



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO QUÍMICA

**ESTUDIOS BIOENERGÉTICOS DE LA INTERACCIÓN DE LA GTPasa MUTANTE Efi1
R1086Q CON SUS BIOMOLÉCULAS EFECTORAS Y SUS IMPLICACIONES EN EL
SÍNDROME SHWACHMAN-DIAMOND**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

BIOL. JESÚS PÉREZ JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG. IQ, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO,

JUNIO 2023



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 de la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig. Para 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 IN215122 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 283909. Se agradece el apoyo a la técnico académico Dra. Norma Sánchez Sánchez adscrita al laboratorio 306 Instituto de Fisiología Celular por las facilidades para el uso de equipo y a la M.C. Marysol Valdez Hernández adscrita al laboratorio de Paleoceanografía y Paleoclimatología del Instituto de Geofísica por su apoyo en el diseño y elaboración de gráficas y figuras de alta resolución. Jesús Pérez Juárez recibió la beca no. 298966 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus 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:

Jesús Pérez-Juárez, Juana Virginia Tapia-Vieyra, Gabriel Gutiérrez-Magdaleno, Nuria Sánchez-Puig.

Altered Conformational Landscape upon Sensing Guanine Nucleotides in a Disease Mutant of Elongation Factor-like1 (EFL1) GTPase. *Biomolecules* **2022**, 12, 1141. DOI /10.3390/biom12081141

DEDICATORIAS

A mi padre J. Jesús Pérez Villa y madre Cira Juárez Guillen por su apoyo, por su confianza y por estar siempre presentes en todo momento.

A mi hermano Horacio y hermana Olga por su generosidad, sus palabras de motivación aliento y por estar siempre presentes en los momentos más retadores de mi vida.

A mi hija Regina Monserrat Pérez Valdez por ser la luz y el propósito en mi vida.

A la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, por aceptarme como miembro de su grupo de trabajo, por su paciencia y su confianza en los momentos más desafiantes en el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutor Dra. Xóchitl Pérez Martínez y Dra. Rosario A. Muños Clares, por su apoyo y exigencia que me obligaron a esforzarme para mejorar como profesional y como persona.

A Gabriel Gutiérrez Magdaleno, por tu compromiso y porque sin tu apoyo este proyecto no se hubiera concluido, y sobre todo por esas charlas filosófico-existenciales con café y galletas mientras trabajábamos en plena contingencia sanitaria.

Al Dr. Enrique García Hernández por facilitarme el uso de su equipo de calorimetría y por su confianza en todo momento para el acceso a su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio con los que compartí experiencias anécdotas y momentos de aprendizaje que me hicieron crecer profesionalmente. En especial a Alfonso Méndez Godoy por estar siempre dispuesto a brindar su apoyo, a Juliana Jaramillo por el trabajo en equipo y a Sara Abigail Ramíres Cortes por las buenas charlas que hicieron muy amenos mis días en el Instituto de Química.

*La vida es oasis y desierto
Nos derrumba..Pero también nos enseña*

Anónimo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1 Contenido

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IV
RESUMEN.....	2
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 EL RIBOSOMA Y LA TRADUCCIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO.....	4
2.2 BIOGÉNESIS RIBOSOMAL EN EUKARIONTES.....	5
2.3 RIBOSOMOPATÍAS.....	8
2.4 EL SÍNDROME SHWACHMAN-DIAMOND (SDS).....	9
2.5 LA GTPASA EFL1.....	10
2.6 MUTACIONES EN EFL1 CAUSAN EL SÍNDROME SHWACHMAN-DIAMOND (SDS).....	12
2.7 RECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	13
2.7.1 <i>Termodinámica en el reconocimiento molecular</i>	14
2.7.2 <i>Cinética enzimática</i>	18
2.7.3 <i>Espectroscopía de fluorescencia</i>	20
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4 PREGUNTAS A RESPONDER.....	23
5 HIPÓTESIS.....	23
6 OBJETIVOS.....	24
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
7 METODOLOGÍAS.....	24
7.1 SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	24
7.1.1 <i>Efl1 y mutantes</i>	24
7.1.2 <i>Sdo1</i>	25
7.1.3 <i>Subunidades ribosomales 60S</i>	26
7.2 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA.....	27
7.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO.....	28
7.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	29
7.5 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	29
8 RESULTADOS.....	30
8.1 OBTENCIÓN DE LAS BIOMOLÉCULAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	30
8.2 ENERGÉTICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA MUTANTE EFL1 R1086Q Y LOS NUCLEÓTIDOS DE GUANINA.....	32
8.3 ENERGÉTICA DE UNIÓN DEL COMPLEJO EFL1 R1086Q•Sdo1 CON LOS NUCLEÓTIDOS DE GUANINA.....	40
8.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA DE MUTANTES DE EFL1.....	45
8.5 INTERACCIÓN DEL COMPLEJO EFL1 R1086Q/WT•Sdo1•60S CON LOS NUCLEÓTIDOS DE GUANINA.....	46
9 DISCUSIÓN.....	48
10 CONCLUSIONES.....	52
11 BIBLIOGRAFÍA.....	55
12 INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	62
12.1 SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES.....	62

ABREVIATURAS

DBA	Anemia Diamond-Blackfan
DC	Disqueratosis congénita
Efl1	Acrónimo del ortólogo de levadura de la proteína <i>Elongation Factor Like 1</i>
eIF6	Acrónimo de la proteína <i>Eukaryotic Initiation Factor 6</i>
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
MgGTP	Trifosfato de guanosina en presencia de magnesio
MgGDP	Difosfato de guanosina en presencia de magnesio
mRNA	RNA mensajero
Ni ²⁺	Ion de níquel
PTC	Centro peptidil transferasa
RNA	Del inglés <i>ribonucleic acid</i>
SBDS	Acrónimo de la proteína humana Swachman-Bodian-Diamond Syndrome
SDS	Síndrome Shwachman-Diamond
Sdo1	Acrónimo del ortólogo de levadura de la proteína Swachman-Diamond ortolog 1
TCS	Síndrome Treacher-Collins
Tif6	Del inglés <i>Translation Initiation Factor 6</i> , ortólogo de levadura de la proteína eIF6
tRNA	RNA de transferencia
kDa	Kilodaltones

ABSTRACT

The ribosome is a ribonucleoprotein complex conserved in all kingdoms of life whose function is to translate the information contained in the messenger RNA (mRNA) into protein. Ribosome synthesis is an energetically demanding and finely regulated process. The last step in the maturation of the 60S ribosomal subunit in the cytoplasm requires the release of the eukaryotic translation initiation factor 6 (human eIF6, yeast Tif6) from the nascent 60S particle by the joint action of the Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase and Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome (human SBDS, yeast Sdo1). Mutations in any of these proteins prevent the release of eIF6 causing a disease known as the Shwachman-Diamond Syndrome (SDS). Mutations that do not affect the protein expression levels or its fold are still unclear. In this work we tried to address the question, what mechanism affect the mutations in EFL1 that give rise to SDS? To this end we studied the functional consequences of the mutation R1086Q in the GTPase Efl1 of *Saccharomyces cerevisiae*, a mutation equivalent to R1095Q in EFL1 described in SDS patients. Using isothermal titration calorimetry (ITC) we obtained the thermodynamic signature for the interaction of Efl1 R1086Q mutant alone or bound to the effector Sdo1 with guanine nucleotides in the presence and absence of magnesium ions. The thermodynamic signature of the interaction with the nucleotides GTP and MgGTP was very different compared with the wild type Efl1. The binding to GTP and MgGTP was an endothermic process, while that to GDP was exothermic irrespective of the metal's presence. This observation contrast with the thermodynamic signature for the binding of wild-type Efl1 to GTP/MgGTP, which was described by an exothermic process. The binding heat capacity (ΔC_{p_b}) changed from a negative large value for the wild type to nearly zero for the mutant. This implies that binding of the substrate to mutant Efl1 elicited a modest conformational change contrasting with the behavior observed in the GTPases. The interaction of Efl1 R1086Q with Sdo1 was an order of magnitude weaker than that of the wild type and was not paired with a conformational change as the ΔC_{p_b} value was also close to zero. Thus Sdo1 couldn't conditionate the mutant to adopt the GTP-bound conformation.

Currently little is known about the regulation of the complex Sdo1•60S in the activity of Efl1. Using fluorescence spectroscopy, we determined the dissociation constants of Efl1 wild type and mutant R1086Q for guanine nucleotides when present in a complex with Sdo1•60S. The K_d values for the ternary complexes GTPase•Sdo1•60S binding to GTP were similar suggesting that the ribosomal subunit does not modify the affinity of the GTPase for the substrate.

Finally, we obtain the kinetic parameters of the mutants Efl1 R1086Q and L910K alone and in the presence of Sdo1. The k_{cat} values for free mutants and bound to Sdo1 did not change respect to the wild type protein. In contrast the K_m values decreased their value by half as previously observed, but the absolute number differ from those for the wild type protein reflecting the changes in the binding constants contained in this parameter.

From our data, we propose a model where the conformational change in Efl1 depends on a long-distance network of interactions that are disrupted in mutant R1086Q, whereby Sdo1 and the guanine nucleotides no longer elicit the conformational changes previously described in the wild type protein. The comparative analysis of the thermodynamic sign offers a possible explanation for the molecular cause of SDS in humans.

RESUMEN

El ribosoma es un complejo ribonucleoproteico conservado en todos los dominios de la vida cuya función es traducir la información contenida en el RNA mensajero (mRNA) en proteínas. La síntesis de ribosomas es un proceso estrictamente regulado que involucra un alto costo energético. El último paso de maduración de la subunidad ribosomal 60S en citoplasma requiere la liberación del factor de inicio de la traducción 6 (eIF6 en humanos, Tif6 en levadura) de su superficie por la acción conjunta de la GTPasa EFL1 (Factor de elongación tipo 1) y su proteína efectora Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome (SBDS en humanos, Sdo1 en levadura). Mutaciones en cualquiera de estas dos proteínas afecta negativamente la capacidad de liberar a eIF6 y en humanos ocasionan una enfermedad conocida como Síndrome Shwachman-Diamond (SDS). Las mutaciones pueden desestabilizar el plegamiento de estas proteínas o bien alterar su funcionamiento. En el presente trabajo no enfocamos en responder la pregunta ¿Qué mecanismo o mecanismos afectan las mutaciones en la proteína EFL1 que ocasionan SDS? Para lo cual estudiamos las consecuencias funcionales de la mutación R1086Q en la GTPasa Efl1 de *Saccharomyces cerevisiae*, una mutación equivalente a R1095Q en EFL1 de pacientes diagnosticados con SDS. Utilizando la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) determinamos la firma termodinámica de la interacción de la mutante Efl1 R1086Q, sola y unida a Sdo1, con los nucleótidos de guanina en presencia y ausencia de iones magnesio. La firma termodinámica de la interacción con los nucleótidos GTP y MgGTP fue muy diferente a la reportada para la interacción con Efl1 silvestre. El proceso fue endotérmico en la mutante, en lugar

de ser exotérmico como ocurre con la proteína silvestre, con la consecuente alteración de la capacidad calorífica de unión (ΔC_{p_b}) que pasó de tener un valor negativo grande en la GTPasa silvestre a un valor cercano a cero para la mutante. Esto indica que la unión del nucleótido GTP/MgGTP a la Efl1 mutante resulta en un cambio conformacional pequeño, contrario a lo que ocurre generalmente en las GTPasas. La afinidad de Efl1 R1086Q con Sdo1 resultó un orden de magnitud más débil que el valor reportado para la proteína silvestre, además de que el valor de ΔC_{p_b} para su interacción es la mitad del valor reportado para la interacción con Efl1 silvestre.

Actualmente se conoce poco sobre la influencia del complejo Sdo1•60S en la actividad de Efl1. Mediante experimentos de fluorescencia en estado estacionario se determinaron las constantes de disociación de Efl1 silvestre y mutante R1086Q por los nucleótidos de guanina unida al complejo Sdo1•60S. Los valores de K_d para los complejos ternarios GTPasa•Sdo1•60S por GTP fueron similares, lo que sugiere que la subunidad ribosomal no modifica la afinidad de la GTPasa por GTP.

Finalmente se obtuvieron los parámetros cinéticos de las mutantes Efl1 R1086Q y L910K, solas y en presencia de Sdo1. Los valores de k_{cat} no cambiaron respecto de la proteína silvestre. En contraste, los valores de K_m disminuyeron su valor a la mitad como se había descrito anteriormente, pero el número absoluto difiere respecto al proteína de tipo silvestre, lo que refleja los cambios en las constantes de unión contenidas en este parámetro.

Con base en nuestro estudio proponemos un modelo en el cual el cambio conformacional de la GTPasa Efl1 depende de una red de interacciones intramoleculares que comunican el dominio efector con el domino catalítico. La mutación R1086Q desacopla esta comunicación afectando el cambio conformacional y disminuyendo su capacidad para liberar a eIF6. El análisis comparativo de la firma termodinámica de Efl1 mutante con estudios previos para la GTPasa silvestre, ofrecen una posible explicación al origen molecular de la enfermedad SDS en humanos como consecuencia de mutaciones en EFL1.

2 ANTECEDENTES

2.1 El ribosoma y la traducción del código genético

Los ribosomas son complejos macromoleculares formados por rRNA y proteínas cuya función es la traducción del código genético. En eucariontes, el ribosoma está formado por una subunidad mayor 60S y una menor 40S que se asocian para formar la molécula funcional 80S. La subunidad mayor se encuentra formada por 46 proteínas estructurales y tres rRNA diferentes (5S, 5.8S y 25S/28S), y la menor comprende 33 proteínas ribosomales y un rRNA 18S. Ambas subunidades desempeñan funciones especializadas. La subunidad menor decodifica la información contenida en el RNA mensajero (mRNA) por medio de su reconocimiento por el anticodón en el aminoacil-transfer RNA (tRNA). La subunidad mayor cataliza la formación del enlace peptídico en una región que se conoce como centro peptidil transferasa (PTC)¹. Estructuralmente el ribosoma eucarionte es más grande y complejo que el procarionte ya que contiene una mayor cantidad de rRNA y de proteínas². Los segmentos de expansión en los rRNA de los ribosomas eucariontes son importantes en el reconocimiento de factores regulatorios que permiten al ribosoma ser más eficiente en velocidad y fidelidad de la traducción respecto a su contraparte procarionte³.

La traducción del código genético se divide en cuatro etapas: Inicio, Elongación, Terminación y Reciclaje. El inicio de la traducción se lleva a cabo mediante el ensamblaje de un complejo denominado 43S en el extremo metilado 5' del mRNA conocido como 5'-m⁷ G-cap. A continuación, el complejo 43S realiza un recorrido sobre el mRNA en dirección 5' a 3' que se conoce como escaneo y que se prolonga hasta que el complejo identifica el codón de inicio AUG. Los factores que participan en el inicio de la traducción se identifican con acrónimos que van del eIF1 al eIF6⁴ (eukaryotic translation initiation factor, por sus siglas en inglés). El factor eIF1 promueve la unión del tRNA a la subunidad 40S el cual se encuentra formando parte del complejo eIF2•GTP•Met-tRNA^{Met}_i y el reconocimiento específico del codón AUG. Utilizando la técnica de criomicroscopía electrónica se determinó que este complejo induce una conformación abierta que comunica al mRNA con el tRNA y el surco de la subunidad 40S para que ocurra el reconocimiento del codón de inicio⁵. A continuación, el factor eIF1 se libera del mRNA mediante el cierre del surco de la subunidad 40S, lo que permite que el tRNA adopte una orientación que puede ser reconocida por la subunidad mayor⁶. En humanos, alteraciones en la liberación de eIF6 afecta negativamente la síntesis proteica⁷, una de las consecuencias de esta alteración es la aparición de SDS. El inicio de la traducción termina con la formación del complejo 80S en el cual el Met-

tRNA^{Met}_i se une en el sitio P (peptidil) del ribosoma, el anticodón del Met-tRNA^{Met}_i se une al codón de inicio del mRNA y el segundo codón del mRNA queda posicionado en el sitio A (aminoacil) del ribosoma ⁸.

La etapa de elongación inicia con la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma. El primer paso de este proceso es la unión del complejo ternario formado por eEF1A•GTP•aminoacil-tRNA con el sitio A del ribosoma. Por hidrólisis de GTP se lleva a cabo la activación de eEF1A. A continuación, el complejo eEF1A•GDP es liberado, en este punto participa una región conservada en procariontes y eucariontes denominada centro peptidil transferasa, cuya función es posicionar al peptidil- y al aminoacil-tRNA permitiendo la formación del enlace peptídico. A continuación, participa otro factor denominado eIF5A, el cual se une al sitio E interactuando con el peptidil-tRNA. Existe evidencia de que eIF5A participa en el posicionamiento de los sustratos que permiten la catálisis del enlace peptídico ^{9 10}. A continuación el factor de elongación eEF2 lleva a cabo la translocación del peptidil-tRNA y del mRNA de tal forma que el sitio A queda vacante y listo para aceptar al próximo aminoacil-tRNA ¹¹.

La traducción termina cuando un codón de paro entra en el sitio A del ribosoma. En eucariontes este proceso es mediado por la GTPasa eRF3 y su activador eRF1. Este último es una proteína formada por tres dominios estructurales, con capacidad de reconocer los tres codones de paro en el sitio A, además presenta un motivo GGQ universalmente conservado. Existe evidencia de que este motivo es responsable de la liberación de la cadena polipeptídica que se origina en el centro peptidil transferasa ¹². eRF1 utiliza GTP como sustrato y forma un complejo en el cual el extremo C-terminal interactúa con eRF3 aumentando la especificidad en el reconocimiento del codón de paro ¹³. Una vez que el codón de paro ha entrado al sitio A, eRF3 cataliza la hidrólisis de GTP permitiendo el desensamble del complejo, de esta forma los constituyentes quedan listos para iniciar nuevos ciclos de traducción ¹⁴.

2.2 Biogénesis ribosomal en eucariontes

La biogénesis ribosomal es un proceso central en la fisiología celular que inicia en el nucleolo y termina en el citoplasma. Este proceso está conformado por tres etapas: 1) la transcripción y procesamiento del pre-rRNA ribosomal, 2) el plegamiento y ensamble del rRNA con proteínas ribosomales y 3) el transporte al citoplasma que es el compartimiento en donde se llevan a cabo

los últimos pasos de maduración antes de que las subunidades ribosomales estén disponible para comenzar la traducción.

La biogénesis ribosomal es el mayor consumidor de energía en la célula. En *S. cerevisiae* cada célula en crecimiento contiene alrededor de 200,000 ribosomas que traducen aproximadamente 13,000 proteínas por segundo ¹⁵. Se estima que el 30% de la traducción global en una célula en crecimiento se concentra en proteínas que participan en alguna etapa de la biogénesis, mientras que el 80% del RNA de la célula es RNA ribosomal ^{16 17}. Debido a la importancia del ribosoma, su biogénesis es un proceso estrictamente controlado donde participan más de 200 proteínas especializadas que garantizan precisión en la síntesis, modificación, transporte y ensamble de las proteínas ribosomales con el rRNA.

La primera etapa comienza en el nucleolo con la transcripción de un pre-rRNA policistrónico 35S. Este precursor es transcrito por la RNA polimerasa I a partir de secuencias repetidas en tándem que son codificadas en el rDNA. Este pre-rRNA se asocia con proteínas estructurales para formar la primer partícula pre-ribosomal 90S. Concomitantemente, el rRNA sufre modificaciones post-transcripcionales como metilación de la ribosa y la base, así como pseudo-uridinilación ¹⁸. En el nucleolo el complejo 90S es escindido por asociación y disociación secuencial de endonucleasas y exonucleasas que actúan en un sitio denominado A₂. El producto es una partícula pre-ribosomal 20S, que es el precursor de la pre-subunidad menor y una partícula denominada 27SA₂ pre-ribosomal que es responsable del reclutamiento de las proteínas ribosomales que forman la pre-subunidad 60S ¹⁹. La biogénesis de la subunidad mayor es más compleja que la de la subunidad menor. El ensamble de la subunidad mayor comienza en el nucleolo en donde participan proteínas que se caracterizan por presentar dominios de unión a RNA tales como Rrp5, Mak21, Noc2 y Nop4. Estas proteínas, son responsables de realizar funciones estructurales tales como compactar y modificar el rRNA formando estructuras rígidas que sirven de andamio para estabilizar el plegamiento del RNA. De forma co-transcripcional se llevan a cabo modificaciones covalentes del pre-rRNA que son realizadas por ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs). En el nucleolo comienza a tomar forma lo que posteriormente serán los centros funcionales de la subunidad mayor, como el centro de activación de GTPasas (GAC), el túnel de salida del polipéptido (PET) y el centro peptidil-transferasa (PTC). Por ejemplo, los factores de ensamble Nop2, Nip7, Noc3 y la metiltransferasa Spb1, se unen a los dominios IV y V de rRNA 25S para la formación del centro peptidil-transferasa. El ensamble de un fragmento que rodea el túnel de salida

es completado por los factores Ssf1-Rrp14 y Rrp15 quienes también permiten la asociación y estabilización de las proteínas ribosomales L19, L25 y L31.

En el núcleo ocurren algunos pasos de remodelación que permiten a la pre-subunidad 60S quedar disponible para ser exportada al citoplasma, estos pasos incluyen la escisión y retiro del espaciador transcrito número 2 (ITS2), este proceso es realizado por tres complejos de nucleasas que son el Las1-Grc3-Rat1-Rai1 y el exosoma Ngl2-Rex1-3. La restructuración de la protuberancia central y control de calidad de los centros funcionales son procesos que ocurren en el núcleo antes de su exportación al citoplasma en donde ocurren las últimas etapas de maduración. En el citoplasma se liberan las últimas proteínas accesorias y se ensamblan nueve proteínas ribosomales, la liberación es mediada por GTPasas y ATPasas y se lleva a cabo a través de un proceso jerárquico. Un aspecto importante es que cada uno de los centros funcionales se encuentra asociado con el ensamble de factores que han cumplido con un control de calidad previo. Por ejemplo, el ensamble del factor Rlp24 que recluta y activa a la ATPasa Drg1 la cual cataliza el remplazo Rlp24 por su homólogo la proteína ribosomal L24 (Rpl24). Otros factores de ensamble como Rei1, Jjj1 y la chaperona Hsp70 las cuales son requeridas para la liberación de Arx1 y Alb1 que participan en el control de calidad del túnel de salida del polipéptido. En los dos últimos pasos de la maduración citoplasmática de la pre-subunidad 60S participan las GTPasas Lsg1 y Efl1 que actúan como factores de liberación para Nmd3 y Tif6 respectivamente. Se sabe que Nmd3 actúa como un control de calidad que verifica la integridad del centro peptidil-transferasa (PTC) ²⁰ y marca uno de los pasos finales de la maduración nuclear uniéndose a la carioferina encargada de la exportación. Por su parte Tif6 es una proteína esencial en la viabilidad celular, su función es crear un impedimento estérico evitando la asociación prematura con la subunidad menor ²¹. La liberación de Tif6 es el último paso de la maduración citoplasmática y es un proceso que lleva a cabo la GTPasa Efl1 en conjunto con su proteína efectora Sdo1 ^{22 23} (Figura 1).

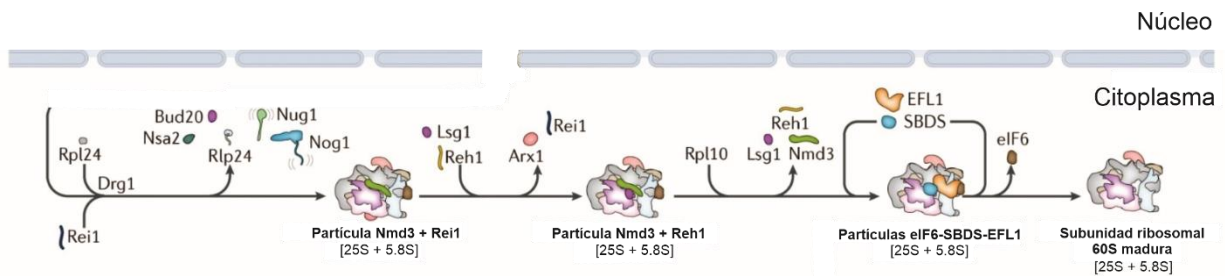


Figura 1. Proceso secuencial de maduración de la subunidad ribosomal 60S en el citoplasma. Las proteínas accesorias EFL1 y SBDS liberan a eIF6, siendo este el último paso de la maduración previo al ensamble del ribosoma traduccionalmente funcional (adaptado de Klinge & Woolford, Jr ²²).

2.3 Ribosomopatías

En humanos, mutaciones en proteínas estructurales del ribosoma o factores involucrados en alguna etapa de la biogénesis originan un tipo de enfermedades conocidas como ribosomopatías.^{24 25} La incidencia de estas enfermedades varía de 1 en 50,000 a 1 en 200,000 nacimientos. En cada tipo de desorden los pacientes presentan un cuadro clínico particular²⁴.

El término ribosomopatía apareció en la literatura por primera vez en una carta publicada en la revista *Nature Genetics* en 1998²⁵. En esta comunicación, los autores hacen referencia a un artículo en donde se identifica una mutación en un paciente de sexo masculino diagnosticado con disqueratosis congénita, una enfermedad rara cuyas principales características son un deterioro acelerado en la dentadura y pigmentación dérmica anormal. Desde entonces han sido descritos diferentes cuadros clínicos en pacientes diagnosticados con algún tipo de ribosomopatía. Entre las más estudiadas se encuentran la anemia Blackfan-Diamond (DBA), el Síndrome Shwachman-Diamond (SDS), la Hipoplasia Cartílago Cabello, el Síndrome Treacher Collins (TCS) y el Síndrome 5q⁻²⁶, entre otras.

Las ribosomopatías se manifiestan a través de un variado cuadro clínico. Los pacientes pueden presentar alteraciones en diferentes órganos y sistemas en los que la sintomatología es muy diversa, sin embargo existen tres características comunes. La primera es que en la mayoría de las ribosomopatías los pacientes presentan afectación en el tejido hematopoyético que conlleva a síndrome mielodisplásico²⁷. La segunda es un elevado riesgo de que la enfermedad evolucione a algún tipo de cáncer relacionado con alteraciones en la regulación de la proteína p53²⁸. Esa última es una familia de factores de transcripción que actúan como supresores de tumores mediante la regulación de la apoptosis, senescencia y arresto del ciclo celular²⁹. Distintas alteraciones en p53 han sido observadas en la patofisiología de pacientes diagnosticados con SDS³⁰, DBA³¹, TCS³² y DC³³. Un regulador clave en la función de p53 es MDM2, una ubiquitina ligasa que inhibe la actividad de p53. Varias proteínas ribosomales son capaces de inhibir la función de MDM2 activando a p53. Este fenómeno se ha observado en varios tipos de cáncer en donde la interacción de RPL11-MDM2 estimula la activación de p53. RPL11, RPL5 y el rRNA 5S forman un subcomplejo estructural de la subunidad ribosomal 60S que secuestra a MDM2. Finalmente, las ribosomopatías presentan alteraciones tejido-específicas. Por ejemplo, mutaciones en RPSA/uS2 dan origen a Asplenia Congénita Aislada, una enfermedad en la que los pacientes nacen sin bazo. El bazo es un órgano que forma parte del sistema linfático cuya principal función es la producción

de glóbulos blancos y la homeostasis de líquidos ³⁴. Otro ejemplo es la Hipotricosis Simplex, esta es una enfermedad en la que los pacientes presentan pérdida acelerada de cabello y deterioro progresivo del vello corporal desde la infancia. En un estudio genómico realizado a una familia de origen chino, se identificaron mutaciones en la proteína ribosomal RPL21, que es una proteína estructural de la subunidad 60S ³⁵. Algunas mutaciones en proteínas ribosomales pueden manifestarse en patologías como autismo y retraso mental. En un estudio donde se analizaron aspectos funcionales de genes codificados en la región q28 del cromosoma X (Xq28) se identificó un paciente en el espectro autista con mutaciones en la proteína ribosomal RPL10. RPL10 se localiza en un zona que conecta a los sitios A-P y el centro peptidil-transferasa de la subunidad 60S ³⁶. A continuación, se describe en detalle la ribosomopatía Síndrome Shwachman-Diamond debido a su relación directa con este trabajo.

2.4 El Síndrome Shwachman-Diamond (SDS)

El Síndrome Shwachman-Diamond (SDS, OMIM# 260400, 617941) fue reportado por primera vez en 1964 por los pediatras Harry Shwachman, Louis K. Diamond y Martin Bodian. El cuadro clínico característico de esta enfermedad se presenta principalmente como insuficiencia pancreática exocrina, neutropenia y condrodisplasia metafisaria en brazos y piernas ^{37 38 39}.

En 2003 se identificó el gen *SBDS* (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome) como responsable de esta enfermedad cuyo locus se ubica en el cromosoma 7 (7q11) y codifica para una proteína de 250 residuos ⁴⁰. Este gen se encuentra adyacente a un pseudogen denominado *SBDSP*, con el que comparte un 97% de identidad, pero que contiene deleciones y cambios de secuencia que generan una proteína trunca no funcional. Las mutaciones en *SBDS* resultan de un evento de conversión génica entre el gen y el pseudogen. Las mutaciones más comunes que presentan los pacientes con SDS son de dos tipos: la primera es una transversión de TA por CT en la posición 183-184 del gen (183-184TA→CT) que introduce un codón de paro en la lisina 62 (K62X), mientras que la segunda es la transversión de timina por citocina en la posición 258 (258+2 T→C) que interrumpe el sitio de procesamiento del intrón 2 dando como resultado también una proteína trunca (84Cfs3). Comúnmente los pacientes presentan la mutación 183-184TA→CT en un alelo y la 258+2 T→C en el otro, sin embargo no existen pacientes con la mutación 183-184TA→CT en ambos alelos, lo cual sugiere que *SBDS* es una proteína esencial.

En el 90% de los casos, los pacientes con SDS presentan mutaciones en el gen *SBDS* y poco se sabe del origen de esta enfermedad en el 10% restante. En 2017 se reportaron pacientes con cuadro clínicos similares a SDS, pero que no tenían mutaciones en *SBDS*. Cuatro pacientes presentaron mutaciones bialélicas en la secuencia codificante de *DNAJC21*. El ortólogo de esta proteína en *Saccharomyces cerevisiae* corresponde a *Jjj1*. La proteína *DNAJC21* (*heat shock protein* familia Hsp40 miembro 21) pertenece a un grupo de proteínas que participan en la traducción, plegamiento, translocación y degradación proteica estimulando la actividad de ATPasa de chaperonas Hsp70. Las proteínas DnaJ/Hsp40 se caracterizan por tener un dominio J responsable de unir a Hsp70. Se han estudiado miembros de la familia DnaJ/Hsp40 que interactúan con el ribosoma en la etapa de translocación ⁴¹. También se encontraron pacientes con mutaciones en *SRP54*, uno de los componentes del complejo ribonucleoproteico SRP (por su nombre en inglés Signal Recognition Particle) cuya función es dirigir la cadena polipeptídica naciente hacia el retículo endoplásmico y facilitar su translocación a este compartimento ⁴². Finalmente nuestro grupo describió mutaciones bialélicas en *EFL1*, que como ya se mencionó anteriormente, participa junto con *SBDS* en el último paso de maduración de la subunidad 60S liberando el factor anti asociación *Tif6* ⁴³ (Figura 2).

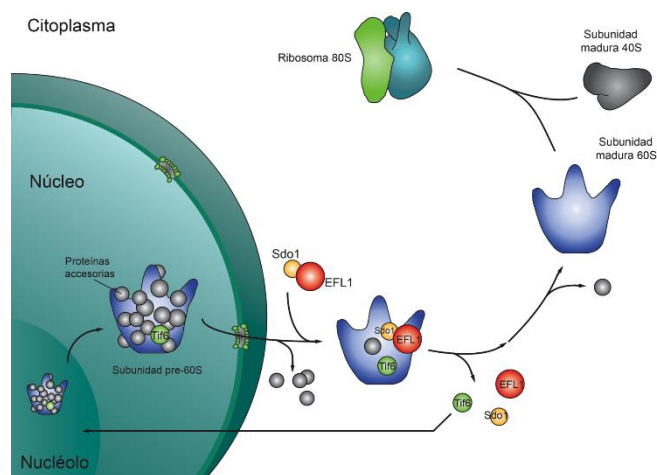


Figura 2. Esquema general de la liberación del factor anti asociación *Tif6* de la superficie de la subunidad ribosomal 60S que es mediada por la GTPasa *EFL1* y su proteína efectora *Sdo1*.

2.5 La GTPasa *EFL1*

EFL1 es una familia de proteínas exclusiva de eucariontes que comparte un origen evolutivo con la familia de translocasas EF-G de procariontes y EF-2 de eucariontes. En humanos el gen *EFL1* codifica para un polipéptido de 1120 residuos. Estructuralmente se compone de cinco dominios, el dominio I contiene al dominio G y presenta cinco motivos que se clasifican del G1 al G5 cuya

función es el reconocimiento de los nucleótidos de guanina y la hidrólisis de GTP⁴⁴. El dominio II contiene una inserción de longitud variable, que es la principal diferencia estructural entre la familia EFL1 y la familia de EF-2^{45 46}. Otras características de la familia EFL1 es que presenta un residuo de treonina conservado en el motivo G1 (AHVDHGKT) que se encuentra involucrado en el reconocimiento del ion magnesio, así como dos firmas en el extremo C-terminal que se compone de la secuencia de residuos RRRKGL y KQRTL⁴⁶, esta última no se encuentra presente en la familia de EF-2. En un estudio en donde se evaluó la conservación funcional de EFL1 se hicieron ensayos de complementación que demostraron que la función de EFL1 es especie específica y que todos sus dominios son esenciales para su función⁴⁶.

A nivel molecular las GTPasas se caracterizan por poseer un mecanismo de switch que alterna entre los estados conformacionales activo e inactivo dependiendo de su unión a GTP o GDP. En la mayoría de los casos las GTPasas requieren de proteínas efectoras que permiten regenerar el estado activo, y que se denominan como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs). De la misma forma también requieren de factores que activen la hidrólisis, a los que se les conoce como GAPs⁴⁷. La proteína SBDS actúa como el intercambiador de nucleótidos de guanina o GEF para EFL1 debilitando su interacción por GDP^{48 49}. Y aunque no se ha establecido categóricamente qué molécula realiza la función de GAP para EFL1, en analogía con lo descrito para EF-G se cree que la subunidad ribosomal 60S es quien realiza esta función⁵⁰.

El conocimiento actual del mecanismo de liberación de eIF6 de la superficie de la pre-subunidad ribosomal 60S es el siguiente: en el citoplasma la pre-subunidad 60S se encuentra unida al factor de anti-asociación eIF6 cuya función es bloquear una región conformada principalmente por la proteína ribosomal eL24, a esta región se le denomina puente intersubunitario B6⁵¹ (Figura 3A). La presencia de eIF6 genera un impedimento estérico que impide la asociación prematura con la subunidad 40S. EFL1 se une a la pre-subunidad 60S en el centro de asociación de GTPasas en una conformación en la cual sus dominios III y V cumplen la función de posicionarla sobre la superficie de la pre-subunidad 60S. Esto último permite a los dominios I, II y IV adoptar una conformación de arco facilitando el acomodo de EFL1 en la superficie, así como la interacción con el rRNA y proteínas ribosomales (Figura 3B). Una vez que EFL1 ha concluido la primera etapa de acomodo, el dominio I interactúa con un fragmento del rRNA denominada asa sarcina-ricina (SRL) y con la proteína ribosomal uL14, en esta conformación EFL1 compite por un sitio en común con eIF6 desplazando a esta última de la superficie de la subunidad ribosomal (Figura 3C). Se ha propuesto

que la interacción con el SRL activa la hidrólisis de GTP cambiando el equilibrio de un estado de alta afinidad a uno de baja afinidad del complejo EFL1-SBDS por la pre-subunidad 60S permitiendo la disociación de este último.

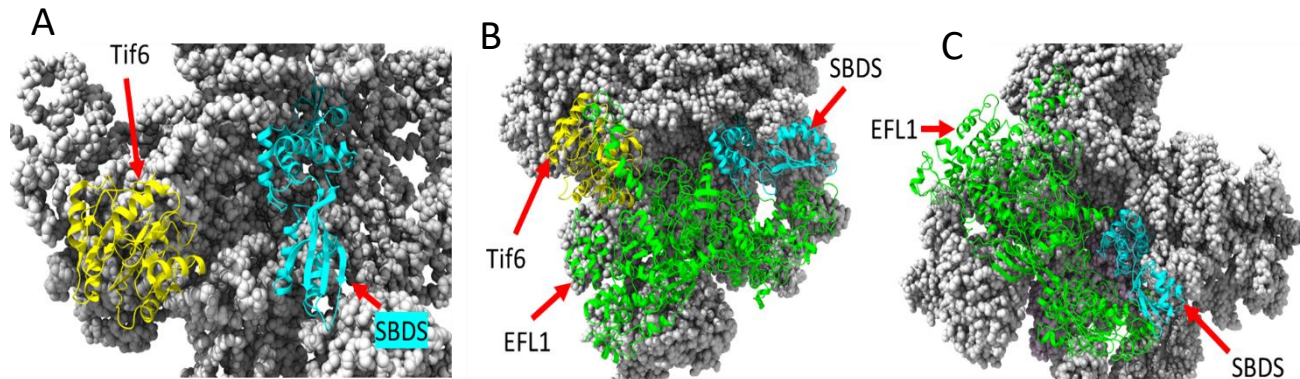


Figura 3. La liberación de eIF6 es mediada por EFL1 y su proteína efectora SBDS. (A) eIF6 y SBDS unidas a la subunidad pre-60S (PDB 5AN9). (B) EFL1 compite por un sitio de interacción común eIF6 (PDB 5ANB). (C) Una vez que eIF6 es liberada, EFL1 cataliza la hidrólisis de GTP y el complejo es liberado de la subunidad ribosomal (PDB 5ANC).

2.6 Mutaciones en EFL1 causan el Síndrome Shwachman-Diamond (SDS)

SDS es una enfermedad que se origina en el 90% de los casos por mutaciones en el gen *SBDS*. *Stepensky et al.* reportaron el primer estudio de pacientes que presentaron un cuadro clínico de SDS con mutaciones en el gen *EFL1* y no en *SBDS*. El análisis reveló mutaciones homocigotas en los residuos M882K en dos pacientes y R1095Q en cuatro pacientes, estas mutaciones se localizan en el dominio IV de la GTPasa. A partir de este estudio, diferentes grupos revisaron sus resultados de secuenciación en pacientes con cuadro clínico de SDS que en primera instancia resultaron negativos a mutaciones en el gen *SBDS*. Actualmente se tienen reportadas once mutaciones en la secuencia codificante de *EFL1* de las cuales siete se localizan en el dominio IV, dos en el dominio I, una en el dominio II, y una en el dominio III, no existen pacientes con mutaciones en el dominio V (Figura 4, Tabla 1)^{52 53 54}. La severidad del cuadro clínico es heterogéneo y dependiente de la mutación. El paciente con la mutación T127A, además de los síntomas clásicos, presentó alteraciones en la memoria visual, cognitiva y en habilidades de percepción. Las mutaciones L496F, I617V y K711R se describieron en pacientes que también presentaron mutaciones en *SBDS*, por lo que no se descarta que estas últimas sean responsables de la enfermedad⁵³. En el caso de pacientes con mutaciones heterocigotas compuestas (R754X/F505S, C883G/defecto de

expresión) los pacientes presentaron anomalías hematológicas, baja estatura, insuficiencia pancreática exocrina con severidad promedio ⁵⁴.

Tabla 1. Variantes en EFL1 asociadas con el Síndrome Shwachman-Diamond.

Mutación	Referencia	Genotipo
c.2645T>A p.M882K	[39]	Homocigota
c.3284G>A p.R1095Q	[39]	Homocigota
c.1486C>T p.L496F	[47]	Homocigota no patogénica
c.1849A>G p.I617V	[47]	Variantes en EFL1 y SBDS
c.2132A>G p.K711R	[47]	Variantes en EFL1 y SBDS
c.379A>G p.T127A	[48]	Homocigota
c.2260C>T p.R754 X / c.1514T>C p.F505S	[48]	Heterocigota
c.2647T>G p.C883G / defecto en la expresión	[48]	Heterocigota
c.2908C>T p.R970H	[48]	Homocigota
c.3205A>G p.T1069A / p.G827W fsTer13	[48]	Heterocigota
c.3205A>G p.T1069A/p.H30R	[48]	Heterocigota

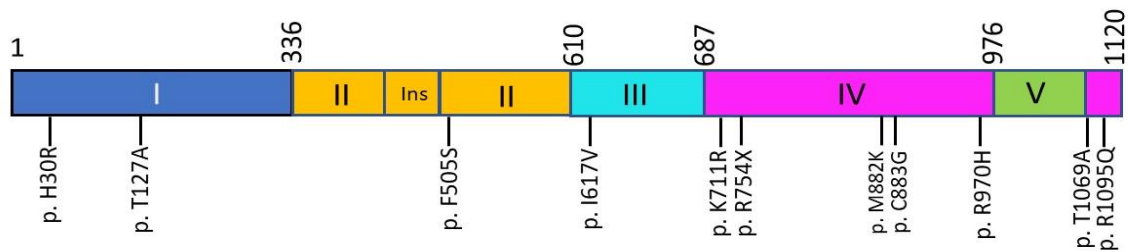


Figura 4. Posición de las variantes en la secuencia de la GTPasa EFL1 reportadas en pacientes con cuadro clínico de SDS.

2.7 Reconocimiento molecular

Se conoce como reconocimiento molecular al proceso por medio del cual las proteínas interactúan físicamente para realizar su función. El reconocimiento puede ser de diferente naturaleza y complejidad, el más conocido es de tipo proteína-proteína; sin embargo, ocurre en una amplia cantidad de moléculas. Por ejemplo, interacción con péptidos, ácidos nucleicos, complejos macromoleculares, lípidos, metales, solventes, etc. A las moléculas mencionadas anteriormente se les denomina ligandos, una proteína puede interactuar con otra proteína, con uno o varios ligandos al mismo tiempo o de forma secuencial para realizar su función.

Una vez que una proteína reconoce a un ligando se le denomina complejo al producto formado por la asociación entre ellos. La formación de un complejo depende de dos características. La primera es que la interacción debe ser específica, lo que implica que la proteína debe tener la capacidad de discriminar entre moléculas similares. La segunda es que el ligando debe poseer afinidad, esto significa que el reconocimiento debe ser posible aún en concentraciones de ligando bajas, de esta forma una o varias moléculas similares que se encuentren disponibles en altas concentraciones no serán capaces de sustituir el reconocimiento de un ligando específico. El reconocimiento molecular es la base de procesos biológicos fundamentales como la transducción de señales, alosterismo, estabilidad estructural etc. Para entender estos procesos, es necesario estudiar los mecanismos fisicoquímicos que rigen la interacción proteína-ligando, entendiendo la cinética y la termodinámica de los procesos de asociación-disociación.

2.7.1 Termodinámica en el reconocimiento molecular

Un complejo proteína-ligando en solución es un sistema termodinámico compuesto de solutos (proteína y ligando) y solvente. Dentro de este sistema existen interacciones complejas que se caracterizan por el intercambio de calor y la consecuente energía asociada que se rigen por las leyes de la termodinámica. De las técnicas disponibles que permiten la caracterización termodinámica de una interacción proteína-ligando, la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es la única capaz de obtener la afinidad de la proteína por su ligando (K_d) y el cambio de dos parámetros fundamentales que rigen el proceso de interacción: la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS). Entre las ventajas de utilizar ITC se encuentra que no es una técnica destructiva, no requiere reactivos especializados, tampoco se requiere inmovilización de los componentes o grupos químicos que funcionen como etiquetas y que potencialmente puedan interferir en el reconocimiento, lo anterior debido a que la señal que se mide es el calor liberado o absorbido en la interacción⁵⁵. Sin embargo, una de sus limitaciones es que para obtener un calor medible es necesario utilizar altas concentraciones de biomoléculas. Por ejemplo, si deseamos hacer un experimento de titulación con una proteína de peso molecular aproximado de 20,000 Da, la concentración mínima deberá ser de 25 nmol que equivale a una concentración aproximada de 0.5 mg en un volumen entre 200-250 μL . El volumen total de la preparación dependerá de la experiencia del usuario y características técnicas del experimento y del instrumento.

La firma termodinámica de un sistema se integra por los siguientes parámetros. La saturación fraccional también conocido como estequiometría (n), la constante de asociación (K_b), el cambio en la energía libre (ΔG_b), el cambio en la entalpía (ΔH_b), cambio en la entropía (ΔS_b) y el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p)⁵⁶. ITC es la única técnica que permite medir el ΔH_b , K_b , y n en un solo experimento. A continuación, se explica brevemente el significado y la interpretación de cada uno de estos parámetros.

La estequiometría (n) proporciona información sobre el número de sitios de unión que pueden ser reconocidos por un ligando. También es útil para conocer la calidad de una preparación cuando se elaboran protocolos de purificación y almacenamiento⁵⁷. La energía libre de Gibbs es un parámetro que nos proporciona información sobre el estado de un sistema. El ΔG_b mide la capacidad termodinámica de un sistema proteína-ligando para unirse en condiciones de temperatura y presión constantes (isotérmico-isobárico)⁵⁸. Un principio de la termodinámica establece que cuando un sistema alcanza el equilibrio la concentración de reactivos y productos y por lo tanto la constante de equilibrio que los relaciona, en este caso la K_b , no se modifica con el tiempo. Un valor de ΔG negativo indica que el proceso ocurre de forma espontánea y que en el equilibrio se encontrará una mayor concentración de producto⁵⁷. Si el valor del ΔG_b fuera positivo significaría que el proceso no es espontáneo y que requiere un cambio en los constituyentes o energía adicional para que se pueda llevar a cabo la formación de producto. Se puede considerar que el ΔG_b determina la estabilidad del complejo. La energía libre de Gibbs se relaciona con la constante de unión K_b y se define formalmente mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_b = -RT \ln K_b \quad (1)$$

donde R es la constante universal de los gases ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura en Kelvin. El análisis de la ecuación (1) nos permite hacer la siguiente observación. Entre más grande sea la constante de unión (K_b) más negativo será el valor de la energía libre de unión, esto es indicativo de que los parámetros cinéticos k_{on} , k_{off} y su cociente K_b determinan las propiedades termodinámicas del complejo. El ΔG_b también puede ser analizado como resultado de la contribución de la entalpía y entropía y se representa por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_b = \Delta H_b - T\Delta S_b \quad (2)$$

donde ΔH_b y ΔS_b representan el cambio en la entalpía y entropía una vez que se ha formado el complejo proteína-ligando y T es la temperatura en Kelvin.

En el estudio del reconocimiento molecular, la entropía (ΔS) se interpreta como el cambio en los grados de libertad del sistema. La entropía es el concepto central de la segunda ley de la termodinámica el cual establece que la energía térmica mantiene un flujo espontáneo de las regiones de mayor a las de menor temperatura. En un sistema proteína-ligando a presión y temperatura constante la entropía se origina por la energía acumulada en los enlaces de átomos y moléculas, el cambio en la distribución de energía genera fluctuaciones en el rompimiento y formación de enlaces débiles, así como en la rotación de cadenas laterales. Estos cambios ocurren cuando la proteína se une al ligando a través de cambios conformacionales que pueden ocurrir en estos constituyentes y en la interacción con el solvente⁵⁹. La difusión de la energía se refleja en un incremento o disminución de la libertad rotacional que genera una ganancia o pérdida de los grados de libertad de los componentes involucrados, la acumulación de estos cambios se conoce como el cambio en la entropía y se representa formalmente como ΔS ^{60 61}. El cambio en la entropía de unión (ΔS_b) se integra por la sumatoria de tres contribuciones de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta S_b = \Delta S_{conf} + \Delta S_{solv} + \Delta S_{r-t} \quad (3)$$

A continuación, se define cada uno de los parámetros que integran el ΔS_b . El cambio en la entropía conformacional (ΔS_{conf}) se origina por la rotación de enlaces sencillos que se “congelan” durante la formación del complejo, estos enlaces tienen la capacidad de rotar cuando la proteína y el ligando no se han unido en un complejo. La segunda es la entropía de solvatación (ΔS_{solv}), su origen está dado por el cambio en los grados de libertad de moléculas de solvente que se liberan de la superficie del complejo proteína-ligando una vez que estos interactúan. La tercera es el cambio en la entropía roto-traslacional (ΔS_{r-t}) que representa la pérdida en los grados de libertad de la proteína y el ligando cuando se ha formado el complejo debido a la disminución en el número de partículas en solución. El ΔS_{r-t} se ha estimado en $\sim -8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para una asociación bimolecular^{62 63}.

La entalpía de unión (ΔH_b) es una medida del cambio de energía total de un sistema. Se considera energía total a la sumatoria de la energía interna del soluto, del solvente y la energía necesaria para que el sistema interactúe a presión y volumen constantes⁶⁰. Al igual que la entropía, la entalpía

no puede ser medida directamente, lo que medimos es un cambio de un estado inicial a un estado final. La entalpía de unión es una medida del cambio en la energía involucrada en la formación o rompimiento de enlaces débiles (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno etc.). Estos cambios se dan en las interacciones proteína-solvente, ligando-solvente, solvente-solvente y proteína-ligando, siendo la reorganización del solvente en la interfaz de unión la que más contribuye al ΔH_b . La formación de interacciones energéticamente favorables es un proceso exotérmico que se refleja en un signo del ΔH_b negativo. Por el contrario, el rompimiento de interacciones no covalentes energéticamente favorables es un proceso endotérmico que se refleja en un ΔH_b de signo positivo ⁶⁴.

La capacidad calorífica (ΔC_p) representa la magnitud de las fluctuaciones en la entalpía de un sistema y es una medida del efecto hidrofóbico ⁶⁵. El efecto hidrofóbico es un concepto que describe el cambio en la termodinámica por ocultamiento o exposición de una superficie no polar expuesta al solvente cuando ocurre el reconocimiento molecular ⁶⁶. La interacción proteína-ligando induce rearrreglos conformacionales que alteran el área expuesta al solvente (ASA), esta puede ser de tipo polar (ASA_p) o no polar (ASA_{ap}). El área no polar que se expone al solvente una vez que ocurre la interacción determina el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). Si en la formación del complejo proteína-ligando predomina la exposición al solvente de grupos no polares (ΔASA_{ap}), el ΔC_p tiende hacia un valor positivo. Si el rearrreglo conformacional induce la exposición de grupos polares (ΔASA_p), la tendencia será hacia un valor negativo. De acuerdo a modelos paramétricos ⁶⁷, el ΔC_p sigue una tendencia lineal de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta C_p_b = \alpha \Delta ASA_{ap} + \beta \Delta ASA_p \quad (4)$$

El ΔC_p_b puede ser disectado en dos contribuciones, una relacionada con los cambios conformacionales de las moléculas que interactúan (ΔC_p^{conf}) y la otra relacionada con la cantidad de superficie que se oculta en la interface ⁶⁸. Esta última contribución corresponde a el cambio observado si la unión da origen a una asociación de cuerpo rígido (ΔC_p^{rb})

$$\Delta C_p_b = \Delta C_p^{conf} + \Delta C_p^{rb} \quad (5)$$

El ΔC_p^{rb} puede obtenerse analizando las estructuras 3D del complejo involucrado, para obtener más información sobre esta metodología puede consultarse ⁶⁹. El ΔC_p^{rb} representa una proporción de la capacidad calorífica de unión total. El ΔC_p^{rb} y el ΔC_p^b se utilizan para calcular el ΔC_p^{conf} de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\Delta C_p^{conf} = 0.45 f_{ap} \Delta ASA_t - 0.26(1 - f_{ap}) \Delta ASA_t \quad (6)$$

Donde f_{ap} representa el promedio de hidrofobicidad ($f_{ap} = 0.68$) ⁶⁷. De la misma forma existen otros factores que contribuyen al cambio en la capacidad calorífica tal como la exposición de cargas electrostáticas o la ruptura de interacciones débiles (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La magnitud de este cambio determinará el signo del ΔC_p ⁶⁷.

Tabla 2. Signos esperados para los valores de ΔC_p y ΔS_b para la interacción proteína-ligando.

Para un aumento en	ΔC_p	ΔS_b
Exposición de grupos no polares	+	-
Exposición de cargas electrostáticas	-	-
Puentes de hidrógeno	+	-
Conformación (isoenergética)	0	+
Interacciones débiles	+	+

2.7.2 Cinética enzimática

Cuando una enzima cataliza la conversión de sustrato a producto la velocidad de reacción (v) depende de la concentración de sustrato $[S]$ y se describe por medio de una ecuación simple conocida como ecuación de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{k_{cat} [S]}{K_m + [S]} E_t \quad (7)$$

Cuando la concentración de sustrato es mucho más grande que la K_m ($[S] \gg K_m$) la ecuación 7 se simplifica a:

$$v = k_{cat} E_t \quad (8)$$

Bajo esta condición la reacción es de primer orden, eso significa que la velocidad de reacción depende únicamente de la concentración de enzima (E_t) no de la concentración de sustrato. Por lo tanto, k_{cat} es una constante de primer orden con unidades de *tiempo*⁻¹ y se conoce también como “número de recambio”. Este parámetro indica el número de moléculas de sustrato que la enzima puede convertir a producto por unidad de tiempo. De la misma forma $k_{cat} E_t$ es la velocidad máxima de reacción (V_{max}) a la que la enzima puede trabajar en condiciones experimentales.

Cuando la concentración de sustrato es mucho menor que la K_m ($[S] \ll K_m$) la ecuación 7 se simplifica de la siguiente forma:

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m [S]} E_t \quad (9)$$

En estas condiciones la reacción es de segundo orden, esto significa que la reacción es proporcional a la concentración de sustrato y a la concentración de enzima. Por lo tanto, el parámetro k_{cat} / K_m es una constante de velocidad de segundo orden con unidades de *Concentración*⁻¹ *tiempo*⁻¹. La constante de Michaelis (K_m) corresponde a la concentración de sustrato a la cual la mitad de la concentración de la enzima se encuentra saturada (Figura 5).

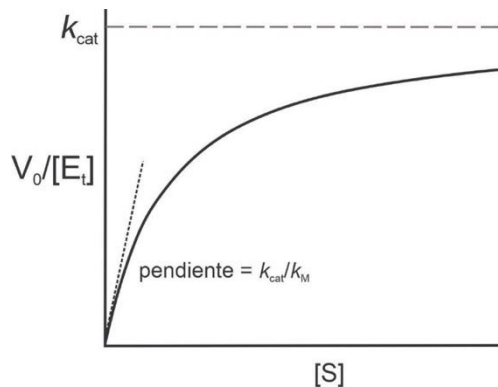


Figura 5. Gráfico de V_o/E_t en función de la concentración de sustrato $[S]$ de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten. A concentraciones saturantes de $[S]$, V_o/E_t se aproxima a k_{cat} (adaptado de Chiwook, P. 2022)

De la información anterior podemos extraer un concepto muy útil en cinética enzimática y este es que la K_m es una constante de disociación aparente. La forma simplificada de explicar lo anterior es por medio de un esquema en donde una proteína P y un ligando L con mutua afinidad se reconocen en solución, esta interacción se representa a través de la siguiente fórmula:



donde PL representa el complejo proteína-ligando, k_{on} y k_{off} son las constantes cinéticas que definen la velocidad de asociación y disociación del complejo PL. Las unidades de k_{on} y k_{off} son $Concentración^{-1} tiempo^{-1}$ y $tiempo^{-1}$ respectivamente. En equilibrio la reacción de asociación $P+L \rightarrow PL$ debe ser correspondida por la reacción $PL \rightarrow P+L$ que se representa de la siguiente forma:

$$k_{on} [P][L] = k_{off} [PL] \quad (11)$$

En esta ecuación, las variables en corchetes representan la concentración de cualquier molécula en el equilibrio, la constante de unión K_b en unidades $Concentración^{-1}$ es definida de la siguiente forma.

$$K_b = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad (12)$$

El inverso de la K_b es la constante de disociación K_d , que tiene unidades de concentración. Esta constante representa la afinidad que tiene un ligando por una enzima. Una velocidad de unión rápida dividida entre una velocidad de disociación lenta nos dará como resultado una K_b grande. Por el contrario, una velocidad de disociación rápida y una velocidad de asociación lenta, nos dará una K_b pequeña.

2.7.3 Espectroscopía de fluorescencia

La absorción de un fotón genera una transición electrónica de un estado basal a un estado excitado. Cuando una molécula se encuentra en un estado electrónicamente excitado, la energía eventualmente se disipa para regresar al estado basal. La absorción de un fotón ocurre a una velocidad muy alta ocasionando una transición desde un nivel vibracional basal (S_0) a un estado vibracional alto (S_1, S_2). Cuando el fotón regresa de un estado excitado al estado basal, la luz que se emite se conoce como fluorescencia.

La energía de excitación puede ser disipada por vías en donde no existe emisión de energía, estos mecanismos pueden ser liberación de calor, interacción con moléculas de solvente, colisión con

otras moléculas, o energía de resonancia por la interacción con otro fluoróforo. Un fluoróforo puede ser endógeno por ejemplo, un aminoácido aromático en una proteína, o exógeno, esto es introducido al sistema. Estos pueden ser proteínas fluorescentes codificadas genéticamente o etiquetas químicas. En un experimento de fluorescencia, la señal obtenida nos indica el número de fotones emitidos a una longitud de onda cuando la molécula es irradiada en una banda de absorción. La forma del espectro de excitación de una molécula es generalmente la misma que la del espectro de absorción.

Un concepto importante en la espectroscopía de fluorescencia es el rendimiento cuántico de un fluoróforo, que corresponde al número de fotones emitidos como fluorescencia en relación con el número de fotones absorbidos por la molécula.

$$\phi = \frac{\text{Fotones emitidos}}{\text{Fotones absorbidos}} \quad (13)$$

Un fluoróforo con un rendimiento cuántico de 1.0 emite todos los fotones absorbidos en forma de fluorescencia. La vida media de un fluoróforo puede ser estimada multiplicando el coeficiente de absorción a la longitud de onda de excitación por el rendimiento cuántico de la fluorescencia. La comparación de la intensidad de fluorescencia con la intensidad de emisión de un fluoróforo cuyo rendimiento cuántico se encuentra disponible en la literatura es una forma de expresar el rendimiento cuántico relativo. En la literatura se encuentran listas de fluoróforos estándar con su respectivo rendimiento cuántico ⁷⁰.

La intensidad de fluorescencia observable (I_f) depende de la longitud de onda, que a su vez se relaciona con el rendimiento cuántico y la densidad óptica. A una longitud de onda dada λ (generalmente el máximo de emisión) la I_f se define como:

$$I_f = I_0 \Phi (1 - 10^{-\epsilon c l}) \approx 2.303 I_0 \Phi \epsilon c l \quad (14)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz de excitación, ϵ es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de excitación, c es la concentración molar y l es el paso óptico de luz (generalmente 1 cm). Esta ecuación sigue la ley de Beer-Lambert donde $A = \epsilon c l$, siendo A la absorción de luz de la muestra a la longitud de onda de excitación. Este concepto es la premisa del tratamiento

cuantitativo de los datos de fluorescencia y significa que la intensidad observable será la suma de la contribución de todas las especies de fluorescencia.

Dependiendo de las condiciones del experimento es posible excitar selectivamente al ligando, a la proteína o al complejo una vez que se ha formado. Entre las desventajas de este método se encuentra que el espectro de emisión puede traslaparse resultando en una combinación de señales de fluorescencia que necesitan ser disectadas por medio de un análisis cuantitativo que no siempre es fácil de obtener.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la biogénesis ribosomal permite entender un proceso fundamental en la fisiología celular, como lo es la síntesis de ribosomas. Hasta principios de la década de los 90 se tenía la noción de que mutaciones en alguna de las proteínas ribosomales o factores que participan en la síntesis eran incompatibles con la viabilidad celular. Sin embargo, esto cambió a partir del estudio genético y molecular de muestras de pacientes con cuadros clínicos atípicos, y cuyas alteraciones genéticas se encontraron en componentes del ribosoma mismo o biomoléculas que participan en su síntesis ⁷¹.

EFL1 es una GTPasa que participa en el último paso de la maduración citoplasmática de la pre-subunidad ribosomal 60S y que en conjunto con la proteína SBDS facilitan la liberación del factor antiasociación eIF6, un paso fundamental para que la subunidad mayor pueda unirse a la subunidad menor y ensamblar el ribosoma funcional. Mutaciones en SBDS y EFL1 son causantes del Síndrome Shwachman-Diamond. Nuestro grupo de investigación describió por primera vez las mutaciones en EFL1 (R1095Q y M882K) que causan este síndrome (Figura 6) ⁵². Usando el ortólogo de la levadura *S. cerevisiae* Efl1 R1086Q, equivalente a R1095Q en humanos, se demostró que la proteína se encuentra plegada y presenta actividad enzimática. Sin embargo, estudios de dinámica molecular y dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS) sugirieron que la proteína mutante adopta una conformación diferente a la que presenta la EFL1 nativa ⁷². Esto último podría constituir una de las alteraciones en el desarrollo de la enfermedad que hasta ahora se desconocen. Estudios previos en nuestro grupo determinaron las constantes termodinámicas y de unión para Efl1 silvestre por sus moléculas efectoras ⁶⁹, por lo que en este trabajo nos avocamos a realizar un análisis comparativo con la mutante R1086Q y establecer sí las constantes de interacción se

modifican, cuál es la magnitud del cambio y así hacer inferencias acerca de la alteración molecular en esta mutante. En particular, el análisis comparativo del parámetro de ΔC_p nos permitió determinar diferencias en los cambios conformacionales entre la proteína silvestre y la mutante, así como su magnitud al interactuar con los nucleótidos de guanina y Sdo1.

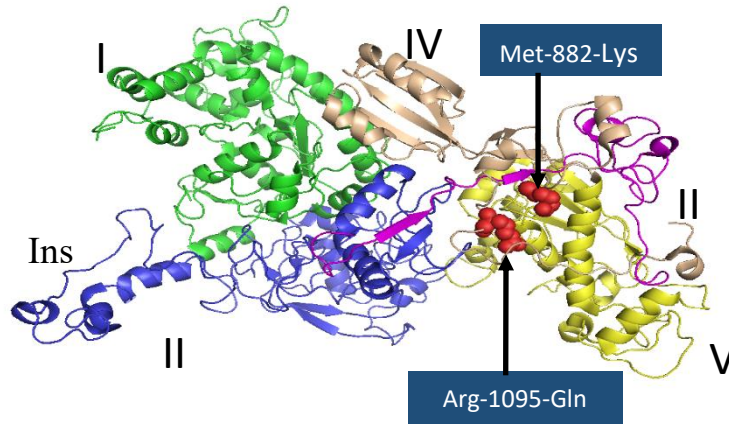


Figura 6. Modelo de la GTPasa EFL1 humana en donde se muestran los cinco dominios estructurales de la proteína, así como la posición de las mutaciones R1095Q y M882K en el dominio IV, estas mutaciones son equivalentes a Efl1 R1086Q y L910K en *S. cerevisiae* que son objeto del presente estudio (PDB 5ANC).

4 PREGUNTAS A RESPONDER

¿Qué efecto tiene la mutación R1086Q en el funcionamiento de la GTPasa Efl1?

¿Podemos observar un cambio en las constantes termodinámicas, cinéticas o de unión cuando la mutante interactúa con alguno de sus ligandos?

Sí existe algún cambio ¿de qué magnitud es comparado con los estudios reportados para Efl1 silvestre?

¿La mutación afecta algún mecanismo en su funcionamiento? Sí afecta algún mecanismo ¿Cuál es?

5 HIPÓTESIS

Si la mutación R1086Q afecta algún mecanismo relacionado con el funcionamiento de la GTPasa Efl1, entonces se observará una diferencia en los parámetros termodinámicos de unión con sus moléculas efectoras (los nucleótidos de guanina, SBDS y/o la subunidad ribosomal 60S), en contraste con los parámetros determinados para Efl1 silvestre.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Entender los mecanismos bioquímicos que afectan las mutaciones R1086Q y L910K en el funcionamiento de la GTPasa Efl1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2 Objetivos particulares

- Calcular los parámetros ΔG_b , ΔH_b , $-T\Delta S_b$, ΔC_p_b (firma termodinámica) utilizando la técnica de calorimetría de titulación isotérmica para la interacción de la GTPasa Efl1 R1086Q sola y en complejo con su proteína efectora Sdo1 con los nucleótidos de guanina.
- Medir la hidrólisis de GTP determinando los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m de las mutantes Efl1R1086Q y L910K solas y en presencia de Sdo1.
- Determinar la afinidad (K_d) de Efl1 silvestre y mutante R1086Q por nucleótidos de guanina en presencia del complejo Sdo1•60S.

7 METODOLOGÍAS

7.1 Sobreexpresión y purificación de biomoléculas

7.1.1 Efl1 y mutantes

Las secuencias codificantes de Efl1 silvestre, mutantes R1086Q, L910K, T33A y la doble mutante R1086Q-P151L fueron clonadas previamente en el vector pRS426 bajo el control del promotor híbrido GAL1/10. La expresión y purificación de las proteínas se realizó de acuerdo al protocolo publicado en ⁷³. A continuación, se describe brevemente este proceso. Una colonia de *S. cerevisiae* BCY123 previamente transformada con el plásmido correspondiente se inoculó en 50 mL de medio líquido SD-Ura suplementado con 2% de glucosa y se dejó crecer durante la noche en agitación constante a 30 °C 200 rpm. El preinóculo se dividió en cinco matraces con 1 L de medio SD-Ura suplementado 0.5% de glucosa y una densidad óptica a 600 nm de 0.1 para iniciar el cultivo. Los matraces se incubaron 8 horas en agitación constante a 30 °C 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 para inducir con 2.8% de galactosa. La inducción se dejó por 20 h en agitación

constante a 30 °C 200 rpm. El cultivo se cosechó por centrifugación a 3,836 x g durante 10 min y el paquete celular se almacenó en tubos con capacidad de 50 mL a -40°C hasta su procesamiento. El paquete celular se descongeló y resuspendió en 30 mL de amortiguador de lisis (50 mM Hepes pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 30 mM Imidazol, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol). La suspensión de células se lisó por fricción con perlas de vidrio (Ø = 500 µm) humectadas con amortiguador de lisis en un contenedor con capacidad de 80 mL utilizando un equipo Bead-Beater (BioSpec). Cada ciclo consistió en dos minutos de lisis, por diez de descanso para un tiempo de lisis total de 10 min. Durante todo el proceso el contenedor se mantuvo en frío. El lisado se centrifugó 20 minutos a 23,281 x g cuyo el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm (Merck Millipore). Esta fracción soluble se purificó a través de una columna empacada con una resina de afinidad a iones de Ni²⁺ con capacidad de 5 mL (GE Healthcare). La columna se equilibró previamente con tres volúmenes de columna utilizando solución amortiguadora de lisis. La proteína unida a la resina se lavó en la columna utilizando 1 volumen de amortiguador de alta sal (50 mM Hepes pH 8.0, 2 M NaCl) a continuación se eluyó con tres volúmenes de columna de solución amortiguadora de elución (50 mM Hepes pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 300 mM Imidazol, 10% glicerol). Como segundo paso de purificación, el producto de la elución de la columna de afinidad a iones de Ni²⁺ se purificó utilizando una cromatografía de filtración en gel en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare) montada en un equipo AKTA start (GE Healthcare). La pureza de las muestras se verificó por medio de electroforesis SDS-PAGE. Las muestras se dispensaron en alícuotas de 150 µL, se congelaron utilizando nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C para su posterior uso.

7.1.2 Sdo1

La secuencia codificante de la proteína Sdo1 fue previamente clonada en el vector pRSET-A (Invitrogen) y su expresión recombinante se realizó en *E. coli* C41 conforme al protocolo reportado en ⁷⁴. Se inoculó una colonia en 50 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, y se incubó a 37°C toda la noche en agitación constante. Al día siguiente se escaló el preinóculo en 1 L de medio LB con 100 µg/mL ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0.8 se indujo la expresión con 0.5 mM de IPTG durante 5 h a 37°C en agitación constante. El cultivo se cosechó por centrifugación a 3,836 x g durante 10 min a 4°C.

El paquete celular se resuspendió en 25 mL de solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 20 mM Imidazol) y se lisó por medio de sonicación utilizando un equipo Sonicator 3000 (Misonix Inc.) a una potencia de 5.5 watts con ciclos de 15 s encendido por 90 s apagado, el tiempo efectivo de lisis fue de 5 min. El lisado se clarificó por centrifugación a 23,281 x g durante 30 min y se filtró usando una membrana de 0.45 μ m (Merck Millipore). La fracción soluble se purificó mediante una cromatografía de afinidad a iones de Ni²⁺ (GE Healthcare, 5 mL), previamente equilibrada con amortiguador de lisis y se eluyó con amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 250 mM NaCl, 300 mM Imidazol). Posteriormente se purificó mediante una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna S FF (GE Healthcare, 5 mL) montada en un equipo AKTA start (GE Healthcare). La pureza de la proteína se verificó mediante electroforesis SDS-PAGE, el producto de la elución se dispensó en alícuotas de 150 μ L, que fueron congeladas utilizando nitrógeno líquido, el lote se almacenó a -80°C.

7.1.3 Subunidades ribosomales 60S

Las subunidades ribosomales 60S se purificaron a partir la cepa *S. cerevisiae* JD1370 (*MATa trp1 ura3 leu2 pep4::HIS3 nuc1::LEU2*)⁷⁵. El protocolo se modificó a partir del descrito por *Algire et al*⁷⁶. Se cultivó 1 L de medio YEPD en agitación constante a 30 °C/200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.8 - 1.0. A continuación se detuvo la síntesis proteica enfriando abruptamente en hielo/agua mediante agitación constante durante 10 min, al mismo tiempo se adicionaron 100 μ g/mL de cicloheximida. El cultivo se cosechó por centrifugación a 3,836 x g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se lavó con 10 mL de agua destilada, se centrifugó nuevamente para retirar el líquido. La pastilla se guardó a 4 °C para su procesamiento. La pastilla se resuspendió en 8 mL de amortiguador de lisis (100 mM acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM acetato de magnesio, 1 mg/ mL heparina, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 0.5 mM EDTA). La lisis se realizó por fricción con perlas de vidrio en un equipo homogenizador FastPrep (Fisher Scientific) aplicando 6 ciclos de 30 s encendido por 5 min de descanso, todo el proceso de lisis se elaboró en frío. El lisado se centrifugó durante 20 min a 19,700 x g a 4 °C y se purificó en un colchón de sacarosa mediante centrifugación a 222,529 x g dos horas en un rotor Ti70 (Beckman Coulter). La pastilla se resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora de alta sal (100 mM Acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM acetato de magnesio, 800 mM cloruro de potasio, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 0.5 mM EDTA) durante 1

h en frío con agitación constante para purificarse nuevamente por centrifugación en un colchón de sacarosa. La pastilla se resuspendió en solución amortiguadora de disociación (50 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 μ M cloruro de magnesio, 800 mM cloruro de potasio, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina) y se dejó reposar en frío y agitación constante durante 1 hora para disociar las subunidades ribosomales. A continuación, se cargaron entre 50-80 densidades ópticas medidas a 260 nm en tubos previamente preparados con un gradiente lineal de sacarosa del 10-40% (50 mM Hepes KOH pH 7.4, 10 μ M $MgCl_2$, 2 mM DTT, 500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 47 % sacarosa w/v, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina) que se centrifugó durante 6 h a 70,358 x g utilizando un rotor Ti45 (Beckman Coulter) a una temperatura de 4°C. El gradiente se fraccionó monitoreado la señal a una longitud de onda de 254 nm y se colectó la fracción correspondiente a la subunidad 60S. Esta última fue trasvasada a tubos para el rotor Ti70 y se centrifugó a 222,529 x g por 3 h. La pastilla se resuspendió en solución amortiguadora de almacenamiento (100 mM acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 2.5 mM acetato de magnesio, 250 mM sacarosa, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina), y se dispensó en alícuotas de 50 μ L a -80°C. La concentración se determinó diluyendo 5 μ L de la muestra en 100 μ L de solución amortiguadora de almacenamiento midiendo la absorbancia a 254 nm y utilizando un coeficiente de absortividad molar de $4 \times 10^7 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ⁷⁶.

7.2 Calorimetría de titulación isotérmica

Las muestras de proteína para los experimentos de calorimetría se prepararon a una concentración de 60-80 μ M para Efl1 R1086Q o doble mutante y 90-120 μ M para Sdo1. Las muestras de Efl1 fueron purificadas y utilizadas el mismo día del experimento. La muestra de Sdo1 se descongeló y centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm para eliminar posibles agregados. Los experimentos de ITC se realizaron en un equipo iTC₂₀₀ System (Malvern Panalytical). Antes de cada experimento se hizo un recambio de solución amortiguadora utilizando 30 mL para cada muestra de proteína usando unidades de ultrafiltración Amicon® Ultra 15 (Millipore) con corte de 100 kDa para las muestras de Efl1 R1086Q y 10 kDa para las muestras de Sdo1. El GTP y el GDP se pesaron y disolvieron en la misma solución utilizada para el recambio de las muestras proteicas. Para los experimentos con Mg^{2+} se utilizó $MgCl_2$ a una concentración de 5 mM. Para los experimentos libres de Mg^{2+} se utilizó EDTA a una concentración de 2 mM para eliminar trazas de iones metálicos en solución. Antes del experimento la muestra fue desgasificada por 10 min en un equipo Microcal Thermovac (Malvern Panalytical). El proceso de titulación consistió en un rango entre 15 y 20 inyecciones

consecutivas con un intervalo de 3 a 5 minutos entre inyección y una velocidad de agitación de 700 rpm. La constante de unión (K_b), el cambio en la entalpía (ΔH_b) y la estequiometría (n), fueron determinados por medio del ajuste de los valores de las isothermas a un modelo de un sitio de unión.

7.3 Espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario

Se midió la constante de disociación (K_d) para la interacción de análogos fluorescentes de guanina derivatizados con el grupo mant- (metyl-antraniloyl) con Efl1 R1086Q en complejo con Sdo1•60S. El protocolo se elaboró titulando un volumen fijo del mant-nucleótido hasta alcanzar una concentración final de 0.3 M. La unión del mant-nucleótido fue monitoreada registrando su señal de fluorescencia. La longitud de onda de excitación fue de 355 nm, la emisión se registró a una longitud de onda de 440 nm para mant-GTP y 445 para mant-GDP. La dilución al final de cada titulación no fue mayor al 2.5% del volumen inicial. El blanco se obtuvo registrando la señal de emisión del experimento de titulación con todos los componentes excepto Efl1 R1086Q, el blanco se sustrajo del experimento de titulación con Efl1 R1086Q. Los datos de emisión fueron analizados y ajustados a un modelo de un sitio de unión utilizando el programa Origin versión 5.0 (Origin Lab. Co).

En una serie de experimentos previos se estableció la proporción estequiométrica de Sdo1 y subunidad ribosomal 60S respecto a la concentración de Efl1R1086Q. La proporción se calculó midiendo la liberación de fosfato manteniendo constante la concentración de Efl1R1086Q e incrementando la concentración de Sdo1, posteriormente se mantuvo constante la concentración del complejo Efl1R1086Q•Sdo1 y se midió la liberación de fosfato incrementando la concentración de subunidad ribosomal 60S. Las curvas de saturación muestran que la proporción óptima para realizar los experimentos de fluorescencia es 0.1 μ M, 0.3 μ M, 0.2 μ M de Efl1 R1086Q, Sdo1, 60S respectivamente (Figura 7).

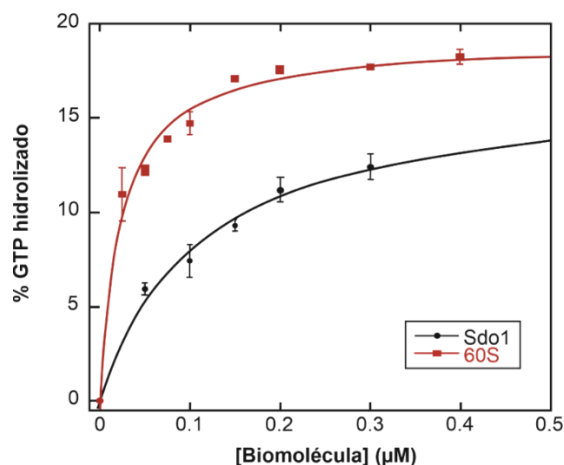


Figura 7. Curvas de actividad para los complejos Efl1•Sdo1 y Efl1•Sdo1•60S. La línea en color negro muestra el porcentaje de GTP hidrolizado utilizando una concentración de 0.1 μM de Efl1 R1086Q incrementando la concentración de Sdo1. La línea en color rojo muestra el porcentaje de GTP hidrolizado manteniendo una concentración fija de 0.1 μM de Efl1 R1086Q, 0.3 μM de Sdo1 y aumentando la concentración de la subunidad ribosomal 60S. Cada curva corresponde al promedio y desviación estándar de tres ensayos independientes.

7.4 Cinética enzimática

Para medir la actividad de la mutante Efl1 R1086Q y Efl1 L910K se utilizó un ensayo enzimático acoplado previamente descrito por Webb *et al.*⁷⁷. En este ensayo, la enzima PNP (purina nucleósido fosforilasa) utiliza al ion fosfato liberado de la hidrólisis de GTP y al MESG (2-amino-6-mercapto-7-metilpurin ribonucleósido) como sustratos para producir ribosa-1-fosfato y AMMP (2-amino-6-mercapto-7-metilpurina), que presenta un máximo de absorción a 360 nm. La lectura de absorbancia se hizo utilizando un espectrofotómetro Cary60 UV-Vis (Agilent Technologies). Cada reacción se hizo en un volumen de 100 μL , la concentración para cada reactivo fue 6 μM de Efl1 R1086Q o Efl1 L910K, 0.3 mM de MESG, 1.0 U de PNP y las cantidades indicadas de GTP como sustrato. Para las mediciones en presencia de Sdo1 se utilizó una concentración de 18 μM . La concentración de fosfato liberado en cada reacción fue estimada utilizando un coeficiente de absortividad molar a 360 nm de 14,386 M^{-1} . Los datos cinéticos fueron analizados utilizando una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el programa Origin versión 5.0 (Origin Lab. Co).

7.5 Espectroscopía de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro Chirascan V100 (Applied Photophysics) equipado con sistema de control de temperatura. La muestra de proteína fue de 0.5 μM , la lectura se hizo utilizando una celda de cuarzo con un paso de luz de 1 mm. Las mediciones se realizaron 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 se le restó el espectro del blanco que corresponde a la señal de la solución amortiguadora sin proteína. Los valores observados se transformaron a valores de elipticidad molar media utilizando la siguiente ecuación:

$$[\theta] \times 10^{-3} (\text{miligrados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{CD_{\text{obs}} \cdot 10^{-3}}{l_{(\text{mm})} \cdot [\text{Proteína}] (\mu\text{M}) \cdot R} \quad (15)$$

Donde: Θ es la elipticidad molar media, CD_{obs} corresponde a señal obtenida del equipo, l es el paso de luz y R es el número de residuos de aminoácidos que contiene la proteína.

8 RESULTADOS

8.1 Obtención de las biomoléculas utilizadas en este trabajo

La GTPasa Efl1 en versiones silvestre, mutantes R1086Q, L910K, T33A y doble mutante R1086Q-P151L se purificaron utilizando dos cromatografías secuenciales. La primera fue una cromatografía de afinidad a iones de Ni^{2+} y la segunda una cromatografía de filtración en gel. El proceso de purificación se monitoreó mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE para cada uno de los pasos. La banda en el carril de la extrema derecha de cada panel de la Figura 8 corresponden a la proteína Efl1 o mutantes (127 kDa) de los diferentes pasos cromatográficos realizados durante la purificación por cromatografía de afinidad. Mientras que la Figura 9 ilustra la purificación de Efl1 R1086Q mediante cromatografía de filtración en gel. En el primer carril de izquierda a derecha se observa la muestra concentrada que se utilizó en los subsecuentes experimentos. La Figura 10 muestra las diferentes etapas de la purificación de Sdo1.

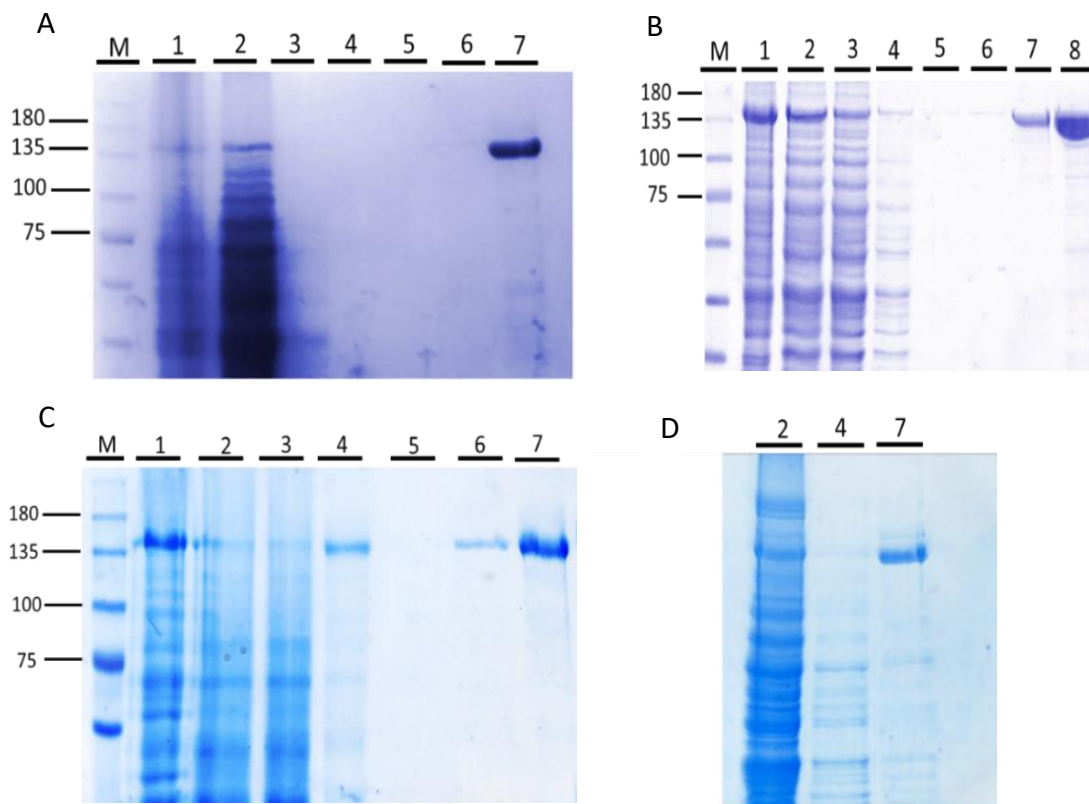


Figura 8. Purificación de la proteína Efl1 R1086Q y mutantes. Electroforesis SDS-PAGE al 7.5% correspondiente a la purificación mediante una cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} . A) Efl1 silvestre. B) Efl1 R1086Q. C) Doble mutante Efl1 R1086Q+P151L. D) Efl1 L910K. Carril: 1 – fracción insoluble, 2 – fracción soluble, 3 – fracción no retenida, 4 – primer lavado con Amortiguador de lisis, 5 – lavado con Amortiguador de alta sal, 6 – segundo lavado con Amortiguador de lisis, 7 – elución, 8 – proteína concentrada. En todos los casos la banda del primer carril de derecha a izquierda para cada uno de los paneles corresponde a la proteína Efl1 silvestre o mutantes con un peso molecular aproximado de 127 kDa.

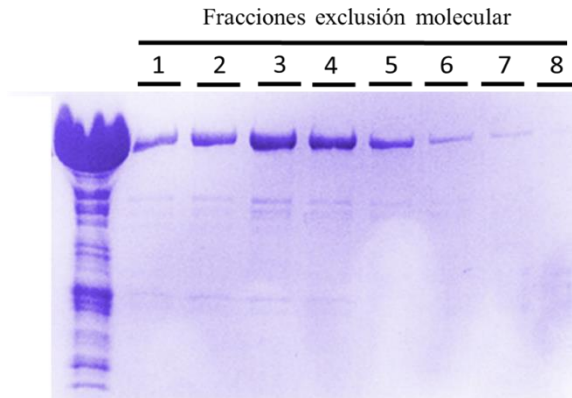


Figura 9. Purificación de la proteína Efl1 R1086Q mediante cromatografía de filtración en gel. Electroforesis SDS-PAGE al 7.5 %. De izquierda a derecha se observa la muestra concentrada y las fracciones eluidas de la columna. El peso molecular esperado es de 127 kDa.

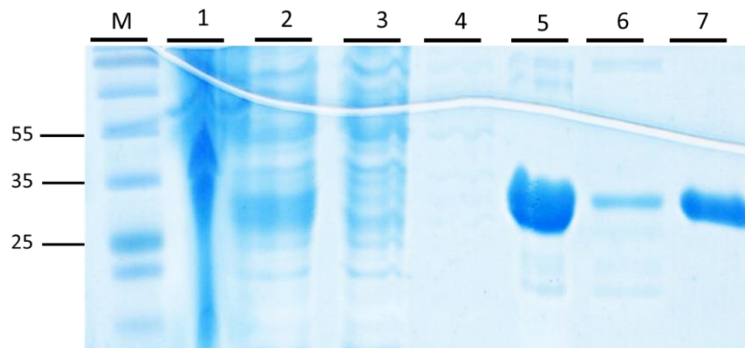


Figura 10. Purificación de la proteína Sdo1. Electroforesis SDS-PAGE al 12 %. M: marcador de peso molecular. Carril: 1 – fracción insoluble, 2 – fracción soluble, 3 – lavado con amortiguador de lisis, 4 – lavador con amortiguador de alta sal, 5 – elución de la cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} , 6 – fracción no retenida por la columna de intercambio catiónico, 7 – elución de la columna de intercambio catiónico. La banda del carril 7 corresponde a la proteína pura con un peso molecular aproximado de 30 kDa.

El aislamiento de subunidades ribosomales 60S de levadura fue realizado a partir de la cepa *S. cerevisiae* JD1370 que es una cepa deficiente en proteasas y nucleasas. Los ribosomas que fueron previamente disociados en sus dos subunidades se separaron por ultracentrifugación en un gradiente lineal de sacarosa del 10-40 %. La Figura 11A muestra el perfil de disociación característico donde el pico mayoritario corresponde a la subunidad 60S y el minoritario a la subunidad 40S. En el panel B se muestra la integridad de las proteínas de la subunidad 60S, con lo que se infiere que la subunidad ribosomal mantiene su estructura y se encuentra en condiciones para realizar los experimentos respectivos

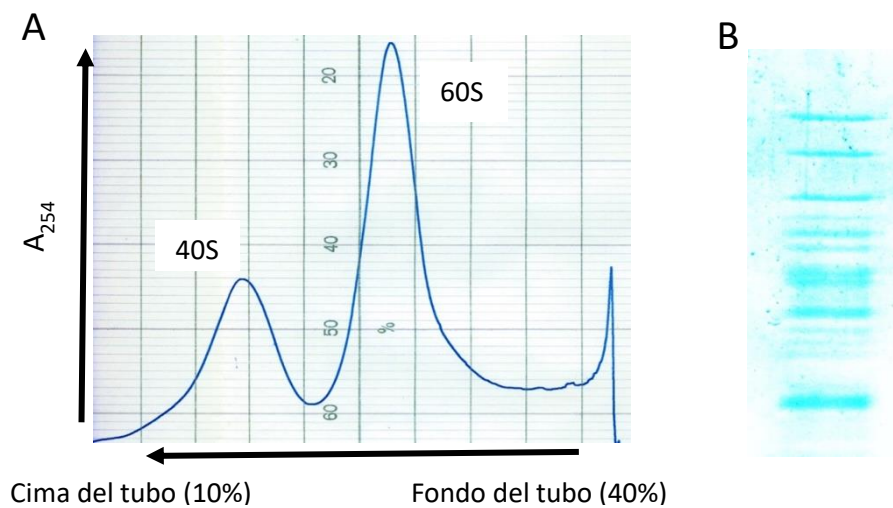


Figura 11. Purificación de subunidades ribosomales 60S por centrifugación diferencial. (A) Fraccionamiento de las subunidades ribosomales separadas en un gradiente lineal de sacarosa. (B) Electroforesis SDS-PAGE al 12% de las proteínas presentes en la fracción ribosomal 60S.

8.2 Energética de la interacción entre la mutante Efl1 R1086Q y los nucleótidos de guanina

Para la caracterización termodinámica de la mutante Efl1 R1086Q con los nucleótidos de guanina, así como la evaluación del efecto del magnesio, se realizaron experimentos utilizando la técnica de calorimetría de titulación isotérmica la cual nos permitió estimar el ΔG_b , ΔH_b , $-T\Delta S_b$, ΔC_{p_b} . La Figura 12 paneles A-B muestra ejemplos representativos de las isotermas de unión para la interacción de la GTPasa mutante con GTP, GDP, MgGTP y MgGDP. Para la unión con GTP y MgGTP el proceso de unión fue endotérmico (Figura 12A) contrario a la interacción con GDP y MgGDP, en donde se observa que la isoterma de unión corresponde a un proceso exotérmico (Figura 12B). La Tabla 3 muestra los parámetros termodinámicos obtenidos para la interacción con

nucleótidos de guanina en función de la temperatura. Para la unión con GTP y MgGTP el proceso fue entrópicamente dirigido. En ausencia del metal se observó un aumento de la constante de afinidad de aproximadamente tres veces a 35 °C ($K_b = 178 \text{ mM}^{-1}$) respecto al valor a 25 °C ($K_b = 60 \text{ mM}^{-1}$), lo anterior debido a una contribución favorable de la entropía a 35 °C ($-T\Delta S_b = -9.30$) y desfavorable para la entalpía ($\Delta H_b = 1.9$). En los experimentos con MgGTP, la afinidad no mostró cambios significativos a las tres temperaturas, observando el valor de K_b en un rango entre 61 mM^{-1} y 76 mM^{-1} . De la misma forma, la entropía no mostró cambios significativos respecto a la temperatura mostrando valores entre $-7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $-8.0 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Para la unión con MgGDP la interacción fue entrópica y entálpicamente dirigida a 25 °C pasando a ser sólo entálpicamente dirigida a 35 °C, el cambio en las contribuciones entálpica y entrópica no se reflejó en variaciones significativas en la afinidad ya que el valor de K_b se mantuvo en un rango entre 35 mM^{-1} y 41 mM^{-1} . En ausencia de Mg^{2+} el proceso fue entálpicamente dirigido a las tres temperaturas con un valor mínimo de $-6.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ a 25 °C y máximo de -9.1 a 35 °C, a pesar de que el cambio en la entalpía haría más favorable la reacción a 35 °C, la afinidad casi no cambia por la compensación entrópica (Tabla 3).

El cambio en la capacidad calorífica (ΔC_{p_b}) de la unión a GTP y GDP en presencia y ausencia de Mg^{2+} fue el parámetro que mostró la diferencia más significativa respecto a los demás parámetros termodinámicos. El ΔC_{p_b} es un parámetro que refleja la magnitud de las fluctuaciones en la entalpía del sistema, a nivel macroscópico se relaciona con el cambio en la superficie polar o apolar expuesta al solvente (ASA). La superficie apolar se encuentra conformada principalmente por átomos de carbono que interaccionan con el solvente, el cambio en la bioenergética que rige esta interacción se conoce como efecto hidrofóbico. Los cambios en la superficie polar son un indicativo de la dinámica principalmente de puentes de hidrógeno y su interacción con el solvente⁷⁸. Para la unión de la GTPasa mutante con GTP y MgGTP observamos un ΔC_{p_b} positivo contrario a la unión con GDP y MgGDP que muestra un ΔC_{p_b} negativo y una diferencia de dos órdenes de magnitud entre ambos nucleótidos (Tabla 3). El signo negativo del ΔC_{p_b} es indicativo de que los residuos expuestos al solvente son principalmente de tipo polar cuando la mutante se une con GDP o MgGDP, contrario a la unión para GTP y MgGTP en donde la naturaleza de los residuos que se exponen al solvente son de tipo apolar.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos de la unión de Efl1 R1086Q a nucleótidos de guanina determinados mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Ligando	T (°C)	K_b (mM^{-1})	K_d (μM)	ΔG_b (kcal mol^{-1})	ΔH_b (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S_b$ (kcal mol^{-1})	ΔC_p_b ($\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
Efl1 R1086Q							
GTP	25	61 ± 7	16 ± 2	-6.53	1.04 ± 0.05	-7.57	
	+Mg ²⁺ 30	64 ± 11 (8 ± 0.7)	16 ± 3 (125 ± 11)	-6.67 (-5.4)	1.07 ± 0.03 (-6.4 \pm 0.4)	-7.74 (1.0)	10 ± 2 (-560 \pm 23)
	35	76 ± 10	13 ± 2	-6.88	1.12 ± 0.06	-8.0	
	25	60 ± 18	17 ± 5	-6.52	1.6 ± 0.3	-8.12	
	-Mg ²⁺ 30	156 ± 34 (4 ± 0.3)	6 ± 1 (250 ± 19)	-7.20 (-5.0)	1.7 ± 0.1 (-7.3 \pm 0.3)	-8.90 (2.3)	30 ± 6 (-700 \pm 34)
	35	178 ± 28	6 ± 1	-7.40	1.9 ± 0.1	-9.30	
GDP	25	41 ± 5	24 ± 3	-6.29	-3.1 ± 0.1	-3.19	
	+Mg ²⁺ 30	35 ± 7 (27 ± 3)	28 ± 6 (37 ± 4.1)	-6.30 (-6.1)	-4.1 ± 0.6 (-5.6 \pm 0.2)	-2.20 (-0.5)	-270 ± 40 (-310 \pm 5)
	35	34 ± 9	29 ± 8	-6.39	-5.8 ± 0.2	-0.59	
	25	336 ± 47	3 ± 0.4	-7.54	-6.6 ± 0.2	-0.94	
	-Mg ²⁺ 30	245 ± 37 (64 ± 9)	4 ± 0.6 (16 ± 2.2)	-7.47 (-6.7)	-7.7 ± 0.3 (-6.7 \pm 0.3)	0.22 (0.0)	-250 ± 17 (-318 \pm 35)
	35	226 ± 34	4 ± 0.6	-7.55	-9.1 ± 0.3	1.55	
Efl1 R1086Q P151L							
GTP	25	55 ± 10	18 ± 3	-6.5	-1.7 ± 0.1	-4.8	
	+Mg ²⁺ 30	59 ± 8	17 ± 2	-6.6	-2.5 ± 0.1	-4.1	-220 ± 35
	35	54 ± 5	18 ± 2	-6.7	-3.9 ± 0.1	-2.8	

Los datos en paréntesis corresponden a los valores determinados para Efl1 silvestre reportados en [69].

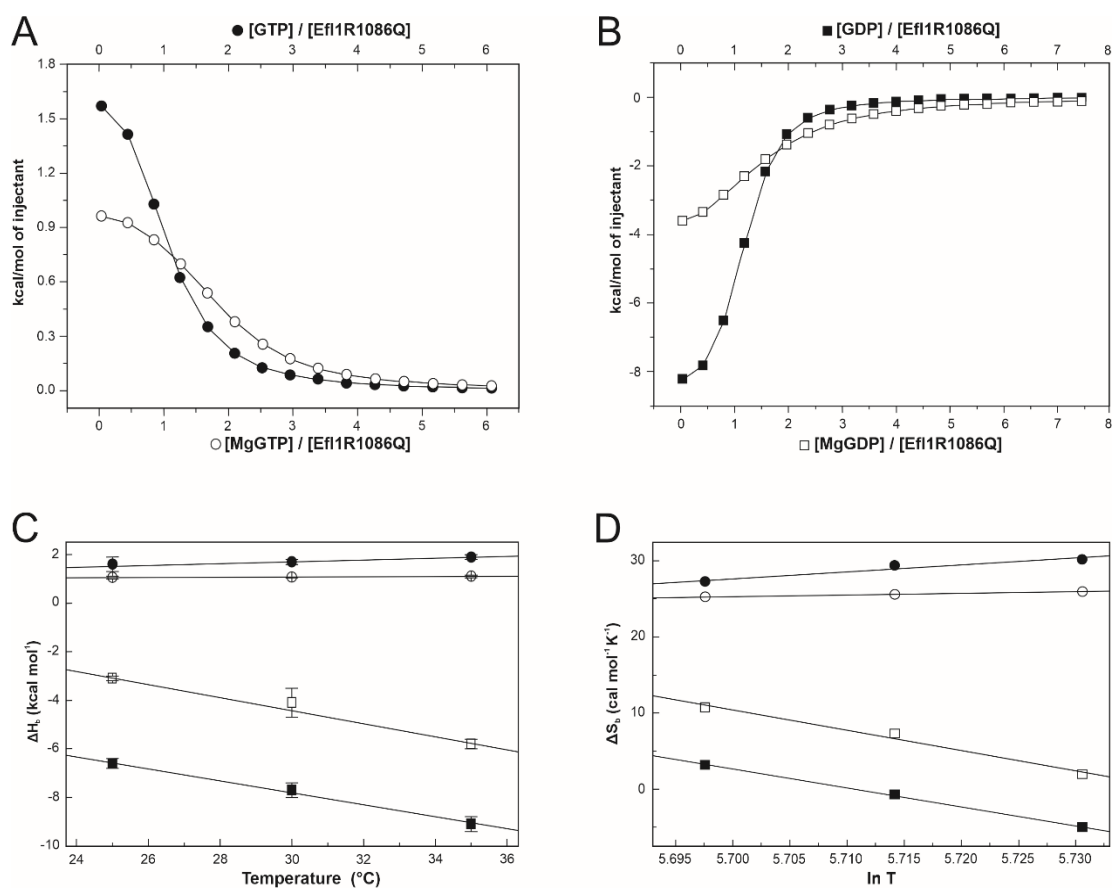


Figura 12. Caracterización termodinámica de la unión de Efl1 R1086Q con los nucleótidos de guanina. (A) Isotermas de unión de Efl1 R1086Q a GTP/MgGTP a 25°C. (B) Isotermas de unión de Efl1 R1086Q a GDP/MgGDP a 25°C. (C) Entalpía de unión en función de la temperatura. (D) Entropía de unión en función de la temperatura. GTP (●), MgGTP, (○) GDP, (■) MgGDP (□).

El efecto de la unión de Efl1 R1086Q a nucleótidos de guanina y Mg^{2+} se encuentra contenida en la magnitud de la constante de asociación heterotrópica (κ), la cual se define por la relación de las constantes de unión al nucleótido en presencia de iones Mg^{2+} respecto a cuando no los hay. La presencia de iones magnesio desestabiliza la interacción de la mutante con ambos nucleótidos como se observa en los valores de κ menores a 1 (Tabla 4). Este efecto es contrario al observado para Efl1 silvestre en donde el magnesio favorece la afinidad por GTP ($\kappa = 2$ a 30 °C)⁶⁹. Esta diferencia se debe principalmente a una entropía menos favorable de la mutante, lo cual sugiere diferencias en la solvatación de la enzima debido a cambios en su flexibilidad al interactuar con GTP en comparación con la misma interacción para Efl1 silvestre. Mientras que el efecto de los iones magnesio es desfavorable para la unión de GDP, tanto para Efl1 silvestre como para la mutante.

Tabla 4. Efecto de los iones Mg^{2+} y Sdo1 en los parámetros de cooperatividad para la interacción heterotrópica de Efl1 R1086Q con los nucleótidos de guanina.

Complejo	Ligando	T (°C)	κ	Δg (kcal mol ⁻¹)	Δh (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta s$ (kcal mol ⁻¹)
Efecto del Mg^{2+}						
Efl1 R1086Q + Sdo1	GTP	25	0.6	0.3	2.9	-2.6
		30	0.3	0.6	0.9	-0.3
		35	0.5	0.5	-1.4	1.9
	GDP	25	1.9	-0.4	0.3	-0.7
		30	3.7	-0.8	1.6	-2.4
		35	5.4	-1.0	2.7	-3.7
Efl1 R1086Q - Sdo1	GTP	25	1.0	-0.1	-0.56	0.5
		30	0.4 (2)	0.6 (-0.4)	-0.63 (0.9)	1.2 (-1.3)
		35	0.4	0.5	-0.78	1.3
	GDP	25	0.1	1.3	3.5	-2.3
		30	0.1 (0.4)	1.2 (0.6)	3.6 (1.1)	-2.4 (-0.5)
		35	0.2	1.2	3.3	-2.1
Efecto de Sdo1						
Efl1 R1086Q + Mg^{2+}	GTP	25	0.6	0.3	-2.1	2.5
		30	0.3	0.7	-4.1	4.8
		35	0.3	0.9	-6.2	7.1
	GDP	25	2.7	-0.6	1.0	-1.6
		30	3.6	-0.8	0.3	-1.1
		35	4.6	-0.9	0.5	-1.4
Efl1 R1086Q - Mg^{2+}	GTP	25	1.0	0.0	-5.6	5.6
		30	0.3 (22.3)	0.7 (-1.8)	-5.6 (5.2)	6.3 (-7.0)
		35	0.2	0.9	-5.6	6.5
	GDP	25	0.2	1.06	4.2	-3.1
		30	0.1 (0.3)	1.2 (0.8)	2.3 (-0.7)	-1.2 (1.5)
		35	0.1	1.3	1.2	0.5

Los datos en paréntesis corresponden a los reportados en [69] para Efl1 silvestre.

La unión ligando-proteína ocurre a nivel local a través de residuos que se localizan en el sitio de interacción. Sin embargo, el efecto de esta interacción frecuentemente es propagado a larga distancia induciendo un cambio conformacional. Uno de los primeros estudios realizados a la

GTPasa Efl1 (Ria1) consistió en realizar deleciones secuenciales en su extremo C-terminal ($\Delta 13aa$, $\Delta 17aa$, $\Delta 22aa$)⁷⁹. En la condición donde fueron deletados 22 residuos ($\Delta 22aa$), se observó la aparición de mutaciones supresoras intragénicas en los residuos P151L y T657M. Estas mutaciones supresoras corrigen el fenotipo de lento crecimiento como respuesta a la deleción de los 22 residuos en el extremo C-terminal de la proteína. Dado que la arginina 1086 se encuentra justo después de la deleción hipotetizamos que estas mutaciones supresoras podrían corregir en cierta medida los defectos de la mutación en este residuo. Para ello se expresó y purificó una versión de Efl1 doble mutante (R1086Q-P151L). El contenido de estructura secundaria de Efl1 R1086Q-P151L fue evaluado por dicroísmo circular. El espectro en el UV lejano mostró la firma típica de estructura secundaria tipo α -hélices y hojas β de la familia de proteínas EFL1, lo anterior es una combinación de alfa hélices de acuerdo con las bandas negativas a 208 y 222 nm y hojas beta de acuerdo con la señal negativa a 217 nm (Figura 13). En la Figura 13 se comparan los espectros de la proteína silvestre (línea color negro), la mutante R1086Q (línea color rojo) y la doble mutante R1086Q-P151L (línea color azul). Existe una ligera diferencia en la magnitud de la señal de elipticidad molar entre Efl1 silvestre y la doble mutante, sin embargo, esta diferencia es más evidente en el rango de 208-225 nm en el espectro de la mutante R1086Q. Lo anterior puede tener dos explicaciones, la primera es que existen ligeras variaciones en la cuantificación de la muestra utilizada, debido a que cada uno de los experimentos fueron llevados a cabo de forma independiente. La segunda es que existen diferencias en la estructura secundaria de la mutante R1086Q en comparación con Efl1 silvestre y la doble mutante.

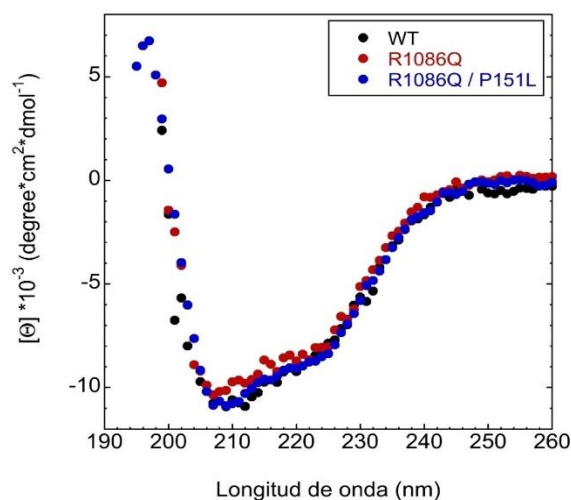


Figura 13. Evaluación del contenido de estructura secundaria de la proteína Efl1 silvestre, mutante R1086Q y doble mutante R1086Q-P151L mediante dicroísmo circular en el UV-lejano, el espectro de dicroísmo

circular muestra diferencias en la magnitud de la elipticidad molar siendo la diferencia del espectro de la mutante R1086Q la más notable lo que sugiere posibles alteraciones en la estructura secundaria como consecuencia de la mutación.

Los estudios termodinámicos de la interacción de la doble mutante Efl1 R1086Q-P151L con los nucleótidos de guanina mostraron que a 25°C la interacción con GTP es entrópicamente dirigida pasando a ser entálpicamente dirigida a 35°C. La afinidad por este nucleótido no mostró cambios significativos manteniéndose en un rango entre 55 mM⁻¹ y 59 mM⁻¹. Sin embargo, el efecto más notable lo observamos en el valor de la entropía que se invirtió respecto a la mutante R1086Q volviéndose exotérmico y con ello su impacto en el ΔC_{p_b} . Este parámetro recuperó su valor negativo (-220 cal mol⁻¹ K⁻¹) respecto a la mutante R1086Q, pero aún se encuentra alejado del ΔC_{p_b} reportado para la GTPasa silvestre (-560 cal mol⁻¹ K⁻¹)⁶⁹. En resumen, la firma termodinámica de la doble mutante muestra que la mutación supresora intragénica restablece parcialmente un cambio conformacional que expone al solvente residuos polares, pero sin llegar a una recuperación total de la conformación como la observada para Efl1 silvestre.

El ΔC_{p_b} y el ΔS_b son parámetros globales de un sistema. El ΔC_{p_b} puede ser disectado en dos contribuciones: una de ellas describe los cambios conformacionales de las moléculas que interactúan ($\Delta C_{p_{conf}}$), mientras que la segunda (ΔC_{p_b}) se relaciona con la cantidad de área que se oculta en la interfaz y se asume como una interacción de tipo cuerpo rígido entre la proteína y el ligando⁶⁸. Al igual que la capacidad calorífica, la entropía de unión (ΔS_b) es la suma de tres contribuciones. La entropía de solvatación (ΔS_{solv}), la entropía roto-traslacional (ΔS_{r-t}) y la entropía conformacional (ΔS_{conf}). La primera se refiere al cambio en los grados de libertad de las moléculas de solvente que se liberan de la interfaz, la segunda describe el cambio en los grados de libertad de los ángulos de torsión de las moléculas que interactúan y la tercera describe el cambio en los grados de libertad por la rotación de enlaces sencillos⁶³. El ΔC_{p_b} de la unión de Efl1 R1086Q a GDP/MgGDP induce un cambio en la conformación donde participan 21 residuos que equivalen aproximadamente a un cambio en el área accesible a solvente de 1000 Å² en la superficie de la GTPasa (Tabla 5). Por el contrario, en la unión con GTP/MgGTP se observa un efecto de cuerpo rígido que involucra un cambio conformacional donde se ocultan solo tres residuos no polares y se exponen tres residuos de naturaleza no polar. Lo anterior sugiere que prácticamente no existe cambio conformacional cuando la mutante une GTP/MgGTP. Lo anterior indica que Efl1 R1086Q adopta dos conformaciones distintas dependiendo del nucleótido al cual se encuentra unido. Por

otro lado, el número de residuos que cambian de conformación entre la Efl1 mutante y la silvestre como resultado de la unión con GTP/MgGTP es muy distinta. Para la silvestre el número de residuos fue de 66 y 51, mientras que para la mutante fueron 4 y 3 respectivamente. Este parámetro contrasta para la unión con GDP/MgGDP en donde el número de residuos es prácticamente igual; 28 y 25 para la silvestre contra 21 para la mutante (Tabla 5). Lo anterior sugiere que el reconocimiento de la Efl1 por GTP/MgGTP se encuentra afectado.

Las diferencias conformacionales de la mutante respecto del nucleótido al que se encuentra unido se evidencian a partir del análisis de entropía conformacional y de solvatación. Para GDP/MgGDP este parámetro mostró un valor desfavorable ($-53 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $-49 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ respectivamente), este valor negativo a nivel macroscópico se interpreta como un aumento en la rigidez de la proteína. En contraste, para la unión con GTP/MgGTP la entropía conformacional muestra una ganancia en los grados de libertad, es decir una entropía favorable ($44 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ vs $36 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ respectivamente). La entropía de solvatación (ΔS_{solv}) para el complejo GDP/MgGDP muestra un valor favorable que contrasta con valores ligeramente desfavorables para el complejo GTP/MgGTP, lo anterior indica que las moléculas de solvente que rodean la interfaz en ambos nucleótidos adoptan diferentes arreglos.

A su vez, la comparación de estos parámetros para la GTPasa mutante y la nativa igualmente apoyan diferencias en la conformación que adoptan estas proteínas al unir GTP/MgGTP. La proteína silvestre muestra una entropía conformacional desfavorable equiparada por la entropía de solvatación favorable. Mientras que la proteína mutante presenta una entropía conformacional grande dirigiendo la interacción. Este análisis junto con la diferencia grande en el número de residuos que cambian de conformación cuando la mutante interacciona con GTP/MgGTP, en comparación con los reportados para la GTPasa silvestre, apoyan la idea de que en el caso de Efl1 los cambios locales son propagados por medio de interacciones cooperativas, pero estos son distintos en la proteína mutante. Por el contrario, en el caso de la unión con GDP/MgGDP los valores de ΔS_{solv} y ΔS_{conf} son similares respecto a los reportados para la GTPasa silvestre (Tabla 5). Por lo tanto, mutaciones puntuales pueden alterar la red de comunicación intramolecular con un impacto en el cambio conformacional de la proteína.

Tabla 5. Deconvolución del ΔC_{p_b} y ΔS_b de la mutante Efl1 R1086Q sola y en complejo con Sdo1 en interacción con nucleótidos de guanina a 30 °C.

Ligando		ΔC_{p_b}	$\Delta C_{p_{rb}}$	$\Delta C_{p_{conf}}$	$-\Delta ASA_{conf}$	N_{conf}^{res}	ΔS_b	ΔS_{solv}	ΔS_{conf}	N_{conf}^{rotb}
Efl1 R1086Q										
GTP	+Mg ²⁺	10 (-560)	-25 (-25)	35 (-535)	-157 (2401)	3 (51)	25 (-3)	-2 (143)	36 (-139)	21 (83)
	-Mg ²⁺	30 (-700)	-11 (-11)	41 (-689)	-184 (3092)	4 (66)	29 (-8)	-7 (179)	44 (-179)	27 (107)
GDP	+Mg ²⁺	-270 (-310)	-48 (-48)	-222 (-262)	996 (1176)	21 (25)	7 (2)	65 (79)	-49 (-70)	30 (42)
	-Mg ²⁺	-250 (-318)	-30 (-30)	-220 (-288)	987 (1293)	21 (28)	-1 (0)	60 (81)	-53 (-73)	31 (44)
Efl1 R1086Q • Sdo1										
GTP	+Mg ²⁺	-400	-25	-375	1683	36	9	96	-78	47
	-Mg ²⁺	30 (-90)	-11 (-11)	41 (-79)	-184 (355)	4 (8)	9 (16)	-7 (23)	24 (0)	14 (0)
GDP	+Mg ²⁺	-315	-48	-267	1198	25	11	75	-57	34
	-Mg ²⁺	-550 (-640)	-30 (-30)	-520 (-610)	2334 (2738)	50 (58)	3 (-5)	132 (164)	-121 (-161)	72 (96)
Efl1 R1086Q P151L										
GTP	+Mg ²⁺	-220	-25	-195	875	19	13	53	-31	19

Las unidades para el ΔC_p y ΔS corresponden a cal mol⁻¹ y Å² para el ΔASA . El parámetro N_{conf}^{res} corresponde al número de residuos que cambian de conformación, el valor se presenta en unidades absolutas. N_{conf}^{res} corresponde al número de enlaces rotables que cambian de conformación, el valor se presenta en unidades absolutas. Los datos en paréntesis fueron reportados en ⁶⁹ para Efl1 silvestre. La metodología para calcular el ΔASA_{conf} se presenta en ⁶⁹. El parámetro N_{res} se calculó asumiendo que la superficie de cada residuo que se oculta en la superficie de una proteína corresponde a aproximadamente 47 Å² ⁸⁰.

8.3 Energética de unión del complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 con los nucleótidos de guanina

Diferentes estudios han demostrado que la proteína Sdo1 funciona como un efector de Efl1 induciendo un cambio conformacional que predispone la unión de la GTPasa con el trinucleótido y debilitando la interacción con GDP ⁴⁹ ⁶⁹. Como primer paso en el estudio del complejo binario Efl1 R1086Q•Sdo1, se determinó la firma termodinámica de la interacción de Efl1 R1086Q con Sdo1 (Inserción Figura 14A). La interacción fue entálpicamente dirigida con una contribución

entrópica que disminuyó conforme la temperatura aumentó. La afinidad se duplicó de 256 mM^{-1} - 25°C a 543 mM^{-1} - 35°C debido a un aumento en la misma proporción de la entalpía que también se duplicó pasando de $-4.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ - 25°C a $-8.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ - 35°C . La afinidad de Efl1 R1086Q por Sdo1 disminuyó en un orden de magnitud comparado con Efl1 silvestre pasando de 3110 mM^{-1} para la silvestre a 288 mM^{-1} para la mutante a 30°C (.).

Tabla 6). Mientras que el ΔCp_b para la interacción de la mutante con Sdo1 es la mitad del reportado para la proteína silvestre ($-440 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ vs $-860 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ respectivamente). Este cambio en el ΔCp_b sugiere que cuando la mutante se une a Sdo1 existe una diferencia de aproximadamente la mitad de los residuos que se ocultan en la interfaz del complejo o que cambian de conformación comparado con los residuos de Efl1 silvestre en una o ambas proteínas.

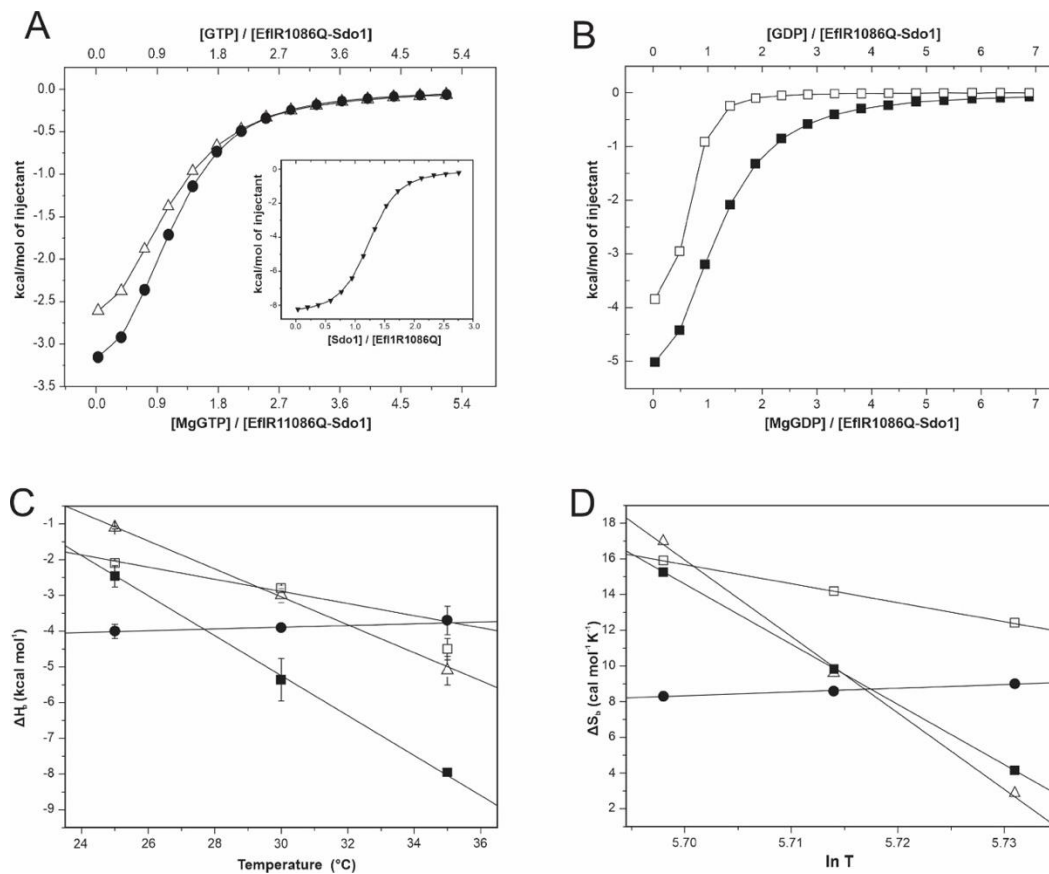


Figura 14. Caracterización termodinámica de la unión de Efl1R1086Q•Sdo1 a nucleótidos de guanina. (A) Isothermas de unión de Efl1 R1086Q a GTP/MgGTP a 25°C , el inserto muestra la transición calorimétrica

de la interacción de Sdo1 con la mutante en ausencia del nucleótido. (B) Isotermas de unión de Efl1R1086Q•Sdo1 a GDP/MgGDP. (C) Entalpía de unión en función de la temperatura. D) Entropía de unión en función de la temperatura. MgGTP (Δ), GTP (\bullet), (\circ) GDP (\blacksquare), MgGDP (\square).

Tabla 6. Parámetros termodinámicos del complejo binario y ternario formado por Efl1 R1086Q, Sdo1 y nucleótidos de guanina determinados por calorimetría de titulación isotérmica.

Ligando	T (°C)	K_b (mM ⁻¹)	K_d (μ M)	ΔG_b (kcal mol ⁻¹)	ΔH_b (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S_b$ (kcal mol ⁻¹)	ΔC_{p_b} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
Efl1 R1086Q							
Sdo1	25	256 \pm 47	3.9 \pm 0.7	-7.4	-4.3 \pm 0.1	-3.1	
	30	288 \pm 56	3.4 \pm 0.6	-7.6	-6.3 \pm 0.2	-1.3	-440 \pm 23
		(3110 \pm 630)	(0.3 \pm 0.0)	(-9.0)	(-13.4 \pm 0.4)	(4.4)	(-860 \pm 31)
35	543 \pm 76	1.8 \pm 0.2	-8.1	-8.7 \pm 0.1	0.6		
Efl1 R1086Q•Sdo1							
+Mg ²⁺	25	34 \pm 3	29 \pm 5	-6.2	-1.1 \pm 0.04	-5.1	
	30	17 \pm 1	58 \pm 7	-5.9	-3.0 \pm 0.2	-2.9	-400 \pm 11
	35	19 \pm 2	52 \pm 7	-6.0	-5.1 \pm 0.4	-0.9	
-Mg ²⁺	25	57 \pm 6	17 \pm 5	-6.5	-4.0 \pm 0.2	-2.5	
	30	44 \pm 1	23 \pm 7	-6.5	-3.9 \pm 0.1	-2.6	30 \pm 6
		(89 \pm 12)	(11 \pm 1)	(-6.8)	(-2.1 \pm 0.2)	(-4.7)	(-90 \pm 5)
35	39 \pm 8	25 \pm 7	-6.5	-3.7 \pm 0.4	-2.8		
+Mg ²⁺	25	110 \pm 23	9 \pm 2	-6.9	-2.1 \pm 0.08	-4.7	
	30	125 \pm 14	8 \pm 1	-7.1	-3.8 \pm 0.05	-3.3	-315 \pm 9
	35	158 \pm 18	6 \pm 1	-7.3	-5.3 \pm 0.11	-2.0	
-Mg ²⁺	25	57 \pm 1.5	17 \pm 0.5	-6.5	-2.5 \pm 0.4	-4.0	-550 \pm 18

	33 ± 5.0	30 ± 4	-6.3	-5.4 ± 0.6	-1.0	(-640 ± 34)
30	(19 ± 1)	(52 ± 1)	(-5.9)	(-7.4 ± 0.0)	(1.5)	
35	29 ± 4.2	34 ± 5	-6.30	-8.0 ± 0.8	1.7	

Los datos entre paréntesis corresponden a Efl1 silvestre y fueron reportados en [69].

A continuación, el complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 se tituló con los nucleótidos de guanina y se determinaron los parámetros termodinámicos (.

Tabla 6). La unión con GTP/MgGTP fue entálpica y entrópicamente dirigida. En presencia de iones magnesio la entropía disminuyó en función de la temperatura compensado por una entalpía favorable mientras que en ausencia de magnesio ambas contribuciones no mostraron cambios. Este efecto del metal en la unión del complejo con el trinucleótido resultó en un cambio grande en la capacidad calorífica de $-400 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para MgGTP que contrasta con $30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para la proteína sola, lo que a su vez refleja la gran diferencia en el número de residuos que cambian de conformación (36 vs 4) que además son opuestos en cuanto a polaridad (Tabla 5).

La disección de la entropía de unión muestra una entropía de solvatación favorable y una entropía conformacional desfavorable para la interacción con MgGTP, esto indica un cambio grande en los grados de libertad de las moléculas de solvente que se liberan de la interfaz durante la formación del complejo. Este comportamiento contrasta en ausencia de magnesio, en donde la entropía de solvatación fue desfavorable y la entropía conformacional favorable, lo anterior refuerza la noción de que el magnesio tiene un efecto importante en el reconocimiento del nucleótido en presencia de Sdo1 y el subsecuente cambio conformacional.

Los parámetros de cooperatividad muestran que el magnesio y Sdo1 desestabilizan la interacción del complejo Efl1 R1086Q con GTP ($\kappa \leq 1$) debido a una entropía desfavorable (Tabla 4). Este comportamiento es opuesto al efecto de Sdo1 para Efl1 silvestre, en donde Sdo1 favorece la interacción entre 20 y 40 veces con GTP. Es importante señalar el efecto drástico en la entalpía de unión para GTP que pasa de ser un proceso endotérmico en la mutante sola a exotérmico para el complejo Efl1 R1086Q•Sdo1. En ausencia de magnesio, la afinidad del complejo con GTP disminuyó 3-4 veces comparado con la mutante sola, esto se explica por la diferencia en la

compensación entrópica-entálpica del complejo que no ocurre para la mutante sola en donde la unión solo es entrópicamente dirigida a las tres temperaturas estudiadas (Tablas 3 y 6).

El cambio en la capacidad calorífica de $30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ sugiere que solamente cuatro residuos cambian de conformación entre la mutante sola y unida a Sdo1. En presencia de magnesio, la afinidad del complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 con MgGTP disminuyó al aumentar la temperatura, de la misma forma se observa una entalpía favorable respecto a la mutante sola en donde la entalpía es desfavorable. Estas diferencias en las contribuciones termodinámicas tienen un efecto grande en la capacidad calorífica de la unión del trinucleótido con el complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 y con la mutante sola, que se refleja en el número de residuos que cambian de conformación en ambos complejos (Tabla 5). Estos resultados sugieren que el magnesio tiene una gran influencia en las propiedades de la interacción del complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 con GTP y que estas propiedades son muy diferentes a las observadas en la unión de Efl1 silvestre.

La compensación entrópica-entálpica del complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 unida a GDP/MgGDP fue similar. Para la unión a MgGDP, la afinidad aumenta 2-5 veces conforme la temperatura aumenta comparado con la afinidad en ausencia de magnesio, esto indica la importancia del metal en la afinidad del complejo por el dinucleótido (Tabla 6). La disección de la entropía de unión para la interacción con GDP y MgGDP, indica una entropía conformacional desfavorable que se compensa por una entropía de solvatación favorable aunque la compensación es de diferente magnitud, tanto los valores de la entropía conformacional como de solvatación son el doble en ausencia de magnesio. Esta diferencia se observa también en el número de residuos que cambian de conformación, 50 residuos en ausencia de magnesio vs 25 en presencia de magnesio, con un número equivalente de enlaces rotables que se rigidizan (Tabla 5). El análisis de los parámetros de cooperatividad muestra que el efecto de Sdo1 en la interacción de la mutante con el difosfato, depende de la presencia de magnesio ($\kappa > 1$) (Tabla 4). El ΔC_{p_b} de la mutante en interacción con MgGDP fue similar en presencia y ausencia de Sdo1 ($\Delta\Delta C_{p_b} -45 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) que representa el ocultamiento de aproximadamente 4 residuos.

Los resultados anteriores demuestran que el efecto de Sdo1 en los cambios conformacionales de la mutante unida a nucleótidos de guanina dependen de la presencia de iones magnesio, lo que sugiere que Sdo1 remodela el sitio de unión del nucleótido con el metal. En conjunto, nuestros resultados muestran que la mutación R1086Q afecta las interacciones que rigen el cambio conformacional de la GTPasa impidiendo que la mutante adopte la conformación observada en la Efl1 silvestre.

8.4 Cinética enzimática de mutantes de EFL1

Con la finalidad de determinar posibles alteraciones en la catálisis como resultado de la mutación, se midieron los parámetros cinéticos de la mutante Efl1 R1086Q sola y unida a Sdo1 utilizando un ensayo enzimático acoplado con la enzima nucleósido purín fosforilasa (PNP) ⁸¹. Este análisis también se hizo con otra mutante reportada como patogénica que se localiza en el dominio IV (EFL1 M882K) que en la secuencia de levadura equivale a Efl1 L910K. Los valores de K_m y la k_{cat} se calcularon por medio de una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos fueron casi idénticos para la mutante R1086Q comparados con los parámetros de Efl1 silvestre. La mutante L910K mostró una disminución del 13% en la k_{cat} . La constante catalítica para la Efl1 R1086Q y Efl1 silvestre fue de 0.67 min^{-1} , mientras que para la mutante L910K fue de 0.58 min^{-1} . Los valores de la constante catalítica para el complejo binario de las mutantes unidas a Sdo1 no mostraron cambios significativos respecto al complejo de Efl1 silvestre•Sdo1. Estos resultados muestran que estas mutaciones no alteran las propiedades catalíticas de Efl1.

En línea con la noción de que Sdo1 funciona como un factor intercambiador de nucleótidos para Efl1, se ha demostrado que la interacción de la GTPasa silvestre con Sdo1 tiene un efecto en la K_m disminuyendo su valor entre dos y tres veces ^{69 82 48}. De acuerdo con esta observación previa, los valores de K_m para los complejos formados por las mutantes con Sdo1 disminuyeron a la mitad respecto a los valores de las mutantes solas. El complejo de las mutantes R1086Q y L910K con Sdo1 mostró un valor aproximadamente 1.6 veces más grande que la K_m de Efl1 silvestre con valores de 94 y 90 μM que contrastan con el valor de 53 μM para Efl1 silvestre (Tabla 7). La K_m es un valor que engloba todas las constantes microscópicas de velocidad de unión y disociación con el sustrato y el producto, así como cambios conformacionales correspondientes. De esta forma el aumento en la K_m para los complejos donde participan las mutantes sugiere que el reconocimiento de GTP se encuentra afectado debido a que Sdo1 no puede desencadenar el cambio conformacional que si ocurre en el complejo donde participa la GTPasa silvestre.

Tabla 7. Parámetros cinéticos para la actividad de Efl1 silvestre y mutantes, solas y en complejo con Sdo1.

Molécula	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} / K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Efl1 R1086Q	0.67 ± 0.03	146 ± 22	76 ± 12
Efl1 L910K	0.58 ± 0.03	185 ± 30	52 ± 9
Efl1 WT	0.67 ± 0.02	155 ± 2	72 ± 10
Efl1 R1086Q • Sdo1	0.67 ± 0.02	84 ± 7	131 ± 11
Efl1 L910K • Sdo1	0.75 ± 0.03	90 ± 9	140 ± 15
Efl1 WT • Sdo1	0.64 ± 0.01	53 ± 3	200 ± 11

8.5 Interacción del complejo Efl1 R1086Q/WT•Sdo1•60S con los nucleótidos de guanina

La interacción del complejo GTPasa•Sdo1•60S con GDP y GTP se estudió midiendo el cambio en la señal de fluorescencia de análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina derivatizados con el grupo metilantraniloil (mant-). Los experimentos se realizaron en estado estacionario por excitación directa del mant-nucleótido a 355 nm y midiendo la intensidad de la emisión de fluorescencia en función de la concentración del nucleótido correspondiente. Para descartar la obtención de constantes de disociación aparentes por la presencia de GDP que pudiera originarse como resultado de la catálisis, se determinó la K_d para la unión de GTP a una mutante catalíticamente inactiva (Efl1 T33A) en el complejo ternario. La K_d para el complejo Efl1T33A•Sdo1•60S fue 24 μM , un valor comparable con los obtenidos para Efl1 silvestre y Efl1 R1086Q que fueron 36 μM y 32 μM respectivamente (Figura 15). El valor calculado para la unión con la mutante catalíticamente inactiva, indica que la cantidad de GDP producto de la catálisis es despreciable y no interfiere en la medición de la afinidad para Efl1 silvestre y mutante R1086Q cuyos valores son comparables entre sí. La K_d para Efl1 R1086Q en el complejo ternario es el doble que el calculado para Efl1R1086Q sola (Tabla 3, Figura 15), esto implica una disminución en la afinidad con el trinucleótido. Sin embargo, este valor es prácticamente el mismo que el calculado para el complejo Efl1 R1086Q•Sdo1 lo que sugiere que la unión a GTP no promueve ningún cambio conformacional adicional al que promueve Sdo1 y la subsecuente unión al ribosoma no modifica la afinidad por el nucleótido. En otro orden de ideas, los datos de fluorescencia de la interacción del mant-GDP en presencia del complejo ternario se ajustó a dos modelos diferentes: el primero corresponde a un sitio de unión y el segundo a dos sitios distintos de unión (Figura 16). Debido a que la GTPasa solo presenta un sitio de unión al dinucleótido podría resultar

contraintuitivo el buen ajuste de los datos a un modelo de dos sitios distintos de unión. Sin embargo, el modelo actual del accionar de EFL1 y SBDS sugieren que una vez que ocurre la catálisis de GTP, EFL1 queda unida a GDP lo que promueve un cambio conformacional que libera de la subunidad 60S a ambas proteínas muy probablemente. Por lo tanto el ajuste de los datos a dos sitios distintos de unión podría explicarse por la existencia de dos poblaciones de la GTPasa en la disolución, una unida en complejo ternario y otra libre ya sea sola o con Sdo1, tal que la fluorescencia medida constituye la señal de ambas poblaciones (Figura 16).

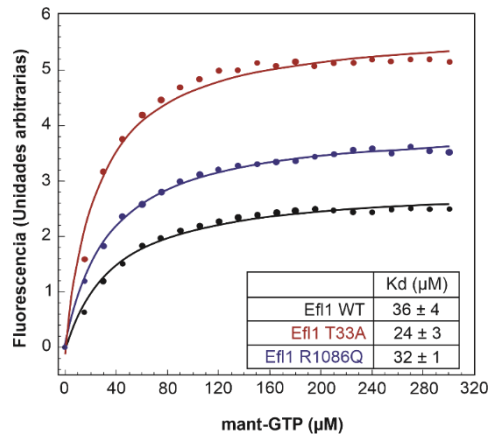


Figura 15. Unión del mant-GTP con Efl1 R1086Q en complejo con Sdo1 y la subunidad ribosomal 60S. El mant-GTP fue excitado a 335 nm y su emisión a 450 nm se graficó en función de la concentración de nucleótido. Las líneas representan el ajuste a un modelo de un sitio de unión. El ajuste de los datos se hizo utilizando el programa Origin versión 5.0 (Origin lab Co).

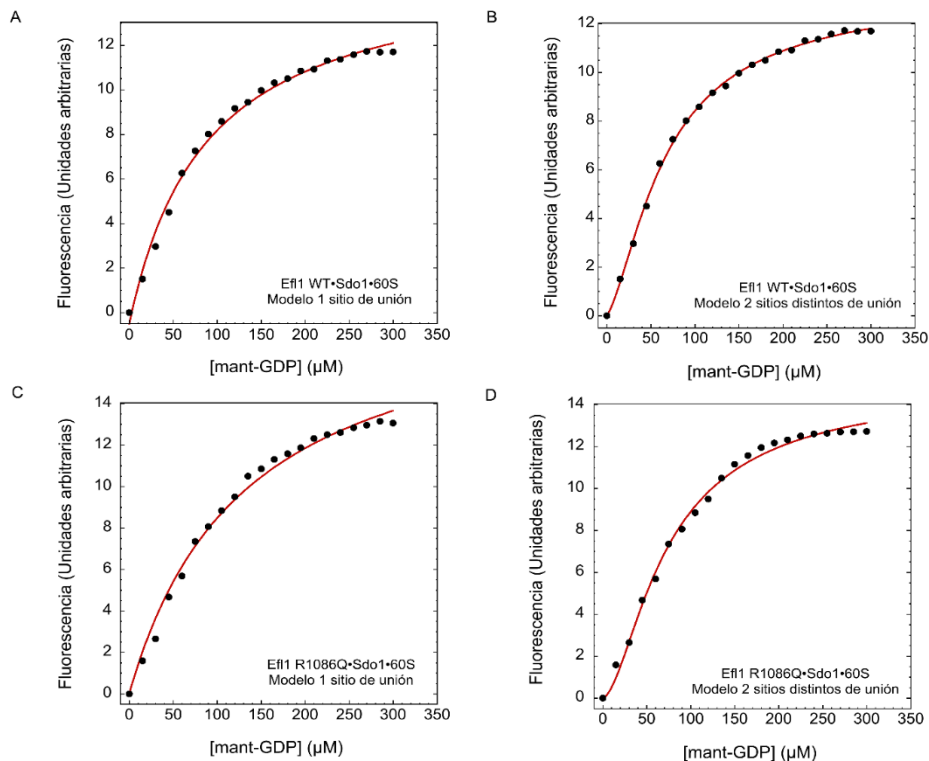


Figura 16. Gráfico de unión del análogo fluorescente mant-GDP con la GTPasa Efl1 silvestre (WT) y la mutante Efl1 R1086Q unida a Sdo1 y la subunidad ribosomal 60S. A-B) Ajuste a un modelo de uno y dos sitios de unión del complejo Efl1 WT•Sdo1•60S. C-D) Ajuste a un modelo de uno y dos sitios de unión del complejo Efl1 R1086Q•Sdo1•60S. Los mant-nucleótidos fueron excitados a 355 nm y la emisión a 450 nm se graficó en función de la concentración de mant-GDP. Para el ajuste de los datos se utilizó el programa Origin versión 5.0 (Origin lab Co).

9 DISCUSIÓN

Los cambios conformacionales son procesos centrales en la función y regulación de las GTPasas que se caracterizan por presentar una conformación compacta al unir GTP y una elongada o abierta en interacción con GDP ⁸³. A partir de la información conformacional inferida por los valores obtenidos de la firma termodinámica y la deconvolución del cambio en la entropía de unión, podemos sugerir que la conformación adoptada en presencia de GTP de la mutante Efl1 R1086Q es diferente al de Efl1 silvestre. El cambio en la capacidad calorífica de la mutante R1086Q al unir GTP y MgGTP mostró una diferencia de tres órdenes de magnitud respecto al mismo parámetro de la GTPasa silvestre. El valor ligeramente positivo del ΔC_{p_b} observado para la mutante indica que el cambio conformacional es prácticamente nulo para la interacción con GTP/MgGTP, también sugiere que la naturaleza química de los residuos expuestos al solvente es principalmente de tipo apolar lo cual contrasta con el valor grande y negativo obtenidos para la GTPasa silvestre en donde de los residuos expuestos al solvente son principalmente de tipo polar. La hipótesis de que la mutación tiene un impacto en el cambio conformacional de la GTPasa se refuerza con el número de residuos que cambian de conformación. Para la interacción con GTP/MgGTP el valor fue de 4 y 3 que contrasta fuertemente con el número de residuos reportados para la GTPasa silvestre de 66 y 51 respectivamente.

De forma general las GTPasas adoptan por lo menos dos estados conformacionales. El primero se denomina T y se refiere a la conformación unida a GTP, el segundo se denomina D y se refiere a la conformación en unión a GDP ⁸⁴. Una de las funciones de la proteína efectora SBDS/Sdo1 es promover el cambio conformacional de Efl1/EFL1 al estado T actuando como un factor intercambiador de nucleótidos (GEF) en dicho estado la GTPasa adquiere una conformación que le permite unir al GTP ⁶⁹. Para la interacción de Sdo1 con Efl1 R1086Q y Efl1 R1086Q•GTP, observamos el mismo valor del ΔC_{p_b} ($-440 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) en la rama central y derecha del ciclo termodinámico de la Figura 14. Este valor en el ΔC_{p_b} puede tener su origen en el ocultamiento de los residuos que interaccionan en la interfaz o puede ser la contribución del cambio conformacional de Sdo1. Para la interacción de los mismos complejos, pero en presencia de Mg^{2+} (Figura 13)

observamos que la diferencia en los valores en el ΔC_{p_b} es de $-410 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ($-850 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ vs $-440 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) por lo que esta diferencia corresponde al cambio conformacional de la GTPasa. Lo que refuerza la idea que la interacción de Efl1 R0186Q con Sdo1 no induce el cambio conformacional que si ocurre para la proteína silvestre. Sin embargo, con esta información es difícil discernir si la Efl1 mutante en su forma apo ya se encuentra en la conformación activa similar a la que induce Sdo1 en la proteína silvestre, o si la forma apo de la GTPasa mutante es una conformación alternativa. El cambio en la capacidad calorífica para la trayectoria de Efl1 silvestre al complejo Efl1 silvestre•Sdo1•GTP es de $-950 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (véase la figura 5 de la referencia 69) casi el doble que el valor del ΔC_{p_b} para misma trayectoria de la proteína mutante ($-410 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Estas diferencias sugieren que la conformación de la GTPasa mutante y la silvestre en complejo con Sdo1 y GTP son diferentes, e igualmente son diferentes para las proteínas apo.

La interacción de la mutante unida a Sdo1 y el complejo unido a MgGDP presentan valores similares de ΔC_{p_b} , mientras que en ausencia de Mg^{2+} el complejo Efl1 R1086Q•Sdo1•GDP muestra un cambio en la capacidad calorífica del doble respecto al observado en la mutante sola. Este parámetro a su vez correlaciona con el número de residuos que cambian de conformación. Lo anterior indica que la mutante adopta dos conformaciones diferentes una al unir GDP en presencia de iones magnesio, y otra inducida por la interacción con Sdo; lo cual es similar al comportamiento observado en Efl1 silvestre. Por lo que el reconocimiento del GTP por la proteína mutante está afectado y no así el del GDP. Con base en nuestros resultados podemos sugerir que Sdo1 induce rearrreglos conformacionales en Efl1 dependientes de la presencia de iones magnesio por los nucleótidos de guanina. Varios GEFs remodelan los switch 1 y 2 a través de repulsión hidrofóbica en el sitio de interacción del Mg^{2+} ⁸⁵. Sin embargo, las estructuras reportadas de EFL1 en complejo con SBDS y la subunidad 60S (PDB 5ANB, 5ANC) localizan a SBDS lejos del dominio G de EFL1 por lo que el efecto que nosotros observamos solo podría ser explicado por un efecto alostérico a larga distancia. Las figuras 17 y 18 muestran un resumen del estudio termodinámico descrito en este trabajo. Con base en su análisis sugerimos que la GTPasa mutante Efl1 R1086Q en solución adopta tres diferentes conformaciones: 1) la primera es una conformación *apo*, que se observa para la mutante sola y en interacción con MgGTP o Sdo1 (Efl1 R1086Q_{apo}), 2) una conformación que denominamos *D-like*, que observamos en interacción con MgGDP y en el complejo Efl1 R1086Q•Sdo1•MgGDP (Efl1 R1086Q_D), y 3) una conformación que denominamos

T-like* , que es diferente de la conformación observada en Efl1 silvestre (Efl1R1086Q_{T*}) y que ocurre cuando la mutante se encuentra unida a Sdo1•MgGTP.

La mutante Efl1 R1086Q exhibe una dinámica conformacional compleja al interactuar con ambos nucleótidos, así como con Sdo1. Sin embargo, esta difiere grandemente de su contraparte silvestre. La interacción de la mutante con nucleótidos de guanina en presencia y ausencia de Mg²⁺ es incapaz de inducir el efecto conformacional y energético observado en la GTPasa silvestre. En el caso de la mutante observamos que la afinidad por GDP se encuentra en el mismo orden de magnitud que el valor para el mismo equilibrio con la Efl1 silvestre. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la mutación R1086Q en el dominio IV altera la comunicación intramolecular a larga distancia responsable del cambio conformacional, de tal forma que el reconocimiento de nucleótidos que ocurre en el dominio I no puede ser comunicado para propagar la transición conformacional respectiva. Las diferencias grandes en la firma termodinámica de la mutante unida a GTP/MgGTP en comparación con Efl1 silvestre pueden explicar su mal funcionamiento y ayudar a entender el origen molecular de SDS.

Para evaluar el impacto que la mutación R1086Q puede tener en el contexto del complejo ternario se midieron las constantes de disociación para el complejo Efl1•Sdo1•60S en versiones silvestre y mutante a análogos fluorescentes mant-GTP y mant-GDP. Los valores de K_d para la interacción del complejo con mant-GTP no mostraron diferencia entre sí. Debido a que estos valores fueron obtenidos en experimentos en condiciones de equilibrio, la K_d calculada implícitamente contiene la contribución de los cambios conformacionales de la GTPasa como resultado de interactuar con Sdo1 y la subunidad 60S. Por lo que podemos decir, que como resultado de la interacción con la subunidad ribosomal, la GTPasa experimenta un cambio conformacional mínimo o tal vez nulo posterior al cambio conformacional inicialmente inducido por Sdo1.

Respecto a los parámetros cinéticos, observamos que para la mutante R1086Q y Efl1 silvestre la k_{cat} es igual con una ligera disminución para la mutante L910K. En presencia de la proteína efectora se observa el mismo efecto para el complejo con la mutante R1086Q y Efl1 silvestre, con un ligero aumento en complejo con la mutante L910K. De acuerdo a lo antes mencionado, no tenemos evidencia experimental que nos sugiera que alguna de las mutaciones mencionadas anteriormente afecta la catálisis. Es notable que en el caso de la K_m observamos un aumento de este parámetro para el complejo de las mutantes con Sdo1. La K_m calculada en estado estacionario incluye todas las constantes microscópicas de velocidad de la unión al sustrato, al producto y el cambio

conformacional correspondiente, de esta forma la diferencia en la K_m de las mutantes en complejo con Sdo1 sugiere que el cambio conformacional inducido por la proteína efectora en las mutantes es diferente del cambio conformacional que induce en la GTPasa silvestre.

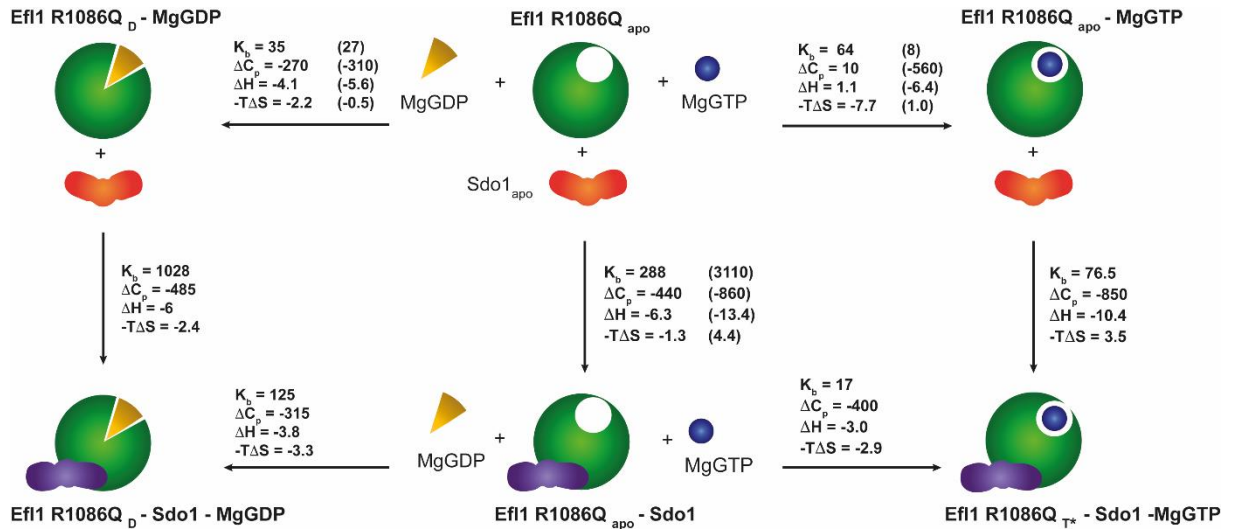


Figura 17. Resumen de parámetros de los equilibrios acoplados entre la mutante Efl1 R1086Q, Sdo1 y nucleótidos de guanina en presencia de magnesio a una temperatura de 30°C. El análisis indica que la mutante adopta tres conformaciones distintas: (1) una *apo* que se observa en la enzima libre y unida a MgGTP o Sdo1 ($Efl1\ R1086Q_{apo}$), (2) una conformación D ($Efl1\ R1086Q_D$) unida a MgGDP o MgGDP•Sdo1 y (3) una conformación T^* que interactúa con MgGTP y Sdo1. Los datos en paréntesis corresponden a Efl1 silvestre y fueron reportados en [73]. Las unidades son K_b - mM^{-1} ; $-T\Delta S$ y ΔH - $kcal\ mol^{-1}$, ΔC_p - $cal\ mol^{-1}\ K^{-1}$.

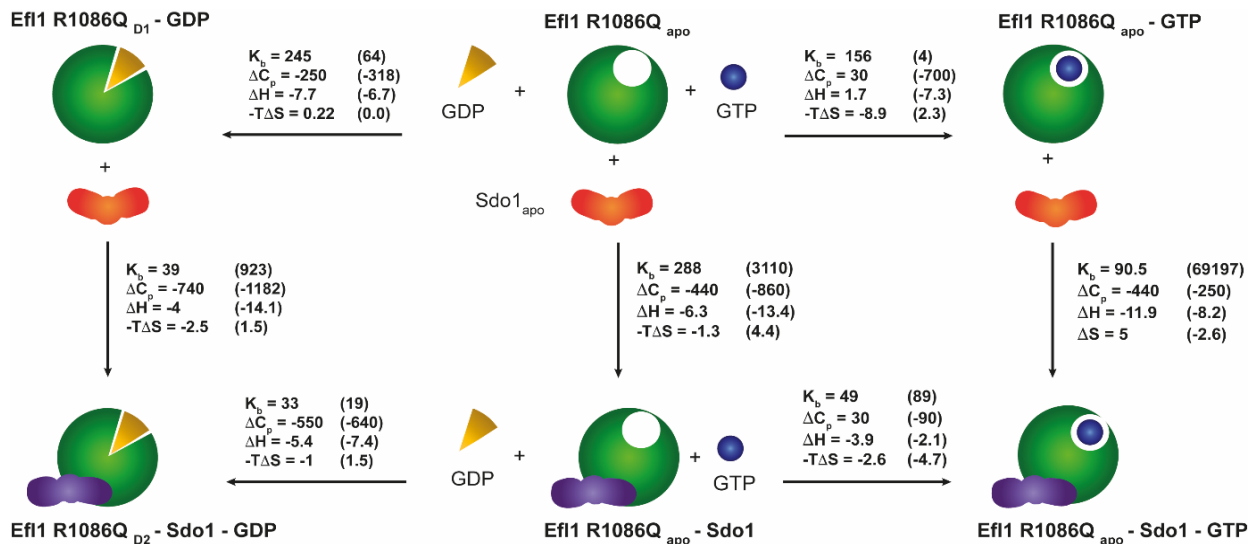


Figura 18. Equilibrios acoplados entre la mutante Efl1 R1086Q, Sdo1 y nucleótidos de guanina en ausencia de magnesio a 30°C. El análisis indica que la mutante Efl1 adopta tres diferentes conformaciones: la conformación *apo* se conserva independientemente si se encuentra unida a GTP o Sdo1 (Efl1 R1086Q_{apo}) y la conformación *D-like* se observa unida a GDP (Efl1 R1086Q_{D1}) que sufre un cambio conformacional seguido de la unión con Sdo1 (Efl1 R1086Q_{D2}). Los datos en paréntesis corresponden a Efl1 silvestre y fueron reportados en [73]. Las unidades son; K_b - mM^{-1} , $-\Delta\Delta S$ y ΔH - kcal mol^{-1} , ΔC_p - $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$.

10 CONCLUSIONES

- El parámetro termodinámico ΔC_p de la mutante Efl1 R1086Q para la interacción con GTP y MgGTP mostró una diferencia de tres órdenes de magnitud en comparación con el mismo parámetro calculado para Efl1 silvestre, este parámetro es un indicador de la magnitud del cambio conformacional cuando una proteína se une a su sustrato en solución, Debido a lo anterior concluimos que la mutación altera el cambio conformacional de la GTPasa mutante Efl1 R1086Q al unir al trinucleótido.
- De acuerdo a los parámetros termodinámicos no encontramos evidencia de que la mutación afecte la interacción con GDP/MgGDP.
- Los parámetros cinéticos no muestran evidencia de que la mutación afecte la hidrólisis de GTP de Efl1 R1086Q.
- La mutación R1086Q debilita la interacción de la GTPasa con su efector Sdo1 un orden de magnitud comparado con la proteína silvestre.
- La K_d calculada para el complejo ternario GTPasa•Sdo1•60S, no muestran evidencia de que la mutación R1086Q afecte la interacción del complejo GTPasa•Sdo1 con la subunidad ribosomal 60S.

PERSPECTIVAS

Actualmente quedan muchas preguntas por responder en el estudio de la biogénesis ribosomal, gran parte de nuestro conocimiento en este campo se centra en el estudio de la biogénesis utilizando

como modelo de *S. cerevisiae*. Sin embargo, este proceso en humanos es más complejo e involucra niveles adicionales de regulación que no se encuentran presentes en levadura. Alteraciones en la biogénesis ribosomal en humanos se manifiesta a través de enfermedades llamadas ribosomopatías, estas enfermedades se manifiestan de forma tejido específica. En este estudio presentamos una explicación al mal funcionamiento de la GTPasa mutante Efl1 R1086Q de *S. cerevisiae* que es la mutación equivalente a EFL1 R1095Q que en humanos da origen a la enfermedad conocida como síndrome Swachman-Diamond. Para entender mejor el origen genético de esta enfermedad, proponemos los siguientes estudios. 1) Determinar la firma termodinámica de la GTPasa EFL1 sola y en complejo con SBDS (sistema de proteínas humanas). 2) Calcular las constantes de disociación de la unión de nucleótidos de guanina en presencia del complejo ternario GTPasa•SBDS/Sdo1•60s mediante la técnica de termoforesis capilar. 3) Calcular las constantes de disociación de la unión del complejo GTPasa•SBDS/Sdo1 en presencia de la subunidad ribosomal 60S (Figura 19). 4) La determinación de estas constantes permitiría alimentar a un sistema de ecuación de tal forma que sería posible estimar la población de ribosomas funcionales presentes en un tejido patológico de esta forma elaborar un análisis comparativo respecto a la población de ribosomas presentes en un tejido sano. Estos estudios permitirían entender mejor la biogénesis ribosomal en humanos y su relación con las enfermedades que se originan por las alteraciones en dicho proceso.

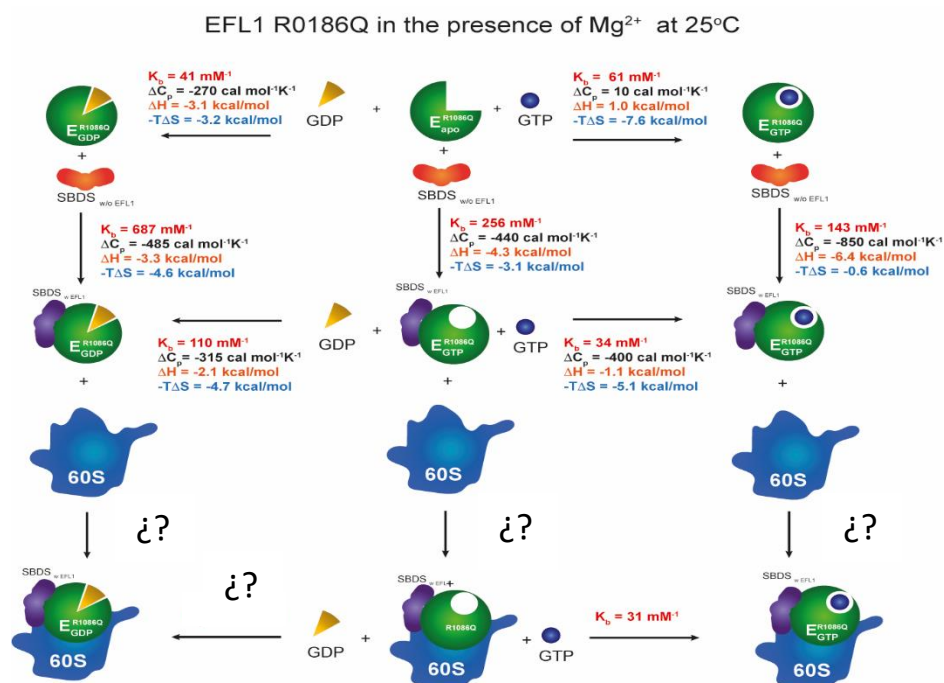


Figura 19. Equilibrios acoplados entre la mutante Efl1 R1086Q, Sdo1 y nucleótidos de guanina en presencia de magnesio a 25°C. La figura muestra la constante de unión (K_b) calculada utilizando la técnica de fluorescencia en estado estacionario del complejo Efl1 R1086Q•SBDS•60S en presencia de MgGTP. Los signos de interrogación muestran las constantes pendientes de ser determinadas.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Greber, B. J. Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *Rna* **22**, 1643–1662 (2016).
2. Fujii, K., Susanto, T. T., Saurabh, S. & Barna, M. Decoding the Function of Expansion Segments in Ribosomes. *Mol. Cell* **72**, 1013–1020 (2018).
3. Kapur, M. & Ackerman, S. L. mRNA Translation Gone Awry: Translation Fidelity and Neurological Disease. *Trends Genetics* **34**, 218–231 (2018).
4. Hinnebusch, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 779–812 (2014).
5. Passmore, L. A. *et al.* The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome. *Mol. Cell* **26**, 41–50 (2007).
6. Nanda, J. S. *et al.* eIF1 Controls Multiple Steps in Start Codon Recognition during Eukaryotic Translation Initiation. *J. Mol. Biol.* **394**, 268–285 (2009).
7. Tan, S. *et al.* Somatic genetic rescue of a germline ribosome assembly defect. *Nat. Commun.* **12**, 1–17 (2021).
8. Dever, T. E., Dinman, J. D. & Green, R. Translation elongation and recoding in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, 1–19 (2018).
9. Shin, B. S. *et al.* Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. *Nucleic Acids Reserch* **45**, 8392–8402 (2017).
10. Labra-Núñez, A. *et al.* Energetic and structural effects of the Tanford transition on ligand recognition of bovine β -lactoglobulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **699**, (2021).
11. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**, 1234–1242 (2009).
12. Frolova, L. Y. *et al.* Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**, 1014–1020 (1999).
13. Song, H. *et al.* The Crystal Structure of Human Eukaryotic Release Factor eRF1—Mechanism of Stop Codon Recognition and Peptidyl-tRNA Hydrolysis. *Cell* **100**, 311–321 (2000).
14. Hellen, C. U. T. Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).

15. von der Haar, T. A quantitative estimation of the global translational activity in logarithmically growing yeast cells. *BMC Syst. Biol.* **2**, 87 (2008).
16. Metzl-Raz E, Kafri M, Yaakov G, Soifer I, Gurvich Y, B. N. Principles of cellular resource allocation revealed by condition-dependent proteome profiling. *Elife* (2017).
17. Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. **04**, 437–440 (1999).
18. 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* **123**, 327–344 (2014).
19. Nerurkar, P. *et al.* Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *International review of cell and molecular biology* **319**, 107–140 (2015).
20. Ma, C. *et al.* Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 214–220 (2017).
21. Basu, U., Si, K. & Maitra, U. *Saccharomyces cerevisiae* TIF6. *Society* **75**, 1453–1462 (2001).
22. Klinge, S. & Woolford, J. L. Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 116–131 (2019).
23. Woolford, J. L. & Baserga, S. J. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**, 643–681 (2013).
24. Alter, B. P. *et al.* Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br. J. Haematol.* **150**, 179–188 (2010).
25. Luzzatto, L. & Karadimitris, A. Dyskeratosis and ribosomal rebellion. *Nature Genetics* **19**, 6–7 (1998).
26. Narla, A. & Ebert, B. L. Ribosomopathies: Human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* **115**, 3196–3205 (2010).
27. Giri, N. *et al.* Clinical and laboratory evidence for a trilineage haematopoietic defect in patients with refractory Diamond-Blackfan anaemia. *Br. J. Haematol.* **108**, 167–175 (2000).
28. Teng, T., Thomas, G. & Mercer, C. Growth control and ribosomopathies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 63–71 (2013).
29. Liu, J., Zhang, C., Hu, W. & Feng, Z. Tumor suppressor p53 and metabolism. *J. Mol. Cell Biol.* **11**, 284–292 (2019).
30. Elghetany, M. T. & Alter, B. P. p53 protein overexpression in bone marrow biopsies of

- patients with Shwachman-Diamond syndrome has a prevalence similar to that of patients with refractory anemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **126**, 452–455 (2002).
31. Dutt, S. *et al.* Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* **117**, 2567–2576 (2011).
 32. Jones, N. C. *et al.* Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat. Med.* **14**, 125–133 (2008).
 33. Fok, W. C. *et al.* p53 Mediates Failure of Human Definitive Hematopoiesis in Dyskeratosis Congenita. *Stem Cell Reports* **9**, 409–418 (2017).
 34. Klauck, S. M. *et al.* Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Molecular Psychiatry* **11**, 1073–1084 (2006).
 35. Zhou, C. *et al.* Mutation in ribosomal protein L21 underlies hereditary hypotrichosis simplex. *Hum. Mutat.* **32**, 710–714 (2011).
 36. Klauck, S. M. *et al.* Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Mol. Psychiatry* **11**, 1073–1084 (2006).
 37. Shwachman, H., Diamond, K.L., Oski, F.A. & Khaw, K.T. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *The journal of Pediatrics* **65**, 645–663 (1964).
 38. Bodian, M., Sheldon, W. & Lightwood, R. Congenital Hypoplasia of the Exocrine Pancreas. *Acta Paediatrica* **53**, 282–293 (1964).
 39. Burke, V., Colebatch, J. H., Anderson, C. M. & Simons, M. J. Association of pancreatic insufficiency and chronic neutropenia in childhood. *Arch. Dis. Child.* **42**, 147–156 (1967).
 40. Boocock, G. R. B. *et al.* Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature Genetics* **33**, 97–101 (2003).
 41. Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S. & Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2560–2570 (2006).
 42. Carapito, R. *et al.* Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. *J. Clin. Invest.* **127**, 4090–4103 (2017).
 43. Stepensky, P. *et al.* 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**, 558–566 (2017).
 44. Bourne, H. R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved

- structure and molecular mechanism. *Nature* **354**, 737–740 (1991).
45. Asano, N. *et al.* Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 1251–1256 (2014).
 46. Méndez-Godoy, A., García-Montalvo, D., Martínez-Castilla, L. P. & Sánchez-Puig, N. Evolutionary and functional relationships in the ribosome biogenesis SBDS and EFL1 protein families. *Mol. Genet. Genomics* **296**, 1263–1278 (2021).
 47. Maracci, C. & Rodnina, M. V. Translational GTPases. *Biopolymers* **105**, 463–475 (2016).
 48. Gijsbers, A., García-Márquez, A., Luviano, A. & Sánchez-Puig, N. Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437**, 349–354 (2013).
 49. García-Márquez, A., Gijsbers, A., de la Mora, E. & Sánchez-Puig, N. Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-Like 1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *J. Biol. Chem.* **290**, 17669–17678 (2015).
 50. Finch, A. J. *et al.* Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* **25**, 917–929 (2011).
 51. Kisly, I., Remme, J. & Tamm, T. Ribosomal protein eL24, involved in two intersubunit bridges, stimulates translation initiation and elongation. *Nucleic Acids Res.* **47**, 406–420 (2019).
 52. Stepensky, P. *et al.* Mutation in EFL1, an SBDS partner, is associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies. *J. Med. Genet.* **0**, 1–9 (2016).
 53. Morini, J. *et al.* Whole exome sequencing discloses heterozygous variants in the DNAJC21 and EFL1 genes but not in SRP54 in 6 out of 16 patients with Shwachman-Diamond Syndrome carrying biallelic SBDS mutations. *Br. J. Haematol.* **185**, 627–630 (2019).
 54. Tan, S. *et al.* EFL1 mutations impair eIF6 release to cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* **134**, 277–290 (2019).
 55. Leavitt, S. & Freire, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 560–566 (2001).
 56. Baranauskiene, L., Kuo, T. C., Chen, W. Y. & Matulis, D. Isothermal titration calorimetry for characterization of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **55**, 9–15 (2019).
 57. Damian, L. Isothermal Titration Calorimetry for Studying Protein–Ligand Interactions.

- 1008**, 103-118 (2013).
58. Du, X. *et al.* Insights into Protein – Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–34 (2016).
 59. Eftink, M. R., Anusiem, A. C. & Biltonen, R. L. Enthalpy-Entropy Compensation and Heat Capacity Changes for Protein-Ligand Interactions: General Thermodynamic Models and Data for the Binding of Nucleotides to Ribonuclease A. *Biochemistry* **22**, 3884–3896 (1983).
 60. Li, H. M., Xie, Y. H., Liu, C. Q. & Liu, S. Q. Physicochemical bases for protein folding, dynamics, and protein-ligand binding. *Sci. China Life Sci.* **57**, 287–302 (2014).
 61. Bronowska, A. . Thermodynamics of ligand-protein interactions: Implications for molecular design. *InTech: Rijeka* 1–48 (2011).
 62. García-Hernández, E. & Hernández-Arana, A. Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: Comparison with protein-folding energetics. *Protein Sci.* **8**, 1075–1086 (1999).
 63. Edgcomb, S. P. & Murphy, K. P. Structural energetics of protein folding and binding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 62–66 (2000).
 64. Ward, W. H. J. & Holdgate, G. A. Isothermal Titration Calorimetry in Drug Discovery. *Prog. Med. Chem.* **38**, 309–376 (2001).
 65. Prabhu, N. V. & Sharp, K. A. Heat Capacity in Proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **56**, 521–548 (2005).
 66. Sturtevant, J. M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2236–2240 (1977).
 67. Murphy, K. P. & Freire, E. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Advances in Protein Chemistry* **43**, 313-361 (1992).
 68. Ladbury, J. E. & Williams, M. A. The extended interface: Measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 562–569 (2004).
 69. Luviano, A., Cruz-Castañeda, R., Sánchez-Puig, N. & García-Hernández, E. Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase. *Biophys. Chem.* **247**, 13–24 (2019).
 70. Demas, J.N. & Crosby, G.A. The measurement of photoluminescence quantum yields. *J. Phys. Chem.* **75**, 991–1024 (1971).
 71. McCann, K. L. & Baserga, S. J. Mysterious ribosomopathies. *Science* **341**, 849–850 (2013).

72. Delre, P. *et al.* Exploring the role of elongation Factor-Like 1 (EFL1) in Shwachman-Diamond syndrome through molecular dynamics. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **38**, 5219-5229 (2019).
73. Gijsbers, A., Nishigaki, T. & Sánchez-Puig, N. Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Protein-protein Interactions. *J. Vis. Exp.* 1–9 (2016)
74. Shammas, C. *et al.* Structural and mutational analysis of the SBDS protein family: Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *J. Biol. Chem.* **280**, 19221–19229 (2005).
75. Meskauskas, A., Leshin, J. A. & Dinman, J. D. Chromatographic purification of highly active yeast ribosomes. *J. Vis. Exp.* 2–5 (2011)
76. Algire, M. A. *et al.* Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA* **8**, 382–397 (2002).
77. Webb, M. R. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4884–4887 (1992).
78. Baker, B. M. & Murphy, K. P. Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods Enzymol.* **295**, 294–315 (1998).
79. Bécam, A. M., Nasr, F., Racki, W., Zagulski, M. & Herbert, C. Ria1p (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Gen.* **266**, 454–462 (2001).
80. Stites, W. E. Protein-protein interactions: Interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **97**, 1233–1250 (1997).
81. Cogan, E. B., Birrell, G. B. & Griffith, O. H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal. Biochem.* **271**, 29–35 (1999).
82. García-Márquez, A., Gijsbers, A., de la Mora, E. & Sánchez-Puig, N. Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *J. Biol. Chem.* **290**, 17669–17678 (2015).
83. Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 943–971 (2011).
84. Hauryliuk, V. *et al.* Thermodynamics of GTP and GDP Binding to Bacterial Initiation Factor 2 Suggests Two Types of Structural Transitions. *J. Mol. Biol.* **394**, 621–626 (2009).

85. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**, 269–309 (2013).

12 INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

12.1 Soluciones y amortiguadores

A continuación, se muestra la composición de las distintas disoluciones y amortiguadores utilizados en este trabajo.


Solución	Composición
IPTG 1000X	IPTG 1 M
Electroforesis en gel de agarosa	
Amortiguador TAE 10X	4.48% Tris base, 1.14% ácido acético, 0.37% EDTA
Electroforesis SDS-PAGE	
Gel concentrador	H ₂ O, acrilamida al 30%, SDS, PSA, TEMED Tris-HCl 0.5 M pH 6.8.
Gel separador	Acrilamida al 30%, SDS, PSA, TEMED Tris-HCl 0.5 M pH 8.8.
Amortiguador de carga 4X	200 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 8% SDS, 0.4% azul de bromofenol.
Solución fijadora SDS-PAGE	Metanol 40 %, ácido acético 10 %.
Solución de tñido	0.25% Azul de Coomassie G-250, 45% metanol, 10% ácido acético.
Amortiguador de tanque	3% Tris base, 14.4% glicina, 1% SDS.
Medios de cultivo	
Glucosa 20%	Disolver 100 g de glucosa en 0.5 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Galactosa 20%	Disolver 200 g de galactosa en 0.5 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Medio LB (Luria-Bertani)	Triptona 10 g, cloruro de sodio 10 g, extracto de levadura 5g, agar 15 g (para medio sólido), 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave. Para el medio sólido se adiciona 2% agar.
Medio YEP(D)	Triptona 16 g, cloruro de sodio 5 g, extracto de levadura 10 g, 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave, 2% de glucosa estéril previamente preparada al 20%. Para el medio sólido se adiciona 2% agar.

Solución drop out para medio SD-Ura 100X	0.6 g L-leucina, 0.4 g L-triptofano, disolver en 100 ml, filtrar por membrana de 0.22 mm .
Medio SD-URA	Base nitrógenada de levadura sin aminoácidos 8 g, casaminoácidos 11 g, drop out 1X, adenina 55 mg, tirosina 55 mg, 1 L de agua destilada, 2% de glucosa estéril previamente preparada al 20%. Esterilizar en autoclave. Para el medio sólido ajustar el pH de la solución a 5.8, y adicionar 2% agar.
Purificación de Efl1 por cromatografía de afinidad a iones de Ni⁺²	
PMSF	Solución 100 mM de PMSF en etanol o isopropanol anhidro
Amortiguador de lisis	50 mM Hepes pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 30 mM imidazol, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol.
Amortiguador de alta sal	50 mM Hepes pH 8.0, 2 M NaCl.
Amortiguador de elución	50 mM Hepes pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 300 mM imidazol, 10% glicerol.
Amortiguador para columna Superdex 200 (filtración en gel)	50 mM Hepes pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 10% glicerol.
Purificación de Sdo1 por cromatografía de afinidad a iones de Ni⁺²	
Solución de lisis	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 20 mM imidazol.
Solución de elución	50 mM Tris-HCl pH 7.2, 250 mM NaCl, 300 mM imidazol.
Solución de alta sal	50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 M NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 20 mM imidazol.
Purificación por intercambio catiónico	
Solución para equilibrar la columna	50 mM Tris-HCl pH 7.2, 100 mM NaCl.
Solución de elución	50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 M NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol.
Aislamiento de subunidades ribosomales 60S	
Amortiguador de lisis	100 mM Acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM acetato de magnesio, 1 mg/ mL heparina, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 0.5 mM EDTA.
Colchón de sacarosa	100 mM Acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM acetato de magnesio, 500 mM KCl, 1

	M sacarosa, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 0.5 mM EDTA.
Amortiguador de alta sal	100 mM Acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM acetato de magnesio, 800 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 0.5 mM EDTA.
Amortiguador de disociación	50 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 μ M cloruro de magnesio, 800 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina.
Gradiente de sacarosa del 10 % al 40 %	50 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 μ M cloruro de magnesio, 500 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 0.1 mM EDTA.
Amortiguador de almacenamiento	100 mM Acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 2.5 mM acetato de magnesio, 250 mM sacarosa, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina.
Calorimetría de titulación isotérmica	
Amortiguador de recambio	50 mM Hepes-KOH pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 5 mM cloruro de magnesio, 5% glicerol.
Fluorescencia en equilibrio	
Amortiguador de recambio	100 mM Acetato de potasio, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 2.5 mM acetato de magnesio, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 50 mM sacarosa, 8 mM putrescina, 1 mM espermidina.

Article

Altered Conformational Landscape upon Sensing Guanine Nucleotides in a Disease Mutant of Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase

Jesús Pérez-Juárez ¹, Juana Virginia Tapia-Vieyra ¹, Gabriel Gutiérrez-Magdaleno ² and Nuria Sánchez-Puig ^{1,*} 

¹ Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico

² División de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpan, Avenida Vasco de Quiroga 4871, Ciudad de México 05348, Mexico

* Correspondence: nuriasp@unam.mx; Tel.: +52-55-56224468

Abstract: The final maturation step of the 60S ribosomal subunit requires the release of eukaryotic translation initiation factor 6 (human eIF6, yeast Tif6) to enter the pool of mature ribosomes capable of engaging in translation. This process is mediated by the concerted action of the Elongation Factor-like 1 (human EFL1, yeast Efl1) GTPase and its effector, the Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein (human SBDS, yeast Sdo1). Mutations in these proteins prevent the release of eIF6 and cause a disease known as Shwachman–Diamond Syndrome (SDS). While some mutations in EFL1 or SBDS result in insufficient proteins to meet the cell production of mature large ribosomal subunits, others do not affect the expression levels with unclear molecular defects. We studied the functional consequences of one such mutation using *Saccharomyces cerevisiae* Efl1 R1086Q, equivalent to human EFL1 R1095Q described in SDS patients. We characterised the enzyme kinetics and energetic basis outlining the recognition of this mutant to guanine nucleotides and Sdo1, and their interplay in solution. From our data, we propose a model where the conformational change in Efl1 depends on a long-distance network of interactions that are disrupted in mutant R1086Q, whereby Sdo1 and the guanine nucleotides no longer elicit the conformational changes previously described in the wild-type protein. These findings point to the molecular malfunction of an EFL1 mutant and its possible impact on SDS pathology.

Keywords: conformational change; EFL1; guanine nucleotides; ITC; magnesium ions; SBDS; SDS



Citation: Pérez-Juárez, J.; Tapia-Vieyra, J.V.; Gutiérrez-Magdaleno, G.; Sánchez-Puig, N. Altered Conformational Landscape upon Sensing Guanine Nucleotides in a Disease Mutant of Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1141. <https://doi.org/10.3390/biom12081141>

Academic Editor: Leonard B. Maggi, Jr.

Received: 19 July 2022
Accepted: 13 August 2022
Published: 19 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ribosomes are the cellular nanomachines that synthesise proteins in all organisms. Eukaryotic ribosomes are formed by the association of the small 40S and the large 60S subunits in a highly regulated process that requires the participation of the three RNA polymerases and several small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) and assembly factors (details have been reviewed elsewhere [1,2]). The last cytoplasmic maturation step of the nascent 60S subunit couples the release of anti-association factor eIF6 (yeast Tif6) with a quality control assessment of the P-site and the GTPase-associated centre via the joint action of the Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase and the Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome (SBDS) protein [3,4]. EFL1 is a molecular motor whose conformational plasticity is central for the release of eIF6 and is finely regulated by interactions with SBDS, the 60S subunit, and guanine nucleotides. SBDS acts as a GDP exchange factor or GEF for EFL1, favouring the active GTP-bound conformation of the enzyme [5,6]. Based on low-resolution cryo-EM data, EFL1 binds the GTPase-associated centre of the 60S subunit and undergoes an SBDS-dependent conformational change, whereby its catalytic module (domains I and II) sterically displaces eIF6 [7]. In this conformation, domain I of EFL1 is now anchored in the sarcin–ricin loop (SRL) which activates GTP hydrolysis by driving EFL1

into a GDP-bound conformation that in turn promotes its dissociation and that of SBDS [7]. In humans, defects in the production and function of ribosomes lead to a group of diseases referred to as ribosomopathies [8–10]. The Shwachman–Diamond Syndrome (SDS; OMIM #260400; #617941) is one such disorder associated with bone marrow failure and a high risk of developing myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia, together with exocrine pancreatic dysfunction, anaemia, neutropenia, and skeletal abnormalities [11,12]. SDS is an autosomal-recessive disease caused in most cases by mutations in the *SBDS* gene [13] and to a lesser extent by mutations in the gene encoding GTPase *EFL1*. Mutations in any of these proteins prevent the release of eIF6 from the 60S subunit, with the consequent imbalance of mature 60S subunits entering the pool of actively translating 80S ribosomes and a decrease in global translation [14,15].

The most common mutations in SBDS result in protein haploinsufficiency either via the disruption of the donor splice site of intron 2 or rearrangements that prematurely truncate the protein. Additionally, missense mutations that destabilise the protein fold or alter surface epitopes have also been reported, and their defect in a ribosome-free context is to weaken the interaction with EFL1 [13,16]. Different mutations have also been reported for EFL1 [15,17,18], although the molecular significance of those that do not affect the protein expression levels is still unclear. An initial approach using molecular dynamics simulations of three such mutants (R1095Q, M882K, and T127A) suggests they adopt a different conformation from the wild type [19]. Similarly, Small Angle X-ray Scattering (SAXS) studies on the yeast ortholog of mutant EFL1 R1095Q have revealed differences in the flexibility of the protein [17].

Diverse mosaic somatic genetic events have been described in the hematopoietic cells of SDS patients that bypass or compensate for the defects in ribosome production caused by germline *SBDS* mutations. In the bone marrow of patients, the most frequent germline alteration is an isochromosome for the long arms of chromosome 7, resulting in a double dose of the *SBDS* mutation that disrupts the donor splicing site but allows the production of a small amount of normal SBDS protein [20,21]. Interstitial deletions in the long arms of chromosome 20 rescue the deficiency of mature ribosomes by decreasing the dosage of eIF6, whose gene is lost in this chromosome deletion [22,23]. Other somatic genetic events that compensate for SBDS deficiency in SDS result in frameshift mutations leading to *EIF6* haploinsufficiency or missense mutations in conserved residues that destabilize the eIF6 protein or disrupt its binding interface with the 60S subunit [24,25]. This alleviating mechanism seems evolutionarily conserved, since yeast cells lacking *SDO1*, the *SBDS* ortholog, develop equivalent suppressor mutations in *TIF6* that attenuate the slow-growth phenotype and the subunit-joining defect [4].

Previous reports have shown that the expression levels and protein fold of *S. cerevisiae* Efl1 R1086Q, equivalent to mutation R1095Q described in SDS patients, are comparable to that of the wild-type protein [17]. So, the detrimental effect may not relate to a lack of enough protein to satisfy the physiological needs of the cell. Consistent with this, here, we show that mutant Efl1 R1086Q cannot efficiently release Tif6 from the 60S subunit using an ex vivo release assay with purified components. To gain further insights into the malfunction of EFL1 mutations and possible alterations in their communication with SBDS and the guanine nucleotides, we characterised the binding energetics of *S. cerevisiae* Efl1 R1086Q using isothermal titration calorimetry. The data presented here suggest this mutant transition through a complex conformational landscape upon binding to Sdo1 and guanine nucleotides distinct from that previously described for wild-type Efl1. The interaction with MgGTP did not induce a conformational change as observed for other GTPases and native Efl1; instead, binding occurred via rigid-body interaction. Similarly, Sdo1 could not elicit the structural and energetic effects expected to function as its guanine exchange factor. It no longer stabilised the GTP-bound conformation but favoured the complex with GDP. These alterations could be partially alleviated by a second variant located far away from domain IV, where the R1086Q mutation locates, suggesting that an intramolecular network communicates the effector module of Efl1 with the catalytic one. Considering that this

mutant cannot efficiently release Tif6 from the 60S ribosomal subunit, it is plausible that these alterations transmit into the ribosomal context, decreasing the number of mature subunits produced.

2. Materials and Methods

2.1. Protein Expression and Purification

S. cerevisiae Efl1 wild type and mutants R1086Q, L910K, T33A, and R1086Q P151L were recombinantly expressed in *S. cerevisiae* and purified as described elsewhere [6,17,26]. Protein purity was assessed with SDS-PAGE, and the samples were stored in 50 mM HEPES-KOH pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 10% glycerol at −80 °C until further use. Yeast Sdo1 was recombinantly expressed in *Escherichia coli* C41 and purified as described in [26,27].

2.2. Purification of *S. cerevisiae* 60S Ribosomal Subunits

Ribosomal 60S subunits were purified from *S. cerevisiae* strain JD1370 (*MATa trp1 ura3 leu2 pep4::HIS3 nuc1::LEU2*) [28] as described in [29] with some modifications. Yeast cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.8–1.0 in 1 L of YEPD medium. Prior to collection, the cells were incubated for 2 min with 100 µg/mL cycloheximide to stop protein synthesis and chilled at 4 °C for further 15 min. Cells were harvested by means of centrifugation and washed twice with cold lysis buffer (100 mM potassium acetate, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10.5 mM magnesium acetate, 1 mg/mL heparin, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine, and 0.5 mM EDTA). Cells were resuspended in the same buffer and disrupted by means of friction with glass beads in a FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) with four rounds of 30 s followed by 5 min rest on ice. The resulting lysate was cleared using centrifugation at 11,768 × *g* at 4 °C for 20 min. The supernatant was placed on top of a 2.5 mL sucrose cushion (100 mM potassium acetate, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10.5 mM magnesium acetate, 1 M sucrose, 500 mM potassium chloride, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, and 0.1 mM benzamidine) and centrifuged for 2.5 h at 222,529 × *g* in a 70Ti rotor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Following centrifugation, the pellet was resuspended in high-salt wash buffer consisting of lysis buffer supplemented with 1.5 M potassium chloride. Insoluble material was removed using centrifugation, and soluble material was layered on top of a 2.5 mL sucrose cushion and centrifuged for 2.5 h at 222,529 × *g* as mentioned above. The pellet was resuspended in subunit separation buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 µM MgCl₂, 500 mM potassium chloride, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, and 0.1 mM benzamidine) and stirred on ice for 1 h to dissociate the ribosomal subunits. In total, 50–80 optical units measured at 254 nm were loaded on top of a 10–40% linear sucrose gradient (50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 µM MgCl₂, 500 mM potassium chloride, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, and 0.1 mM benzamidine) and centrifuged for 6 h at 70,358 × *g* in a 45Ti rotor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) at 4 °C. The gradient was fractionated by monitoring the absorbance at 254 nm. The 60S subunits were pooled together and pelleted at 222,529 × *g* for 3 h in a 70Ti rotor. Finally, 60S subunits were resuspended in storage buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 100 mM potassium acetate, 10.5 mM magnesium acetate, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine, and 250 mM sucrose) and stored at −80 °C until further use. The concentration of purified 60S ribosome subunits was determined by measuring the absorbance at 260 nm and using an extinction coefficient of 4 × 10⁷ cm^{−1} M^{−1} [30].

2.3. Tif6 Release Assay

The release of Tif6 (yeast orthologue of eIF6) was performed as previously described in [3,15]. Reaction mixtures contained 10 nM 60S subunits, 40 nM Tif6, 50 nM Efl1 variant, 50 nM Sdo1, and 100 µM GTP in buffer of 10 mM Tris-HCl at pH 7.4, 75 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂ supplemented with RNase inhibitors (Promega, Madison, WI, USA) and protease inhibitors free of EDTA (GoldBio, St. Louis, MO, USA). GTP was omitted in the negative control, and 50 mM EDTA was added as the positive control to disassemble the

60S ribosomal subunits. Reaction mixtures of 100 μL were incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min and added on top of 150 μL of a 30% sucrose cushion prepared in the same buffer. Samples were centrifuged at 476,000 \times g for 30 min in an Optima tabletop MX ultracentrifuge with a TLA-100 rotor. The top 200 μL (free fraction) was recovered, and the remaining 50 μL was resuspended in 150 μL of the same buffer. Samples were precipitated with 30% trichloroacetic acid, electrophoresed in 10% Tris-glycine SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and immunoblotted with antibodies anti-eIF6 (PA531066; Thermo Scientific; dilution 1:3000) and anti-uL3 (OAAB09713; Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA; dilution 1:500) overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Subsequently, the membranes were washed and incubated with an anti-rabbit antibody (31466; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; dilution 1:10,000). The chemiluminescent signal was visualised with an ECL chemiluminescence kit (Amersham Bioscience). Signals were quantified using programme Image J version 1.8.0.

2.4. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

All calorimetric measurements were carried out using MicroCalTM iTC₂₀₀ System (GE Healthcare, Northampton, MA, USA) in a temperature range of 25–35 $^{\circ}\text{C}$. Experiments were performed in a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 100 μM DTT, and 5% glycerol. In the titrations with Mg^{2+} -bound nucleotides, both the ligand and protein solutions contained 5 mM MgCl_2 . In the case of titrations with Mg^{2+} -free nucleotide, both the ligand and protein solutions were supplemented with 2 mM EDTA to sequester any residual trace of metal ions in solution. Protein samples and ligands were prepared in the exact same buffer prior to each titration. Protein concentration in the cell comprised 30–50 μM GTPase, while the ligand concentration in the syringe was 2–3 mM for GTP, MgGTP, GDP, and MgGDP. To ensure measuring the interaction of the complex Efl1 R1086Q•Sdo1 with the nucleotide, an eight-fold concentration excess of Sdo1 was used compared with that of the enzyme. This resulted in >80% of Efl1 being bound to Sdo1 before nucleotide addition, considering the dissociation constant measured in this work. The titration schedule consisted of 15–20 consecutive injections of the ligand with 5 min intervals between injections and a stirring rate of 700 rpm. The dilution heat of the ligand was obtained by adding the ligand to a buffer solution under identical conditions and with the same injection schedule used for the protein sample. All samples were degassed for 10 min prior to the experiment.

The binding isotherms obtained for the isolated GTPase in the presence of $\text{Mg}(\text{II})$ were analysed using a ternary model in which the protein can bind to the free nucleotide (G(D)TP) or that bound to one magnesium ion ($\text{MgG}(\text{D})\text{TP}$); additionally, GTP may also exist in the form of Mg_2GTP , which is not recognised by the protein. The derivation of this coupled-equilibria model can be reviewed in [6,31]. The binding constant (K_b), the enthalpy change (ΔH_b), and the stoichiometry (n) were obtained with the non-linear routines implemented in Origin 5.0 (OriginLab, Co., Northampton, MA, USA) using a one-binding-site model as described in [32,33]. The heterotropic cooperativity for the binding of guanine nucleotides and Sdo1 to Efl1 R1086Q were calculated as previously described in [6,32]. The cooperative effects of $\text{Mg}(\text{II})$ on the binding of guanine nucleotides to Efl1 R1086Q alone and bound to Sdo1 were calculated as follows:

$$\kappa = K_{\text{E-MG}}/K_{\text{E-G}}$$

$$\kappa = K_{\text{ES-MG}}/K_{\text{ES-G}}$$

$$\Delta h = \Delta H_{\text{E-MG}} - \Delta H_{\text{E-G}}$$

$$\Delta h = \Delta H_{\text{ES-MG}} - \Delta H_{\text{ES-G}}$$

where subscripts E-MG and E-G stand for the association of the metal-bound and metal-free guanine nucleotide with mutant Efl1, respectively. Corresponding expressions applied to the heterotropic cooperativity of the binding of nucleotides to the preformed complex, Efl1•Sdo1 (ES).

The impact of Sdo1 on the binding of Efl1 R1086Q to guanine nucleotides in the presence of magnesium ions is contained in K_{ES-MG} and ΔH_{ES-MG} relative to the K_{E-S} and ΔH_{E-S} values; analogous ratios report the effects in the absence of Mg(II):

$$\kappa = K_{ES-MG}/K_{E-S}$$

$$\kappa = K_{ES-G}/K_{E-G}$$

$$\Delta h = \Delta H_{ES-MG} - \Delta H_{E-S}$$

$$\Delta h = \Delta H_{ES-G} - \Delta H_{E-G}$$

The corresponding cooperative entropy change was calculated as:

$$T\Delta s = \Delta h - \Delta g = \Delta h + RT\ln\kappa$$

The detailed methodology and equations to compute the changes in the accessible surface area (ΔASA) of the GTPase upon binding to nucleotides and the ΔS energetic-based parameters are reported in [6]. Briefly, the water-accessible areas (ASAs) were computed using programme NACCESS, while the changes in accessible surface area (ΔASA) upon the formation of each GTPase–nucleotide complex were estimated considering the difference between the complex and the sum of the free interacting partners. The calculated polar (ΔASA_p) and apolar (ΔASA_{ap}) area changes were subsequently used to estimate the free molecular partners. Polar (ΔASA_p) and apolar (ΔASA_{ap}) area changes were used to calculate the heat-capacity change as if the binding occurred as a rigid-body interaction (ΔCp_{rb}) according to:

$$\Delta Cp_{rb} = \alpha\Delta ASA_{ap} + \beta\Delta ASA_p$$

where $\alpha = 0.45 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} (\text{\AA}^2)^{-1}$ corresponds to the heat-capacity change of the buried apolar surface area and $\beta = -0.26 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} (\text{\AA}^2)^{-1}$ represents the heat-capacity change of the buried polar surface [34].

The heat capacity due to conformational changes (ΔCp_{conf}) was solved by clearing the variable from:

$$\Delta Cp_b = \Delta Cp_{rb} + \Delta Cp_{conf}$$

and the corresponding change in accessible surface area given by the conformational change was solved as follows:

$$\Delta Cp_{conf} = 0.45f_{ap} \Delta ASA_{conf} - 0.26f_{ap} \Delta ASA_{conf}$$

where $f_{ap} = 0.68$ represents the average hydrophobicity index found at protein–protein interfaces [35].

The entropic contribution due to conformational change (ΔS_{conf}) was solved by clearing the variable from:

$$\Delta S_b = \Delta S_{solv} + \Delta S_{r-t} + \Delta S_{conf}$$

Solvation entropy (ΔS_{solv}) represents the changes in the degrees of freedom of the solvent molecules upon complex formation and can be calculated as follows:

$$\Delta S_{solv} = \Delta Cp_b (\ln T/T_s)$$

with T_s being the reference temperature (112 °C) at which the contribution of solvation effects to the overall binding entropy are negligible. The contribution due to changes in roto-translational entropy (ΔS_{r-t}) for a bimolecular association corresponds to $-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ [36].

3. Results

EFL1 works together with its effector protein, SBDS, to release eIF6 in the final maturation step of the 60S ribosomal subunit. Recently, mutations in EFL1 together with those in SBDS have been described to cause Shwachman–Diamond Syndrome [15,17,18]. We

enquired if yeast mutation R1086Q, equivalent to the R1095Q disease mutation in human EFL1, could efficiently release Tif6 (the yeast orthologue of human eIF6) using an ex vivo system with purified yeast components (Figure 1). In the presence of wild-type Efl1, Tif6 was enriched in the free fraction, confirming its efficient release by contrasting with the lesser amount that remained bound to the 60S subunits. Oppositely, mutant Efl1 R1086Q resulted in a reduced portion of Tif6 in the free fraction compared with that for the wild type, evidencing its inability to adequately free Tif6. These results, together with previous reports showing similar protein expression levels of the wild type and this mutant in yeast cells, and comparable protein fold and hydrodynamic behaviour [17], reinforce the idea that this mutant is folded but functionally defective. However, the underlying cause of this malfunction is not clear. To shed light on the affected mechanisms, we studied the interaction of this mutant with its target molecules, guanine nucleotides, SBDS, and the 60S ribosomal subunit.

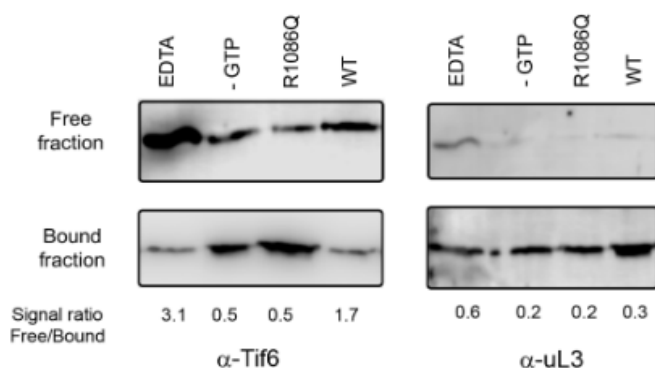


Figure 1. Tif6 release assay mediated by yeast Efl1. Yeast 60S ribosomal subunits were incubated in the presence of GTP, Sdo1, and yeast Efl1 wild-type or R1086Q mutant and sedimented through a 30% sucrose cushion. The distribution of Tif6 in the supernatant (free fraction) or sedimented together with the 60S subunit (bound fraction) was visualised using immunoblot. Positive control contained EDTA to disassemble the ribosomal subunits. Negative control lacked GTP.

To measure the studied equilibria and not the apparent values due to more than one equilibrium occurring because of catalysis, we measured the interactions between MgGTP, and Efl1 wild type, R1086Q, and a catalytically inactive mutant when present in complex with Sdo1 and the 60S subunit. As a first step, we measured the dependence of GTP hydrolysis mediated by Efl1 R1086Q as a function of Sdo1 and 60S subunits to ensure full occupancy of the GTPase (Supplementary Figure S1A). GTP hydrolysis approached a maximum at a molar ratio of three molecules of Sdo1 per enzyme, suggesting that Efl1 had reached saturation. A second titration of 60S subunits to a constant ratio of 1:3 of GTPase and Sdo1 showed saturation at ~1.5 molecules of enzyme per 60S subunit; thus, a molar ratio of 1:3:1.5 was used to assemble ternary complex GTPase•Sdo1•60S.

We measured the binding of different Efl1 constructs present in complex with Sdo1 and 60S subunits to the fluorescence GTP analogue, mant-GTP, by following the increase in the fluorescence signal after excitation at 355 nm. Fluorescence intensities were plotted as a function of increasing nucleotide concentrations, and the dissociation constant (K_d) was calculated by fitting the data to a one-binding-site model (Supplementary Figure S1B). The calculated K_d for the binding of mant-GTP to catalytically inactive Efl1 mutant T33A present in complex with Sdo1 and the 60S subunits was 24 μ M, a value comparable to those of 36 and 32 μ M obtained for the Efl1 wild type and R1086Q mutant, respectively. This indicates that the effect of GDP present in the reaction cell due to catalysis did not skew the calculated dissociation constants in the span of the experimental measurement and supported the subsequent interaction experiments. Furthermore, the presence of mutant

Efl1 R1086Q in complex with Sdo1 and 60S subunits did not substantially alter its affinity for GTP in comparison to that bound only to Sdo1 whose dissociation constant at 25 °C corresponded to 29 μ M (see below). Because these values were obtained from equilibrium experiments, they implicitly contain the contribution of the conformational dynamics of the complex and thus suggest that Efl1 does not undergo further conformational changes on the ribosome when bound to GTP aside from that previously triggered by Sdo1.

3.1. Binding Energetics of Mutant Efl1 R1086Q and Guanine Nucleotides

To characterise the interaction energetics of Efl1 R1086Q with guanine nucleotides and evaluate the contribution of the magnesium ions to the binding, we performed isothermal titration calorimetric studies. Figure 2A,B show representative traces of the binding isotherms obtained for the complexes characterised in this section. Table 1 summarises the thermodynamic binding values for the interaction of Efl1 R1086Q with guanine nucleotides as a function of temperature. It stood out that the thermodynamic processes governing the interactions of mutant R1086Q with both nucleotides were entirely different. The binding to GTP and MgGTP was an endothermic process, while that to GDP was exothermic irrespective of the metal's presence. This observation contrasts with the thermodynamic signature for the binding of wild-type Efl1 to GTP/MgGTP, which is described by an exothermic process [6]. The binding affinity for both nucleotides was similar even though their thermodynamic signatures differed. The binding to the triphosphate nucleotide was entropically driven, although the binding to the free-metal form exhibited a significant temperature dependence. At 35 °C, the affinity for GTP was three times larger than at 25 °C due to a larger entropic contribution, while in the same temperature interval, that for MgGTP only increased 1.2-fold. In contrast, the temperature had a lesser impact on the binding affinity of the diphosphate nucleotide, with disparate effects on the individual thermodynamic contributions. The interaction with GDP was enthalpically and entropically favourable at 25 °C, and as temperature increased, the entropic contribution became unfavourable and was compensated by an increase in binding enthalpy of ~ 6 kcal mol⁻¹. A similar trend was observed for the binding to MgGDP, with a greater decrease in entropy that remained favourable, compensated by a minor increase in enthalpy of only ~ 3 kcal mol⁻¹.

The mutual effect of nucleotides and Mg(II) on the binding to Efl1 R1086Q is contained in the magnitude of the cooperative heterotropic association constant (k), which is defined by the ratio of the metal-bound to the metal-free nucleotide association constants. Magnesium ions destabilised the interaction of Efl1 R1086Q with both nucleotides, as shown for k values smaller than 1 (Table 2). This behaviour opposed that observed for wild-type Efl1, in which magnesium ions increased the affinity for GTP ($k = 2$ at 30 °C) [6]. The discrepancy mainly comes from less favourable entropy, suggesting that differential desolvation effects and/or changes in the flexibility of the mutant and wild-type protein impact the interaction affinity. So, they must likely adopt unlike conformations.

We calculated the heat-capacity changes (ΔC_p) to investigate the conformational rearrangements of Efl1 R1086Q upon binding to the guanine nucleotides. In protein-ligand interactions and in protein folding, changes in the fraction of polar and nonpolar surfaces buried upon complex formation, together with the degree of surface solvation, relate to the change in the heat capacity of binding and can be easily measured using ITC [37]. The solvation or exposure of polar groups characterises a negative ΔC_p . In contrast, the burial of polar groups results in a positive value and is the signature of the hydrophobic effect driving protein folding. Upon complex formation, the magnitude of C_p may change depending on which phenomenon dominates the process [38,39]. Assuming a linear dependence of ΔH_b with the temperature, the analysis of the data resulted in very different heat-capacity changes for the complexes formed by Efl1 R1086Q bound to either nucleotide irrespective of the metal (Figure 2C,D and Table 1). ΔC_p for Efl1 R1086Q•MgGTP was 10 cal mol⁻¹ K⁻¹, and it was -270 cal mol⁻¹ K⁻¹ for the complex with MgGDP. Similar changes were obtained for the corresponding Mg(II)-free nucleotides (30 and -250 cal mol⁻¹ K⁻¹ for GTP and GDP, respectively). The significantly negative

ΔC_p for the interaction of Efl1 R1086Q with the diphosphate nucleotide indicated the exposure of polar groups to the solvent. In contrast, the conformation adopted by the mutant bound to GTP and MgGTP exposed nonpolar residues to the solvent. Thus, Efl1 R1086Q adopted two distinct conformations depending on the bound nucleotide. More notorious is the difference in ΔC_p of this mutant compared with wild-type Efl1, whose binding to GTP in the presence and absence of Mg(II) corresponds to a large and negative value [6], reinforcing the idea that mutant Efl1 adopts a different conformation in complex with the triphosphate nucleotide.

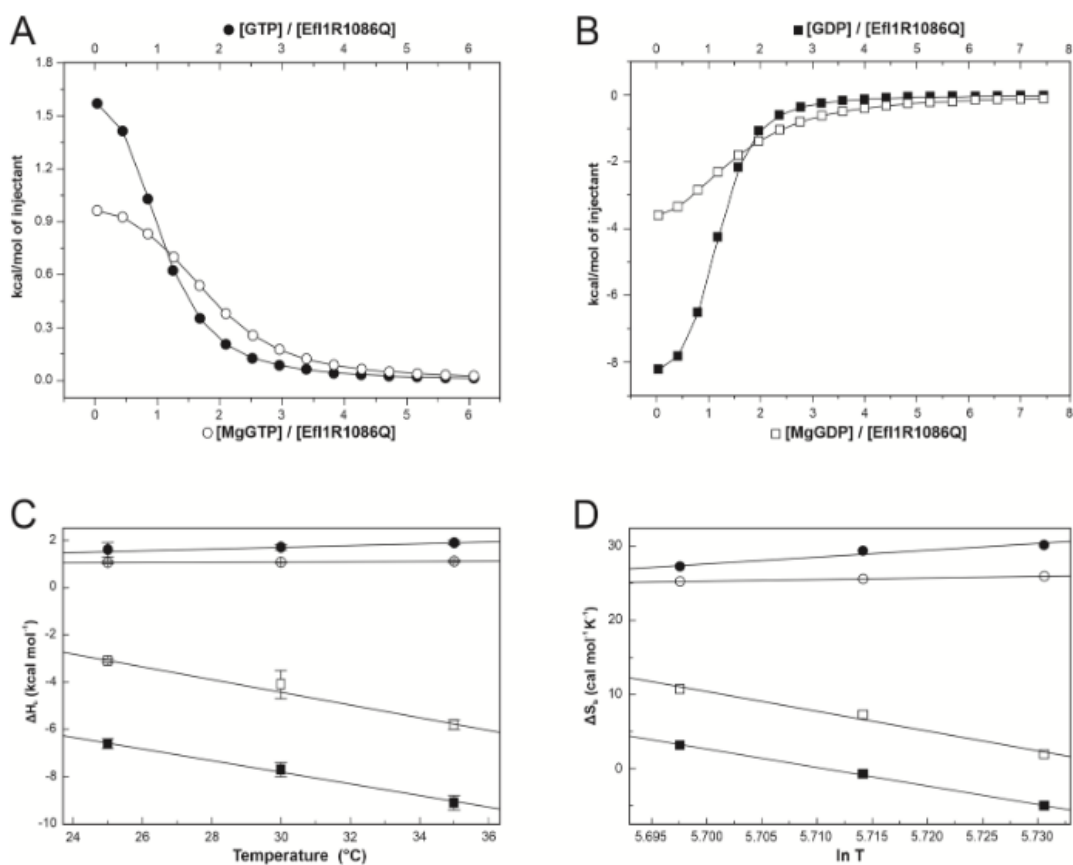


Figure 2. Calorimetric characterisation of the interaction between Efl1 R1086Q and guanine nucleotides. Panels (A,B) depict representative binding isotherms obtained at 30 °C for GTP (●), MgGTP (○), GDP (■), and MgGDP (□). Solid lines correspond to the fit to a one-binding-site model using non-linear regression. Panels (C,D) present binding enthalpy and entropy as functions of temperature. Solid lines correspond to the least squares linear fitting describing the thermal dependence of ΔH_b or ΔS_b assuming ΔC_p is constant in the temperature range spanned.

Table 1. Thermodynamic parameters for the binding of Efl1 R1086Q to guanine nucleotides determined using isothermal titration calorimetry.

Ligand	T (°C)	K _b (mM ⁻¹)	K _d (μM)	ΔG _b (kcal mol ⁻¹)	ΔH _b (kcal mol ⁻¹)	-TΔS _b (kcal mol ⁻¹)	ΔCp _b (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	
Efl1 R1086Q								
GTP	+Mg ²⁺	25	61 ± 7	16 ± 2	-6.53	1.04 ± 0.05	-7.57	
		30	64 ± 11 (8 ± 0.7)	16 ± 3 (125 ± 11)	-6.67 (-5.4)	1.07 ± 0.03 (-6.4 ± 0.4)	-7.74 (1.0)	10 ± 2 (-560 ± 23)
		35	76 ± 10	13 ± 2	-6.88	1.12 ± 0.06	-8.0	
	-Mg ²⁺	25	60 ± 18	17 ± 5	-6.52	1.6 ± 0.3	-8.12	
		30	156 ± 34 (4 ± 0.3)	6 ± 1 (250 ± 19)	-7.20 (-5.0)	1.7 ± 0.1 (-7.3 ± 0.3)	-8.90 (2.3)	30 ± 6 (-700 ± 34)
		35	178 ± 28	6 ± 1	-7.40	1.9 ± 0.1	-9.30	
GDP	+Mg ²⁺	25	41 ± 5	24 ± 3	-6.29	-3.1 ± 0.1	-3.19	
		30	35 ± 7 (27 ± 3)	28 ± 6 (37 ± 4.1)	-6.30 (-6.1)	-4.1 ± 0.6 (-5.6 ± 0.2)	-2.20 (-0.5)	-270 ± 40 (-310 ± 5)
		35	34 ± 9	29 ± 8	-6.39	-5.8 ± 0.2	-0.59	
	-Mg ²⁺	25	336 ± 47	3 ± 0.4	-7.54	-6.6 ± 0.2	-0.94	
		30	245 ± 37 (64 ± 9)	4 ± 0.6 (16 ± 2.2)	-7.47 (-6.7)	-7.7 ± 0.3 (-6.7 ± 0.3)	0.22 (0.0)	-250 ± 17 (-318 ± 35)
		35	226 ± 34	4 ± 0.6	-7.55	-9.1 ± 0.3	1.55	
Efl1 R1086Q P151L								
GTP	+Mg ²⁺	25	55 ± 10	18 ± 3	-6.5	-1.7 ± 0.1	-4.8	
		30	59 ± 8	17 ± 2	-6.6	-2.5 ± 0.1	-4.1	-220 ± 35
		35	54 ± 5	18 ± 2	-6.7	-3.9 ± 0.1	-2.8	

Data in parenthesis correspond to those of wild-type Efl1 as reported in [6].

ΔCp_b can be dissected into two contributions, one concerning the conformational changes undergone by interacting molecules (ΔCp_{conf}) and the other related to the amount of hidden area at the binding interface as if the binding occurred as a rigid-body association (ΔCp_{rb}) [40]. Similarly, the entropy of binding (ΔS_b) consists of the contribution of three components: solvation entropy (ΔS_{solv}), roto-translational entropy (ΔS_{r-t}), and conformational entropy (ΔS_{conf}) [36,41]. The first refers to changes in the solvation of the interacting surfaces, while the second results from the restriction of the rotation and translation motions of the binding molecules. The deconvolution of measured ΔCp_b and ΔS_b into their corresponding conformational contributions helps to rationalise the significance of these thermodynamic parameters in molecular terms. ΔCp_b for GDP/MgGDP was mainly dominated by the contribution of the conformational change in which Efl1 R1086Q buried a surface of ~1000 Å² corresponding to 21 residues (Table 3). In contrast, binding to GTP/MgGTP reflected the counterbalance of opposing contributions from the rigid-body association and the conformational heat-capacity change. The first one involved the burial of approximately three nonpolar residues at the binding interface and the exposure of three other nonpolar residues arising from the conformational change. Comparing these data with previous reports for the wild-type protein suggests that both proteins undergo a similar conformational change upon binding to the diphosphate nucleotide in the absence of Mg(II). However, seemingly dissimilar for the triphosphate nucleotide, considering the twenty-fold excess of residues (66 vs. 3 residues) being buried in the native enzyme. The extent of these conformational changes in Efl1 R1086Q were similar when analysed in terms of conformational entropy. Many rotatable bonds stiffened in the complex with GDP/MgGDP, with just as many loosening in the complex bound to GTP/MgGTP. Favourable solvation entropy for the complex of Efl1 R1086Q with GDP/MgGDP contrasting with the slightly unfavourable value for GTP/MgGTP suggested a different rearrangement of the solvent molecules around the complexes due to the exposure of hydrophobic groups in the latter

(Table 3). The conformation adopted by Efl1 R1086Q was different when bound to either nucleotide, but it paralleled that of the wild type in complex with GDP/MgGDP. The mutation profoundly affected the recognition of GTP/MgGTP with a larger affinity at the expense of an altered conformational change.

Table 2. Effect of Mg^{2+} and Sdo1 in the cooperativity parameters for the heterotropic interaction of Efl1 R1086Q with guanine nucleotides.

Complex	Ligand	T (°C)	κ	Δg (kcal mol ⁻¹)	Δh (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta s$ (kcal mol ⁻¹)
Effect of Mg^{2+}						
Efl1 R1086Q + Sdo1	GTP	25	0.6	0.3	2.9	-2.6
		30	0.3	0.6	0.9	-0.3
		35	0.5	0.5	-1.4	1.9
	GDP	25	1.9	-0.4	0.3	-0.7
		30	3.7	-0.8	1.6	-2.4
		35	5.4	-1.0	2.7	-3.7
Efl1 R1086Q - Sdo1	GTP	25	1.0	-0.1	-0.56	0.5
		30	0.4 (2)	0.6 (-0.4)	-0.63 (0.9)	1.2 (-1.3)
		35	0.4	0.5	-0.78	1.3
	GDP	25	0.1	1.3	3.5	-2.3
		30	0.1 (0.4)	1.2 (0.6)	3.6 (1.1)	-2.4 (-0.5)
		35	0.2	1.2	3.3	-2.1
Effect of Sdo1						
Efl1 R1086Q + Mg^{2+}	GTP	25	0.6	0.3	-2.1	2.5
		30	0.3	0.7	-4.1	4.8
		35	0.3	0.9	-6.2	7.1
	GDP	25	2.7	-0.6	1.0	-1.6
		30	3.6	-0.8	0.3	-1.1
		35	4.6	-0.9	0.5	-1.4
Efl1 R1086Q - Mg^{2+}	GTP	25	1.0	0.0	-5.6	5.6
		30	0.3 (22.3)	0.7 (-1.8)	-5.6 (5.2)	6.3 (-7.0)
		35	0.2	0.9	-5.6	6.5
	GDP	25	0.2	1.06	4.2	-3.1
		30	0.1 (0.3)	1.2 (0.8)	2.3 (-0.7)	-1.2 (1.5)
		35	0.1	1.3	1.2	0.5

Data in parenthesis correspond to or were calculated from those reported in [6] for wild-type Efl1.

Early studies on C-terminal deletions of Efl1 identified intragenic suppressor mutations that correct the slow-growth phenotype conferred by the removal of the last 22 residues of the protein [42]. We reasoned that any of these two mutations, P151L or T657M, may alleviate the defects described above for the binding of Efl1 R1086Q to MgGTP. Double mutant Efl1 R1086Q P151L exhibited a partial recovery of the thermodynamic parameters of the binding to MgGTP with respect to the Efl1 wild type (Tables 1 and 3). More notorious is the regaining of an exothermic process driven by both contributions, enthalpy and entropy, at all the temperatures tested, as previously observed for wild-type Efl1 [6]. ΔC_p of -220 cal mol⁻¹ K⁻¹ for the double mutant contrasted with the positive value obtained for R1086Q but approximated the -560 cal mol⁻¹ K⁻¹ of the wild-type enzyme. The deconvolution of the heat capacity resulted in half of the polar residues being exposed to the solvent compared with those in wild-type Efl1. Thus, suppressor mutation P151L present in domain I seemed to partially rescue the altered conformation elicited by mutation R1086Q located far away in domain IV of the yeast Efl1 orthologue.

Table 3. Energy-based calculations of the conformational changes of mutant Efl1 alone or in complex with Sdo1 upon nucleotide binding at 30 °C.

Ligand	ΔC_{p_b}	$\Delta C_{p_{rb}}$	$\Delta C_{p_{conf}}$	$-\Delta ASA_{conf}$	N_{conf}^{res}	ΔS_b	ΔS_{solv}	ΔS_{conf}	N_{conf}^{rotb}	
Efl1 R1086Q										
GTP	+Mg ²⁺	10 (−560)	−25 (−25)	35 (−535)	−157 (2401)	3 (51)	25 (−3)	−2 (143)	36 (−139)	21 (83)
	−Mg ²⁺	30 (−700)	−11 (−11)	41 (−689)	−184 (3092)	4 (66)	29 (−8)	−7 (179)	44 (−179)	27 (107)
GDP	+Mg ²⁺	−270 (−310)	−48 (−48)	−222 (−262)	996 (1176)	21 (25)	7 (2)	65 (79)	−49 (−70)	30 (42)
	−Mg ²⁺	−250 (−318)	−30 (−30)	−220 (−288)	987 (1293)	21 (28)	−1 (0)	60 (81)	−53 (−73)	31 (44)
Efl1 R1086Q•Sdo1										
GTP	+Mg ²⁺	−400	−25	−375	1683	36	9	96	−78	47
	−Mg ²⁺	30 (−90)	−11 (−11)	41 (−79)	−184 (355)	4 (8)	9 (16)	−7 (23)	24 (0)	14 (0)
GDP	+Mg ²⁺	−315	−48	−267	1198	25	11	75	−57	34
	−Mg ²⁺	−550 (−640)	−30 (−30)	−520 (−610)	2334 (2738)	50 (58)	3 (−5)	132 (164)	−121 (−161)	72 (96)
Efl1 R1086Q P151L										
GTP	+Mg ²⁺	−220	−25	−195	875	19	13	53	−31	19

Units for ΔC_p and ΔS correspond to $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ and for ΔASA are \AA^2 . N_{conf}^{res} corresponds to the number of residues changing conformation as absolute value. N_{conf}^{rotb} corresponds to the number of rotatable bonds changing conformation as absolute value. Data in parenthesis correspond to or were calculated from those reported in [6] for wild-type Efl1.

3.2. Effect of Sdo1 in the Interaction Energetics of Mutant Efl1 R1086Q with Guanine Nucleotides

It has been proposed that Sdo1 increases the affinity of Efl1 for GTP by inducing a conformational change that favours the binding of this nucleotide [5,6]. We investigated if Sdo1 could elicit the same effect on the Efl1 R1086Q mutant by measuring their interaction and the consequence of this interaction on guanine-nucleotide affinity (Figure 3 and Table 4). The affinity of Sdo1 for Efl1 R1086Q increased two-fold with the temperature and was enthalpically driven, with favourable entropy at 25 and 30 °C that became unfavourable at 35 °C. However, these binding parameters largely differed from those reported for the wild-type complex. The affinity of Efl1 R1086Q for Sdo1 decreased by one order of magnitude from 0.3 μM to 3 μM with respect to that of native Efl1 (Table 4). The analysis of the thermal dependence of ΔH_b resulted in a ΔC_{p_b} of $−440 \text{ cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ for the complex with mutant Efl1 (Table 3), which corresponded to half the magnitude of that for wild-type Efl1 ($−860 \text{ cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$). This difference suggests that the two complexes differ in half the number of residues being buried at the protein–protein interface or a change in conformation.

In subsequent experiments, the pre-formed Efl1 R1086Q•Sdo1 complex was titrated with guanine nucleotides (Table 4). The binding to the triphosphate was both enthalpically and entropically driven, with the magnesium ions having a large impact on the thermal dependence of these parameters. In the presence of magnesium ions, binding entropy decreased as a function of the temperature compensated by more favourable enthalpy, while in their absence, both contributions remained almost unchanged. This disparate effect of the metal on the binding of the complex for the triphosphate nucleotide resulted in dissimilar heat-capacity changes, $−400 \text{ cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ for MgGTP, contrasting with $30 \text{ cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ for GTP, which in turn implied the exposure of a different number of residues (36 vs. 4) of opposing hydrophobic nature (Table 3) and the consequent difference in conformation. Similarly, the dissection of binding entropy depicted a favourable solvation component but an unfavourable conformational change upon interaction with MgGTP, indicating a large change in the degrees of freedom of the solvent molecules released

during complex formation. These contributions were reverted in the absence of magnesium ions, reinforcing the idea that the metal impacted the recognition of this nucleotide and the corresponding conformational change (Table 3). The inspection of the cooperativity parameters showed that magnesium ions and Sdo1 destabilised the interaction of Efl1 R1086Q with the triphosphate nucleotide ($\kappa \leq 1$) due to unfavourable entropy (Table 2). This observation largely differed from the effect Sdo1 had on wild-type Efl1, which favoured 20–40-fold the interaction with GTP [6]. More notorious is the drastic change in binding enthalpy for the triphosphate from an endothermic process for the isolated enzyme to an exothermic one for the Efl1 R1086Q•Sdo1 complex. In the absence of magnesium ions, the affinity of the preformed complex for GTP decreased by 2–4 times compared with the free enzyme due to a large discrepancy between the less favourable entropy compensated by the enthalpic contribution (Tables 1 and 4). The heat-capacity change of $30 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ implied that only ~four residues changed conformation between the free and Sdo1-bound enzymes. In the presence of the metal, the affinity of complex Efl1 R1086Q•Sdo1 for MgGTP decreased as the temperature raised and showed a favourable enthalpic component with respect to that of the isolated enzyme. These differences in the thermodynamic contributions resulted in very different heat capacities for Sdo1-bound Efl1 R1086Q and the free enzyme ($-400 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ vs. $10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) with the concomitant differences in the number and nature of residues changing conformation in both complexes (Table 3). These results suggested that the complex formed between Efl1 R1086Q•Sdo1 and the triphosphate nucleotide and their thermodynamic properties were influenced by magnesium ions and were different from those of the wild-type enzyme. Similarly, at 25–30 °C, the binding of the diphosphate nucleotide to the Efl1 R1086Q•Sdo1 complex was also driven by favourable enthalpic and entropic contributions. As previously discussed, magnesium ions also elicited disparate effects on the binding of this nucleotide, and the affinity was 2–5 times greater in the presence of magnesium ions due to a more favourable entropic contribution (Table 4). The dissection of binding entropy for both GDP and MgGDP indicated a negative contribution from conformational entropy compensated by the solvation entropy, albeit to different extents. In the absence of magnesium, twice more residues were buried with an equivalent number of routable bonds freezing in the preformed complex (Table 3). The analysis of the mutual cooperativity indicated that the favourable entropic effect of Sdo1 on the interaction of mutant Efl1 with the diphosphate nucleotide depended on the presence of magnesium ions (Table 2).

Reciprocally, the diphosphate decreased three-fold the interaction of Sdo1 with mutant Efl1 in the presence of magnesium ions. In contrast, the triphosphate had no impact on the interaction between the two proteins (Figure 4). Therefore, Sdo1 aggravated the interaction of mutant Efl1 with MgGTP by an order of magnitude, a dissenting effect expected for Sdo1 acting as an effector that drives Efl1 into the active conformation, as it was previously described for the wild-type protein. The interaction of wild-type Efl1 with Sdo1 increased the affinity of the GTPase for its substrate GTP by a factor of ~70, predisposing a conformation in Efl1 that made it readily accessible to accommodate GTP with no further changes in ΔASA in relation to the isolated protein. In contrast, the association of MgGTP with preformed mutant Efl1 R1086Q•Sdo1 was accompanied by large and dissimilar ΔCp_b and ΔH_b compared with those observed for the isolated enzyme (Tables 1 and 4). This implied that a large conformational change still happened upon binding ($\Delta\Delta\text{Cp}_b -410 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) with the additional modification of 40 residues with respect to the isolated enzyme (Figure 2). On the other hand, the associated ΔCp_b value of MgGDP binding to mutant Efl1 was similar in the presence and absence of Sdo1 ($\Delta\Delta\text{Cp}_b -45 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) suggesting the burial of only four additional residues (Figure 2). Interestingly, the effect Sdo1 elicited on the conformational changes of mutant Efl1 upon binding to guanine nucleotides depended on the presence of magnesium ions, implying that Sdo1 may exert its influence by remodelling the metal binding pocket. Together the results showed that mutation R1086Q profoundly affected the internal rearrangement of interactions necessary to elicit the same conformational change observed in native Efl1 in response to its effector ligands.

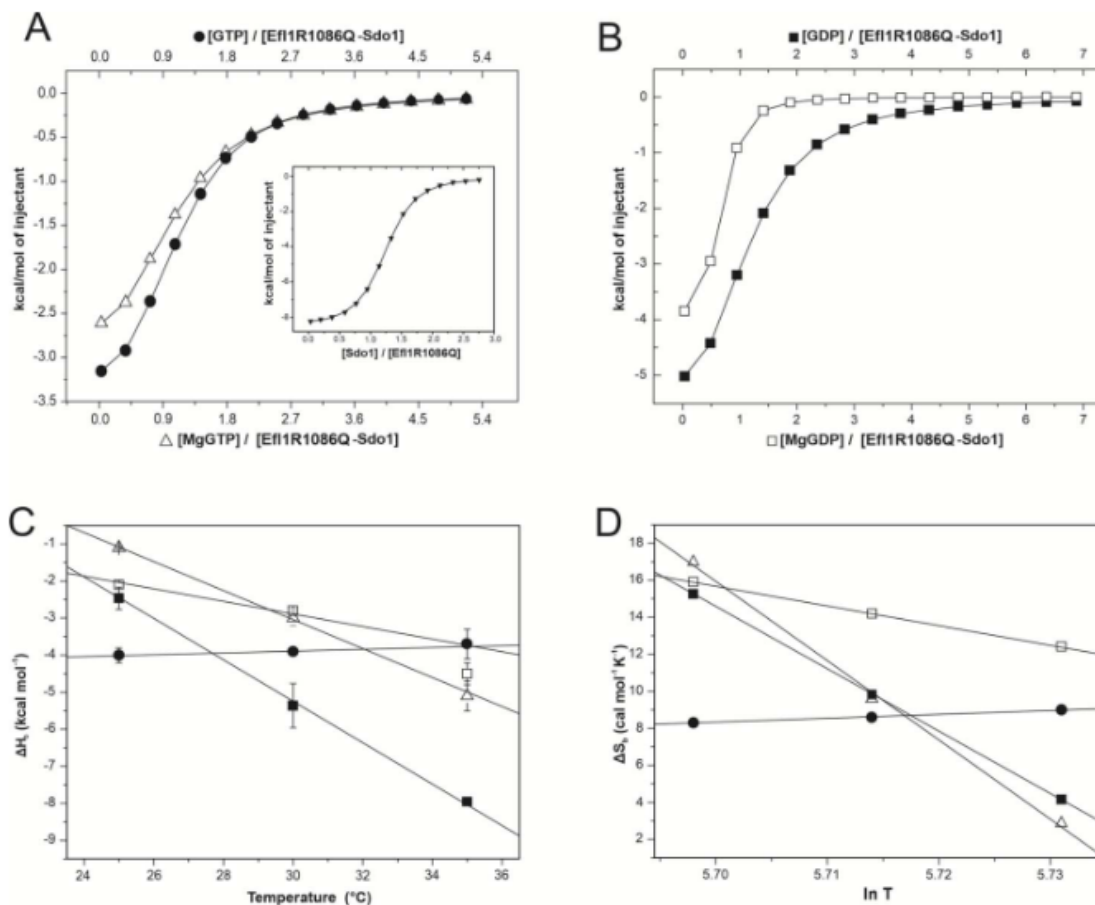


Figure 3. Calorimetric characterisation of the interaction between complex Efl1 R1086Q•Sdo1 and guanine nucleotides. Panels (A,B) depict representative binding isotherms obtained at 30 °C for GTP (●), MgGTP (Δ), GDP (■), and MgGDP (□). Insertion in panel A corresponds to the binding of Efl1 R1086Q to Sdo1. Solid lines correspond to the fit to the one-binding-site model using non-linear regression. Panels (C,D) present binding enthalpy and entropy as functions of temperature. Solid lines correspond to the least squares linear fitting describing the thermal dependence of ΔH_b or ΔS_b assuming ΔC_p is constant in the temperature range spanned.

Finally, we measured the enzyme kinetics of mutant Efl1 R1086Q as an isolated enzyme and bound to Sdo1 using an enzymatic coupled assay with a purine nucleoside phosphorylase (PNP) enzyme [43]. This analysis was extended to another disease mutation (EFL1 M882K) also located in domain IV of the GTPase using the equivalent yeast variant, Efl1 L910K [17]. The K_m and k_{cat} kinetic parameters were calculated using non-linear regression assuming a Michaelis–Menten model (Supplementary Table S1). Both kinetic variables were almost identical for the R1086Q mutant with respect to the wild-type enzyme, while those for the L910K mutant showed a modest decrease of 13% in k_{cat} and a similar increase in K_m . The catalytic constant for mutant R1086Q and the wild-type enzyme consisted of 0.67 min^{-1} , and it was 0.58 min^{-1} for mutant Efl1 L910K. The corresponding values of the catalytic constants for the binary complexes of mutant GTPases and Sdo1 did not significantly change with respect to the wild-type protein complex. Together, these results confirmed that these mutations did not alter the catalytic properties of Efl1. In line with the proposed role of Sdo1 as a guanine exchange factor of Efl1, previous results

have shown that the interaction of wild-type Efl1 with Sdo1 impacted its K_m for GTP, decreasing its value 2–3-fold [5,6,44]. The K_m values for the complexes formed between Sdo1 and Efl1 mutants decreased by half with respect to their cognate-free counterpart and differed from each other. The Sdo1 complexes with Efl1 mutants R1086Q and L910K had K_m values approximately 1.6 larger than that of the native protein, consisting of 84 and 90 μM , respectively, and contrasting with the value of 53 μM for wild-type Efl1. The measured K_m value comprises all the microscopic rate constants of the individual reactions occurring in the enzyme, which include the binding to the substrate and product and the corresponding conformational changes. Thus, the increase in K_m for the mutant binomials suggested that their recognition of GTP was impaired largely because Sdo1 could not elicit the conformational change occurring in the native complex.

Table 4. Thermodynamic parameters for the binary and ternary interaction systems formed among Efl1 R1086Q, Sdo1, and guanine nucleotides determined using isothermal titration calorimetry.

Ligand	T (°C)	K_b (mM ⁻¹)	K_d (μM)	ΔG_b (kcal mol ⁻¹)	ΔH_b (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S_b$ (kcal mol ⁻¹)	ΔC_{p_b} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	
Efl1 R1086Q								
Sdo1	25	256 ± 47	3.9 ± 0.7	-7.4	-4.3 ± 0.1	-3.1		
	30	288 ± 56 (3110 ± 630)	3.4 ± 0.6 (0.3 ± 0.0)	-7.6 (-9.0)	-6.3 ± 0.2 (-13.4 ± 0.4)	-1.3 (4.4)	-440 ± 23 (-860 ± 31)	
	35	543 ± 76	1.8 ± 0.2	-8.1	-8.7 ± 0.1	0.6		
Efl1 R1086Q•Sdo1								
GTP	+Mg ²⁺	25	34 ± 3	29 ± 5	-6.2	-1.1 ± 0.04	-5.1	
		30	17 ± 1	58 ± 7	-5.9	-3.0 ± 0.2	-2.9	-400 ± 11
		35	19 ± 2	52 ± 7	-6.0	-5.1 ± 0.4	-0.9	
	-Mg ²⁺	25	57 ± 6	17 ± 5	-6.5	-4.0 ± 0.2	-2.5	
		30	44 ± 1 (89 ± 12)	23 ± 7 (11 ± 1)	-6.5 (-6.8)	-3.9 ± 0.1 (-2.1 ± 0.2)	-2.6 (-4.7)	30 ± 6 (-90 ± 5)
		35	39 ± 8	25 ± 7	-6.5	-3.7 ± 0.4	-2.8	
GDP	+Mg ²⁺	25	110 ± 23	9 ± 2	-6.9	-2.1 ± 0.08	-4.7	
		30	125 ± 14	8 ± 1	-7.1	-3.8 ± 0.05	-3.3	-315 ± 9
		35	158 ± 18	6 ± 1	-7.3	-5.3 ± 0.11	-2.0	
	-Mg ²⁺	25	57 ± 1.5	17 ± 0.5	-6.5	-2.5 ± 0.4	-4.0	
		30	33 ± 5.0 (19 ± 1)	30 ± 4 (52 ± 1)	-6.3 (-5.9)	-5.4 ± 0.6 (-7.4 ± 0.0)	-1.0 (1.5)	-550 ± 18 (-640 ± 34)
		35	29 ± 4.2	34 ± 5	-6.30	-8.0 ± 0.8	1.7	

Data in parenthesis correspond to those of wild-type Efl1 as reported in [6].

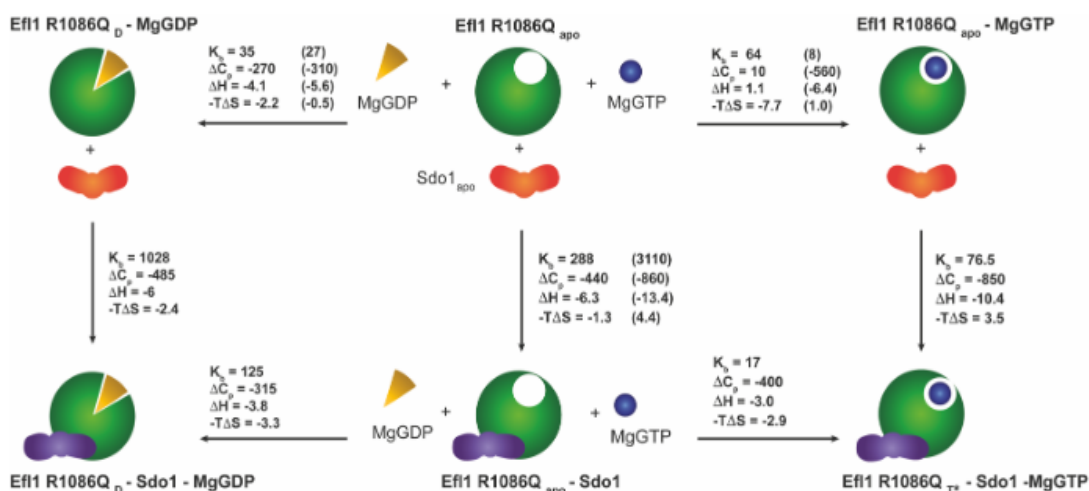


Figure 4. Energetics of the coupled equilibria among mutant Efl1 R1086Q, Sdo1, and guanine nucleotides in the presence of magnesium ions at 30 °C. Analyses indicated that mutant Efl1 adopted three different conformations: (1) an *apo* form of the enzyme adopted by the free enzyme and bound to MgGTP or Sdo1 (Efl1 R1086Q_{apo}), (2) a *D* conformation (Efl1 R1086Q_D) bound to MgGDP or MgGDP•Sdo1, and (3) a *T** conformation interacting with MgGTP and Sdo1. Data in parenthesis correspond to those of wild-type Efl1 as reported in [6]. Units: K_b —mM⁻¹; $-T\Delta S$ and ΔH —kcal mol⁻¹; ΔC_p —cal mol⁻¹ K⁻¹.

4. Discussion

Conformational changes are central to the function and regulation of GTPases, which transit between a compact, active conformation bound to GTP and a more elongated, inactive structure in complex with GDP [45]. The structural rearrangements inferred from the heat capacity and entropy of mutant Efl1 did not resemble the trend observed for translational GTPases or that of wild-type Efl1. The thermodynamic signature of the interaction between mutant Efl1 and MgGDP/GDP was different from that described for the wild-type protein, implying that the complexes are not alike. No conformational changes occurred upon binding to MgGTP, as judged by the small heat-capacity change close to zero and the burial of only 3 residues, a small number compared with the 51-residue changing conformation in the wild-type complex. So, mutant Efl1, instead of adopting an active T-conformation upon binding to MgGTP, remained in the initial form. This *apo* conformation may not necessarily be the same between mutant R1086Q and the wild-type protein, since differences in their radius of gyration (R_g) have already been reported [17]. The heterotropic cooperative parameters indicated that Mg(II) weakened the interaction of mutant Efl1 R1086Q with GTP and strengthened it for GDP, an opposing trend with respect to that described for classical GTPases.

GTPases operate as molecular switches with sophisticated regulatory mechanisms that sense the bound nucleotide through the interaction with effector biomolecules such as guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs) [46]. The proposed role of Sdo1/SBDS as a GEF of Efl1/EFL1 is to facilitate the transition of the GTPase into the active T-conformation favouring the interaction with GTP [6]. Instead, the interaction of Sdo1 with mutant Efl1 did not trigger any conformational change in the GTPase. ΔC_p of -440 cal mol⁻¹ K⁻¹ for the two vertical branches of the GTP thermodynamic cycle (Supplementary Figure S2) in the absence of Mg(II) ions corresponded to the burial of the protein–protein interface and/or the conformational change in Sdo1 but had no contributions from a conformational change happening in the GTPase. Thus, the additional heat capacity observed for the interaction of complex Efl1 R1086Q•Sdo1 with

MgGTP ($\Delta C_p -410 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) was contributed by a conformational change occurring exclusively in the GTPase. Whether this shape resembles the T-conformation achieved by the wild-type protein is still unclear, as these data were obtained only in the absence of the metal, and it has already been noted that Mg(II) has a profound impact on the interaction. However, the overall heat-capacity change of $-950 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ required to drive the native protein into ternary complex GTPase•GTP•Sdo1 was twice larger than that in mutant Efl1 ($-410 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). These differences suggest that the conformations of the mutant and wild-type proteins bound to Sdo1 and the triphosphate are different, and probable so is their function. Binding to MgGDP triggered a similar conformational change in isolated mutant Efl1 and that in the pre-formed complex with Sdo1. In the absence of magnesium ions, the free mutant and that bound to Sdo1 adopted two discernible conformations differing by twice the number of residues, an analogous scenario previously described for the wild-type protein and GDP. Based on these observations, it is evident that Sdo1 communicates with structural elements of switches 1 or 2 to mediate the conformational changes and modify the affinity of Efl1 for guanine nucleotides. Several GEFs remodel these switches through hydrophobic repulsion in the Mg(II) binding pocket [46]. The data shown here could imply that it is the case for this GTPase. However, in the current structures (PDB 5ANB, 5ANC), SBDS locates far away from the G-subdomains, which may only be explained by a long-distance allosteric effect. A summary of the conformational changes occurring in Efl1 R1086Q in response to its interaction with Sdo1 and nucleotides are shown in Figure 4 and Supplementary Figure S2. The present analysis suggests that mutant Efl1 R1086Q in solution adopts three differentiable conformations: 1) an *apo* form in the absence of any ligand and bound to MgGTP or Sdo1 (Efl1 R1086Q_{apo}), 2) a *D-like* conformation that can be achieved via the interaction with MgGDP or Sdo1 (Efl1 R1086Q_D), and 3) a *T*-like* conformation that differs from that of the wild-type protein (Efl1 R1086Q_{T*}). Therefore, this mutant exhibited a complex conformational landscape mediated by the interaction with both nucleotides and Sdo1, as previously described for the native protein, albeit differently. Its interaction with guanine nucleotides and Mg(II) did not resemble that of the wild type, and Sdo1 no longer induced the energetic and structural effects that favoured the interaction of the mutant GTPase with the trinucleotide. On the contrary, it increased the relative affinity of the mutant GTPase for GDP by a factor of twelve, driving the protein to the inactive conformation. Taken together, the results indicate that mutation R1086Q in domain IV perturbs the long-distance intramolecular communication that senses the nucleotide-binding status occurring in domain I of Efl1. These alterations in the thermodynamic signature of mutant Efl1 could explain its malfunction and aid our understanding of the molecular causes of SDS.

To what extent this altered conformational plasticity is transferable and detrimental in the ribosomal context awaits further investigation. However, it is difficult to envisage that the deviations observed here are fortuitous, since this mutant cannot efficiently release Tif6 (Figure 1), and the conformational transition facilitated by Sdo1 is vital for the eviction. Upon binding to the ribosomal subunit, Efl1 mostly adopt a T-like conformation stabilised by Sdo1, triggering the release of Tif6. The subsequent hydrolysis of GTP drives Efl1 into a GDP-bound conformation, prompting the release of the GTPase and its cofactor, Sdo1 [7]. According to our calorimetric analyses, only a small proportion of mutant Efl1 can be recruited to the ribosomal subunit by Sdo1, as expected by the one-order-of-magnitude decrease in the affinity of the two proteins. Instead of stabilising the GTP-bound conformation, Sdo1 favours the GDP-bound form of Efl1 R1086Q, a non-productive conformation unable to release Tif6 and affecting the rate of 60S subunits incorporated into the pool of translating ribosomes. If the upregulation of Efl1 is attenuated, the cells no longer have a persistent signal to produce mature ribosomal subunits that fulfils the cell requirements for translation.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12081141/s1>, Figure S1: Active complex formed with different constructs of Efl1 together with the effector protein Sdo1 and the ribosomal subunit 60S; Figure S2: Energetics of the coupled equilibria between mutant Efl1 R1086Q, Sdo1 and the guanine nucleotides in the absence of magnesium ions at 30 °C; Table S1: Summary of kinetic data for the activities of Efl1 and mutants alone and in complex with the effector Sdo1 [6,44,47].

Author Contributions: J.P.-J.—Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualisation, Writing—Original Draft, Writing—Review and Editing; J.V.T.-V.—Methodology, Investigation; G.G.-M.—Methodology; N.S.-P.—Conceptualisation, Formal analysis, Investigation, Supervision, Funding acquisition, Writing—Original Draft, Writing—Review and Editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research in our lab was supported by funding from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (CONACyT) grant 283909 and DGAPA-PAPIIT IN215122.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated in this study are contained within the article or the supplementary material.

Acknowledgments: Jesús Pérez Juárez is a student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship 298966 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). We thank Abril Gijsbers and Enrique Hernández-García for fruitful discussions on this manuscript. We appreciate the help of Norma Sánchez Sánchez during the purification of the ribosomal subunits and that of Teresa Montiel Montes for assistance with the immunoblot analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interests.

Abbreviations

EFL1: Elongation factor like-1 protein, SBDS; Shwachman Bodian Diamond Syndrome protein, SDS; Shwachman–Diamond Syndrome. ITC; isothermal titration calorimetry.

References

1. Nerurkar, P.; Altvater, M.; Gerhardy, S.; Schutz, S.; Fischer, U.; Weirich, C.; Panse, V.G. Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2015**, *319*, 107–140. [CrossRef]
2. Pena, C.; Hurt, E.; Panse, V.G. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 689–699. [CrossRef]
3. Finch, A.J.; Hilcenko, C.; Basse, N.; Drynan, L.F.; Goyenechea, B.; Menne, T.F.; Gonzalez Fernandez, A.; Simpson, P.; D'Santos, C.S.; Arends, M.J.; et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 917–929. [CrossRef]
4. Menne, T.F.; Goyenechea, B.; Sanchez-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*, 486–495. [CrossRef]
5. García-Márquez, A.; Gijsbers, A.; de la Mora, E.; Sánchez-Puig, N. Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 17669–17678. [CrossRef]
6. Luviano, A.; Cruz-Castañeda, R.; Sánchez-Puig, N.; García-Hernández, E. Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase. *Biophys. Chem.* **2019**, *247*, 13–24. [CrossRef]
7. 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*, 914–919. [CrossRef]
8. Farley-Barnes, K.I.; Ogawa, L.M.; Baserga, S.J. Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. *Trends Genet.* **2019**, *35*, 754–767. [CrossRef]
9. Venturi, G.; Montanaro, L. How Altered Ribosome Production Can Cause or Contribute to Human Disease: The Spectrum of Ribosomopathies. *Cells* **2020**, *9*, 2300. [CrossRef]
10. Yelick, P.C.; Trainor, P.A. Ribosomopathies: Global process, tissue specific defects. *Rare Dis.* **2015**, *3*, e1025185. [CrossRef]

11. Myers, K.C.; Davies, S.M.; Shimamura, A. Clinical and molecular pathophysiology of Shwachman-Diamond syndrome: An update. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **2013**, *27*, 117–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Shwachman, H.; Diamond, L.K.; Oski, F.A.; Khaw, K.T. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J. Pediatrics* **1964**, *65*, 645–663. [[CrossRef](#)]
13. Boocock, G.R.; Morrison, J.A.; Popovic, M.; Richards, N.; Ellis, L.; Durie, P.R.; Rommens, J.M. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 97–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Calamita, P.; Miluzio, A.; Russo, A.; Pesce, E.; Ricciardi, S.; Khanim, F.; Cheroni, C.; Alfieri, R.; Mancino, M.; Gorrini, C.; et al. SBDS-deficient cells have an altered homeostatic equilibrium due to translational inefficiency which explains their reduced fitness and provides a logical framework for intervention. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tan, S.; Kermasson, L.; Hoslin, A.; Jaako, P.; Faille, A.; Acevedo-Arozena, A.; Lengline, E.; Ranta, D.; Poiree, M.; Fenneteau, O.; et al. EFL1 mutations impair eIF6 release to cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* **2019**, *134*, 277–290. [[CrossRef](#)]
16. Gijbsers, A.; Montagut, D.C.; Méndez-Godoy, A.; Altamura, D.; Saviano, M.; Siliqi, D.; Sánchez-Puig, N. Interaction of the GTPase Elongation Factor Like-1 with the Shwachman-Diamond Syndrome Protein and Its Missense Mutations. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4012. [[CrossRef](#)]
17. Stepensky, P.; Chacón-Flores, M.; Kim, K.H.; Abuzaitoun, O.; Bautista-Santos, A.; Simanovsky, N.; Siliqi, D.; Altamura, D.; Méndez-Godoy, A.; Gijbsers, 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*, 558–566. [[CrossRef](#)]
18. Tan, Q.K.; Cope, H.; Spillmann, R.C.; Stong, N.; Jiang, Y.H.; McDonald, M.T.; Rothman, J.A.; Butler, M.W.; Frush, D.P.; Lachman, R.S.; et al. Further evidence for the involvement of EFL1 in a Shwachman-Diamond-like Syndrome and expansion of the phenotypic features. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* **2018**, *4*, a003046. [[CrossRef](#)]
19. Delre, P.; Alberga, D.; Gijbsers, A.; Sanchez-Puig, N.; Nicolotti, O.; Saviano, M.; Siliqi, D.; Mangiatordi, G.F. Exploring the role of elongation Factor-Like 1 (EFL1) in Shwachman-Diamond syndrome through molecular dynamics. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *38*, 5219–5229. [[CrossRef](#)]
20. Maserati, E.; Minelli, A.; Olivieri, C.; Bonvini, L.; Marchi, A.; Bozzola, M.; Danesino, C.; Scappaticci, S.; Pasquali, F. Isochromosome (7)(q10) in Shwachman syndrome without MDS/AML and role of chromosome 7 anomalies in myeloproliferative disorders. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2000**, *121*, 167–171. [[CrossRef](#)]
21. Minelli, A.; Maserati, E.; Nicolis, E.; Zecca, M.; Sainati, L.; Longoni, D.; Lo Curto, F.; Menna, G.; Poli, F.; De Paoli, E.; et al. The isochromosome i(7)(q10) carrying c.258+2t>c mutation of the SBDS gene does not promote development of myeloid malignancies in patients with Shwachman syndrome. *Leukemia* **2009**, *23*, 708–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Maserati, E.; Pressato, B.; Valli, R.; Minelli, A.; Sainati, L.; Patitucci, F.; Marletta, C.; Mastronuzzi, A.; Poli, F.; Lo Curto, F.; et al. The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: The role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *Br. J. Haematol.* **2009**, *145*, 190–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pressato, B.; Valli, R.; Marletta, C.; Mare, L.; Montalbano, G.; Lo Curto, F.; Pasquali, F.; Maserati, E. Deletion of chromosome 20 in bone marrow of patients with Shwachman-Diamond syndrome, loss of the EIF6 gene and benign prognosis. *Br. J. Haematol.* **2012**, *157*, 503–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kennedy, A.L.; Myers, K.C.; Bowman, J.; Gibson, C.J.; Camarda, N.D.; Furutani, E.; Muscato, G.M.; Klein, R.H.; Ballotti, K.; Liu, S.; et al. Distinct genetic pathways define pre-malignant versus compensatory clonal hematopoiesis in Shwachman-Diamond syndrome. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1334. [[CrossRef](#)]
25. Tan, S.; Kermasson, L.; Hilcenko, C.; Kargas, V.; Traynor, D.; Boukerrou, A.Z.; Escudero-Urquijo, N.; Faille, A.; Bertrand, A.; Rossmann, M.; et al. Somatic genetic rescue of a germline ribosome assembly defect. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5044. [[CrossRef](#)]
26. Gijbsers, A.; Nishigaki, T.; Sánchez-Puig, N. Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Protein-protein Interactions. *J. Vis. Exp.* **2016**, *116*, e54640. [[CrossRef](#)]
27. Shammas, C.; Menne, T.F.; Hilcenko, C.; Michell, S.R.; Goyenechea, B.; Boocock, G.R.; Durie, P.R.; Rommens, J.M.; Warren, A.J. Structural and mutational analysis of the SBDS protein family: Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19221–19229. [[CrossRef](#)]
28. Leshin, J.A.; Heselpoth, R.; Belew, A.T.; Dinman, J. High throughput structural analysis of yeast ribosomes using hSHAPE. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 478–487. [[CrossRef](#)]
29. Algire, M.A.; Maag, D.; Savio, P.; Acker, M.G.; Tarun, S.Z., Jr.; Sachs, A.B.; Asano, K.; Nielsen, K.H.; Olsen, D.S.; Phan, L.; et al. Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA* **2002**, *8*, 382–397. [[CrossRef](#)]
30. Smith, R.L.; Baca, O.; Gordon, J. Co-ordinate synthesis of ribosomes and elongation factors in the liver of immature chicks following a metabolic shift up. *J. Mol. Biol.* **1976**, *100*, 115–126. [[CrossRef](#)]
31. Pulido, N.O.; Salcedo, G.; Perez-Hernandez, G.; Jose-Nunez, C.; Velazquez-Campoy, A.; Garcia-Hernandez, E. Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the F(1)-ATPase beta subunit. *Biochemistry* **2010**, *49*, 5258–5268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pulido, N.O.; Chavelas, E.A.; Torner, F.J.; Gracia-Hernández, E. Current applications of isothermal calorimetry to the study of protein complexes. In *Advances in Protein Physical Chemistry*; Gracia-Hernández, E., Fernández-Velasco, A., Eds.; Transworld Research Network: Kerala, India, 2008; pp. 115–138.

33. Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S.A.; Freire, E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *261*, 35–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Murphy, K.P.; Freire, E. Thermodynamics of Structural Stability and Cooperative Folding Behavior in Proteins. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C.B., Richards, F.M., Edsall, J.T., Eisenberg, D.S., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1992; Volume 43, pp. 313–361.
35. 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*, 993–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Edgcomb, S.P.; Murphy, K.P. Structural energetics of protein folding and binding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 62–66. [[CrossRef](#)]
37. Jelesarov, I.; Bosshard, H.R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–18. [[CrossRef](#)]
38. Gomez, J.; Hilser, V.J.; Xie, D.; Freire, E. The heat capacity of proteins. *Proteins* **1995**, *22*, 404–412. [[CrossRef](#)]
39. Prabhu, N.V.; Sharp, K.A. Heat capacity in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *56*, 521–548. [[CrossRef](#)]
40. Ladbury, J.E.; Williams, M.A. The extended interface: Measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 562–569. [[CrossRef](#)]
41. Garcia-Hernandez, E.; Hernandez-Arana, A. Structural bases of lectin-carbohydrate affinities: Comparison with protein-folding energetics. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1075–1086. [[CrossRef](#)]
42. Becam, A.M.; Nasr, F.; Racki, W.J.; Zagulski, M.; Herbert, C.J. Ria1p (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genom.* **2001**, *266*, 454–462. [[CrossRef](#)]
43. Cogan, E.B.; Birrell, G.B.; Griffith, O.H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal. Biochem.* **1999**, *271*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gijssbers, A.; García-Márquez, A.; Luviano, A.; Sánchez-Puig, N. Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *437*, 349–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wittinghofer, A.; Vetter, I.R. Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 943–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cherfils, J.; Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 269–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Webb, M.R. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4884–4887. [[CrossRef](#)]