



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA INTERACCIÓN DE LA GTPASA EFL1 CON LOS  
NUCLEÓTIDOS DE GUANINA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
Adrián García Márquez**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig  
Instituto de Química, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Enrique García Hernández  
Instituto de Química, UNAM**

**Dra. Rosario Muñoz Clares  
Facultad de Química, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

Al financiamiento recibido de CONACYT dentro del proyecto 283909 “Escrutinio de moléculas orgánicas pequeñas contra la GTPasa EFL1 como blanco en el Síndrome de Shwachman-Diamond” para la realización de este trabajo.

A la Doctora Nuria Sánchez Puig por la confianza en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Carlos Mújica Jiménez por su apoyo y consejos técnicos.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares y el Dr. Enrique García Hernández por sus aportes como tutores de este proyecto.

A los miembros del laboratorio por su apoyo y aportes al desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado encargados de evaluar el proyecto.

## **Dedicatorias**

A mi madre, Buenaventura Márquez Márquez. Gracias por todo.

A mis hermanos Jorge García Márquez y Adalberto García Márquez.

A mi familia.

A mi tutora, por su paciencia y confianza.

## ABREVIATURAS

ANS	1-Anilino-8-naftaleno sulfonato
dH <sub>2</sub> O	Agua destilada
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600nm
Ef1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor-like 1” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
EFTUD1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 1” de <i>Homo sapiens</i>
FRET	Transferencia de energía resonante de fluorescencia
GAP	Del inglés GTPase-activating Protein (Proteína activadora de GTPasa)
GEF	Del inglés Guanine Exchange Factor (Factor Intercambiador de nucleótido de Guanina)
GSF	Del inglés Guanine Stabilizing Factor (Factor estabilizador de GTPasa)
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
GppNHp	Guanosín 5'-[β,γ-imido] trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
LB	Medio Luria-Bertani
mant	n-metil-antraniloil
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SBDS	Proteína mutada en el Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond
SD-URA	Synthetic Drop-out sin uracilo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	Tetrametilendiamina

# INDICE

1	ANTECEDENTES .....	9
1.1	Determinación de los parámetros de interacción proteína-ligando .....	9
1.1.1	Modelos de unión proteína-ligando a un sitio de unión.....	9
1.1.2	Reacción de unión entre proteína y ligando .....	11
1.2	Métodos para evaluar la interacción proteína-ligando.....	22
1.2.1	Dicroísmo circular (DC) .....	22
1.2.2	Fluorescencia .....	25
1.2.3	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	27
1.3	Biogénesis ribosomal en eucariontes.....	28
1.3.1	La GTPasa EFL1/EFTUD1 en la maduración ribosomal .....	29
1.3.2	La proteína SBDS.....	33
1.4	La superfamilia de las GTPasas .....	34
1.4.1	Dominio G.....	35
2	Justificación.....	36
3	Hipótesis .....	37
4	Objetivo General .....	37
4.1	Objetivos específicos .....	37
5	Metodologías.....	38
5.1	Sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	38
5.1.1	Sobreexpresión de las proteínas EFTUD1/Efl1 en levadura .....	38
5.2	Caracterización de las proteínas Efl1/EFTUD1 y su unión con los nucleótidos de guanina.....	39
5.2.1	Materiales .....	39
5.2.2	Dicroísmo circular (CD) .....	39

5.2.3	Dispersión dinámica de Luz (DLS) .....	40
5.3	Ensayo de fluorescencia con ANS para evaluar la interacción de EFTUD1 y Efl1 con los nucleótidos de guanina.....	40
5.4	Espectroscopia de fluorescencia de los triptófanos para evaluar la interacción de EFTUD1 y Efl1 con nucleótidos de guanina .....	41
5.5	Espectroscopía de energía resonante de fluorescencia (FRET) para evaluar la interacción de Efl1 con mant-nucleótidos.....	42
5.5.1	Velocidad de interacción de Efl1 con análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina .....	42
6	Resultados y Discusión.....	44
6.1	Purificación de las GTPasas EFL1 recombinantes .....	44
6.2	Plegamiento de las GTPasas EFL1 recombinantes.....	46
6.3	Cambios conformacionales en las proteínas Efl1 y EFTUD1 como resultado de la unión a nucleótidos de guanina.....	48
6.4	Caracterización de la interacción de Efl1/EFTUD1 con nucleótidos de guanina.....	51
6.4.1	Interacción de EFTUD1/Efl1 con nucleótidos de guanina mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos.....	51
6.4.2	Interacción de Efl1 con nucleótidos de guanina sola y unida a Sdo1 mediante FRET .....	59
7	Conclusiones.....	72

## RESUMEN

En eucariontes, la síntesis de ribosomas requiere del ensamblaje coordinado de cuatro moléculas de ARNr y 79 proteínas estructurales mediante la participación de más de 200 proteínas accesorias que no forman parte del ribosoma maduro. Una de estas proteínas accesorias es EFL1, una GTPasa que participa en las etapas finales de la maduración de la subunidad ribosomal 60S en citoplasma, que junto con la proteína mutada en el Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), liberan el factor de anti-asociación eIF6 de la superficie de la subunidad 60S. Lo anterior permite que esta se asocie con la subunidad pequeña 40S, y se lleve a cabo el ensamblaje de los ribosomas maduros. En este trabajo se caracterizó la interacción de la GTPasa humana, EFTUD1, y el ortólogo de levadura, Efl1, con los nucleótidos de guanina, libres y unidas a sus correspondientes proteínas SBDS/Sdo1. Para la elucidación de las constantes de unión se siguieron dos enfoques: uno en equilibrio donde se tituló EFTUD1/Efl1 con los nucleótidos de guanina registrando el apagamiento de la fluorescencia de los triptófanos en presencia y ausencia de SBDS/Sdo1 y otro mediante cinética rápida en flujo detenido siguiendo la señal de FRET entre los triptófanos del sitio activo de las GTPasa y análogos fluorescentes de guanina, en presencia y ausencia de SBDS/Sdo1. En ambos casos se encontró que la proteína EFL1 libre presenta una mayor afinidad por su producto, GDP, que por su sustrato el GTP. Considerando que en promedio en una célula la concentración fisiológica de GTP es tres veces mayor que la de GDP, se tendría un escenario con una proporción mayor de GTPasa en su forma inactiva unida a GDP. Sin embargo, la interacción de EFL1 con SBDS/Sdo1 disminuye significativamente la afinidad por GDP, sin modificar la afinidad por GTP. Lo anterior resulta en el desplazamiento de los equilibrios de interacción, favoreciendo la forma activa de EFL1 unida a GTP y SBDS. Por lo tanto, SBDS/Sdo1 actúa como GEF para EFL1 promoviendo su activación mediante la liberación de GDP. Además, los estudios de cinética rápida permitieron obtener información acerca del mecanismo de interacción, encontrándose que presenta un mecanismo de dos pasos, con un evento de unión inicial seguido por un cambio conformacional del complejo (ajuste inducido). Este comportamiento se presentó para ambos nucleótidos y fue independiente de la presencia de SBDS/Sdo1, por lo que EFL1 transita por diferentes conformaciones durante su funcionamiento.



Los resultados de este trabajo fueron publicados en

Adrián García-Márquez, Abril Gijbers, Eugenio de la Mora and Nuria Sánchez-Puig\*. (2015) Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-Like 1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 290:17669-17678. DOI: 10.1074/jbc.M114.626275

Además de contribuir datos en:

Abril Gijbers, Adrián García-Márquez, Axel Luviano and Nuria Sánchez-Puig\*. (2013) Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond Syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 437, 349-354. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.077

# 1 ANTECEDENTES

## 1.1 Determinación de los parámetros de interacción proteína-ligando

Los procesos que ocurren en los organismos vivos requieren de reconocimientos moleculares altamente específicos orquestados por proteínas, desde su ejecución hasta su regulación. Estas interacciones forman redes que implican rutas celulares como la replicación, transcripción, traducción, transducción de señal y transporte con frecuentes y extensos estímulos de las vías de señalización, retroalimentación e información cruzada. La descripción de estos mecanismos de reconocimiento molecular ha permitido modelarlos con suficiente precisión tal que su comportamiento puede ser predicho o modificado según se requiera.

### 1.1.1 Modelos de unión proteína-ligando a un sitio de unión

El caso más simple de un proceso de reconocimiento molecular en las áreas de bioquímica y biología molecular es el que ocurre entre dos proteínas o la unión de una proteína a una molécula. El encuentro entre la proteína y el ligando cambia el panorama energético de ambos reactivos. Tan pronto como los reactivos se acercan uno al otro, ocurren interacciones tipo electrostáticas, puente de hidrógeno, enlace coordinado con metales, hidrofóbicas, van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  y electromagnéticas [1] que afectan el microambiente y el paisaje energético de cada uno. La subsecuente asociación dependerá del medio de reacción y por ende el estado energético de cada uno de los reactivos. Se han propuesto tres modelos básicos que explican los mecanismos de formación de complejos proteína-ligando con una estequiometría 1:1: el modelo llave-cerradura, el modelo ajuste inducido y el de selección conformacional.

**Modelo llave-cerradura.** En este modelo ambos reactivos tienen una superficie de unión complementaria exacta. Sin embargo, este modelo no puede explicar la evidencia experimental que una proteína se une a su ligando cuando el sitio de unión no coincide inicialmente con la forma del ligando [2].

**Modelo de ajuste inducido.** Considera que el sitio de unión de la proteína es flexible, y la interacción con el ligando induce un cambio conformacional. Este mecanismo puede ser posible solo si el reconocimiento entre los sitios que interactúan es lo suficientemente fuerte para proporcionar la energía necesaria para que, en lo subsecuente, ocurra el ajuste inducido en un tiempo razonable [3].

**Modelo de selección conformacional.** A diferencia de los modelos anteriores, este modelo postula que no existe un solo estado nativo de la proteína, sino un vasto conjunto de estados conformacionales/subestados que coexisten en equilibrio. Este modelo se desprende de la teoría del paisaje energético tipo embudo del plegamiento de proteínas (modelo de Monod–Wyman–Changeux, [4]). El “conformero” más adecuado es el que se unirá al ligando, desplazando el equilibrio hacia la formación del complejo. El paisaje energético cercano al estado nativo contiene varios mínimos correspondientes a los subestados (múltiples pozos energéticos). Entre más flexible la proteína, menor la barrera entre subestados, y mayor el conjunto de conformaciones nativas posibles. Los cambios estructurales en algunos casos van más allá del rearrreglo del sitio de unión, y pueden abarcar hasta el rearrreglo de un dominio estructural. Estas fluctuaciones en los estados energéticos, le confieren a las proteínas una dinámica que, en muchos de los casos, está relacionada con su funcionalidad [5].

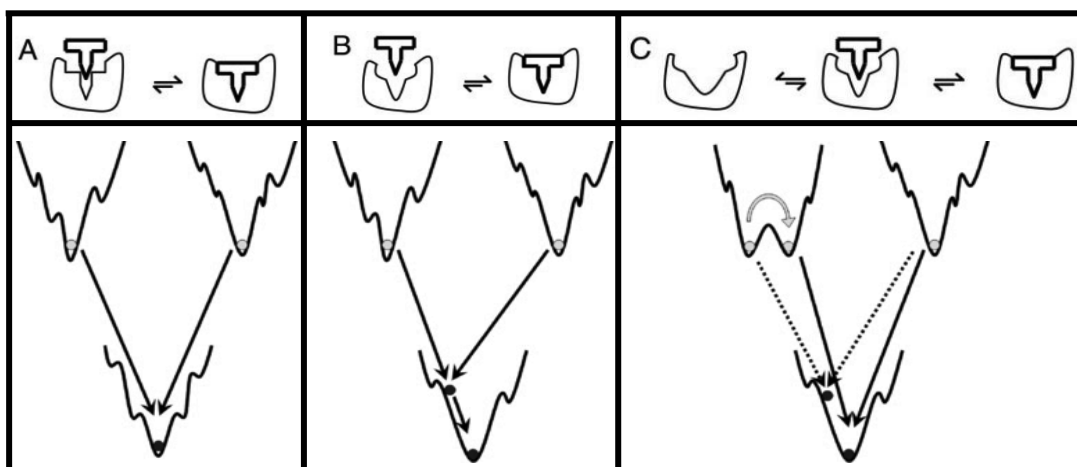


Figura 1. Esquema del equilibrio y diagrama de embudo de los modelos de unión 1:1 entre proteína y ligando. A) Modelo llave-cerradura. B) Modelo de ajuste Inducido. C) Modelo de selección conformacional. Las líneas punteadas describen un equilibrio preexistente de la proteína seguido de un ajuste inducido (modificado de [5]).

En la Figura 1 se representan los diferentes esquemas de modelo de unión 1:1 entre una proteína y ligando, aunados a su diagrama de embudo para visualizar los diferentes subestados energéticos de los reactivos y como convergen en configuraciones adecuadas para llevarse a cabo la reacción. Como se puede ver en inciso C de esta imagen, los mecanismos de ajuste inducido y selección conformacional en algunos casos no son mutuamente excluyentes, pueden existir mecanismos que combinen ambos modelos, siempre y cuando las diferencias estructurales sean significativas entre la forma unida y libre de las proteínas. Es probable que la forma transitoria del complejo proteína-ligando sea suficientemente estable para propiciar el cambio conformacional, a menos que la proteína se encuentre en un estado predispuesto para llevar a cabo estos cambios en la estructura. Es posible que se favorezca este estado de predisposición mediante la acción de proteínas efectoras, promoviendo la unión y el posterior ajuste inducido.

### **1.1.2 Reacción de unión entre proteína y ligando**

Hay varias suposiciones inherentes en cualquier análisis de la interacción entre una proteína y su ligando. Para el caso más simple son las siguientes [6]:

1. Las interacciones se asumen reversibles. La reacción de asociación es bimolecular, mientras que la reacción de disociación es unimolecular.
2. Todas las moléculas receptoras son equivalentes e independientes.
3. La señal medida es proporcional al número de sitios ocupados en el receptor.
4. Los componentes no presentan reacciones químicas alternas y solo existen en el estado libre o unido.

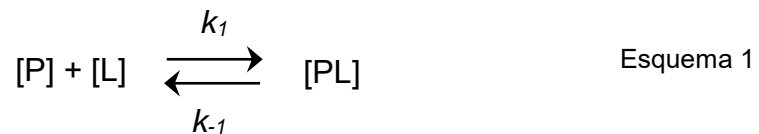
La desviación de este comportamiento simple puede indicar que se está llevando a cabo un suceso de unión más complejo y es cuando se consideran modelos como el ajuste inducido y selección conformacional [6]. El cambio conformacional en una proteína puede estar confinado a una región específica como en el caso de la teoría del ajuste inducido, en donde el sitio de unión al ligando sufre reordenamientos al momento de unirlo. Sin embargo, existen rearrreglos

conformacionales que involucran un mayor nivel de complejidad, como son cambios en la estructura cuaternaria de la ATP sintasa para la formación de ATP [7], o el giro de un flagelo durante la propulsión [8].

### 1.1.2.1 Formación reversible del complejo proteína-ligando

En este estudio nos concentramos en la unión de las GTPasas EFTUD1 y Efl1 con los nucleótidos de guanina, en la cual, se asumió que puede ser descrita por el modelo de unión de dos moléculas con estequiometría 1:1, ya que estas proteínas presentan un solo dominio G.

La reacción básica de unión reversible que ocurre en la mayoría de las reacciones biológicas entre una proteína y su ligando en un solo sitio, para formar el complejo PL es:



La reacción de asociación corresponde a una cinética de segundo orden. Mientras que la reacción de disociación está descrita por una cinética de primer orden:

$$V = k_1[P][L] \quad (1)$$

$$V = k_{-1}[PL] \quad (2)$$

El parámetro  $k_1$  es una constante de velocidad de segundo orden con unidades de *concentración*<sup>-1</sup> • *tiempo*<sup>-1</sup> mientras que [P] y [L] son las concentraciones de moléculas libres disponibles para reaccionar en un determinado tiempo. Estas reacciones están típicamente limitadas por la velocidad de colisión entre las moléculas, las cuales son determinadas por la velocidad de difusión de las moléculas y el tamaño de su superficie de interacción. El parámetro  $k_{-1}$  es una constante de velocidad de primer orden con unidades de *tiempo*<sup>-1</sup>. Esta constante de velocidad de disociación es la probabilidad que el complejo se separe en un tiempo determinado y [PL] es la concentración de complejo Proteína-Ligando.

La velocidad de la reacción de unión siguiendo la concentración del complejo PL está dada por la ecuación:

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_1[P]_t[L] - k_{-1}[PL]_t \quad (3)$$

Se puede llegar a la solución de esta ecuación, sin embargo, para simplificar el modelo se suele usar la concentración de uno de los reactivos en una proporción mucho mayor con respecto al otro, para que este no cambie significativamente y por ende sea una constante. Si consideramos  $[L] \gg [P]$ , la ecuación resultante corresponde a una cinética de reacción de pseudo-primer orden.

Para poder llegar a la solución de la diferencial se requiere un cambio de variable, donde la concentración de la proteína libre en función del tiempo  $[P]_t$  se exprese en términos de la concentración del complejo Proteína-ligando,  $[PL]$ .

$$[P]_t + [PL]_t = [P]_e + [PL]_e$$

a) 
$$[P]_t = [P]_e + [PL]_e - [PL]_t$$

En equilibrio:

$$k_1[P]_e[L] = k_{-1}[PL]_e$$

Despejando  $[P]_e$ :

$$[P]_e = \frac{k_{-1}[PL]_e}{k_1[L]}$$

Sustituyendo en a):

$$[P]_t = \frac{k_{-1}[PL]_e}{k_1[L]} + [PL]_e - [PL]_t$$

Sustituyendo  $[P]_t$  en la ecuación 3:

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_1 \left( \frac{k_{-1}[PL]_e}{k_1[L]} + [PL]_e - [PL]_t \right) [L] - k_{-1}[PL]_t$$

Resolviendo el producto y reordenando términos semejantes:

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_{-1}[PL]_e + k_1[L][PL]_e - k_1[L][PL]_t - k_{-1}[PL]_t$$

$$\frac{d[PL]}{dt} = (k_1[L] + k_{-1})[PL]_e - (k_1[L] + k_{-1})[PL]_t$$

$$\frac{d[PL]}{dt} = -(k_1[L] + k_{-1})([PL]_t - [PL]_e)$$

En esta forma la derivada parcial se encuentra en términos de [PL], por lo tanto, aplicando la integral se obtiene la ecuación 4:

$$\int_{[PL]_0}^{[PL]_t} \frac{d[PL]}{[PL]_t - [PL]_e} = - \int_{t_0}^t (k_1[L] + k_{-1}) dt$$

$t_0 = 0$

$$\ln \left( \frac{[PL] - [PL]_{eq}}{[PL]_0 - [PL]_{eq}} \right) = -(k_1[L] + k_{-1})t + C$$

$$[PL]_t - [PL]_{eq} = ([PL]_0 - [PL]_{eq})e^{-(k_1[L] + k_{-1})t} + C$$

El valor de C se puede calcular considerando las condiciones al equilibrio. El valor de C en este caso es cero, por lo tanto, despejando [PL]<sub>t</sub>:

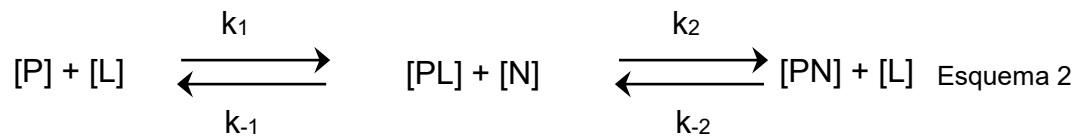
$$[PL]_t = ([PL]_0 - [PL]_{eq})e^{-(k_1[L] + k_{-1})t} + [PL]_e \quad (4)$$

A partir de la ecuación, la constante observada ( $k_{obs}$ ) queda determinada como:

$$k_{obs} = k_1[L] + k_{-1} \quad (5)$$

La dependencia de la  $k_{obs}$  con respecto a la concentración de ligando total nos arroja una función lineal, donde la pendiente corresponde a  $k_1$  y la ordenada al origen  $k_{-1}$ .

Se pueden medir las constantes de disociación independientemente, mediante ensayos de desplazamiento llevados a cabo en un equipo de flujo detenido (o stopped-flow, de acuerdo con su nombre en inglés). Una de las estrategias usadas es la mezcla rápida de un exceso de ligando no fluorescente (N) para la disociación de la proteína que está formando complejo con el ligando fluorescente (L). La reacción se describe a continuación:



Es necesario una alta concentración de N para asegurar que esta se asocie antes que L se vuelva a unir a P. Las constantes de velocidad observadas corresponderán entonces a las constantes de disociación [9].

### 1.1.2.2 Constante de equilibrio

La constante de equilibrio caracteriza la afinidad entre las moléculas. Por definición, en el equilibrio, las velocidades de reacción de asociación y disociación son iguales.

$$\text{Velocidad de unión} = k_1[P]_{eq}[L]_{eq} = k_{-1}[PL]_{eq} = \text{Velocidad de disociación}$$

Siendo la constante de equilibrio:  $K_{eq} = \frac{[PL]_{eq}}{[P]_{eq}[L]_{eq}}$ , entonces se deduce que la

constante de disociación al equilibrio corresponde a  $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$

Cuando el sistema llega al equilibrio, se puede estimar la fracción de saturación de la enzima por el ligando, definida como  $\theta = [PL]_{eq}/[P]_t$ , en donde  $[PL]_{eq}$  es la concentración del complejo Proteína-Ligando cuando se alcanza el equilibrio, y  $[P]_t$  es la concentración de proteína total, es decir la proteína libre [P] más la proteína en complejo [PL]. A partir de estas definiciones se puede estimar “ $\theta$ ” mediante la siguiente ecuación:



$$y = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad (6)$$

La constante de equilibrio es un parámetro termodinámico relacionado directamente con el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) para la reacción bajo ciertas condiciones de temperatura.

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad (7)$$

Donde R es la constante de los gases y T es la temperatura en unidades absolutas. Reacciones favorables tienen un valor grande de  $K_{eq}$  y un  $\Delta G$  muy negativo.

### 1.1.2.3 Mecanismos de reacciones múltiples o complejas

Las reacciones químicas pueden darse en muchos esquemas de reacción, involucrando diversos componentes y cinéticas durante su desarrollo [10]. En la experimentación podemos vislumbrar este tipo de reacciones complejas con la observación de más de una fase cinética.

Los mecanismos de reacciones múltiples siempre consisten en una serie de reacciones de primero y segundo orden. Las constantes asociadas a los pasos intermediarios y a la reacción general pueden ser determinadas a partir del análisis de los trazos cinéticos. A continuación, se hace una revisión de los modelos de selección conformacional y de ajuste inducido como ejemplo de mecanismos de dos pasos de reacción (Figura 2).

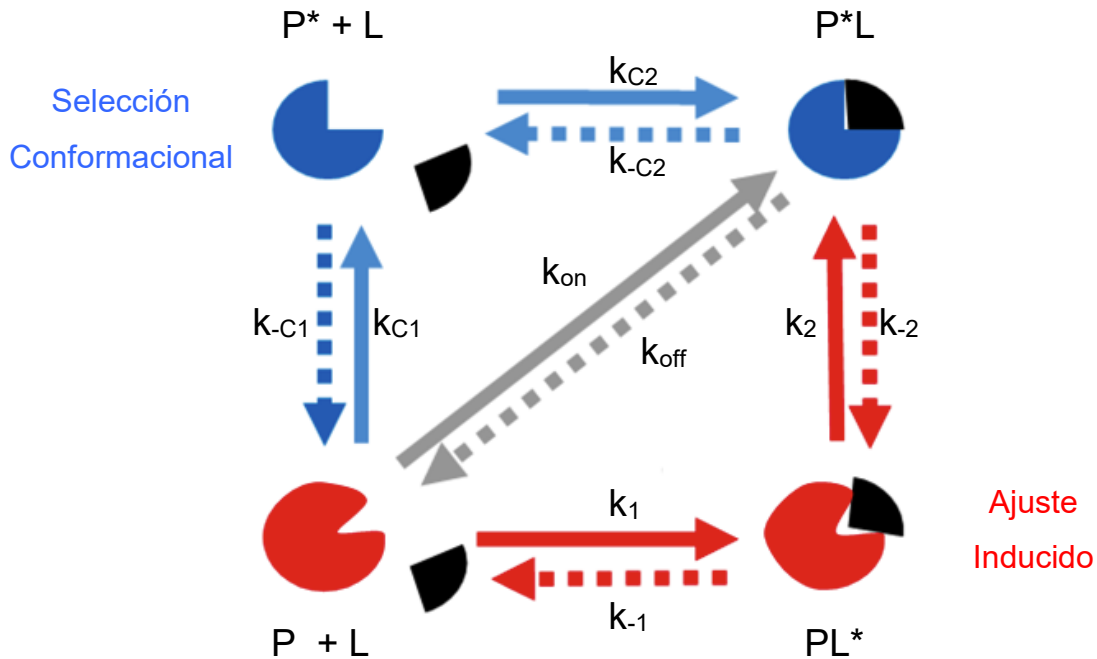
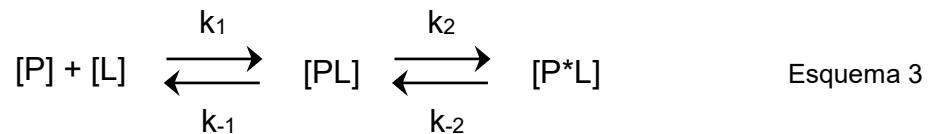


Figura 2. Diagrama de los mecanismos de unión de una proteína (P) con su ligando (L). Mecanismo de selección conformacional (ruta azul),  $k_{C1}/k_{-C1}$  son las constantes de velocidad del cambio intrínseco de las dos conformaciones P/P\* y  $k_{C2}/k_{-C2}$  son las constantes de velocidad correspondientes a la formación/disociación del complejo final PL. Ajuste inducido (ruta roja), donde se presenta la formación de un intermediario (PL\*) descrito por las constantes  $k_1/k_{-1}$ , seguido de un cambio conformacional inducido por el ligando para llegar a la conformación final PL. Las constantes de velocidad correspondientes a este segundo paso de reacción son  $k_2/k_{-2}$ . La ruta gris esquematiza lo observado en experimentos al equilibrio, donde no son evidentes los pasos intermedios de reacción. También puede representar un proceso de unión generado experimentalmente que corresponde a un proceso de un solo paso aparente con constantes de velocidad de unión y disociación  $k_{on}$  y  $k_{off}$ , respectivamente (modificado de [10]).

### a) Ajuste inducido



Cuando el primer paso de la reacción corresponde a la interacción de segundo orden de la proteína con el ligando, seguido de un segundo paso de isomerización del complejo de primer orden, ocurre un mecanismo descrito como modelo de ajuste inducido. El supuesto de este mecanismo sugiere que la unión del ligando es más rápida que el cambio de conformación de la proteína, lo que significa que

este llega al equilibrio antes que ocurra la segunda reacción (equilibrio rápido). Por lo tanto, el análisis de la cinética de unión arroja dos constantes observadas, la correspondiente a la reacción rápida,  $k_{obs (R)}$ , y a la reacción lenta,  $k_{obs (L)}$ . De esta manera, ambas reacciones se pueden manejar por separado, por lo tanto, la primera reacción se describe como la reacción básica de unión reversible (Ecuación 5).

La dependencia de la constante observada de la segunda reacción lenta, formación del complejo  $[P^*L]$ , con respecto a la concentración de ligando describe una función hiperbólica [11]:

$$\frac{d[P^*L]}{dt} = k_2[PL]_t - k_{-2}[P^*L]_t \quad (8)$$

En el equilibrio del primer paso de la reacción:

$$\begin{aligned} \text{a)} \quad & k_1[P]_e[L] = k_{-1}[PL]_e \\ \text{b)} \quad & [P_T]_e = [P]_e + [PL]_e \end{aligned}$$

Despejando  $[P]_e$  de la ecuación b):

$$[P]_e = [P_T]_e - [PL]_e$$

Sustituyendo en a) y despejando  $[PL]_e$ :

$$k_1([P_T]_e - [PL]_e)[L] = k_{-1}[PL]_e$$

$$k_1[L][P_T]_e - k_1[PL]_e[L] = k_{-1}[PL]_e$$

$$k_1[L][P_T]_e = k_{-1}[PL]_e + k_1[PL]_e[L]$$

$$k_1[L][P_T]_e = (k_{-1} + k_1[L])[PL]_e$$

$$[PL]_e = \frac{k_1[L][P_T]_e}{k_{-1} + k_1[L]} = \frac{[L][P_T]_e}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [L]}$$

Sustituyendo  $[PL]_e$  en la ecuación 8:

$$\frac{d[P^*L]}{dt} = \frac{k_2[L]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [L]} [P_T]_e - k_{-2}[P^*L]_t$$

Del mismo modo que la ecuación 4, se resuelve la integral obteniendo una función exponencial que describe la formación del complejo P\*L en función del tiempo (segundo paso de la reacción) con una constante observada:

$$k_{obs}(L) = \frac{k_2[L]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [L]} + k_{-2} \quad (9)$$

Para la obtención de la constante de disociación al equilibrio para el modelo de ajuste inducido, se considera la condición del estado estacionario del complejo PL:

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_1[P]_t[L] + k_{-2}[P^*L]_t - k_{-1}[PL]_t - k_2[PL]_t$$

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_1[P]_t[L] + k_{-2}[P^*L]_t - (k_{-1} + k_2)[PL]_t$$

Aplicando la condición de estado estacionario:

$$\frac{d[PL]}{dt} = 0 \rightarrow k_1[P]_e[L] + k_{-2}[P^*L]_e = (k_{-1} + k_2)[PL]_e \quad a)$$

En el equilibrio:

$$\frac{d[P^*L]}{dt} = 0 \rightarrow k_2[PL]_e + k_{-2}[P^*L]_e = 0 \rightarrow [PL]_e = \frac{k_{-2}}{k_2} [P^*L]_e \quad b)$$

Sustituyendo b) en a):

$$k_1[P]_e[L] + k_{-2}[P^*L]_e = (k_{-1} + k_2) \frac{k_{-2}}{k_2} [P^*L]_e$$

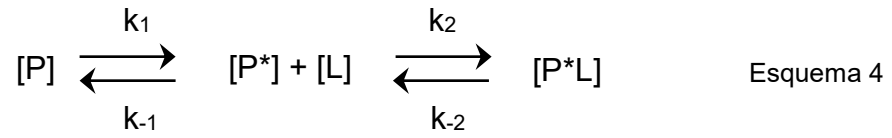
$$k_1[P]_e[L] + k_{-2}[P^*L]_e = k_{-1} \frac{k_{-2}}{k_2} [P^*L]_e + k_{-2}[P^*L]_e$$

$$k_1[P]_e[L] = k_{-1} \frac{k_{-2}}{k_2} [P^*L]_e$$

$$\frac{[P]_e[L]}{[P^*L]_e} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2} = K_d \quad (10)$$

b) Selección conformacional

En este caso, el mecanismo de dos pasos es iniciado por una isomerización de primer orden de la proteína (o ligando), seguido de la formación de segundo orden del complejo proteína-ligando, el cuál es el proceso rápido de la reacción.



Las constantes de velocidad observadas en el experimento a condiciones de pseudo-primer orden se describen con las siguientes ecuaciones [11]:

$$k_{obs(R)} = k_2[L] + k_{-2} \quad (11)$$

La velocidad de la reacción lenta (isomerización), puede determinarse en función de la concentración de proteína:

$$-\frac{d[P]}{dt} = k_1[P]_t - k_{-1}[P^*]_t \quad (12)$$

En el equilibrio del primer paso de la reacción:

- a)  $k_2[P^*]_e[L] = k_{-2}[P^*L]_e$
- b)  $[P^*_T]_e = [P^*]_e + [P^*L]_e$

Despejando  $[P^*L]_e$  de la ecuación b):

$$[P^*L]_e = [P^*_T]_e - [P^*]_e$$

Sustituyendo en a) y despejando  $[P^*]_e$ :

$$k_2[P^*]_e[L] = k_{-2}([P^*_T]_e - [P^*]_e)$$

$$k_2[P^*]_e[L] + k_{-2}[P^*]_e = k_{-2}[P^*_T]_e$$

$$[P^*]_e(k_2[L] + k_{-2}) = k_{-2}[P^*_T]_e$$

$$[P^*]_e = \frac{k_{-2}[P^*_T]_e}{k_2[L] + k_{-2}} = \frac{\frac{k_{-2}}{k_2}[P^*_T]_e}{[L] + \frac{k_{-2}}{k_2}}$$

Sustituyendo  $[P^*]_e$  en la ecuación 12:

$$-\frac{d[P]}{dt} = \frac{d[P^*L]}{dt} = k_1[P]_t - \frac{k_{-1}\left(\frac{k_{-2}}{k_2}\right)}{[L] + \frac{k_{-2}}{k_2}}[P^*_T]_e$$

Se resuelve la integral obteniendo una función exponencial con una constante observada:

$$k_{obs(L)} = k_1 + \frac{k_{-1}\left(\frac{k_{-2}}{k_2}\right)}{[L] + \frac{k_{-2}}{k_2}} \quad (13)$$

En comparación con el mecanismo de ajuste inducido, en este caso la curva descrita por la ecuación de la reacción lenta ( $k_{obs}$  vs  $[L]$ ) corresponde a una hipérbola descendente, y por lo tanto alcanza un valor mínimo que corresponde a  $k_1$ .

Las estrategias a seguir para medir las constantes de equilibrio pueden ser mediante experimentos al equilibrio, donde se determina el avance de reacción en función de la concentración de uno de los reactivos, o experimentos cinéticos, donde se determinan las velocidades de reacción de asociación/disociación. Las aproximaciones cinéticas aportan más información, porque proporcionan no solamente los parámetros termodinámicos y la constante de equilibrio, sino también las constantes de velocidad, las cuales caracterizan la dinámica del sistema [12].

## 1.2 Métodos para evaluar la interacción proteína-ligando

### 1.2.1 Dicroísmo circular (DC)

La espectroscopia de dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica de absorción atómica basada en el cambio de configuración electrónica molecular de un estado basal a uno excitado debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada. La señal medida de DC corresponde a la diferencia entre las absorbancias de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha. La capacidad de causar este efecto reside en la actividad óptica de la muestra (moléculas quirales), las cuales distorsionan el plano generando una elipse. El DC se reporta ya sea en unidades de absorptividad diferencial ( $\Delta\epsilon$ ) o en elipticidad  $[\theta]$  la cual está definida como el ángulo cuya tangente es la razón del eje menor entre el eje mayor de una elipse. Existe una relación simple entre  $\Delta\epsilon$  y elipticidad (en grados) descrita como  $\theta = 32.98 \cdot \Delta\epsilon$ . Para facilitar la comparación entre proteínas y péptidos con pesos moleculares diferentes es común expresar la señal de dicroísmo circular como elipticidad molar  $[\theta]_M$  o elipticidad molar media de residuos  $[\theta]_{mrm}$  que se pueden calcular como:

$$[\theta]_M = \frac{DC_{obs} \cdot 100}{C_M \cdot l} \quad (14)$$

donde  $C_M$  es la concentración molar,  $l$  es la longitud de la trayectoria de la luz en cm y  $DC_{obs}$  es la señal de dicroísmo circular arrojada por el equipo en miligrados. La elipticidad molar tiene unidades de grados $\cdot$ cm<sup>2</sup>/dmol.

$$[\theta]_{mrm} = \frac{DC_{obs} \cdot 10^6}{C_{\mu M} \cdot l \cdot n} \quad (15)$$

donde  $C_{\mu M}$  es la concentración expresada en  $\mu$ M,  $l$  es la longitud de la trayectoria de la luz en mm,  $DC_{obs}$  es la señal de dicroísmo circular arrojada por el equipo en miligrados y  $n$  es el número de residuos de la proteína. La elipticidad media de residuos tiene unidades de grados $\cdot$ cm<sup>2</sup>/dmol $\cdot$ residuo [13].

El espectro de dicroísmo circular de una proteína se obtiene generalmente en las regiones de ultravioleta cercano (250-350nm) y lejano (180-250 nm). El cromóforo en el UV lejano es el enlace peptídico mientras que en el UV cercano son los residuos aromáticos y el puente de disulfuro. La señal de DC puede ser deconvolucionada para estimar el contenido de estructura secundaria de una proteína. Los programas especializados para esto comparan el espectro experimental con una base de datos de espectros de proteínas con estructuras secundarias conocidas. La espectroscopía de dicroísmo circular tiene aplicaciones en diversos estudios biológicos tales como: evaluaciones conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos; termodinámica de plegamiento y desplegamiento de biomoléculas; estudios de interacción de biomoléculas asimétricas (interacciones proteína-proteína, interacciones DNA/proteína, interacciones proteína-ligando e interacciones DNA-ligando) y, cinética de plegamiento y desplegamiento de macromoléculas.

Los rasgos característicos de los espectros de diferentes clases de proteínas en el ultravioleta lejano son [14]:

- Todas las proteínas que contienen estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice tienen espectros con una banda intensa negativa con dos picos, uno a 208 y otro a 222 nm, y una banda muy positiva en 191–193 nm. Las intensidades de estas dos bandas reflejan el contenido de  $\alpha$ -hélices.
- Los espectros de proteínas con un alto contenido de láminas  $\beta$  regulares son significativamente más débiles que los espectros de las proteínas helicoidales. Estos espectros comúnmente tienen una banda negativa a 210-225 nm y una señal fuertemente positiva a 190-220 nm.
- Los péptidos desordenados y las proteínas desnaturalizadas presentan una señal fuertemente negativa a 195-200 nm y otra mucho más débil (que puede ser positiva o negativa) entre 215 y 230 nm.
- Las proteínas con una mezcla de hélices- $\alpha$  y láminas  $\beta$  casi siempre tienen espectros dominados por el componente  $\alpha$ -helicoidal y por tanto con frecuencia muestran bandas a 222, 208, y 190-195 nm. En algunos casos,



puede haber un solo espectro ancho mínimo entre 210 y 220 nm debido a las contribuciones superpuestas de  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$ .

Por otro lado, las señales de DC en el UV cercano están dominadas por las señales de los residuos aromáticos individuales en una proteína, y pueden adoptar valores positivos o negativos y pueden variar dramáticamente en intensidad. Por tanto, existe poca correlación entre el número de residuos aromáticos y la intensidad de DC aromático, y el espectro de DC en el UV cercano de una proteína no permite decir nada concreto con respecto a la estructura terciaria. Sin embargo, las señales que estos producen son sensibles a la estructura terciaria global de las proteínas. Las características principales de los cuatro fluoróforos en el ultravioleta cercano se resumen a continuación [15]:

- La fenilalanina presenta una estructura bien definida en el intervalo de 255-270 nm y sus picos se observan generalmente cercanos a 262 y 268 nm.
- La tirosina generalmente tiene un máximo en el intervalo de 275-282 nm, con un posible hombro 6 nm hacia el rojo (longitud de onda mayor).
- El triptófano, muestra con frecuencia, una estructura fina arriba de los 280 nm en la forma de dos bandas, una a los 288 - 293 y otra 7 nm hacia el azul (de longitud de onda menor), con el mismo signo y otra banda alrededor de los 265 nm.
- El DC de la cisteína comienza a una longitud de onda larga (>320 nm) y muestra uno o dos picos anchos arriba de 240 nm; el pico de longitud de onda larga frecuentemente es negativo.

Cuando las proteínas están plegadas presentan frecuentemente elementos altamente asimétricos en su estructura secundaria, tales como las  $\alpha$ -hélices y las láminas  $\beta$ -plegadas, las cuales generan espectros de DC característicos. Estos espectros pueden evidenciar cambios conformacionales asociados a la interacción de la proteína con un ligando, permitiendo la determinación de la constante de unión al equilibrio. La interacción entre proteína y ligando usualmente induce un cambio en la estabilidad térmica de las proteínas, modificando la temperatura de

desnaturalización, la entalpia y la capacidad calorífica. Estas modificaciones se deben a las reacciones simultáneas de unión con el ligando y la desnaturalización [16]. La desnaturalización de las proteínas resulta en la pérdida de sus estructuras secundarias, por lo que el proceso puede ser seguido a partir de las señales de DC y el correspondiente cambio en las bandas de los espectros. Algunas proteínas tienden a desnaturalizarse por completo y sus espectros de desnaturalización se asemejan a una mezcla de las señales emitidas por péptidos pequeños. Otras proteínas se desnaturalizan parcialmente y posiblemente mantengan contenido residual de estructura  $\alpha$ -hélice en un estado de “glóbulo fundido” [17].

### **1.2.2 Fluorescencia**

Es una técnica espectroscópica que requiere de fluoróforos que emiten luz en una longitud de onda más larga (longitud de emisión) cuando son excitados a una cierta longitud de onda (longitud de excitación). En general, en proteínas, la fluorescencia requiere de una etiqueta fluorescente (reportero), la cual puede ser intrínseca, como los aminoácidos aromáticos, o extrínseca. La adición de etiquetas extrínsecas en una proteína no debe alterar las propiedades bioquímicas de esta o su interacción con ligandos. También requiere que el reportero sea suficientemente sensible para cambiar su señal de fluorescencia de forma detectable en una concentración de proteína razonable en función del ambiente local. Mediante el uso de diferentes técnicas de fluorescencia como la anisotropía o la energía resonante de fluorescencia (FRET) se han desarrollado una extensa gama de métodos de análisis capaces de vislumbrar el ensamblaje de complejos bimoleculares, tales como las interacciones de proteína-proteína y proteína-ligando, así como determinación de cambios conformacionales de proteínas [18].

El aminoácido triptófano es el principal responsable de la fluorescencia intrínseca de las proteínas, siendo fuertemente influenciado por el medio local (viscosidad, temperatura, polaridad) que lo rodea. La variación de la señal de fluorescencia, dependiente del medio local del triptófano, propicia que la interpretación de los

datos espectroscópicos, en algunos casos, llegue a ser difícil pues no es posible considerar todos los factores que influyen en el apagamiento de la señal de fluorescencia de los triptófanos [18]. Los diferentes mecanismos en que se ha explicado este apagamiento tras la interacción con un ligando involucran la transferencia de electrones, transferencia de energía de largo alcance, inducción de cambios conformacionales y diversas reacciones intramoleculares. Estos fenómenos se describen como el efecto de filtro interno, el apagamiento por colisión (dinámico) y aquel ocasionado tras la interacción del ligando (apagamiento estático). El efecto de filtro interno (Inner Filter Effect, IFE) es la absorción por parte de la muestra de la radiación de excitación (primario) y/o emisión (secundario) reduciendo la intensidad de fluorescencia. Comúnmente el IFE es considerado una fuente de error en el análisis fluoroscópico, el cual requiere ser corregido.

#### **1.2.2.1 Interacción con análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina**

Los análogos fluorescentes de nucleótido más comúnmente utilizados para estudiar su interacción con proteínas son aquellos derivatizados con el grupo fluorescente metilantraniloil (mant). Este grupo fluorescente reportero está localizado en la posición 2' o 3' del oxígeno de la ribosa del nucleótido en cuestión, que en nuestro caso corresponde a los nucleótidos de guanina, GDP y GTP (Figura 3). La excitación del fluoróforo mant a 360 nm resulta en una emisión de fluorescencia a 440 nm. Una gran variedad de estudios descritos en la literatura sugiere que el análogo fluorescente no perturba la unión, además de ser una etiqueta muy sensible en el entorno químico. Esto se ha determinado mediante estudios de cinética de interacción y de competencia comparando los análogos fluorescentes y los nucleótidos sin modificar [19]. En algunos casos, las propiedades fluorescentes del triptófano y del grupo mant pueden ser combinadas para llevar a cabo experimentos de fluorescencia por transferencia de energía resonante (FRET). El razonamiento detrás de este experimento se basa en la excitación de los triptófanos de la proteína (290 nm) y la detección de la fluorescencia de grupo mant a 448 nm debido al traslape en la emisión de la fluorescencia del triptófano y la excitación del mant a 355 nm. Tal que la emisión

detectada a 450 nm es debida a la transferencia de energía de los triptófanos al grupo mant.

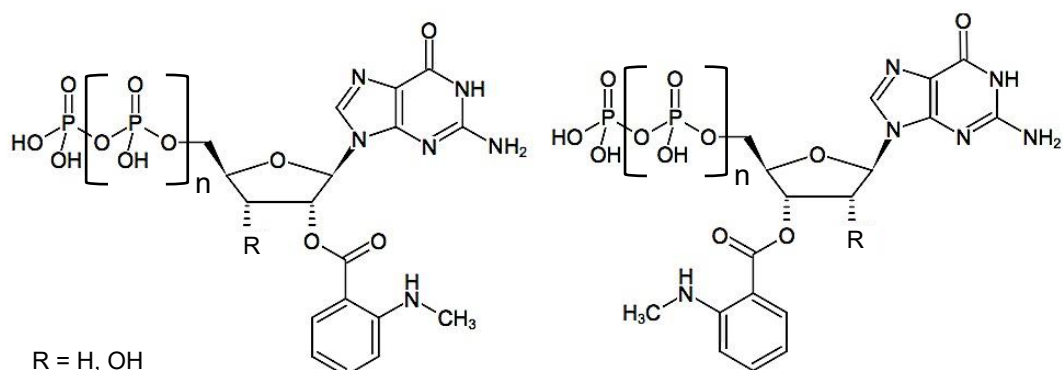


Figura 3. Estructura de los isómeros 3' (izquierda) y 2' (derecha) de mantGDP ( $n = 1$ ) y mantGTP ( $n = 2$ ). Cuando R = H corresponde a los mant-desoxinucleótidos de guanina.

La concentración del mant-nucleótido no debe de estar alejada del valor de la constante de disociación con el fin de obtener precisión razonable en la estimación de la constante de disociación. Sin embargo, la concentración de mant-nucleótido no puede estar por debajo de 10 nM debido a la sensibilidad del límite de detección de la señal de fluorescencia. Por lo que constantes de disociación en el intervalo subnanomolar están fuera del alcance de la valoración por fluorescencia con mant-nucleótidos [20].

### 1.2.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (Dynamic light scattering, DLS) mide las fluctuaciones de la intensidad de luz difractada, con respecto al tiempo, debido al movimiento browniano de las partículas. Al incidir un haz de luz monocromático, tal como un láser, en una solución con partículas en movimiento browniano, causa un efecto Doppler cuando la luz golpea a la partícula, cambiando la longitud de onda de la luz incidida (luz difractada) con respecto al tiempo (fluctuación). La intensidad de luz difractada fluctuará dependiendo del tamaño de partícula, siendo las partículas pequeñas las que causen fluctuaciones más rápidas que las de mayor tamaño. El uso de algoritmos matemáticos y consideraciones como que las

partículas en estudios son rígidas con forma esférica permiten correlacionar esta variación en la intensidad con el coeficiente de difusión y el tamaño de las partículas (radio hidrodinámico,  $R_H$ ). El radio hidrodinámico de una partícula se calcula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein  $R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$  donde éste depende de la temperatura (T), de la viscosidad de medio ( $\eta$ ) y del coeficiente de difusión ( $D$ ) [21]. Esta técnica es una de las más usadas para determinar el tamaño de partículas y permite medir radios de hasta 0.001  $\mu\text{m}$ , lo cual es difícil de alcanzar con otras técnicas [22]. Además, puede determinar la velocidad de partículas en disolución, por ejemplo, la velocidad de difusión de microorganismos o analizar el flujo de los fluidos. Es una técnica no invasiva ni destructiva, por lo que es muy demandado para la determinación del tamaño de las proteínas en medio líquido y los cambios en su estructura (tamaño) como resultado de la interacción con su sustrato/producto.

### **1.3 Biogénesis ribosomal en eucariontes**

La síntesis de proteínas es llevada a cabo por los ribosomas, quienes, a su vez están constituidos por proteína (35%) y RNAr (65%). Son un complejo formado por dos subunidades, 60S y 40S, asociadas no covalentemente [23]. En eucariontes, la biogénesis ribosomal involucra la producción y el correcto ensamblaje de los cuatro RNA ribosomales y sus 79 proteínas estructurales. En este proceso se encuentran involucrados cientos de factores accesorios no presentes en la partícula madura. En ausencia de estas proteínas, las células dejan de crecer aún bajo condiciones óptimas. Dentro de estos factores accesorios se han descrito ATPasas tipo AAA, GTPasas, factores de exportación y helicasas entre otras.

La síntesis de ribosomas comienza en el nucléolo, donde la RNA polimerasa III sintetiza el RNAr 5S, en tanto la RNA polimerasa I sintetiza el pre-RNAr 35S que da lugar a los RNAr 18S, 5.8S y 28S (25S en levaduras). La transcripción de los RNAm de las proteínas ribosomales se lleva a cabo por la RNA polimerasa II, estas proteínas son sintetizadas en el citoplasma y transportadas al nucléo(lo). El

pre-RNAr 35S se asocia a proteínas ribosomales para formar un pre-ribosoma 90S, el cual es separado en las partículas pre-40S y pre-60S, y cuya maduración continúa de forma independiente primeramente en el núcleo y posteriormente en el citoplasma [24]. Uno de los últimos pasos de maduración citoplasmática del precursor de la subunidad 60S en levadura involucra a las dos proteínas de estudio en este trabajo, la GTPasa EFL1 y la proteína SBDS.

### **1.3.1 La GTPasa EFL1/EFTUD1 en la maduración ribosomal**

La proteína EFL1, también denominada EFTUD1 (**E**longation **F**actor **T**u GTP-binding **D**omain-containing protein **1**) para el ortólogo humano, es una GTPasa que participa en la fase final de la biogénesis ribosomal de la subunidad 60S, y por ende en la activación traduccional de los ribosomas. EFL1 es una proteína homóloga a los factores de elongación EF-G/eEF2 (28% de identidad), que promueven la translocación del aminoacil-tRNA del sitio A al sitio P durante la elongación en la síntesis proteica [25]. Estas GTPasas están organizadas estructuralmente en 5 dominios distintos, siendo el dominio 1 el que contiene el dominio G donde reside la unión de los nucleótidos de guanina y la catálisis, y cuatro dominios más enumerados del II-V (Figura 5C) [26]. En el citoplasma celular, EFL1 junto con la proteína SBDS desencadenan la liberación del factor de anti-asociación eIF6 del pre-ribosoma 60S, permitiendo así el ensamblaje del ribosoma 80S y el reciclaje de eIF6 al núcleo [27]. El proceso empieza cuando la subunidad pre-60S unida con eIF6 interacciona con SBDS posterior a la unión de la última proteína estructural uL16 y la liberación del factor de exportación Nmd3 por acción de la GTPasa Lsg1. La proteína eIF6 obstruye físicamente el puente inter-subunitario B6 [28] que une las dos subunidades del ribosoma, además de ocupar parte del asa sarcina-ricina (SRL) y segmentos de las proteínas uL14, uL3 y eL24. Mientras que SBDS interacciona con parte del sitio P y la base del tallo, sin contactar a eIF6 (Figura 4). La región entre ambas proteínas corresponde al sitio asociado a GTPasas que es subsecuentemente ocupado por EFL1. En el complejo ternario SBDS•EFL1•eIF6, los dominios I y II de la GTPasa contactan a eIF6, y los dominios III y IV de EFL1 interaccionan con los dominios 1 y 2 de SBDS (Figura 5B-C). A través de un cambio conformacional mediado por SBDS,

EFL1 desplaza estéricamente a eIF6 al competir por un sitio en común en la subunidad 60S. Posteriormente, se cree que la hidrólisis de GTP desencadena un nuevo cambio conformacional que promueve la liberación de EFL1 y SBDS (Figura 5A) [29]. Este mecanismo no solo previene la asociación prematura de las subunidades ribosomales, sino que también actúa como punto de control para evaluar la integridad de sitios clave de la subunidad 60S involucrados en la traducción como son el sitio P, el centro asociado de GTPasas, la base del tallo ribosomal y el asa sarcina-ricina. Aunque todavía se debate acerca del orden de interacción de estas proteínas con la subunidad ribosomal, estudios con el complejo binario EFL1•SBDS han demostrado que uno de los roles de SBDS es actuar como un intercambiador de GDP para EFL1 [30, 31]. Esta información fue obtenida, en parte, como resultado de esta tesis. Y aunque su efecto es moderado en el incremento de la velocidad de disociación de GDP en EFL1, comparado con al efecto de otros intercambiadores de nucleótidos sobre GTPasas de traducción, su interacción con EFL1 favorece en esta última una conformación ávida por GTP [32].

Mutaciones que impiden la correcta comunicación entre EFL1 y SBDS previene la liberación de eIF6 y consecuentemente, el ensamble de ribosomas maduros originando una enfermedad conocida como Síndrome de Shwachman-Diamond (SDS). Recientemente se describieron mutaciones homocigotas en la proteína EFL1 en pacientes con un cuadro clínico similar a aquel observado en el Síndrome Shwachman-Diamond (SDS) [33-35]. Esta es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la insuficiencia pancreática exócrina, alteraciones esqueléticas, deficiencia en la función de la médula ósea y una alta predisposición a desarrollar leucemia [36]. Hasta ahora solo se han descritas un puñado de mutaciones en EFL1 y la mayoría se localizan en el dominio IV, salvo por la T127A localizada en el dominio I. Existe poca información acerca del efecto de estas mutaciones en la función de la proteína. Sin embargo, las mutaciones R1095Q y M882K no alteran el plegamiento de EFL1 ni su actividad de GTPasa o activación por SBDS, por lo que se cree que las mutaciones pueden alterar la red

intramolecular de interacciones que rige el o los cambio(s) conformacional(es) necesario(s) para liberar a eIF6 [34].

Además de EFL1 existen otras GTPasas que participan en la biogénesis ribosomal de la subunidad mayor: Nog1, Nug1, Nug2 y Lsg1 [37], y Bms1 que participa en la maduración de la subunidad ribosomal menor. Por lo que ha sido de interés la caracterización de las GTPasas y la elucidación de sus mecanismos de regulación.

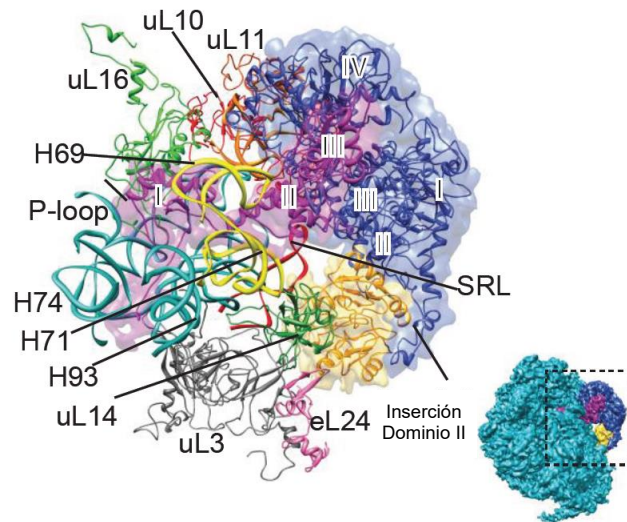


Figura 4. Representación del modelo atómico del complejo ternario EFL1•SBDS•eIF6 asociado a la subunidad 60S del ribosoma. EFL1, azul oscuro; SBDS, magenta; eIF6, amarillo; subunidad 60S, cian. Imagen dilucidada por criomicroscopía electrónica filtrada a 6 Å [29]. PDB ID: EMD-3146.



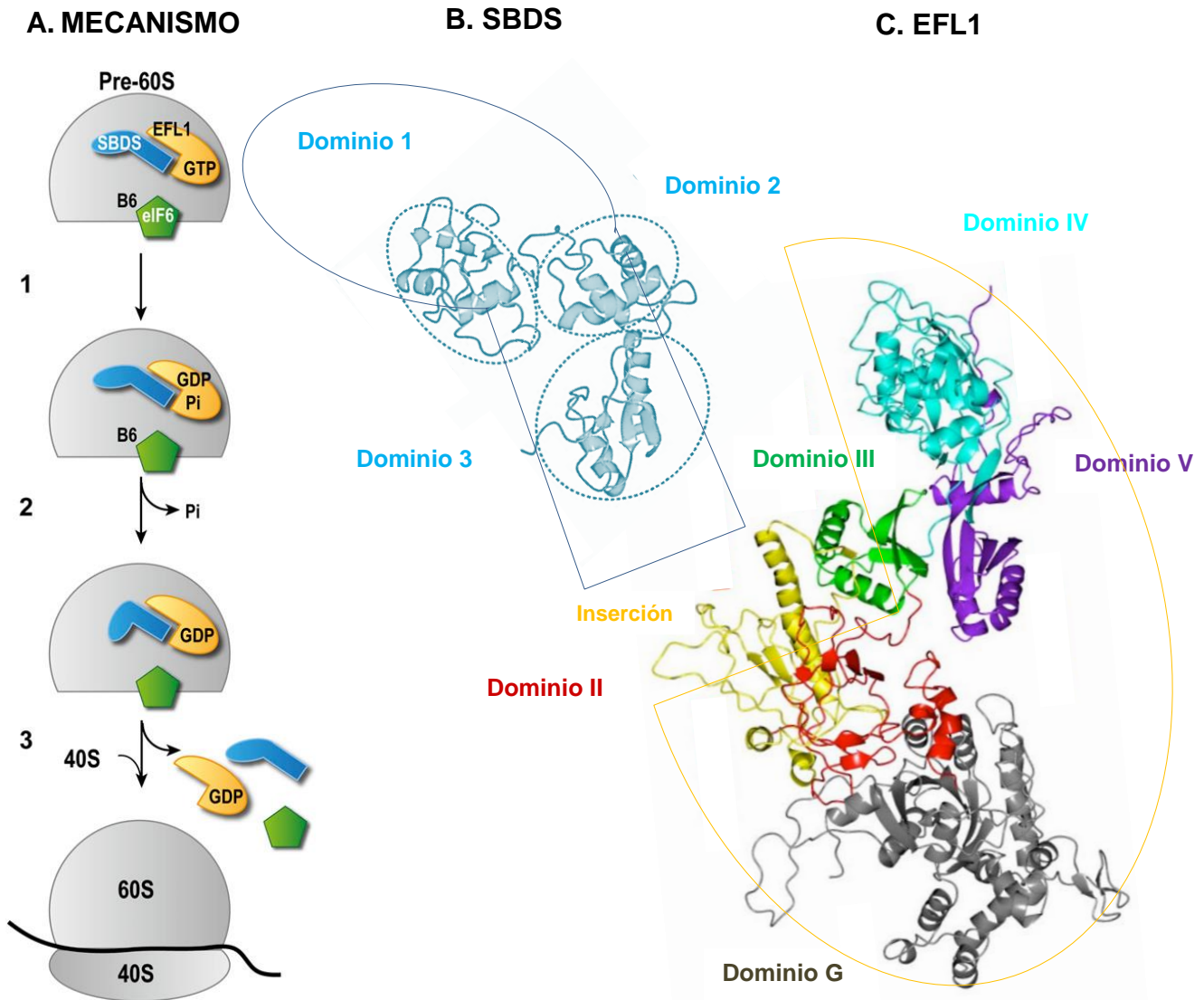


Figura 5. A. Modelo de liberación del factor eIF6 por SBDS y EFL1. 1) SBDS estimula la actividad de GTPasa de EFL1. 2) Hidrólisis de GTP, EFL1 adopta conformaciones de unión a GDP. SBDS rota interrumpiendo el puente B6, sitio de unión de las subunidades del ribosoma. 3) EFL1 sufre un cambio conformacional que compite por un sitio en común con eIF6 liberándolo. La hidrólisis de GTP ocasiona la disociación de EFL1 y SBDS de la subunidad ribosomal. La liberación de eIF6 permite la formación del ribosoma activo 80S el cual puede comenzar la traducción [27, 29]. B. Estructura tridimensional de la proteína SBDS humana obtenida por RMN (PDB ID:2KDO). C. Modelo tridimensional de ScEfl1 realizado por Alfonso Méndez Godoy, obtenido por homología empleando MODELLER y la estructura cristalográfica de ScEfl-2 como modelo.

### 1.3.2 La proteína SBDS

SBDS es una proteína de 250 aminoácidos que se encuentra en todos los tejidos del cuerpo humano [38]. Esta proteína forma parte de una familia altamente conservada en el dominio Archaea y Eucarya, pero no contiene homólogos en bacteria [39]. Es una proteína flexible y elongada [40, 41] cuya estructura tridimensional está organizada en tres dominios: el dominio N-terminal con un plegamiento denominado FYSH (por su homología con un dominio de la proteína de levadura Yhr087wp; Fungal, Yhr087wp, **Shwachman**), un dominio central en forma de racimo de tres hélices que confiere especie-especificidad a la proteína; y el C-terminal con una estructura del tipo ferredoxina con homología estructural al dominio V del factor de elongación 2 de levadura, dominio de unión a ARN [39, 42, 43]. En la Figura 4 se muestra la estructura del complejo ternario SBDS•EFL1•eIF6 asociado al ribosoma, donde se puede observar las interacciones de los tres dominios de SBDS.

Junto con EFL1, la pérdida de función de la proteína SBDS es la principal causa del Síndrome Shwachman-Diamond (SDS, OMIM #260400) [38]. El 90% de los pacientes contienen mutaciones en el gen *SBDS* en uno o ambos alelos alterando la función del producto, y que en la mayoría de los casos resulta en una proteína trunca. Entre las mutaciones más comunes se encuentra la 183-184TA>CT, que genera un codón de paro (X) en el aminoácido 62 (K62X), y la 258+2T>C que interrumpe el sitio donador del empalme en el intrón 2 generando un corrimiento en el marco de lectura (frameshift, fs) que codifica para un codón de paro tres residuos después del aminoácido 84 (C84fsX3). También se han descrito mutaciones no sinónimas en cualquiera de los tres dominios de la proteína que en algunos casos desestabilizan el plegamiento de la proteína causando su desnaturalización o bien afectan epítomos en la +|superficie de la proteína [27]. Algunas de estas mutaciones afectan su interacción con EFL1, por lo que pueden alterar la regulación que SBDS ejerce en EFL1 [40].

#### 1.4 La superfamilia de las GTPasas

Las GTPasas son una clase de proteínas reguladoras involucradas en procesos celulares centrales, tales como traducción, biogénesis ribosomal, transporte intracelular, formación de citoesqueleto, entre otras. Cabe destacar su interacción con proteínas efectoras, generando una red de interacciones proteína-nucleótido y proteína-proteína, la cual es la base de la transducción de señal (familia RAS). De igual manera, las GTPasas tienen un papel preponderante en el ensamblaje del ribosoma, así como en todos los pasos de la síntesis de proteínas: iniciación, elongación, terminación y reciclaje [44].

Las GTPasas son capaces de unir GTP e hidrolizarlo a GDP, a través de ciclos de regulación precisos, inducidos por proteínas efectoras. Los factores que estimulan la actividad hidrolítica y el intercambio de GDP/GTP de una GTPasa son comúnmente referidos como las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) y factores intercambiadores de guanina (GEF), respectivamente. Además de los factores anteriormente descritos, hay otros que modifican la conformación de la GTPasa no unida a nucleótido (forma apo), llamados factores de estabilización del GTP (GFS), los cuales cambian el equilibrio de la conformación D (GTPasa-GDP) a T (GTPasa-GTP) de la forma apo de la GTPasa. Esto implica que la afinidad de algunas GTPasas por GDP y GTP es modificado por su interacción con otros ligandos o cofactores [20]. La gran mayoría de las GTPasas que intervienen en el ensamblaje del ribosoma enlazan débilmente a los nucleótidos de guanina; a diferencia de la familia RAS (GTPasas pequeñas) que no requieren la asistencia de GEFs para promover la liberación de GDP y unen GTP con una alta afinidad [45]. Los mecanismos mediante los cuales actúan estos efectores sobre la actividad de las GTPasas pueden ser diversos. Algunas proteínas efectoras tipo GEFs, insertan un residuo ácido en el sitio de unión del grupo fosfato, generando interacciones electrostáticas de repulsión para expulsar al nucleótido de guanina. Otro mecanismo descrito resulta de la inserción de residuos hidrofóbicos al sitio de unión del ion  $Mg^{2+}$ , lo cual disminuye la afinidad por este ion y por ende al GDP. También se ha observado que la interacción con la proteína GEF remodela la estructura de la GTPasa, sobre todo del motivo switch 2, generando un ambiente

hidrofóbico en el sitio de unión a  $Mg^{2+}$ . Finalmente puede ocurrir que la proteína efectora se posicione en el Dominio G, obstruyendo parcial o totalmente la unión al nucleótido [46].

#### **1.4.1 Dominio G**

El dominio de unión a GTP/GDP en la familia de GTPasas tiene secuencias conservadas, con cinco motivos estructurales involucrados en la unión del nucleótido (Figura 6) [47]. El asa P (Walker A), la región NKXD y el motivo SAL interaccionan de manera inespecíficas tanto con el GTP como con el GDP. El motivo del asa P tiene la secuencia consenso (G/A)XXXXGK(S/T) y enlaza a los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  del GDP y GTP. El motivo NKXD asistido por el motivo SAK, enlaza fuertemente a la porción de guanina y el anillo de ribosa del nucleótido. Mientras que los switch I (Walker A) y el switch II (Walker B) permiten la discriminación entre GTP y GDP de la GTPasa. El switch I normalmente contiene una treonina, a veces remplazada por serina, la cual coordina un ion  $Mg^{2+}$  que es determinante en la afinidad de la GTPasa por el nucleótido de guanina. Se ha propuesto que la coordinación del  $\beta$ -fosfato ayuda a neutralizar la carga del nucleótido difosfato, haciéndolo un mejor grupo saliente desde el fosfato terminal. El switch II acomoda el fosfato  $\gamma$  del GTP y junto con un residuo semiconservado de Gln, participan en la reacción de hidrólisis del GTP. El motivo switch II sufre cambios conformacionales drásticos en respuesta a la hidrólisis de GTP o del intercambio de nucleótido de guanina [48].

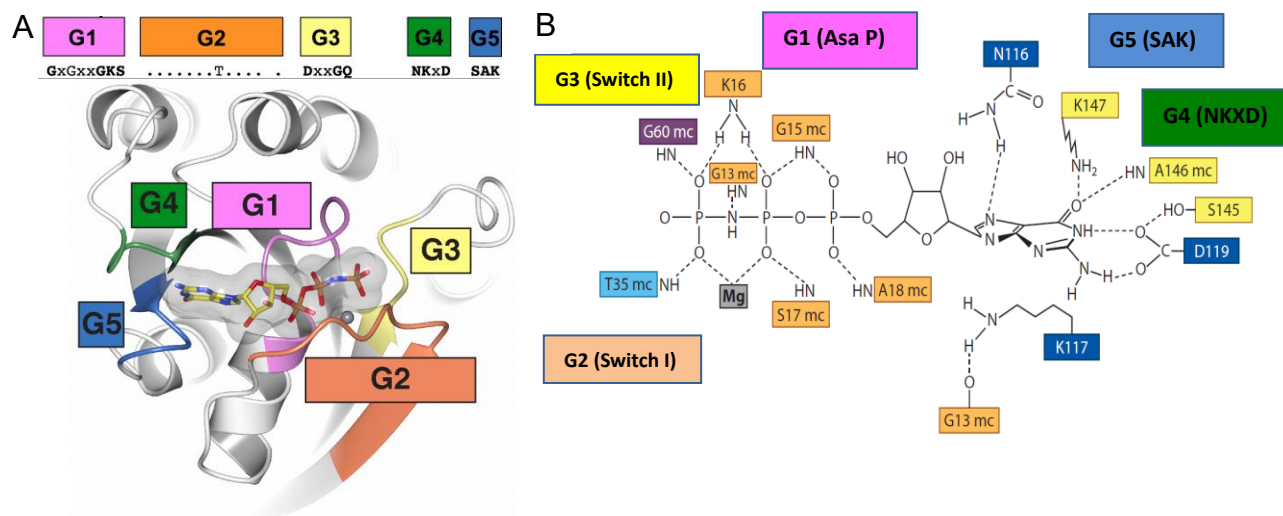


Figura 6. Representación esquemática del dominio de unión a nucleótidos de guanina de una GTPasa. **A.** Parte superior, Secuencias conservadas de los motivos estructurales del Dominio G, nombrados de G1-G5. Parte inferior, Representación esquemática tridimensional del Dominio G unido a GppNp en presencia de  $Mg^{+2}$  (esfera gris) con los motivos estructurales marcados con diferentes colores. **B.** Se muestran los residuos del Dominio G que interactúan con el nucleótido GppNHp, un análogo no hidrolizable de GTP. La numeración corresponde a los residuos de la GTPasa Ras humana. La terminación "mc" representa a la cadena principal (por sus siglas en inglés, main chain). Imagen obtenida mediante cristalografía a 1.35 Å de resolución, PDB ID:5P21, [49-51].

## 2 Justificación

Existen una gran variedad de estudios avocados a entender el reconocimiento y regulación de GTPasas por los nucleótidos de guanina y sus biomoléculas efectoras; en particular de GTPasa pequeñas y aquellas involucradas en traducción. Pero poco es lo que se sabe hasta el momento sobre estos mecanismos para la GTPasa EFL1. Se desconocen las constantes de interacción con los nucleótidos de guanina y el efecto que ejerce la proteína SBDS sobre esta unión, así como sus bases termodinámicas. Esta información es crucial para describir el funcionamiento y regulación de EFL1 y SBDS en los pasos finales de maduración de la subunidad ribosomal mayor, para entender el desarrollo de la ribosomopatía SDS y sus causas.

### 3 Hipótesis

Se ha demostrado que la interacción de EFL1 con la proteína SBDS disminuye el valor de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) por GTP, por lo que se sugiere que SBDS podría actuar como un GEF para EFL1 [31]. Sin embargo, este trabajo no determinó cuál de las constantes de equilibrio de la interacción es modificada. Si SBDS actúa como un efector de EFL1, entonces la interacción con SBDS modificará las constantes microscópicas de velocidad, y por ende las de equilibrio, de la interacción de EFL1 con GDP y/o GTP.

### 4 Objetivo General

- Caracterizar la unión de las proteínas EFTUD1/Efl1 con nucleótidos de guanina, en presencia y ausencia de SBDS/Sdo1, mediante técnicas espectroscópicas.

#### 4.1 Objetivos específicos

- Determinar mediante dicroísmo circular los parámetros de estabilidad térmica de los ortólogos humanos EFTUD1 y de levadura Efl1.
- Determinar mediante titulación espectroscópica de fluorescencia los parámetros de interacción ( $K_d$ ) de EFTUD1/Efl1 con GDP y con un análogo no hidrolizable de GTP (GppNHp) en presencia o ausencia de SBDS/Sdo1.
- Determinar los parámetros cinéticos de la unión de análogos fluorescente de nucleótidos de guanina (mant-GTP/GDP) con Efl1 sola y unida a Sdo1.
- Determinar el efecto del magnesio sobre la unión de Efl1 con los nucleótidos de guanina.

## 5 Metodologías

### 5.1 Sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes

El grupo de trabajo ya contaba con los protocolos para la sobreexpresión y purificación de los ortólogos humano (EFTUDI) y de *S. cerevisiae* de EFL1 (Efl1) en levadura y de sus correspondientes proteínas efectoras SBDS y Sdo1 en la bacteria *Escherichia coli* C41. El protocolo detallado del proceso de expresión y purificación de las proteínas se encuentra descrito en [52]. Se probó también el protocolo de sobreexpresión de Efl1 en bacteria descrito por Asano y colaboradores [53].

#### 5.1.1 Sobreexpresión de las proteínas EFTUD1/Efl1 en levadura

Para la expresión de ambas GTPasas se utilizó el plásmido pRS426, en el cual las correspondientes secuencias codificantes, junto con una secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV y una etiqueta de 6 histidinas, se encuentran bajo el control del promotor *GAL1/10* y el terminador *MATA*. El pRS426 es un vector de expresión cuyo marcador de selección en bacteria es la resistencia a ampicilina y en levadura es la complementación genética de la auxotrofia a uracilo por la presencia del gen *URA3*. También contiene las secuencias de REP3 y FRT necesarias para la propagación de alta copia en levadura. La expresión se llevó a cabo en la cepa de *S. cerevisiae* BCY123 mediante la adición de 2.5% de galactosa por 20 h a 30°C. La lisis celular se realizó por fricción con perlas de vidrio ( $\varnothing = 0.5$  mm). Las proteínas se purificaron a través de una cromatografía de afinidad a iones  $\text{Ni}^{2+}$  seguida de una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 de acuerdo con lo escrito en [52] con la adición de un lavado de alta sal (1.5 M NaCl) antes de la elución de la cromatografía de afinidad para separar ácidos nucleicos. La purificación se monitoreó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 7.5 % teñidos con azul de Coomassie G250. Efl1 también fue sobreexpresada en *E. coli* C41 y purificada como se describe en [53] adicionando el lavado con NaCl 1.5 M.

## 5.2 Caracterización de las proteínas Efl1/EFTUD1 y su unión con los nucleótidos de guanina

### 5.2.1 Materiales

Todos los compuestos químicos usados, incluyendo las sales de sodio de GDP y GTP fueron obtenidas de Sigma Chemical Co, a excepción de los derivados fluorescentes con el grupo mant de GDP, GTP, desoxiGDP, desoxiGTP y GppNHp los cuales fueron adquiridos de Jena Biosciences (Jena, Alemania).

### 5.2.2 Dicroísmo circular (CD)

Las proteínas EFTUD1 y Efl1 se dializaron en un amortiguador de fosfatos (50 mM Amortiguador fosfatos pH 7). Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en el ultravioleta lejano (195-260 nm) con una concentración de proteína de 0.1 mg/ml. Las mediciones se llevaron a cabo en una celda de cuarzo de 0.2 cm de paso óptico en un espectropolarímetro Jasco J-710 a temperatura de 20 °C en presencia y ausencia de GppNHp y GDP. Los espectros representan el promedio de tres mediciones realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido de 20 nm/min. Para procesar los datos, la señal en miligrados obtenida por el equipo se transformó a elipticidad molar media de residuos utilizando la ecuación 15:

$$[\theta]_{mrm} = \frac{DC_{obs} \cdot 10^6}{C \cdot l \cdot n}$$

Donde  $\theta_{mrm}$  es la elipticidad molar media de residuos,  $DC_{obs}$  es el valor de la elipticidad observada en mdeg (miligrados),  $C$  es la concentración de proteína en  $\mu\text{M}$ ,  $n$  es el número de residuos de la proteína y  $l$  es el paso óptico en mm. Los valores de elipticidad molar media de residuos se deconvolucionaron con los programas K2D3 [54] y CDNN [55]. La desnaturalización térmica se evaluó siguiendo la señal de dicroísmo circular a 208 nm a una velocidad de calentamiento de 1°C/min en un intervalo de temperatura de 20 – 90 °C y de 90 - 20 °C.



### **5.2.3 Dispersión dinámica de Luz (DLS)**

Los experimentos DLS se realizaron con el instrumento Malven Nano S (Malvern, Ltd) equipado con un láser NIBS (Laser no invasivo de dispersión) y un peltier para controlar la temperatura. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C en 50 mM Fosfatos pH 7 a una longitud de onda de 663 nm. La muestra de proteína (2 mg/ml) fue filtrada previamente por medio de un filtro Anotop® de tamaño de poro 0.02 µm (Whatman, GE). Los radios hidrodinámicos fueron calculados a partir de los valores Z usando el software ZetaSizer.

### **5.3 Ensayo de fluorescencia con ANS para evaluar la interacción de EFTUD1 y Efl1 con los nucleótidos de guanina**

La molécula ANS (1-Anilino-8-naftaleno sulfonato) se ocupa para examinar el carácter no polar de proteínas y membranas. Stryer ([56]) demostró que la fluorescencia del ANS, unido a sitios no polares de la apomioglobina era la misma a la fluorescencia en disolventes orgánicos hidrofóbicos [57]. El reactivo ANS libre presenta una baja fluorescencia al ser excitado a 380 nm con un máximo de emisión a 545 nm, sin embargo, la intensidad de fluorescencia del ANS aumenta cuando se une a regiones hidrofóbicas. Por lo que, el complejo Proteína-ANS tiene un espectro de emisión cuya intensidad puede ser hasta 40 veces más intensa. Lo cual la hace una molécula útil para evaluar la desnaturalización de una proteína o cambios conformacionales en donde se exponen regiones hidrofóbicas. En este trabajo se usó el ANS para evaluar la unión de GDP y GppNHp con EFTUD1 y Efl1, asumiendo que la unión generara cambios conformacionales que propicien la exposición de sitios hidrofóbicos que modificaran la fluorescencia del reactivo ANS. Se detectó el espectro de emisión del ANS a longitudes de onda de 400-600 nm excitando a 350 nm con un espectrofotómetro AMINCO-LS. Se utilizó una concentración de 5 µM de proteína sola o en presencia de 500 µM GDP o GppNHp y 100 µM de ANS en un amortiguador de 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

#### 5.4 Espectroscopia de fluorescencia de los triptófanos para evaluar la interacción de EFTUD1 y Efl1 con nucleótidos de guanina

Los espectros de fluorescencia de los triptófanos presentes en la proteína fueron medidos usando un espectrofotómetro AMINCO-LS. La muestra fue irradiada a 290 nm para excitar selectivamente el grupo indol de los residuos triptófanos, y el espectro de emisión fue registrado entre 310 y 410 nm. Se siguió el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de la proteína como resultado del incremento en la concentración de nucleótidos de guanina. Se realizó la adición de 1  $\mu$ L de nucleótido (1-2 mM) a una solución 1  $\mu$ M de EFTUD1 o Efl1 en amortiguador A (50 mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 5 mM mgCl<sub>2</sub>, 10 % glicerol) en presencia o ausencia de 10 $\mu$ M SBDS para la titulación de EFTUD1 o 10  $\mu$ M Sdo1 para Efl1 a 25°C. La constante de disociación ( $K_d$ ) se determinó mediante un ajuste no lineal a un modelo de interacción 1:1 a partir de los valores de máxima emisión, corregidos por filtro interno, en función de la concentración de ligando adicionada de acuerdo con la ecuación:

$$F_{obs} = F_{inicial} \cdot \frac{\Delta F_{PL} \cdot [L]}{[L] + K_d} \quad (16)$$

Para corregir el efecto del filtro interno se consideró un ajuste de los datos con la ecuación descrita en [58].

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot \text{antilog} \left( \frac{OD_{ex} + OD_{em}}{2} \right) \quad (17)$$

Donde  $OD_{ex}$  corresponde a la absorbancia del nucleótido a 290 nm,  $OD_{em}$  es la absorbancia del nucleótido al máximo de emisión y  $F_{obs}$  es el valor experimental máximo de emisión de la reacción. Para obtener los valores de OD para cada concentración de nucleótido se calculó el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ). Se registró la absorbancia a 290 nm de los nucleótidos de guanina en función de las concentraciones, siendo la pendiente  $\epsilon$ , según la ley de Lambert-Beer.

## 5.5 Espectroscopía de energía resonante de fluorescencia (FRET) para evaluar la interacción de Efl1 con mant-nucleótidos

Las proteínas EFTUD1 y Efl1 presentan cuatro triptófanos en el dominio G, por lo que se evaluó el fenómeno de FRET en la interacción de Efl1 con análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina. Para ello la muestra se excitó a una longitud de onda de 290 nm y se registró el espectro de emisión entre 300-550 nm. Se registró el espectro de emisión de la proteína sola (1µM), en presencia de nucleótido y del nucleótido libre.

### 5.5.1 Velocidad de interacción de Efl1 con análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina

En los experimentos de cinética rápida para la interacción entre la proteína Efl1 y los nucleótidos de guanina se monitoreo la fluorescencia del grupo mant en función del tiempo en presencia de las GTPasas sola y en presencia de las proteínas efectoras mediante FRET. Se excitó selectivamente los triptófanos a una longitud de onda de 290 nm y se midió la fluorescencia emitida por el grupo mant usando un filtro de 400 nm de corte para evidenciar la señal de fluorescencia debida a la transferencia de energía resonante de los triptófanos de las GTPasas al grupo mant de los análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina, el cual presenta un máximo de emisión a 450 nm. Los experimentos fueron realizados en el amortiguador A a 28°C, mediante el rápido mezclado de volúmenes iguales de GTPasa y mant-nucleótidos monitoreando el cambio de fluorescencia en función del tiempo. En ausencia de iones Mg<sup>2+</sup> se ocupó el amortiguador B (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA y 10 % glicerol). Se usó un espectrofluorómetro sx.18MV (Applied Photophysics, Lestherhead, UK) equipado con un módulo de flujo detenido (stopped-flow). Los datos se evaluaron mediante regresión no lineal a modelos de función exponenciales. Para el ajuste a una exponencial sencilla se utilizó la siguiente ecuación:

$$F_{obs} = F_{\infty} + Ae^{-k_{app}t} \quad 18)$$

donde  $F_{obs}$  corresponde a la fluorescencia observada al tiempo  $t$ ,  $k_{app}$  y  $A$  corresponden a la constante de velocidad aparente y la amplitud de la señal, y  $F_{\infty}$  es el valor final de la fluorescencia.

Los valores de las constantes de asociación ( $k_{+1}$ ) y de disociación ( $k_{-1}$ ) se estimaron a partir de la pendiente y la ordenada al origen del gráfico de la dependencia de las constantes aparentes de velocidad ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de ligando.

En el caso de una doble exponencial, los datos se ajustaron a la ecuación 15.

$$F_{obs} = F_{\infty} + A_1 e^{-k_{app1}t} + A_2 e^{-k_{app2}t} \quad (19)$$

donde  $F_{obs}$  corresponde a la fluorescencia observada al tiempo  $t$ ,  $k_{app1}$  y  $k_{app2}$  a las constantes de velocidad aparente y  $A_1$  y  $A_2$  corresponden a las amplitudes de la señal del primer y segundo componente respectivamente, y  $F_{\infty}$  es el valor final de la fluorescencia.

Al igual que para el ajuste a una exponencial sencilla, los valores de las constantes de asociación se estimaron a partir de la pendiente del gráfico de la dependencia de las constantes aparentes de velocidad ( $k_{app}$ ), también mencionadas como constantes observadas ( $k_{obs}$ ), en función de la concentración de ligando de ambas fases [59]. Las constantes microscópicas de velocidad de disociación fueron también determinadas mediante experimentos de desplazamiento, en los cuales se ocupó GDP a una concentración 20 veces mayor a la del mant-GDP para desplazar este último del complejo con Efl1.

La constante de equilibrio se calculó a partir de las constantes microscópicas de velocidad mediante la ecuación 10:

$$K_d = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{+1}k_{+2}}$$

Para los ensayos de competencia se desplazó el mant-GDP previamente unido a Efl1 (5  $\mu$ M Efl1 y 40  $\mu$ M mant-GDP) mediante la adición de diferentes

concentraciones de GDP (0, 50, 150, 200  $\mu$ M) y se siguió el decremento en la señal de fluorescencia respecto al tiempo.

## **6 Resultados y Discusión**

El objetivo del presente estudio fue describir la interacción de la GTPasa EFTUD1 con los nucleótidos de guanina sola y unida a SBDS. Debido a que en los sistemas *in vivo* ocurren un gran número de reacciones simultáneamente, para facilitar el estudio en el laboratorio se estudia la reacción de interés de manera aislada en un medio que permita mantener la proteína en su forma nativa y en suficiente concentración para producir una señal medible en condiciones al equilibrio y/o en función del tiempo. Por lo anterior, se requiere de los reactivos puros y concentrados, los cuales en nuestro estudio corresponden a las proteínas EFTUD1/Efl1 plegada sola o unida a su proteína efectora SBDS/Sdo1 y los nucleótidos de guanina en presencia o ausencia de iones magnesio.

### **6.1 Purificación de las GTPasas EFL1 recombinantes**

Como se mencionó anteriormente, la expresión y purificación de todas las biomoléculas usadas en este trabajo ya había sido reportado [52]. Sin embargo, la purificación constó de un paso adicional para separar los ácidos nucleicos unidos a las GTPasas y así obtener una preparación adecuada para los estudios realizados en este trabajo. La presencia de ácidos nucleicos unidos a la proteína podría alterar la unión con los nucleótidos de guanina, así como la determinación de la concentración de proteína. Ya que esta es determinada mediante su absorción a 280 nm; una longitud de onda en la que los ácidos nucleicos presentan una absorción residual. Los resultados muestran que la cromatografía de exclusión molecular separa dos poblaciones hidrodinámicamente distintas para ambas GTPasas recombinantes (Figura 7A). El análisis SDS-PAGE de ambas fracciones mostró que en ambas se encuentra presente la proteína Efl1 y tras el lavado con alta sal el pico de elución correspondiente a la proteína de alto peso molecular desaparece con el subsecuente aumento de la concentración de la

segunda fracción (dato no mostrado). EFL1 es una proteína que se une a la subunidad 60S ribosomal en la región denominada como el centro asociado de GTPasas que comprende los dominios II y IV del RNAr 26S, el tallo ribosomal formado por las proteínas P0, P1 $\alpha$ , P1 $\beta$ , P2 $\alpha$ , P2 $\beta$  y la proteína L12. Por lo que es probable que durante su purificación las proteínas EFL1 se asocien a fragmentos de RNA formando complejos de gran tamaño presentes en el primer pico de elución de la cromatografía de filtración en gel. Es bien sabido que la interacción de proteínas con ácidos nucleicos es de naturaleza electrostática [60], por lo que la adición de una alta concentración de sal (iones) probablemente interrumpe dicha interacción favoreciendo la forma libre de la GTPasa.

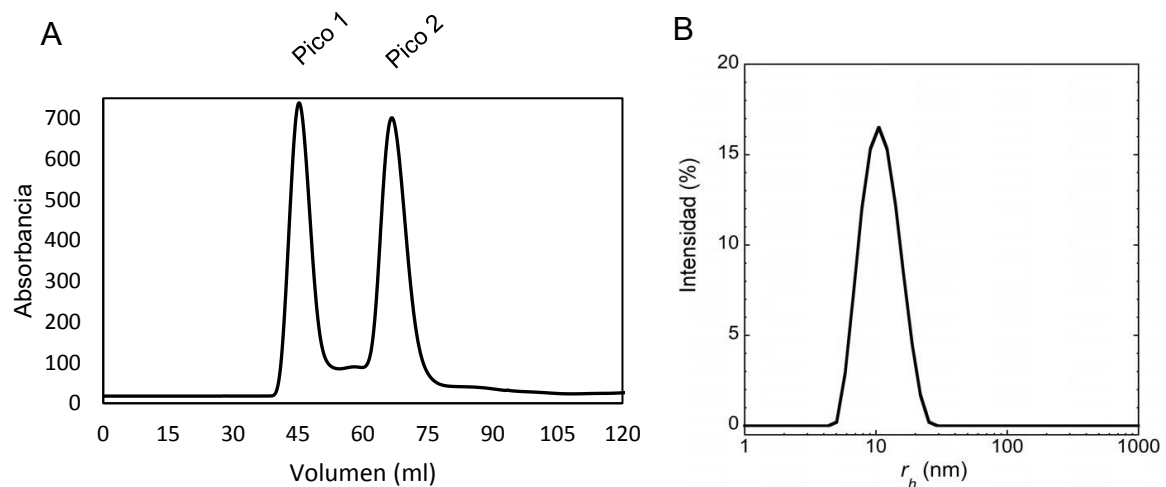


Figura 7. A. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular de la proteína Efl1 de levadura proveniente de columna de afinidad a iones  $Ni^{2+}$  sin lavado con alta concentración de NaCl (panel izquierdo). B. Análisis por dispersión dinámica de luz de la proteína Efl1 contenida en el segundo pico de la cromatografía de exclusión molecular.

La proteína contenida en el segundo pico de elución de la cromatografía de exclusión molecular de Efl1 de levadura (en adelante Efl1) se sometió a un análisis por DLS encontrándose que se trata de una muestra de proteína polidispersa con un radio hidrodinámico promedio de 8.8 nm, correspondiente al tamaño de una proteína de aproximadamente 4 veces el tamaño esperado de Efl1 (Figura 7B). Sin embargo, en la literatura no se ha reportado que las GTPasas formen homoligómeros, lo que sugiere que Efl1 es una proteína de estructura alargada

que no se puede modelar a una proteína de estructura esférica. Estudios recientes de dispersión de rayos X a ángulo bajo han demostrado que efectivamente Efl1 es una proteína elongada y flexible [40].

En la Tabla 1 se muestran el rendimiento final de las GTPasas obtenidas a partir de diferentes sistemas de expresión heteróloga. La proteína Efl1 expresada en levadura presentó el mayor rendimiento con respecto a la cantidad obtenida para el ortólogo humano (EFTUD1) expresada en el mismo sistema y el menor rendimiento se obtuvo para la Efl1 expresada en bacteria.

Tabla 1. Rendimiento de la purificación de las biomoléculas utilizadas en este trabajo.

Proteína recombinante	Masa molecular (kDa)	Coefficiente de extinción <sup>1</sup> (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Rendimiento (mg proteína/L cultivo)
EFTUD1	127.997	105,770	4
EFL1 levadura	127.031	83,770	7
EFL1 bacteria	127.031	83,770	0.5

<sup>1</sup>El coeficiente de extinción molar se calculó asumiendo que todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos.

## 6.2 Plegamiento de las GTPasas EFL1 recombinantes

Tras la purificación de las proteínas recombinantes se caracterizó su plegamiento como primer paso para asegurar su funcionalidad. Se registró el espectro de dicroísmo circular de las proteínas en estudio (Figura 8) y su contenido de estructura secundaria se analizó con el software CDNN (Tabla 2). Este análisis mostró que no hay una diferencia aparente entre los espectros de DC de la proteína Efl1 en presencia o ausencia de magnesio, y el contenido de estructura secundaria entre los ortólogos de humano y levadura es similar. Los espectros de DC de las proteínas recombinantes (Figura 8) sugieren que la estructura secundaria de la familia de proteínas EFL1 es una combinación de alfa hélices de acuerdo con las bandas negativas a 222 y 208 nm, y hojas beta (señal negativa a 217 nm). El mínimo a 208 nm es característico de la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  que ocurre en estructuras alfa hélice. A su vez, el contenido de estructura secundaria es similar al de su proteína homóloga EF-2 correspondiente a 38% alfa hélice y 23 % hoja beta plegada (PDB ID:1N0V). El contenido de estructura secundaria de EF-2 fue extraído de la base de datos PDB sum.

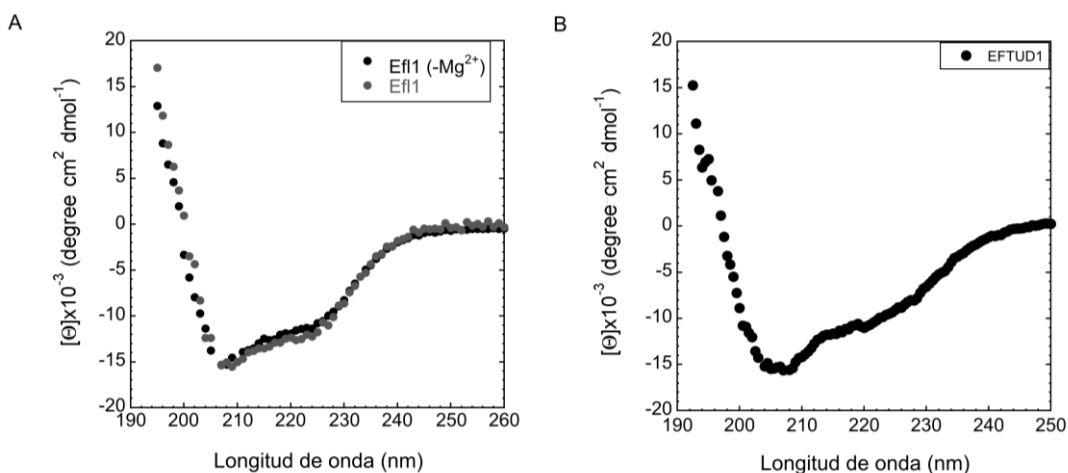


Figura 8. Evaluación del contenido de estructura secundaria de las proteínas (A) Efl1 con o sin magnesio y (B) EFTUD1 mediante dicroísmo circular.

Tabla 2. Deconvolución de los espectros de dicroísmo circular de las proteínas en estudio para la estimación de su contenido de estructura secundaria.

Estructura secundaria (%)	Proteína	
	Efl1	EFTUD1
Hélice $\alpha$ (%)	37.3	34
Hoja $\beta$ (%)	15.5	18
Giro $\beta$ (%)	16.5	17
Hebra al azar	27.6	29

Se realizaron estudios de estabilidad térmica de las proteínas EFTUD1 y Efl1 para conocer el intervalo de temperatura de trabajo en el que era posible hacer los subsecuentes estudios de interacción proteína-ligando. La desnaturalización térmica se siguió midiendo la señal de dicroísmo circular a 208 nm correspondiente a una de las señales de las hélices alfa de estas proteínas (Figura 9). Para ambas proteínas, solo se observó una transición del estado nativo al desnaturalizado lo que sugiere un proceso de desnaturalización de dos estados. Sin embargo, es de notar que en ambas proteínas la transición abarca 30 °C, es decir inicia a los 40 °C y termina cerca de los 70 °C. Lo cual sugiere que probablemente la trayectoria de desnaturalización es más compleja que dos estados. El proceso de desnaturalización térmica fue irreversible, ya que la trayectoria de renaturalización no se traslapó con la curva de calentamiento (dato



no mostrado). Las temperaturas medias de desnaturalización ( $T_m$ ) aparente para el ortólogo de humano y levadura fueron similares con valores de 52 °C y 55 °C, respectivamente.

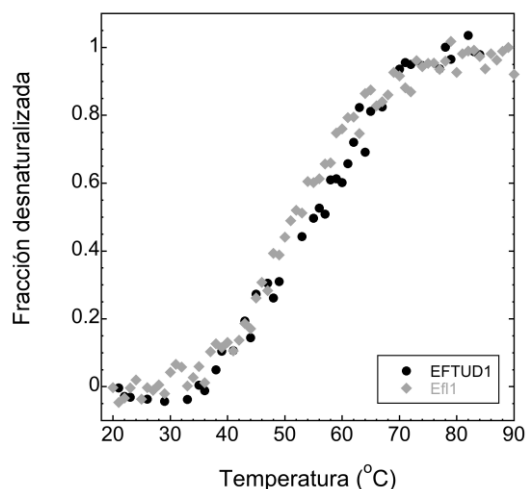


Figura 9. Desnaturalización térmica de la proteína de levadura Efl1 (diamantes grises) y la proteína humana EFTUD1 (círculos negros) seguida por dicroísmo circular.

Estudios previos realizados en el grupo de trabajo mediante calorimetría diferencial de barrido demostraron que el proceso de desnaturalización térmica del ortólogo Efl1 es en realidad más complejo y sigue un proceso de dos transiciones de dos estados cada una [31]. La temperatura de desnaturalización para la primera transición es de 51 °C, que correlaciona con la transición observada por CD, mientras que la segunda transición ocurre a los 64 °C. Con esta información se decidió trabajar a temperatura ambiente, en un intervalo de temperatura de 25 a 30 °C.

### 6.3 Cambios conformacionales en las proteínas Efl1 y EFTUD1 como resultado de la unión a nucleótidos de guanina

Se exploraron diferentes metodologías para caracterizar la interacción de Efl1/EFTUD1 con los nucleótidos de guanina. En primera instancia se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de las proteínas Efl1 y EFTUD1 en presencia de GDP y del análogo no hidrolizable GppNHp (guanosín 5'-[ $\beta,\gamma$ -imido] trifosfato) (

Figura 10). El análisis de los espectros de dicroísmo circular de Efl1 con GDP sugiere que la interacción propicia un cambio en el contenido de estructura secundaria de la proteína, mientras que la unión a GppNHp no presenta cambios detectables (Figura 10A). Para el caso de la proteína EFTUD1, los cambios en las señales de CD fueron menos evidentes en presencia de los nucleótidos de guanina evaluados. Sin embargo, para ambos nucleótidos la señal a 208 nm disminuyó mientras que la de 218 nm aumentó ligeramente (Figura 10B). Lo anterior sugiere que, para ambos ortólogos, la unión a nucleótidos de guanina genera pequeños cambios conformacionales. Es importante mencionar que cuantificar la magnitud del cambio conformacional mediante esta técnica es poco preciso, ya que existe la posibilidad de cambios estructurales que resulten equivalentes, es decir, generen el mismo contenido de estructura secundaria.

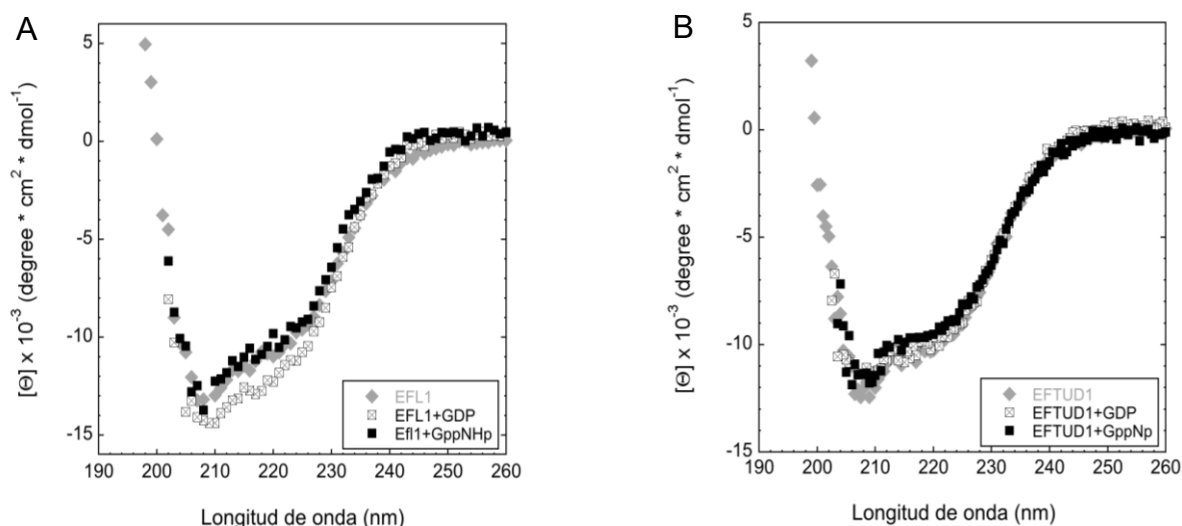


Figura 10. Espectros de dicroísmo circular de Efl1 (A) y EFTUD1 (B) en presencia de diferentes nucleótidos de guanina.

En muchos análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular se asume que la contribución de los residuos de aminoácidos aromáticos es despreciable en espectro de UV lejano. Sin embargo, estos aminoácidos tienen una intensa transición  $\pi$ - $\pi^*$  que se manifiesta en el intervalo de 180-230 nm, la cual en algunos casos es significativa [61]. En este caso, es posible que ocurra un cambio

en la conformación de la proteína al interactuar con los nucleótidos de guanina, propiciando la exposición u ocultamiento de residuos aromáticos. Porque los pequeños cambios observados en los espectros de DC de la Figura 10, pueden ser resultado de una compensación en la absorción diferencial de la luz polarizada por efecto del ocultamiento/exposición al medio de triptófanos, tirosinas y fenilalaninas sin que por eso quiera decir que no hay cambios conformacionales grandes.

Por otra parte, Los nucleótidos de guanina presentan señal de DC en solución 0.01 M de amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0, debida a transiciones electrónicas, con bandas negativas en los intervalos 180-210 nm y 230-295 nm y una banda positiva en el intervalo de 210-230 nm [62]. Estas señales pueden aportar significativamente en los cambios observados en los espectros de DC.

También se evaluó de forma indirecta, la ocurrencia de cambios conformacionales en las proteínas Efl1/EFTUD1 como resultado de la interacción con los nucleótidos de guanina siguiendo cambios en la emisión de fluorescencia del colorante ANS. Este colorante aumenta su fluorescencia al interactuar con superficies hidrofóbicas presentes en las proteínas, por lo que cambios en su emisión sugieren la exposición u ocultamiento de regiones hidrofóbicas en las proteínas en estudio y por lo tanto cambios en su contenido de estructura terciaria.

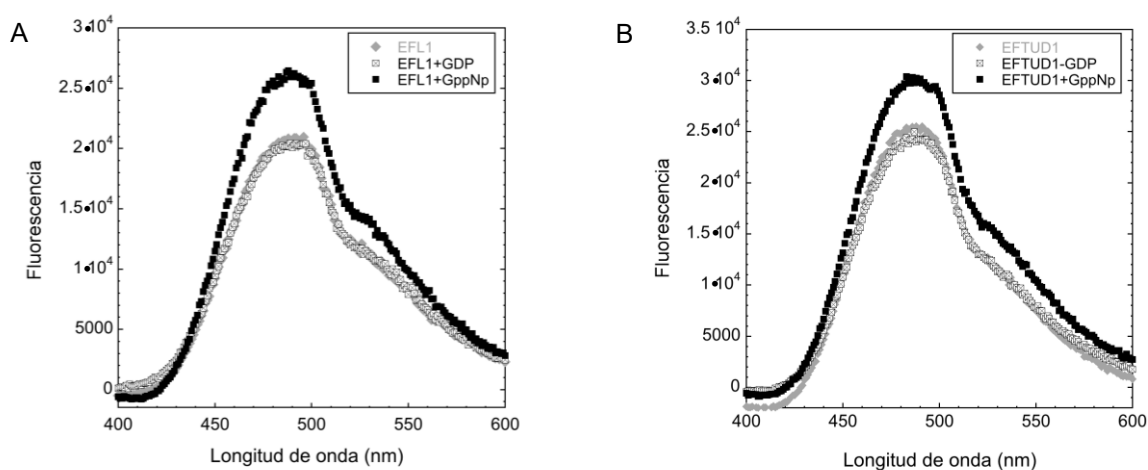


Figura 11. Efecto de los nucleótidos de guanina en la exposición de sitios hidrofóbicos en Efl1 y EFTUD1 mediante el espectro de emisión del ANS. (A) Espectro de emisión de fluorescencia de ANS con Efl1 y diferentes nucleótidos de guanina. (B) Espectro de emisión de fluorescencia de ANS con EFTUD1 y diferentes nucleótidos de guanina.

Como se puede observar en la Figura 11, la intensidad en el máximo de emisión del ANS en presencia del complejo proteína•GppNHp, tanto para Efl1 como EFTUD1, aumentó considerablemente respecto a aquel correspondiente a las proteínas libres. Lo anterior sugiere que la unión con el nucleótido GppNHp genera un cambio significativo en la estructura terciaria de Efl1 y EFTUD1, ya sea mediante la exposición de grupos hidrofóbicos y/o formación de cargas. Existen estudios en los que se determinó que la unión de ANS con proteínas ocurre inicialmente mediante la formación de interacciones electrostáticas entre grupo  $-SO_3^-$  del ANS con aminoácidos cargados positivamente en las proteínas [57]. Por el contrario, esta técnica no evidenció cambios conformacionales apreciables en las proteínas Efl1 y EFTUD1 con GDP.

Los resultados de esta sección sugieren que las proteínas Efl1 y EFTUD1 sufren cambios conformacionales al unir ambos nucleótidos, GDP y GppNHp. Sin embargo, las discrepancias en los resultados obtenidos al usar distintas técnicas como fueron dicroísmo celular y fluorescencia sugieren que los cambios conformacionales resultan en estructuras diferentes entre sí.

## **6.4 Caracterización de la interacción de Efl1/EFTUD1 con nucleótidos de guanina**

### **6.4.1 Interacción de EFTUD1/Efl1 con nucleótidos de guanina mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos**

Se ha reportado que la emisión de los triptófanos localizados en el sitio activo de una proteína, o cercano a este, puede ser apagada por la transferencia de energía al ligando. En particular, se ha observado el apagamiento en la emisión de fluorescencia de los triptófanos presentes en el dominio G de las GTPasas como resultado de la interacción con nucleótidos de guanina. Por lo que se utilizó este fenómeno para describir la interacción de estos ligandos con las proteínas Efl1 y EFTUD1. EFTUD1 presenta 13 triptófanos en su estructura, de los cuales cuatro

se encuentran en el dominio G, mientras que Efl1 tiene también cuatro triptófanos en el sitio de unión a nucleótidos de guanina de un total de 9.

En la Figura 12 se muestran los espectros de emisión de los residuos de triptófano resultantes de la titulación de EFTUD1 y Efl1 con concentraciones crecientes de GDP. Se puede observar que conforme aumenta la concentración de GDP la intensidad a la longitud de máxima emisión disminuye. Para estudiar la interacción de Efl1 y EFTUD1 con GTP, se utilizó el análogo no hidrolizable GppNHp, que emula la estructura de GTP sin que pueda ser hidrolizado evitando así la presencia de equilibrios simultáneos que compliquen el análisis.

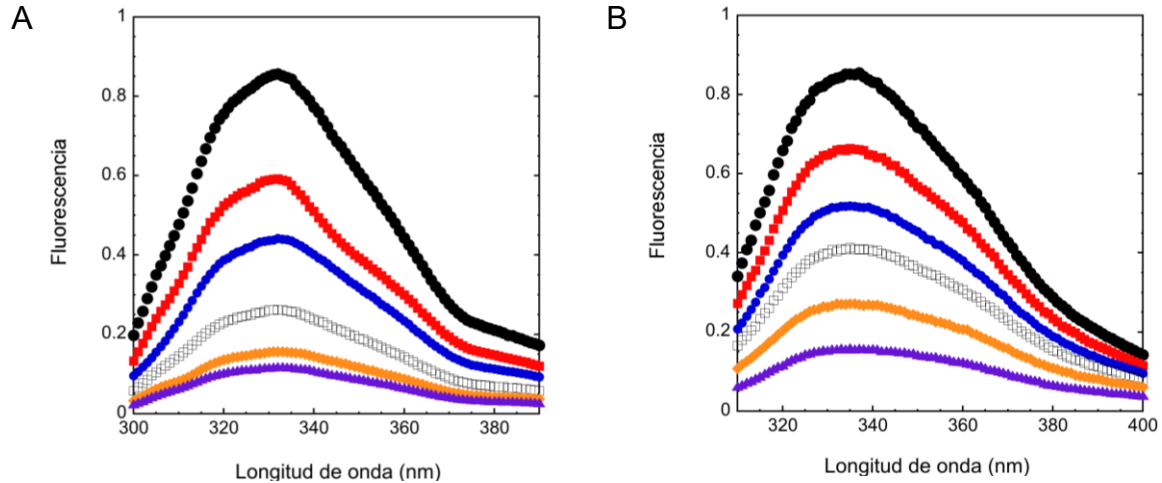


Figura 12. Espectros de emisión de (A) Efl1 y (B) EFTUD1 en presencia de diferentes concentraciones de GDP. Negro – 0  $\mu\text{M}$ , rojo – 100  $\mu\text{M}$ , azul – 200  $\mu\text{M}$ , blanco – 300  $\mu\text{M}$ , dorado – 400  $\mu\text{M}$ , morado – 500  $\mu\text{M}$ .

Para estudiar la interacción de una proteína con su ligando es necesario que la señal medida sea proporcional a la concentración del complejo proteína•ligando. Por lo que en nuestro caso es necesario que el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de las GTPasas EFL1, durante la titulación con nucleótidos de guanina, se deba únicamente a la unión y no a otros factores, tales como la absorción de luz incidente por parte de los nucleótidos, la cual, puede contribuir en el decaimiento de la señal de fluorescencia. Este fenómeno se conoce como filtro interno y se evidenció mediante la titulación de la lisozima con

GDP, una enzima que no presenta ningún sitio de unión a nucleótidos de guanina, por lo que el cambio en la señal es debido únicamente a este fenómeno (Figura 13).

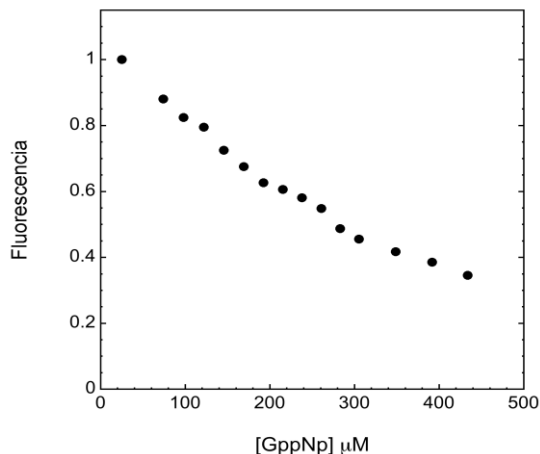


Figura 13. Efecto del filtro interno. Enmascaramiento de la fluorescencia de emisión de los triptófanos de la lisozima debido a la absorción de luz por parte del GppNHP a la longitud de onda de excitación (290nm).

Para corregir el efecto de filtro interno se consideró un ajuste de los datos mediante la ecuación:

$$F_{\text{corregida}} = F_{\text{observada}} \cdot \text{antilog}\left(\frac{DO_{\text{ex}} + DO_{\text{em}}}{2}\right)$$

donde  $DO_{\text{ex}}$  corresponde a la absorbancia del nucleótido a la longitud de onda de excitación (290 nm),  $DO_{\text{em}}$  es la absorbancia del nucleótido a la longitud de onda de emisión (340 nm) y  $F_{\text{observada}}$  es el valor experimental de fluorescencia a la longitud de máximo de emisión.

En nuestro caso de estudio, la absorbancia del nucleótido a longitud de emisión es despreciable pues los nucleótidos de guanina no absorben a 340 nm, pero sí a 290 nm correspondiente a la longitud de onda de excitación (Figura 14). Por lo que fue necesario corregir los datos de fluorescencia para el efecto de filtro interno. Para obtener los valores de absorción a cada concentración de nucleótido usada en las titulaciones se calculó el coeficiente de extinción molar a 290 nm según la ley de Lambert-Beer. Los coeficientes de absorción a 290 nm obtenidos para el

GppNHp y GDP fueron de  $2.9$  y  $3.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Como era de esperarse, ambos coeficientes fueran similares, ya que el cromóforo que absorbe a  $290 \text{ nm}$  es el anillo de purinas y es compartido por ambos nucleótidos. El espectro de absorción muestra dos bandas traslapadas que corresponden dos transiciones electrónicas del tipo  $\pi\pi^*$  [62]. La longitud de máxima absorción ocurre a  $253 \text{ nm}$ , por lo cual, el valor de absorptividad es mayor a esa longitud de onda (cuatro veces).

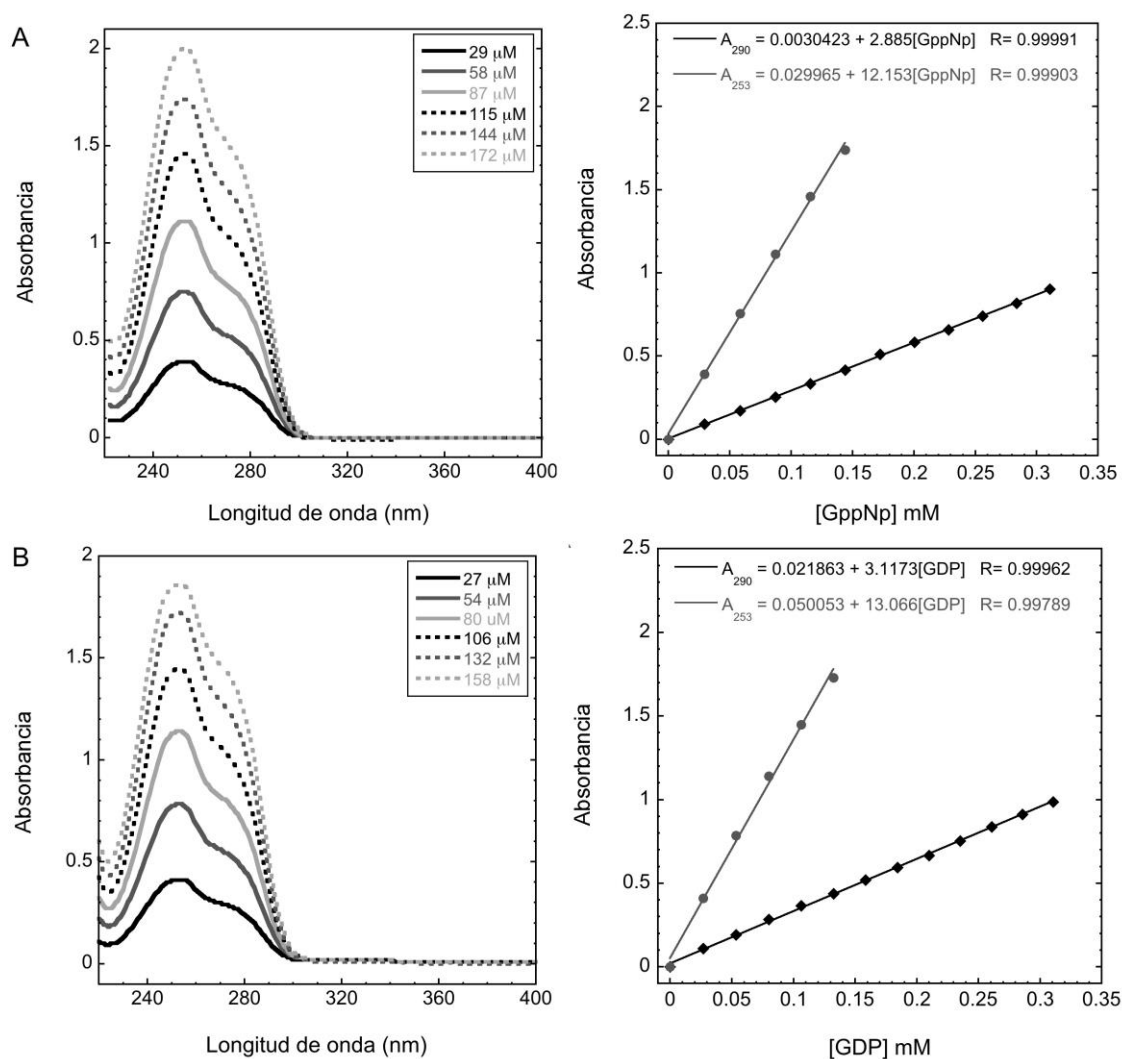


Figura 14. Espectro de absorción de GppNHp (A) y GDP (B). Panel derecho - dependencia de la absorción a  $290 \text{ nm}$  y  $253 \text{ nm}$  de los nucleótidos de guanina en función de la concentración. La línea sólida corresponde al ajuste a la Ley de Lambert-Beer.

La fluorescencia en cada punto de la titulación fue corregida y el re-gráfico en función de la concentración de nucleótido se ajustó a un modelo de interacción 1:1 que corresponde a una hipérbola en condiciones de pseudo-primer orden (Figura 15 y Figura 16).

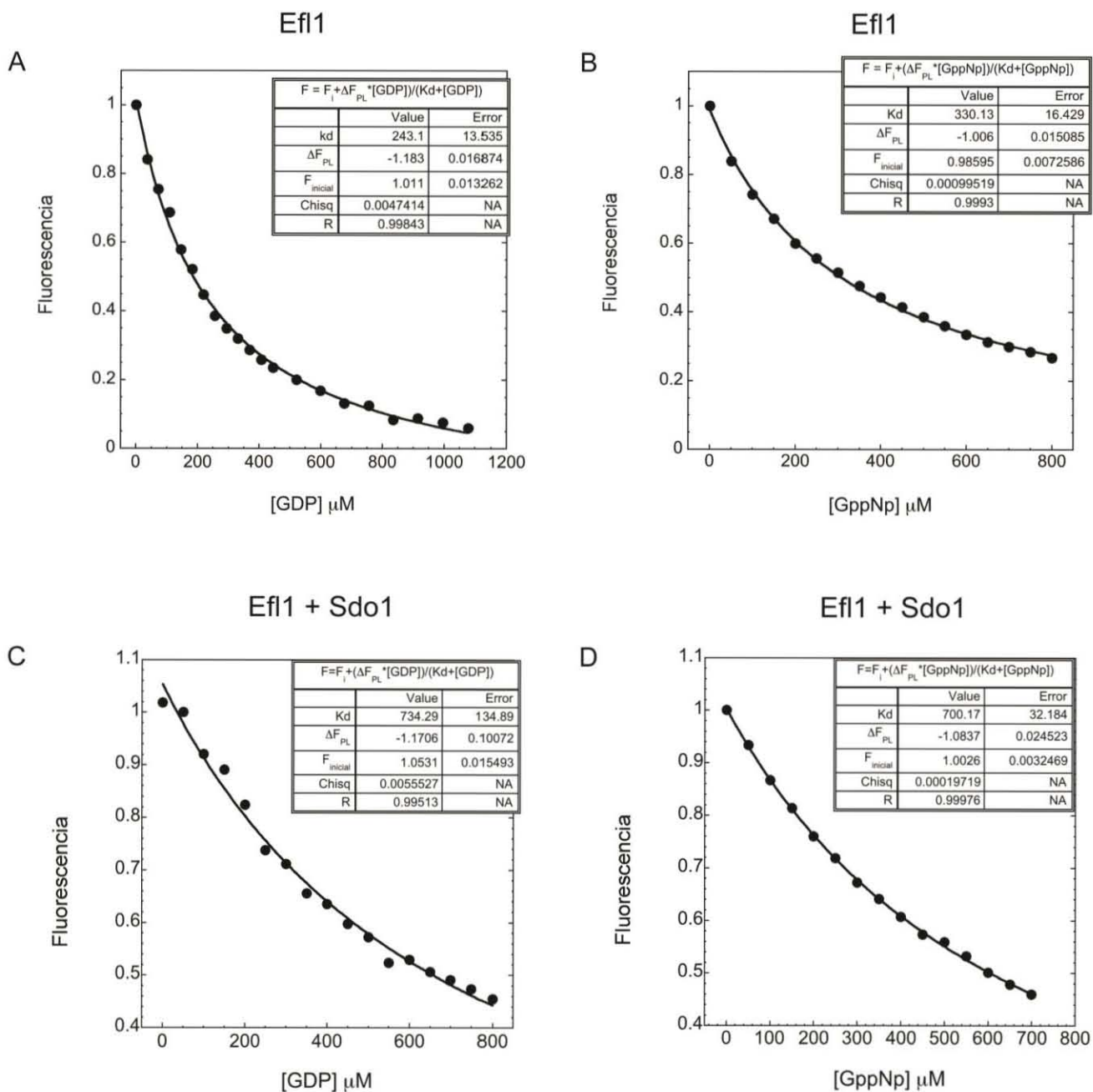


Figura 15. Titulación de Efl1 con nucleótidos de guanina en presencia o ausencia Sdo1. Las gráficas corresponden a los máximos de emisión de fluorescencia intrínseca de Efl1 en función de la concentración de nucleótido en amortiguador A (50 mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % glicerol). La línea sólida representa el ajuste a un modelo de un solo sitio de unión.



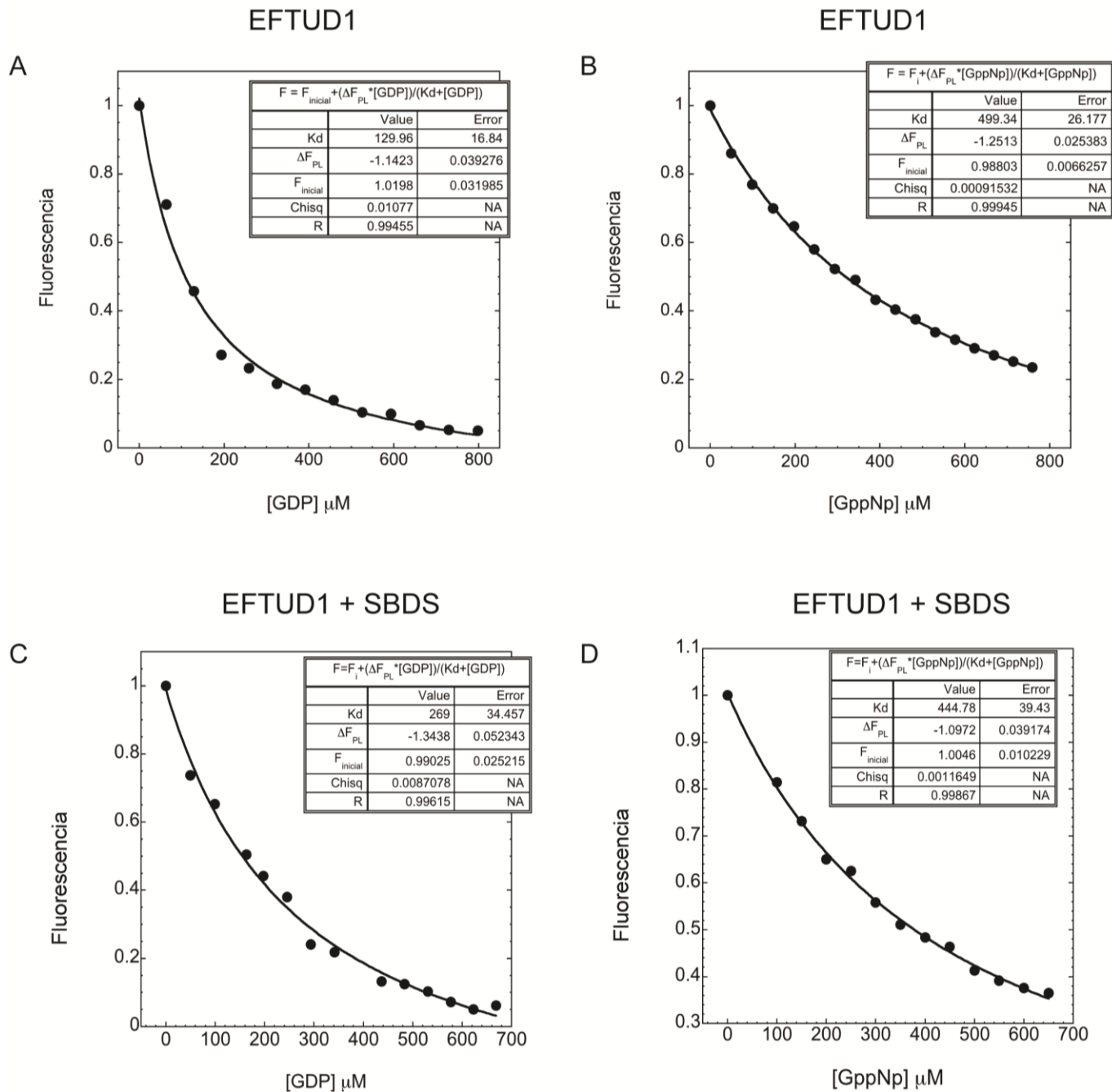


Figura 16. Titulación de EFTUD1 con nucleótidos de guanina en presencia o ausencia Sdo1. Las gráficas corresponden a los máximos de emisión de fluorescencia intrínseca de Efl1 en función de la concentración de nucleótido en amortiguador A (50 mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % glicerol). La línea sólida representa el resultado del ajuste al modelo de un solo sitio de unión.

Las constantes de disociación que describen cada equilibrio se resumen en la Tabla 3. En todos los casos se observó un buen ajuste al modelo de interacción de

proteína-ligando de un solo sitio de unión. De forma interesante, los resultados sugieren que ambas proteínas, Efl1 y EFTUD1, son más afines a su producto (GDP) que a su sustrato. Lo anterior asumiendo que el GppNHp es un *bona fide* análogo del GTP e interactúa de la misma forma con la proteína. Ya que existen reportes con GTPasas de traducción tales como EF-G [63], SelB [64] y ERF3 [65] que muestran que los análogos no hidrolizable de GTP no siempre son funcionalmente equivalentes. Una mayor afinidad por GDP que por GTP ya ha sido observado para otras GTPasas ribosomales (Tabla 3). En presencia de Sdo1/SBDS se observó que las constantes de disociación por GDP incrementaron su valor, mientras que la correspondiente para GppNHp no cambia para EFTUD1, para el caso de Efl1 la proteína Sdo1 no solo modificó la constante de disociación por GDP, si no también aquella por GppNHp. Considerando estas constantes de disociación y que las concentraciones fisiológicas promedio de GTP y GDP en una célula eucariota son de 460  $\mu\text{M}$  y 160  $\mu\text{M}$  respectivamente [66], Efl1 se encontraría en una concentración al doble unida a GTP respecto a la unida a GDP y su interacción con Sdo1 sólo favorecería 0.5 veces la formación de este complejo. En el caso de EFTUD1 los resultados sugieren que la interacción de la GTPasa con su correspondiente proteína efectora abate la interacción con GDP, asemejándose a la función de las proteínas efectoras GEF. Al disminuir la afinidad de la GTPasa por el GDP, la proteína SBDS desplaza el equilibrio hacia la formación del complejo activo EFTUD1•SBDS•GTP. La EFTUD1 libre se encontraría en una proporción de casi 50% unida a uno u otro nucleótido, mientras que su unión con SBDS aumentaría 2.5 veces la proporción de GTPasa unida a GTP.

Tabla 3. Constantes de disociación obtenidas mediante el apagamiento de los triptófanos en las GTPasas Efl1 y EFTUD1 por nucleótidos de guanina. Con fines de comparación se muestra las constantes de disociación de algunas GTPasas ribosomales.

Complejo	$K_d$ GDP ( $\mu$ M)	$K_d$ GppNHp ( $\mu$ M)	$K_d$ GTP ( $\mu$ M)	Referencia
Efl1	243 $\pm$ 13	330 $\pm$ 16	-	Este trabajo
Efl1•Sdo1	734 $\pm$ 135	700 $\pm$ 32	-	Este trabajo
EFTUD1	130 $\pm$ 16	499 $\pm$ 26	-	Este trabajo
EFTUD1•SBDS	269 $\pm$ 34	444 $\pm$ 34	-	Este trabajo
Bms1	24	-	323	[67]
Obg (Homólogo Nog1)	0.5	1.2	-	[68]
eRF3	1.3	>160	200	[65]
eRF3•eRF1	1.9	200	0.7	

Por lo que los resultados en esta sección sugieren que las proteínas Sdo1/SBDS funcionan como un intercambiador de nucleótidos de guanina para las GTPasa Efl1/EFTUD1 favoreciendo el intercambio de GDP por GTP. Sin embargo, es importante mencionar que esta técnica tiene ciertas limitaciones que se mencionan a continuación. La fluorescencia intrínseca de los triptófanos de una proteína es muy sensible a los cambios de polaridad del medio local que los rodea. Como se mencionó en la sección anterior, la unión de las GTPasas con nucleótidos de guanina parece provocar un cambio conformacional en ellas. Por lo que es posible que, como resultado del cambio conformacional, se expongan u oculten triptófanos tanto de las GTPasas como de los efectores ocasionando cambios en la fluorescencia medida que no son considerados en el modelo usado [18]. Más aún, una disminución en la señal de fluorescencia también puede ser ocasionado por un efecto de dilución tras la adición de los nucleótidos. Por lo que es importante que esta no sea mayor al 5%, ya que de lo contrario no es posible corregir adecuadamente el valor de la fluorescencia. La Figura 17 muestra como aún después de corregir los datos de fluorescencia por el efecto de filtro interno para la titulación de GppNHp a lisozima (una proteína que no une nucleótidos de guanina) se sigue observando un decaimiento en la señal en un experimento con una dilución final del 15%.

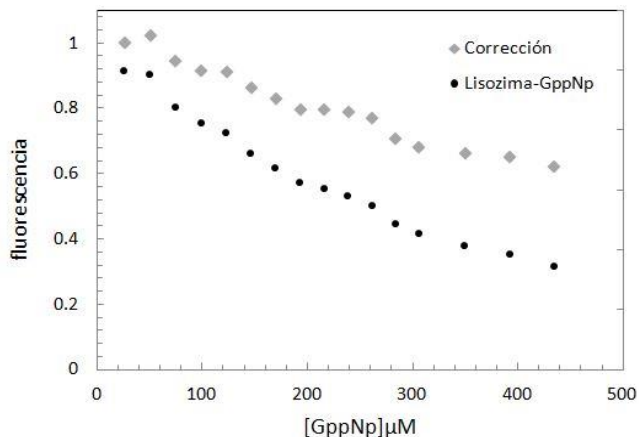


Figura 17. Decaimiento en la señal de emisión de los triptófanos de la lisozima en una titulación con GppNHp con una dilución al final de la titulación del 15%.

#### 6.4.2 Interacción de Efl1 con nucleótidos de guanina sola y unida a Sdo1 mediante FRET

A partir de esta sección, se decidió trabajar con la proteína Efl1 de levadura (expresada en levadura), debido al rendimiento de purificación de la proteína. Para evidenciar el fenómeno de FRET en la unión de Efl1 con los nucleótidos de guanina se obtuvieron los espectros de emisión de Efl1 libre, mant-nucleótido libre y el complejo Efl1•mant-nucleótido tras la excitación a 290 nm (Figura 18). La transferencia de energía de los triptófanos de la proteína se evidenció mediante el decaimiento en su señal de fluorescencia con el correspondiente aumento en la señal del grupo mant a 440 nm respecto a sus espectros de emisión individuales. Esto se debió al traslape del espectro de emisión de los triptófanos presentes en el sitio de unión a nucleótidos de guanina con el espectro de excitación del grupo mant a una longitud de onda alrededor de los 340 nm. Si bien, el fenómeno FRET ocurre como resultado de la interacción entre Efl1 y los nucleótidos de guanina, es difícil determinar que aminoácidos intervienen en la transferencia de energía. Como se mencionó antes, Efl1 contiene en su estructura 9 triptófanos, de los cuales 4 se encuentran en el sitio activo, lo cual los hace posibles candidatos responsables de este fenómeno.

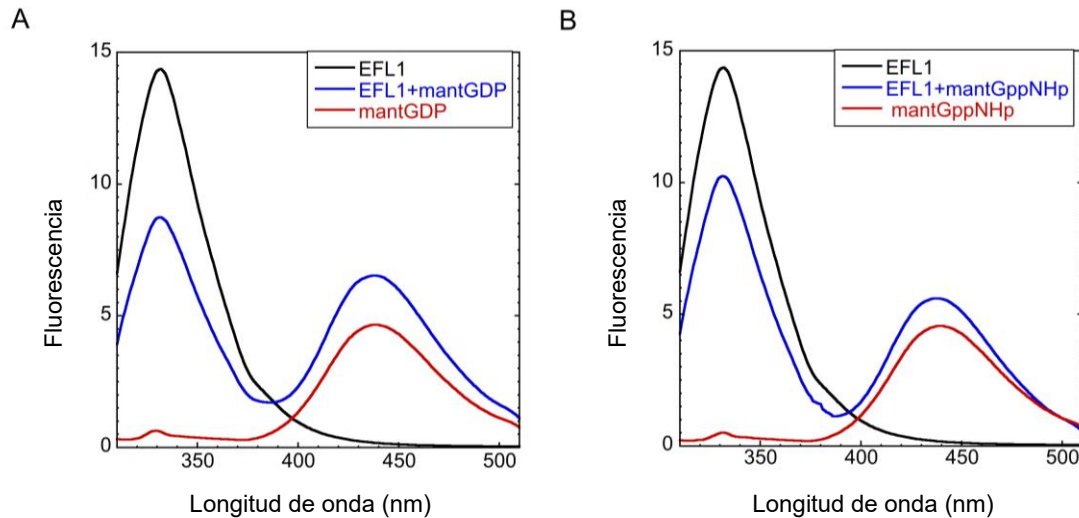


Figura 18. Formación de los complejos de Efl1 con análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina (mant-). Espectros de emisión de Efl1 (negro), mant-nucleótidos (rojo) y complejo (azul) después de su excitación a 290 nm.

Con el fin de obtener una descripción más amplia del proceso de interacción entre Efl1 y los nucleótidos de guanina, se realizaron experimentos de cinética rápida siguiendo la señal de FRET anteriormente descrita. Este tipo de experimentos no sólo nos permite obtener las constantes de disociación, sino también las constantes microscópicas de velocidad de la interacción y por tanto información del mecanismo. Se realizaron experimentos en condiciones de pseudo-primer orden con concentraciones de  $4\mu\text{M}$  Efl1 y  $20\text{-}125\mu\text{M}$  para los mant-nucleótidos. Para evaluar el efecto de Sdo1 en la interacción con los nucleótidos se agregó una concentración tres veces mayor de ésta que la de Efl1 para asegurar que toda fracción de Efl1 se encontraba en complejo con Sdo1 ( $K_d=80\text{nM}$ , [53]). La asociación de Efl1 con los diferentes nucleótidos, en presencia y ausencia de magnesio, se describió adecuadamente mediante un modelo de dos exponenciales como demuestra la variación aleatoria de los residuales del ajuste. Por el contrario, el ajuste de los datos a un modelo de una exponencial sencilla no resultó adecuado ya que los datos, en particular aquellos a tiempos cortos de asociación, no son descritos adecuadamente por este modelo (Figura 19). Un ajuste a un modelo de dos exponenciales resulta en dos constantes aparentes de velocidad, y sugiere que la interacción ocurre en dos pasos mediante un cambio

conformacional. Sin embargo, este comportamiento también podría ser resultado de heterogeneidad en la muestra de proteína o del ligando.

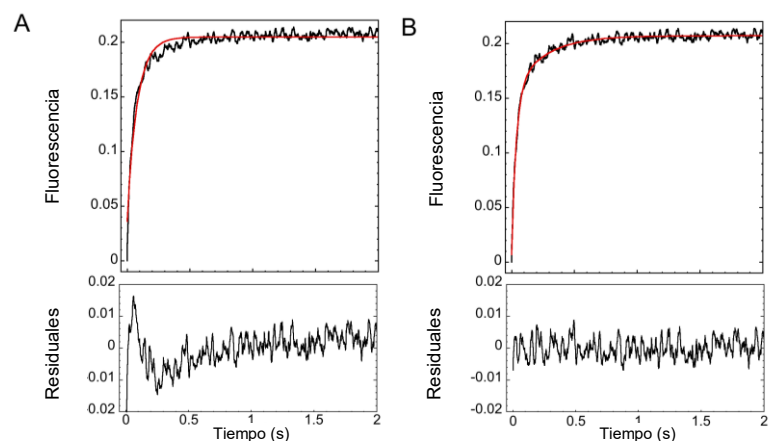


Figura 19. Ajuste de la curva temporal de asociación de Efl1 con mant-GDP en presencia de iones  $Mg^{2+}$  a un modelo de exponencial sencilla (A) o de doble exponencial (B). Trazo rojo representa el ajuste de los datos.

Para descartar estas dos últimas posibilidades se realizaron diferentes controles. La muestra comercial de mant-nucleótidos contiene una mezcla racémica de los correspondientes isómeros 2' y 3' (Figura 3) en una proporción 1:1, por lo que una doble exponencial podría explicarse por una mayor afinidad a alguno de los isómeros. Sin embargo, el ajuste a una doble exponencial para describir la cinética de interacción de Efl1 con los desoxinucleótidos de guanina no pudo ser explicada por la afinidad mayor por alguno de los isómeros, ya que la asociación con el mant-desoxinucleótido, que corresponde sólo al isómero 2', también se describió adecuadamente mediante este modelo (Figura 20).

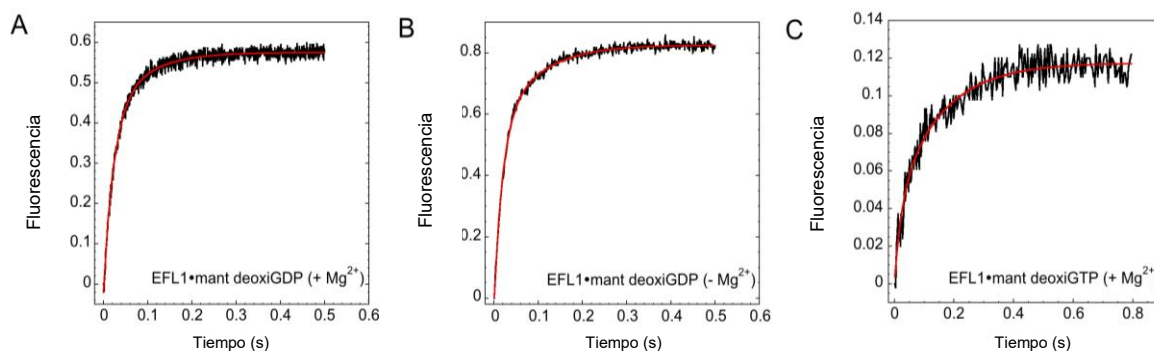


Figura 20. Cinética de unión de Efl1 a desoxi-nucleótidos de guanina. El grupo mant- fue excitado mediante FRET a partir de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Efl1. La línea roja corresponde al ajuste a una ecuación de doble exponencial. (A) asociación a mant-desoxiGDP en presencia de iones Mg<sup>2+</sup>. (B) asociación a mant-desoxiGDP en ausencia de iones Mg<sup>2+</sup>. (C) asociación a mant-desoxiGTP en presencia de iones Mg<sup>2+</sup>.

Por otro lado, la fuente de proteína Efl1 utilizada en este trabajo proviene de su expresión recombinante en levadura. Al ser éste un organismo eucarionte, es posible que una población de proteína en la muestra haya sufrido modificaciones post-traduccionales y estas modificaciones alteren la interacción con los nucleótidos de guanina. Anteriormente en el grupo de trabajo se demostró que Efl1 expresada en levadura presenta varias fosforilaciones, cuyo impacto en la función se desconoce [69]. Para descartar el efecto de estas modificaciones post-traduccionales en la interacción, se expresó la proteína Efl1 en bacteria y se evaluó la interacción con mant-GDP (Figura 21). Nuevamente, el ajuste de los datos a un modelo de una exponencial sencilla no describió adecuadamente los datos experimentales en las etapas iniciales de la interacción. En contraste, el ajuste a un modelo de doble exponencial no muestra desviaciones sistemáticas de los residuales. Por lo que, en caso de existir modificaciones post-traduccionales en la proteína Efl1, estas no son responsables del ajuste de los datos de unión a GDP a una doble exponencial. Cabe resaltar que no se utilizó la expresión en bacteria como fuente rutinaria de proteína debido a los bajos rendimientos (Tabla 1).

Todo lo anterior sugiere que la interacción de Efl1 con GDP y GTP genera un cambio conformacional en la proteína, lo cual se ve reflejado en el ajuste de los datos a un modelo de dos pasos.

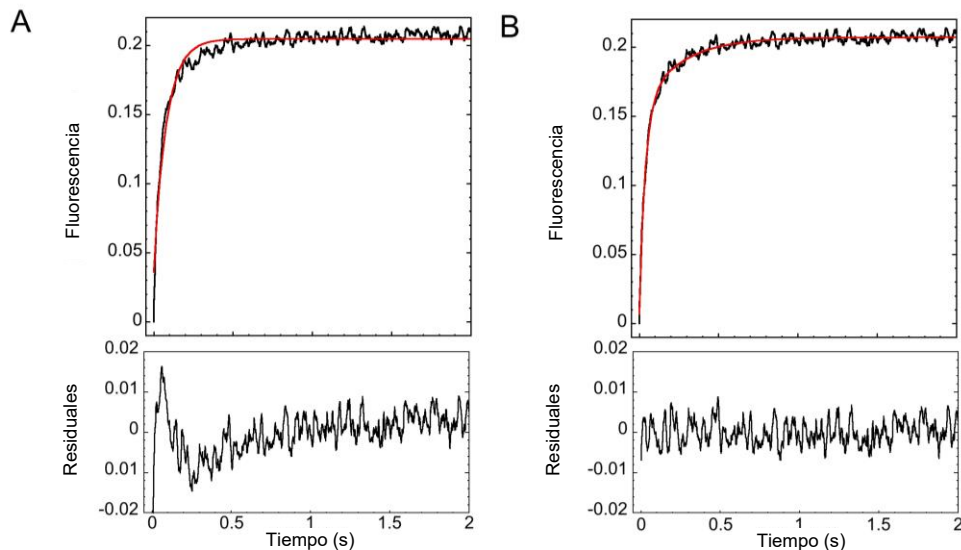


Figura 21. Cinética de unión de la proteína Efl1 expresada en bacteria con mant-GDP. Trazo sólido en rojo corresponde al ajuste a una exponencial sencilla (A) y al ajuste de los datos a una doble exponencial (B).

#### 6.4.2.1 Mecanismo de ajuste inducido para la interacción de Efl1 con los nucleótidos de guanina

En la sección anterior se determinó que la interacción de Efl1 con los nucleótidos de guanina conlleva un mecanismo de unión que ocurren en dos etapas (dos fases cinéticas) que involucra un cambio conformacional. Este cambio conformacional puede ocurrir después de la asociación con el ligando (ajuste inducido) o bien, que la proteína se encuentre en un equilibrio entre dos conformaciones antes de la asociación con el ligando (selección conformacional). En el modelo de ajuste inducido, la interacción de la proteína con el ligando procede a través de una constante de asociación de segundo orden y es más rápido que el cambio conformacional de la proteína, lo que significa que este llega al equilibrio antes que ocurra la segunda reacción (equilibrio rápido). El segundo paso de la reacción corresponde a la isomerización con una constante de primer orden [9]. Un método común para estudiar la dependencia de la constante de segundo orden respecto al tiempo es realizar los experimentos en presencia de altas concentraciones de uno de los reactivos. En esta condición de pseudo-primer orden, la constante asociada a la primera fase rápida presenta una dependencia lineal con la concentración de ligando, mientras que para la segunda fase se



espera un comportamiento hiperbólico. Sin embargo, para describir la hipérbola completa se requiere de concentraciones altas de ligando, lo cual no siempre es posible de alcanzar experimentalmente. Así en el regráfico de las constantes aparentes de velocidad en función de la concentración de nucleótido, la pendiente corresponde a la constante de velocidad de asociación ( $k_{+1}$ ) mientras que la intersección en el eje de las “Y” corresponde a la constante de velocidad de disociación ( $k_{-1}$ ). Con los valores obtenidos de las constantes de velocidad se puede calcular la constante de disociación mediante la ecuación 16. Como se puede observar en las Figura 22-22, los datos de interacción de Efl1 con GDP y GTP sugieren que estos procesos ocurren mediante un mecanismo de ajuste inducido. En contraste, en el mecanismo de selección conformacional la dependencia de las constantes aparentes de velocidad en función de la concentración de nucleótido describe una hipérbola descendente [70].

Las constantes de disociación obtenidas mediante experimentos de cinética rápida siguiendo la señal de FRET demostraron que, al igual que cuando la interacción se midió siguiendo el apagamiento de los triptófanos, la afinidad de Efl1 es mayor por GDP que por GTP (Tabla 4). Los valores de las constantes de disociación para la enzima libre en presencia de iones magnesio fueron 10 y 170  $\mu\text{M}$  para GDP y GTP, respectivamente. La menor afinidad de mant-GTP es resultado principalmente de una disminución en la velocidad de asociación al nucleótido (primer paso del mecanismo de reacción), aunque en el cambio conformacional la disociación ocurre ligeramente más rápida comparada con los valores observados para mant-GDP. Por lo que Efl1 libre en el citoplasma se encontraría en una proporción de 6 veces mayor unida a GDP que a GTP, lo cual resulta en la formación de un complejo no funcional al favorecer la configuración D de Efl1. Estos resultados son relevantes ya que se ha reportado que mutaciones no-sinónimas en SBDS (el ortólogo humano de Sdo1) asociadas con el Síndrome de Shwachman-Diamond interrumpen la interacción entre estas dos proteínas [40], y por ende favorecen este escenario en el que EFL1 se encuentra libre unida a GDP.

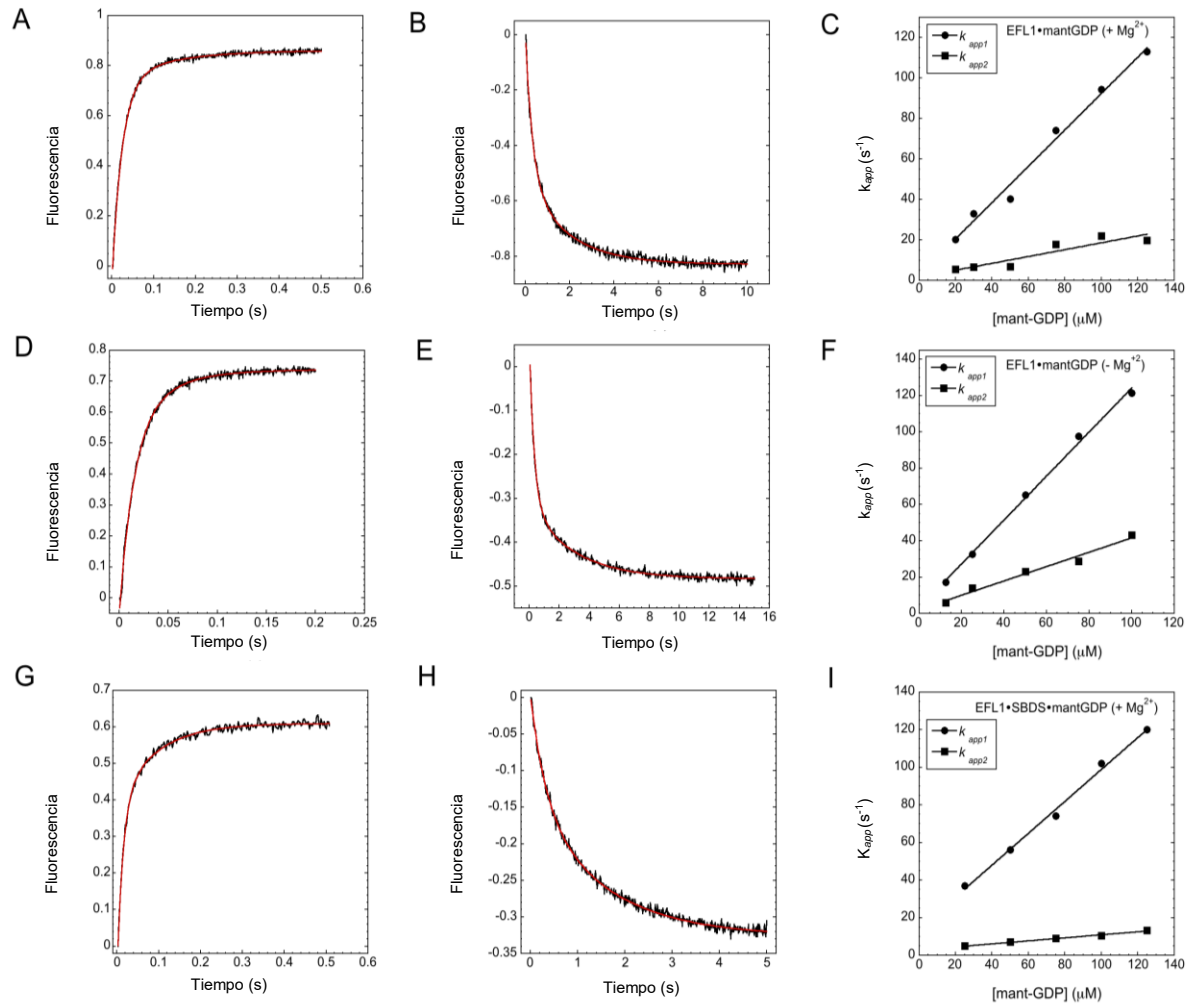


Figura 22. Interacción de mant-GDP a Efl1 en presencia o ausencia de Sdo1. El grupo mant- fue excitado mediante FRET a partir de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Efl1. Las concentraciones después de mezclar son 4  $\mu\text{M}$  Efl1, 10  $\mu\text{M}$  Sdo1, 50  $\mu\text{M}$  mant-GDP y 5mM  $\text{Mg}^{2+}$ , según corresponda el experimento. La línea roja corresponde al ajuste a una ecuación de doble exponencial. (A) Asociación de mant-GDP a Efl1. (B) Disociación de mant-GDP de Efl1 con 500  $\mu\text{M}$  GDP. (C) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GDP. (D) Asociación de mant-GDP a Efl1 en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . (E) disociación de mant-GDP de Efl1 con 500 $\mu\text{M}$  GDP en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . (F) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GDP en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . (G) Asociación de mant-GDP al complejo EFL1•Sdo1. (H) disociación de mant-GDP del complejo EFL1•Sdo1 con 500 $\mu\text{M}$  GDP. (I) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GDP en asociación con el complejo EFL1•Sdo1. Círculos -  $k_{app1}$ ; cuadrados -  $k_{app2}$ .

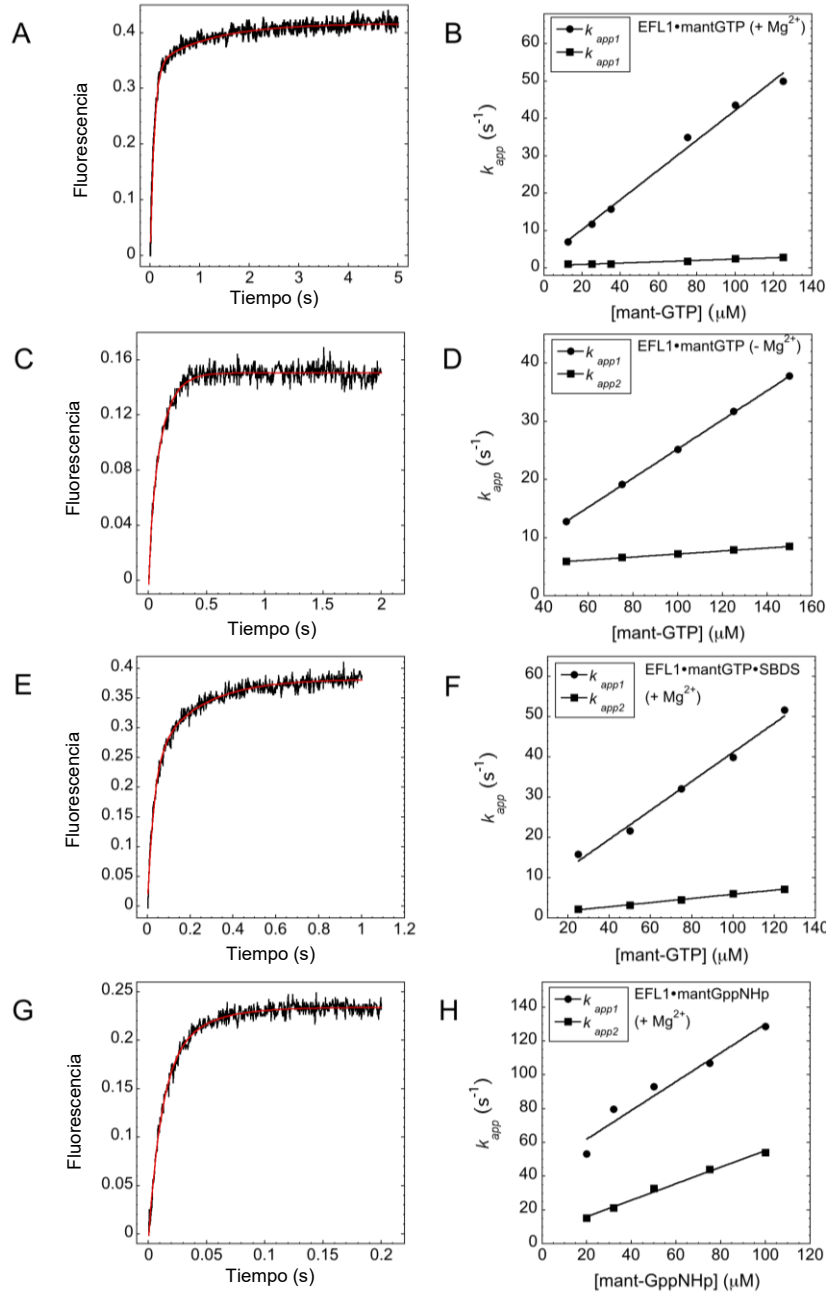


Figura 23. Interacción de mant-GTP con Efl1 en presencia o ausencia de Sdo1. El grupo mant- fue excitado mediante FRET a partir de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Efl1. Las concentraciones después de mezclar son 4 μM Efl1, 10 μM Sdo1, 50 μM mant-GTP/GppNHp, y 5mM Mg<sup>2+</sup>, según corresponda el experimento. La línea roja corresponde al ajuste a una ecuación de doble exponencial. (A) Asociación de mant-GTP a Efl1. (B) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GTP. (C) Asociación de mant-GTP a Efl1 en ausencia de Mg<sup>2+</sup>. (D) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GTP en ausencia de Mg<sup>2+</sup>. (E) Asociación de mant-GTP al complejo Efl1•Sdo1. (F) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GTP para la interacción con el complejo Efl1•Sdo1. (G) Asociación de mant-GppNHp a Efl1. (H) Dependencia de las constantes aparentes ( $k_{app}$ ) en función de la concentración de mant-GppNHp para la interacción con Efl1. Círculos -  $k_{app1}$ ; Cuadrados -  $k_{app2}$ .

Ya ha sido previamente observado un mecanismo de interacción de dos pasos, correspondiente a un ajuste inducido en la interacción de otras GTPasas de traducción con los nucleótidos de guanina. El factor de liberación 3 eucarionte (eRF3) muestra este comportamiento para la interacción con GDP, independientemente de la presencia de su proteína efectora (eRF1) o del ribosoma. Por otro lado, la GTPasa bacteriana HflX se une a GTP mediante un mecanismo de dos pasos, pero la unión con GDP en presencia del ribosoma ocurre en un solo paso [71].

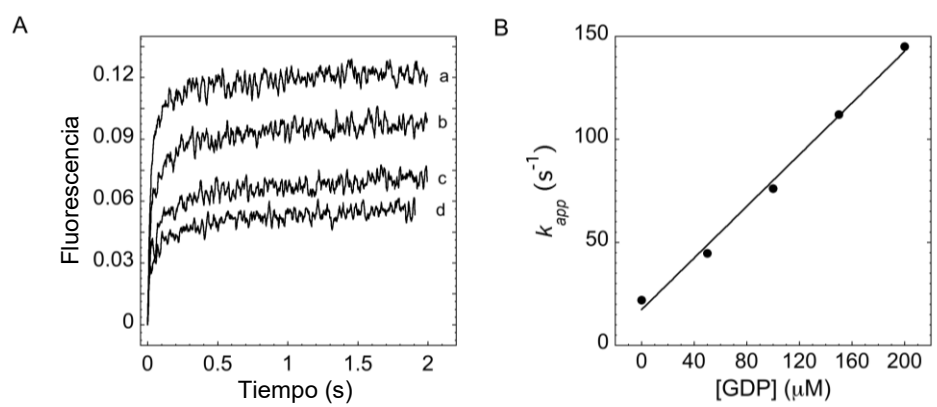


Figura 24. Cinética de unión por competencia de GDP con Efl1 mant-GDP. (A) Asociación de mant-GDP a Efl1 en presencia de concentraciones crecientes del nucleótido natural GDP: 0  $\mu M$  GDP (a), 50  $\mu M$  GDP (b), 150  $\mu M$  GDP (c), 200  $\mu M$  GDP (d). (B) Dependencia de las constantes aparentes de asociación de Efl1 con respecto a la concentración de GDP.

El grupo mant en los análogos fluorescentes de guanina no interfiere en la interacción con Efl1. Esto se comprobó con ensayos de desplazamiento con los nucleótidos naturales. En estos experimentos se sigue el apagamiento de la señal de fluorescencia por el desplazamiento del mant-nucleótido con el nucleótido natural y el efecto se evaluó mediante el desplazamiento del mant-GDP con GDP. Los datos se ajustaron a una función doble exponencial para la determinación de las constantes cinéticas de disociación (Figura 24). La constante de velocidad aparente se ajustó a una dependencia lineal en función de la concentración de GDP. El valor de la pendiente,  $0.63 \pm 0.03 \mu M^{-1} s^{-1}$ , corresponde a la constante de velocidad bimolecular de unión por GDP, que coincide, tomando en cuenta el

margen de error experimental, con la constante de velocidad de asociación de mant-GDP,  $0.9 \pm 0.05 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  considerando un mecanismo de reacción en dos pasos. Por lo que, la adición del fluoróforo mant a GDP no modifica la unión a Efl1.

#### **6.4.2.2 Efecto de Sdo1 en la interacción de Efl1 con nucleótidos de guanina**

La obtención de las constantes de velocidad para la interacción de Efl1 previamente unida a Sdo1 con los nucleótidos de guanina nos permitió profundizar el efecto de esta proteína en la unión. La unión de Efl1 a mant-GDP en presencia de Sdo1 presentó una constante de disociación de  $620 \mu\text{M}$ , 60 veces más grande que para Efl1 libre. Por lo que la interacción de Efl1 con Sdo1 disminuye drásticamente la unión a mant-GDP, principalmente por el aumento de ambas constantes de velocidad de disociación que favorecen la liberación de mant-GDP. Las constantes de velocidad de disociación aumentaron casi 4 y 8 veces en presencia de Sdo1, comparado con los valores de  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$  en su ausencia, respectivamente (Tabla 4). Si bien el efecto de Sdo1 es modesto respecto a lo reportado para otras proteínas efectores de GTPasas, donde la  $k_{-2}$  se modifica dos hasta cinco órdenes de magnitud ([72], [73] y [74]), aproximadamente, este resultado sugiere que Sdo1 actúa como un factor intercambiador de nucleótido (GEF), facilitando la liberación de GDP y la subsecuente asociación con GTP. En presencia de Sdo1, la unión de Efl1 por mant-GTP no fue alterada ( $Kd = 231 \pm 93$ ) y las correspondientes constantes microscópicas de velocidad de reacción se encuentran en la misma magnitud, considerando que la diferencia entre los valores se encuentra dentro del límite del error experimental. Esto sugiere que Sdo1 no tiene efecto en la interacción de Efl1 con GTP. El complejo Efl1-Sdo1 tiene una afinidad mayor a GTP que a GDP (Figura 25, Tabla 4) y considerando las concentraciones celulares promedio de nucleótidos de guanina [75], los equilibrios se verían modificados tal que habría 8 veces más complejo ternario Efl1•Sdo1•GTP que el formado por GDP. De este modo, Sdo1 favorece la conformación activa T de Efl1 alterando los equilibrios de unión al pasar de un estado en el que Efl1 está unida a GDP cuando se encuentra libre, mientras que se favorece la unión a GTP en presencia de Sdo1.

Adicionalmente, se ha determinado que la subunidad 60S actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) modificando la  $k_{cat}$  de Efl1 [27]. En conjunto esta información sugiere que Efl1 se une a la subunidad 60S, como un complejo ternario, con Sdo1 y GTP y de manera conjunta acoplan la hidrólisis de GTP con la liberación Tif6 de la superficie de la subunidad 60S. Tras la hidrólisis de GTP, el complejo Efl1-Sdo1-GDP se libera de la subunidad 60S y ocurre el intercambio de GDP por GTP acompañado de cambios conformacionales en Efl1, y tal vez también en Sdo1, aunque en esto no se evaluó en este trabajo. A pesar de que los datos anteriores sugieren que la unión a ambos nucleótidos va acompañada de cambios conformacionales sin importar que Efl1 se encuentre libre o unida a Sdo1, no es posible establecer la naturaleza de dichos cambios conformacionales, o si son equivalentes. En la Figura 25 se esquematiza el mecanismo de reacción de Efl1 con su sustrato (GTP), el producto (GDP), la proteína efectora Sdo1 y  $Mg^{2+}$ .

#### **6.4.2.3 Efecto de los iones magnesio en la unión de Efl1 con los nucleótidos de guanina**

La unión de Efl1 a nucleótidos de guanina en ausencia de iones  $Mg^{2+}$  mostró que estos no son necesarios para que ocurra la interacción, y no modifican el modo de esta última, ya que para ambos nucleótidos se obtuvieron curvas temporales que también se ajustan a un modelo de reacción de dos pasos. Se determinó una  $K_d$  de 2 y 240  $\mu M$ , para mant-GDP y mant-GTP respectivamente. Estos valores indican que en ausencia de  $Mg^{2+}$  la afinidad de mant-GDP a Efl1 aumentó aproximadamente 6 veces por una ligera disminución en ambas constantes de velocidad de disociación (Tabla 4). En el caso del efecto en la unión a GTP, la afinidad disminuyó ligeramente presentando con una constante de disociación de 240  $\mu M$  (171  $\mu M$  en presencia de  $Mg^{2+}$ ). Este pequeño cambio se atribuyó a una disminución en casi un orden de magnitud en la velocidad de disociación del nucleótido compensado por un aumento en la velocidad con la que ocurre el cambio conformacional. La mayoría de las GTPasas unen a los nucleótidos de guanina a través de los motivos estructurales switch I y switch II que contacta al  $\gamma$ -fosfato de GTP. Además, el switch II contiene una treonina conservada que coordina al ion  $Mg^{2+}$  que estabiliza a los fosfatos  $-\beta$ - y  $-\gamma$  del nucleótido. Por lo que

en ausencia de iones  $Mg^{2+}$  es posible que el switch II sea más flexible y se vea reflejado en la ligera disminución de la afinidad de Efl1 por GTP. El requerimiento de los iones  $Mg^{2+}$  entre las proteínas G es muy variado, y una disminución en la afinidad por el sustrato en ausencia de iones magnesio ya se ha observado en proteínas G de traducción tales como EF-Tu y eRF3 [59, 76].

#### **6.4.2.4 Interacción de Efl1 con el análogo no hidrolizable GppNHp**

El GppNHp es un análogo no hidrolizable de GTP ocupado en estudios estructurales y de función de GTPasas. La unión de GppNHp a Efl1 se comparó con la de GTP. La  $K_d$  de GppNHp fue de 3.6 más grande que aquella por GTP (Tabla 4), sugiriendo que la unión es más débil por el análogo comparado con el sustrato natural. Aunque la diferencia de estos valores puede no ser significativa, las constantes de velocidad de disociación para ambos pasos de reacción (la unión y el cambio conformacional) son de 10 y 20 veces más grandes por GppNHp. Esto sugiere que la menor afinidad de Efl1 por el análogo se debe a una liberación más rápida. Por lo que se deduce que GTP y GppNHp deben de unirse a Efl1 de maneras diferentes, y por tanto GppNHp no emula la unión de GTP a Efl1. Cabe mencionar que GppNHp se asemeja al comportamiento de GDP en presencia de Sdo1, tanto en los experimentos al equilibrio como en los cinéticos (Tabla 3 y Tabla 4). Diversos estudios han demostrado que el GppNHp en ocasiones no emula la interacción de GTPasa-GTP. Puede ser posible que la unión de Efl1 a GppNHp adopte una conformación similar a la del complejo Efl1-Sdo1-GDP, donde los residuos de switch II sean incapaces de interactuar con el  $\gamma$ -fosfato de GppNHp [65].

Tabla 4. Constantes microscópicas de velocidad de la interacción entre Efl1 y mant-nucleótidos en presencia ó ausencia de Sdo1, con o sin iones  $Mg^{2+}$ .

Complejo	Nucleótido	$k_{+1}$ ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{+2}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{-2}$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ ( $\mu M$ )
Efl1	mant-GDP	$0.9 \pm 0.05$ ( $0.63 \pm 0.03$ ) <sup>a</sup>	$0.17 \pm 0.04$	$3.7 \pm 0.05$	$0.4 \pm 0.025$	$9.7 \pm 3$
Efl1•Sdo1	mant-GDP	$0.85 \pm 0.04$	$0.080 \pm 0.005$	$14 \pm 3$	$3 \pm 0.4$	$618 \pm 136$
Efl1	mant-GTP	$0.42 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.004$	$2.4 \pm 0.7$	$0.6 \pm 0.1$	$171 \pm 93$
Efl1•Sdo1	mant-GTP	$0.36 \pm 0.021$	$0.05 \pm 0.002$	$5.2 \pm 1.3$	$0.8 \pm 0.2$	$231 \pm 93$
Efl1	mant-GppNHp	$0.85 \pm 0.012$	$0.5 \pm 0.03$	$45 \pm 7$	$6.4 \pm 2$	$677 \pm 151$
Efl1(- $Mg^{2+}$ )	mant-GDP	$1.3 \pm 0.01$	$0.4 \pm 0.05$	$3.1 \pm 0.04$	$0.32 \pm 0.04$	$1.9 \pm 0.3$
Efl1(- $Mg^{2+}$ )	mant-GTP	$0.25 \pm 0.002$	$0.026 \pm 0.003$	$0.34 \pm 0.2$	$4.6 \pm 0.04$	$240 \pm 67$

<sup>a</sup>Constante de velocidad de asociación bimolecular para GDP obtenida por ensayos de competición con mant-GDP.

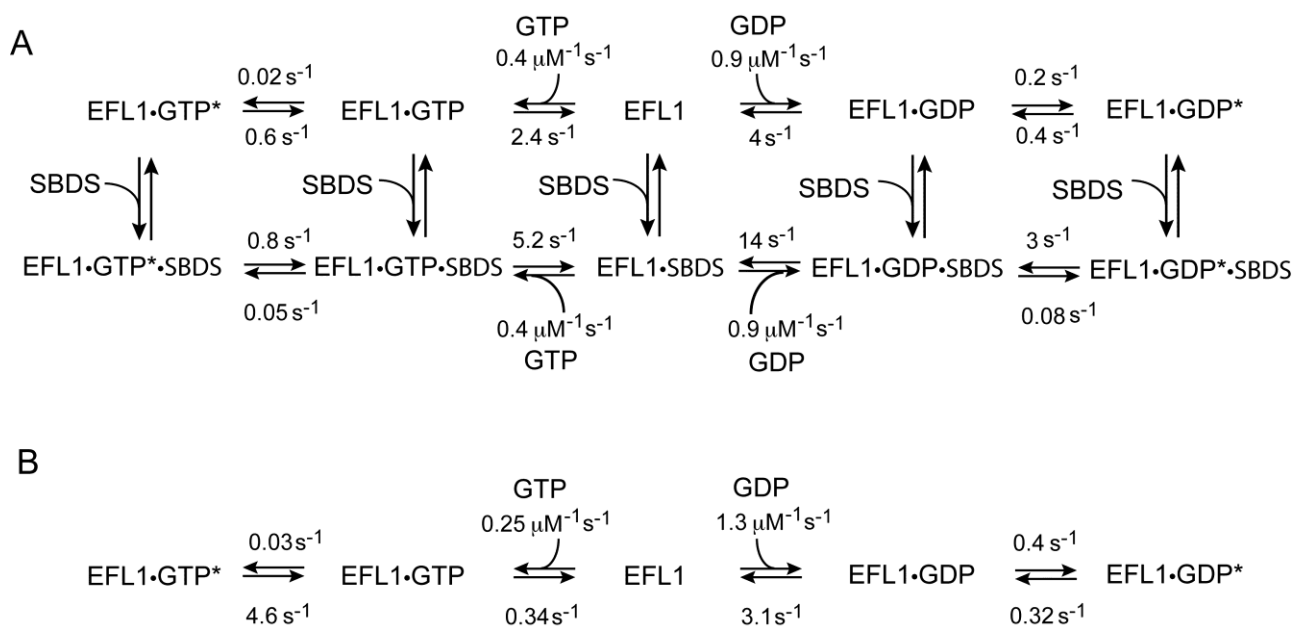


Figura 25. Esquema de la cinética de la interacción de Efl1 con nucleótidos de guanina. (A) en presencia de 5 mM  $Mg^{2+}$ . (B) en ausencia de  $Mg^{2+}$ .



## 7 Conclusiones

- La sobreexpresión recombinante del ortólogo humano EFTUD1 en *Saccharomyces cerevisiae* (BCY123) presentó un bajo rendimiento lo que complica su uso en estudios métodos biofísicos que requieren concentraciones altas de proteína.
- Los ortólogos humano y de levadura de EFL1 son marginalmente estables. Sus temperaturas de desnaturalización se encuentran cercanas a los 50°C, aunque el proceso de desnaturalización comienza a los 40°C.
- La proteína Efl1 presenta el fenómeno FRET entre el grupo mant de análogos fluorescentes de nucleótidos de guanina y los triptófanos de su sitio activo.
- La unión de Efl1 con nucleótidos de guanina ocurre mediante un mecanismo de reacción de dos pasos: interacción proteína-ligando seguido de un cambio conformacional derivado de la interacción (modelo de ajuste inducido)
- El análogo no hidrolizable GppNHp no emula la unión de Efl1 con GTP.
- Sdo1 es una biomolécula efectora de la GTPasa Efl1 actuando como un intercambiador de GDP, es decir es un GEF de Efl1.
- Los iones magnesio no son necesarios para a unión de los nucleótidos de guanina con Efl1, pero sí la favorece.
- La interacción de Sdo1 (SBDS en humanos) con Efl1 desplaza el equilibrio de la forma D de la Efl1 (inactiva) a la forma activa T unida a GTP.

## Bibliografía

- [1] Li G. Nano-inspired biosensors for protein assay with clinical applications. 1st edition. ed. Cambridge, MA: Elsevier; 2018.
- [2] Fischer E. The influence of configuration on enzyme activity. *Dtsch Chem Ges.* 1894;27:2984-93 (Translated from German).
- [3] Koshland DE. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1958;44:98-104.
- [4] Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *Journal of molecular biology.* 1965;12:88-118.
- [5] Tobi D, Bahar I. Structural changes involved in protein binding correlate with intrinsic motions of proteins in the unbound state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102:18908-13.
- [6] Wilkinson KD. Quantitative analysis of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol.* 2004;261:15-32.
- [7] Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* 1994;370:621-8.
- [8] Lin J, Nicastro D. Asymmetric distribution and spatial switching of dynein activity generates ciliary motility. *Science.* 2018;360.
- [9] Eccleston JF, Martin SR, Schilstra MJ. Rapid kinetic techniques. *Methods in cell biology.* 2008;84:445-77.
- [10] Amaral M, Kokh DB, Bomke J, Wegener A, Buchstaller HP, Eggenweiler HM, et al. Protein conformational flexibility modulates kinetics and thermodynamics of drug binding. *Nat Commun.* 2017;8:2276.
- [11] Halford SE. Escherichia coli alkaline phosphatase. An analysis of transient kinetics. *The Biochemical journal.* 1971;125:319-27.
- [12] Pollard TD. A guide to simple and informative binding assays. *Molecular biology of the cell.* 2010;21:4061-7.
- [13] Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta.* 2005;1751:119-39.
- [14] Venyaminov SY, Yang JT. Determination of protein secondary structure. In: Fasman GD, editor. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules.* New York: Plenum Press; 1996. p. 69-107.
- [15] Strickland EH. Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Crit Rev Biochem.* 1974;2:113-75.
- [16] Celej MS, Montich GG, Fidelio GD. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein science : a publication of the Protein Society.* 2003;12:1496-506.
- [17] Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature protocols.* 2006;1:2527-35.
- [18] Ghisaidoobe AB, Chung SJ. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International journal of molecular sciences.* 2014;15:22518-38.
- [19] Hiratsuka T. New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochimica et biophysica acta.* 1983;742:496-508.
- [20] Manser E, Leung T. *GTPase protocols : the Ras superfamily.* Totowa, N.J.: Humana Press; 2002.

- [21] Sutherland W. LXXV. A dynamical theory of diffusion for nonelectrolytes and the molecular mass of albumin. *Philos Mag Ser.* 1905;6(9):781–5.
- [22] Berne BJ, Pecora R. *Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics.* Dover ed. Mineola, N.Y.: Dover Publications; 2000.
- [23] Bohinski RC. *Modern concepts in biochemistry.* 5th ed. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall; 1993.
- [24] Senger B, Lafontaine DL, Graindorge JS, Gadal O, Camasses A, Sanni A, et al. The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Molecular cell.* 2001;8:1363-73.
- [25] Becam AM, Nasr F, Racki WJ, Zagulski M, Herbert CJ. 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 Genomics.* 2001;266:454-62.
- [26] Graindorge JS, Rousselle JC, Senger B, Lenormand P, Namane A, Lacroute F, et al. Deletion of EFL1 results in heterogeneity of the 60 S GTPase-associated rRNA conformation. *Journal of molecular biology.* 2005;352:355-69.
- [27] Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, Drynan LF, Goyenechea B, Menne TF, et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes & development.* 2011;25:917-29.
- [28] Gartmann M, Blau M, Armache JP, Mielke T, Topf M, Beckmann R. Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285:14848-51.
- [29] Weis F, Giudice E, Churcher M, Jin L, Hilcenko C, Wong CC, et al. Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22:914-9.
- [30] Garcia-Marquez A, Gijsbers A, de la Mora E, Sanchez-Puig N. Defective Guanine Nucleotide Exchange in the Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase by Mutations in the Shwachman-Diamond Syndrome Protein. *The Journal of biological chemistry.* 2015;290:17669-78.
- [31] Gijsbers A, Garcia-Marquez A, Luviano A, Sanchez-Puig N. Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Shwachman-Diamond syndrome. *Biochemical and biophysical research communications.* 2013;437:349-54.
- [32] Luviano A, Cruz-Castaneda R, Sanchez-Puig N, Garcia-Hernandez 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.
- [33] Lee S, Shin CH, Hong CR, Kim J-D, Kim A-R, Lee J, et al. Somatic uniparental disomy with a rare EFL1 variant causes Shwachman-Diamond syndrome through dysregulating ribosomal protein synthesis. 2018:483362.
- [34] Stepensky P, Chacon-Flores M, Kim KH, Abuzaitoun O, Bautista-Santos A, Simanovsky N, 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.* 2017.
- [35] Tan QKG, Cope H, Spillmann RC, Stong N, Jiang Y-H, McDonald MT, et al. Further evidence for the involvement of EFL1 in a Shwachman-Diamond-like syndrome and expansion of the phenotypic features. *Cold Spring Harbor molecular case studies.* 2018;4:a003046.
- [36] Nakhoul H, Ke J, Zhou X, Liao W, Zeng SX, Lu H. Ribosomopathies: mechanisms of disease. *Clin Med Insights Blood Disord.* 2014;7:7-16.
- [37] Kallstrom G, Hedges J, Johnson A. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Molecular and cellular biology.* 2003;23:4344-55.

- [38] Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature genetics*. 2003;33:97-101.
- [39] Boocock GR, Marit MR, Rommens JM. Phylogeny, sequence conservation, and functional complementation of the SBDS protein family. *Genomics*. 2006;87:758-71.
- [40] Gijsbers A, Montagut DC, Mendez-Godoy A, Altamura D, Saviano M, Siliqi D, et al. Interaction of the GTPase Elongation Factor Like-1 with the Shwachman-Diamond Syndrome Protein and Its Missense Mutations. *International journal of molecular sciences*. 2018;19.
- [41] Siliqi D, Foadi J, Mazzorana M, Altamura D, Méndez-Godoy A, Sánchez-Puig N. Conformational Flexibility of Proteins Involved in Ribosome Biogenesis: Investigations via Small Angle X-ray Scattering (SAXS). 2018;8:109.
- [42] Ng CL, Waterman DG, Koonin EV, Walters AD, Chong JPJ, Isupov MN, et al. Conformational flexibility and molecular interactions of an archaeal homologue of the Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein. *BMC structural biology*. 2009;9:32-.
- [43] Savchenko A, Krogan N, Cort JR, Evdokimova E, Lew JM, Yee AA, et al. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:19213-20.
- [44] Hauryliuk VV. [GTPases of prokaryotic translational apparatus]. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2006;40:769-83.
- [45] Karbstein K. Role of GTPases in ribosome assembly. *Biopolymers*. 2007;87:1-11.
- [46] Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews*. 2013;93:269-309.
- [47] Hauryliuk V, Hansson S, Ehrenberg M. Cofactor dependent conformational switching of GTPases. *Biophysical journal*. 2008;95:1704-15.
- [48] Raw AS, Coleman DE, Gilman AG, Sprang SR. Structural and biochemical characterization of the GTPgammaS-, GDP.Pi-, and GDP-bound forms of a GTPase-deficient Gly42 --> Val mutant of Galpha1. *Biochemistry*. 1997;36:15660-9.
- [49] Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294:1299-304.
- [50] Stiegler AL, Boggon TJ. PseudoGTPase domains in p190RhoGAP proteins: a mini-review. *Biochemical Society transactions*. 2018;46:1713-20.
- [51] Pai EF, Krengel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *The EMBO journal*. 1990;9:2351-9.
- [52] Gijsbers A, Nishigaki T, Sanchez-Puig N. Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Protein-protein Interactions. *J Vis Exp*. 2016.
- [53] Asano N, Atsuumi H, Nakamura A, Tanaka Y, Tanaka I, Yao M. Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;443:1251-6.
- [54] Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA, Perez-Iratxeta C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*. 2012;80:374-81.
- [55] Dalmas B, Bannister WH. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra: an attempt to solve the problem of the best-fitting reference protein subsets. *Analytical biochemistry*. 1995;225:39-48.
- [56] Stryer L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *Journal of molecular biology*. 1965;13:482-95.
- [57] Matulis D, Lovrien R. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophysical journal*. 1998;74:422-9.

- [58] M. Kubista RS, S. Eriksson, B. Albinsson. Experimental correction for inner-filter effect in fluorescence spectra *The Analyst*. 1994;119:417-9.
- [59] Pisareva VP, Pisarev AV, Hellen CU, Rodnina MV, Pestova TV. Kinetic analysis of interaction of eukaryotic release factor 3 with guanine nucleotides. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:40224-35.
- [60] Record MT, Jr., Anderson CF, Mills P, Mossing M, Roe JH. Ions as regulators of protein-nucleic acid interactions in vitro and in vivo. *Adv Biophys*. 1985;20:109-35.
- [61] Woody RW. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur Biophys J*. 1994;23:253-62.
- [62] Sprecher CA, Johnson WC, Jr. Circular dichroism of the nucleic acid monomers. *Biopolymers*. 1977;16:2243-64.
- [63] Wilden B, Savelsbergh A, Rodnina MV, Wintermeyer W. Role and timing of GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent tRNA translocation on the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:13670-5.
- [64] Paleskava A, Konevega AL, Rodnina MV. Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287:27906-12.
- [65] Hauriyluk V, Zavialov A, Kisselev L, Ehrenberg M. Class-1 release factor eRF1 promotes GTP binding by class-2 release factor eRF3. *Biochimie*. 2006;88:747-57.
- [66] Traut TW. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and cellular biochemistry*. 1994;140:1-22.
- [67] Karbstein K, Jonas S, Doudna JA. An essential GTPase promotes assembly of preribosomal RNA processing complexes. *Molecular cell*. 2005;20:633-43.
- [68] Lin B, Covalle KL, Maddock JR. The *Caulobacter crescentus* CgtA protein displays unusual guanine nucleotide binding and exchange properties. *Journal of bacteriology*. 1999;181:5825-32.
- [69] García Márquez A. Estudios de la fosforilación en la familia de GTPasas EFTUD1/EFL1. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
- [70] Gianni S, Dogan J, Jemth P. Distinguishing induced fit from conformational selection. *Biophysical Chemistry*. 2014;189:33-9.
- [71] Fischer JJ, Coatham ML, Bear SE, Brandon HE, De Laurentiis EI, Shields MJ, et al. The ribosome modulates the structural dynamics of the conserved GTPase HflX and triggers tight nucleotide binding. *Biochimie*. 2012;94:1647-59.
- [72] Goody RS, Hofmann-Goody W. Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur Biophys J*. 2002;31:268-74.
- [73] Gromadski KB, Schummer T, Stromgaard A, Knudsen CR, Kinzy TG, Rodnina MV. Kinetics of the interactions between yeast elongation factors 1A and 1B $\alpha$ , guanine nucleotides, and aminoacyl-tRNA. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:35629-37.
- [74] Gromadski KB, Wieden HJ, Rodnina MV. Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry*. 2002;41:162-9.
- [75] Traut TW. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and cellular biochemistry*. 1994;140:1-22.
- [76] Arai KI, Kawakita M, Kaziro Y. Studies on polypeptide elongation factors from *Escherichia coli*. II. Purification of factors Tu-guanosine diphosphate, Ts, and Tu-Ts, and crystallization of Tu-guanosine diphosphate and Tu-Ts. *The Journal of biological chemistry*. 1972;247:7029-37.