{\text{t}}$ ) mediante:

$$\Delta C p_a^{\text{conf}} = 0.45 f_{\text{np}} \Delta A S A_{\text{t}} - 0.26 (1 - f_{\text{np}}) \Delta A S A_{\text{t}} \quad (\text{ec.20})$$

donde  $f_{\text{np}}$  representa el índice de hidrofobicidad promedio de interfases proteína-proteína.<sup>85-87</sup> Finalmente, asumiendo que cada residuo oculta un promedio de  $47 \text{ \AA}^2$  de área,<sup>87</sup> el número de residuos ocultos al solvente ( $N_{\text{res}}$ ) debido a los cambios conformacionales en la proteína fueron determinados (**Tabla 5**).



**Tabla 5.** Deconvolución de los valores de  $\Delta C_{p_a}$  y  $\Delta S_a$ .

Receptor	Ligando	$\Delta C_{p_a}$	$\Delta C_{p_r}$	$\Delta C_{p_a}^{conf}$	$-\Delta ASA_t$	$N_{res}$	$\Delta S_b$	$\Delta S_{solv}$	$\Delta S_{conf}$	$E_{rot}$
Efl1	GDP	-318	-30	-288	1293	28	7	81	-67	33
	MgGDP	-310	-48	-262	1176	25	7	79	-64	32
	GTP	-700	-11	-689	3092	66	6	179	-165	82
	MgGTP	-560	-25	-535	2401	51	7	143	-128	64
Efl1-	GDP	-640	-30	-610	2738	58	7	164	-149	74
Sdol	GTP	-90	-11	-79	355	8	18	23	3	1

La deconvolución de los valores de  $\Delta C_{p_a}$  muestran que la unión de GDP/MgGDP a Efl1 es acompañada del ocultamiento de  $\sim 1200 \text{ \AA}^2$ , que equivalen a 28 residuos, mientras que en la unión de GTP/MgGTP, el ocultamiento es de  $\sim 3100 \text{ \AA}^2$  involucrando a  $\sim 66$  residuos.

Debido a la gran flexibilidad estructural de Efl1, no se puede descartar la posibilidad de que una fracción sustancial del  $\Delta C_{p_a}$  surja de grandes cambios en las fluctuaciones conformacionales (por ejemplo, debido al aumento de la rigidez de la proteína). Por lo tanto, los valores de entropía fueron utilizados como una forma alternativa de inferir cambios conformacionales en Efl1.

El  $\Delta S_a$  se puede dividir en tres componentes:<sup>71</sup>

$$\Delta S_a = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r-t} \quad (\text{ec.21})$$

donde el termino  $\Delta S_{solv}$  está relacionado con el cambio en los grados de libertad debido a la liberación de moléculas de solvente de las superficies interactuantes y puede ser calculado como:

$$\Delta S_{solv} = \Delta C_{p_a} (\ln(T/T_s)) \quad (\text{ec.22})$$

donde  $T_s$  es la temperatura donde los efectos de solvatación no contribuyen al cambio de entropía (112 °C). El valor de  $\Delta S_{r-t}$  proviene de la pérdida de grados de libertad rotacional y traslacional, y se ha estimado en  $-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para eventos de unión bimoleculares.<sup>68</sup> El término  $\Delta S_{conf}$  proviene de la pérdida de grados de libertad conformacional debido al congelamiento de residuos y/o del ligando. Este último subcomponente fue determinado mediante las ecuaciones 21 y 22. Finalmente, los valores de  $\Delta S_{conf}$  fueron transformados

a número de enlaces rotables congelados tras la unión ( $E_{\text{rot}}$ ), asumiendo un decremento promedio de entropía de -2 u.e. por enlace.<sup>88</sup> Como se muestra en la **Tabla 5**, los valores de  $E_{\text{rot}}$  fueron dos veces más altos para la asociación con GTP/MgGTP que para el dinucleótido, lo cual concuerda con el análisis de los valores del cambio en la capacidad calorífica.

### 6.3 Efecto de Sdo1 en el reconocimiento molecular de Efl1 a nucleótidos

Para resolver los equilibrios acoplados que se producen en presencia de Sdo1, se midió primero la interacción de Efl1 con Sdo1 (**Figura 15C**). Como se muestra en la **Tabla 6**, la unión de Efl1 a Sdo1 fue dirigida entálpicamente mostrando un componente entrópico favorable a 20 °C que se vuelve desfavorable a 30 °C. El análisis de la dependencia térmica del  $\Delta H_a$  (**Figura 15E**) mostró valores de  $-860 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , lo cual equivale al ocultamiento de una superficie de  $\sim 4000 \text{ \AA}^2$  que equivale a 80 residuos. Debido a que no se han resuelto las estructuras tridimensionales del complejo Efl1-Sdo1, es difícil determinar cuánta de esta superficie se debe al ocultamiento de la interfase de unión y cuánta se debe al cambio conformacional de las proteínas interactuantes.

Posteriormente, el complejo preformado Efl1-Sdo1 fue titulado con GD(T)P en función de la temperatura. Un modelo que toma en cuenta los equilibrios descritos en el **Esquema 2** fue ajustado a las curvas calorimétricas (**Figura 15D**). La unión de Sdo1 a Efl1 induce diferentes efectos en la unión de nucleótidos. A 30 °C, la afinidad de Efl1-Sdo1 por GDP disminuye 3 veces con respecto a Efl1 aislada, debido a un componente entrópico ahora desfavorable. En contraste, Sdo1 incrementa la afinidad de Efl1 por GTP por un factor de 20, con componentes entrópico y entálpico favorables. Comparando la unión de ambos nucleótidos, Sdo1 incrementa la afinidad de Efl1 por GTP con respecto a GDP por un factor de 70. De forma recíproca, el GDP debilita la interacción de Efl1 con Sdo1, mientras que el GTP incrementa en gran medida la afinidad de Efl1 por Sdo1 (**Figura 16**).

**Tabla 6.** Parámetros termodinámicos de la interacción de Efl1-Sdo1 a nucleótidos de guanina en función de la temperatura determinados mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Receptor	Ligand	T (°C)	n	$K_b$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G_b$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$\Delta H_b$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$-T\Delta S_b$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$\Delta C_p_b$ ( $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )
Efl1	Sdo1	20	1.07±0.02	1580±280	0.6±0.0	-8.3	-4.8±0.1	-3.5	
		25	0.87±0.02	3200±650	0.3±0.0	-8.8	-9.1±0.2	0.3	-860±31
		30	0.87±0.05	3110±630	0.3±0.0	-9.0	-13.4±0.4	4.4	
Sdo1-Efl1	GDP	20	1.30±0.02	330±38	3±1	-7.4	-1.0±0.1	-6.4	
		25	0.93±0.03	62±3	16±	-6.5	-4.5±0.0	-2.0	-640±34
		30	1.01±0.00	19±1	52±1	-5.9	-7.4±0.0	1.5	
	GTP	20	1.03±0.00	481±27	2±0	-7.6	-1.2±0.0	-6.4	
		25	1.10±0.02	166±13	6±1	-7.1	-1.7±0.1	-5.4	-90±5
		30	1.03±0.00	89±12	11±1	-6.8	-2.1±0.2	-4.7	

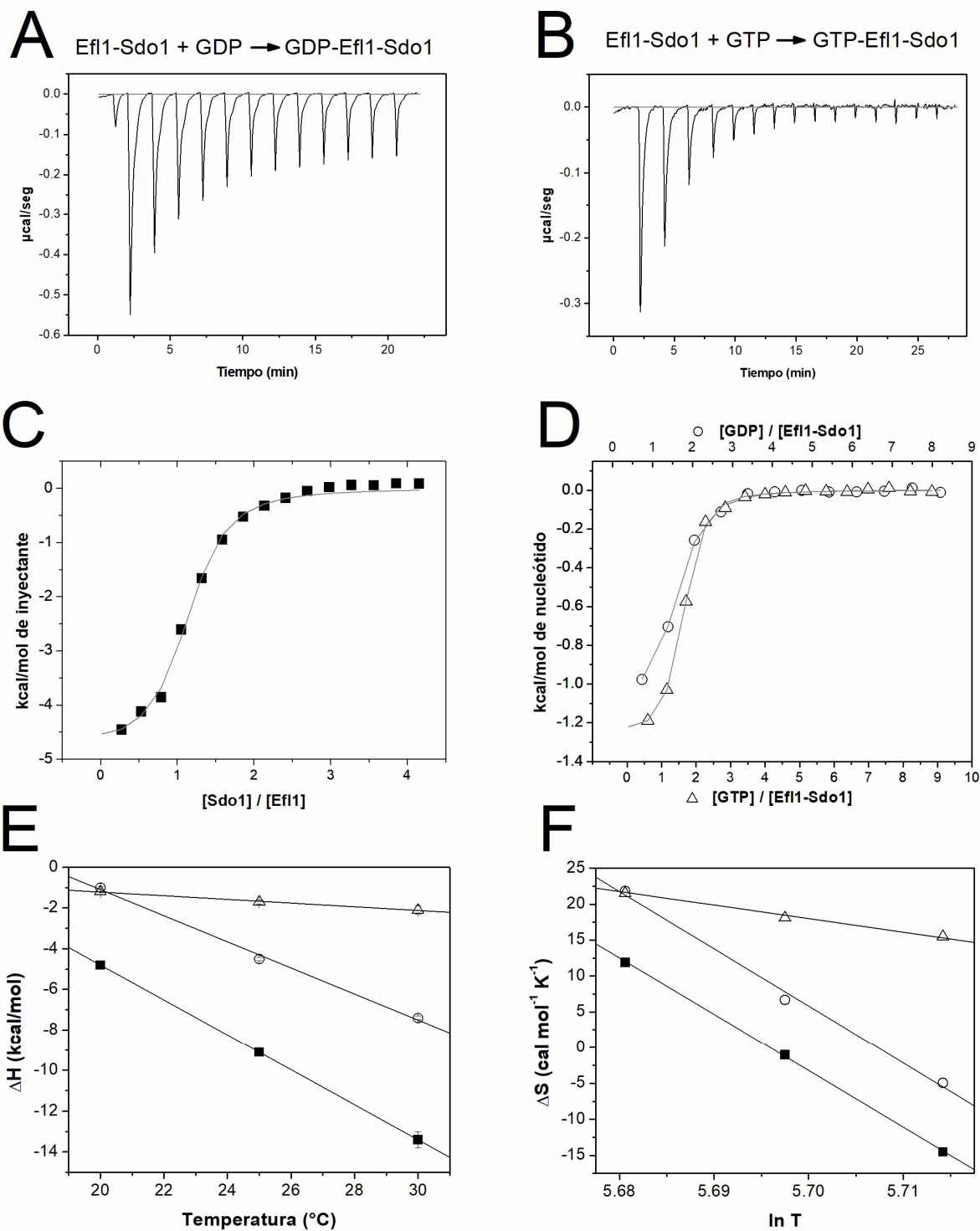


Figura 15. Caracterización calorimétrica de la unión de Sdo1-Efl1 a GDP ( $\circ$ ), MgGDP ( $\bullet$ ), GTP ( $\Delta$ ) y MgGTP ( $\blacktriangle$ ). Potenciogramas (A y B) e isothermas (C y D) de la unión a GDP y GTP a 25 °C, respectivamente. E. Entalpía de unión en función de la temperatura. F. Entropía de unión en función de la temperatura.

La unión de GTP al complejo Efl1-Sdo1 fue acompañada de un valor pequeño de  $\Delta C_{p_a}$  ( $-90 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), involucrando el ocultamiento de solo 8 residuos, lo cual es compatible con una unión tipo cuerpo rígido. Con base en lo anterior, Sdo1 parece inducir un cambio conformacional en Efl1 que hace que la unión a GTP sea un evento en el que los cambios en  $\Delta ASA_{tot}$  y  $E_{rot}$  se reducen significativamente en relación con los cambios observados para Efl1 aislada. Los parámetros de cooperatividad presentados en la **Tabla 7** indican que la mayor afinidad de Efl1 por GTP inducida por Sdo1 es de origen entrópico.

**Tabla 7.** Parámetros de cooperatividad heterotrópica de la interacción entre Efl1, Sdo1 y GD(T)P.

Receptor	Ligando	Temperatura (°C)	$\kappa$	$\Delta g$ kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta h$ kcal mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta s$ kcal mol <sup>-1</sup>
Efl1-Sdo1	GDP	20	1.2	-0.1	2.5	-2.6
		25	0.4	0.5	0.5	0.0
		30	0.3	0.8	-0.7	1.5
	GTP	20	40.1	-2.1	2.1	-1.2
		25	20.8	-1.8	1.8	-3.6
		30	22.3	-1.8	5.2	-7.0

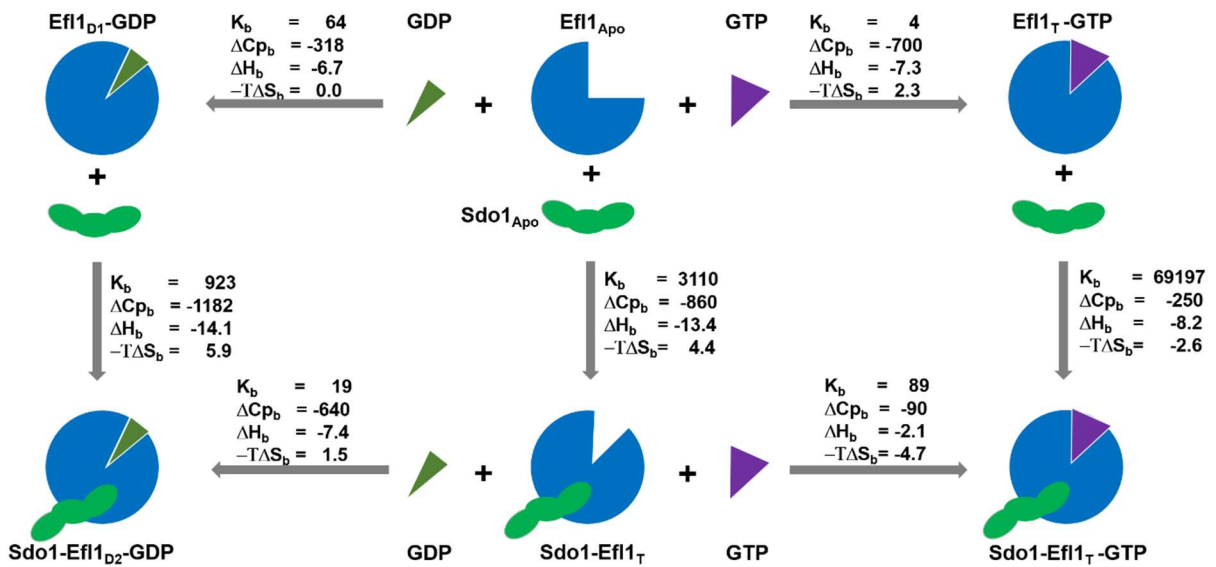


Figura 16. Parámetros termodinámicos de los equilibrios acoplados de la interacción entre Efl1, Sdo1 y nucleótidos de guanina. Efl1 puede adquirir al menos 4 conformaciones distintas en solución: la conformación Apo, la conformación D unida a GDP, la conformación T unida a GTP y/o Sdo1 y una conformación D2 diferente a las anteriores cuando se encuentra unida a GDP y Sdo1.

## 7. Discusión

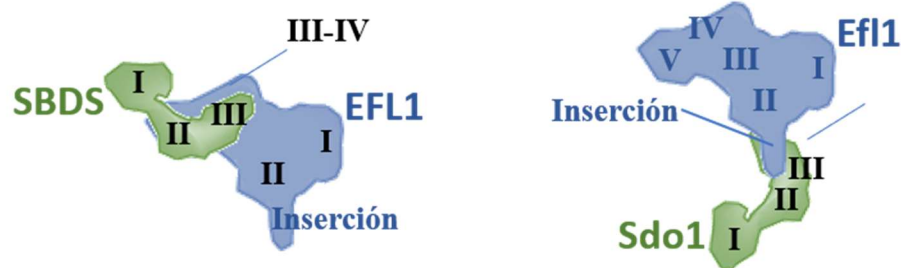
Los cambios conformacionales inducidos por nucleótidos juegan un papel central en la regulación y función de las GTPasas. Canónicamente, estas enzimas adoptan una conformación más compacta cuando se encuentran unidas a GTP (conformación T) con respecto a cuando están unidas a GDP (conformación D).<sup>42,89</sup> Con base en los cambios conformacionales inferidos del análisis de los valores de  $\Delta C_p$  y de  $\Delta S_a$ , Efl1 exhibe este comportamiento, ocultando 25-28 residuos tras la unión de GDP y el doble de residuos (51-66) cuando interacciona con GTP. En analogía con otras GTPasas traduccionales, es posible que los cambios conformacionales tengan lugar en las regiones de *Switch* I y II contenidas en el dominio G.<sup>42,90,91</sup> El análisis de los parámetros termodinámicos de cooperatividad heterotrópica indican que el Mg(II) modifica las afinidades de Efl1 por nucleótidos, como se ha observado en el factor de inicio de la traducción eIF5B y en el factor de liberación eRF3.

La unión de GTP al complejo preformado Efl1-Sdo1 involucra el ocultamiento de un pequeño número de residuos, lo que sugiere una asociación tipo cuerpo rígido, infiriéndose por tanto que Sdo1 conduce a Efl1 a adquirir una conformación T, con el consecuente aumento en la afinidad por GTP. En contraste, la unión de GDP al complejo Efl1-Sdo1 tiene un valor relativamente grande de  $\Delta C_p$ , lo que indica que Efl1 y/o Sdo1 adoptan conformaciones distintas con respecto al complejo Sdo1-Efl1-GTP. Por tanto, el análisis de los parámetros termodinámicos de unión indica que Efl1 adquiere al menos cuatro conformaciones claramente diferentes en solución: 1) la forma apo de la enzima, 2) una conformación T cuando se encuentra unida a GTP (Efl1<sub>T</sub>-GTP), a Sdo1 (Efl1<sub>T</sub>-Sdo1) o a ambas moléculas (Sdo1-Efl1<sub>T</sub>-GTP), 3) una conformación D, unida a GDP (Efl1<sub>D1</sub>-GDP) y 4) una conformación diferente a las anteriores, inducida por el efecto simultáneo de GDP y Sdo1 (Sdo1-Efl1<sub>D2</sub>-GDP). En este sentido, Efl1 muestra una gran plasticidad conformacional comparada con otras GTPasas más clásicas en donde solo la unión a GTP o GDP induce la forma activa e inactiva de la enzima, respectivamente.

En términos de significancia biológica, ¿qué tan relevante es la interacción entre Efl1, Sdo1 y nucleótidos de guanina en solución o sin la partícula ribosomal 60S? Modelos



estructurales obtenidos por Cryo-EM de los ortólogos humanos EFL1 y SBDS en complejo con la partícula 60S, establecen un modelo de unión en el que los dominios II-III de SBDS interactúan directamente con los dominios III-IV de EFL1, mientras que el bucle de inserción dentro del dominio II de EFL1 se ubica lejos de SBDS (**Figura 17 izquierda**). Cabe mencionar que en esta forma de interacción entre EFL1 y SBDS el residuo Ser143 de SBDS asociado al síndrome de Shwachman-Diamond, no participa en la interacción entre la GTPasa y su cofactor, ubicándose lejos de la interfaz EFL1-SBDS.

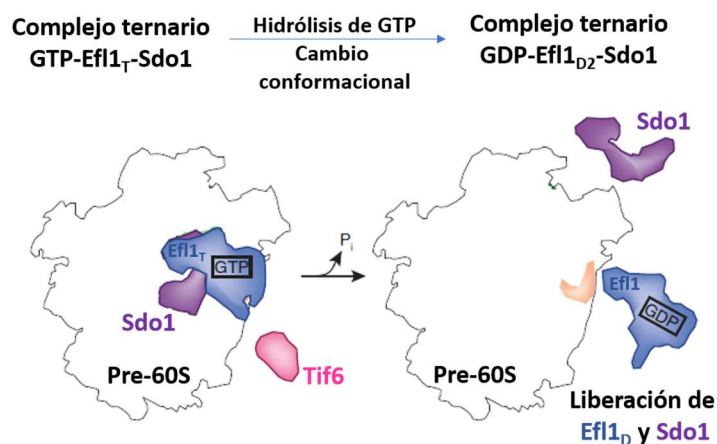


**Figura 17.** Representación esquemática de modelos de unión de Efl1/EFL1 con Sdo1/SBDS. **Izquierda:** Modelo de unión derivado de estructuras de crio-microscopía electrónica en presencia de subunidad ribosomal 60S. **Derecha:** Forma de interacción de Efl1 y Sdo1 en solución en ausencia de subunidad 60S.

En contraste, el modo de unión derivado de los datos de interacción en un contexto libre de partículas ribosomales establece que el dominio de inserción en Efl1 interactúa directamente con Sdo1 estableciendo un binomio que tiene una orientación invertida con respecto al modelo de unión Cryo-EM en presencia de la partícula 60S (**Figura 17 derecha**). Los resultados calorimétricos presentados aquí indican claramente que la interacción de Efl1 con GT(D)P y Mg(II) se asemeja notablemente a la observada para otras GTPasas, y que Sdo1 se comporta como un factor accesorio que induce efectos clásicos energéticos y estructurales que favorecen la interacción de la GTPasa con el trinucleótido y debilitan la interacción con el dinucleótido. En vista de estos efectos característicos, es difícil concluir que la interacción de Sdo1 y Efl1 fuera del ribosoma es fortuita y carente de significado biológico.

Se ha propuesto que el papel principal de Sdo1/SBDS es reclutar a Efl1 y facilitar una transición conformacional en Efl1 que estéricamente desplaza al factor Tif6/eIF6 de

la superficie de la subunidad 60S.<sup>52,63</sup> No obstante, experimentos de titulación han mostrado que Efl1 puede unirse a la subunidad 60S independientemente de Sdo1, lo que indica que este cofactor no desempeña un papel significativo como reclutador de Efl1.<sup>54,92</sup> Además, no se ha establecido si Sdo1 y Efl1 se unen como un heterodímero a la subunidad 60S o de forma independiente. En principio, si Efl1 tiene el mismo comportamiento que los factores EF-G/EF-2 y otras GTPasas traduccionales, sería necesaria la adquisición de su conformación T para unirse a la subunidad 60S. En esta idea, nuestros resultados muestran que la conformación T de Efl1 es estabilizada por Sdo1. Además, debido a que tanto Efl1 como Sdo1 son proteínas citoplasmáticas<sup>51,57</sup> e interaccionan entre sí con afinidad nanomolar baja en presencia de GTP (**Figura 16**), es posible que se unan a la subunidad 60S como un heterodímero. También se ha propuesto que la remoción del factor Tif6/eIF6 precede a la liberación de Efl1 y Sdo1 para producir a la subunidad 60S madura.<sup>52</sup> Consistente con este escenario, nuestros resultados muestran que las conformaciones de los complejos Sdo1-Efl1<sub>T</sub>-GTP y Sdo1-Efl1<sub>D2</sub>-GDP son estructuralmente diferentes, por lo que, la transición conformacional de complejo ternario T al complejo ternario D (resultado de la hidrólisis de GTP) podría ser el factor estructural desencadenante para la liberación de ambos factores de la superficie de la subunidad 60S (**Figura 18**).



**Figura 18.** Como producto de la hidrólisis de GTP, la transición conformacional del complejo ternario GTP-Efl1<sub>T</sub>-Sdo1 al complejo GDP-Efl1<sub>D2</sub>-Sdo1 altera la interacción de ambos factores con la subunidad 60S, facilitando su liberación.

Estudios previos han sugerido que Sdo1 tiene la función de factor GEF de Efl1. Consistentemente, nuestros resultados muestran que Sdo1 incrementa la afinidad de Efl1 por GTP con respecto a GDP, como consecuencia del efecto simultáneo de disminuir la afinidad por GDP e incrementar la afinidad por GTP. No obstante, cuando comparamos los parámetros cinéticos de unión a nucleótidos de otras GTPasas que requieren de factor GEF para intercambiar nucleótidos,<sup>93-95</sup> el efecto de Sdo1 como factor GEF es marginal en términos cinéticos. De hecho, en términos cinéticos, Efl1 se comporta como las GTPasas que carecen de factores GEF.<sup>96,97</sup> Sin embargo, vale la pena señalar que los valores de  $K_d$  de los complejos de Efl1-nucleótidos están en el orden submicromolar, los que a su vez están cerca de las concentraciones de GDP y GTP observadas en levadura *in vivo*. En células de *S. cerevisiae* en fase de crecimiento exponencial, las concentraciones intracelulares de GTP y GDP son  $\sim 200$  y  $\sim 50$   $\mu\text{M}$ , respectivamente.<sup>98</sup> Bajo estas condiciones, la interacción Efl1 con GTP en presencia de Sdo1 sería favorecida por un factor de 18 con respecto a la forma apo o en complejo con GDP. En cambio, en ausencia de Sdo1, Efl1 apo, y sus complejos con GDP o GTP coexistirían equimolarmente. Si Efl1 necesita ser precargada con GTP para interactuar con la subunidad 60S, como ocurre en otras GTPasas, una de las funciones de Sdo1 sería la de modular las poblaciones relativas de las formas activa e inactiva de Efl1 y, en consecuencia, regular la tasa de maduración ribosomal.

En conclusión, los efectos estructurales y energéticos provocados por Sdo1 y los nucleótidos de guanina modulan de una manera muy específica el paisaje conformacional de Efl1 en solución, sin duda recordando el comportamiento de otras GTPasas. Los modos de unión drásticamente diferentes para la interacción de Sdo1/SBDS y Efl1/EFL1 en complejo y libres de la partícula 60S constituyen una interesante incógnita para resolver. Es necesario realizar investigaciones adicionales para reconciliar los modos de unión del cofactor de la GTPasa determinados a partir de experimentos en solución y datos de crio-microscopía electrónica.

## 8. Referencias Bibliográficas

- (1) Melnikov, S.; Ben-Shem, A.; Garreau de Loubresse, N.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. One Core, Two Shells: Bacterial and Eukaryotic Ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19* (6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2313>.
- (2) Opron, K.; Burton, Z.; Opron, K.; Burton, Z. F. Ribosome Structure, Function, and Early Evolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20* (1), 40. <https://doi.org/10.3390/ijms20010040>.
- (3) Schmeing, T. M.; Ramakrishnan, V. What Recent Ribosome Structures Have Revealed about the Mechanism of Translation. *Nature* **2009**, *461* (7268), 1234–1242. <https://doi.org/10.1038/nature08403>.
- (4) Konikkat, S.; Woolford, J. L. Principles of 60S Ribosomal Subunit Assembly Emerging from Recent Studies in Yeast. *Biochem. J.* **2017**, *474* (2), 195–214. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160516>.
- (5) Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. Driving Ribosome Assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803* (6), 673–683. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2009.10.009>.
- (6) Gerhardy, S.; Menet, A. M.; Peña, C.; Petkowski, J. J.; Panse, V. G. Assembly and Nuclear Export of Pre-Ribosomal Particles in Budding Yeast. *Chromosoma* **2014**, *123* (4), 327–344. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0463-z>.
- (7) Nerurkar, P.; Altvater, M.; Gerhardy, S.; Schütz, S.; Fischer, U.; Weirich, C.; Panse, V. G. Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2015**, *319*, 107–140. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2015.07.002>.
- (8) Decatur, W. A.; Liang, X.; Piekna-Przybylska, D.; Fournier, M. J. Identifying Effects of SnoRNA-Guided Modifications on the Synthesis and Function of the Yeast Ribosome. *Methods Enzymol.* **2007**, *425*, 283–316. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)25013-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)25013-X).
- (9) Kiss, T. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Small Nucleolar RNA-Guided Post-Transcriptional Modification of Cellular RNAs. *EMBO J.* **2001**, *20* (14), 3617–3622. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>.
- (10) Watkins, N. J.; Bohnsack, M. T. The Box C/D and H/ACA SnoRNPs: Key Players in the Modification, Processing and the Dynamic Folding of Ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, *3* (3), 397–414. <https://doi.org/10.1002/wrna.117>.
- (11) Schütz, S.; Fischer, U.; Altvater, M.; Nerurkar, P.; Peña, C.; Gerber, M.; Chang, Y.; Caesar, S.; Schubert, O. T.; Schlenstedt, G.; et al. A RanGTP-Independent Mechanism Allows Ribosomal Protein Nuclear Import for Ribosome Assembly. *Elife* **2014**, *3*. <https://doi.org/10.7554/eLife.03473>.
- (12) Baxter-Roshek, J. L.; Petrov, A. N.; Dinman, J. D. Optimization of Ribosome Structure and Function by rRNA Base Modification. *PLoS One* **2007**, *2* (1), e174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000174>.
- (13) de la Cruz, J.; Karbstein, K.; Woolford, J. L. Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84* (1), 93–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033917>.

- (14) Greber, B. J. Mechanistic Insight into Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit Biogenesis by Cryo-Electron Microscopy. *RNA* **2016**, *22* (11), 1643–1662. <https://doi.org/10.1261/rna.057927.116>.
- (15) Sanghai, Z. A.; Miller, L.; Molloy, K. R.; Barandun, J.; Hunziker, M.; Chaker-Margot, M.; Wang, J.; Chait, B. T.; Klinge, S. Modular Assembly of the Nucleolar Pre-60S Ribosomal Subunit. *Nature* **2018**, *556* (7699), 126–129. <https://doi.org/10.1038/nature26156>.
- (16) Ciganda, M.; Williams, N. Eukaryotic 5S rRNA Biogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, *2* (4), 523–533. <https://doi.org/10.1002/wrna.74>.
- (17) Fernández-Pevida, A.; Kressler, D.; de la Cruz, J. Processing of Preribosomal RNA in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2015**, *6* (2), 191–209. <https://doi.org/10.1002/wrna.1267>.
- (18) Lo, K.-Y.; Li, Z.; Bussiere, C.; Bresson, S.; Marcotte, E. M.; Johnson, A. W. Defining the Pathway of Cytoplasmic Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *Mol. Cell* **2010**, *39* (2), 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.018>.
- (19) Karbstein, K. Role of GTPases in Ribosome Assembly. *Biopolymers* **2007**, *87* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bip.20762>.
- (20) Biedka, S.; Wu, S.; LaPeruta, A. J.; Gao, N.; Woolford, J. L. Insights into Remodeling Events during Eukaryotic Large Ribosomal Subunit Assembly Provided by High Resolution Cryo-EM Structures. *RNA Biol.* **2017**, *14* (10), 1306–1313. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1297914>.
- (21) Ma, C.; Wu, S.; Li, N.; Chen, Y.; Yan, K.; Li, Z.; Zheng, L.; Lei, J.; Woolford, J. L.; Gao, N. Structural Snapshot of Cytoplasmic Pre-60S Ribosomal Particles Bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24* (3), 214–220. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3364>.
- (22) Malyutin, A. G.; Musalgaonkar, S.; Patchett, S.; Frank, J.; Johnson, A. W. Nmd3 Is a Structural Mimic of EIF5A, and Activates the CpGTPase Lsg1 during 60S Ribosome Biogenesis. *EMBO J.* **2017**, e201696012. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201696012>.
- (23) Ebersberger, I.; Simm, S.; Leisegang, M. S.; Schmitzberger, P.; Mirus, O.; von Haeseler, A.; Bohnsack, M. T.; Schleiff, E. The Evolution of the Ribosome Biogenesis Pathway from a Yeast Perspective. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (3), 1509–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1137>.
- (24) P Mandira. Parts of ribosomes shift from cytosol to nucleus and from nucleus to cytoplasm: Is this true? If yes, why is it so? | Socratic <https://socratic.org/questions/57dc05817c0149755d006025> (accessed Jan 14, 2019).
- (25) OPS, O.-A. DeCS Server - List Exact Term [http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&task=exact\\_term&previous\\_page=homepage&interface\\_language=e&search\\_language=e&search\\_exp=GTPasas](http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=e&search_language=e&search_exp=GTPasas) (accessed May 24, 2019).
- (26) Li, H.; Yao, X.-Q.; Grant, B. J. Comparative Structural Dynamic Analysis of GTPases. *PLOS Comput. Biol.* **2018**, *14* (11), e1006364. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006364>.

- (27) Maracci, C.; Rodnina, M. V. Review: Translational GTPases. *Biopolymers* **2016**, *105* (8), 463–475. <https://doi.org/10.1002/bip.22832>.
- (28) Song, S.; Cong, W.; Zhou, S.; Shi, Y.; Dai, W.; Zhang, H.; Wang, X.; He, B.; Zhang, Q. Small GTPases: Structure, Biological Function and Its Interaction with Nanoparticles. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/J.AJPS.2018.06.004>.
- (29) Hanna, S.; El-Sibai, M. Signaling Networks of Rho GTPases in Cell Motility. *Cell. Signal.* **2013**, *25* (10), 1955–1961. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2013.04.009>.
- (30) Ridley, A. J. Rho GTPase Signalling in Cell Migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *36*, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2015.08.005>.
- (31) Mizuno-Yamasaki, E.; Rivera-Molina, F.; Novick, P. GTPase Networks in Membrane Traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81* (1), 637–659. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052810-093700>.
- (32) Jaffe, A. B.; Hall, A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21* (1), 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>.
- (33) Hodge, R. G.; Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and Their Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17* (8), 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>.
- (34) Johnson, D. S.; Chen, Y. H. Ras Family of Small GTPases in Immunity and Inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12* (4), 458–463. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2012.02.003>.
- (35) Porter, A. P.; Papaioannou, A.; Malliri, A. Deregulation of Rho GTPases in Cancer. *Small GTPases* **2016**, *7* (3), 123–138. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1173767>.
- (36) Haga, R. B.; Ridley, A. J. Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology. *Small GTPases* **2016**, *7* (4), 207–221. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
- (37) Orgaz, J. L.; Herraiz, C.; Sanz-Moreno, V. Rho GTPases Modulate Malignant Transformation of Tumor Cells. *Small GTPases* **2014**, *5* (4), e983867. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29019>.
- (38) Leipe, D. D.; Wolf, Y. I.; Koonin, E. V.; Aravind, L. Classification and Evolution of P-Loop GTPases and Related ATPases. *J. Mol. Biol.* **2002**, *317* (1), 41–72. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2001.5378>.
- (39) Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science (80-. )*. **2001**, *294* (5545), 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>.
- (40) Wittinghofer, A.; Vetter, I. R. Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80* (1), 943–971. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062708-134043>.
- (41) Shan, S.; Chandrasekar, S.; Walter, P. Conformational Changes in the GTPase Modules of the Signal Reception Particle and Its Receptor Drive Initiation of Protein Translocation. *J. Cell Biol.* **2007**, *178* (4), 611–620. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702018>.
- (42) Haurlyliuk, V.; Hansson, S.; Ehrenberg, M. Cofactor Dependent Conformational

- Switching of GTPases. *Biophys. J.* **2008**, *95* (4), 1704–1715.  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127290>.
- (43) Kuhle, B.; Ficner, R. EIF5B Employs a Novel Domain Release Mechanism to Catalyze Ribosomal Subunit Joining. *EMBO J.* **2014**, *33* (10), 1177–1191.  
<https://doi.org/10.1002/emboj.201387344>.
- (44) Lin, J.; Gagnon, M. G.; Bulkley, D.; Steitz, T. A. Conformational Changes of Elongation Factor G on the Ribosome during TRNA Translocation. *Cell* **2015**, *160* (1–2), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.049>.
- (45) da Silveira Tomé, C.; Foucher, A.-E.; Jault, J.-M.; Housset, D. High Concentrations of GTP Induce Conformational Changes in the Essential Bacterial GTPase EngA and Enhance Its Binding to the Ribosome. *FEBS J.* **2018**, *285* (1), 160–177. <https://doi.org/10.1111/febs.14333>.
- (46) Clementi, N.; Polacek, N. Ribosome-Associated GTPases: The Role of RNA for GTPase Activation. *RNA Biol.* **2010**, *7* (5), 521–527.  
<https://doi.org/10.4161/rna.7.5.12467>.
- (47) Ash, M.-R.; Maher, M. J.; Mitchell Guss, J.; Jormakka, M. The Cation-Dependent G-Proteins: In a Class of Their Own. *FEBS Lett.* **2012**, *586* (16), 2218–2224.  
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2012.06.030>.
- (48) Maracci, C.; Peske, F.; Dannies, E.; Pohl, C.; Rodnina, M. V. Ribosome-Induced Tuning of GTP Hydrolysis by a Translational GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (40), 14418–14423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412676111>.
- (49) Wallin, G.; Kamerlin, S. C. L.; Åqvist, J. Energetics of Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Nat. Commun.* **2013**, *4* (1), 1733.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2741>.
- (50) Cherfils, J.; Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **2013**, *93* (1), 269–309.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>.
- (51) Senger, B.; Lafontaine, D. L. J.; Graindorge, J.-S.; Gadai, O.; Camasses, A.; Sanni, A.; Garnier, J.-M.; Breitenbach, M.; Hurt, E.; Fasiolo, F. The Nucle(Ol)Ar Tif6p and Efl1p Are Required for a Late Cytoplasmic Step of Ribosome Synthesis. *Mol. Cell* **2001**, *8* (6), 1363–1373. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00403-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00403-8).
- (52) Weis, F.; Giudice, E.; Churcher, M.; Jin, L.; Hilcenko, C.; Wong, C. C.; Traynor, D.; Kay, R. R.; Warren, A. J. Mechanism of EIF6 Release from the Nascent 60S Ribosomal Subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22* (11), 914–919.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3112>.
- (53) Asano, N.; Atsumi, H.; Nakamura, A.; Tanaka, Y.; Tanaka, I.; Yao, M. Direct Interaction between EFL1 and SBDS Is Mediated by an Intrinsically Disordered Insertion Domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443* (4), 1251–1256.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.12.143>.
- (54) Finch, A. J.; Hilcenko, C.; Basse, N.; Drynan, L. F.; Goyenechea, B.; Menne, T. F.; González Fernández, A.; Simpson, P.; D’Santos, C. S.; Arends, M. J.; et al. Uncoupling of GTP Hydrolysis from EIF6 Release on the Ribosome Causes Shwachman-Diamond Syndrome. *Genes Dev.* **2011**, *25* (9), 917–929.  
<https://doi.org/10.1101/gad.623011>.

- (55) Warren, A. J. Molecular Basis of the Human Ribosomopathy Shwachman-Diamond Syndrome. *Adv. Biol. Regul.* **2018**, *67*, 109–127. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2017.09.002>.
- (56) Bezzetti, V.; Cipolli, M. Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives. *Mol. Diagn. Ther.* **2018**. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0368-2>.
- (57) Menne, T. F.; Goyenechea, B.; Sánchez-Puig, N.; Wong, C. C.; Tonkin, L. M.; Ancliff, P. J.; Brost, R. L.; Costanzo, M.; Boone, C.; Warren, A. J. The Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Protein Mediates Translational Activation of Ribosomes in Yeast. *Nat. Genet.* **2007**, *39* (4), 486–495. <https://doi.org/10.1038/ng1994>.
- (58) Gartmann, M.; Blau, M.; Armache, J.-P.; Mielke, T.; Topf, M.; Beckmann, R. Mechanism of EIF6-Mediated Inhibition of Ribosomal Subunit Joining. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (20), 14848–14851. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.096057>.
- (59) Benelli, D.; Marzi, S.; Mancone, C.; Alonzi, T.; la Teana, A.; Londei, P. Function and Ribosomal Localization of AIF6, a Translational Regulator Shared by Archaea and Eukarya. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (1), 256–267. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn959>.
- (60) Miluzio, A.; Beugnet, A.; Volta, V.; Biffo, S. Eukaryotic Initiation Factor 6 Mediates a Continuum between 60S Ribosome Biogenesis and Translation. *EMBO Rep.* **2009**, *10* (5), 459–465. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.70>.
- (61) Brina, D.; Miluzio, A.; Ricciardi, S.; Biffo, S. EIF6 Anti-Association Activity Is Required for Ribosome Biogenesis, Translational Control and Tumor Progression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2015**, *1849* (7), 830–835. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2014.09.010>.
- (62) Ceci, M.; Gaviraghi, C.; Gorrini, C.; Sala, L. A.; Offenhäuser, N.; Carlo Marchisio, P.; Biffo, S. Release of EIF6 (P27BBP) from the 60S Subunit Allows 80S Ribosome Assembly. *Nature* **2003**, *426* (6966), 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature02160>.
- (63) Plisson-Chastang, C.; Larburu, N.; Gleizes, P.-E. Ribosomal 60S-Subunit Production: The Final Scene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22* (11), 837–838. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3121>.
- (64) García-Hernández, E.; Fernández-Velasco, D. A. *Advances in Protein Physical Chemistry : 2008*; Transworld Research Network, 2008.
- (65) de Azevedo Jr., W.; Dias, R. Experimental Approaches to Evaluate the Thermodynamics of Protein- Drug Interactions. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9* (12), 1071–1076. <https://doi.org/10.2174/138945008786949441>.
- (66) Davis, A. M.; St-Gallay, S. A.; Kleywegt, G. J. Limitations and Lessons in the Use of X-Ray Structural Information in Drug Design. *Drug Discov. Today* **2008**, *13* (19–20), 831–841. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2008.06.006>.
- (67) Kawasaki, Y.; Freire, E. Finding a Better Path to Drug Selectivity. *Drug Discov. Today* **2011**, *16* (21–22), 985–990. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2011.07.010>.
- (68) Homans, S. W. Dynamics and Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions. In *Bioactive Conformation I*; Springer Berlin Heidelberg, 2006; pp 51–82.



- [https://doi.org/10.1007/128\\_2006\\_090](https://doi.org/10.1007/128_2006_090).
- (69) Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L. Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2004**, *24* (1–2), 1–52.
- (70) Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.-L.; Ai, S.-M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X.-L.; Liu, S.-Q. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>.
- (71) Edgcomb, S. P.; Murphy, K. P. Structural Energetics of Protein Folding and Binding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (1), 62–66.
- (72) García-Hernández, E.; Hernández-Arana, A. Structural Bases of Lectin-Carbohydrate Affinities: Comparison with Protein-Folding Energetics. *Protein Sci.* **1999**, *8* (5), 1075–1086. <https://doi.org/10.1110/ps.8.5.1075>.
- (73) Vega, S.; Abian, O.; Velazquez-Campoy, A. On the Link between Conformational Changes, Ligand Binding and Heat Capacity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2016**, *1860* (5), 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.010>.
- (74) Prabhu, N. V.; Sharp, K. A. HEAT CAPACITY IN PROTEINS. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *56* (1), 521–548. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.56.092503.141202>.
- (75) Murphy, K. P.; Freire, E. Thermodynamics of Structural Stability and Cooperative Folding Behavior in Proteins. *Adv. Protein Chem.* **1992**, *43*, 313–361. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60556-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60556-2).
- (76) Gietz, R. D.; Schiestl, R. H. High-Efficiency Yeast Transformation Using the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>.
- (77) Louis-Jeune, C.; Andrade-Navarro, M. A.; Perez-Iratxeta, C. Prediction of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Using Theoretically Derived Spectra. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2012**, *80* (2), 374–381. <https://doi.org/10.1002/prot.23188>.
- (78) Pulido, N. O.; Salcedo, G.; Pérez-Hernández, G.; José-Núñez, C.; Velázquez-Campoy, A.; García-Hernández, E. Energetic Effects of Magnesium in the Recognition of Adenosine Nucleotides by the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  Subunit. *Biochemistry* **2010**, *49* (25), 5258–5268. <https://doi.org/10.1021/bi1006767>.
- (79) Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S. A.; Freire, E. Characterization of Protein–Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. In *Protein-Protein Interactions*; Humana Press: New Jersey, 2004; Vol. 261, pp 035–054. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:035>.
- (80) Salcedo, G.; Cano-Sánchez, P.; de Gómez-Puyou, M. T.; Velázquez-Campoy, A.; García-Hernández, E. Isolated Noncatalytic and Catalytic Subunits of F<sub>1</sub>-ATPase Exhibit Similar, Albeit Not Identical, Energetic Strategies for Recognizing Adenosine Nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837* (1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.08.005>.
- (81) Hubbard; Thornton, J. “{NACCESS}”, {C}omputer {P}rogram, {D}epartment of {B}iochemistry and {M}olecular {B}iology, {U}niversity {C}ollege {L}ondon. **1993**.

- (82) Goldberg, R. N.; Kishore, N.; Lennen, R. M. Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, *31* (2), 231–370. <https://doi.org/10.1063/1.1416902>.
- (83) Mitkevich, V. A.; Kononenko, A. V.; Petrushanko, I. Y.; Yanvarev, D. V.; Makarov, A. A.; Kisselev, L. L. Termination of Translation in Eukaryotes Is Mediated by the Quaternary ERF1\**e*RF3\*GTP\*Mg<sup>2+</sup> Complex. The Biological Roles of ERF3 and Prokaryotic RF3 Are Profoundly Distinct. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (14), 3947–3954. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl549>.
- (84) Ladbury, J. E.; Williams, M. A. The Extended Interface: Measuring Non-Local Effects in Biomolecular Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14* (5), 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.08.001>.
- (85) García-Hernández, E.; Zubillaga, R. A.; Rodríguez-Romero, A.; Hernández-Arana, A. Stereochemical Metrics of Lectin-Carbohydrate Interactions: Comparison with Protein-Protein Interfaces. *Glycobiology* **2000**, *10* (10), 993–1000.
- (86) Jones, S.; Thornton, J. M. Principles of Protein-Protein Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (1), 13–20.
- (87) Stites, W. E. Protein-Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. **1997**. <https://doi.org/10.1021/CR960387H>.
- (88) Doig, A. J.; Sternberg, M. J. Side-Chain Conformational Entropy in Protein Folding. *Protein Sci.* **1995**, *4* (11), 2247–2251. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041101>.
- (89) Cherfils, J.; Zeghouf, M. Chronicles of the GTPase Switch. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7* (8), 2011.
- (90) Hauryliuk, V.; Mitkevich, V. A.; Draycheva, A.; Tankov, S.; Shyp, V.; Ermakov, A.; Kulikova, A. A.; Makarov, A. A.; Ehrenberg, M. Thermodynamics of GTP and GDP Binding to Bacterial Initiation Factor 2 Suggests Two Types of Structural Transitions. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394* (4), 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.015>.
- (91) Hauryliuk, V.; Mitkevich, V. A.; Eliseeva, N. A.; Petrushanko, I. Y.; Ehrenberg, M.; Makarov, A. A. The Pretranslocation Ribosome Is Targeted by GTP-Bound EF-G in Partially Activated Form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (41), 15678–15683. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807912105>.
- (92) Stepensky, P.; Chacón-Flores, M.; Kim, K. H.; Abuzaitoun, O.; Bautista-Santos, A.; Simanovsky, N.; Siliqi, D.; Altamura, D.; Méndez-Godoy, A.; Gijsbers, A.; et al. Mutations in *EFL1*, an *SBDS* Partner, Are Associated with Infantile Pancytopenia, Exocrine Pancreatic Insufficiency and Skeletal Anomalies in Ashwachman-Diamond like Syndrome. *J. Med. Genet.* **2017**, *54* (8), 558–566. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104366>.
- (93) Goody, R.; Hofmann-Goody, W. Exchange Factors, Effectors, GAPs and Motor Proteins: Common Thermodynamic and Kinetic Principles for Different Functions. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31* (4), 268–274. <https://doi.org/10.1007/s00249-002-0225-3>.
- (94) Gromadski, K. B.; Wieden, H.-J.; Rodnina, M. V. Kinetic Mechanism of

- Elongation Factor Ts-Catalyzed Nucleotide Exchange in Elongation Factor Tu. *Biochemistry* **2002**, *41* (1), 162–169.
- (95) Gromadski, K. B.; Schümmer, T.; Strømgaard, A.; Knudsen, C. R.; Kinzy, T. G.; Rodnina, M. V. Kinetics of the Interactions between Yeast Elongation Factors 1A and 1B $\alpha$ , Guanine Nucleotides, and Aminoacyl-TRNA. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (49), 35629–35637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707245200>.
- (96) Thanbichler, M.; Böck, A.; Goody, R. S. Kinetics of the Interaction of Translation Factor SelB from *Escherichia Coli* with Guanosine Nucleotides and Selenocysteine Insertion Sequence RNA. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (27), 20458–20466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002496200>.
- (97) Wilden, B.; Savelsbergh, A.; Rodnina, M. V.; Wintermeyer, W. Role and Timing of GTP Binding and Hydrolysis during EF-G-Dependent TRNA Translocation on the Ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (37), 13670–13675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606099103>.
- (98) Rudoni, S.; Colombo, S.; Coccetti, P.; Martegani, E. Role of Guanine Nucleotides in the Regulation of the Ras/CAMP Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1538* (2–3), 181–189.



# Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase

Axel Luviano, Roberto Cruz-Castañeda, Nuria Sánchez-Puig\*, Enrique García-Hernández\*

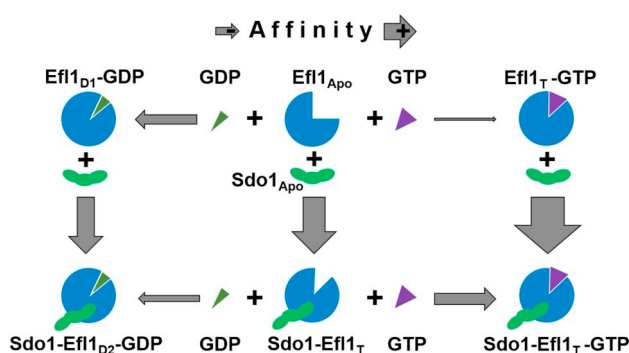
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico



## HIGHLIGHTS

- Recognition energetics of Efl1 in solution was determined by ITC.
- Sdo1 increases 70-fold the relative affinity of Efl1 for GTP over that for GDP.
- Depending on the ligand(s), Efl1 shows at least 4 evidently different conformations.
- Efl1 conformation bound to GTP and/or Sdo1 is more compact than that bound to GDP.
- Conformational landscape of Efl1 is modulated similarly to translational GTPases.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Keywords:

Efl1/EFL1  
Sdo1/SBDS  
Guanine nucleotide  
Isothermal titration calorimetry  
Conformational change  
Binding heat capacity

## ABSTRACT

One of the final maturation steps of the large ribosomal subunit requires the joint action of the elongation factor-like 1 (human EFL1, yeast Efl1) GTPase and the Shwachman-Diamond syndrome protein (human SBDS, yeast Sdo1) to release the eukaryotic translation initiation factor 6 (human eIF6, yeast Tif6) and allow the assembly of mature ribosomes. EFL1 function is driven by conformational changes. However, the nature of such conformational changes or the mechanism by which they are prompted are still largely unknown. In previous studies, it has been established that this GTPase interacts with its cofactor in solution in an inverted orientation with respect to the binding mode derived from 60S ribosome subunit cryo-EM data. To shed new light on this conundrum, we characterized calorimetrically the energetic basis describing the recognition of Efl1 to GT(D)P, Sdo1 and their intercommunication in solution. A structural-based analysis of the binding signatures indicates that Efl1 has a large structural flexibility. The mutual effects of Sdo1 and nucleotides on Efl1 modulate in a very specific and robust way the complex conformational landscape of Efl1, resembling the behavior observed with other GTPases and their cofactors.

**Abbreviations:** EFL1, human elongation factor like-1 protein; Efl1, yeast elongation factor like-1 protein; SBDS, human Shwachman-Diamond syndrome protein; Sdo1, yeast Shwachman-Diamond syndrome protein; eIF6, eukaryotic initiation factor 6; SDS, Shwachman-Diamond syndrome; ITC, isothermal titration calorimetry; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; GMPPNP, 5'-guanylyl imidodiphosphate

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [nuriasp@unam.mx](mailto:nuriasp@unam.mx) (N. Sánchez-Puig), [egarciah@unam.mx](mailto:egarciah@unam.mx) (E. García-Hernández).

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.02.003>

Received 1 January 2019; Received in revised form 31 January 2019; Accepted 6 February 2019

Available online 13 February 2019

0301-4622/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Ribosome synthesis is an intricate multistep process through which the assembly of ribosomal subunits is orchestrated by numerous accessory proteins [1–3]. In eukaryotic cells, one of the last maturation steps of the 60S subunit prior to its incorporation into fully functional ribosomes requires the release of the translation initiation factor 6 (human eIF6, yeast Tif6) [4]. This event is coordinated by the cooperative action of the elongation factor-like 1 (human EFL1, yeast Efl1) GTPase and its cofactor the Shwachman-Diamond syndrome protein (human SBDS, yeast Sdo1) [5–7]. SBDS promotes an allosteric conformational change in EFL1 that causes the steric displacement of eIF6 from the surface of the 60S subunit. Mutations that impair correct communication between SBDS and EFL1 prevent the release of eIF6, obstructing the assembly of actively translating ribosomes and leading to the progression of the human ribosomopathy known as Shwachman-Diamond syndrome (SDS) [8–10].

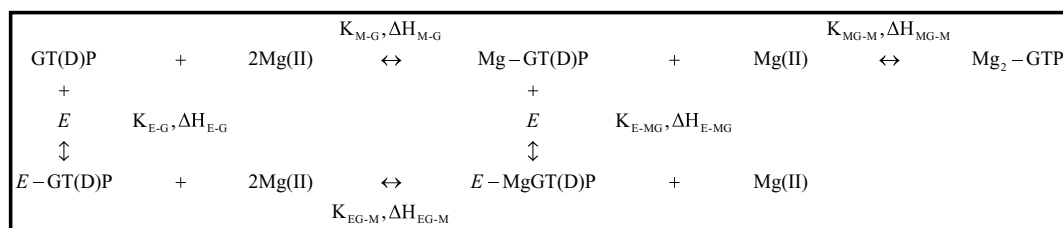
EFL1 is a large GTPase (1110 residues for the yeast orthologue) phylogenetically related to the prokaryotic ribosomal translocase EF-G and the eukaryotic elongation factor EF-2 [11]. These GTPases are organized in five structurally dissimilar domains, although the EFL1 protein family has an insertion of variable length in domain II (79 and 160 residues in the human and yeast orthologues, respectively) that is absent in EF-G or EF-2. SBDS is a relative small assembly factor (250 residues) with a highly flexible three-domain architecture [5,12,13]. A recent cryo-electron microscopy study of 60S ribosomal subunit structures complexed with SBDS-eIF6, SBDS-EFL1-eIF6 or SBDS-EFL1 has provided significant insights into the mechanism of eIF6 release through the concerted action of SBDS and EFL1 [14]. In this study, the authors propose that the last stage of ribosome maturation initiates when the eIF6-bound pre-60S subunit becomes able to interact with SBDS after recruitment of the last structural ribosomal protein uL16 and release of the nuclear export factor Nmd3 by the GTPase Lsg1. eIF6 occupies a site on the ribosome surface composed of the sarcin-ricin loop (SRL) and segments of the uL14, uL3 and eL24 proteins. SBDS binds in a region comprised by the tRNA P-site and the base of the stalk, making no contact with the anti-association factor. The region between SBDS and eIF6 corresponds to the ribosome GTPase center, which is subsequently occupied by EFL1 in a low-affinity GTP-bound state. In the SBDS-EFL1-eIF6 complex, domains III and IV of EFL1 directly interact with domains II and III of SBDS, while domains I and II of the GTPase, far away from the SBDS-EFL1 interface, contact eIF6. Upon undergoing an SBDS-dependent conformational change, EFL1 adopts a competent state in which domain I (the GTPase domain), along with the characteristic insertion loop in domain II, sterically displaces eIF6 from the ribosome. It is thought that GTP hydrolysis elicits a conformational shift that finally triggers the liberation of the GTPase and its cofactor. This mechanism not only prevents premature association of the ribosomal subunits, but also provides a final quality control point to assess the integrity of key functional 60S subunit sites, namely, the polypeptide exit tunnel, the P site, the GTPase center, the base of the P-stalk and SRL.

The above model for the last maturation step of the 60S subunit represents a milestone in understanding the molecular basis of ribosomal biogenesis, as well as in the elucidation of key determinants for the progression of SDS. Nevertheless, several aspects of the process have yet to be elucidated. For instance, other structural and genetic studies using the yeast orthologues suggest that the release of Nmd3 and Tif6 is coupled rather than sequential [15–17]. In this other model, the interaction between Tif6 and Nmd3 needs to be disrupted most probably by Efl1 for the latter to retract from the L1 stalk (uL1) and promote the release of both accessory factors in a concerted manner. Clarifying or maybe unifying these models will require further investigation. The precise timing for the recruitment of EFL1 to the ribosome has not been clarified, nor the influence of the nucleotides and/or SBDS in this process. Furthermore, the

energetics that govern the cascade of conformational events that end in the release of eIF6 has not been determined, which prevents a quantitative description of the underlying molecular forces. In addition, there is still scarce information about the cooperative effects between nucleotides and SBDS in regulating the conformational landscape of EFL1, and the mechanism that drives the eviction of these proteins from the 60S subunit.

The mechanism derived from the cryo-EM structures postulates a binding mode between SBDS and EFL1 in which the GTPase adopts an opposite orientation to that inferred from earlier studies carried out in a ribosome-free context. Calorimetric measurements of the association between Sdo1 and Efl1 and truncated constructs of these yeast orthologues prove that the insertion loop in domain II of the GTPase interacts directly with domains II-III of the cofactor [18]. An Efl1 construct deleted of its insertion loop is unable to interact with Sdo1, while the isolated loop binds to the cofactor with great affinity [18]. Further studies have established that for binding to Sdo1, it is not only this insertion in Efl1 that is important but domains I and II are also important [19]. Additionally, some SBDS missense mutations implicated in SDS that modify surface epitopes without perturbing the protein fold weaken the interaction with EFL1 in vitro [19]. These results correlate with mass spectrometry experiments showing a direct contact between residues Met<sup>435</sup> in the Efl1 insertion loop and Ser<sup>143</sup> in the Sdo1 domain II [20]. Ser<sup>143</sup> is a residue whose Leu or Trp variants are associated with SDS and result in the loss of affinity between SBDS and EFL1 in solution [21]. In contrast, the models derived from cryo-EM data pose SBDS Ser<sup>143</sup> 60 Å away from EFL1 Ala<sup>439</sup> (Efl1 Met<sup>435</sup>). Overall, the binding mode of Sdo1 and Efl1 determined from solution studies is drastically different from that proposed by cryo-EM data regarding the orientation of the GTPase. In the former, the insertion loop forms part of the protein-protein interface, while in the latter the insertion loop lies far away from that interface occupying a position where it seems to play a direct role in the displacement of eIF6. In vivo, however, yeast cells complemented with Efl1 lacking this insertion show no apparent growth defect questioning the role of this region on the release of Tif6 [14]. Furthermore, the insertion is not a conserved feature within the EFL1 protein family; for instance, it is almost inexistent in the proteins of the protists *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium sp.*, but is amongst the longest in the human and yeast orthologues.

A binding kinetic study with the yeast orthologues Sdo1 and Efl1 using fluorescent analogues of guanine nucleotides showed that Sdo1 weakens the interaction of Efl1 with GDP [21]. Therefore, it was proposed that Sdo1 acts as a guanine exchange factor (GEF) for Efl1. In this study, it was also shown that Efl1 undergoes structural rearrangements upon nucleotide binding. However, the extent and nature of these changes were not described, nor their reliance on Sdo1 and/or the nucleotide type. To further clarify the communication between Sdo1 and Efl1 off the ribosome, and the impact of this interaction on the recognition of guanine nucleotides, in this work we characterized the molecular recognition thermodynamics of Efl1 by isothermal titration calorimetry. This technique allowed a straightforward determination of the complete thermodynamic binding signatures, without the need for extrinsic reporters that might alter the interaction. In addition, by performing the measurements at different temperatures it was possible to quantify the binding heat capacity ( $\Delta C_{p,b}$ ) of the different complexes with precision. This thermodynamic function relates to the reorganization of the solvent around protein and ligand surfaces, and it is therefore an excellent reporter on the extent of the conformational changes occurring upon complex formation [22–25]. Our data revealed a complex conformational landscape of the GTPase which is finely regulated by Sdo1 and both guanine nucleotides, GTP and GDP. Importantly, the mutual effects of Sdo1 and nucleotides on Efl1 parallel the behavior observed for other GTPases and their cofactors. In view of these results, further investigation about the possible functional role of these interactions off the ribosome is clearly warranted.



**Scheme 1.** Ternary binding equilibrium between Efl1 (E), Mg(II) ions and GT(D)P. The ability of GTP to bind to two Mg(II) ions is explicitly taken into account.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Protein samples

Yeast Efl1 and Sdo1 proteins were recombinantly produced and purified as described elsewhere [26]. In brief, the Efl1 protein sequence (NP\_014236) was fused to a TEV protease cleavage site at the C-terminus followed by a 6xHis-tag and cloned into pRS426 vector [27] under the control of the *GALI/10* promoter. Recombinant protein expression was induced in *S. cerevisiae* BCY123 with galactose and purified by affinity chromatography using His-Trap-FF column (GE Healthcare), treated with TEV protease (0.05 mg/g of fusion protein), followed by a second affinity chromatography and a final size exclusion chromatography using a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE Healthcare). Final yield corresponded to 5 mg of protein/l of culture of pure recombinant Efl1 protein as determined by SDS-PAGE and MALDI-TOF spectrometry. The yeast Sdo1 coding sequence (NP\_013122) was cloned into pRSET-A vector (Invitrogen) fused to a 6xHis-tag at the N-terminus. Purification of the recombinant Sdo1 protein was done by affinity chromatography followed by ion exchange chromatography with HiTrap-SP-Sepharose FF column (GE Healthcare) to yield 10 mg of protein/l of culture. All experiments were performed with freshly purified protein.

### 2.2. Circular dichroism spectroscopy (CD)

The CD spectra of Efl1 and Sdo1 were recorded at 20 °C in the far-UV region with a JASCO J-720 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD) equipped with a PTC-348WI Peltier-type cell holder for temperature control. Protein solutions of ~0.2 mg/ml were loaded into a quartz cell of 0.1-cm length path. Each spectrum corresponds to the average of three repetitive scans and was corrected by the buffer signal. Ellipticities are reported as mean residue ellipticity,  $[\theta]_{\text{mrw}}$ . Secondary structure content was calculated from CD spectra using the deconvolution software K2D3 [28]. Thermal denaturation transitions were followed by monitoring the ellipticity signal at 208 nm, using a constant scan rate of 1 °C/min. Unfolded fractions as a function of temperature ( $f_U(T)$ ) were calculated as:

$$f_U(T) = \frac{\theta(T) - \theta_N(T)}{\theta_U(T) - \theta_N(T)} \quad (1)$$

where  $\theta(T)$ ,  $\theta_N(T)$  and  $\theta_U(T)$  are the observed, native and unfolded ellipticities, respectively.

### 2.3. Isothermal titration calorimetry (ITC)

Calorimetric measurements for the titration of Efl1 with guanine nucleotides or Sdo1 were carried out using a MicroCal™ iTC<sub>200</sub> System (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). Unless otherwise stated, all the experiments were performed in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution, pH 8.0, supplemented with 0.1 M NaCl, 125 μM DTT, and 10% glycerol. At each temperature measurement, the pH was adjusted to maintain it at a constant value of 8.0. Efl1 concentration in the cell

comprised 25–30 μM, while ligand concentrations in the syringe were: 2 mM for GTP or MgGTP, 1.0–1.5 mM for GDP or MgGDP, and 0.5–1.0 mM for Sdo1. For the titration of Efl1 with Mg(II)-bound GT(D)P, both the ligand and protein solutions contained 5 mM MgCl<sub>2</sub>. In the case of the titrations with Mg(II)-free nucleotide, ligand and protein solutions were supplemented with 2 mM EDTA to sequester any residual trace of the metal ion in the solution. The titration schedule consisted of 15–20 consecutive injections of ligand with a 5-min interval between injections, using a stirring rate of 750 rpm. The dilution heat of the ligand was obtained by adding ligand to a buffer solution under identical conditions and the same injection schedule used to that with the protein sample. All samples were degassed for 10 min prior to the experiment.

The resulting binding isotherms for the isolated GTPase obtained in presence of Mg(II) were analyzed using a ternary model in which free Efl1 (E) may bind GT(D)P or MgG(D)TP, while GTP may also be in the form of Mg<sub>2</sub>GTP (Scheme 1)

Subscripts M-G and MG-M stand for the stepwise association of two magnesium ions to the guanine nucleotide, E-G and E-MG for the association of metal-free and metal-bound guanine nucleotide to the enzyme, and EG-M for the association of Mg(II) to the nucleotide-pre-bound protein, respectively. In this coupled equilibrium of weak interactions, GT(D)P and MgGT(D)P compete with each other for the Efl1 binding site. Derivation of the coupled-equilibria model has been presented in detail elsewhere [29]. In brief, the heat involved at each step of the titration is described by:

$$\begin{aligned}
 q_i = V_0 & \left( \left( [E \cdot \text{GT(D)P}]_i - [E \cdot \text{GT(D)P}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) \right) \Delta H_{E-G} \right. \\
 & + \left( [E \cdot \text{MgGT(D)P}]_i - [E \cdot \text{MgGT(D)P}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) \right) (\Delta H_{E-MG} \\
 & + \Delta H_{M-G}) + \left( [\text{MgGT(D)P}]_i - [\text{MgGT(D)P}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) \right. \\
 & \left. - F_{\text{MgGT(D)P}} [\text{GT(D)P}]_0 \frac{v_i}{V_0} \right) (\Delta H_{M-G}) \\
 & + \left( [\text{Mg}_2\text{GTP}]_i - [\text{Mg}_2\text{GTP}]_{i-1} \left( 1 - \frac{v_i}{V_0} \right) \right. \\
 & \left. - F_{\text{Mg}_2\text{GTP}} [\text{GTP}]_0 \frac{v_i}{V_0} \right) (\Delta H_{M-G} + \Delta H_{MG-M}) \Big) + q_{\text{dil}} \quad (2)
 \end{aligned}$$

where  $q_i$  stands for the heat evolved in the  $i$ -th injection,  $V_0$  is the working volume of cell,  $v_i$  is the aliquot volume added at injection  $i$ , and  $q_{\text{dil}}$  is a fitting term introduced to account for experimentally uncorrected dilution heat effects. For GDP, the binding parameters for the second metal ion were set to zero.  $F_{\text{MgGT(D)P}}$  and  $F_{\text{Mg}_2\text{GTP}}$  correspond, respectively, to the fraction of MgGT(D)P and Mg<sub>2</sub>GTP complexes in the syringe introduced in the cell just by injection. Finally,  $[\text{GT(D)P}]_0$  stands for the GT(D)P concentration in the syringe.

The total concentration of each species in Eq. 2 is related to the concentration of the free molecular counterparts through the corresponding equilibrium constant:

$$\begin{aligned}
[GT(D)P]_T &= [GT(D)P] + K_{M-G}[GT(D)P][Mg(II)] \\
&\quad + K_{M-G}K_{MG-M}[GT(D)P][Mg(II)]^2 \\
&\quad + K_{E-G}[E][GT(D)P] + K_{E-MG}K_{M-G}[E][GT(D)P][Mg(II)] \\
[Mg(II)]_T &= [Mg(II)] + K_{M-G}[GT(D)P][Mg(II)] \\
&\quad + 2K_{M-G}K_{MG-M}[GTP][Mg(II)]^2 \\
&\quad + K_{E-G}K_{M-G}[E][GT(D)P][Mg(II)] \\
[E]_T &= [E] + K_{E-G}[E][GT(D)P] + K_{E-MG}K_{M-G}[E][GT(D)P][Mg(II)]
\end{aligned} \tag{3}$$

During fitting to this ternary model, formation parameter values  $K_{E-G}$ ,  $\Delta H_{E-G}$  for the complexes of GT(D)P with free Efl1,  $K_{M-G}$ ,  $\Delta H_{M-G}$  for MgGT(D)P and  $K_{MG-M}$ ,  $\Delta H_{MG-M}$  for Mg<sub>2</sub>GTP were kept fixed (determined in independent experiments), while  $K_{EG-M}$ ,  $\Delta H_{EG-M}$  for the interaction with MgGT(D)P were the fitting parameters. We assumed that the interaction parameters of Mg(II) with guanine nucleotides are similar to those with adenine nucleotides and therefore we used the previously reported values for the latter [29]. Binding parameters for the interaction of metal-free nucleotides with Efl1 were determined using an identical and independent binding site model [30,31] according:

$$\begin{aligned}
Q &= \frac{M_t \Delta H_{E-G} V_0}{2} \left[ 1 + \frac{L_t}{M_t} + \frac{1}{K_{E-G} M_t} \right. \\
&\quad \left. - \sqrt{\left( 1 + \frac{L_t}{M_t} + \frac{1}{K_{E-G} M_t} \right)^2 - \frac{4L_t}{M_t}} \right]
\end{aligned} \tag{4}$$

where  $Q$  is the normalized heat evolved per mol of ligand at the end of the  $i^{th}$  injection, and  $L_t$  and  $M_t$  are the total ligand and macromolecule concentration, respectively. The heat released in the  $i^{th}$  injection is:

$$q_i = Q_i + \frac{v_i(Q_i + Q_{i-1})}{2V_0} - Q_{i-1} + q_{dil} \tag{5}$$

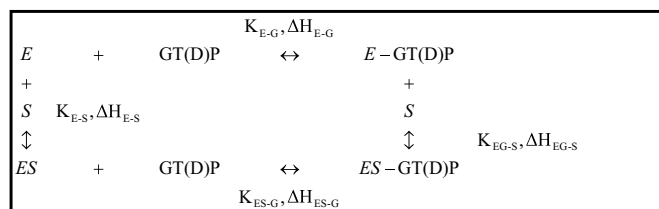
For the titration of Sdo1-bound Efl1 with Mg(II)-free GT(D)P, the underlying coupled equilibria model is described by Scheme 2, in which free and Sdo1-bound Efl1 (E and E-P, respectively) may bind the nucleotide:

Binding parameters for the interaction of Sdo1 with Efl1 ( $K_{E-S}$ ,  $\Delta H_{E-S}$ ) were determined from direct binary titration experiments, by non-linear fitting of Eqs. 4 and 5 to the normalized titration data. For the ternary interaction of Efl1, Sdo1 and nucleotide, the binding model adopted a similar form to that described by Eqs. 3 and 4. To bias the experimental setup for predominantly measuring the interaction of the complex Efl1-Sdo1 (E-S) with the nucleotide, a three-fold concentration excess of Sdo1 was used compared to that of Efl1. Considering the dissociation constant measured in this work, this results in > 99% of Efl1 bound to Sdo1 prior to addition of the nucleotide.

Finally, fitting to the experimental data included a parameter  $n$  as normalization factor to correct for errors in the quantification of protein concentration and/or to account for the presence of inactive protein fraction:

$$[E]_T = n[E]_0 \tag{6}$$

where  $[E]_0$  is the experimental concentration of Efl1.



**Scheme 2.** Ternary binding equilibrium between Efl1 (E), Sdo1 (S) and GT(D)P.

All non-linear regressions were carried using the program Origin 7.0 (OriginLab, Co., Northampton, MA) and the Affinimeter software ([www.affinimeter.com](http://www.affinimeter.com)) [32].

The heterotropic cooperativity in the binding of nucleotide and Mg (II) to Efl1 is contained in  $K_{E-MG}$  and  $\Delta H_{E-MG}$  relative to  $K_{E-G}$  and  $\Delta H_{E-G}$  values [29]:

$$\kappa = K_{E-MG}/K_{E-G} = K_{EG-M}/K_{M-G} \tag{7}$$

$$\Delta h = \Delta H_{E-MG} - \Delta H_{E-G} = \Delta H_{EG-M} - \Delta H_{M-G} \tag{8}$$

Finally, the cooperative entropy change can be calculated as:

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT \ln \kappa \tag{9}$$

Corresponding expressions apply to the heterotropic cooperativity for the binding of nucleotides and Sdo1 to Efl1.

#### 2.4. Changes in accessible surface area

The protein data bank (PDB) was surveyed for experimentally solved structures of translation GTPases in complex with guanine nucleotides. Three GTPases bound to GDP were found (EF-G PDB:1DAR [33], eEFSec PDB:5IZK [34], Hbs1 PDB:3P27 [35]), four bound to MgGDP (EF-G PDB:1FNM [36], EF-Tu PDB:1TUI [37], eIF5B PDB:4NCF and 4NCL [38]), two bound to GTP/GMPPNP (eIF5B PDB:4NCN [38] and eEF2 PDB:2E1R [39]) and two bound to MgGMPPNP (EF-Tu PDB:1EFT [40] and 1EXM [41]), and EF-Pyl PDB:3WNB [42]). Structure-based determinations of water-accessible surface areas (ASA) were performed with the NACCESS program [43], using a probe radius of 1.4 Å and a slice width of 0.25 Å. Assuming a rigid-body like association, changes in accessible surface area ( $\Delta ASA$ ) upon formation of each GTPase-nucleotide complex were estimated considering the difference between the complex and the sum of the free molecular partners. Polar ( $\Delta ASA_p$ ) and apolar ( $\Delta ASA_{ap}$ ) area changes were calculated from changes in accessibility of nitrogen plus oxygen atoms and sulfur plus carbon atoms, respectively. Magnesium and phosphate areas were considered as polar areas.

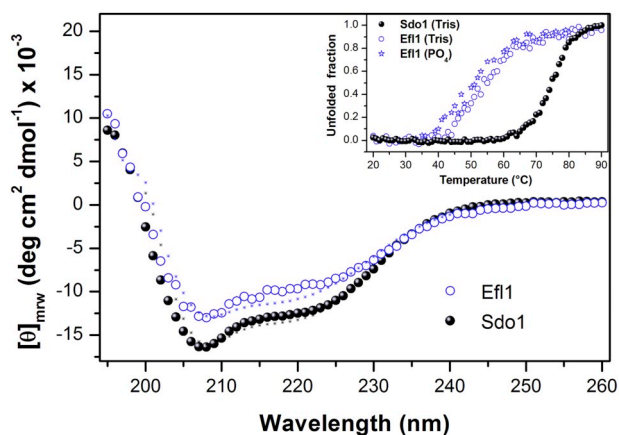
### 3. Results

#### 3.1. Thermal stability of Efl1 and Sdo1

To establish the appropriate experimental temperature interval to perform the ITC measurements, the thermal unfolding profiles of Efl1 and Sdo1 were determined by CD spectroscopy. The far-UV CD spectra of both proteins recorded at room temperature consisted of the typical signals of folded proteins (Fig. 1). Deconvolution of the CD spectra indicated fractional contents of  $\alpha$ -helix/ $\beta$ -strand conformations of 0.28/0.14 and 0.36/0.09 for Efl1 and Sdo1, respectively. These secondary structure contents are in good agreement with those observed in the cryo-EM structures of the human EFL1 (0.30/0.09) and SBDS (0.39/0.15) bound to the ribosomal 60S-subunit [14], and in the NMR structures of the isolated human SBDS [5]. The inset in Fig. 1 shows the thermal denaturation profiles. Both proteins exhibited a sharp transition, providing additional evidence that, as isolated entities, they are natively-like folded. Sdo1 was more resistant to thermal perturbation than Efl1, with an unfolding onset of  $\sim 60^\circ\text{C}$ , while that of the GTPase was  $\sim 40^\circ\text{C}$ . Since the pH of a Tris buffer solution has a significant dependence on temperature, a melting curve for Efl1 in a phosphate buffer was also recorded. In this last buffer, the unfolding onset was also  $\sim 40^\circ\text{C}$ , while the midpoint transition occurred  $\sim 4^\circ\text{C}$  below that observed in the Tris buffer. Therefore, we decided to set  $30^\circ\text{C}$  as the upper temperature limit to carry out the titration measurements.

#### 3.2. Binding energetics of Efl1 to guanine nucleotides

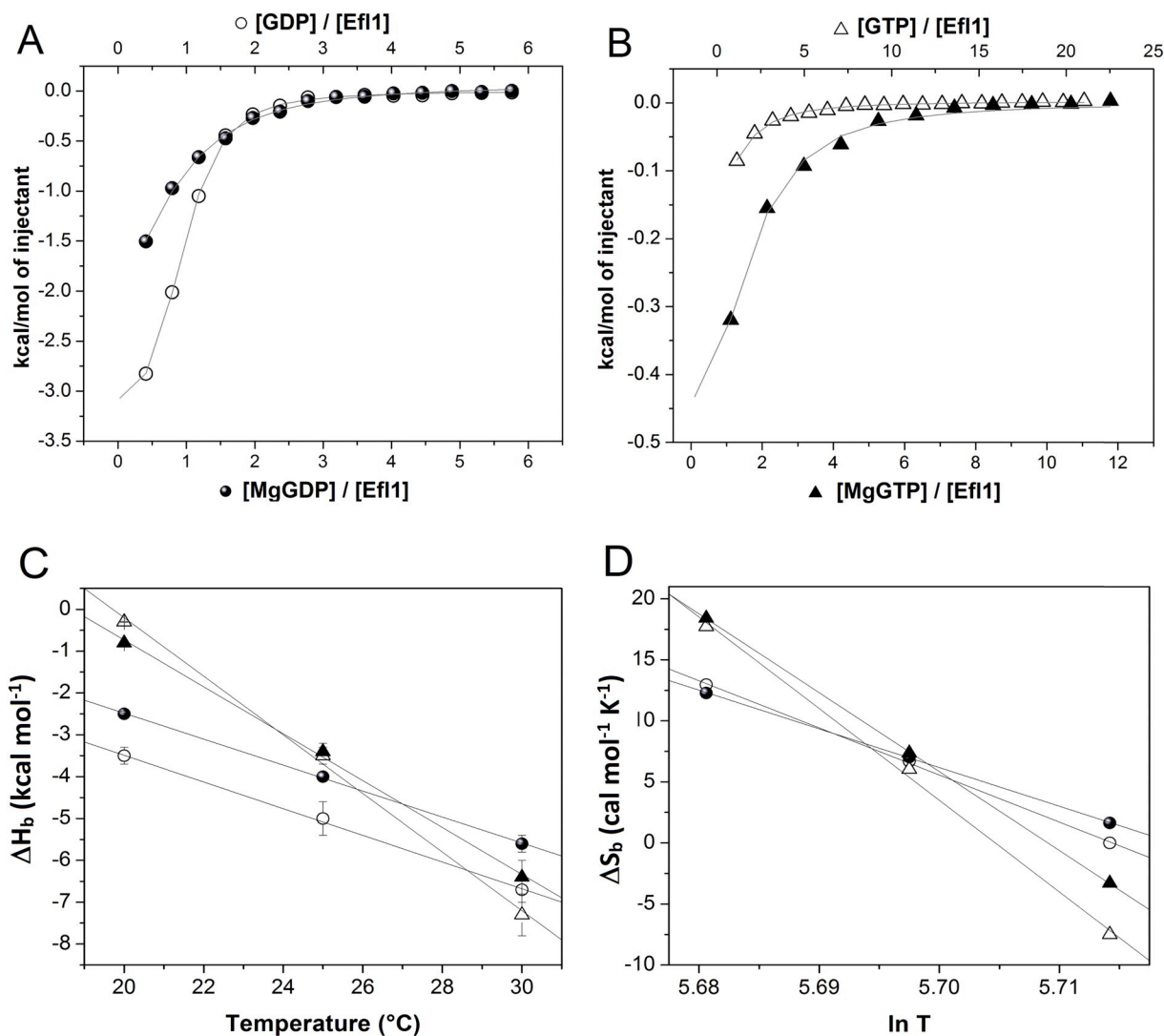
As shown in Scheme 1 for the binding of Efl1 to GT(D)P, several equilibria occur during the interaction of a protein with Mg(II)-bound



**Fig. 1.** Far-UV CD spectra of Efl1 (open symbols) and Sdo1 (solid symbols) at 20 °C. Asterisks represent the best-fitted spectra calculated using the deconvolution software K2D3. Inset: Thermal perturbation profiles determined from the change in ellipticity at 208 nm carried out in 15 mM Tris (circles) or 15 mM phosphate (stars) buffer, pH 8.

nucleotides. The simultaneous consideration of all coupled equilibria is required to obtain the actual thermodynamic values [29,44–46]. Fig. 2 shows representative examples of the calorimetric isotherms obtained for the Efl1-nucleotide complexes characterized in this work. For the interaction with metal-free GT(D)P in which a 1:1 equilibrium is established, a single binding site model was used to fit to the titration curves. In the presence of Mg(II), a model that considers the formation of all the species depicted in Scheme 1 was fitted to the data. Table 1 summarizes the values of the binding parameters as a function of temperature. Measurements carried out using buffers of different ionization enthalpy ( $\Delta H_{\text{ion}}$  [47]) yielded the same binding enthalpy (within the experimental uncertainty), indicating that there is no binding-linked protonation event (Fig. 3).

The binding parameters for both nucleotides to isolated Efl1 exhibited a significant dependence on temperature. At 30 °C, the MgGDP affinity was three times larger than that for MgGTP. Although five times smaller, this affinity difference is consistent with that reported by García-Márquez et al. [21] for fluorescent mant-nucleotide derivatives at 28 °C. The affinity variation between the two nucleotides was due to small differences in the enthalpic and entropic contributions. Compared to the diphosphate, the triphosphate showed a larger favorable binding enthalpy ( $\sim 1$  kcal mol $^{-1}$ ) that was outweighed by a less favorable

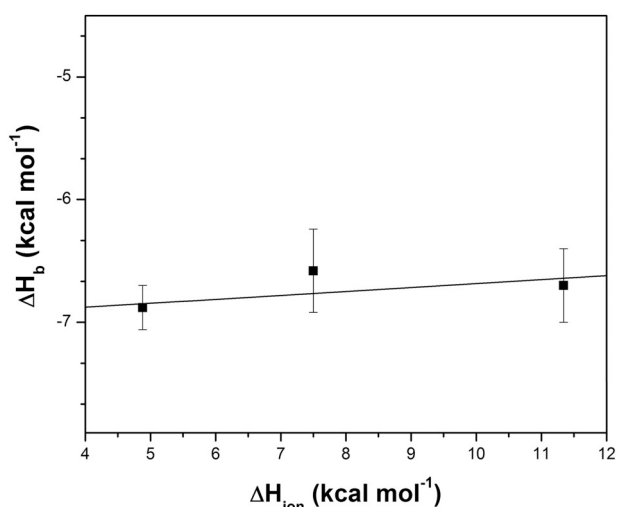


**Fig. 2.** Calorimetric characterization of the binding of Efl1 to GDP (○), MgGDP (●), GTP (△) and MgGTP (▲). Binding isotherms with (A) GDP/MgGDP and (B) GTP/MgGTP at 20 °C. Binding enthalpy (C) and entropy (D) as a function of temperature. Dashed lines correspond to the least squares linear fittings for describing the thermal dependence of  $\Delta H_b$  or  $\Delta S_b$ , i.e., assuming that  $\Delta C_p$  is constant in the temperature range spanned.



**Table 1**  
Thermodynamic parameters for the binding of Efl1 to guanine nucleotides determined by ITC.

Ligand	T (°C)	n	$K_b$ (mM <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$\Delta G_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$-\Delta S_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta C_{p_b}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
GDP	20	0.90 ± 0.05	272 ± 11	4 ± 0.2	-7.3	-3.5 ± 0.2	-3.8	
	25	0.94 ± 0.02	141 ± 12	7 ± 0.5	-7.0	-5.0 ± 0.4	-2.0	-318 ± 35
	30	0.91 ± 0.02	64 ± 9	16 ± 2.2	-6.7	-6.7 ± 0.3	0.0	
MgGDP	20	0.95 ± 0.05	34 ± 2	29 ± 1.7	-6.1	-2.5 ± 0.1	-3.6	
	25	0.91 ± 0.02	32 ± 3	31 ± 2.9	-6.1	-4.0 ± 0.1	-2.1	-310 ± 5
	30	0.92 ± 0.02	27 ± 3	37 ± 4.1	-6.1	-5.6 ± 0.2	-0.5	
GTP	20	1.10 ± 0.08	12 ± 0.9	83 ± 6.2	-5.5	-0.3 ± 0.0	-5.2	
	25	1.01 ± 0.05	8 ± 0.7	125 ± 11	-5.3	-3.5 ± 0.3	-1.8	-700 ± 34
	30	1.02 ± 0.05	4 ± 0.3	250 ± 19	-5.0	-7.3 ± 0.3	2.3	
MgGTP	20	1.20 ± 0.08	45 ± 5	22 ± 2.4	-6.2	-0.8 ± 0.0	-5.4	
	25	1.11 ± 0.02	15 ± 2	66 ± 8.8	-5.7	-3.4 ± 0.0	-2.3	-560 ± 23
	30	1.09 ± 0.02	8 ± 0.7	125 ± 11	-5.4	-6.4 ± 0.4	1.0	



**Fig. 3.** Binding enthalpy as a function of the ionization enthalpy of the buffer. Independent titrations of Efl1 with GDP were performed using 0.05 M HEPES ( $\Delta H_{ion} = 4.88$  kcal mol<sup>-1</sup>), 0.05 M Tricine ( $\Delta H_{ion} = 7.5$  kcal mol<sup>-1</sup>) or 0.05 M Tris ( $\Delta H_{ion} = 11.34$  kcal mol<sup>-1</sup>), pH 8.0, 30 °C. A linear regression analysis (solid line) yielded a net exchange of  $0.03 \pm 0.05$  protons.

binding entropy ( $\sim 1.5$  kcal mol<sup>-1</sup>). The greater thermal dependence shown by MgGTP resulted on the binding being both enthalpically and entropically driven at 20 °C to be only enthalpically driven at 30 °C. Interaction with MgGDP had a smaller dependence on temperature, and as a consequence, the binding strengths of the two nucleotides varied distinctively with temperature, with that of MgGTP being somewhat stronger at 20 °C.

The mutual effect of nucleotides and Mg(II) on the binding to Efl1 is contained in the magnitude of the cooperative heterotropic association constant ( $\kappa$ ), which is defined by the ratio of the metal-bound to the metal-free nucleotide binding constants (Eqs. 7–9, Table 2). Magnesium ion increased the affinity of Efl1 for GTP although this effect was weakened as the temperature increased ( $\kappa(20\text{ °C}) = 3.8$ ,  $\kappa(30\text{ °C}) = 2$ ). Likewise, a positive heterotropic effect between  $Mg^{2+}$  and GTP has been observed for the translational GTPase eRF3 bound to its GEF

**Table 2**  
Thermodynamic cooperativity parameters for the heterotropic interaction between Mg(II) and guanine nucleotides to Efl1.

Receptor	Ligand	T (°C)	$\kappa$	$\Delta g$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta h$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$-\Delta s$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
Efl1	GDP	20	0.1	1.2	1.0	0.2
		25	0.2	0.9	1.0	-0.1
		30	0.4	0.6	1.1	-0.5
	GTP	20	3.8	-0.7	-0.5	-0.2
		25	1.9	-0.4	0.1	-0.5
		30	2	-0.4	0.9	-1.3

protein eRF1 ( $\kappa(25\text{ °C}) = 5.5$ ) [48]. On the contrary, the presence of the metal ion destabilized the interaction with GDP as shown for  $\kappa$  values smaller than 1, which increased with temperature ( $\kappa(20\text{ °C}) = 0.1$ ,  $\kappa(30\text{ °C}) = 0.4$ ). This behavior parallels the thermal trend observed previously for the translational GTPase eIF5B ( $\kappa(5\text{ °C}) = 0.3$ ,  $\kappa(25\text{ °C}) = 0.5$ ) [38] and the single temperature determination for eRF3 ( $\kappa(25\text{ °C}) = 0.6$ ) [48]. Thus, all these data indicate that the  $\gamma$ -phosphate moiety is required to fulfill Mg(II) coordination at the active site of Efl1 and other translational GTPases. Nevertheless, it is noteworthy that the stronger heterotropic interaction with the trinucleotide comes mainly from a more favorable entropy, which indicates that distinct desolvation effects and/or changes in the conformational flexibility of Efl1 also play a determining role in the interaction affinity.

Assuming a linear dependence of  $\Delta H_b$ , data in Fig. 2C yielded heat capacity changes ( $\Delta C_{p_b}$ ) of  $-310 \pm 5$  and  $-560 \pm 23$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> for the binding of Efl1 to MgGDP and MgGTP, respectively. Similar changes were obtained for the corresponding metal-free nucleotides ( $-318 \pm 35$  and  $-700 \pm 34$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> for GDP and GTP, respectively). Consistently, analysis of the binding entropies (Fig. 2D) yielded similar  $\Delta C_{p_b}$  values to those obtained from analysis of the binding enthalpies:  $-385 \pm 35$  (GDP),  $-316 \pm 3$  (MgGDP),  $-750 \pm 35$  (GTP) and  $-645 \pm 4$  (MgGTP) cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

In protein-ligand interactions, as well as in protein folding events, heat capacity changes are largely determined by the rearrangement of the solvent around the solutes, i.e., the extent of solvation/desolvation of the interacting surfaces [22–25,49,50]. A negative  $\Delta C_{p_b}$  magnitude indicates that the burial of apolar surface areas ( $\Delta ASA_{ap}$ ) exceeds the positive contribution arising from the burial of polar surface areas ( $\Delta ASA_p$ ). According to simple parametric models [22],  $\Delta C_{p_b}$  scales linearly with  $\Delta ASA_{ap}$  and  $\Delta ASA_p$ :

$$\Delta C_{p_b} = \alpha \Delta ASA_{ap} + \beta \Delta ASA_p \quad (10)$$

Furthermore,  $\Delta C_{p_b}$  can be phenomenologically dissected into two contributions, one related to the conformational changes undergone by the interacting molecules ( $\Delta C_{p_b}^{conf}$ ) and the other associated with the amount of hidden area at the binding interface [51]. This last contribution would correspond to the observed change if the binding occurred as a rigid-body like association ( $\Delta C_{p_b}^{rb}$ ):

$$\Delta C_p_b = \Delta C_p^{\text{conf}} + \Delta C_p^{\text{rb}} \quad (11)$$

Estimation of  $\Delta C_p^{\text{rb}}$  can be achieved by analyzing the 3D structure of the complex involved and modeling the free molecules as if they adopted the same conformation as that observed in the complex. Since the cryo-EM structures of Efl1 bound to the ribosomal 60S subunit are of low resolution ( $> 8 \text{ \AA}$ ), it was not possible to locate the nucleotide in the active site of the GTPase [14]. To estimate the area buried at a GTPase-nucleotide interface, we surveyed the PDB for high-resolution structures of nucleotide-bound translational GTPases. As detailed in the Materials and Methods section, three GTPases with GDP, four with MgGDP, two with GTP/GMPPNP and two with MgGMPPNP were found. For each nucleotide type, the average  $\Delta ASA_p$  and  $\Delta ASA_{ap}$  was calculated. The non-hydrolyzable substrate analogue GMPPNP was considered equivalent to GTP. The average  $\Delta C_p^{\text{rb}}$  for each nucleotide type was estimated from Eq. 10 using the aforementioned  $\Delta ASA$  values and the Murphy & Freire parameters  $\alpha = 0.45$  and  $\beta = -0.26 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  [22]. Clearly,  $\Delta C_p^{\text{rb}}$  represents only a small portion of the total heat capacity binding change measured for the Efl1 complexes (Table 3, 4th column).  $\Delta C_p_b$  and  $\Delta C_p^{\text{rb}}$  were used to calculate  $\Delta C_p^{\text{conf}}$  (Table 3, 5th column, Eq. (11)). In turn,  $\Delta C_p^{\text{conf}}$  relates to the total area change ( $\Delta ASA_t$ ):

$$\Delta C_p^{\text{conf}} = 0.45 f_{ap} \Delta ASA_t - 0.26(1 - f_{ap}) \Delta ASA_t \quad (12)$$

where  $f_{ap}$  represents the average hydrophobicity index ( $f_{ap} = 0.68$ ) seen at protein-protein interfaces (Table 3, 6th column) [52–54]. Finally, assuming that each residue buries on average  $47 \text{ \AA}^2$  of surface area [54], the number of residues ( $N_{res}$ ) sequestered from the solvent by protein conformational rearrangements was calculated (Table 3, 7th column).

The deconvolution of the  $\Delta C_p_b$  values revealed that upon GDP/MgGDP binding, Efl1 undergoes a conformational change accompanied by the burial of  $\sim 1200 \text{ \AA}^2$  of surface area ( $\sim 28$  residues). GTP/MgGTP binding elicited a larger conformational change involving the burial of  $\sim 3100 \text{ \AA}^2$  of surface area ( $\sim 66$  residues).

Since Efl1 has a very flexible structure, the possibility cannot be ruled out that a substantial fraction of the binding heat capacity arises from large changes in the conformational fluctuations of the GTPase (e.g., by “stiffening” of the protein structure) upon binding [55–57]. Therefore, the binding entropy was also analyzed as an alternative way to infer the extent of the conformational changes undergone by Efl1.  $\Delta S_b$  can be dissected into three main components [58]:

$$\Delta S_b = \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{r-t} \quad (13)$$

The solvation entropy ( $\Delta S_{\text{solv}}$ ) results from changes in the degrees of freedom of the solvent molecules released from the interacting surfaces and can be calculated as follows:

$$\Delta S_{\text{solv}} = \Delta C_p_b (\ln(T/T_s)) \quad (14)$$

$T_s$  is a reference temperature ( $T = 112 \text{ }^\circ\text{C}$ ) where solvation effects do not contribute to the overall binding entropy [58].  $\Delta S_{r-t}$  contains the loss of overall degrees of rotation and translation, and has been estimated as  $\sim -8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  for a bimolecular association [58,59]. Accordingly, using this value and Eq. 14 (Table 3, 9th column), the

conformational entropy ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ) was estimated from Eq. 13 (Table 3, 10th column). In turn, the number of rotatable bonds that become frozen upon complex formation ( $N_{\text{rotb}}$ ) was estimated assuming an average entropy decrease of  $-2$  e.u. per bond [60], i.e.,  $N_{\text{rotb}} = -\Delta S_{\text{conf}}/2$  (Table 3, 11th column). As shown in Table 3, the  $N_{\text{rotb}}$  values for the GTP complexes are twice higher than those involved in the formation of GDP complexes, a result that is in good agreement with the deconvolution analysis of the  $\Delta C_p_b$  values.

### 3.3. Energetic effects of Sdo1 in the interaction of Efl1 with guanine nucleotides

It has been reported that Sdo1 modifies the interaction strength of Efl1 with guanine nucleotides [21]. To solve the coupled equilibria that occur in the presence of Sdo1 (Scheme 2), the protein-protein interaction was first measured by titrating Efl1 with Sdo1 (Fig. 4A). The interaction was enthalpically driven showing a favorable entropy component at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  and an unfavorable one at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Table 4). The binding parameters obtained here are in good agreement with those determined also calorimetrically by Asano et al. ( $\Delta G_b = -9.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta H_b = -14.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $T\Delta S_b = -4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [18]. Analysis of the thermal dependence of  $\Delta H_b$  ( $\Delta S_b$ ) yielded a  $\Delta C_p_b$  value of  $-860 \pm 31$  ( $-786 \pm 12$ )  $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (Fig. 4), which, according to Eqs. 10 and 12, is consistent with the burial of  $\sim 4000 \text{ \AA}^2$  (or  $\sim 80$  residues). Given that the structure of the isolated Sdo1-Efl1 complex has not yet been solved, it is not possible to discern whether this overall change corresponds only to the direct protein-protein contact, or also to significant conformational changes of the molecular partners.

In another series of experiments, the pre-formed Efl1-Sdo1 complex was titrated with guanine nucleotides (Fig. 4B). These results together with those obtained for the interaction of Efl1 with nucleotides allowed the determination of the complete coupled equilibria depicted in Scheme 2. The binding of Sdo1 to Efl1 exerted disparate effects on the affinity for the nucleotides (Table 4). At  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , the affinity of Sdo1-bound Efl1 for GDP decreased three times in relation to the isolated Efl1 because of an unfavorable entropy component. By contrast, Sdo1 increased the affinity of Efl1 for GTP by a factor of  $\sim 20$  with a more favorable entropy change despite a larger enthalpic penalty. Therefore, Sdo1 improved the relative affinity of Efl1 for GTP over that for GDP by a factor of  $\sim 70$ . Because of the distinct temperature dependences on nucleotide binding, a smaller improvement ( $\sim 30$  times) was observed at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Reciprocally, GDP weakened the interaction of Sdo1 and Efl1, while GTP increased the affinity between the two proteins (Fig. 5). Noteworthy, the association of GTP to the preformed Efl1-Sdo1 complex was accompanied by far smaller  $\Delta C_p_b$  and  $\Delta H_b$  values than those observed for the isolated GTPase. Energetic-based calculations indicated that only 8 residues became buried upon docking of GTP on the protein binary complex (Table 3). Accordingly, Sdo1 seems to pre-induce a conformational change in Efl1 that makes binding to GTP an event in which the net changes in  $\Delta ASA$  and the number of free rotatable bonds are significantly reduced in relation to the changes observed for the isolated Efl1. Because of reciprocal effects (Fig. 5), a similar behavior is observed in the comparison of Efl1 binding to Sdo1 in the presence versus the absence of GTP ( $\Delta \Delta C_p_b = 610 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

**Table 3**  
Energetic-based calculations of the conformational changes of Efl1 or Sdo1-Efl1 upon nucleotide binding<sup>a</sup>.

Receptor	Ligand	$\Delta C_p_b$	$\Delta C_p_{rb}$	$\Delta C_p^{\text{conf}}$	$-\Delta ASA_t$	$N_{res}$	$\Delta S_b$	$\Delta S_{\text{solv}}$	$\Delta S_{\text{conf}}$	$N_{\text{rotb}}$
Efl1	GDP	-318	-30	-288	1293	28	7	81	-67	33
	MgGDP	-310	-48	-262	1176	25	7	79	-64	32
	GTP	-700	-11	-689	3092	66	6	179	-165	82
	MgGTP	-560	-25	-535	2401	51	7	143	-128	64
Efl1-Sdo1	GDP	-640	-30	-610	2738	58	7	164	-149	74
	GTP	-90	-11	-79	355	8	18	23	3	1

<sup>a</sup> Units for  $\Delta C_p$  and  $\Delta S$  correspond to  $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  and for  $\Delta ASA$  to  $\text{\AA}^2$ .

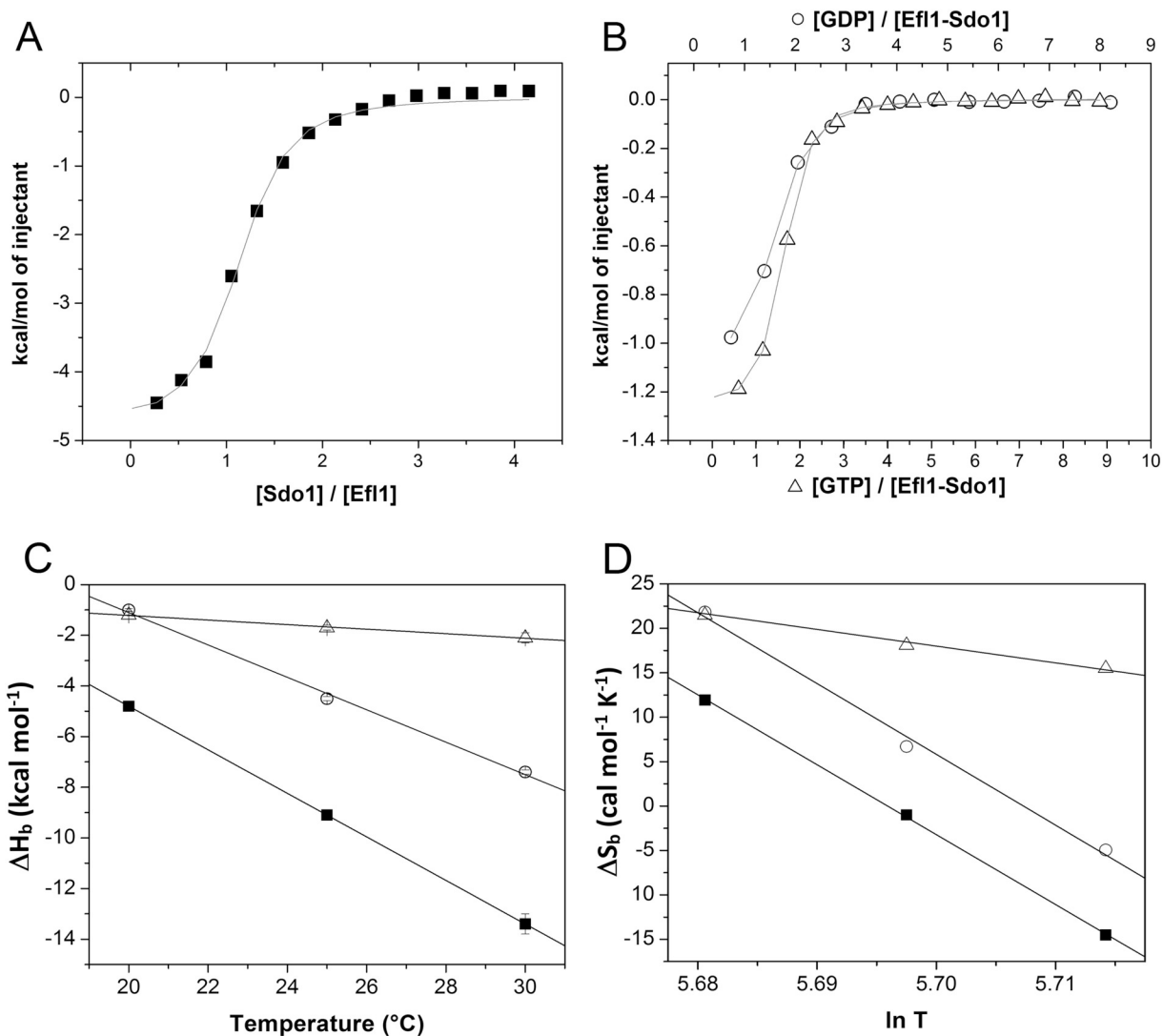


Fig. 4. Calorimetric characterization of the binding of Efl1 to Sdo1 (■), and the complex Sdo1-Efl1 to GDP (○) or GTP (Δ). (A-B) Binding isotherms at 20 °C. (C-D) Binding enthalpy and entropy as a function of temperature. Dashed lines correspond to the least-squares linear fittings describing the thermal dependence of  $\Delta H_b$  or  $\Delta S_b$ .

Table 4

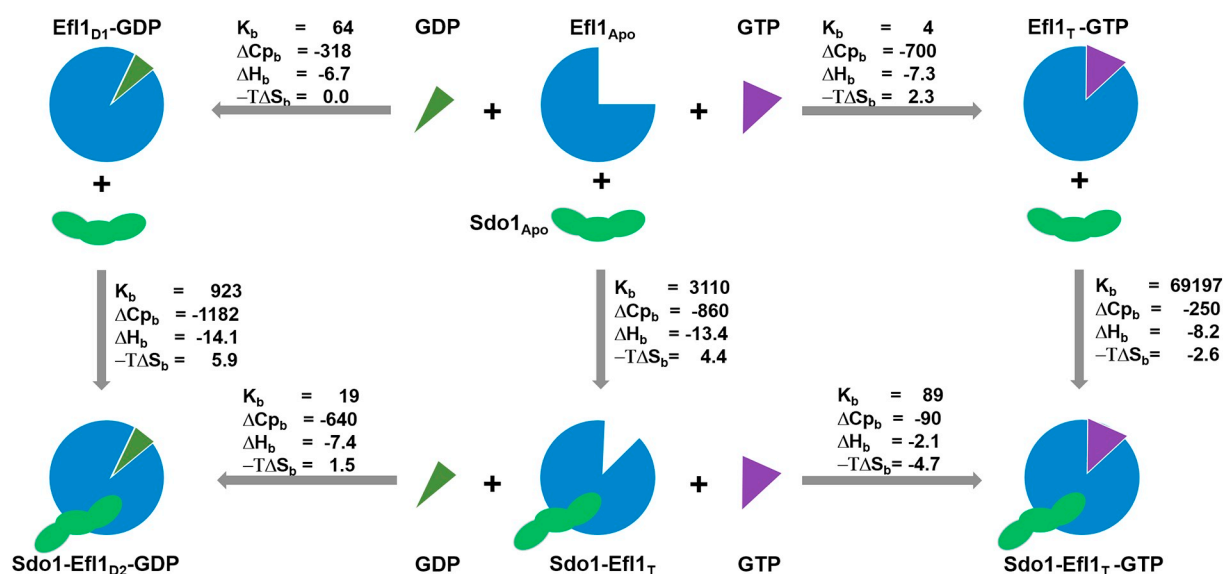
Thermodynamic parameters for the ternary binding system formed between Efl1, Sdo1 and guanine nucleotides determined by ITC.

Receptor	Ligand	T (°C)	n	$K_b$ (mM <sup>-1</sup> )	$K_d$ (μM)	$\Delta G_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S_b$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta C_{p_b}$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
Efl1	Sdo1	20	1.07 ± 0.02	1580 ± 280	0.6 ± 0.0	-8.3	-4.8 ± 0.1	-3.5	
		25	0.87 ± 0.02	3200 ± 650	0.3 ± 0.0	-8.8	-9.1 ± 0.2	0.3	-860 ± 31
		30	0.87 ± 0.05	3110 ± 630	0.3 ± 0.0	-9.0	-13.4 ± 0.4	4.4	
Sdo1-Efl1	GDP	20	1.30 ± 0.02	330 ± 38	3 ± 1	-7.4	-1.0 ± 0.1	-6.4	
		25	0.93 ± 0.03	62 ± 3	16 ±	-6.5	-4.5 ± 0.0	-2.0	-640 ± 34
		30	1.01 ± 0.00	19 ± 1	52 ± 1	-5.9	-7.4 ± 0.0	1.5	
	GTP	20	1.03 ± 0.00	481 ± 27	2 ± 0	-7.6	-1.2 ± 0.0	-6.4	
		25	1.10 ± 0.02	166 ± 13	6 ± 1	-7.1	-1.7 ± 0.1	-5.4	-90 ± 5
		30	1.03 ± 0.00	89 ± 12	11 ± 1	-6.8	-2.1 ± 0.2	-4.7	

This picture is consistent with the cooperativity parameter values, which indicate that the effect of Sdo1 at favoring the interaction of Efl1 with GTP is of entropic origin (Table 5). On the contrary, the associated  $\Delta C_{p_b}$  value of GDP binding to Efl1 was twice larger in the presence than in the absence of Sdo1 (Table 4). Similarly, Sdo1 binding to the Efl1-GDP complex was accompanied by a larger heat capacity decrease ( $\Delta\Delta C_{p_b} = -322$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), which indicates the additional burial of 31 residues in relation to the binding to the isolated enzyme.

#### 4. Discussion

Nucleotide-dependent conformational changes play a central role in the regulation and function of GTPases [61–63]. As a general rule, these enzymes adopt a more compact conformation in complex with GTP (the so-called T form) than that with GDP (the so-called D form) [64–67]. According to the extent of the structural rearrangements inferred from the analysis of the binding heat capacities and entropies, Efl1 parallels



**Fig. 5.** Energetics of the coupled equilibria between Efl1, Sdo1 and guanine nucleotides. The analysis of the binding parameters indicates that Efl1 exhibits a significant structural plasticity adopting at least four different conformational states: the apo form of the enzyme (Efl1<sub>Apo</sub>), a T-like conformation interacting with GTP and/or Sdo1 (Efl1<sub>T</sub>), a D-like conformation bound to GDP alone (Efl1<sub>D1</sub>), which undergoes a large conformational change upon binding to Sdo1 (Efl1<sub>D2</sub>). Units:  $K_b$  in  $\text{mM}^{-1}$ ,  $\Delta H_b$  and  $-T\Delta S_b$  in  $\text{kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta C_p_b$  in  $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

**Table 5**

Thermodynamic cooperativity parameters for the heterotropic interaction of Efl1 to Sdo1 and guanine nucleotides.

Receptor	Ligand	Temperature °C	$\kappa$	$\Delta g$ $\text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta h$ $\text{kcal mol}^{-1}$	$-T\Delta s$ $\text{kcal mol}^{-1}$
Efl1-Sdo1	GDP	20	1.2	-0.1	2.5	-2.6
		25	0.4	0.5	0.5	0.0
		30	0.3	0.8	-0.7	1.5
	GTP	20	40.1	-2.1	2.1	-1.2
		25	20.8	-1.8	1.8	-3.6
		30	22.3	-1.8	5.2	-7.0

this behavior by burying 51–66 residues when bound to GTP versus 25–28 when interacting with GDP. It is plausible that in analogy to other GTPases, the conformational changes that lead to the burial of those residues are mainly associated with the restructuring of switches 1 and 2 in the G domain [61]. The heterotropic cooperative parameters indicate that Mg(II) modifies slightly GT(D)P binding to Efl1, showing the same trends observed in translational GTPases. Binding of GTP to the pre-formed Sdo1-Efl1 complex involves the burial of a small number of residues suggesting a rigid-body like association. Therefore, it seems that Sdo1 brings Efl1 to adopt a T-like conformation, with the concomitant affinity gain for the guanine trinucleotide. In contrast, the binding of GDP to the Sdo1-Efl1 complex is accompanied by a large decrease in heat capacity, indicating that Efl1 and/or Sdo1 in the GDP complex adopt a significantly different and less stable conformational state in relation to the Sdo1-Efl1-GTP complex. Overall, the present analysis suggests that Efl1 off the ribosome can adopt at least four clearly differentiable conformational states, namely, 1) the apo form, 2) a T-like conformation that can be achieved by the interaction with GTP (Efl1<sub>T</sub>-GTP), with Sdo1 (Sdo1-Efl1<sub>T</sub>) or with both molecules (Sdo1-Efl1<sub>T</sub>-GTP), 3) a D-like conformation in presence of GDP alone (Efl1<sub>D1</sub>-GDP), and 4) a different D-like conformation induced by the simultaneous effect of Sdo1 and GDP (Sdo1-Efl1<sub>D2</sub>-GDP) (Fig. 5). Therefore, Efl1 exhibits a larger conformational plasticity compared to the classical GTPases whose GTP- and GDP-bound structures are distinct and correspond to their active and inactive forms.

To what extent the large conformational plasticity exhibited by Efl1 in solution and the binding modes of this GTPase with Sdo1 and nucleotides is transferable to the ribosomal context is a question still to be answered. The available cryo-EM models establish a binding mode on

the ribosome in which domains II-III of SBDS interact directly with domains III-IV of EFL1, while the insertion loop within domain II of the GTPase is far away from the cofactor [14]. This binding posture locates the SDS-related residue Sdo1 Ser<sup>143</sup> far away from the Sdo1-Efl1 interface. In contrast, the binding mode derived from interaction data in a ribosome-free context establishes that Efl1 interacts with Sdo1 in an inverted orientation with respect to the complex on the ribosome, making direct contact with the cofactor through the insertion loop [18,20] with Ser<sup>143</sup> positioned within the Sdo1-Efl1 interface. The calorimetric results presented herein clearly indicate that the interaction of Efl1 with GT(D)P and Mg(II) remarkably resembles that observed for other GTPases, and that Sdo1 behaves as an accessory factor that induces classical energetic and structural effects that favor the interaction of the GTPase with the trinucleotide and weaken the interaction with the dinucleotide. In view of these characteristic effects, it is difficult to conclude that the interaction of Sdo1 and Efl1 off the ribosome is fortuitous.

The proposed main role of SBDS/Sdo1 is to facilitate a conformational transition in EFL1/Efl1 that sterically displaces eIF6/Tif6 from the ribosomal subunit [14]. However, on the basis of the biochemical data available, other conceivable functions for this cofactor could be invoked. For instance, titration experiments have shown that EFL1 can bind mature 60S subunits independently of SBDS, suggesting that the cofactor does not play a significant role as a recruiter of the GTPase to the ribosomal subunit [5]. There is no experimental evidence describing the binding events to the isolated 60S subunit and it is not clear whether EFL1 and SBDS bind as heterodimer or the binding hierarchy of the isolated proteins. If EFL1 emulates the behavior of EF-G/EF-2 and other translation GTPases [68], it would be expected to adopt a T-like

conformation to interact with the ribosomal subunit. Accordingly, our calorimetric analysis clearly shows that the Efl1 T-like conformation is largely stabilized by Sdo1. Furthermore, since Efl1 and its cofactor are cytoplasmic proteins that interact to each other in presence of GTP with low nanomolar affinity (Fig. 5), they may bind to the 60S subunit as a heterodimer. It has been proposed that eviction of eIF6 precedes the release of SBDS and EFL1 that is necessary to produce fully mature 60S subunits [14]. Presumably, this release is associated with a conformational change driven by GTP hydrolysis, which decreases the affinity of the SBDS-EFL1 binomial for the ribosomal subunit. Consistent with this scenario, our data revealed that the conformations of the Sdo1-Efl1<sub>D2</sub>-GDP and Sdo1-Efl1<sub>T</sub>-GTP complexes differ significantly from each other. Therefore, the large conformational transition from Sdo1-Efl1<sub>T</sub>-GTP to Sdo1-Efl1<sub>D2</sub>-GDP triggered by GTP hydrolysis could facilitate the subsequent release of the assembly factors.

In a previous study, it was proposed that Sdo1 acts as a GDP exchange factor or GEF for Efl1 [21,69]. Consistently, the results obtained herein indicate that Sdo1 significantly increases Efl1's affinity for GTP over GDP; an effect elicited by simultaneously decreasing the affinity for GDP and increasing that for GTP. However, when compared to the behavior observed for other GTPases that are strongly dependent on the GEF partner to displace GDP [70–72], it seems that the role of Sdo1 as an exchange factor is marginal in kinetic terms. In fact, Efl1 exchanges nucleotides at a rate comparable to that of GTPases that do not require a GEF partner [73,74]. Nevertheless, it is worth noting that the dissociation constants of Efl1-nucleotide complexes are within the low-to-medium micromolar ranges, which in turn are close to the concentrations of GDP and GTP observed in vivo. In exponentially growing cells, the *S. cerevisiae* intracellular concentrations of GTP and GDP are ~200 and ~50 μM, respectively [75]. Under this condition, the interaction of Sdo1 with Efl1 would favor the GTP-bound form of the enzyme by a factor of 18 over the apo or GDP-bound forms. Conversely, the apo, GTP-bound and GDP-bound Efl1 forms would coexist in the cytoplasm almost equimolarly in the absence of Sdo1. If this GTPase, as exhibited by other related GTPases, needs to be preloaded with GTP to interact with the 60S subunit, Sdo1 could modulate the relative populations of the Efl1 forms and, as a consequence, affect the final incorporation rate of the 60S subunits into the pool of active ribosomes.

In conclusion, the structural and energetic effects elicited by Sdo1 and guanine nucleotides modulate in a very specific and robust way the complex conformational landscape of Efl1 in solution, certainly recalling the behavior of other GTPases. Clearly, the drastically different binding modes inferred for the interaction of Sdo1/SBDS and Efl1/EFL1 on and off the ribosome pose a significant conundrum. In particular, this is because the GTP-bound conformation of Efl1 (required for the binding of the GTPase on the 60S subunit surface) is largely stabilized by isolated Sdo1. Further research is clearly warranted in order to reconcile the GTPase-cofactor binding modes determined from the solution and cryo-EM data.

## Acknowledgements

Axel Luviano is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship No. 269390 from CONACyT. We thank Dr. Patricia Cano-Sánchez, Q. Rocío Patiño Maya and Dr. Guillermo Salcedo for the technical support in the production of the recombinant proteins, CD and calorimetric measurements, respectively. This work was financed in part by DGAPA, UNAM [PAPIIT IN205018] and CONACyT [Grants 235831, 283909].

## References

- [1] J. de la Cruz, K. Karbstein, J.L. Woolford, Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo, *Annu. Rev. Biochem.* 84 (2015) 93–129, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033917>.
- [2] S. Gerhardy, A.M. Menet, C. Peña, J.J. Petkowski, V.G. Panse, Assembly and nuclear export of pre-ribosomal particles in budding yeast, *Chromosoma* 123 (2014) 327–344, <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0463-z>.
- [3] P. Nerurkar, M. Altwater, S. Gerhardy, S. Schütz, U. Fischer, C. Weirich, V.G. Panse, Eukaryotic ribosome assembly and nuclear export, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* (2015) 107–140 (doi:10.1016/bs.ircmb.2015.07.002).
- [4] M. Ceci, C. Gaviraghi, C. Gorrini, L.A. Sala, N. Offenhäuser, P. Carlo Marchisio, S. Biffo, Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly, *Nature* 426 (2003) 579–584, <https://doi.org/10.1038/nature02160>.
- [5] A.J. Finch, C. Hilcenko, N. Basse, L.F. Drynan, B. Goyenechea, T.F. Menne, A. González Fernández, P. Simpson, C.S. D'Santos, M.J. Arends, J. Donadieu, C. Bellanné-Chantelot, M. Costanzo, C. Boone, A.N. McKenzie, S.M.V. Freund, A.J. Warren, Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome, *Genes Dev.* 25 (2011) 917–929 (doi:10.1101/gad.623011).
- [6] T.F. Menne, B. Goyenechea, N. Sánchez-Puig, C.C. Wong, L.M. Tonkin, P.J. Ancliff, R.L. Brost, M. Costanzo, C. Boone, A.J. Warren, The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast, *Nat. Genet.* 39 (2007) 486–495, <https://doi.org/10.1038/ng1994>.
- [7] A.J. Warren, Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome, *Adv. Biol. Regul.* 67 (2018) 109–127, <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.09.002>.
- [8] G.R.B. Boocock, J.A. Morrison, M. Popovic, N. Richards, L. Ellis, P.R. Durie, J.M. Rommens, Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome, *Nat. Genet.* 33 (2003) 97–101, <https://doi.org/10.1038/ng1062>.
- [9] P. Stepensky, M. Chacón-Flores, K.H. Kim, O. Abuzaitoun, A. Bautista-Santos, N. Simanovsky, D. Siliqi, D. Altamura, A. Méndez-Godoy, A. Gijsbers, A. Naser Eddin, T. Dor, J. Charrow, N. Sánchez-Puig, O. Elpeleg, Mutations in *EFL1*, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome, *J. Med. Genet.* 54 (2017) 558–566, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104366>.
- [10] Q.K.-G. Tan, H. Cope, R.C. Spillmann, N. Stong, Y.-H. Jiang, M.T. McDonald, J.A. Rothman, M.W. Butler, D.P. Frush, R.S. Lachman, B. Lee, C.A. Bacino, M.J. Bonner, C.M. McCall, A.A. Pendse, N. Walley, U. members, V. Shashi, L.D.M. Pena, Further evidence for the involvement of *EFL1* in a Shwachman-Diamond-like syndrome and expansion of the phenotypic features, *Mol. Case Stud.* (2018), <https://doi.org/10.1101/mcs.a003046> mcs.a003046.
- [11] B. Senger, D.L. Lafontaine, J.S. Graindorge, O. Gadal, A. Camasses, A. Sanni, J.M. Garnier, M. Breitenbach, E. Hurt, F. Fasiolo, The nucleolar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis, *Mol. Cell* 8 (2001) 1363–1373 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779510> (accessed December 10, 2018), [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00403-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00403-8).
- [12] A. Savchenko, N. Krogan, J.R. Cort, E. Evdokimova, J.M. Lew, A.A. Yee, L. Sánchez-Pulido, M.A. Andrade, A. Bochkarev, J.D. Watson, M.A. Kennedy, J. Greenblatt, T. Hughes, C.H. Arrowsmith, J.M. Rommens, A.M. Edwards, The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19213–19220, <https://doi.org/10.1074/jbc.M414421200>.
- [13] C. Shammah, T.F. Menne, C. Hilcenko, S.R. Michell, B. Goyenechea, G.R.B. Boocock, P.R. Durie, J.M. Rommens, A.J. Warren, Structural and mutational analysis of the SBDS protein family. Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond syndrome, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19221–19229, <https://doi.org/10.1074/jbc.M414656200>.
- [14] F. Weis, E. Giudice, M. Churcher, L. Jin, C. Hilcenko, C.C. Wong, D. Traynor, R.R. Kay, A.J. Warren, Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 914–919, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3112>.
- [15] K.-Y. Lo, Z. Li, C. Bussièr, S. Bresson, E.M. Marcotte, A.W. Johnson, Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit, *Mol. Cell* 39 (2010) 196–208, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.018>.
- [16] A.G. Malyutin, S. Musalgaonkar, S. Patchett, J. Frank, A.W. Johnson, Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis, *EMBO J.* 36 (2017) 854–868, <https://doi.org/10.15252/embj.201696012>.
- [17] S. Patchett, S. Musalgaonkar, A.G. Malyutin, A.W. Johnson, The T-cell leukemia related rpl10-R98S mutant traps the 60S export adapter Nmd3 in the ribosomal P site in yeast, *PLoS Genet.* 13 (2017) e1006894, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006894>.
- [18] N. Asano, H. Atsuami, A. Nakamura, Y. Tanaka, I. Tanaka, M. Yao, Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2014) 1251–1256, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.143>.
- [19] A. Gijsbers, D. Montagut, A. Méndez-Godoy, D. Altamura, M. Saviano, D. Siliqi, N. Sánchez-Puig, Interaction of the GTPase elongation factor Like-1 with the Shwachman-Diamond syndrome protein and its missense mutations, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 4012, <https://doi.org/10.3390/ijms19124012>.
- [20] A.N. Holding, XL-MS: protein cross-linking coupled with mass spectrometry, *Methods* 89 (2015) 54–63, <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2015.06.010>.
- [21] A. García-Márquez, A. Gijsbers, E. de la Mora, N. Sánchez-Puig, Defective guanine nucleotide exchange in the elongation factor-like 1 (EFL1) GTPase by mutations in the Shwachman-Diamond syndrome protein, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 17669–17678, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626275>.
- [22] K.P. Murphy, E. Freire, Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins, *Adv. Protein Chem.* 43 (1992) 313–361.
- [23] G. Pérez-Hernández, E. García-Hernández, R.A.R.A. Zubillaga, M.T.M.T. De Gómez-Puyou, Structural energetics of MgADP binding to the isolated β subunit of F1-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3*, *Arch. Biochem. Biophys.* 408 (2002)

- 177–183, [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00577-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00577-5).
- [24] N.V. Prabhu, K.A. Sharp, Heat capacity in proteins, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56 (2005) 521–548, <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.56.092503.141202>.
- [25] S. Vega, O. Abian, A. Velázquez-Campoy, On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (2016) 868–878, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.010>.
- [26] A. Gijbsbers, T. Nishigaki, N. Sánchez-Puig, Fluorescence anisotropy as a tool to study protein-protein interactions, *J. Vis. Exp.* (2016), <https://doi.org/10.3791/54640>.
- [27] T.W. Christianson, R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero, P. Hieter, Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors, *Gene* 110 (1992) 119–122 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1544568> (accessed December 10, 2018), [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90454-W](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90454-W).
- [28] C. Louis-Jeune, M.A. Andrade-Navarro, C. Perez-Iratxeta, Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra, *Proteins* 80 (2012) 374–381, <https://doi.org/10.1002/prot.23188>.
- [29] N.O. Pulido, G. Salcedo, G. Pérez-Hernández, C. José-Núñez, A. Velázquez-Campoy, E. García-Hernández, Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the F1-ATPase  $\beta$  subunit, *Biochemistry* 49 (2010) 5258–5268, <https://doi.org/10.1021/bi1006767>.
- [30] N.O. Pulido, E.A. Chavelas, F. Turner, E. García-Hernández, Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes, in: E. García-Hernández, D.A. Fernández-Velasco (Eds.), *Adv. Protein Phys. Chem., Transworld Research Network, India*, 2008, pp. 115–138.
- [31] A. Velázquez-Campoy, S.A. Leavitt, E. Freire, Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry, *Protein-Protein Interact., Humana Press, New Jersey*, 2004, pp. 035–054 (doi:10.1385/1-59259-762-9:035).
- [32] E. Muñoz, A. Piñero, AFFINmeter software: from its beginnings to future trends—a literature review, *J. Appl. Bioanal.* 4 (2018) 124–139, <https://doi.org/10.17145/jab.18.017>.
- [33] S. al-Karadaghi, A. Aevansson, M. Garber, J. Zheltonosova, A. Liljas, The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange, *Structure* 4 (1996) 555–565 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8736554> (accessed February 8, 2018), [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00061-5).
- [34] M. Dobosz-Bartoszek, M.H. Pinkerton, Z. Otwinowski, S. Chakravarthy, D. Söll, P.R. Copeland, M. Simonovic, Crystal structures of the human elongation factor eEFSec suggest a non-canonical mechanism for selenocysteine incorporation, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12941, <https://doi.org/10.1038/ncomms12941>.
- [35] A.M.G. van den Elzen, J. Henri, N. Lazar, M.E. Gas, D. Durand, F. Lacroite, M. Nicaise, H. van Tilbeurgh, B. Séraphin, M. Graille, Dissection of Dom34–Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (2010) 1446–1452, <https://doi.org/10.1038/nsmb.1963>.
- [36] M. Laurberg, O. Kristensen, K. Martemyanov, A.T. Gudkov, I. Nagev, D. Hughes, A. Liljas, Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site 1 Edited by I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* 303 (2000) 593–603, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4168>.
- [37] G. Polekhina, S. Thirup, M. Kjeldgaard, P. Nissen, C. Lippmann, J. Nyborg, Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP, *Structure* 4 (1996) 1141–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939739> (accessed May 12, 2018), doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00122-0).
- [38] B. Kuhle, R. Ficner, EIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining, *EMBO J.* 33 (2014) 1177–1191, <https://doi.org/10.1002/emboj.201387344>.
- [39] R. Søb, R.T. Mosley, M. Justice, J. Nielsen-Kahn, M. Shastry, A.R. Merrill, G.R. Andersen, Sordarin derivatives induce a novel conformation of the yeast ribosome translocation factor eEF2, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 657–666, <https://doi.org/10.1074/jbc.M607830200>.
- [40] M. Kjeldgaard, P. Nissen, S. Thirup, J. Nyborg, The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation, *Structure* 1 (1993) 35–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069622> (accessed May 12, 2018), doi: [https://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90007-4).
- [41] J. Mesters, R. Hilgenfeld, T. Hogg, Insights into the GTPase mechanism of EF-Tu from structural studies, *The Ribosome, American Society of Microbiology*, 2000, pp. 347–357, <https://doi.org/10.1128/9781555818142.ch28>.
- [42] T. Yanagisawa, R. Ishii, Y. Hikida, R. Fukunaga, T. Sengoku, S. Sekine, S. Yokoyama, A SelB/EF-Tu/aIF2 $\gamma$ -like protein from *Methanosarcina mazei* in the GTP-bound form binds cysteinyl-tRNA<sub>Cys</sub>, *J. Struct. Funct. Genom.* 16 (2015) 25–41, <https://doi.org/10.1007/s10969-015-9193-6>.
- [43] S.J. Hubbard, J.M. Thornton, “NACCESS”, Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 1993.
- [44] O. Hahn-Herrera, G. Salcedo, X. Barril, E. García-Hernández, Inherent conformational flexibility of F1-ATPase  $\alpha$ -subunit, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1857 (2016), <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.04.283>.
- [45] G. Salcedo, P. Cano-Sánchez, M.T.M.T. De Gómez-Puyou, A. Velázquez-Campoy, E. García-Hernández, Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F1-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837 (2014) 44–50, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.08.005>.
- [46] A. Velázquez-Campoy, Allostery and cooperative interactions in proteins assessed by isothermal titration calorimetry, in: M. Bastos (Ed.), *Biocalorimetry - Found. Contemp. Approaches*, CRC Press, Boca Raton, 2016, pp. 223–246.
- [47] R.N. Goldberg, N. Kishore, R.M. Lennen, Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers, <https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srd/jpcrd615.pdf>, (2002) (accessed January 22, 2019).
- [48] V.A. Mitkevich, A.V. Kononenko, I.Y. Petrushanko, D.V. Yanvarev, A.A. Makarov, L.L. Kisselev, Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1 $\cdot$ eRF3 $\cdot$ GTP $\cdot$ Mg $^{2+}$  complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 3947–3954, <https://doi.org/10.1093/nar/gkl549>.
- [49] E.A.E.A. Chavelas, E. García-Hernández, Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes, *Biochem. J.* 420 (2009) 239–247, <https://doi.org/10.1042/BJ20082171>.
- [50] P.L. Privvalov, G.I. Makhatadze, Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding, *J. Mol. Biol.* 224 (1992) 715–723 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1314903> (accessed April 14, 2017), [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90555-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90555-X).
- [51] J.E. Ladbury, M.A. Williams, The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (2004) 562–569, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.08.001>.
- [52] E. García-Hernández, R.A. Zubillaga, A. Rodríguez-Romero, A. Hernández-Arana, Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces, *Glycobiology* 10 (2000) 993–1000, <https://doi.org/10.1093/glycob/10.10.993>.
- [53] S. Jones, J.M. Thornton, Principles of protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 13–20 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8552589> (accessed April 14, 2017).
- [54] W.E. Stites, Protein-Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis, (1997), <https://doi.org/10.1021/CR960387H>.
- [55] M.J. Seewald, K. Pichumani, C. Stowell, B.V. Tibbals, L. Regan, M.J. Stone, The role of backbone conformational heat capacity in protein stability: temperature dependent dynamics of the B1 domain of *Streptococcal* protein G, *Protein Sci.* 9 (2000) 1177–1193, <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1177>.
- [56] D. Idiyatullin, I. Nesmelova, V.A. Daragan, K.H. Mayo, Heat capacities and a snapshot of the energy landscape in protein GB1 from the pre-denaturation temperature dependence of backbone NH nanosecond fluctuations, *J. Mol. Biol.* 325 (2003) 149–162 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473458> (accessed January 23, 2019), [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01155-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01155-5).
- [57] V.L. Arcus, C.R. Pudney, Change in heat capacity accurately predicts vibrational coupling in enzyme catalyzed reactions, *FEBS Lett.* 589 (2015) 2200–2206, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.042>.
- [58] S.P. Edgcomb, K.P. Murphy, Structural energetics of protein folding and binding, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 62–66, [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00055-5).
- [59] E. García-Hernández, A. Hernández-Arana, Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: comparison with protein-folding energetics, *Protein Sci.* 8 (1999) 1075–1086, <https://doi.org/10.1110/ps.8.5.1075>.
- [60] A. Doig, M. Sternberg, Side-chain conformational entropy in protein folding, *Protein Sci.* 4 (1995) 2247–2251, <https://doi.org/10.1002/pro.5560041101>.
- [61] J. Cherfils, M. Zeghouf, Chronicles of the GTPase switch, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 493–495, <https://doi.org/10.1038/nchembio.608>.
- [62] I.R. Vetter, A. Wittinghofer, The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science* 80 (294) (2001) 1299–1304, <https://doi.org/10.1126/science.1062023>.
- [63] A. Wittinghofer, I.R. Vetter, Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif, *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 943–971, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062708-134043>.
- [64] V. Haurlyliuk, S. Hansson, M. Ehrenberg, Cofactor dependent conformational switching of GTPases, *Biophys. J.* 95 (2008) 1704–1715, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127290>.
- [65] V. Haurlyliuk, V.A. Mitkevich, A. Draycheva, S. Tankov, V. Shyp, A. Ermakov, A.A. Kulikova, A.A. Makarov, M. Ehrenberg, Thermodynamics of GTP and GDP binding to bacterial initiation factor 2 suggests two types of structural transitions, *J. Mol. Biol.* 394 (2009) 621–626, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.015>.
- [66] V. Haurlyliuk, V. A. Mitkevich, N. A. Eliseeva, I.Y. Petrushanko, M. Ehrenberg, A. A. Makarov, The pretranslocation ribosome is targeted by GTP-bound EF-G in partially activated form, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 15678–15683, <https://doi.org/10.1073/pnas.0807912105>.
- [67] A. Paleskava, A.L. Konevega, M.V. Rodnina, Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 27906–27912, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.366120>.
- [68] V.A. Mitkevich, V. Shyp, I.Y. Petrushanko, A. Soosaar, G.C. Atkinson, T. Tenson, A.A. Makarov, V. Haurlyliuk, GTPases IF2 and EF-G bind GDP and the SRL RNA in a mutually exclusive manner, *Sci. Rep.* 2 (2012) 843, <https://doi.org/10.1038/srep00843>.
- [69] A. Gijbsbers, A. García-Márquez, A. Luviano, N. Sánchez-Puig, Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437 (2013) 349–354, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.077>.
- [70] R. Goody, W. Hofmann-Goody, Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions, *Eur. Biophys. J.* 31 (2002) 268–274, <https://doi.org/10.1007/s00249-002-0225-3>.
- [71] K.B. Gromadski, T. Schümmer, A. Strømgaard, C.R. Knudsen, T.G. Kinzy, M.V. Rodnina, Kinetics of the interactions between yeast elongation factors 1A and 1B $\alpha$ , guanine nucleotides, and aminoacyl-tRNA, *J. Biol. Chem.* 282 (2007)

- 35629–35637, <https://doi.org/10.1074/jbc.M707245200>.
- [72] K.B. Gromadski, H.-J. Wieden, M.V. Rodnina, Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu, *Biochemistry* 41 (2002) 162–169 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772013> (accessed March 15, 2018), <https://doi.org/10.1021/bi015712w>.
- [73] M. Thanbichler, A. Böck, R.S. Goody, Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and Selenocysteine insertion sequence RNA, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20458–20466, <https://doi.org/10.1074/jbc.M002496200>.
- [74] B. Wilden, A. Savelsbergh, M.V. Rodnina, W. Wintermeyer, Role and timing of GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent tRNA translocation on the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 13670–13675, <https://doi.org/10.1073/pnas.0606099103>.
- [75] S. Rudoni, S. Colombo, P. Coccetti, E. Martegani, Role of guanine nucleotides in the regulation of the Ras/cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1538 (2001) 181–189 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336789> (accessed October 3, 2017).