



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS DEL RECONOCIMIENTO DE NUCLEÓTIDOS DE GUANINA POR LA
GTPASA RIBOSOMAL LSG1/KRE35

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JULIANA JARAMILLO RAMÍREZ

DOCTORA NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme sus puertas y permitirme crecer en ella.

Al financiamiento otorgado para la realización de este trabajo en los proyectos CONACyT 283909 “Escrutinio de moléculas orgánicas pequeñas contra la GTPasa EFL1 como blanco en el Síndrome Shwachman-Diamond” y PAPIIT-DGAPA IG200218 “Estudios bioquímicos y estructurales de proteínas implicadas en la biomineralización de carbonato de calcio y silicio: implicaciones químico-biológicas y biomédicas”.

Al CONACyT por la beca número 603910 otorgada para realizar mis estudios de Doctorado.

A la Dra. Nuria Sánchez Puig por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo y ahora, sentirme orgullosa de ello.

Al Instituto de Química de la UNAM, por recibirme diariamente y brindarme herramientas para desarrollar mi trabajo.

A los Doctores Alejandro Sosa, Miguel Costas, Nina Pastor, Federico del Río, Amelia Farrés, Arturo Navarro, Roberto Arreguín y Patricia Cano, por contribuir al desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de grupo, que hicieron parte del día a día, que me enseñaron, aconsejaron y ayudaron cada vez que lo necesité.

A mi familia, por su confianza. A mis padres, Martha y Alfredo, siempre presentes, este trabajo es también un fruto de su infinito amor. A mi esposo, Alejandro, por recorrer este camino a mi lado, por levantar mi ánimo cada vez que fue necesario y por instarme a seguir. A mis hijos, Alana y Matías, por ser el motor de todo.

A las personas que de alguna manera han contribuido con el desarrollo de este trabajo.

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio 7 del Departamento de Química de Biomacromoléculas del **Instituto de Química** de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se publicó el artículo de investigación con resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto en la revista Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, con el título:

Characterisation of the interaction of guanine nucleotides with ribosomal GTPase Lsg1

Autores: Juliana Jaramillo-Ramírez, Nancy Marcial-Bazaldua y Nuria Sánchez-Puig

Año: 2021

Volumen: 1869

Número: 1

DOI: [10.1016/j.bbapap.2020.140538](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140538)



Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

Tutora

Alana y Matías, gracias por enseñarme que dar es recibir, por hacerme tan feliz cada día y por sus sonrisas, las más hermosas que jamás he visto.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1 ANTECEDENTES.....	2
1.1 Biogénesis Ribosomal.....	2
1.2 GTPasas, proteínas de unión a GTP o proteínas G	9
1.2.1 GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal	14
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3 PREGUNTAS A RESPONDER.....	21
4 HIPÓTESIS.....	22
5 OBJETIVOS.....	23
6 METODOLOGÍAS.....	24
6.1 Reactivos químicos, enzimas e insumos	24
6.2 Microorganismos.....	24
6.2.1 Levaduras	24
6.2.2 Bacterias.....	24
6.3 Medios de cultivo.....	25
6.4 Suplementos y aditivos	26
6.5 Disoluciones y amortiguadores.....	26
6.6 Procedimientos generales de Biología Molecular	29
6.6.1 Plásmidos de expresión	29
6.6.2 Aislamiento de DNA plasmídico de E. coli.....	29
6.6.3 Amplificación de secuencias codificantes.....	30
6.6.4 Restricción de DNA.....	31
6.6.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	32
6.6.6 Transformación de células bacterianas de E. coli con DNA plasmídico	32
6.6.7 Transformación de levaduras (<i>S. cerevisiae</i>) con DNA plasmídico ..	32
6.6.8 Clonación por el método de Gibson	33
6.6.9 Ligación de fragmentos de DNA.....	34
6.7 Procedimientos generales de bioquímica de proteínas	34

6.7.1	Purificación de proteínas.....	34
6.7.2	Medición de la concentración de proteína	35
6.7.3	Electroforesis de proteína desnaturizante SDS-PAGE	36
6.8	Obtención de subunidades ribosomales 60S.....	36
6.9	Caracterización Biofísica de Lsg1 libre y en complejo con la proteína Nmd3 y la subunidad 60S (Lsg1•Nmd3•60S).	37
6.9.1	Dicroísmo circular (CD).....	37
6.9.2	Fluorescencia.....	38
6.9.3	Cinética enzimática, determinación de los valores de K_m y k_{cat}	41
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1	Construcción de los plásmidos para la expresión recombinante de las proteínas Lsg1 y Nmd3	42
7.2	Purificación de proteínas recombinantes.....	44
7.2.1	Purificación de la proteína Lsg1	44
7.2.2	Purificación de la proteína Nmd3	45
7.3	Obtención de subunidades ribosomales 60S de <i>S. cerevisiae</i>	46
7.4	Contenido de estructura secundaria y estabilidad térmica evaluada mediante dicroísmo circular.....	48
7.5	Contenido de estructura terciaria evaluado mediante espectroscopía de fluorescencia.....	49
7.6	Unión de Lsg1 a nucleótidos de guanina evaluado mediante espectroscopía de fluorescencia en equilibrio	51
7.6.1	Interacción de Lsg1 libre con nucleótidos de guanina	51
7.6.2	Interacción de Lsg1 con nucleótidos de guanina en el complejo Lsg1•Nmd3•60S	58
7.7	Estudios de cinética enzimática de la GTPasa Lsg1	62
8	CONCLUSIONES	66
9	BIBLIOGRAFÍA.....	67
10	APÉNDICE	73
10.1	Oligonucleótidos.....	73

ABREVIATURAS

AMMP	2-amino-6-mercapto-7-metilpurina
Amp	Ampicilina
cpGTPasa	GTPasa circularmente permutada
BME	β -mercaptoetanol
Clor	Cloranfenicol
CD	Dicroísmo circular (por sus siglas en inglés “circular dichroism”)
dH ₂ O	Agua destilada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
rDNA	DNA Ribosomal
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Efl1	Acrónimo de la proteína “Elongation factor-like 1”
FRET	Transmisión de energía de resonancia o transferencia de energía de resonancia de Förster
GAPs	Proteínas activadoras de GTPasa (por sus siglas en inglés “GTPase activating proteins”)
GDP	Guanosín difosfato
GEFs	Factores intercambiadores de nucleótidos (por sus siglas en inglés “guanine nucleotide exchange factors”)
GSF	Factor estabilizador de GTP (por sus siglas en inglés “GTP stabilizing Factor”)
GTP	Guanosín trifosfato o guanosina-5'-trifosfato
GppNHp	Guanosín 5'-(β,γ -imido)-trifosfato
GTP γ S	Guanosín 5-O-(3-tiotrifosfato)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
Lsg1	Acrónimo de la proteína “Large subunit GTPase 1”
mantAMP	Mant-adenosín monofosfato o Mant-trifosfato de adenosina
Mant	N-metil-3'-O-antranoil
MCS	Sitio múltiple de clonación
MESG	2-amino-6-mercapto-7-metilpurin ribonucleósido

mantGDP	Mant- guanosín difosfato
mantGTP	Mant- guanosín trifosfato
NESs	Señal de exportación nuclear (por sus siglas en inglés “nuclear export signal”)
NLS	Secuencia de localización nuclear (por sus siglas en inglés “nuclear localization signal”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNP	Nucleósido fosforilasa de purinas
PR	Proteína ribosomal
PTC	Centro peptidil transferasa (por sus siglas en inglés “peptidyl transferase center”)
RNA	Del inglés ribonucleic acid
RNAPol I	RNA Polimerasa I
RNAPol II	RNA Polimerasa II
RNAPol III	RNA Polimerasa III
rRNA	RNA ribosomal
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scLsg1	Acrónimo de la proteína “Large subunit GTPase 1” de <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS PAGE	Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida
snoRNA	RNA pequeños nucleolares
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato
TEMED	Tetrametilendiamina
TEV	Tobacco etch virus

ESTUDIOS DEL RECONOCIMIENTO DE NUCLEÓTIDOS DE GUANINA POR LA GTPASA RIBOSOMAL LSG1/KRE35

RESUMEN

La biogénesis de ribosomas en eucariotas requiere la participación de varios factores de transactivación que están involucrados en la modificación, ensamblaje, transporte y vigilancia de la integridad de las subunidades ribosomales. Uno de estos factores es la GTPasa Lsg1, una proteína que actúa como factor de liberación para el adaptador de exportación Nmd3 y media la incorporación de la última proteína estructural uL16 (Rp110) en la presubunidad 60S. En este trabajo se caracterizó a la proteína Lsg1 recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* y se estudió su catálisis y propiedades de unión con nucleótidos de guanina. Se describió la interacción de Lsg1 con los nucleótidos de guanina para Lsg1 sola y en presencia de subunidades ribosomales 60S y de la proteína Nmd3 mediante espectroscopía de fluorescencia en equilibrio. En presencia de subunidades ribosomales 60S y Nmd3, la afinidad de Lsg1 por GTP aumenta cinco veces, mientras que por GDP incrementa 2.8 veces; por lo que la subunidad ribosomal y Nmd3 actúan como factores estabilizadores de GTP (GSF por sus siglas en inglés) para Lsg1. Además, Lsg1 sufre diferentes cambios conformacionales según el compañero de unión o los nucleótidos de guanina con los que interactúa. Los ensayos de fluorescencia indicaron que Lsg1 tiene una mayor afinidad por GTP que por GDP, lo que sugiere que en el citoplasma celular existe principalmente unida a sustrato. Se estudió también la catálisis de Lsg1 en estado estacionario que demostró una hidrólisis de GTP lenta con valores de k_{cat} de 1 min^{-1} y K_m de $34 \mu\text{M}$.

1 ANTECEDENTES

1.1 Biogénesis Ribosomal

Los ribosomas son grandes complejos macromoleculares encargados de la traducción del RNA mensajero (mRNA) a proteínas; por lo tanto, son indispensables para la viabilidad celular. La biosíntesis de ribosomas en las células es un proceso altamente regulado y está vinculado con otros procesos fundamentales como el crecimiento y la división celular (Thomson et al. 2013). La estructura general y función de los ribosomas están universalmente conservados. Estructuralmente consisten en dos subunidades compuestas por RNA ribosomal (rRNA) y proteínas ribosomales. En eucariontes la subunidad mayor 60S y la menor 40S (50S y 30S en procariontes) se asocian para formar el complejo 80S (70S en procariontes) traduccionalmente competente. En levadura la subunidad mayor 60S contiene tres rRNAs (25S, 5.8S y 5S) y 46 proteínas ribosomales y la subunidad menor 40S está compuesta por un solo rRNA (18S) y 33 proteínas ribosomales (Panse & Weirich 2016). Funcionalmente la subunidad 60S es la encargada de realizar la actividad peptidil transferasa, es decir la transferencia peptídica que media la formación del enlace peptídico, y la subunidad 40S decodifica la información contenida en el mRNA.

La biogénesis de estos enormes complejos ribonucleoprotéicos, a pesar de ser una tarea crítica y demandante de energía, es altamente eficiente considerando que una célula posee cerca de 200,000 ribosomas generados en 100 min, que pueden ocupar hasta el 40 % del volumen citoplasmático y que en un estado de crecimiento rápido en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) el 60 % de la transcripción está relacionada con los rRNAs. La célula entonces produce en promedio 2,000 ribosomas por minuto (Warner 1999), razón por la cual debe sintetizar alrededor de 160,000 proteínas ribosomales nuevas por minuto (Pausch et al. 2015).

Nuestro conocimiento de la biogénesis ribosomal y los factores que intervienen en el proceso proviene principalmente de estudios realizados en la levadura *S. cerevisiae* (Pausch et al. 2015). En las células de levadura además de los cuatro rRNAs y las 79 proteínas ribosomales que componen el ribosoma, la maduración de las subunidades 60S y 40S requiere de ~70 RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs por sus siglas en inglés) y de más de 200 factores de transactivación, entre los que se encuentran exo y endonucleasas, metiltransferasas, RNA helicasas, ATPasas y GTPasas (Weis et al. 2014). Este conjunto de factores de transactivación está envuelto en el procesamiento y plegamiento de rRNA, así como en la asociación de proteínas ribosomales, ensamblaje, transporte, vigilancia y control de la integridad de las

presubunidades durante la producción de los ribosomas, funciones que realiza en diferentes etapas de la biogénesis ribosomal (Figura 1) (Ma et al. 2016).

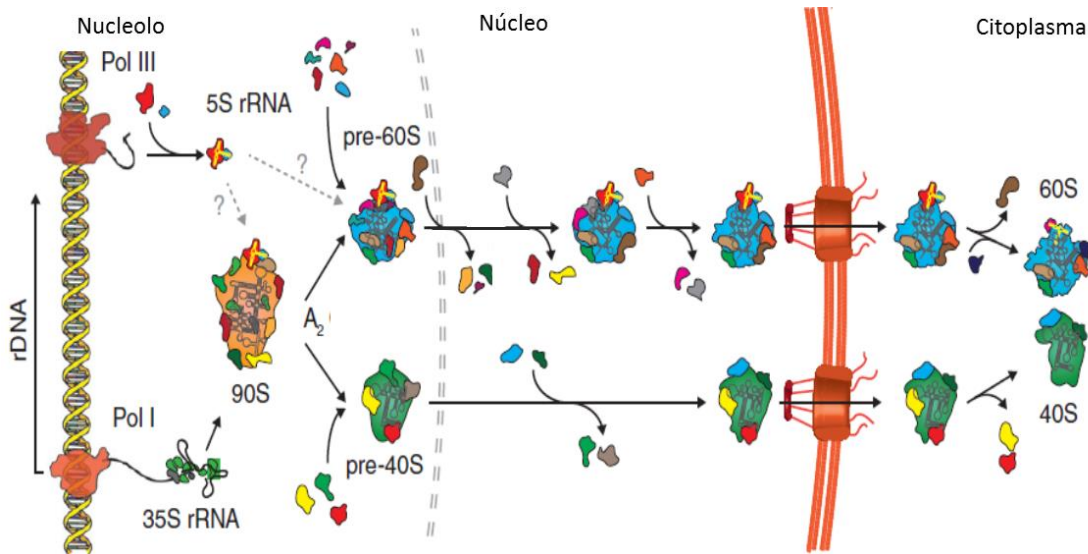


Figura 1. Esquema de la biogénesis ribosomal en eucariontes. El proceso comienza en el nucleolo con la transcripción de los cuatro rRNAs; allí al transcrito primario se añaden proteínas cotranscricionalmente formándose la partícula conocida como 90S. Esta partícula es escindida generando las presubunidades 60S y 40S que siguen rutas diferentes de maduración. El proceso continúa en el núcleo y finaliza en el citoplasma e involucra en conjunto la síntesis, modificación, ensamblaje y transporte de los cuatro rRNAs y las 79 proteínas ribosomales que finalmente conforman el ribosoma maduro; tomado de (Panse & Weirich 2016).

La biogénesis ribosomal se inicia en el nucleolo con la transcripción del DNA ribosomal (rDNA). La RNAPol I genera un solo transcrito policistrónico, el pre rRNA 35S (47S en humanos) mientras de manera independiente la RNAPol III transcribe el rRNA 5S, el cual posteriormente se une a la pre-60S en el núcleo (Weis et al. 2014). A medida que el transcrito primario 35S emerge del ribosoma los snoRNAs median modificaciones covalentes como metilación y pseudouridilación sobre alrededor de 100 bases de rRNA; conforme ocurren estas modificaciones, proteínas tanto ribosomales como accesorias se asocian con el rRNA 35S dando origen a un complejo conocido como 90S, el primer precursor identificable. Este complejo es procesado por una serie de exo y endonucleasas que realizan diversos cortes sobre el pre-rRNA 35S para generar los rRNAs 25S, 18S y 5.8S que componen, junto con el 5S y las proteínas ribosomales a las subunidades mayor y menor del ribosoma. Este proceso descrito de ensamblaje inicial y procesamiento ocurre cotranscricionalmente (Nissan et al. 2002; Ting et al. 2017). Los mRNAs que codifican para las proteínas estructurales del ribosoma son transcritos

por la RNAPol II en el núcleo y trasladados al citoplasma donde son traducidos a proteínas, cuya gran mayoría son importadas al núcleo para ser ensambladas con los rRNAs (Ting et al. 2017).

Una vez que las presubunidades ribosomales 60S y 40S han alcanzado cierto estado de maduración, son exportadas al citoplasma de manera independiente. Debido a que sus dimensiones se encuentran en el rango de 20 nm tienen que ser transportadas por medio de transporte activo a través del complejo del poro nuclear, ya que su tamaño supera los límites de 9 nm que pueden difundirse de manera pasiva (Dingwall & Laskey 1986). La incorporación de factores de exportación media el paso de las subunidades a través del canal central hidrofóbico del complejo del poro nuclear. Se ha identificado a la carioferina Crm1 (Xpo1 o exportina-1) como el factor de exportación más importante de las dos subunidades ribosomales. Crm1 reconoce moléculas que poseen una señal de exportación nuclear rica en leucinas o NES (por sus siglas en inglés "Nuclear Export Signal"), la cual es provista por la proteína Nmd3 incorporada en la subunidad ribosomal pre-60S mientras está aún en el nucleolo. La responsable de la direccionalidad del transporte es la GTPasa Ran mediante un gradiente RanGTP/RanGDP a través de la membrana nuclear. La partícula pre-60S intranuclear unida a la proteína Nmd3 es reconocida por la carioferina Crm1, la cual a su vez interacciona con la forma activa de la GTPasa Ran que facilita la exportación unidireccional al citoplasma de las subunidades pre-60S (Gadal et al. 2001; Hedges et al. 2005). No se conoce aún el mecanismo por el cual la subunidad 40S es exportada al citoplasma pues no se ha identificado aún la proteína que provee la señal de exportación nuclear. Además de Crm1, se han encontrado otros factores involucrados en la exportación de la subunidad pre-60S como son Mex67, Rrp12, Arx1, Ecm1, Bud20 y Npl3, y aunque ninguno de estos son factores esenciales, se cree que optimizan el proceso de exportación (Thomson et al. 2013).

Nmd3 es una proteína esencial de 59 KDa en la cual se han identificado cuatro dominios, el N-terminal o ZFD (por sus siglas en inglés "Zinc Finger Domain") es un dominio que posee motivos de unión a Zn^{+2} (CXXC); los residuos 155-310 constituyen el segundo dominio RBD encargado de la unión a RNA (nombrado así por sus siglas en inglés "RNA-Binding Domain") y está dividido en dos subdominios, RBDI y RBDII, que participan en el reconocimiento de rRNA; los residuos 311-400 comprenden el tercer dominio OB de unión a oligonucleótidos (por sus siglas en inglés "Oligonucleotide-Binding"); este dominio se encuentra tradicionalmente en proteínas ribosomales o factores de traducción; sin embargo, para el caso de Nmd3 no reconoce el rRNA 25S y en cambio interactúa con las proteínas ribosomales eL42 y uL1. Por último el dominio C-terminal, de aproximadamente 100 residuos, posee una secuencia de exportación nuclear (NES) y una secuencia de localización nuclear o NLS (por sus siglas en inglés "Nuclear

Localization Sequence”) característica que le permite desplazarse del núcleo al citoplasma y viceversa (Figura 2) (Ma et al. 2017). La eliminación de 50 aminoácidos en el C-terminal (469-518), región donde se encuentra la secuencia NES, reduce la exportación nuclear de Nmd3, resultando en un fenotipo de lento crecimiento. El efecto se ve intensificado al eliminar 100 aminoácidos, lo que sugiere la presencia de dos NESs en Nmd3. También se determinó que la NLS que permite a la proteína volver al núcleo se pierde al eliminar 120 aminoácidos del C-terminal, ocasionando la relocalización de la proteína al citoplasma. En eucariotas, los miembros de la familia de proteínas Nmd3 poseen en el extremo C-terminal una región básica seguida de un dominio hidrofílico y ácido (Ho et al. 2000; Gadai et al. 2001).

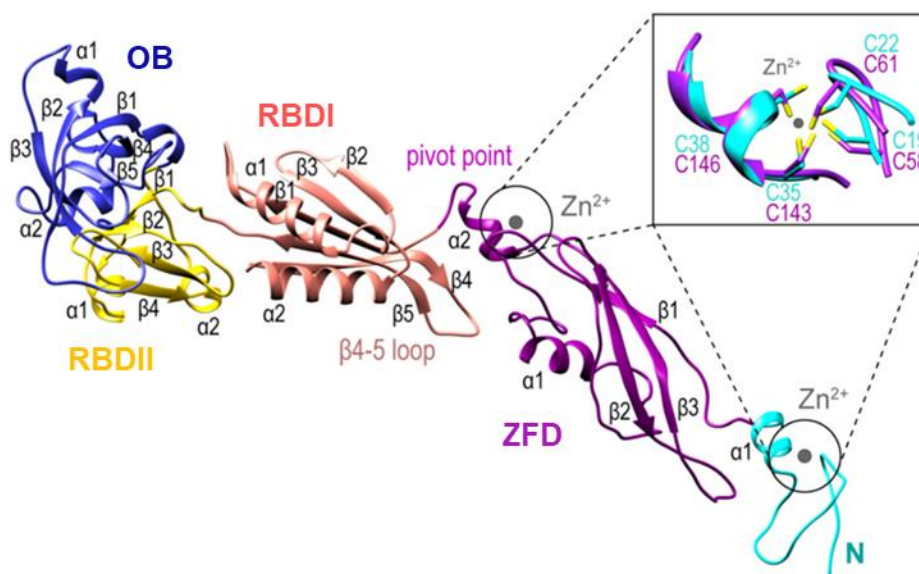


Figura 2. Estructura de la proteína Nmd3 de *S. cerevisiae*. Modelo atómico obtenido por cryo-EM de Nmd3 (PDB 6RZZ) (residuos T16-R404); se indican los dominios de Nmd3 nombrados por sus siglas en inglés: el dominio de unión a iones zinc, ZFD (zinc finger domain); el dominio de unión a RNA (RBD) dividido en dos subdominios RBDI y RBDII (RNA binding domain I y II); y el dominio OB (oligonucleotide binding domain). Tomado de (Kargas et al. 2019; Ma et al. 2017).

Se ha considerado que Nmd3 actúa como control de la integridad para las presubunidades 60S que son exportadas del núcleo, ya que reconoce la conformación casi madura del centro peptidil transferasa (PTC por sus siglas en inglés) y marca uno de los pasos finales de la maduración nuclear de la subunidad uniéndose a la carioferina encargada de la exportación (Ma et al. 2017). Una vez en el citoplasma la subunidad pre-60S aún mantiene unida a Nmd3 y al factor de antiasociación, Tif6. Estas proteínas no ribosomales deben ser liberadas en el citoplasma previo a la formación del ribosoma maduro y recicladas al núcleo, en donde

participan en subsecuentes ciclos de maduración. Este proceso es llevado a cabo por las GTPasas Lsg1 y Efl1 que actúan como factores de liberación para Nmd3 y Tif6 respectivamente. Para el caso de Efl1 la actividad de GTPasa es acoplada por la proteína Sdo1 (SBDS en mamífero) para promover la disociación del factor de anti-asociación Tif6 (eIF6 en mamífero) de la superficie de la subunidad pre-60S (Weis et al. 2015; Gijbers 2013; Finch et al. 2011); este es el último paso en la biogénesis ribosomal. Previa actividad de Efl1 se presenta la incorporación de la proteína ribosomal uL16 (Rpl10 acorde a la antigua nomenclatura) y la subsiguiente liberación de Nmd3 de la superficie de la subunidad ribosomal mayor. Este es un proceso dependiente de energía de hidrólisis de GTP mediado por la GTPasa Lsg1 (Figura 3) (Hedges et al. 2005). Alteraciones en la función de uL16 o Lsg1 evitan la liberación de Nmd3, impidiendo la unión de las dos subunidades posiblemente por impedimento estérico, ya que no se han encontrado proteínas Nmd3 ni Lsg1 en unidades 80S. Además la disponibilidad de Nmd3 en el núcleo disminuye debido a su relocalización en el citoplasma, ocasionando la acumulación de presubunidades recién sintetizadas en el núcleo (Hedges et al. 2005).

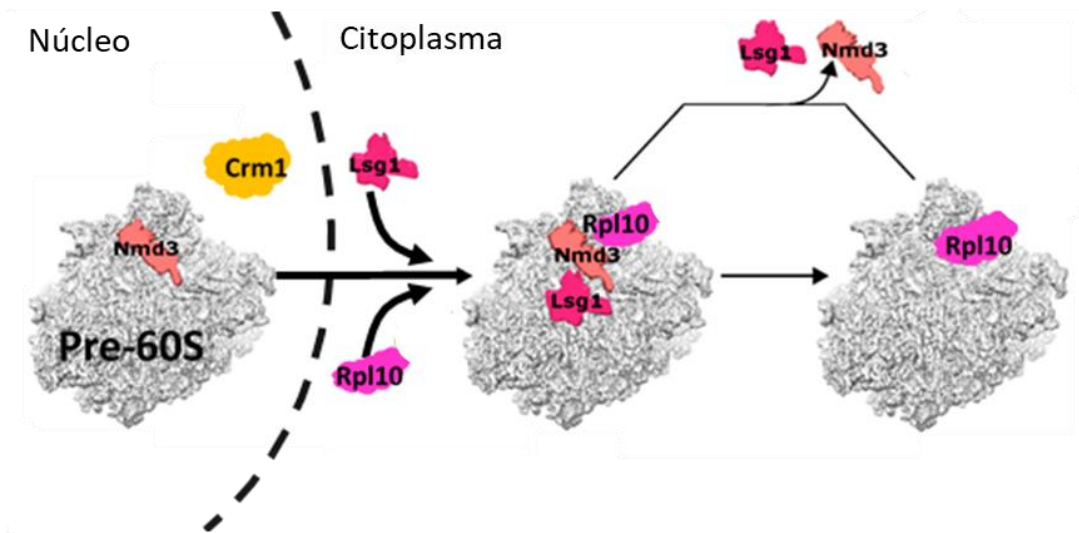


Figura 3. Modelo de la función de Lsg1 en la biogénesis ribosomal. La subunidad pre-60S es exportada del núcleo unida a Nmd3; una vez en el citoplasma uL16 (Rpl10) es incorporada en la subunidad y se da la liberación de Nmd3, ambos procesos mediados por la actividad catalítica de Lsg1. Adaptado de (Karbstein 2007; Ma et al. 2017).

La proteína ribosomal uL16 (Figura 4A) se localiza en una hendidura entre la protuberancia central y el centro de activación de GTPasas de la subunidad ribosomal 60S, donde interactúa con el rRNA 25S a lo largo de las hélices H38 y H89 (Figura 4B) (Pausch et al. 2015; Hofer et al. 2007). Las proteínas ribosomales son proteínas altamente básicas, y uL16 no es la excepción, ya que posee un extremo N-terminal básico. Las carioferinas y chaperonas pueden mantener la

estabilidad de las proteínas ribosomales enmascarando su naturaleza básica al neutralizar las cargas positivas no favorables y de esta manera facilitar su transporte, evitar interacciones indeseadas y promover su ensamblaje en las partículas preribosomales (Ting et al. 2017).

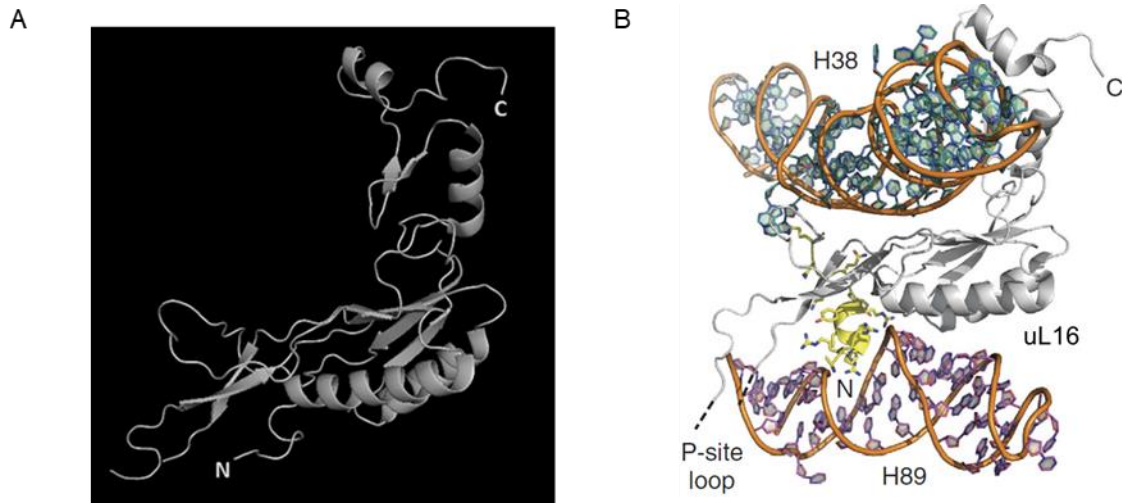


Figura 4. Proteína ribosomal uL16. (A) Modelo atómico de uL16 PDB 5T6R. (B) Esquema de la unión que se presenta entre uL16 y los sitios de interacción con la subunidad 60S madura, específicamente las hélices 38 y 89 del rRNA 25S. Tomado de (Pausch et al. 2015).

uL16 es reconocida cotranscripcionalmente por la chaperona Sqt1, cuya estructura está formada de ocho hélices con repeticiones múltiples WD (con estructura de hélice enrollada o beta-propela) que forman un disco con una superficie cargada negativamente. La superficie ácida de Sqt1 reconoce la extensión N-terminal altamente básica que precede el dominio globular de uL16; la unión es mediada por enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones entre regiones hidrofóbicas. Esta misma región que comprende el N-terminal de uL16 es la que se encuentra en el interior de la subunidad 60S y está en contacto con el rRNA 25S (Figura 5) (Pausch et al. 2015).

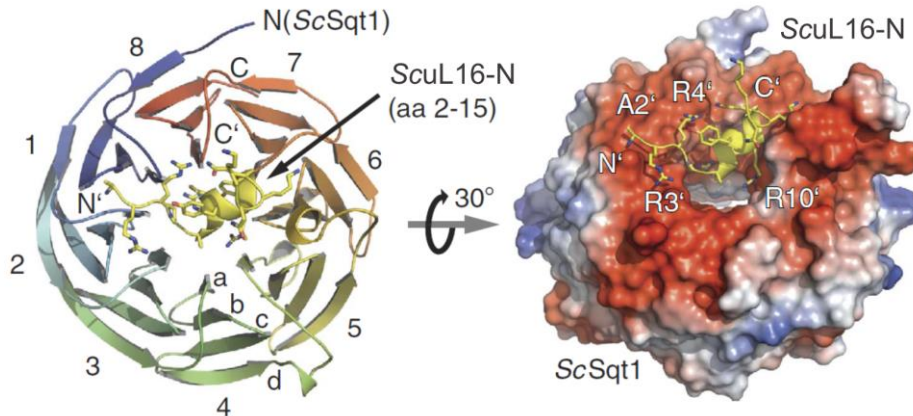


Figura 5. Proteína Sqt1 y su interacción con uL16. Estructura cristalina (izquierda) y representación de la superficie con propiedades electrostáticas (derecha) de *scSqt*, las superficies con carga negativa están en rojo y con carga positiva en azul. La hélice amarilla representa el N-terminal de uL16. Tomado de (Pausch et al. 2015).

Estudios sugieren que la actividad catalítica de la GTPasa Lsg1 es necesaria tanto para la incorporación de uL16 en la subunidad 60S como para la liberación de Nmd3 (Hedges et al. 2005). También se ha encontrado que un asa interna no estructurada altamente conservada en uL16 (residuos 102-112) cumple un rol dinámico en la liberación de Nmd3, pues mutaciones en esta asa afectan la liberación de Nmd3 (Hofer et al. 2007). Trabajos estructurales recientes indican que los sitios principales de unión de Nmd3, H38, H69 y H89, y de uL16, H38 y H89, están parcialmente superpuestos, y por esta razón las dos proteínas no pueden unirse al mismo tiempo con la mayor afinidad a la subunidad pre-60S. La unión inicial de la proteína uL16 origina una serie de rearrreglos en el ribosoma que desencadenan un desprendimiento parcial de Nmd3, promoviendo inicialmente una rotación de la hélice H38 que desbloquea el extremo C terminal de Nmd3. A su vez, el asa P de uL16 desplaza a Nmd3 hacia arriba generando un cambio conformacional de Nmd3 pues compiten por un sitio de unión superpuesto; este fenómeno dirige el equilibrio hacia la liberación de Nmd3, sin desprenderla completamente, pues su completa liberación de la presubunidad 60S requiere de la actividad GTPasa de Lsg1 (Kargas et al. 2019).

El proceso descrito de unión de la proteína uL16 y liberación de Nmd3 es uno de los últimos pasos de maduración de la subunidad ribosomal mayor en el citoplasma. Debido a la función esencial del ribosoma, un error en su estructura o en su vía de ensamblaje compromete la viabilidad de la célula. Las proteínas ribosomales son importantes tanto para el correcto ensamblaje del ribosoma, así como para mantener su estructura y función (de la Cruz et al. 2015). Si las proteínas ribosomales presentan mutaciones severas puede resultar en ribosomas no

funcionales y mutaciones menos graves pueden ocasionar defectos en su biogénesis o en la traducción. El número de defectos potenciales que pueden presentarse durante la biogénesis ribosomal es grande; sin embargo, las células poseen un sistema de vigilancia que vela por la correcta síntesis y función de los ribosomas, reconociendo las subunidades preribosomales anómalas y dirigiéndolas a degradación. Las subunidades preribosomales que se acumulan en el núcleo son degradadas por el exosoma, un complejo con actividad de exonucleasa, mientras que las subunidades defectuosas que escapan al control nuclear pueden ser degradadas en el citoplasma. Sin embargo, aún no está claro como el sistema de vigilancia identifica los posibles defectos (Thomson et al. 2013).

Los ribosomas son componentes indispensables de las células, razón por la cual conocer su mecanismo de acción y ruta de ensamblaje es de gran importancia tanto desde una perspectiva biológica como médica; en donde los ribosomas son blancos farmacológicos. De igual manera, estudios recientes han demostrado que defectos en la biogénesis de los ribosomas están asociados a varias enfermedades hereditarias. Una eficiencia baja de traducción o problemas con la fidelidad pueden desencadenar enfermedades relacionadas con deficiencias en la biogénesis ribosomal o en la función del ribosoma. Estas enfermedades son conocidas como ribosomopatías (Kressler et al. 2017; Nakhoul et al. 2014; Narla & Ebert 2010). Estas enfermedades presentan cuadros clínicos heterogéneos (incluso entre pacientes con la misma enfermedad), pero que comúnmente presentan fallas en la médula ósea, anormalidades esqueléticas y predisposición a desarrollar cáncer.

1.2 GTPasas, proteínas de unión a GTP o proteínas G

Las GTPasas, conocidas también como proteínas de unión a GTP o proteínas G, son una superclase de proteínas reguladoras universalmente conservadas que se encuentran dentro del dominio conocido como NTPasas con asa P (o P-loop NTPases) ya que poseen un asa de unión a fosfato (Karbstein 2007). Esta superclase está dividida en dos grandes clases según sus características estructurales y secuencia. La primera, denominada TRAFAC (por sus siglas en inglés “translation factors”), incluye enzimas involucradas en procesos celulares como traducción, transducción de señales, motilidad celular, transporte intracelular y biogénesis ribosomal. La segunda clase, denominada SIMIBY (por sus siglas “inglés de signal recognition particle, MinD y BioD”), formada

por las GTPasas de la partícula de reconocimiento de señal, ATPasas Mind-like y un grupo de proteínas con actividad de transferencia de fosfatos. Estas dos clases abarcan 20

familias que a su vez, de acuerdo a sus motivos conservados, características estructurales comunes o arquitectura de sus dominios están subdivididas en 57 subfamilias (Leipe et al. 2002).

Estructuralmente las GTPasas se caracterizan por poseer un dominio de unión a GTP o dominio G altamente conservado responsable de la unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina (Reynaud et al. 2005). El plegamiento del dominio G consta de seis hebras β y cinco hélices α intercaladas y se caracteriza por la presencia de cinco motivos G1-G5, de los cuales cuatro (G1-G4) están altamente conservados (Figura 6). Cada motivo interactúa de forma diferente con el nucleótido de guanina y cumple diferentes funciones en la unión e hidrólisis:

- G1 [GXXXXGK(S/T)] (Walker A o P-loop) es el motivo encargado de la unión a los fosfatos α y β del nucleótido (X hace referencia a cualquier amino ácido).
- G2 (switch I) coordina al ion Mg^{+2} , cofactor esencial para la hidrólisis de GTP que une a los fosfatos β y γ (Karbstein 2007); este motivo está altamente conservado en cada familia, pero difiere entre las distintas familias (Bourne et al. 1991). Un residuo de treonina o serina conservada es la responsable de coordinar al ion Mg^{+2} .
- G3 [DXXG] (Switch II o Walker B) está implicado en la coordinación del ion Mg^{+2} por medio de un aspartato y con la unión al fosfato γ por un puente de hidrógeno con un residuo de glicina. Contiene un residuo, a menudo glutamina o histidina, que contacta con la molécula de agua catalítica involucrada en la hidrólisis.
- G4 [(N/T)(K/Q)XD] es la región encargada de la especificidad de la GTPasa ya que se une al anillo de guanina.
- G5 [SA(K/L)] interactúa con la guanina indirectamente a través de puentes de hidrógeno; esta región presenta una baja conservación en las GTPasas involucradas en biogénesis ribosomal (Karbstein 2007).

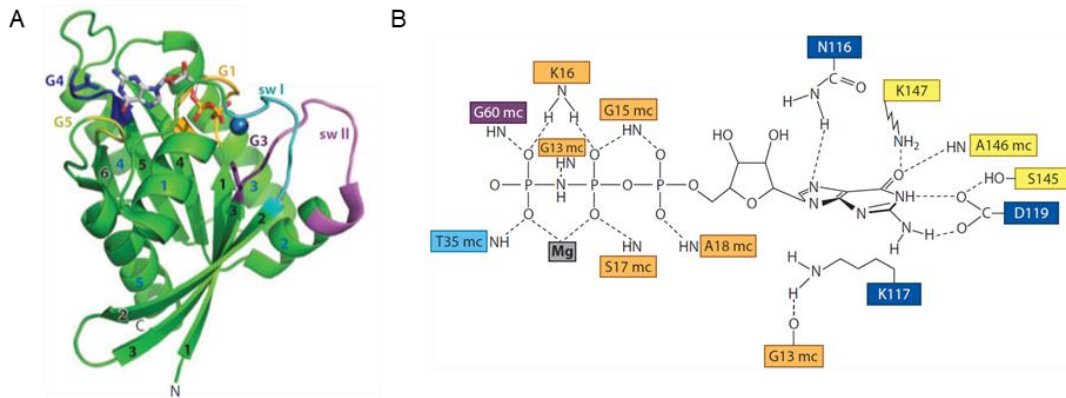


Figura 6. Características generales de proteínas de unión a GTP. (A) Estructura del dominio G de la GTPasa Ras unida a GppNHp, un análogo no hidrolizable de GTP, en presencia de Mg^{+2} . se indican los motivos G1-amarillo, G2-cian, G3-morado, G4-azul y G5-verde. (B) Esquema de las interacciones entre los diferentes motivos, altamente conservados en las GTPasas, del dominio G de la misma proteína con GppNHp. Tomado de (Wittinghofer & Vetter 2011).

Los motivos G2 y G3 son conocidos también como switch I y switch II respectivamente, por ser regiones flexibles que pueden llegar a sufrir grandes cambios conformacionales dependiendo del nucleótido con el que interaccionen, GDP o GTP. La hidrólisis del fosfato γ desencadena el cambio conformacional debido a la pérdida de la interacción por medio de puentes de hidrógeno con residuos de treonina en el switch I y de glicina en el switch II. De esta forma la hidrólisis del GTP produce la relajación de las dos regiones y ocasiona que la GTPasa adopte la conformación específica para GDP (Figura 7) (Wittinghofer & Vetter 2011; Petsco & Ringe 2014).

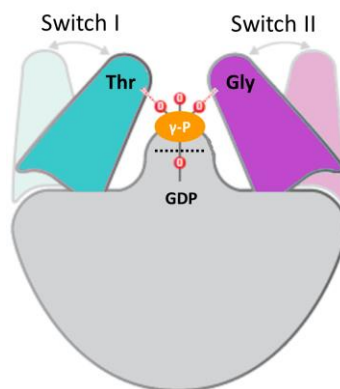


Figura 7. Diagrama esquemático del cambio conformacional que se presenta en los motivos switch I y switch II del dominio G de GTPasas como resultado de unión a GDP o GTP. El mecanismo de switch se encuentra conservado en las GTPasas e involucra la interacción entre el fosfato gamma (γ -P)

del GTP por medio de puentes de hidrógeno con los residuos de treonina y glicina ubicados dentro de los switch I y II respectivamente. Adaptado de (Petsco & Ringe 2014; Wittinghofer & Vetter 2011).

Existe controversia sobre el mecanismo por el cual se lleva a cabo la hidrólisis del GTP y sobre el origen del poder catalítico de las GTPasas. En general, se propone que una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico al fosfato γ y que la transferencia del protón puede producirse por un mecanismo bien sea, asociativo o disociativo, de manera directa o indirecta, con la asistencia de otra molécula de agua (Figura 8). La actividad catalítica de la proteína podría consistir en extraer el protón de la molécula de agua, en cuyo caso la función de un residuo en el switch II sería la de actuar como base. Para el caso de la GTPasa p21 ras en la cual se ha estudiado este mecanismo, se propone que la molécula de agua es activada por el oxígeno del grupo carbamoil de una glutamina; sin embargo, este residuo puede variar en otras GTPasas y en su lugar encontrarse un aminoácido con cadena alifática incapaz de cumplir con esta función (Gijsbers 2013; Pai et al. 1990). Otra ruta alternativa propuesta es la catálisis asistida por sustrato en donde el fosfato γ del GTP por sí mismo cumple el papel de base, abstrayendo un protón del agua, lo que genera la formación del ion hidroxilo, el cual realizaría un ataque nucleofílico sobre el mismo grupo fosfato γ protonado; en este mecanismo se forma un intermediario de reacción pentacoordinado (Leipe et al. 2002). Para este caso la función de la GTPasa sería estabilizar el estado de transición (Maracci et al. 2014).

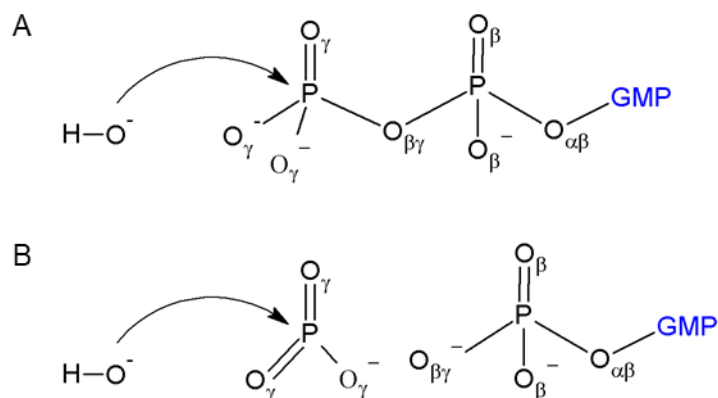


Figura 8. Mecanismos asociativo y disociativo para la hidrólisis de un éster de fosfato. (A) En el mecanismo asociativo el ataque del ion hidroxilo proveniente de la hidrólisis del agua es concertado con la ruptura del enlace $\text{P}_\gamma\text{-O}_{\beta\gamma}$. (B) En el mecanismo disociativo la ruptura previa del enlace $\text{P}_\gamma\text{-O}_{\beta\gamma}$ produce un intermediario que es atacado por el ion hidroxilo.

Por lo general las GTPasas monoméricas actúan como interruptores moleculares o switches, y oscilan entre tres estados: el estado activo si se encuentran unidas a GTP, inactivo

unidas a GDP (Maracci et al. 2014) y vacío. Las velocidades de hidrólisis de GTP y el intercambio de nucleótidos de estas proteínas pueden variar ampliamente (Maracci & Rodnina 2016).

Las GTPasas involucradas en procesos de traducción y biogénesis ribosomal por lo general unen nucleótidos de guanina débilmente, presentando valores aproximados de K_d entre 10^{-5} - 10^{-6} M (Pisareva et al. 2006; Verstraeten et al. 2011). Más aún, el paso del estado inactivo al activo se produce de manera muy lenta; por lo que en general estas GTPasas son reguladas por otras proteínas como las proteínas activadoras de GTPasa o GAPs (por sus siglas en inglés “GTPase activating proteins”) que estimulan la hidrólisis del GTP o por los factores intercambiadores de nucleótidos o GEFs (por sus siglas en inglés “guanine nucleotide exchange factors”) que favorecen el intercambio de GDP por GTP. Estos últimos pueden ser factores estabilizadores de GTP (GSF-por sus siglas en inglés “GTP Stabilizing Factor”) aumentando la afinidad por GTP, o favoreciendo la liberación de GDP en el caso de los estimuladores de disociación de nucleótidos de guanina (GDS-por sus siglas en inglés “Guanine nucleotide Dissociation Stimulator”) (Takakura et al. 2000; Maracci et al. 2014) (Figura 9).

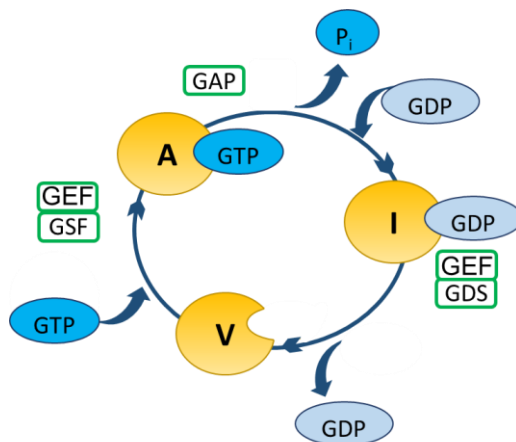


Figura 9. Ciclo catalítico de GTPasas y sus biomoléculas efectoras. El ciclo catalítico de GTPasa incluye tres estados indicados en círculos amarillos: uno activo unido a GTP (A), uno inactivo unido a GDP (I), y uno vacío (V). Las biomoléculas se muestran en recuadros verdes: proteína activadora de GTPasa (GAP) y factores intercambiadores de GTP (GEFs) los cuales incluyen a los factores estabilizadores de GTP (GSF) y a los estimuladores de disociación de nucleótidos de guanina (GDS) (Bourne et al. 1991).

La afinidad de las GTPasas por el ligando puede variar, en algunos casos como el de Bms1, se ha demostrado que la unión a GDP es más fuerte que la de GTP, lo suficiente para que la proteína permanezca en su estado inactivo, es decir unida a GDP, incluso a pesar de que las concentraciones intracelulares de GDP son menores que las de GTP (Traut 1994). Para Bms1 se encontró que la biomolécula efectora, Rcl1, aumentaba su afinidad por GTP, mientras

permanece constante su relación con GDP. Para otras GTPasas la unión al ribosoma produce el desplazamiento de afinidad hacia GTP, lo que conlleva a una preferencia de las proteínas por el estado activo (Karbstein 2007). El ribosoma además puede actuar como GAP; como es el caso del factor de elongación EF-Tu, cuando ésta GTPasa se une al ribosoma se estimula su actividad, incrementando su constante catalítica hasta seis ordenes de magnitud (Maracci & Rodnina 2016). Sin embargo, no todas las GTPasas necesitan la intervención de GEFs; se ha demostrado que para algunas, como el caso de Era, la liberación de GDP y la unión a GTP se producen rápidamente (Karbstein 2007).

1.2.1 GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal

Las GTPasas vinculadas a la biogénesis ribosomal o GTPasas ribosomales son esenciales para el crecimiento celular, pues cumplen con funciones críticas para la maduración de las dos subunidades ribosomales. Hasta el momento se conocen seis GTPasas esenciales que participan en la biogénesis ribosomal, cuyas posibles funciones aún no se encuentran descritas con exactitud; pero, se asocian con actividades como promover rearrreglos conformacionales, evitar la unión prematura de proteínas y facilitar la asociación o disociación de proteínas ribosomales o factores que participan en la maduración (Kressler et al. 2010). La liberación de factores de transactivación que interactúan de manera transitoria con las subunidades ribosomales puede darse por dos mecanismos principalmente. En uno, la GTPasa desestabiliza la biomolécula acelerando un cambio conformacional en el ribosoma; y en otro, desplaza directamente la proteína.

En el proceso de ensamblaje de la subunidad menor 40S de levadura sólo se ha encontrado la intervención de la GTPasa Bms1; en cambio, para la subunidad 30S en bacteria participan tres GTPasas, Era, RsgA y YqeH. Para la maduración de la subunidad mayor 60S se han identificado cinco GTPasas esenciales; tres de ellas, Nog1, Nug1 y Nug2 (Nog2) se encuentran en el nucleolo y núcleo cuyas funciones y orden en el que actúan aún se desconocen, y las dos restantes, Efl1 y Lsg1 son citoplasmáticas y actúan en las etapas finales de la maduración de la subunidad 60S, de tal forma que la actividad de Lsg1 precede la de Efl1 (Kargas et al. 2019; Ma et al. 2017). De las cinco GTPasas involucradas en la maduración de la 60S, Nog1, Nug1, Nug2 y Lsg1 pertenecen a la familia Yawg/YlqF de GTPasas circularmente permutadas (cpGTPasas) (Figura 10) (Weis et al. 2014). Las cpGTPasas se encuentran en los tres dominios de la vida y poseen una única permutación circular que inicia con el motivo G4 en la parte N-terminal de la proteína y los motivos se presentan en el orden G4-G5-G1-G2-G3. A pesar de la diferencia en estructura primaria con las GTPasas tradicionales la permutación no

altera el plegamiento ni la interacción de las proteínas con los nucleótidos (Reynaud et al. 2005). Todas las cpGTPasas cuya función se conoce están relacionadas con la biogénesis ribosomal o interactúan con RNA (Britton 2009).

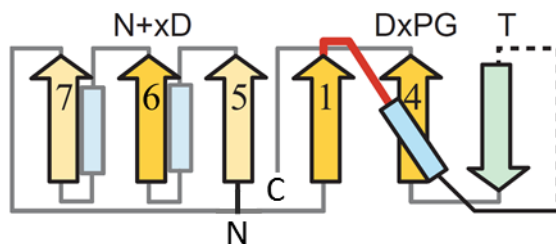


Figura 10. Diagrama topológico de la familia de GTPasas YawG/YlqF. Las hebras están representadas por flechas y las hélices por rectángulos azules, la hebra anti paralela característica en la clase TRAFAC se encuentra en verde, el asa P o P-loop está representado por la línea roja y las líneas punteadas representan elementos de estructura secundaria omitidos. Tomado de Leipe et al. 2002.

1.2.1.1 La GTPasa Lsg1 (Large subunit GTPase 1)

La clasificación evolutiva de la superclase de GTPasas comprende, como se describió anteriormente, dos grandes clases, TRAFAC y SIMBI. La primera clase TRAFAC comprende 20 familias, una de las cuales es la familia Yawg/YlqF caracterizada por poseer el dominio G circularmente permutado. La GTPasa Lsg1 o Kre35 (Large Subunit GTPase 1, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia Yawg/YlqF de cpGTPasas que está formada por cinco subfamilias representadas por las proteínas YlqF, YqeH, YjeQ, MJ1464 y YawG. La subfamilia YlqF a su vez puede ser subdividida en cinco clados: YlqF, MTG1, NOG1, NUG1 y LSG1. De acuerdo con esta clasificación también se ha descrito que Lsg1 pertenece a la familia YRG (por YlqF Related GTPase) (Reynaud et al. 2005; Leipe et al. 2002).

Lsg1 de *S. cerevisiae* (scLsg1) es una proteína esencial y citoplasmática que posee un dominio central de GTPasa tipo MMR/HSR1 (definido en la base de datos PFAM) o dominio G, una región de α -hélice y una señal de localización nuclear, sin que se hayan elucidado otras regiones importantes (Figura 11). El dominio de unión a GTP se encuentra circularmente permutado, característico de la familia YRG (Reynaud et al. 2005) con sus motivos distribuidos en su secuencia primaria en el orden G4(NKAD), G5(SAL), G3(GYPNVGK), G2(TKHFQT) y G1(DCPG) (Reynaud et al. 2005). La señal de localización nuclear es funcional en el ortólogo humano más no en el de levadura, pues se ha demostrado que en levadura es una proteína citoplasmática que no se traslada al núcleo. Por lo contrario en el ortólogo humano *hsLsg1* la NLS es funcional, lo que permite su traslado entre citoplasma y núcleo (Weis et al. 2014) encontrándose en retículo endoplasmático y en cuerpos de Cajal (Reynaud et al. 2005).

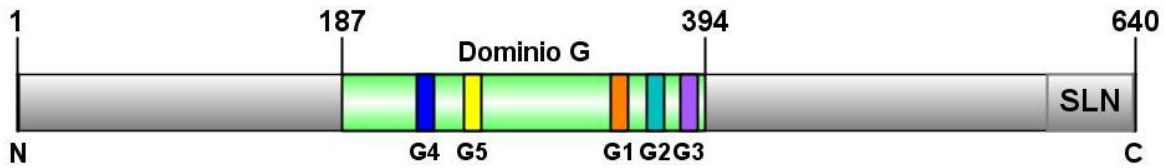


Figura 11. Diagrama esquemático de la GTPasa Lsg1 de *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína Lsg1 de levadura esta codificada por 640 residuos con un dominio central de GTPasa (residuos 187-394, verde) el cual se encuentra circularmente permutado presentando en su estructura primaria los motivos en el siguiente orden: G4, azul; G5, amarillo; G1, naranja; G2, cian y G3, magenta. En el C terminal posee la señal de localización nuclear, SLN, no funcional en levadura.

Como se mencionó en la sección de biogénesis ribosomal la actividad de GTPasa de Lsg1 es necesaria para la incorporación de la proteína ribosomal uL16 y la liberación del factor Nmd3 del ribosoma. En la Figura 12A Kargas y colaboradores (Kargas et al. 2019) muestran la interacción de Lsg1, Nmd3 y uL16, con la subunidad 60S. Lsg1 se encuentra en la cara de la interface de unión de la subunidad 60S con la 40S y ocupa la posición inmediatamente superior a la H69 por medio de una interacción entre el W142 de Lsg1 y la A2256 de la 60S (Figura 12B). La interacción de Lsg1 con Nmd3 es mediada por el residuo R163 de Lsg1 y W104 de Nmd3 (Figura 12C).

Al igual que Lsg1, Nmd3 también se une a la interfaz de unión de la subunidad 60S a lo largo del corredor de tRNA desde la proteína uL1 en el tallo L1, extendiéndose a través del sitio de salida y el PTC para interactuar con Lsg1 y en el extremo opuesto con el factor anti asociación Tif6. La liberación de Nmd3 ocurre después de la incorporación de las proteínas ribosomales eL40 y uL16 y requiere la actividad GTPasa de Lsg1 (Kargas et al. 2019).

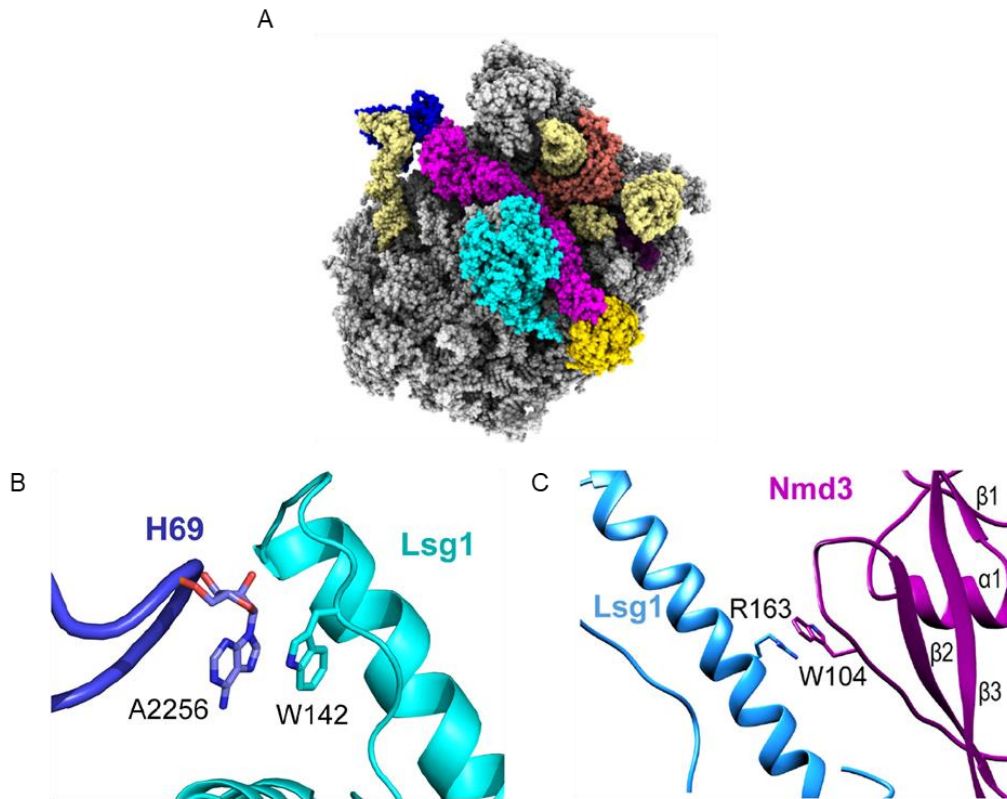


Figura 12. Estructura de la subunidad ribosomal pre-60S con factores transitorios e interacción de Lsg1 con rRNA y con Nmd3. (A) Modelo atómico de la subunidad 60S en gris con sus hélices H89 y H38, y su tallo L1 en amarillo crema, Lsg1 en cian, Nmd3 en violeta, uL16 en coral y Tif6 en amarillo. (B) Interacción de Lsg1 con el rRNA 25S. (C) Interacción de Lsg1 con Nmd3. Tomado de (Kargas et al. 2019).

La información obtenida por la reconstrucción estructural de las diferentes etapas en las que Nmd3 y Lsg1 participan representa un gran logro en la comprensión del ensamblaje del PTC. Sin embargo, varios aspectos del proceso aún no se han dilucidado. Por ejemplo, los reordenamientos mencionados anteriormente no son suficientes para liberar a Nmd3, ya que permanece unida a la subunidad 60S a través de su interacción en el extremo con Tif6 y Lsg1. El mecanismo por el cual se completa la liberación de Nmd3 y el papel preciso de Lsg1 y su actividad de GTPasa sigue sin estar claro. Se conoce que el dominio G en las GTPasas sufre grandes cambios conformacionales durante el ciclo funcional de la enzima, actuando como interruptores moleculares que alternan desde un estado inactivo unido a GDP a un estado activo en complejo con GTP. La actividad GTPasa de Lsg1 aumenta cuando se une a la subunidad 60S cargada con Nmd3 (Malyutin et al. 2017), y se ha propuesto que la interacción de la G2261 en la H69 con el switch 1 de Lsg1 puede regular la hidrólisis, al bloquear el dominio G en la conformación unida a GTP. Sin embargo, la posición de la G2261 persiste incluso en ausencia

de Lsg1, por lo que no está claro cómo se regula su actividad de GTPasa. Malyutin y colaboradores proponen que posiblemente un rearrreglo conformacional de Nmd3 modificaría transitoriamente la interacción de la H69 con Lsg1 y esto regularía la hidrólisis de GTP.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la biogénesis ribosomal y de las proteínas involucradas, además de aportar a la comprensión de un proceso fundamental en todas las células, también contribuye a identificar fallas que pueden comprometer la viabilidad celular y la salud humana desarrollando enfermedades relacionadas con el ribosoma, conocidas como ribosomopatías, o reflejándose en un incremento de la probabilidad de desarrollar cáncer (Teng et al. 2013).

Lsg1 es una proteína que interviene en las últimas etapas de la biogénesis ribosomal, y de la cual, hasta el momento, poco se conoce sobre sus propiedades bioquímicas y biofísicas. No se sabe como biomoléculas que se encuentran en la misma ruta, como la subunidad ribosomal 60S y Nmd3, pueden llegar a afectar su función. Aún no se ha descrito la unión de nucleótidos de guanina por parte de Lsg1, ni el tipo de cambios conformacionales que sufre durante el proceso y como se modifican en presencia de cofactores como el complejo binario Nmd3•60S. Además, el mecanismo mediante el cual se da la liberación de Lsg1 de la subunidad 60S una vez que ha llevado a cabo su función aún se desconoce. Tampoco se ha descrito la actividad catalítica de Lsg1 como proteína de unión a GTP o GTPasa. Catalíticamente, las GTPasas de traducción y ribosomales no son enzimas controladas por difusión, al contrario, poseen una actividad intrínseca baja, por lo cual en ocasiones su actividad es regulada por biomoléculas efectoras. Existen casos como el de EF-2, una traslocasa, que interviene en el proceso de traducción y que posee constantes de unión similares tanto para sustrato como para producto para la cual no se conocen intercambiadores que modulen su actividad. Para las GTPasas SelB, eRF3 y Efl1 las constantes de afinidad por el producto son mayores que para el sustrato, evidenciando la necesidad de efectores. Para entender la regulación de Lsg1 y conocer si la subunidad 60S y Nmd3 funcionan como moléculas efectoras, se determina la actividad catalítica de la GTPasa y se determinan las constantes de disociación de Lsg1 hacia nucleótidos de guanina de manera aislada y en presencia del sistema binario, Nmd3•60S, debido a que participa en la misma ruta celular que Lsg1. De esta forma se puede describir como se modifica la unión a nucleótidos y la función que cumple el complejo Nmd3•60S, evaluando la posible actividad como intercambiador mediante fluorescencia en estado estacionario. Tanto las proteínas, Lsg1 y Nmd3, así como las subunidades 60S empleadas para las determinaciones mencionadas, se obtuvieron de *Saccharomyces cerevisiae*; esto debido a que se ha empleado el estudio de la biogénesis en levadura como un modelo para trabajos bioquímicos y estructurales debido en parte a que muchos aspectos de la biogénesis ribosomal en humanos se encuentran

conservados en levadura, incluyendo estudios de enfermedades asociadas a problemas de ensamblaje de ribosomas (Woolford Jr & Baserga 2013).

3 PREGUNTAS A RESPONDER

¿La afinidad de Lsg1 difiere entre sustrato y producto?

¿La función de GTPasa de Lsg1 se encuentra modulada por biomoléculas efectoras?

¿Son Nmd3 y la subunidad 60S efectoras para Lsg1? En dado caso, ¿qué tipo de moléculas efectoras son?

¿Cómo se describe la actividad enzimática de hidrólisis de GTP por parte de Lsg1?

4 HIPÓTESIS

Las constante de disociación por GTP encontrada para la GTPasa Lsg1 en el sistema Lsg1•Nmd3•60S se verá disminuida con relación a la presentada por Lsg1 aislada, indicando un incremento en la afinidad de la enzima por nucleótidos de guanina en presencia de Nmd3 y la subunidad 60S, biomoléculas involucradas en la misma ruta de biogénesis ribosomal. Entonces el sistema Nmd3•60S es un factor modulador de la actividad de Lsg1 actuando como GEF (Figura 13).

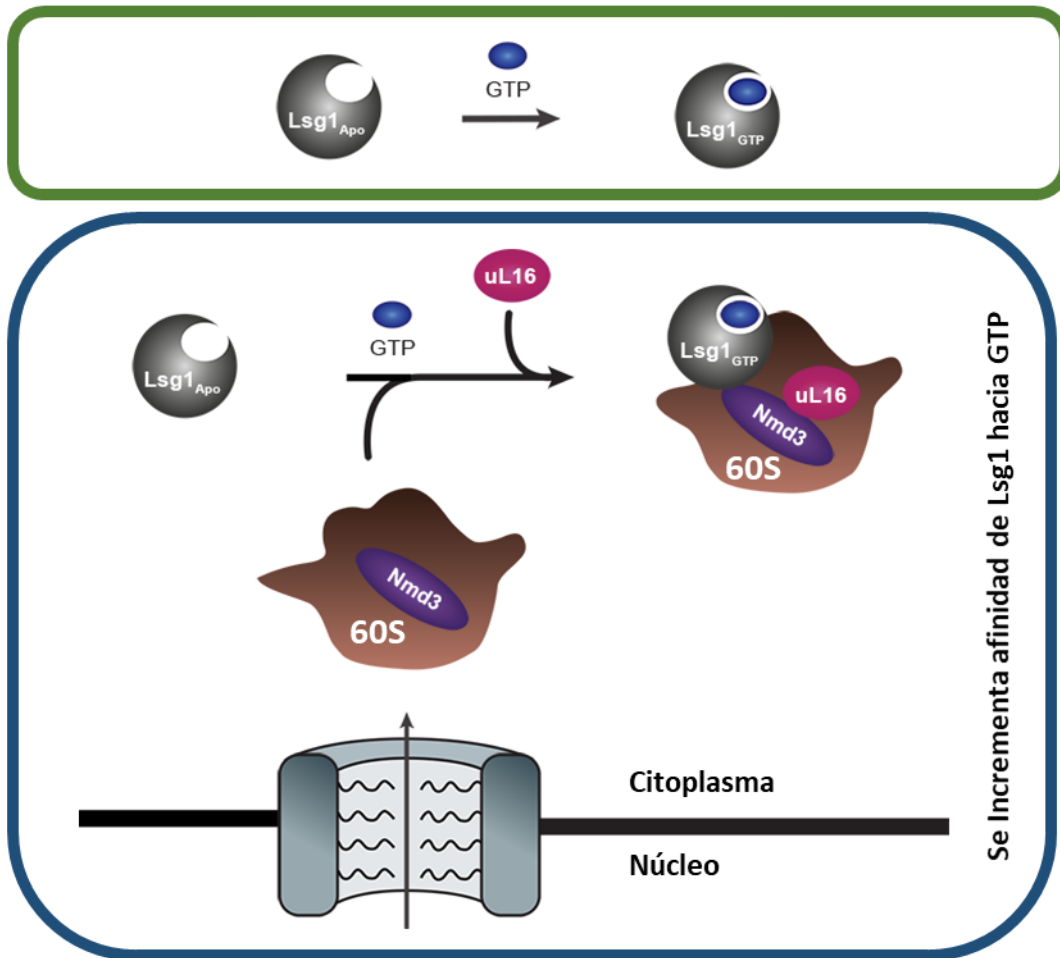


Figura 13. Esquema de la interacción de Lsg1 con GTP. La afinidad de Lsg1 hacia su sustrato se modifica, incrementando cuando interactúa con Nmd3 y la subunidad 60S.

5 OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el reconocimiento de nucleótidos de guanina mediante ensayos de fluorescencia en equilibrio y la actividad enzimática de la GTPasa ribosomal Lsg1 por medio de ensayos enzimáticos acoplados.

Objetivos particulares

- Describir la afinidad de Lsg1 hacia diferentes nucleótidos de guanina, naturales y análogos tanto no hidrolizables como fluorescentes, mediante ensayos de fluorescencia en equilibrio.
- Determinar si Nmd3 y la subunidad ribosomal 60S modifican la afinidad de Lsg1 hacia nucleótidos de guanina mediante ensayos de fluorescencia en equilibrio.
- Definir la clase de biomoléculas efectoras que son Nmd3 y la subunidad 60S para la GTPasa Lsg1.
- Describir la actividad enzimática de Lsg1 mediante la determinación de la k_{cat} y la K_m empleando ensayos enzimáticos acoplados.

6 METODOLOGÍAS

6.1 Reactivos químicos, enzimas e insumos

Los reactivos químicos y aminoácidos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., y Merck & Co. (New Jersey, EUA). Los componentes de los medios de cultivo se compraron a ForMedium®. El IPTG, PMSF, cicloheximida y la agarosa se obtuvieron de la compañía GoldBio Technology. El SDS, el reactivo de Bradford y la acrilamida fueron comprados a BioRad. Los kits de purificación de plásmido por lisis alcalina, de purificación de productos de PCR, así como el de extracción de gel de agarosa fueron adquiridos de Jena Bioscience.

Las enzimas empleadas en los diferentes procesos fueron adquiridas de Thermo Fisher Scientific, Fermentas o New England Biolabs.

Las unidades para concentración de proteínas por ultrafiltración, Centricon® y Centriprep®, así como los filtros con tamaños de poro 0.22 µm y 0.45 µm fueron comprados a Merck Millipore.

6.2 Microorganismos

6.2.1 Levaduras

Para la obtención de subunidades ribosomales se utilizó la cepa de levadura JD1370 (*MATa trp1 ura3 leu2 PEP4::HIS3 NUC1::LEU2*), carente en la proteasa A y la nucleasa NUC1.

Para la expresión de la proteína Nmd3 se empleó la cepa de levadura BCY123 (*MATa, Can1, ade2, trp1, Ura3-52, his3, leu2-3, 112, pep4::his⁺, prb1::leu2⁺, bar1::HisG⁺, lys2::pGAL1/10-GAL⁴*), deficiente en tres proteasas YPL154C, YEL060C y YIL015W.

6.2.2 Bacterias

Para amplificar los plásmidos se emplearon rutinariamente las cepas de *Escherichia coli* DH5α y DH10β:

- DH5α

(*F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169, recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) poa supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*)

- DH10β

(*F⁻ endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 ϕ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str^R λ⁻*)

Para expresar Lsg1 se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pRIL (*E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]). Esta cepa es empleada con sistemas de expresión basados en el promotor T7 bacteriófago como pRSET y pET y es carente de la proteasa *OmpT*, la cual puede degradar las proteínas durante su purificación. Además posee genes que codifican tRNAs que reconocen los codones de arginina AGA y AGG, el codón de isoleucina AUA y el codón de leucina CUA, los cuales restringen con frecuencia la traducción de proteínas heterólogas.

6.3 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y selección de microorganismos se describe en las Tabla 1 y Tabla 2 que se muestran a continuación.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en el desarrollo del proyecto.

Medio	Composición para preparar un litro de cultivo
LB (Luria-Bertani)	10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona.
YEP(D)	10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa.
SD-URA	8 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos con sulfato de amonio, 11 g de casa aminoácidos, 55 mg de adenina, 55 mg de tirosina. Ajustar pH a 5.8 y posterior a esterilización agregar la solución de drop out (con Leucina y Triptófano) según la Tabla 2.

Tabla 2. Composición para las soluciones de drop out 100X.

Aminoácido	Composición para 100 mL (g)	Aminoácido	Composición para 100 mL (g)
Arginina	0.2	Metionina	0.1
Histidina	0.1	Fenilalanina	0.6
Isoleucina	0.6	Treonina	0.5
Leucina	0.6	Triptófano	0.4
Lisina	0.4		

Los medios fueron preparados con agua destilada, esterilizados a 22 psi y 120 °C durante 20 min y conservados a temperatura ambiente a excepción de los medios sólidos, los cuales

fueron conservados a 4 °C. Para los medios sólidos se adicionó 1.5 % de agar a la composición del medio líquido.

6.4 Suplementos y aditivos

El compuesto X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactopiranosido) adicionado en el análisis fenotípico de bacterias se adquirió de ForMedium.

Los antibióticos empleados para seleccionar bacterias transformantes fueron adquiridos de ForMedium y usados en las siguientes concentraciones: kanamicina 50 µg/mL en agua, cloranfenicol 50 µg/mL en etanol, ampicilina 100 µg/mL en agua. Todos los antibióticos se esterilizaron por filtración utilizando filtros de membrana estériles de 0.22 µm de diámetro de poro y se conservaron a -20 °C.

6.5 Disoluciones y amortiguadores

Los reactivos empleados en la elaboración de las distintas soluciones y amortiguadores de pH se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de las disoluciones y amortiguadores usados en los diferentes procedimientos de biología molecular y bioquímica de proteínas.

Solución	Composición
Aislamiento de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina	
Solución P1	Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa 10 mg/mL
Solución P2	SDS 1 %, NaOH 0.2 M
Solución P3	Acetato de potasio 3 M pH 4.8
Selección de clonas transformantes	
X-GAL 500X	2% X-GAL disuelto en N-N-dimetilformamida
Electroforesis en gel de agarosa	
Amortiguador TAE 10X	Tris base 4.84 %, ácido acético 1.14 %, sal disódica EDTA 0.37 %
Transformación de células de levadura	
10X TE	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA pH 8.
L1	4 mL dH ₂ O, 0.5 mL TE 10X, 0.5 mL LiAc 1 M
L2	4 mL PEG 50 %, 0.5 mL TE 10X, 0.5 mL Acetato de litio 1 M

Expresión en levadura	
SD-URA	SD +Leu +Trp según Tabla 2
Glucosa 20 %	Solución de glucosa al 20 % en agua
Galactosa 20 %	Solución de galactosa al 20 % en agua
Expresión en bacteria	
IPTG 1000X	IPTG 500 mM (isopropil β -D-tiogalactopiranosido)
Electroforesis SDS-PAGE	
Gel concentrador	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
Gel separador	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
Amortiguador de carga 4X	Tris-HCl 200 mM pH 8, β -mercaptoetanol 400 mM, glicerol 40 %, SDS 8 %, azul de bromofenol 0.4 %
Solución fijadora	Metanol 40 %, ácido acético 10 %
SDS-PAGE	
Solución teñidora	Azul de coomassie G-250 0.25 %, metanol 45 %, ácido acético 10 %
Amortiguador de tanque	Tris base 3 %, glicina 14.4 %, SDS 1 %
Purificación de Lsg1 por cromatografía de afinidad a iones Ni²⁺	
PMSF	Solución 100 mM de PMSF en etanol o isopropanol anhidro
Amortiguador de lisis	Buffer fosfatos 50 mM pH 7.5 (K ₂ HPO ₄ 25 mM + NaH ₂ PO ₄ 25 mM), NaCl 500 mM, imidazol 25 mM, MgCl ₂ 5 mM, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 20 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 2 mM
Amortiguador de alta sal	Buffer fosfatos 50 mM pH 7.5 (K ₂ HPO ₄ 25 mM + NaH ₂ PO ₄ 25 mM), NaCl 1 M, MgCl ₂ 5 mM
Amortiguador de elución	Buffer fosfatos 50 mM pH 6 (K ₂ HPO ₄ 25 mM + NaH ₂ PO ₄ 25 mM), NaCl 500 mM, MgCl ₂ 5 mM, imidazol 250 mM, glicerol 10 %
Purificación de Lsg1 por cromatografía de exclusión molecular	
Amortiguador para columna Superdex 200	Hepes 50 mM pH 6.5, NaCl 500 mM, MgCl ₂ 5 mM, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 10 mM, 0.001 % triton X-114

Purificación de Nmd3 por cromatografía de afinidad a amilosa	
Amortiguador de lisis	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 450 mM, KCl 100 mM, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 20 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 2 mM, ZnCl ₂ 1 μM
Amortiguador de lavado de alta sal	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 1 M, KCl 100 mM, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 20 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 2 mM, ZnCl ₂ 1 μM
Amortiguador de elución	Hepes 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, KCl 100 mM, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 20 mM, ZnCl ₂ 1 μM, 0.001 % triton X-114, maltosa 10 mM
Dicroísmo circular	
Amortiguador para Lsg1	Fosfatos 25 mM pH 6.6, NaCl 50 mM.
Amortiguador para Nmd3	Fosfatos pH 7.5 5 mM, NaCl 5 mM
Obtención de subunidades ribosomales 60S	
Amortiguador de lisis	Acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH 20 mM pH 7.4, acetato de magnesio 10.5 mM, heparina 1 mg/mL, DTT 2 mM, PMSF 0.1 mM, benzamidina 0.1 mM
Colchón de sacarosa	Acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH 20 mM pH 7.4, acetato de magnesio 10.5 mM, KCl 500 mM, sacarosa 1 M, DTT 2 mM, PMSF 0.1 mM, benzamidina 0.1 mM, EDTA 0.5 mM
Amortiguador de alta sal	Acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH 20 mM pH 7.4, acetato de magnesio 10.5 mM, KCl 500 mM, DTT 2 mM, PMSF 0.1 mM, benzamidina 0.1 mM, EDTA 0.5 mM
Amortiguador de separación	Hepes-KOH 50 mM pH 7.4, MgCl ₂ 10 μM, KCl 500 mM, DTT 2 mM, PMSF 0.1 mM. benzamidina 0.1 mM
Gradiente de glucosa del 10 % al 40 %	Hepes-KOH 50 mM pH 7.4, MgCl ₂ 5 mM, DTT 2 mM, KCl 500 mM, PMSF 0.1 mM, EDTA 0.1 mM, benzamidina 0.1 mM y glucosa suficiente para tener concentraciones al 10 % y 40 %
Amortiguador de almacenamiento	Acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH 20 mM pH 7.4, acetato de magnesio 2.5 mM, sacarosa 250 mM, DTT 2 mM, PMSF 0.1 mM, benzamidina 0.1 mM

Fluorescencia en equilibrio	
Sistema	Hepes 50 mM pH 6.5, NaCl 500 mM, MgCl ₂ 5 mM, glicerol 10 %, Amortiguador uno
	2-mercaptoetanol 10 mM, 0.001 % triton X-114
Sistema	Acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH pH 7.420 mM, acetato de Amortiguador dos
	magnesio 10.5 mM, sacarosa 250 mM, DTT 2 mM, PMSF 0.1 mM, con poliaminas
	benzamidina 0.1 mM, putrescina 8 mM, espermidina 1 mM

6.6 Procedimientos generales de Biología Molecular

6.6.1 Plásmidos de expresión

En el laboratorio ya se contaba con un vector de expresión en bacteria para la proteína Lsg1 de *S. cerevisiae*. Dicho vector consta del esqueleto del plásmido pET28 con la secuencia codificante de Lsg1 fusionada a una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal (Marcial 2016).

Para la obtención de Nmd3 inicialmente se solicitó al Departamento de Biociencias Moleculares dirigido por el Dr. Arlen W Johnson en la Universidad de Texas el plásmido de expresión pAJ1381 (Sengupta et al. 2010), en el cual se encuentra clonada la secuencia codificante de la proteína de unión a maltosa (por sus siglas en inglés “Maltose Binding Protein, MBP”), una etiqueta de diez histidinas, un sitio de reconocimiento de corte por la proteasa TEV y de la proteína Nmd3, tal que el casete de expresión codifica a una proteína de fusión MBP-10xHis-TEVsite-Nmd3, a la que subsecuentemente denominamos MHTN. Este casete de expresión fue subclonado en el plásmido pRS426 modificado con el promotor híbrido *Gal1/10* y el terminador *Mat α* , con el que finalmente se realizó la expresión de Nmd3.

6.6.2 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Aislamiento por el método de lisis alcalina

Se inocularon las clonas transformantes en 5 mL de medio LB con su respectivo marcador de selección, se crecieron durante 18 h a 37 °C y agitación de 200 rpm. Para cada purificación se siguieron los siguientes pasos: se centrifugó el cultivo celular a 6700 x g por 5 min y se obtuvo el paquete celular. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 μ L de solución P1. Se adicionaron 200 μ L de solución P2 y se mezcló por inversión hasta que la disolución se tornó translúcida, posteriormente se agregaron 150 μ L de solución P3. La mezcla se centrifugó a 9700 x g por 15 min para eliminar los restos celulares, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 400 μ L de isopropanol frío a 4 °C. Se incubó por 30 min

a 4 °C y después la mezcla se centrifugó a 9700 x g por 15 min y el paquete celular se lavó con 500 µL de una solución de etanol al 70 % v/v. Finalmente, las trazas de etanol se eliminaron por evaporación y el DNA se resuspendió en 25 µL de agua libre de nucleasas. La composición de las soluciones utilizadas en esta sección se encuentra descrita en la sección de disoluciones y amortiguadores de pH (Tabla 3).

Aislamiento con Kit de purificación de plásmidos

Para los casos en que se purificó el DNA plasmídico con el kit *fast-n-easy plasmid mini-prep* de Jena Bioscience se siguieron las instrucciones del proveedor como se indica: Se inoculó una clona transformante en 5 mL de medio LB con su respectivo marcador de selección, se creció durante 18 h a 37 °C con agitación a 200 rpm. El paquete celular se obtuvo mediante centrifugación a 6700 x g durante 2 min y se resuspendió en 300 µL de amortiguador de lisis usando vortex. Se añadieron 300 µL de amortiguador de neutralización con RNAsa y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 6700 x g durante 5 min, la solución cambió de color rosa al amarillo. El sobrenadante se trasladó a una columna previamente activada utilizando 100 µL de amortiguador de activación y centrifugada a 6700 x g durante 30 s. La columna con el sobrenadante se centrifugó a 6700 x g durante 30 s, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de amortiguador de lavado para posteriormente centrifugar a 6700 x g por 30 s. Se descartó el remanente y se eluyó la columna en un tubo nuevo con 30 µL de amortiguador de elución incubando la columna por un periodo de 1 min a temperatura ambiente y centrifugando a 6700 x g durante 1 min. Finalmente se midió la concentración de DNA en la solución.

6.6.3 Amplificación de secuencias codificantes

Las secuencias codificantes de las proteínas Lsg1 y Nmd3 se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los procesos se empleó la DNA polimerasa Phusion® High-Fidelity (NEB). La composición de las reacciones que se describe en la Tabla 4 se mezcló suavemente y se transfirió a un termociclador con la tapa térmica previamente calentada a 98 °C. Las condiciones empleadas en el termociclador se muestran en la Tabla 5.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa SerialCloner 2.6.1 y fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co.

Tabla 4. Composición de la reacción de PCR con la DNA polimerasa Phusion® High-Fidelity.

Componente	Concentración
Oligonucleótido sentido	0.5 µM
Oligonucleótido reverso	0.5 µM
DNA molde	10 ng
Phusion DNA polimerasa	0.2 U/50 µL
Amortiguador 5X Phusion GC	1 X
dNTPs	200 µM
DMSO	3 %
MgCl ₂	0.5 mM
Agua	Hasta completar volumen de reacción 50µL

Tabla 5. Condiciones de temperatura y tiempo empleadas para realizar la PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s
Desnaturalización	98 °C	10 s
Alineamiento	60 °C	30 s
Extensión	72 °C	45 s
Extensión final	72 °C	5 min
Mantener	4 °C	

6.6.4 Restricción de DNA

Los patrones de restricción de plásmidos para la selección de clonas se utilizaron como un indicio de su correcta construcción. Para ello se comparó el tamaño de los fragmentos observados con el patrón de restricción teórico de la construcción en cuestión calculado, utilizando las secuencias de reconocimiento de las mismas enzimas de restricción empleadas en el experimento. Para llevar a cabo las reacciones de restricción, el DNA plasmídico en cuestión se incubó con la enzima de restricción 3 h en el amortiguador y a la temperatura óptima recomendados por el proveedor. La digestión se resolvió en un gel de agarosa al 1 %. Las construcciones que mostraron un patrón de restricción correcto se purificaron con el kit *Plasmid Mini-Prep* de Jena Bioscience siguiendo las instrucciones del proveedor y se secuenciaron con la compañía GENSCRIPT.

6.6.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se resolvieron en geles de agarosa al 1 % con amortiguador TAE 1X. Las muestras de DNA, 8 μ L aproximadamente, se mezclaron con 2 μ L de amortiguador de carga. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se cubrieron con el mismo amortiguador empleado en la fabricación del gel. Una vez colocadas las muestras en el gel, se corrieron a 90 V por 45 min. La visualización del DNA se realizó mediante tinción con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) o GelRed® (Biotium) usando un transiluminador (Gel Doc™XR de BIO RAD).

6.6.6 Transformación de células bacterianas de *E. coli* con DNA plasmídico

5 μ L de DNA plasmídico o 10 μ L de reacción de ligación se mezclaron con 50 μ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH10 β o DH5 α y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C durante 45 s, seguido de 2 min en hielo. Después se agregaron 500 μ L de medio LB a cada tubo de células y se incubaron a 37 °C durante 1 h con agitación constante a 200 rpm. Finalmente cada reacción de transformación se sembró en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente y se incubaron durante 18 h a 37 °C.

6.6.7 Transformación de levaduras (*S. cerevisiae*) con DNA plasmídico

Para obtener células competentes regularmente se inocularon 10 mL de medio YEPD con la cepa de *S. cerevisiae* y se incubaron a 30 °C durante la noche con agitación constante a 250 rpm. Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio YEPD con la cantidad de preinóculo necesaria para alcanzar una DO₆₀₀ de 0.1. El cultivo se incubó a 30 °C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica (DO₆₀₀ entre 0.6 y 0.8). Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 4704 x g durante 2 min a 21 °C y se lavó con 10 mL de agua estéril para eliminar remanentes del medio de cultivo. Se empastilló centrifugando a 4704 x g por 2 min a 21 °C y se resuspendió en 1 mL de solución L1 preparada el mismo día. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvieron células de levadura competentes que se distribuyeron en alícuotas de 100 μ L para ser transformadas. Para la transformación de las células se mezclaron 200 ng de DNA plasmídico con 100 μ g de acarreador de DNA y se agregaron a 100 μ L de células competentes de levadura. Se adicionaron 600 μ L de solución L2, se mezclaron por inversión y se mantuvieron a 30 °C durante 2 h con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente se agregaron 70 μ L de DMSO a cada tubo y se realizó un choque térmico a 42 °C por 15 min. Para eliminar el sobrenadante cada tubo se centrifugó a 4704 x g

durante 1 min. El botón celular se resuspendió en 100 μ L de amortiguador TE y se plaqueó en el respectivo medio de selección. Finalmente se incubó a 30 °C durante 3 días. La composición de las soluciones utilizadas en esta sección se encuentra descrita en la sección de disoluciones y amortiguadores de pH (Tabla 3).

6.6.8 Clonación por el método de Gibson

Este método de clonación fue desarrollado en el 2009 por Gibson y colaboradores y representa una manera de ensamblar, en una sola reacción isotérmica, dos o más fragmentos de DNA para dar como resultado una molécula de DNA recombinante. La reacción involucra la actividad de tres enzimas, una exonucleasa, una DNA polimerasa y una ligasa. La exonucleasa T5 remueve nucleótidos de los extremos 5' de los fragmentos de DNA de doble cadena que se desean clonar, facilitando el alineamiento de los fragmentos complementarios en los extremos. Posteriormente, una DNA polimerasa en este caso la enzima Pushion™ High-Fidelity rellena los espacios vacíos y finalmente la ligación se lleva a cabo por la DNA ligasa *Taq*. La clonación por Gibson es una reacción que se da en un solo paso en donde los fragmentos no tienen la necesidad de contar con sitios específicos de restricción.

Para llevar a cabo la clonación por Gibson se obtuvieron inicialmente los fragmentos DNA de doble cadena, el vector pRS426 previamente digerido con *NcoI* y *BglII* y el casete génico MBP-10xHis-TEVsite-Nmd3 (MHTN) previamente amplificado por PCR empleando los oligos con extremos complementarios al vector PFGMHTN y PRGMHTN descritos en el apéndice (sección 10.1). Posteriormente se realizó la reacción con los componentes de la Tabla 6 siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se empleó el kit NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix de la empresa New England Biolabs. La reacción tuvo una duración de 15 min empleando una temperatura de 50 °C.

Tabla 6. Condiciones empleadas para clonar por Gibson

Componente	Cantidad
Vector	0.1 pmoles
Inserto	0.05 pmoles
NEBuilder HiFi DNA master mix	10 μ L
Agua	20 μ L

6.6.9 Ligación de fragmentos de DNA

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen final de 10 μ L utilizando la DNA ligasa T4, 50 ng de plásmido y 150 ng de inserto con una relación molar vector-inserto 1:3. La cantidad de inserto se calculó utilizando la Ecuación (1).

$$ng \text{ de inserto} = \frac{(ng \text{ plásmido})(kb \text{ inserto})}{kb \text{ plásmido}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Se prepararon reacciones con la composición mostrada en la Tabla 7 y se incubaron durante 18 h a 4 °C.

Tabla 7. Composición de las reacciones de ligación utilizando la ligasa T4.

Reactivos	Ligación con inserto	Control (ligación sin inserto)
Amortiguador T4 (10x)	1 X	1 X
Inserto PCR (30 ng/ μ L)	10 ng	-
Vector (30 ng/ μ L)	30 ng	30 ng
Ligasa T4	1 U	1 U
Agua c.b.p	10 μ L	10 μ L

Para las reacciones de ligación que se llevaron a cabo con el sistema T/A característico del vector pGEM-T-Easy se siguieron las instrucciones del proveedor.

6.7 Procedimientos generales de bioquímica de proteínas

6.7.1 Purificación de proteínas

S. cerevisiae Lsg1 se expresó recombinantemente en *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL. La secuencia codificante de Lsg1 se clonó en el vector pET28 y se fusionó a un sitio de reconocimiento de corte con TEV en el C-terminal seguido de una etiqueta de seis histidinas. Los platos con medio sólido de *E. coli* para la expresión de Lsg1 se incubaron siempre a 37 °C y los cultivos en medio líquido se incubaron a la misma temperatura en un agitador orbital a 200 rpm.

Las células se crecieron en medio LB suplementado con 50 μ g/mL de kanamicina y 50 μ g/mL de cloranfenicol. La expresión de la proteína se indujo a una DO_{600nm} de 0.8, añadiendo 0.5 mM de IPTG durante 18 h a 18 °C. Las células se lisaron por sonicación en amortiguador de lisis y se centrifugaron a 30.996 x g por 50 min. La fracción soluble se sometió inicialmente a cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA Superflow, QIAGEN), en donde se le realizó un lavado con amortiguador de alta sal y luego se eluyó con amortiguador de elución, la proteína se

concentró para posteriormente purificarla por cromatografía de exclusión por tamaño, empleando una columna HiLoad16/600 Superdex 200 (GE Healthcare). Se colectaron y unieron las fracciones con Lsg1, se concentraron y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso. La pureza de la muestra se determinó mediante SDS-PAGE y medición de la relación de la absorbancia 260/280 nm, para descartar contaminación de ácidos nucleicos. La composición de los amortiguadores se encuentra en la Tabla 3.

La expresión de Nmd3 de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en la cepa de *S. cerevisiae* BCY123, la secuencia codificante para el casete de expresión MHTN se clonó en el vector pRS426. Los cultivos tanto sólidos como líquidos para levadura usados en la expresión de Nmd3 se incubaron siempre a 30 °C y para el caso del medio líquido se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm. Las células se crecieron en medio SD-URA suplementado con 0.5 % de glucosa y 100 µM ZnCl₂ hasta que la D.O_{600nm} alcanzara 1.8, posteriormente la sobreexpresión de la proteína se indujo con una concentración final de 2.5 % de galactosa por 18 h a 30 °C. Las células se colectaron mediante centrifugación, el botón celular se resuspendió en amortiguador de lisis y las células se lisaron por fricción con perlas de vidrio. Posteriormente se centrifugó a 30.996 x g por 50 min. La proteína en la fracción soluble fue purificada usando una resina de amilosa (New England Biolabs), se realizó un lavado de alta sal y se eluyó con amortiguador de elución. La fracción con Nmd3 se concentró y se almacenó a -80 °C para su posterior uso. La pureza de la muestra se determinó mediante SDS-PAGE y medición de la relación de la absorbancia 260/280 nm, para descartar contaminación de ácidos nucleicos. La composición de los amortiguadores se encuentra en la Tabla 3.

6.7.2 Medición de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante espectrofotometría de absorción en el UV a 280 nm o por el método de Bradford a 595 nm en un biofotómetro eppendorf (biophotometer plus de Thomas Scientific). Para la determinación se ajustó el blanco con la solución de amortiguador en la que se encuentra la proteína y posteriormente se midió la absorción de la solución con proteína. Para el caso de la absorción a 280 nm la concentración se obtuvo utilizando la ley de Lambert-Beer que se muestra en la Ecuación (2).

$$A = \varepsilon * l * C \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde A corresponde a la luz absorbida, ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$) de la proteína, l corresponde a la longitud que recorre la luz a través de la muestra (cm) y C la concentración de la muestra (M). Los valores de los coeficientes de extinción molar a 280 nm

para cada una de las proteínas se calculan a partir de la composición de aminoácidos usando la Ecuación (3).

$$\varepsilon_{280\text{ nm}} = W * \varepsilon_{280\text{ nm}}^{Trp} * Y * \varepsilon_{280\text{ nm}}^{Tyr} * C * \varepsilon_{280\text{ nm}}^{Cys} \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde W , Y y C corresponden al número de triptófanos, tirosinas y cistinas presentes en la proteína. Para el caso de MHTNmd3 se contemplaron igualmente todos los aminoácidos de la proteína de fusión, incluyendo los presentes en la MBP. $\varepsilon_{280\text{ nm}}^{Trp}$, $\varepsilon_{280\text{ nm}}^{Tyr}$ y $\varepsilon_{280\text{ nm}}^{Cys}$ corresponden a los coeficientes de extinción molar del triptófano ($5,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), tirosina ($1,490\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y cistina ($125\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 280 nm respectivamente (Pace et al. 1995).

Para la determinación de proteína por el método de Bradford se mezclaron 50 μL de muestra con 750 μL de agua y 200 μL de reactivo Bradford, se dejó en reposo 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se calculó empleando la ecuación resultante de la curva patrón, determinada experimentalmente, presentada en la Ecuación (4) y multiplicado por el factor de dilución (1000 $\mu\text{L}/50\text{ }\mu\text{L}$).

$$Abs_{595\text{ nm}} = 0.064 C(\mu\text{g}/\text{mL}) - 0.025 \quad \text{Ecuación (4)}$$

6.7.3 Electroforesis de proteína desnaturizante SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE, se realizó para confirmar la pureza de las proteínas con las que se trabajó. Se utilizaron geles de poliacrilamida con porcentajes que varían entre 7.5 % para Nmd3 y 12 % para Lsg1. Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga y se calentaron por 5 min a 100 °C. Posteriormente estas se cargaron en el gel que se colocó en una cámara de electroforesis vertical y se aplicó un potencial eléctrico de 100 V durante 1.5 h aproximadamente. Posteriormente el gel se fijó con solución fijadora, se enjuagó y se tiñó con solución teñidora de azul de coomassie. La composición del gel separador y concentrador y de las soluciones se muestran en la sección de electroforesis SDS-PAGE descrita en la Tabla 3. Finalmente el gel se destiñó sumergiéndolo en agua caliente durante 20 min.

6.8 Obtención de subunidades ribosomales 60S

La obtención de subunidades ribosomales se realizó con base en la metodología planteada por Algire y colaboradores (Algire et al. 2002), para obtención de subunidades 40S y 80S: El protocolo se modificó ligeramente para obtener subunidades 60S puras y que

presentaran baja actividad de GTPasa. Se creció 1 L de cultivo de la cepa de levadura JD1370 (*MATa trp1 ura3 leu2 PEP4::HIS3 NUC1::LEU2*), carente en la proteasa A y la nucleasa NUC1, en un fermentador a 30 °C y 180 rpm hasta DO entre 0.8 y 1. El crecimiento se detuvo en frío, añadiendo cicloheximida a una concentración final de 100 µg/mL, durante 15 min, luego las células se colectaron a 3810 x g durante 10 min y el botón celular se resuspendió y lavó dos veces en amortiguador de lisis. Las levaduras se lisaron por fricción con perlas de vidrio y se centrifugaron a 4 °C y 11768 x g durante 20 min. La fracción soluble se transfirió a un colchón de sacarosa y se centrifugó a 4 °C y 222592 x g durante 2.5 h. El pellet se resuspendió en 1.5 mL de amortiguador de alta sal durante 1 h en un baño de hielo y se centrifugó a 13100 x g por 2 min. El sobrenadante se trasladó a un colchón de sacarosa y se centrifugó nuevamente a 4 °C y 222592 x g durante 2.5 h. El pellet se resuspendió en amortiguador de separación y se sometió a agitación continua durante 1 h. La concentración se ajustó a 50 DO/mL con amortiguador de separación y se cargaron 700 µL de subunidades en cada uno de los seis gradientes de glucosa previamente preparados con soluciones de glucosa del 10 % al 40 %. Se centrifugaron 6 h a 70358 x g y se colectaron las subunidades ribosomales 60S utilizando un detector UV-Vis modelo EM-1 de BioRad. Para identificar las fracciones se siguió la absorbancia a 254 nm, posteriormente se centrifugaron las subunidades 60S a 222592 x g 3 h, se resuspendieron en la solución de almacenamiento y se guardaron a -80 °C.

6.9 Caracterización Biofísica de Lsg1 libre y en complejo con la proteína Nmd3 y la subunidad 60S (Lsg1•Nmd3•60S).

6.9.1 Dicroísmo circular (CD)

El contenido de estructura secundaria de Lsg1 2 µM, sola o en presencia de 150 µM de nucleótidos de guanina, GTP y GDP, se evaluó mediante CD, los espectros se colectaron en 25 mM de fosfatos a pH 6.6 y 50 mM de NaCl a 20 °C en el rango del UV lejano. Los experimentos se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan V100 (Applied Photophysics), equipado con controlador de temperatura. Los espectros, tanto del amortiguador, empleado como blanco y los de Lsg1 se midieron en un intervalo de longitud de onda de 190 a 260 nm, con un incremento de 1 nm por paso, un tiempo promedio de 5 s y un ancho de banda de 1 nm, a una temperatura de 20 °C en una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 mm. Cada espectro corresponde al promedio de 5 trazos y se corrigieron sustrayendo la señal del CD del amortiguador para la misma longitud de onda. El contenido de estructura secundaria se estimó por deconvolución del espectro

en el programa BestSel (Misconai et al. 2018). Los valores observados se transformaron a valores de elipticidad molar media utilizando la Ecuación (5).

$$[\theta] \times 10^{-3} (\text{mili grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{CD_{obs} \cdot 10^3}{l (\text{mm}) \cdot [\text{Proteína}] (\mu\text{M}) \cdot R} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde θ es la elipticidad molar media, CD_{obs} las unidades obtenidas del equipo, l el paso de luz y R el número de residuos de aminoácidos en la proteína.

La temperatura de desnaturalización térmica se evaluó monitoreando la elipticidad a 208 nm en un rango de temperatura de 20 a 80 °C, con un ancho de banda de 1 nm, un tiempo de respuesta de 16 s y una velocidad de barrido de 1 °C/min.

6.9.2 Fluorescencia

La fluorescencia intrínseca de los triptófanos se utilizó tanto para evaluar de forma indirecta el contenido de estructura terciaria de Lsg1, así como para determinar las constantes de unión en equilibrio de la proteína con los nucleótidos de guanina. Dependiendo del experimento en cuestión los nucleótidos de guanina utilizados comprendieron nucleótidos naturales, análogos no hidrolizables o análogos fluorescentes.

Evaluación de la estructura terciaria de Lsg1 mediante fluorescencia

Para evaluar la estructura terciaria de Lsg1 se obtuvieron los espectros de fluorescencia de la proteína nativa y en presencia de urea como agente desnaturalizante. Lsg1 1 μM se excitó a 290 nm y se midió el espectro de emisión de fluorescencia para la proteína nativa y desnaturalizada en presencia de 7 M de urea. La emisión de la fluorescencia se midió en un rango de 310 a 510 nm a 25 °C con una velocidad de barrido de 600 nm/min, usando slits de excitación y de emisión de 5 nm y una celda de cuarzo con un paso óptico de 10 mm. Cada espectro corresponde al promedio de 10 trazos. Los espectros fueron corregidos sustrayendo la señal del amortiguador para la misma longitud de onda. En la Figura 14 se presenta un diagrama de la estrategia experimental para la caracterización estructural y de estabilidad de Lsg1, incluyendo la caracterización por DC y por fluorescencia arriba mencionada.

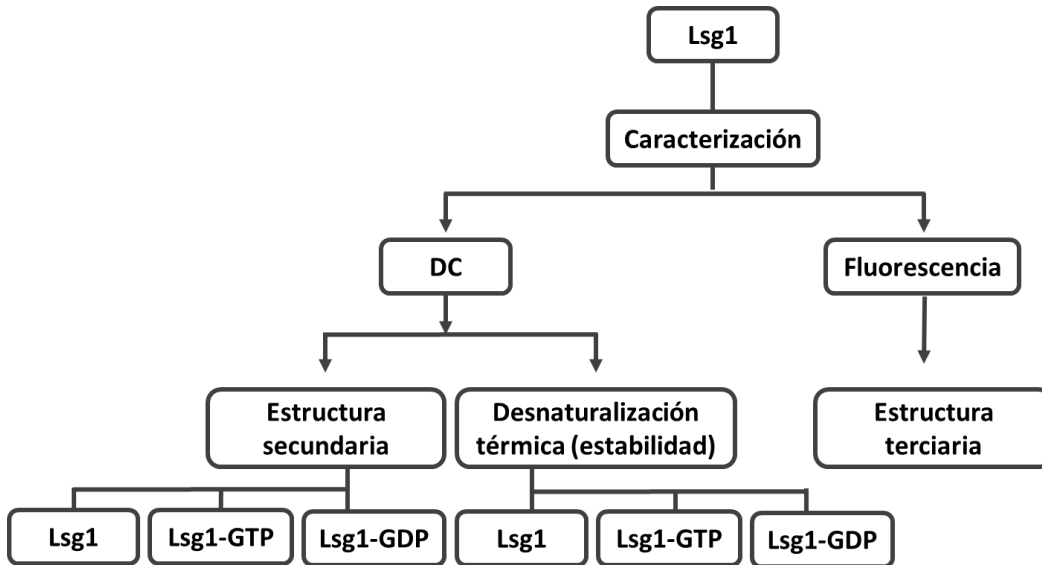


Figura 14. Diagrama de la caracterización del contenido estructural y estabilidad de Lsg1. Estrategia experimental para caracterizar Lsg1 empleando dicroísmo circular (DC) y fluorescencia.

Ensayos de unión de nucleótidos de guanina a Lsg1 libre y en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S mediante fluorescencia en equilibrio

Se evaluó la interacción de Lsg1 con los nucleótidos de guanina siguiendo el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de la proteína. Para ello se excitaron únicamente los triptófanos de la proteína a 295 nm y se midió la señal de fluorescencia en el máximo de emisión (332 nm) después de incrementar la concentración de nucleótidos. Se emplearon nucleótidos de guanina, tanto naturales, GTP y GDP, como análogos no hidrolizables, GppNHp y GTP γ S, así como nucleótidos de adenina; ATP y ADP, como control. La señal de fluorescencia observada (F_{obs}) se corrigió por el efecto del filtro interno obteniendo la fluorescencia corregida (F_{corr}), y esta última se graficó en función de la concentración de nucleótido. Las medidas se realizaron utilizando los dos sistemas de amortiguadores descritos en la Tabla 3 para fluorescencia en equilibrio. Otra estrategia ampliamente empleada es medir la fluorescencia de análogos de guanina que poseen el grupo fluorescente N-metil-3'-O-antraniloil (mant), mantGTP y mantGDP, que poseen un máximo de emisión alrededor de los 440 nm. En esta modalidad los cambios en la fluorescencia al ocurrir la unión del análogo pueden ser monitoreados por excitación directa del grupo mant a 355 nm o indirecta excitando los triptófanos a 295 nm mediante FRET (por sus siglas en inglés "Fluorescence Resonance Energy Transfer"); en ambos casos se mide el máximo de emisión del grupo mant. Para el caso de FRET los triptófanos de la proteína que se encuentran cerca del sitio de unión actúan como donadores de energía y los

análogos fluorescentes que se unen como aceptores, ya que su espectro de excitación coincide con el espectro de emisión de los triptófanos. Finalmente se registra la emisión de fluorescencia del mant que incrementa a medida que ocurre la saturación de la proteína al aumentar la concentración del ligando. De las opciones mencionadas, la medición de la K_d de Lsg1 con análogos fluorescentes de guanina solo fue posible para mantGDP mediante FRET, debido a la dificultad de seguir el cambio en las señales tanto para FRET con mantGTP como para la excitación directa del mant para ambos análogos, mantGTP y mantGDP. La dificultad radicó principalmente en que el incremento total en las señales no llegaba a superar el 20 % y también en el ruido de fondo presentado debido a la fluorescencia de los análogos no unidos. Para el caso del sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S se utilizaron también análogos fluorescentes con el grupo mant, ahora excitando directamente el fluoróforo a 355 nm y registrando su máximo de emisión a 440 nm; este máximo varió ligeramente dependiendo del análogo de guanina empleado. Se empleó el amortiguador dos con poliaminas para fluorescencia en equilibrio descrito en la Tabla 3 para medir el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S debido a que la presencia de poliaminas ha demostrado cumplir un papel importante en la estabilidad de ribosomas (Nakashima et al. 2017) y en favorecer su interacción con proteínas efectoras (Takada et al. 2020).

Se realizaron titulaciones en ausencia de proteína Lsg1 como blanco para cada uno de los sistemas descritos anteriormente que emplean análogos fluorescentes. En todos los casos el ajuste a los datos se realizó empleando un modelo de un sitio de unión con en el programa KaleidaGraph para determinar la correspondiente constante de disociación (K_d). Los métodos empleados para la determinación de la constante de disociación por fluorescencia para cada nucleótido se relacionan en la Figura 15.

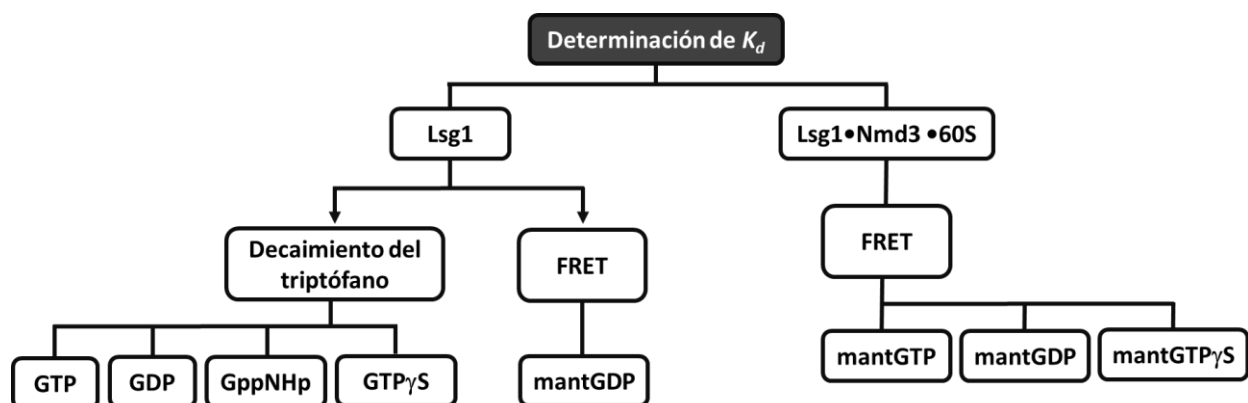


Figura 15. Diagrama descriptivo de los métodos empleados para la determinación de las constantes de disociación (K_d) de Lsg1 sola y en el sistema Lsg1•Nmd3•60S hacia nucleótidos de guanina.

6.9.3 Cinética enzimática, determinación de los valores de K_m y k_{cat}

Para medir la actividad enzimática de Lsg1 se utilizó un ensayo enzimático acoplado en el que la enzima acoplada PNP (nucleósido fosforilasa de purinas) utiliza como sustrato al ion fosfato liberado de la hidrólisis de GTP por Lsg1 y al MESG (2-amino-6-mercapto-7-metilpurin ribonucleósido) para generar ribosa 1-fosfato y AMMP (2-amino-6-mercapto-7-metilpurina); este último presenta un máximo de absorción a 360 nm. Este método fue utilizado anteriormente para caracterizar los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} de la GTPasa ribosomal Efl1 que también participa en la maduración de la subunidad 60S (Gijsbers 2013). Para medir la actividad de Lsg1 en el sistema ternario, se empleó el método de verde de malaquita. En la Figura 16 se presenta el diagrama de los métodos empleado para la determinación de la actividad enzimática de Lsg1 sola y en el sistema Lsg1•Nmd3•60S.

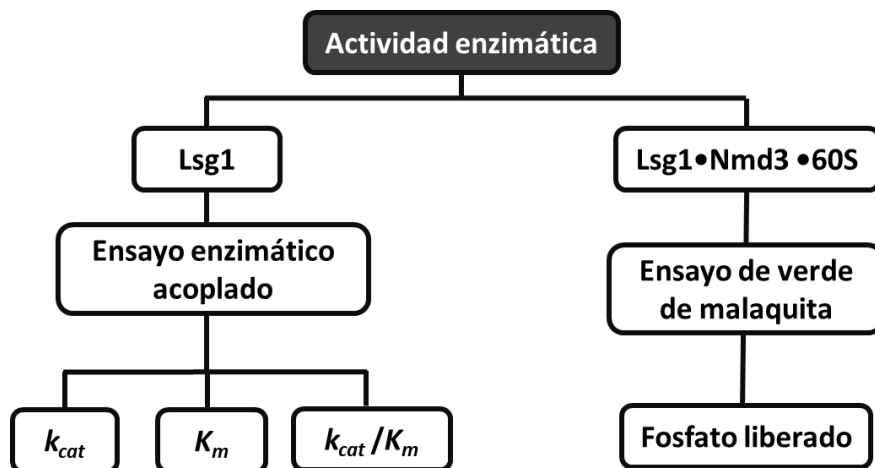


Figura 16. Diagrama descriptivo de la determinación de la actividad enzimática de Lsg1 sola y en el sistema Lsg1•Nmd3•60S.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Construcción de los plásmidos para la expresión recombinante de las proteínas Lsg1 y Nmd3

En el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 7 se contaba con la secuencia codificante para Lsg1 fusionada a una etiqueta de seis histidinas en el C-terminal clonada en el plásmido de expresión pET28 (pET28Lsg1His). Esta construcción se empleó como molde para el diseño de una nueva que incluyera un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV entre la proteína Lsg1 y la etiqueta de histidinas, con la finalidad de evaluar la posibilidad de remover la etiqueta una vez purificada la proteína. Además se incluyeron sitios de restricción para las endonucleasas con el objetivo de facilitar futuras modificaciones a nivel de biología molecular.

En el procedimiento para realizar la construcción descrita anteriormente el molde empleado para la amplificación fue el plásmido pET28Lsg1His que contiene la secuencia codificante para el ortólogo de levadura de Lsg1. Con los oligos forward (PFLsg1T) y reverse (PRLsg1T), descritos en el apéndice (sección 10.1), se insertaron sitios de reconocimiento para las endonucleasas *NcoI* y *Bam*HI en el caso del oligo PFLsg1T y *XhoI* y *Bam*HI en el oligo PRLsg1T, en donde además se incluyó la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. El amplicón anteriormente descrito se clonó en el vector de tránsito pGEM-Teasy; cuyo agente de selección es un marcador metabólico, este vector posee el sitio múltiple de clonación dentro de la secuencia de la β -galactosidasa de *E. coli*, por lo que si la secuencia de interés es insertada en el vector, se interrumpe la expresión de la β -galactosidasa, enzima que hidroliza el X-gal en galactosa y 5-Bromo-4-Cloro-3-hidroxi indol (azul). De esta manera las células transformadas eficientemente no pueden hidrolizar el X-Gal y conservan una tonalidad blanca; por el contrario, las células que cuentan con el vector sin el fragmento de DNA de interés expresarán la β -galactosidasa y podrán hidrolizar el X-gal debido a la presencia de esta enzima, adquiriendo una tonalidad azul por la formación del 5-Bromo-4-Cloro-3-hidroxi indol. Para la clonación de Lsg1 en el vector pGEM-T Easy se añadieron soluciones de IPTG 1X y X-Gal 2 %, preparadas según la Tabla 3. Este procedimiento se llevó a cabo con dos propósitos principales. El primero fue para realizar un escrutinio de las células transformantes que adquirieron el plásmido con el inserto y el segundo para asegurar extremos cohesivos en el inserto al extraerlo con enzimas de restricción. Se liberó el inserto Lsg1TEV del vector de tránsito pGEM-Teasy mediante digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, el cual fue sub-clonado en el vector pET28b resultando en la construcción denominada pET28Lsg1TEVHis (Figura 17). El vector pET28 es un vector de expresión de baja copia que contiene una región regulatoria de la

transcripción que consiste del promotor T7 seguido del operador lactosa. La expresión de la proteína es regulada por el operador lac por medio del análogo no hidrolizable de alolactosa (IPTG). Su sitio de clonación múltiple incluye la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* utilizadas para clonar el inserto Lsg1TEVHis y su marcador de selección es kanamicina.

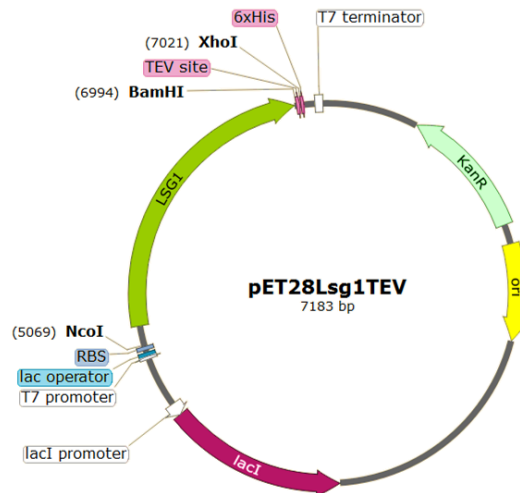


Figura 17. Construcción pET28bLsg1TEV. Vector de expresión de la proteína recombinante Lsg1 de *S. cerevisiae* seguido de un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV (TEV site) y una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en el extremo carboxilo terminal.

Para la expresión de Nmd3 se realizaron una serie de ensayos previos que no dieron los resultados esperados. Se describen dos brevemente a continuación. Para la expresión recombinante de la proteína Nmd3 se probaron diferentes sistemas binarios hospedero-vector hasta encontrar el apropiado. Inicialmente se empleó el plásmido de expresión en levadura pAJ1381 (Sengupta et al. 2010) que contaba con un casete de expresión constituido por la secuencia que codifica para la proteína de unión a maltosa, una etiqueta de diez histidinas, un sitio de reconocimiento por TEV y la proteína Nmd3, (MHTN). En este plásmido la expresión del transgen es constitutiva y posee como marcador de selección la complementación de la auxotrofia a leucina. La expresión de Nmd3 mediante este plásmido se ensayó en células de levadura de *S. cerevisiae* BJ5464. Sin embargo, no se observó expresión de la proteína de fusión MHTNmd3. También se clonó la secuencia que codifica para Nmd3 unida a una etiqueta de histidinas empleando el método de clonación por Gibson; sin embargo, no fue posible obtener proteína soluble.

Finalmente se adicionaron las regiones regulatorias correspondientes a un promotor híbrido *Gal1/10* al casete de expresión MHTN (Elison et al. 2018) y el terminador *Mat α* para sub-

clonarse en el vector pRS426 obteniéndose la construcción denominada pRS426MHTN (Figura 18), con la cual se expresó satisfactoriamente la proteína de fusión MHTNm3.

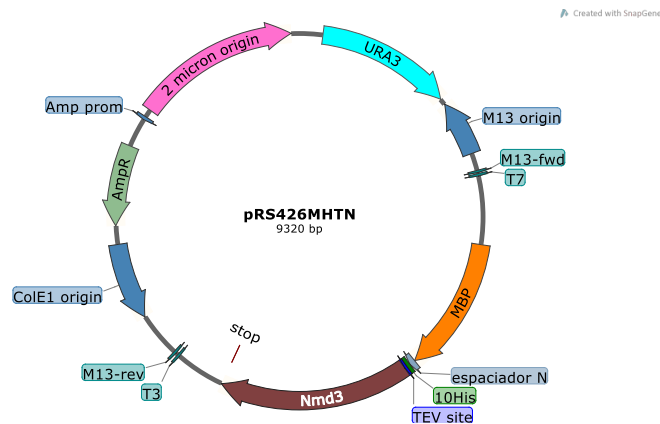


Figura 18. Construcción pRS426MHTN. Vector empleado para la expresión en *S. cerevisiae* de la proteína Nmd3. La proteína resultante es una fusión correspondiente a la proteína de unión a maltosa (MBP), una etiqueta de 10xHistidinas, un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV y Nmd3.

7.2 Purificación de proteínas recombinantes

7.2.1 Purificación de la proteína Lsg1

Previamente en el grupo de trabajo ya se habían establecido las condiciones para la expresión de la proteína Lsg1 en un sistema bacteriano (Marcial 2016). Con este conocimiento previo, se expresó Lsg1 de levadura fusionada a un sitio de reconocimiento por TEV y una etiqueta de seis histidinas en células de *E. coli* BL21 pRIL previamente transformadas con el plásmido pET28bLsg1TEVHis. La expresión se indujo con 0.5 mM IPTG por 18 h a 18 °C. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones Ni²⁺ seguida de una cromatografía por filtración en gel; los amortiguadores empleados para la purificación se describen en la Tabla 3. La presencia y pureza de la proteína se evidenció mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE donde se observó una banda del tamaño esperado para Lsg1 de 73 KDa (Figura 19) y mediante la razón entre la absorbancia a 260 y 280 nm, donde la $A_{260/280 \text{ nm}} \sim 0.65$ obtenida rutinariamente es un valor esperado para una solución libre de ácidos nucleicos. Las fracciones donde se presentó la proteína Lsg1 fueron concentradas y congeladas a -80 °C para su posterior uso. El rendimiento obtenido fue de 4 mg/L de cultivo.

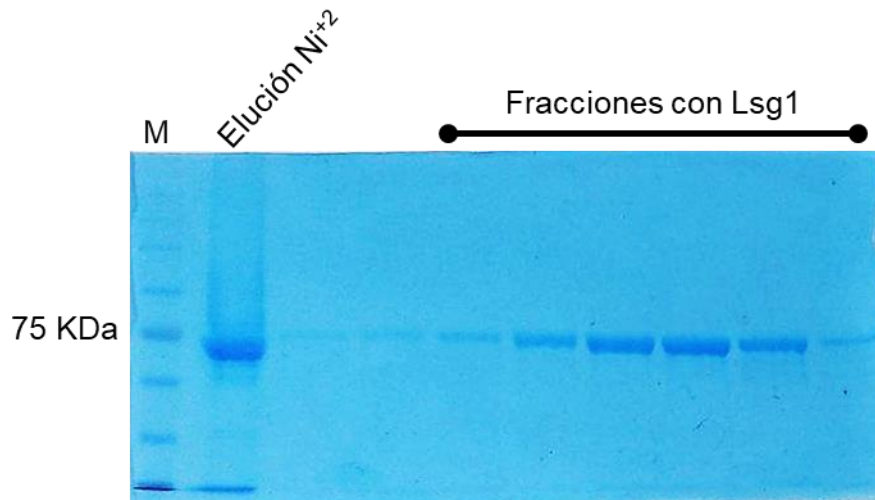


Figura 19. Gel SDS-PAGE de la purificación de la proteína Lsg1 (73 KDa). De izquierda a derecha: M- marcador de peso molecular; Elución Ni^{2+} -fracción eluida de la cromatografía de afinidad a iones Ni^{2+} seguida de las fracciones resultantes de la cromatografía de exclusión molecular.

7.2.2 Purificación de la proteína Nmd3

La proteína de fusión MHTNmd3 se estudió sin remover la MBP ya que se ha reportado que es funcional *in vivo* y que además la eliminación de la MBP desestabiliza la proteína y reduce la unión a la subunidad 60S (Sengupta et al. 2010).

La presencia de la proteína de fusión MHTNmd3 se evaluó por medio de electroforesis SDS-PAGE donde se observó una banda con el tamaño esperado de 103 KDa (Figura 20). Las fracciones donde se presentó la proteína Nmd3 fueron concentradas y congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso.

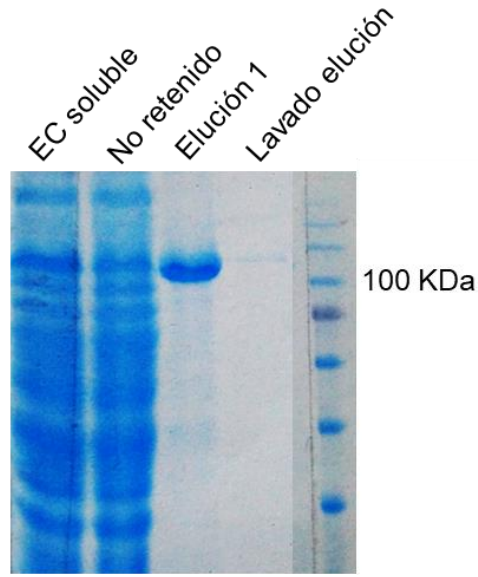


Figura 20. Gel SDS-PAGE de la purificación de la proteína de fusión MHTNmd3 mediante una cromatografía de afinidad a amilosa. La proteína obtenida tiene un peso aparente cercano a los 100 KDa el cual corresponde adecuadamente con los 103 KDa de su peso molecular teórico. Marcador de peso molecular a la derecha.

7.3 Obtención de subunidades ribosomales 60S de *S. cerevisiae*

Puesto que la proteína Lsg1 participa en el penúltimo paso de maduración de la subunidad 60S del ribosoma, uno de los objetivos de este trabajo consistía en determinar si la presencia de esta subunidad regula la interacción de Lsg1 con los nucleótidos de guanina. Para esto fue necesario contar con subunidades 60S. En el proceso de purificación, los ribosomas 80S inicialmente fueron disociados en sus dos componentes, las subunidades 60S y 40S, las cuales posteriormente fueron separadas mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa. En la Figura 21 se presenta un gradiente obtenido rutinariamente durante el proceso de obtención de las subunidades 60S. Las fracciones correspondientes a las subunidades 60S se colectaron y se concentraron hasta 1.5 μ M.

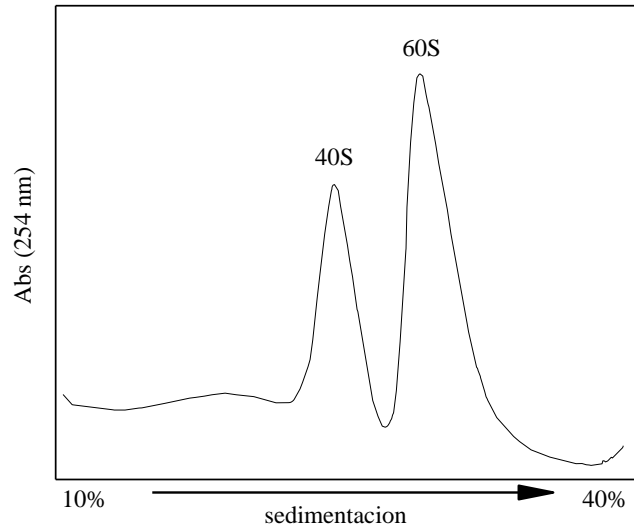


Figura 21. Subunidades ribosomales 40S y 60S resueltas en un gradiente de sacarosa del 10 - 40 %.

Las subunidades 60S obtenidas pueden poseer actividad GTPasa debido a que, en su gran mayoría, provienen de la disociación del ribosoma maduro. Por este motivo pueden permanecer asociados, dependiendo de la etapa de traducción en la que se encuentre el ribosoma, distintos factores, bien sean factores de iniciación, elongación o terminación, como lo son eIF2, eEF-2 y eRF3, respectivamente, que son proteínas G y por tanto presentan actividad hidrolizando GTP. Regularmente estudios estructurales sobre el ribosoma se realizan empleando complejos reconstituidos *in vitro*; en los cuales, para eliminar factores distintos de las proteínas ribosomales, los ribosomas son purificados con métodos que incluyen un lavado con una concentración alta de sal (Huber et al. 2011; Shasmal et al. 2016). Para desprender factores de la subunidad 60S y minimizar de esta forma la actividad GTPasa presente en las subunidades, estas fueron sometidas a un lavado con un alto contenido de sal (KCl 800 mM). Con el lavado se pretende eliminar proteínas no ribosomales que puedan presentar actividad hidrolítica de GTP. De esta manera las subunidades 60S obtenidas empleando alta concentración de sal no presentaron actividad GTPasa, como se presenta más adelante en la sección 7.7 en los resultados de los ensayos de verde de malaquita de la Figura 32. Esta concentración de sal es similar a la reportada por Munoz y colaboradores, para eluir las unidades ribosomales, en un método de obtención de ribosomas por intercambio aniónico, donde eluyen con 650 mM de KCl, obteniendo ribosomas equivalentes a los extraídos por métodos tradicionales (Munoz et al. 2017).

7.4 Contenido de estructura secundaria y estabilidad térmica evaluada mediante dicroísmo circular

La estructura secundaria se evaluó mediante dicroísmo circular y la fluorescencia intrínseca de sus residuos de triptófano. El espectro de dicroísmo circular (CD) en el UV lejano de Lsg1 libre consistió en la firma típica de estructura secundaria mixta con una mezcla tanto de hélices- α como láminas- β evidenciado por la presencia de dos mínimos a 208 y 220 nm (Figura 22A). El mínimo pronunciado a 208 nm es característico de las hélices- α y una meseta alrededor de 220 nm resultante de la superposición de las bandas negativas características de las láminas- β y las hélices- α (210-225 nm y 222 nm, respectivamente). El espectro de Lsg1 sufre cambios leves en presencia de nucleótidos de guanina, lo que sugiere que la GTPasa unida posee diferente contenido de estructura secundaria comparada con la apoproteína, como se presenta en la Tabla 8. Para ambos nucleótidos la intensidad de los mínimos (210 y 220 nm) decrece. Sin embargo, en presencia de GTP la disminución se da en proporciones diferentes, invirtiendo el patrón del espectro, mientras para GDP ambas señales decrecen de manera equivalente y ambos mínimos se solapan, presentándose una única banda entre 210 y 220 nm debido a las contribuciones superpuestas de hélices- α y hojas- β . Para realizar la deconvolución de los espectros se empleó el programa BeStSel. El contenido de estructura secundaria se presenta en la Tabla 8, y los resultados sugieren una disminución del contenido de α -hélices, que es compensada por un incremento en la cantidad de hebras- β y de regiones desordenadas. Estos datos indican que Lsg1 no tiene una estructura compacta sino que consta de grandes regiones desestructuradas donde casi la mitad de la proteína presenta una conformación flexible.

La estabilidad térmica de Lsg1 se determinó monitoreando la señal de elipticidad a 208 nm en función de la temperatura (Figura 22B). La desnaturalización térmica correspondió a un proceso irreversible, ya que el trazo obtenido del experimento de enfriamiento no se superpuso con el del calentamiento. Los datos describieron una curva sigmoideal distorsionada con una transición aguda entre 30-48 °C y una temperatura de fusión aparente o T_m de 37 °C. A medida que incrementa aún más la temperatura se presenta una segunda transición con un punto medio alrededor de los 57 °C y una probable tercera transición. Este comportamiento indica que el desplegamiento de Lsg1 sigue una ruta compleja de 3 estados con 2 intermediarios. La señal de CD al final del proceso a 80 °C todavía presentó valores de elipticidad molar media de residuo cercanos a -3000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, por lo que cierta estructura secundaria persiste incluso a altas temperaturas. La unión a nucleótidos de guanina modifica la estabilidad térmica de Lsg1, en ambos casos la temperatura aparente para la primera transición se incrementa en 1 °C. Sin

embargo, la pendiente para la segunda transición cambia de 0.18 miligrados/°C para la forma apo-Lsg1 a 0.22 y 0.25 miligrados/°C cuando está unida a GDP y GTP respectivamente. Inesperadamente, el proceso de desnaturalización, independientemente del estado de unión de Lsg1, se inició a 30 °C, temperatura que coincide con la temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae*. Por lo cual, Lsg1 es sólo marginalmente estable a la temperatura fisiológica y las condiciones de estrés que dan lugar a un aumento de la temperatura del entorno podrían ser detectadas por la proteína disminuyendo la tasa de producción de ribosomas como mecanismo de adaptación. De esta manera se estableció 25 °C como temperatura límite para llevar a cabo mediciones posteriores.

7.5 Contenido de estructura terciaria evaluado mediante espectroscopía de fluorescencia

La estructura terciaria de Lsg1 fue evaluada mediante la señal de fluorescencia de los triptófanos presentes en la proteína. Lsg1 tiene 7 triptófanos, dos de los cuales se encuentran en el N-terminal no estructurado y los cinco restantes en la región estructurada. La región estructurada incluye así mismo el dominio G (residuos 187-394) (Figura 23). Lsg1 (1 µM) fue excitada a 290 nm y los espectros de emisión fueron registrados para la proteína nativa y la desnaturalizada en presencia de 7 M de urea.

Para la proteína nativa se observa el máximo de emisión a una longitud de onda de 332 nm (Figura 22C), lo que indica que el espectro está dominado principalmente por los tres triptófanos que se encuentran en un ambiente hidrofóbico completamente inmersos en el dominio G plegado de Lsg1 (W188, W192 y W249) (Figura 23). En contraste, el espectro de emisión de la proteína desnaturalizada mostró un desplazamiento hacia longitudes de onda más altas y una disminución de la intensidad de la señal de fluorescencia (Figura 22C). Este comportamiento sugiere la pérdida de la estructura terciaria de la proteína debido al cambio en el entorno químico de los triptófanos, cuya emisión ocurre a mayores longitudes de onda, similares a la de un triptófano expuesto a un ambiente hidrofílico del solvente.

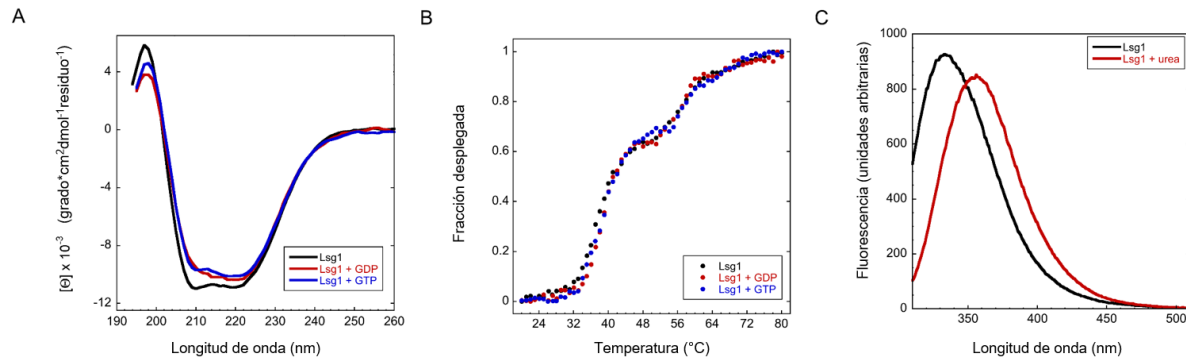


Figura 22. Contenido estructural y estabilidad de Lsg1. (A) Espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano de Lsg1 libre y en presencia de nucleótidos de guanina, GTP y GDP. (B) Desnaturalización térmica de Lsg1 sola y en presencia de nucleótidos de guanina evaluada mediante dicroísmo circular. (C) Espectros de fluorescencia de Lsg1 nativa y desnaturalizada químicamente.

Tabla 8. Porcentaje de contenido de estructura secundaria de Lsg1 libre y en presencia de GTP y GDP.

Estructura	Lsg1	Lsg1 + GDP	Lsg1 + GTP
Hélices- α	26.4	20.1	20.1
Láminas- β	27.3	32.8	29.3
Regiones desordenadas	46.2	47.1	50.6

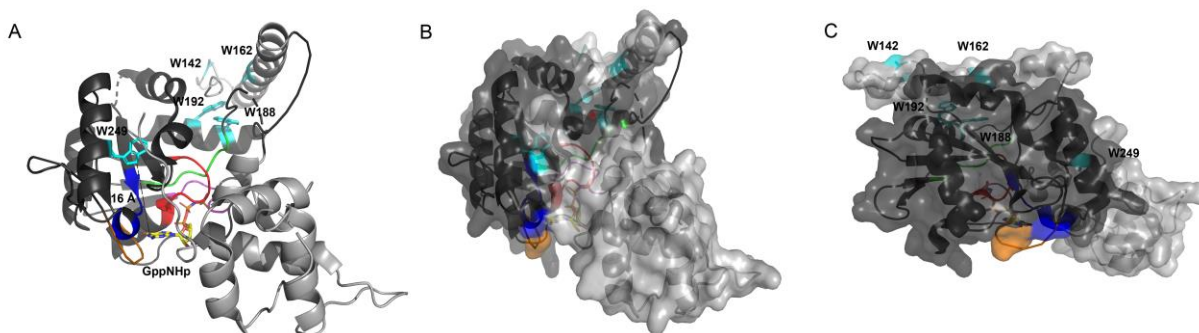


Figura 23. Estructura del dominio de GTPasa de Lsg1 unida a GppNHp (PDB 5T62). (A) Representación del dominio G circularmente permutado en gris oscuro y la región extra de hélices en gris claro. Los motivos responsables de la unión e hidrólisis son como se indica: G4 azul, G5 marrón, G1 rojo, G2 morado y G3 verde y los residuos de triptófano en cian. (B) Representación de la superficie. (C) Representación de la superficie rotada 75° en el eje vertical.

7.6 Unión de Lsg1 a nucleótidos de guanina evaluado mediante espectroscopía de fluorescencia en equilibrio

El máximo de emisión de fluorescencia de aminoácidos como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina depende, en gran medida, del entorno en el que estos fluoróforos se encuentran, en términos generales la intensidad de fluorescencia disminuye al incrementar la polaridad del medio, es decir, al exponerse al solvente. Este efecto de diferencia de fluorescencia según el ambiente químico del fluoróforo es ampliamente empleado en el monitoreo de unión de ligandos a proteínas debido al cambio en el entorno químico que pueden sufrir las moléculas fluorescentes, especialmente los triptófanos, al formarse un complejo (Möller & Denicola 2002).

7.6.1 Interacción de Lsg1 libre con nucleótidos de guanina

La señal de fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano ha demostrado ser un medio sensible para detectar cambios conformacionales locales en las regiones de cambio, switch I y II, de las GTPasas y para calcular la afinidad de unión por nucleótidos de guanina. Como se mencionó anteriormente, Lsg1 contiene siete residuos de triptófano, tres de los cuales se encuentran enterrados en el dominio G (Figura 22 y Figura 23), presentando en su espectro de emisión un máximo a 332 nm, lo que sugiere que la contribución de los triptófanos presentes en el dominio G domina la forma del espectro. Al unirse a los nucleótidos de guanina, no sólo se apaga notablemente la intensidad de la señal de fluorescencia en presencia de GTP, sino que además, el espectro de emisión presenta un desplazamiento al rojo en la longitud de onda de máxima emisión para la forma unida a GDP (de 332 a 340 nm). Esto sugiere que el entorno local de los residuos de triptófano se altera con el intercambio de nucleótidos de guanina y se vuelve menos hidrofóbico en presencia de GDP (Figura 24). Sin embargo, en la estructura Cryo-EM de Lsg1 no es posible distinguir cual triptófano es el responsable del apagamiento de la señal cuando se presenta la unión a nucleótidos (Figura 23), ya que ninguno se encuentra en contacto directo con el análogo no hidrolizable GppNHp. Este resultado sugiere que la disminución en la señal se debe a cambios locales cerca del sitio de interacción con el nucleótido o a cambios conformacionales inducidos en la proteína resultado de la unión. Este apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano se empleó para medir la constante de disociación (K_d) de Lsg1 para diferentes nucleótidos de guanina (Tabla 9).

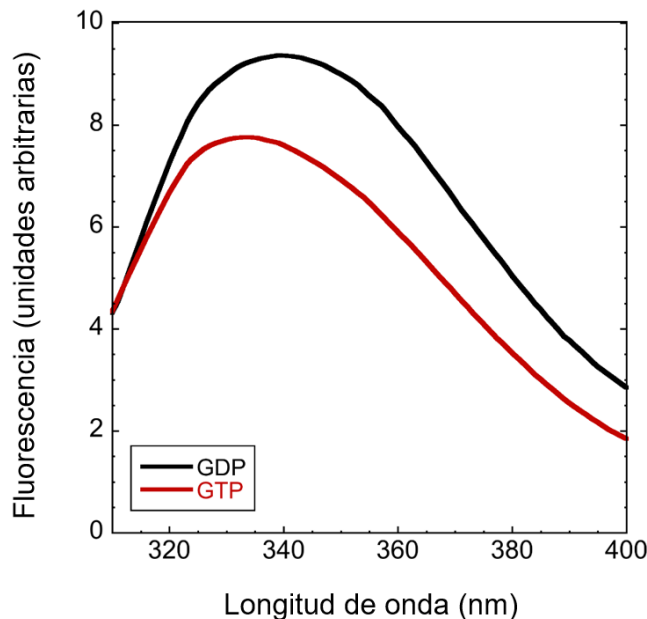


Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia de Lsg1 unida a GDP y GTP. Los residuos de triptófano fueron excitados a 295 nm. Los espectros fueron colectados a concentraciones de nucleótido que aseguran una formación de más de 90 % de complejo proteína-ligando. Los espectros son representativos de dos experimentos independientes donde se promediaron cinco trazos.

Los triptófanos de la proteína fueron excitados a 295 nm y su señal de fluorescencia fue registrada en la correspondiente longitud de onda de máxima emisión. Los controles, en los que se agregaron alícuotas de amortiguador, indican que el efecto de la dilución es despreciable al no presentarse cambios significativos en la fluorescencia al realizar la titulación. De igual manera, se observó el mismo comportamiento en los controles donde se emplearon soluciones de ATP y ADP, indicando la especificidad de Lsg1 por nucleótidos de guanina al no evidenciar unión con ninguno de los nucleótidos de adenina mencionados (Figura 25). Esta característica se evidencia aún más, si se tiene en cuenta que Lsg1 conserva el motivo G4 (NKAD), encargado de la especificidad por nucleótidos de guanina que poseen las GTPasas debido a la doble interacción por puentes de hidrógeno del ácido aspártico con el anillo de guanina.

Los valores de K_d se calcularon del gráfico de la intensidad máxima de fluorescencia en función de la concentración de nucleótidos, corrigiendo los datos por efecto del filtro interno como se indica en (van de Weert 2010) y se empleó un modelo de un sitio de unión para ajustar los datos de acuerdo con la Ecuación (6).

$$F = F_i + \frac{A * x}{K_d + x} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Donde F indica la fluorescencia corregida, F_i la fluorescencia inicial, A la amplitud de la señal, x la concentración de ligando y K_d la constante de disociación.

La afinidad de Lsg1 por GTP es 1.5 veces mayor que la medida para GDP con valores de K_d de $108 \pm 19 \mu\text{M}$ y $175 \pm 31 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 25 A-B). Como se mencionó en la metodología, ambas titulaciones se llevaron a cabo en dos sistemas amortiguadores diferentes optimizados para ayudar a la estabilidad, bien sea, de la proteína Lsg1 o de las subunidades 60S. La naturaleza del amortiguador no afectó la interacción de Lsg1 libre con los nucleótidos de guanina como lo confirman los valores de K_d casi idénticos para ambos sistemas de amortiguador, como se muestra en la Tabla 9.

Considerando la concentración de nucleótidos de guanina en células de levadura en crecimiento exponencial, $200 \mu\text{M}$ GTP y $50 \mu\text{M}$ GDP (Rudoni et al. 2001), la proteína Lsg1 libre presente en el citoplasma de la célula estaría predominantemente unida a GTP, en una proporción 2.5 veces mayor que la unida a GDP. Sin embargo, se conoce que la disposición de nutrientes influye en gran medida en la concentración de nucleótidos de guanina, viéndose modificada la relación GTP/GDP en la célula, que puede cambiar de 4 a 1.5 en presencia o carencia de glucosa respectivamente (Rudoni et al. 2001). Por lo tanto, los cambios en la concentración de nucleótidos de guanina resultantes de cambios en el estado nutricional pueden modular la cantidad de Lsg1 unida predominantemente a GTP a unida principalmente a GDP. También se determinó la afinidad de Lsg1 a los análogos no hidrolizables de GTP, GppNHp y GTP γ S, cuya unión fue aproximadamente cuatro veces más débil en comparación con la del GTP, con constantes de disociación de 212 ± 19 y $370 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 25 C).

Comúnmente se asume que los análogos no hidrolizables de GTP son buenos sustitutos del GTP, pero no siempre es así, y pueden ser funcionalmente diferentes dependiendo de la GTPasa en cuestión. Por ejemplo, el GTP γ S es un buen análogo para el factor de traducción SelB y presenta una mayor afinidad que el sustrato natural, mientras que, el GppNHp no lo es (Paleskava et al. 2012). La disminución en la afinidad de unión de Lsg1 para ambos análogos de GTP sugiere que, a pesar de encontrarse en el rango de μM , los valores de K_d son considerablemente diferentes y podrían no ser buenos sustitutos del sustrato natural GTP.

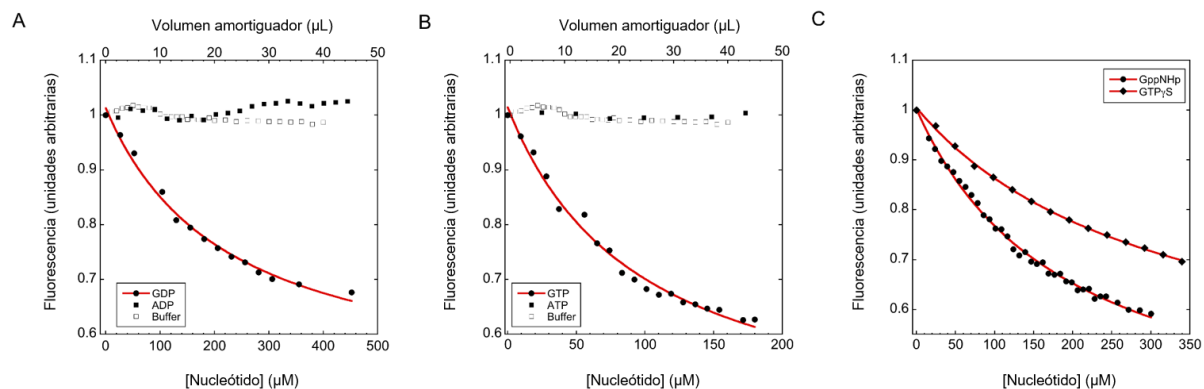


Figura 25. Curvas de unión para Lsg1 con nucleótidos. Unión de Lsg1 a nucleótidos de guanina determinada mediante el decaimiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos (círculos y diamantes sólidos). Las líneas sólidas representan el ajuste a un modelo de un sitio de unión. Se muestran también las titulaciones control al amortiguador (cuadrados vacíos) y a nucleótidos de adenina (cuadrados sólidos). (A) GDP. (B) GTP. (C) GppNHp y GTP γ S.

Además de utilizar la emisión de triptófano para estudiar la interacción de las GTPasas con los nucleótidos de guanina, otra estrategia frecuente utilizada consiste en medir la emisión de análogos fluorescentes, como son los modificados con un grupo reportero metilantranilo (mant-). Los cambios en la fluorescencia tras la unión se siguen ya sea mediante la excitación directa del fluoróforo o mediante la excitación indirecta a través de FRET, utilizando los residuos de triptófano presentes en la unión como donadores y el nucleótido mant- como aceptor. En el primer caso, es necesario sustraer la señal de fluorescencia del grupo mant en una titulación blanco; es decir, se grafica la diferencia entre la titulación a una mezcla en presencia de proteína y aquella obtenida sin proteína. Independientemente de la metodología utilizada para determinar la constante de disociación, los valores deben ser similares, si el grupo fluorescente no perturba la unión. En este trabajo se realizaron ensayos para explorar ambas posibilidades, utilizar los análogos fluorescentes mediante excitación directa y mediante FRET, para caracterizar la unión de los nucleótidos de guanina a Lsg1. Sin embargo, fue difícil utilizar estas señales en los experimentos de titulación en equilibrio, ya que al añadir concentraciones crecientes de nucleótido fluorescente, primero, el cambio de fluorescencia del complejo era inferior al 20% en ambos casos, excitación directa del mant y FRET (Figura 26) y segundo, se presentaba un fuerte aumento de la señal de fondo por el exceso de nucleótido libre, ambas condiciones resultaron desfavorables para identificar la señal correspondiente a la unión.

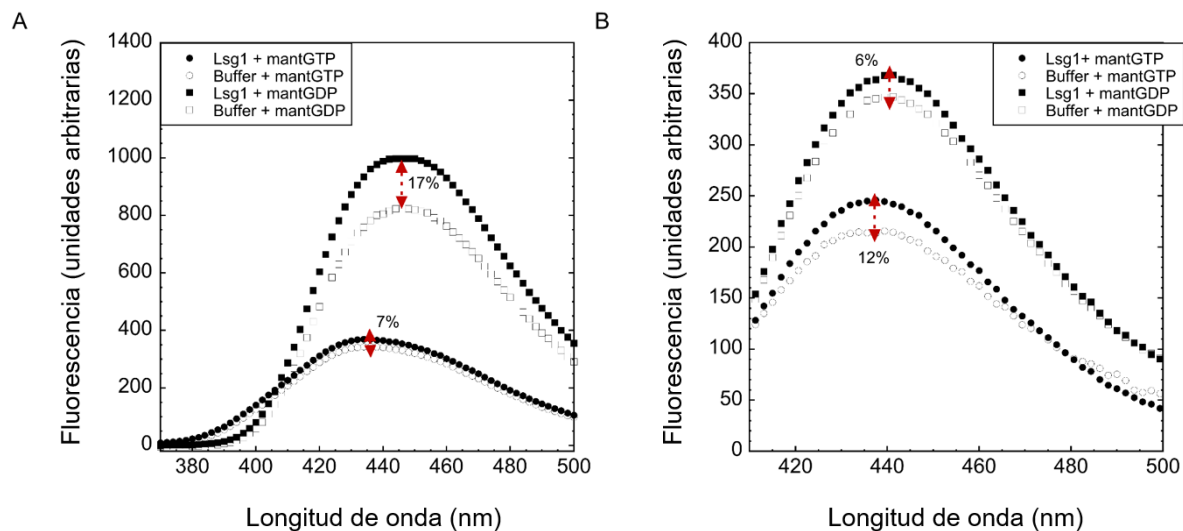


Figura 26. Espectro de emisión de análogos fluorescentes de guanina (mant-GDP y mant-GTP) unidos a Lsg1. (A) FRET de mant-nucleótidos mediante la excitación de los residuos de triptófano de Lsg1 (λ_{ex} 295 nm). (B) Espectros de emisión obtenidos por la excitación directa de los mant-nucleótidos (λ_{ex} 355 nm). Las flechas rojas representan el incremento en la señal del nucleótido unido respecto de la misma concentración de nucleótido libre. Los espectros fueron obtenidos a concentraciones de ligando que aseguran la presencia de más del 90 % de complejo proteína-ligando. Los espectros son representativos de dos experimentos independientes donde se promediaron cinco trazos.

Sólo la unión de mant-GDP con Lsg1 mediante FRET resultó en un espectro dependiente de la concentración de ligando, cuya emisión presentó un aumento moderado de la señal de fluorescencia del 17 %, lo que permitió estimar un valor de K_d de $189 \pm 89 \mu\text{M}$ (Figura 27)(Tabla 9). Las señales experimentales fueron muy ruidosas debido al pequeño cambio en la señal de fluorescencia y esto se reflejó en la incertidumbre grande del ajuste. No obstante, la constante de disociación es similar a la obtenida mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano utilizando el GDP no modificado, lo que sugiere que el grupo mant no afecta la unión con Lsg1 y funge como un buen análogo de guanina para esta enzima.

Tabla 9. Constantes de disociación para la interacción entre Lsg1 sola y en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S con nucleótidos de guanina.

Sistema	Nucleótido de guanina	K_d (μM)
Lsg1	GDP	175 \pm 31
		176 \pm 26*
	mant-GDP	189 \pm 89*
	GTP	108 \pm 19
		91 \pm 16*
	GppNHp	212 \pm 19*
	GTP γ S	>370*
Lsg1•Nmd3•60S	mant-GDP	62 \pm 8
	mant-GTP	22 \pm 4
	mant-GTP γ S	185 \pm 24

*Constantes de disociación medidas en 50 mM Hepes-KOH pH6.5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % glicerol, 10 mM 2-mercaptoetanol y 0.01 % tritón X-114.

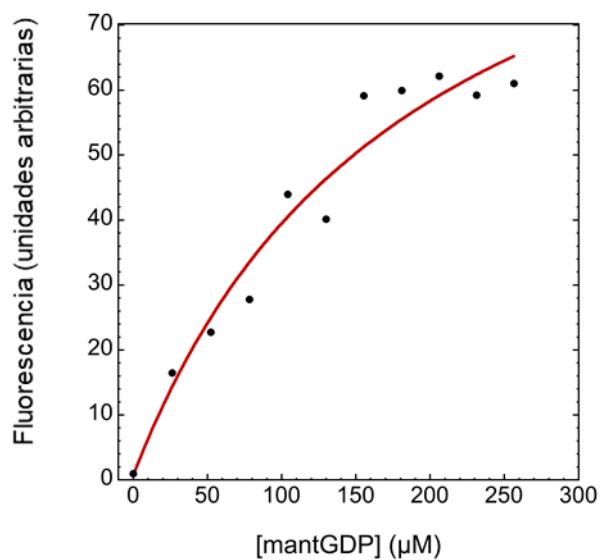


Figura 27. Interacción de Lsg1 con mant-GDP evaluada mediante FRET. La línea sólida representa el ajuste con un modelo de un sitio de unión.

El incremento en la señal de FRET para el mant-GTP fue de apenas el 7 % (Figura 26), un cambio muy pequeño especialmente si se tiene en cuenta la ubicación del triptófano 249, que se encuentra a 16 Å del nucleótido, y que el FRET puede darse entre donadores y aceptores que

se encuentran próximos (10-100 Å) (Lakowicz 2011). Sin embargo, a pesar de estar cercanos triptófano y nucleótido, pueden no encontrarse en la orientación adecuada; también se observa la presencia de un asa formada por los residuos 206-209; ambos factores pueden ser responsables de la disminución en la señal al interrumpir la transferencia de energía. Este comportamiento indica que pueden presentarse distintos cambios conformacionales en Lsg1 al unirse a los diferentes nucleótidos de guanina e impidió determinar la K_d para mant-GTP por esta técnica. Igualmente se llevó a cabo un control, evaluando la ausencia de interacción con un análogo fluorescente de adenina mant-AMP (mant-adenosín monofosfato), como referencia del comportamiento del FRET de la proteína con el grupo mant. Este control se llevó a cabo asumiendo que no se presenta unión con nucleótidos de adenina, como se determinó previamente por medio del apagamiento de la fluorescencia de los triptófanos (Figura 25). Como se evidencia en la Figura 28 no se observó un cambio en la señal de fluorescencia para el mant-AMP lo que sugiere una vez más que no se presenta unión al nucleótido de adenina y que el incremento en la señal en presencia de mant-GDP se debe principalmente al proceso de unión del nucleótido de guanina con la proteína.

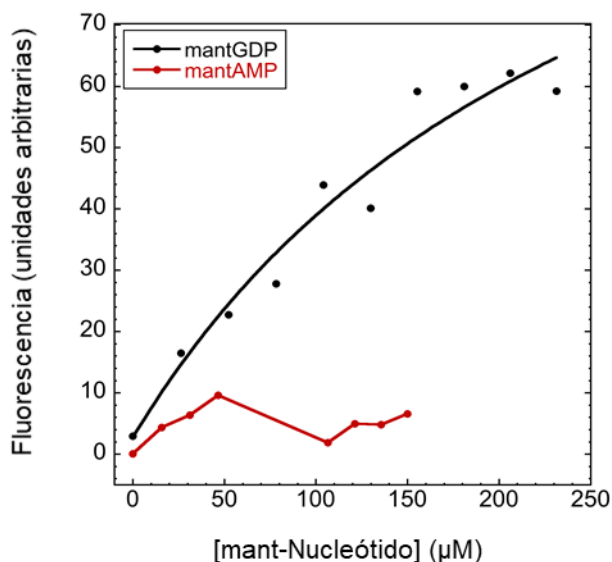


Figura 28. Diferencia en la emisión de FRET para mant-GDP y mant-AMP en presencia de Lsg1. El cambio en intensidad de la fluorescencia para mant-AMP (rojo) es pequeña comparada con la presentada por mant-GDP (negro).

7.6.2 Interacción de Lsg1 con nucleótidos de guanina en el complejo Lsg1•Nmd3•60S

Teniendo en cuenta los diferentes experimentos de fluorescencia discutidos anteriormente, se optó por medir el aumento de la señal de fluorescencia de los mant-nucleótidos al unirse a Lsg1 en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S mediante excitación directa del fluoróforo a 355 nm (Figura 29). No se consideraron los demás escenarios, ya que para el caso del decaimiento de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Lsg1 sería enmascarada por la emisión de los residuos de triptófano de Nmd3 y de las proteínas estructurales de la subunidad 60S. Mientras para el caso de FRET, sería difícil disectar la contribución en la disminución de la señal por el gran efecto de filtro interno originado por la absorbancia en la longitud de onda de excitación, no sólo de los mant-nucleótidos titulados, sino también del rRNA y las proteínas estructurales presentes en el complejo Nmd3•60S. Se obtuvieron los gráficos de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de nucleótido y se determinaron los valores de K_d empleando un modelo de un sitio de unión (Figura 29). La afinidad de Lsg1 por ambos nucleótidos de guanina, cuando está presente en el complejo Lsg1•Nmd3•60S, incrementa en comparación con Lsg1 libre. La K_d de Lsg1•Nmd3•60S para mantGTP correspondió a 22 μM , resultando en una afinidad cinco veces mayor que la obtenida para Lsg1 sola con GTP (108 μM), mientras la K_d obtenida para mant-GDP disminuyó 2.8 veces (62 μM). A pesar de la disminución de ambas constantes, el sistema Lsg1•Nmd3•60S desplaza aún más el equilibrio hacia la forma unida a GTP, presentándose 8 veces mayor comparado con la forma unida a GDP. La afinidad de Lsg1 por el análogo no hidrolizable $\text{GTP}\gamma\text{S}$ al estar presente en el complejo ternario también incrementó. Esto sugiere que el complejo funciona como un factor estabilizador de GTP (GSF) (Hauryliuk et al. 2008) para Lsg1 favoreciendo la interacción de la GTPasa con su sustrato. En general las GTPasas dependen de proteínas externas para activar la hidrólisis de GTP (GAPs). Este papel, para el caso de GTPasas asociadas a ribosomas, es realizado por el RNA ribosomal, seguido por el intercambio de GDP por GTP mediado por GEFs (Clementi & Polacek 2010). Para el caso de Lsg1 se ha sugerido que el RNA 25S, especialmente las G2261 y U2269 de la H69, con una hebra- β (residuos 135-175) de Lsg1 activa su catálisis (Malyutin et al. 2017; Kargas et al. 2019). Por lo tanto, es tentador especular que la partícula preribosomal Nmd3•60S tiene un doble propósito en la activación de Lsg1 con diferentes regiones que actúan sinérgicamente como GSF y GAP para aumentar la baja actividad de Lsg1.

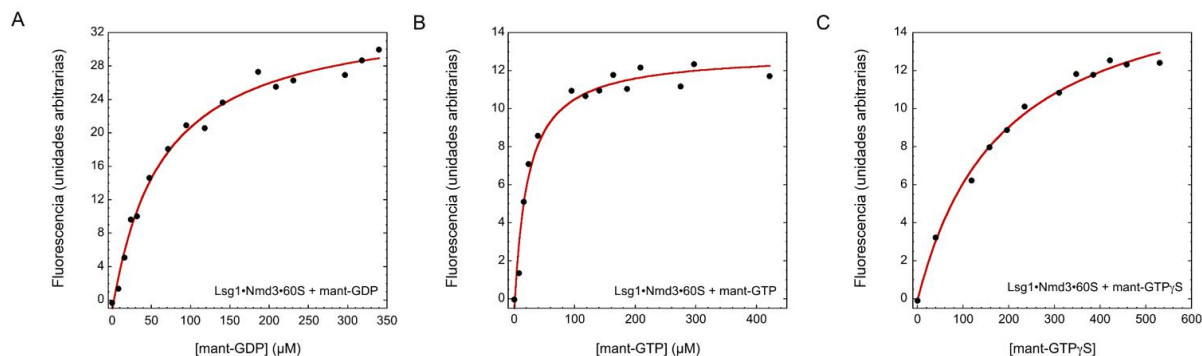


Figura 29. Unión de mant- guanin nucleótidos a Lsg1 en complejo con Nmd3 y la subunidad ribosomal 60S (Lsg1•Nmd3•60S). (A) mant-GDP. (B) mant-GTP. (C) mant-GTP γ S. Los mant-nucleótidos fueron excitados directamente a 335 nm y su emisión a 450 nm se graficó en función de la concentración de nucleótido. Las líneas representan el ajuste a un modelo de un sitio de unión.

Los valores de K_d obtenidos para Lsg1 sola en solución, así como los obtenidos en presencia de Nmd3 y la subunidad 60S determinados por medio de los diferentes métodos mencionados se resumen en la Tabla 9.

Una inspección más detallada de los espectros de emisión de los mant-nucleótidos unidos a Lsg1, sola en solución o en el sistema Lsg1•Nmd3•60S, evidenció una magnitud diferente en el aumento de la señal de fluorescencia de cada complejo GTPasa-Ligando (Figura 30). El aumento de la emisión de fluorescencia fue el mayor para el complejo Lsg1-mantGDP mientras que fue insignificante para Lsg1-mantGTP. Estas variaciones en la magnitud de la emisión sugieren que el entorno del nucleótido en el sitio de unión de Lsg1 es diferente y sólo puede ser resultado de que la proteína adopte diferentes conformaciones en cada complejo. Esto concuerda con los resultados presentados en la Figura 24 para los nucleótidos no modificados. Además, el máximo de la señal que presentan los mant-nucleótidos cuando se unen a Lsg1•Nmd3•60S difiere de cualquiera de los dos observados para la proteína libre, indicando que Lsg1 puede adoptar incluso, al menos, otra conformación cuando está presente en el complejo ternario, sin que sea posible establecer si la conformación en el sistema ternario difiere o es la misma para mant-GDP o mant-GTP. Por lo tanto, los resultados sugieren que se presentan cambios conformacionales en el ambiente donde ocurre la unión. De esta forma se asume que Lsg1 adopta al menos tres estados conformacionales claramente diferenciados: una conformación unida a GDP, una conformación unida a GTP y una tercera conformación unida a cualquiera de los dos nucleótidos en el complejo con Nmd3 y la subunidad 60S. Sin embargo, en

ausencia de información estructural no es posible discernir las diferencias o similitudes entre estos complejos. En la Figura 31 se presentan algunas de las interacciones entre Lsg1 y los nucleótidos estudiados en este trabajo.

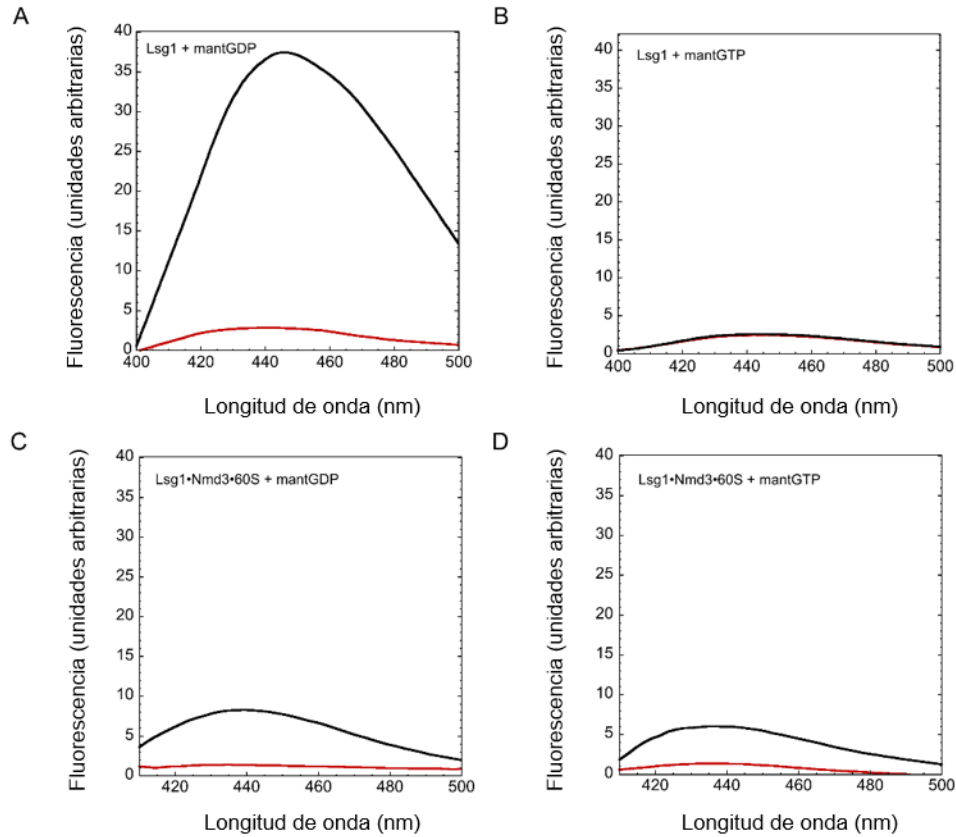


Figura 30. Espectros de emisión de mant-nucleótidos unidos a Lsg1 libre y en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S excitando directamente los grupos mant a 355 nm. Los trazos rojos representan la emisión del nucleótido cuando solo se ha formado el 5 % de complejo y los negros cuando se ha formado más del 90 % del complejo. Los trazos son representativos de dos experimentos independientes donde se promediaron cinco trazos.

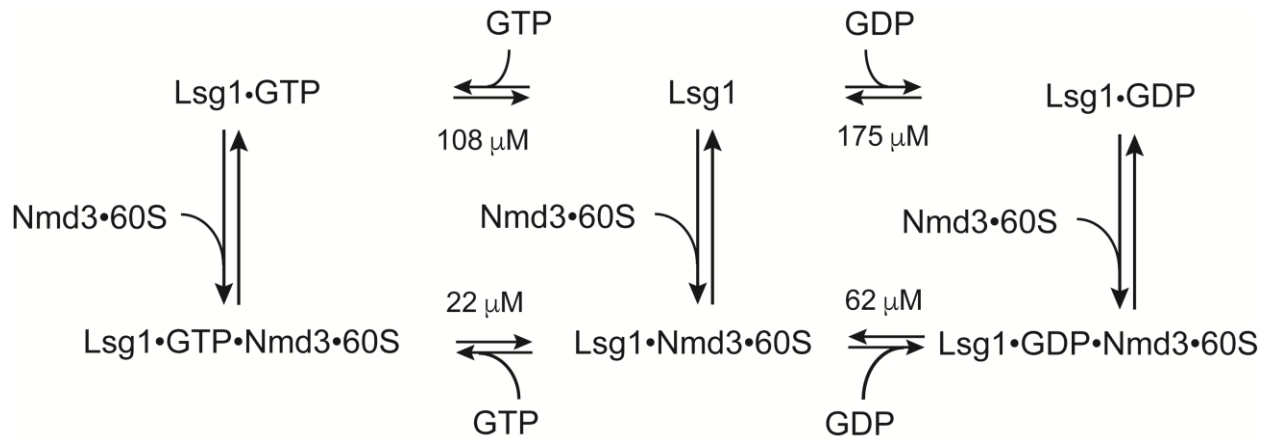


Figura 31. Esquema del equilibrio de interacción entre Lsg1 libre y en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S con nucleótidos de guanina.

En general en este trabajo se caracterizó la interacción entre los nucleótidos de guanina y Lsg1, sola y en complejo con Nmd3 y la subunidad 60S (Lsg1•Nmd3•60S), asemejándose al escenario de la proteína libre en el citoplasma de la célula y unida a la subunidad ribosomal pre-60S, respectivamente. La afinidad de Lsg1 por GTP es mayor que por GDP favoreciendo una población de enzima libre unida a su sustrato. El equilibrio se desplaza aún más hacia la conformación ligada a ambos nucleótidos de guanina cuando Lsg1 interactúa con el complejo Nmd3•60S, viéndose incrementada la afinidad cinco veces para GTP y 2.8 veces para GDP. Si además se considera que en el citoplasma el GTP se encuentra en un exceso de cuatro veces con respecto a GDP, se prevé que el conjunto celular de Lsg1 estará predominantemente unido a GTP. Esto sugiere que la formación del complejo entre Lsg1 y la partícula ribosomal Nmd3•60S promueve la unión de GTP a Lsg1, con Nmd3•60S actuando como un factor estabilizador de GTP (GSF). Es posible prever un mecanismo en el que principalmente todas las moléculas de Lsg1 incorporadas a la partícula Nmd3•60S se encuentran en el estado unido a GTP favorecido por la actividad estabilizadora de GTP de esta última. La posterior hidrólisis de GTP se produce y la resultante Lsg1 unida a GDP es liberada y se intercambia fácilmente el GDP por el GTP sin necesidad de un factor intercambiador específico. El intercambio de GDP por GTP está acompañado de un cambio conformacional en Lsg1 libre, la cual sufre un segundo cambio conformacional sucesivo al unirse al complejo Nmd3•60S. Sin embargo, con base en los experimentos realizados no fue posible discriminar si las conformaciones de Lsg1 en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S son diferentes en presencia de alguno de los dos nucleótidos.

7.7 Estudios de cinética enzimática de la GTPasa Lsg1

Las GTPasas son conocidas también como proteínas de unión a GTP debido a que suelen poseer baja actividad de hidrólisis. Por esta razón la medición de su actividad catalítica puede verse comprometida por actividades no específicas bien sea de la proteína de estudio o de las moléculas efectoras. Inicialmente se realizó un ensayo colorimétrico cualitativo de verde de malaquita con el cual se evidenció que Lsg1 libre hidroliza GTP y que su actividad se ve incrementada en presencia de Nmd3 y subunidades 60S, igualmente se observa que ambas biomoléculas, tanto Nmd3 como las subunidades 60S, carecen de actividad significativa hidrolítica hacia GTP. Estos resultados demuestran que la estimulación de Lsg1 proviene de la influencia de ambas moléculas efectoras y que además estas últimas carecen de actividad GTPasa no específica. Adicionalmente se verificó la ausencia de actividad ATPasa para Lsg1 (Figura 32).

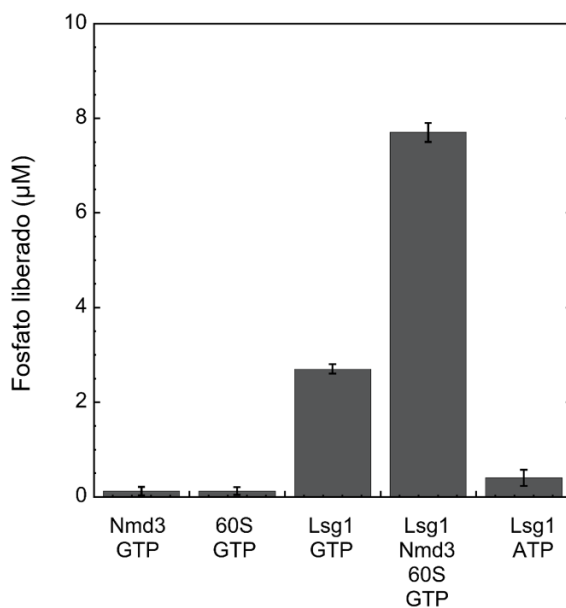


Figura 32. Fosfato inorgánico liberado por las diferentes biomoléculas (Nmd3, 60S y Lsg1) y el complejo Lsg1•Nmd3•60S en presencia de GTP o ATP. El fosfato fue medido con el ensayo de verde de malaquita como se indica en materiales y métodos. Los valores corresponden a un promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar representada en barras.

La cinética enzimática de Lsg1 en ausencia de biomoléculas efectoras se midió mediante un ensayo enzimático acoplado con la enzima nucleósido fosforilasa de purinas (PNP). El análisis cinético en estado estacionario demostró una cinética lenta pero saturable de hidrólisis de GTP con la consiguiente producción de fosfato inorgánico. Las curvas temporales de actividad se midieron por triplicado. Las velocidades iniciales (V_0) se graficaron en función de la concentración

de GTP y los datos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Figura 33). Los parámetros cinéticos obtenidos para Lsg1 de levadura correspondieron a $k_{cat}=1\pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ y $K_m=34\pm 2.4 \text{ }\mu\text{M}$, y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de $468 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La mayoría de las GTPasas tienen una baja actividad intrínseca en ausencia de moléculas efectoras como GAPs o GEFs con valores de k_{cat} tan bajos como $<0.03 \text{ min}^{-1}$ para las GTPasas tipo Ras (Bourne et al. 1991) que dependen en gran medida de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina y de proteínas activadoras de GTPasas para ser activadas. Por otro lado las GTPasas ribosomales y translacionales no necesariamente requieren de biomoléculas efectoras pues pueden llegar a presentar velocidades catalíticas más elevadas, como 3.6 min^{-1} para la Bms1 de levadura (Karbstein & Doudna 2006) o 5 min^{-1} para la EF-2 de rata (Carlberg et al. 1990).

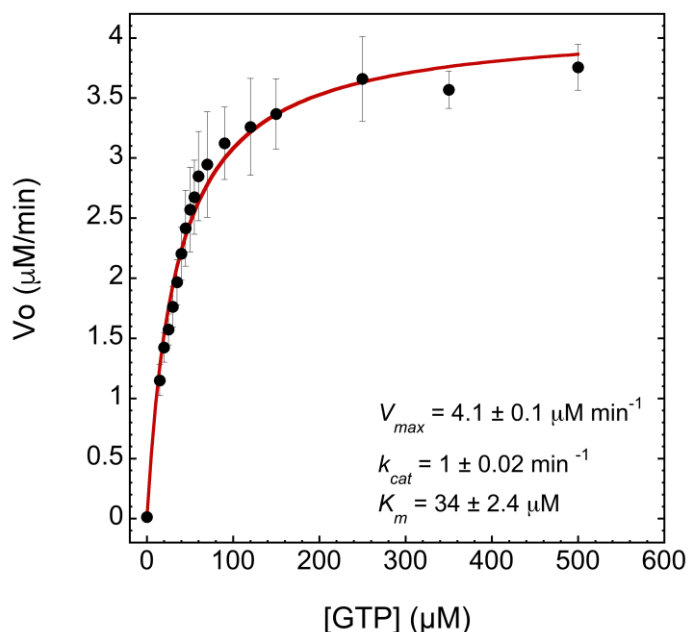
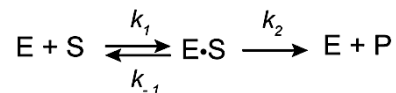


Figura 33. Caracterización de los parámetros cinéticos de Lsg1. Curva de velocidad inicial (V_o) en función de la concentración de GTP. La línea sólida representa el ajuste a los datos al modelo de Michaelis-Menten.

La velocidad de hidrólisis de GTP en estado estacionario observada para la proteína de levadura Lsg1, a pesar de ser baja, es un orden de magnitud superior a la reportada para otras GTPasas ribosomales circularmente permutadas como Nug2 de *S. cerevisiae* ($k_{cat} 0.09 \text{ min}^{-1}$, (Im et al. 2011)) o el ortólogo de Lsg1 de *Arabidopsis thaliana* Lsg1-2 ($k_{cat} 0.13 \text{ min}^{-1}$, (Weis et al. 2014)). Además, el aumento de la velocidad de primer orden k_{cat}/k_{uncat} para la hidrólisis de GTP corresponde a $10^{5,6}$, un aumento similar notificado anteriormente para EFL1, otra GTPasa

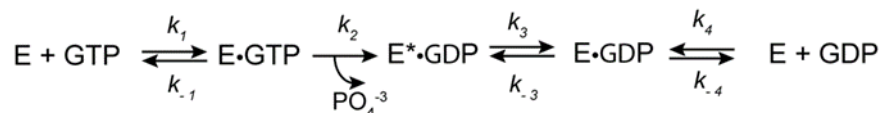
ribosomal (Gijsbers et al. 2013). La hidrólisis de GTP por Lsg1 con múltiples recambios sugiere que la liberación de GDP es espontánea con una baja afinidad de unión, como se confirma con los experimentos de unión mostrados en la Tabla 9. Informes previos han reportado que Lsg1 de levadura recombinante expresada de manera similar no presentó una actividad detectable de hidrólisis de GTP y esta sólo se hizo evidente cuando se reconstituyó en un complejo con Nmd3 y la subunidad ribosomal 60S (Malyutin et al. 2017). Estos datos contrastan, no sólo con los resultados presentados en este trabajo en la Figura 33, sino también con otras observaciones que muestran que Lsg1 de humano (Reynaud et al. 2005) y de *A. thaliana* (Weis et al. 2014) tienen actividad de GTPasa *in vitro*. Esto sugiere que, a pesar de ser baja, todos los miembros de la familia de proteínas Lsg1 tienen actividad intrínseca de GTPasa y la discrepancia con los resultados reportados por Malyutin y colaboradores puede deberse a la baja concentración de la enzima utilizada en el ensayo (un orden de magnitud menor).

La constante de disociación (K_d) es usada comúnmente para evaluar la fuerza, y por lo tanto la afinidad de unión entre una biomolécula y su ligando o sustrato. Cuando se trata de enzimas, el equilibrio de disociación de un ligando a menudo se relaciona con reacciones parciales de su ciclo catalítico. La constante cinética de Michaelis-Menten K_m , a menudo puede ser mal interpretada como la constante de disociación del sustrato, porque en el modelo más simple



K_m se define como $\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$ y en la condición específica en donde $k_{-1} \gg k_2$ se tiene que

$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d$. Esta relación implica además que el valor de la K_m será siempre igual o mayor que el de la K_d . Sin embargo los mecanismos de unión y catálisis pueden ser más complejos que el planteado anteriormente, incluyendo, si la unión de enzima y sustrato ocurre en diferentes pasos o si existen cambios conformacionales. En la presente caracterización de Lsg1, La K_m medida es tres veces menor que la K_d para GTP, sugiriendo que el esquema cinético mencionado es insuficiente para describir el comportamiento de Lsg1. Además, si se tiene en cuenta la observación de que la conformación de Lsg1 unida a GDP es diferente a la de la enzima libre o unida a GTP, un mecanismo más probable podría ser



en el que la liberación del fosfato inorgánico conlleva a un equilibrio irreversible en una dirección y E*•GDP representa un estado conformacional único y distinguible.

La K_m que describe este equilibrio sería la presentada en la Ecuación (7) (Johnson 1992).

$$K_m = \frac{k_{-1}(k_3k_4) + (k_2k_3k_4)}{k_1(k_2(k_{-3} + k_4 + k_3) + k_3k_4)} \quad \text{Ecuación (7)}$$

Considerando esta expresión es claro que dependiendo de las constantes intrínsecas de velocidad la K_m puede ser menor que, mayor que o igual a la K_d determinada para el sustrato, ya que es una función compleja que incluye todas las reacciones que ocurren en el proceso. Las constantes relacionadas con las reacciones de los pasos individuales como la constante de disociación de la unión al sustrato se encuentran inmersas en ella y no pueden ser resueltas. Además, los valores de K_d obtenidos en este trabajo (Tabla 9) se determinaron mediante mediciones en equilibrio y por ello no fue posible obtener información mecanística del proceso y el valor de K_d por GTP representa la constante de disociación global que contienen ambas constantes, la del proceso de unión y la del cambio conformacional. Estas limitaciones pueden superarse examinando la ruta de reacción usando métodos cinéticos que estudian el curso del tiempo de la reacción antes de alcanzar el estado estacionario, en donde la enzima es examinada como un reactivo estequiométrico.

8 CONCLUSIONES

- La interacción de Lsg1 con los nucleótidos de guanina presentó una afinidad por GTP mayor que por GDP favoreciendo una población de enzima unida a su sustrato. El equilibrio se desplaza aún más hacia la conformación ligada a GTP cuando Lsg1 interactúa con el complejo Nmd3•60S, resultando en un incremento de cinco veces la afinidad por sustrato. Por su parte, la afinidad por GDP incrementa 2.8 veces.
- La formación del complejo entre Lsg1 y la partícula ribosomal Nmd3•60S promueve la unión de GTP a Lsg1, ya que se ve disminuida su constante de disociación, por lo tanto Nmd3•60S actúa como un factor estabilizador de GTP (GSF). Por consiguiente las moléculas de Lsg1 incorporadas a la partícula Nmd3•60S se encuentran principalmente en el estado unido a GTP.
- El intercambio de GDP por GTP probablemente está acompañado de un cambio conformacional en Lsg1 libre, la cual sufre un segundo cambio conformacional sucesivo al unirse al complejo Nmd3•60S. Sin embargo no fue posible discriminar si las conformaciones de Lsg1 en el sistema ternario Lsg1•Nmd3•60S son diferentes en presencia de alguno de los dos nucleótidos, GTP o GDP.
- La caracterización de la cinética enzimática de Lsg1 libre demostró una modesta constante catalítica, comparable con otras GTPasas involucradas en la biogénesis ribosomal y la traducción. La catálisis incrementa al unirse al complejo Nmd3•60S. Así pues, la partícula Nmd3•60S cumple un doble propósito en la activación de Lsg1 actuando como proteína activadora de GTPasa (GAP), así como factor estabilizador de GTP.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Algire, M.A. et al., 2002. Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA*, 8(3), pp.382–397. Available at: <https://doi.org/10.1017/s1355838202029527>.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349, pp.117–127. Available at: <https://doi.org/10.1038/349117a0>.
- Britton, R.A., 2009. Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), pp.155–176. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073225>.
- Carlberg, U., Nilsson, A. & Nygard, O., 1990. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *European Journal of Biochemistry*, 191(3), pp.639–645. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19169.x>.
- Clementi, N. & Polacek, N., 2010. Ribosome-associated GTPases: the role of RNA for GTPase activation. *RNA Biology*, 7(5), pp.521–527. Available at: <https://doi.org/10.4161/rna.7.5.12467>.
- Dingwall, C. & Laskey, R.A., 1986. Protein import into the cell nucleus. *Annual Review of Cell Biology*, 2(1), pp.367–390. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.02.110186.002055>.
- Elison, G.L. et al., 2018. Insights into bidirectional gene expression control using the canonical GAL1/GAL10 promoter. *Cell Reports*, 25(3), pp.737–748. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.050>.
- Finch, A.J. et al., 2011. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes & Development*, 25(9), pp.917–929. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.623011>.
- Gadal, O. et al., 2001. Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), pp.3405–3415. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.21.10.3405-3415.2001>.
- Gijsbers, A., 2013. *Caracterización de la actividad enzimática de las GTPasas ribosomales EFTUD1/EFL1*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gijsbers, A. et al., 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(3), pp.349–354. Available at:

- <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.077>.
- Hauryliuk, V., Hansson, S. & Ehrenberg, M., 2008. Cofactor dependent conformational switching of GTPases. *Biophysical Journal*, 95(4), pp.1704–1715. Available at: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127290>.
- Hedges, J., West, M. & Johnson, A.W., 2005. Release of the export adapter , Nmd3p , from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO Journal*, 24(3), pp.567–579. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600547>.
- Ho, J.H., Kallstrom, G. & Johnson, A.W., 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *The Journal of Cell Biology*, 151(5), pp.1057–1066. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.1057>.
- Hofer, A., Bussiere, C. & Johnson, A.W., 2007. Mutational analysis of the ribosomal protein Rpl10 from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(45), pp.32630–32639. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M705057200>.
- Huber, D. et al., 2011. SecA Interacts with ribosomes in order to facilitate posttranslational translocation in bacteria. *Molecular Cell*, 41(3), pp.343–353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.028>.
- Im, C.H. et al., 2011. Nuclear/Nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of YlqF/YawG GTPases function in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(10), pp.8620–8632. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200816>.
- Johnson, K.A., 1992. 1 Transient-State kinetic analysis of enzyme reaction pathways. In D. S. Sigman, ed. *The Enzymes*. Academic Press, pp. 1–61. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874604708600190>.
- Karbstein, K., 2007. Role of GTPases in ribosome assembly. *Biopolymers*, 87(1), pp.1–11. Available at: <https://doi.org/10.1002/bip.20762>.
- Karbstein, K. & Doudna, J.A., 2006. GTP-dependent formation of a ribonucleoprotein subcomplex required for ribosome biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 356(2), pp.432–443. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.052>.
- Kargas, V. et al., 2019. Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *eLife*, 8, pp.1–26. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.44904>.
- Kressler, D., Hurt, E. & Baßler, J., 2017. A puzzle of life: crafting ribosomal subunits. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(8), pp.640–654. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.05.005>.
- Kressler, D., Hurt, E. & Baßler, J., 2010. Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica*

- Acta - Molecular Cell Research*, 1803(6), pp.673–683. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.10.009>.
- de la Cruz, J., Karbstein, K. & Woolford Jr, J.L., 2015. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), pp.93–129.
- Lakowicz, J.R., 2011. *Principles of fluorescence spectroscopy* 3rd ed., Springer. Available at:
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- Leipe, D.D. et al., 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), pp.41–72. Available at:
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>.
- Ma, C. et al., 2016. Structural dynamics of the yeast Shwachman- Diamond syndrome protein (Sdo1) on the ribosome and its implication in the 60S subunit maturation. *Protein & Cell*, 7(3), pp.187–200. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0242-5>.
- Ma, C. et al., 2017. Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(3), pp.214–220. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3364>.
- Malyutin, A.G. et al., 2017. Nmd3 is a structural mimic of eIF5A , and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 36(7), pp.854–868. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201696012>.
- Maracci, C. et al., 2014. Ribosome-induced tuning of GTP hydrolysis by a translational GTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), pp.14418–14423. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1412676111>.
- Maracci, C. & Rodnina, M. V., 2016. Review Translational GTPases. *Biopolymers*, 105(8), pp.463–475. Available at: <https://doi.org/10.1002/bip.22832>.
- Marcial, N.G., 2016. *Clonación y expresión recombinante de la GTPasa ribosomal Lsg1*. Universidad Nacional Autónoma de México. Available at:
<http://132.248.9.195/ptd2016/julio/0747118/Index.html>.
- Misconai, A. et al., 2018. BeStSel : a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, 46, pp.315–322. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
- Möller, M. & Denicola, A., 2002. Study of protein-ligand binding by fluorescence. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30(5), pp.309–312. Available at:
<https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030050089>.
- Munoz, A.M. et al., 2017. Active yeast ribosome preparation using monolithic anion exchange

- chromatography. *RNA Biology*, 14(2), pp.188–196. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2016.1270004>.
- Nakashima, M. et al., 2017. Long and branched polyamines are required for maintenance of the ribosome, tRNA(His) and tRNA(Tyr) in *Thermus thermophilus* cells at high temperatures. *Genes to Cells*, 22(7), pp.628–645. Available at: <https://doi.org/10.1111/gtc.12502>.
- Nakhoul, H. et al., 2014. Ribosomopathies: mechanisms of disease. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 7, pp.7–16. Available at: <https://doi.org/10.4137/CMBD.S16952>.
- Narla, A. & Ebert, B.L., 2010. Ribosomopathies : human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, 115(16), pp.3196–3205. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-178129>.
- Nissan, T.A. et al., 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *The EMBO Journal*, 21(20), pp.5539–5547. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf547>.
- Pace, N.C. et al., 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4, pp.2411–2423. Available at:
<https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>.
- Pai, E.F. et al., 1990. 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*, 9(8), pp.2351–2359. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07409.x>.
- Paleskava, A., Konevega, A.L. & Rodnina, M. V., 2012. Thermodynamics of the GTP-GDP-operated Conformational Switch of Selenocysteine-specific Translation Factor SelB *. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp.27906–27912. Available at:
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.366120>.
- Panse, V.G. & Weirich, C.S., 2016. *Eukaryotic ribosome assembly and export*, Elsevier Ltd. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944474300402>.
- Pausch, P. et al., 2015. Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones. *Nature Communications*, 6(7494), pp.1–15. Available at:
<https://doi.org/10.1038/ncomms8494>.
- Petsco, G.A. & Ringe, D., 2014. *Protein structure and function* Primera Ed. E. Lawrence & M. Robertson, eds., London: New Science Press Ltd. Available at:
<https://global.oup.com/academic/product/protein-structure-and-function-9780199556847?cc=za&lang=es#:~:text=Written by two outstanding names,function are deduced from sequence.>
- Pisareva, V.P. et al., 2006. Kinetic analysis of interaction of eukaryotic release factor 3 with

- guanine nucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), pp.40224–40235. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M607461200>.
- Reynaud, E.G. et al., 2005. Human Lsg1 defines a family of essential GTPases that correlates with the evolution of compartmentalization. *BMC Biology*, 3(21), pp.1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-21>.
- Rudoni, S. et al., 2001. Role of guanine nucleotides in the regulation of the Ras/cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1538(2–3), pp.181–189. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(01\)00067-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(01)00067-2).
- Sengupta, J. et al., 2010. Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. *The Journal of Cell Biology*, 189(7), pp.1079–1086. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201001124>.
- Shasmal, M. et al., 2016. E. coli metabolic protein aldehyde-alcohol dehydrogenase-E binds to the ribosome: a unique moonlighting action revealed. *Scientific Reports*, 6(19936), pp.1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep19936>.
- Takada, H. et al., 2020. The C-Terminal RRM/ACT domain is crucial for fine-tuning the activation of “Long” RelA-SpoT homolog enzymes by ribosomal complexes. *Frontiers in Microbiology*, 11, pp.1–16. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00277>.
- Takakura, A. et al., 2000. Involvement of a small GTP-binding protein (G protein) regulator, small G protein GDP dissociation stimulator, in antiapoptotic cell survival signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 11(5), pp.1875–1886. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1875>.
- Teng, T. et al., 2013. Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Molecular and Cellular Biology*, 33(23), pp.4660–4671. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.01174-13>.
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S. & Hurt, E., 2013. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(21), pp.4815–4821. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.111948>.
- Ting, Y.-H. et al., 2017. Bcp1 is the nuclear chaperone of Rpl23 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(2), pp.585–596. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.747634>.
- Traut, T.W., 1994. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140, pp.1–22. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00928361>.

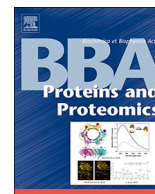
- Verstraeten, N. et al., 2011. The universally conserved prokaryotic GTPases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), pp.507–542. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-11>.
- Warner, J.R., 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), pp.437–440. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01460-7).
- van de Weert, M., 2010. Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: common errors. *Journal of Fluorescence*, 20, pp.625–629. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0572-x>.
- Weis, B.L. et al., 2014. The 60S associated ribosome biogenesis factor LSG1-2 is required for 40S maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 80(6), pp.1043–1056. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.12703>.
- Weis, F. et al., 2015. Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(11), pp.914–919. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3112>.
- Wittinghofer, A. & Vetter, I.R., 2011. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annual Review of Biochemistry*, 80, pp.943–971. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062708-134043>.
- Woolford Jr, J.L. & Baserga, S.J., 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), pp.643–681. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197>.

10 APÉNDICE

10.1 Oligonucleótidos

Oligonucleótidos empleados en los procedimientos de biología molecular; se presentan los sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción (subrayado sencillo) y la secuencia codificante para reconocimiento de la proteasa TEV (subrayado doble).

Oligo	Secuencia (5'-3')	Sitios de reconocimiento
PFLsg1T	CGCG <u>GGATCCATGGG</u> TCCACCAAAGAAGC TCCAAGAAATG	<i>Nco</i> I <i>Bam</i> HI
PRLsg1T	CCGCTCGAGGCCCTGGAAGTACAGGTTTTC <u>GGATCC</u> ATTATTTTCAATGCTAAAACTTTG`	<i>Xho</i> I TEV <i>Bam</i> HI
PFGMHTN	CGAATAAACACACATAAATAAAC <u>CCATGGG</u> GTA AAATCGAAGAAGGTAACTGGTAATCT	<i>Nco</i> I
PRGMHTN	CAGGTTTTCAGACCC <u>AGATC</u> IGTTAACTTACT GCTGAGATTCAACGGGTGTGTTCTCG	<i>Bgl</i> III



Characterisation of the interaction of guanine nucleotides with ribosomal GTPase Lsg1



Juliana Jaramillo-Ramírez, Nancy Marcial-Bazaldua, Nuria Sánchez-Puig*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Lsg1
Guanine nucleotides
Fluorescence spectroscopy
Binding affinity
GTPases

ABSTRACT

Ribosome biogenesis in eukaryotes requires the participation of several transactivation factors that are involved in the modification, assembly, transport and quality control of the ribosomal subunits. One of these factors is the Large subunit GTPase 1 (Lsg1), a protein that acts as the release factor for the export adaptor named Nonsense-mediated mRNA decay 3 protein (Nmd3) and facilitates the incorporation of the last structural protein uL16 into the 60S subunit. Here, we characterised the recombinant yeast Lsg1 and studied its catalysis and binding properties for guanine nucleotides. We described the interaction of Lsg1 with guanine nucleotides alone and in the presence of the complex Nmd3•60S using fluorescence spectroscopy. Lsg1 has a greater affinity for GTP than for GDP suggesting that in the cell cytoplasm it exists mainly bound to the former. In the presence of 60S subunits loaded with Nmd3, the affinity of Lsg1 for both nucleotides increases but to a larger extent towards GTP. From this observation together with the excess of GTP present in the cytoplasm of exponentially growing cells over that of GDP, we can infer that the pre-ribosomal particle composed by Nmd3•60S acts as a GTP Stabilising Factor for Lsg1. Additionally, Lsg1 undergoes different conformational changes depending on its binding partner or the guanine nucleotides it interacts with. Steady-state kinetic analysis of free Lsg1 indicated slow GTP hydrolysis with values of k_{cat} 1 min^{-1} and K_m of $34 \mu\text{M}$.

1. Introduction

Ribosomes are highly conserved ribonucleoprotein nanomachines responsible for the synthesis of proteins. In yeast, ribosomes contain 4 rRNAs and 79 different structural proteins. Ribosomal subunits are produced in an intricate process known as ribosome biogenesis which is tightly controlled. More than 200 trans-acting factors and 76 small nucleolar RNAs, that are not part of the mature ribosome structure, transiently associate with the assembling ribosomes to make them functional [1–4]. In eukaryotic cells, ribosome biogenesis begins in the nucleolus and the final maturation occurs in the cytoplasm, where trans-acting factors are removed, and the last structural ribosomal proteins are added. Amongst these factors there are shuttling proteins that travel from the nucleus to the cytoplasm bound to pre-ribosomal particles and are recycled back into the nucleus to participate in new rounds of ribosome biogenesis. Recycling of these factors requires

specialised cytoplasmic proteins referred to as release factors. Many of these are associated with nucleoside triphosphate hydrolysing enzymes such as GTPases and ATPases [5]. Six GTPases have been described to participate in ribosome biogenesis, two of them, Lsg1¹ and Efl1² act consecutively in the last cytoplasmic maturation steps of the 60S ribosomal subunit to complete the peptidyl transferase centre (PTC) [6]. The nascent 60S particle is exported from the cell nucleus after recruiting the nuclear export factor Nmd3³ that contains a leucine-rich nuclear export sequence (NES) recognized by Crm1, the exportin that mediates nuclear export together with the small GTPase Ran [7,8]. Nmd3 binds to the joining interface of the 60S subunit along the tRNA corridor from the uL1 protein at the L1 stalk all the way down through the exit site and the PTC to interact at the opposite end with the anti-association factor eIF6 (yeast Tif6) while also making contact with Lsg1 [6]. Nmd3 is released after the incorporation of the eL40 and uL16 ribosomal proteins and requires the GTPase activity of Lsg1 [9–11].

Abbreviations: Lsg1, Large subunit GTPase 1; Nmd3, Nonsense-mediated mRNA decay 3 protein; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; GppNHP, guanosine 5'-(β,γ -imido)-triphosphate; GTP γ S, guanosine 5'-O-[γ -thio]triphosphate; PTC, peptidyl transferase centre

* Corresponding author.

E-mail address: nuriasp@unam.mx (N. Sánchez-Puig).

¹ Large subunit GTPase 1.

² Elongation factor like-1.

³ Nonsense-mediated mRNA decay 3.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140538>

Received 28 February 2020; Received in revised form 6 August 2020; Accepted 3 September 2020

Available online 09 September 2020

1570-9639/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Proper loading of uL16 and completion of the PTC requires a series of local rearrangements in the 25S rRNA and surrounding structural proteins. Incorporation of eL40 triggers a rearrangement on H89 creating the space to recruit uL16 whose packing promotes a rotation of H38 unlocking it from the C-terminus of Nmd3. In turn, release of Nmd3 from the P-loop of uL16 results in a conformational shift that dislodges Nmd3 by competing for an overlapping binding site to complete the PTC [6,12].

The knowledge acquired from the structural reconstruction of the different stages in which Nmd3 and Lsg1 participate represents a milestone in our understanding of the assembly of the PTC. Nevertheless, several aspects of the process have yet to be elucidated. For instance, the rearrangements mentioned above are not sufficient to release Nmd3, since it remains joined to the 60S subunit throughout its interaction with eIF6 and Lsg1. The mechanism by which the release of Nmd3 is completed and the precise role of Lsg1 and its GTPase activity remains unclear. Lsg1 belongs to the TRAFAC (TRANslation FACTors) class of proteins [13] with a circularly permuted G-domain whose motifs appear in the order of G4-G5-G1-G2-G3 [14]. This domain in the GTPases undergoes large conformational changes during the functional cycle of the enzyme, acting as molecular switches that alternates from an inactive state bound to GDP to an active state in complex with GTP. The GTPase activity of Lsg1 increases when bound to the 60S subunit loaded with Nmd3 [15], and it has been proposed that the interaction of nucleotide G2261 in the helix 69 of the 25S rRNA with the G2 sub-domain of Lsg1 may regulate hydrolysis by locking it in the GTP bound conformation. However, the mechanism that drives the release of Lsg1 from the 60S subunit is still unknown, as is the interplay in the conformational changes occurring in Lsg1 upon binding to nucleotides or other cofactors such as the Nmd3·60S particle in this process.

In this study, we characterised the binding of *Saccharomyces cerevisiae* Lsg1 to guanine nucleotides alone and bound to the complex Nmd3·60S subunit using biophysical techniques. Free in solution, Lsg1 is predominantly bound to GTP, while binding to the pre-60S subunit loaded with Nmd3 further shifts the equilibrium towards the GTP-bound form. This suggests that the pre-ribosomal 60S subunit acts as a GTP stabilising factor (GSF) for Lsg1. The protein undergoes distinct conformational changes on the nucleotide binding pocket upon binding to either GTP or GDP whether in the free state or bound to the complex Nmd3·60S.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification of biological molecules

2.1.1. Lsg1-TEV-6xHis

S. cerevisiae Lsg1 was expressed recombinantly in *Escherichia coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL. The Lsg1 coding sequence was fused to a TEV protease cleavage site at the C-terminus followed by a 6xHis-tag and cloned into the expression vector pET28. Cells were grown in LB medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin and 50 µg/mL chloramphenicol. Protein expression was induced at an OD_{600nm} of 0.8 by the addition of 0.5 mM IPTG for 18 h at 18 °C. Cells were lysed by sonication in Lysis buffer A (50 mM Hepes pH 6.5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.001% triton X-114, 20 mM imidazole). Cell debris was removed by centrifugation at 30,996 × g for 50 min and the soluble fraction purified through immobilized metal affinity chromatography (HisTrap FF, GE Healthcare). The bound protein was eluted using Lysis buffer A supplemented with 250 mM imidazole, concentrated and further purified on a size exclusion chromatography using a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE Healthcare) previously equilibrated with Lysis buffer A lacking imidazole. Fractions containing the Lsg1 protein were pooled together, concentrated and stored at –80 °C until further use. Protein purity was judged by SDS-PAGE and measuring the absorbance ratio 260/280 nm to assess nucleic acid contamination. Purified Lsg1 sample showed an

A_{260/280 nm} ~ 0.68; a value expected for a protein solution free of nucleic acids [16]. Final yield corresponded to 4 mg of pure recombinant Lsg1 protein per litre of culture.

2.1.2. MBP-10xHis-TEV-Nmd3

The *S. cerevisiae* Nmd3 coding sequence was fused at the N-terminus to the *malE* gene encoding the *E. coli* Maltose-Binding Protein (MBP) followed by a 10xHis-tag and a TEV recognition site. The expression cassette, MBP-10xHis-TEV-Nmd3, was cloned in the vector pRS426 under the control of the *Gal 1/10* divergent promoter [17] and the *MATA 3'UTR*. Expression was carried out in the *S. cerevisiae* strain BCY123. Cells were grown in SD-URA medium supplemented with 0.5% glucose and 100 µM ZnCl₂ until O.D_{600nm} reached 1.8 and protein expression was induced with 2% galactose for 18 h at 30 °C. The cell pellet was resuspended in Lysis buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM KCl, 1 µM ZnCl₂, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.001% triton X-114, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidine) and disrupted by friction with glass beads. Lysate was cleared by centrifugation at 30,996 × g for 50 min. The soluble fraction was purified using an amylose resin and eluted with a modified Lysis buffer B containing 500 mM NaCl and 20 mM maltose. Samples containing Nmd3 were concentrated and stored in a buffer composed of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 µM ZnCl₂, 10% glycerol at –80 °C until further use. Protein purity was assessed by SDS-PAGE and measuring the absorbance ratio 260/280 nm.

2.1.3. Purification of 60S subunits from *S. cerevisiae*

Purification of 60S ribosomal subunits was carried out using the methodology proposed by Algire and collaborators with some modifications [18]. Yeast cells JD1370 (*MATa trp1 ura3 leu2 pep4::HIS3 nuc1::LEU2* [19]) were grown in 1 L of YEPD until OD_{600nm} reached a value of 1 and were immediately cooled on ice with 100 µg/mL cycloheximide for 15 min. Cells were washed with water and resuspended in Lysis buffer C (100 mM potassium acetate, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM magnesium acetate, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine) with 1 mg/mL heparin. Cells were disrupted by friction with glass beads and the lysate was cleared by centrifugation at 11,768 × g and 4 °C for 20 min. The clarified lysate was layered on top of 2.5 mL sucrose cushions (100 mM potassium acetate, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM magnesium acetate, 1 M sucrose, 500 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine) and centrifuged for 2.5 h at 222,592 × g in a 70Ti rotor (Beckman Coulter). The pellet was resuspended in High Salt Wash buffer consisting of Lysis buffer C supplemented with 800 mM KCl and 0.5 mM EDTA. Insoluble material was removed by centrifugation and the soluble material was layered over 2.5 mL sucrose cushions and centrifuged for 2.5 h at 222,592 × g, as mentioned above. The pellet was resuspended in Subunit separation buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 µM MgCl₂, 500 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine) and stirred on ice for 1 h to allow the dissociation of the ribosomal subunits. 50 optical units measured at 254 nm were loaded on top of a 10–40% sucrose gradient prepared in 50 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 µM MgCl₂, 500 mM KCl, 2 mM DTT and centrifuged for 6 h at 70,358 × g in a 45Ti rotor (Beckman Coulter). Fractions containing the 60S subunits were pooled together and pelleted at 222,592 × g for 3 h in a 70Ti rotor. Subunits were resuspended in Storage buffer (100 mM potassium acetate, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM magnesium acetate, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine, 250 mM sucrose) and stored at –80 °C until further use.

2.2. Circular dichroism spectroscopy (CD)

The CD spectra of 2 µM Lsg1 alone or in the presence of 150 µM guanine nucleotides were recorded in 25 mM Phosphate pH 6.6, 50 mM NaCl at 25 °C in the far-UV region with a Chirascan V100 spectropolarimeter (Applied Photophysics) equipped with a temperature

controller. Wavelength scans were recorded using a quartz cuvette of 1 mm pathlength from 260 to 190 nm, with an increase of 1 nm per step, an averaging time of 5 s and a bandwidth of 1 nm. Each spectrum corresponds to the average of five repetitive scans and was corrected by subtracting the CD signal of the buffer over the same wavelength region. Secondary structure content was estimated by deconvolution of the spectrum with the BeStSel program [20]. Temperature dependence of ellipticity was followed by monitoring the signal at 208 nm from 20 to 80 °C, with a bandwidth of 1 nm, a response time of 16 s, a sample interval of 0.2 °C and a scan rate of 1 °C/min.

2.3. GTPase assay

The GTPase activity of Lsg1 was measured at 25 °C using the Enzchek Phosphate Assay kit (Molecular Probes) following the manufacturer's instructions and those described by Webb with few modifications [21]. Standard reactions consisted of 100 µL solution containing 4 µM of Lsg1, 0.3 mM MESG, 1.0 U purine nucleoside phosphorylase (PNP) and the indicated amounts of GTP in reaction buffer 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂. Absorbance as a function of time was monitored at 360 nm in a Cary 60 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies). The background slope was recorded prior to the addition of the GTPase and subtracted from the sample signals. The slope of the measured time course corresponded to the GTP hydrolysis rate. The concentration of phosphate released in the reaction was estimated using a molar absorption coefficient at 360 nm of 14,386 M⁻¹ cm⁻¹ obtained from an experimental standard curve. Initial velocities were calculated using the portion of the curve corresponding to the initial 5% of consumed product. Data from three independent experiments were fitted using nonlinear least squares regression to the Michaelis-Menten model with the program KaleidaGraph 4.5. Qualitatively, GTP hydrolysis was monitored using the green malachite colorimetric assay as described by Cogan et al. [22]. 50 µL reaction mixtures consisted of 1.5 µM Lsg1 or Nmd3, 0.3 µM yeast 60S ribosomal subunits, and combinations thereof, and 100 µM GTP or ATP. Buffer composition corresponded to that of the storage buffer described in the 60S subunit purification section supplemented with 8 mM putrescine and 1 mM spermidine. Each reaction mixture was incubated for 40 min at 30 °C before developing the colorimetric reaction.

2.4. Steady state fluorescence measurements

The interaction of free Lsg1 with guanine nucleotides was measured at 25 °C using two different buffer systems: 1) 50 mM Hepes-KOH pH 6.5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.001% triton X-114 and 2) 100 mM potassium acetate, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10.5 mM magnesium acetate, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidine, 250 mM sucrose, 8 mM putrescine and 1 mM spermidine. The rationale behind the implementation of these buffers follows the observation that Lsg1 has a high tendency to aggregate that is alleviated by the presence of high salt concentrations while polyamines have been shown to play a role in the stability of ribosomes [23] and favour the binding of effector proteins [24]. The second buffer was used for measuring the interaction of Lsg1 with guanine nucleotides in the presence of Nmd3•60S subunits.

2.4.1. Interaction of Lsg1 with guanine nucleotides

The experiments were carried out at 25 °C on a spectrofluorometer (Olis, DM 45) using a quartz cuvette of 10 mm pathlength. The equilibrium dissociation constant (K_d) was measured for the interaction between Lsg1 and the following guanine nucleotides: GTP, GDP, and the non-hydrolysable analogues GTP γ S and GppNHp. Increasing amounts of guanine nucleotides (0.5–1 mM stock) were titrated into a solution containing 0.5 µM Lsg1. Binding was followed by recording the fluorescence quenching of the Lsg1 tryptophan residues after excitation at

295 nm. Dilution at the end of each titration was no larger than 5% of the initial volume. Data were corrected by inner filter effect as described in [25] using a molar absorption coefficient for the nucleotides at 295 nm of 1.2 mM⁻¹ cm⁻¹. Maximum emission at 332 nm was plotted as a function of the nucleotide concentration and fitted to a one binding site model $Y = Fi + (A * X / (K_d + X))$ to estimate the dissociation constant, where X is the ligand concentration, Y is the measured fluorescence intensity, Fi is initial fluorescence signal, A is the signal amplitude and K_d is the equilibrium dissociation constant.

2.4.2. Interaction of the ternary complex Lsg1•Nmd3•60S with guanine nucleotides

The equilibrium dissociation constant (K_d) was measured for the interaction between the fluorescent guanine nucleotide analogues, mant-GTP, mant-GDP and mant-GTP γ S, and Lsg1 bound to the complex Nmd3•60S. Increasing amounts of nucleotide (10 mM stock) were titrated to a solution containing 0.2 µM Lsg1, 0.6 µM Nmd3 and 0.6 µM 60S subunits. Binding was monitored by recording the fluorescence enhancement of the mant-nucleotides after excitation at 355 nm. Dilution at the end of each titration was no larger than 2.5% of the initial volume. Data were corrected for the background signal by subtracting the fluorescence of the same ligand concentration without Lsg1 in the reaction mixture. Maximum emission (440 nm for mant-GTP, 445 nm for mant-GDP and 447 nm for mant-GTP γ S) was plotted as a function of nucleotide concentration and fitted to a one binding site model to estimate the dissociation constant.

3. Results and discussion

3.1. Protein folding and stability analysis of Lsg1

The structural content of Lsg1 was evaluated by circular dichroism and the intrinsic fluorescence of its tryptophan residues. The far-UV CD spectrum of free Lsg1 consisted of the typical signature of mixed secondary structure containing both α -helices and β -sheets as evidenced by the presence of two minima at 210 and 220 nm (Fig. 1A). These minima result from the overlap between the negative bands characteristic of the α -helices (222 nm) and the β -sheets (210–225 nm). In the presence of guanine nucleotides, the CD spectrum of Lsg1 undergoes subtle but distinguishable changes suggesting that the nucleotide-bound protein has a different secondary structure content compared to the apo-protein. Furthermore, differences depend on the bound nucleotide; in the presence of GTP the intensity of both signals, 210 and 220 nm, decreased but to a different extent inverting its shape, while in the presence of GDP both signals decreased to a similar degree merging the two minima. Deconvolution of the spectra (Fig. 1A inset) suggests a decrease in the helical content of Lsg1 that is compensated by an increase in the amount of β -sheet and fewer unstructured regions.

The thermal stability of Lsg1 was determined by monitoring the ellipticity at 208 nm as a function of temperature (Fig. 1B). Thermal denaturation corresponded to an irreversible process as the trace obtained from the cooling down experiment did not overlap with that of the heating up (data not shown). The data described a distorted sigmoidal curve with an initial sharp transition occurring between 30 and 48 °C and an apparent melting temperature (T_m) of 37 °C. As temperature increased further, the CD signal instead of reaching a plateau depicted a second transition with a midpoint near 57 °C and a probable vague third transition. Thus, the unfolding pathway of Lsg1 follows a complex route with at least two intermediate states. The signal at 80 °C still elicited values of mean residue molar ellipticity close to - 3000 degree cm² dmol⁻¹ suggesting that some secondary structure persists even at high temperatures. Binding to guanine nucleotides modified the thermal stability of Lsg1; the apparent T_m for the first transition increased by 1 °C irrespective of the bound nucleotide and the slope for the second transition changed from 0.18 millidegrees/°C for the apo-Lsg1 to 0.22 and 0.25 millidegrees/°C when bound to GDP and GTP,

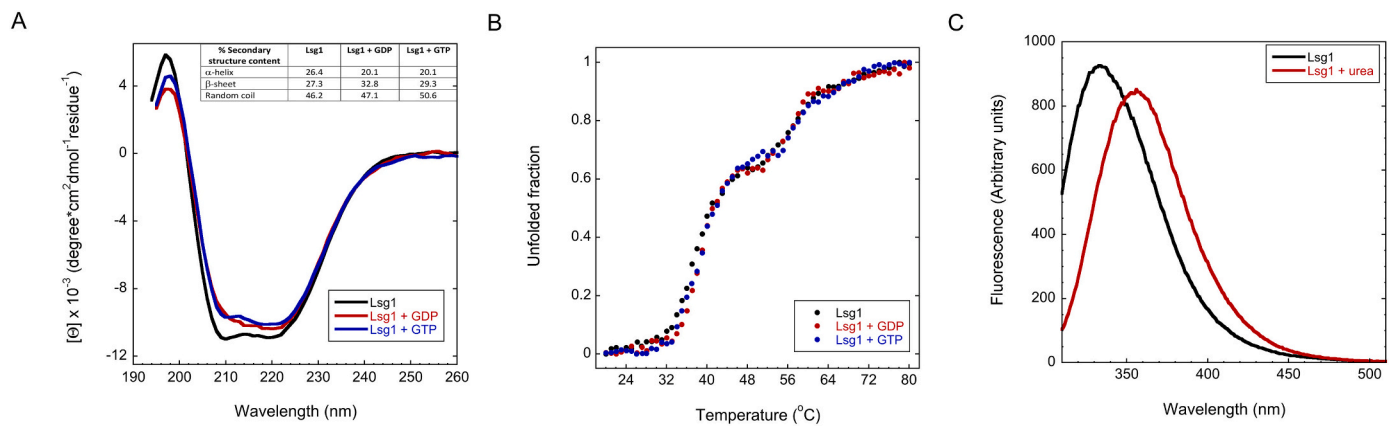


Fig. 1. Stability and structural content of Lsg1. A) Far-UV circular dichroism spectra of Lsg1 alone and in the presence of guanine nucleotides. Table inset shows the secondary structure content obtained by the deconvolution of the data using the BeStSel program. B) Thermal denaturation of Lsg1 alone and in the presence of guanine nucleotides. C) Fluorescence spectra of native and chemically denatured Lsg1.

respectively. Regardless of the bound state of Lsg1, the denaturation process started at 30 °C, a temperature which coincides with the optimal growth temperature of *S. cerevisiae* suggesting that Lsg1 is a marginally stable protein under physiological conditions.

Protein tertiary structure was evaluated by monitoring tryptophan fluorescence. Lsg1 has seven tryptophan residues five of which are contained in the structured G-domain (residues 187–394) and the extra helical region, and the rest being present in the unstructured N-terminal region (Fig. 2). Lsg1 (1 μ M) was excited at 290 nm and the emission spectra were recorded for the native and denatured protein in the presence of 7 M urea. As evidenced by the maximum emission at 332 nm, the spectrum of native Lsg1 is dominated by the fluorescence of the three tryptophan residues (W188, W192 and W249) present in the G-folded domain which are completely buried (Fig. 2). In contrast the emission spectrum of the denatured protein shows a displacement towards higher wavelengths and a decrease in the fluorescence intensity (Fig. 1C). This behaviour suggests the loss of the tertiary structure of the protein with the exposure of the protein tryptophans towards the hydrophilic solvent environment.

3.2. Interaction of Lsg1 with guanine nucleotides

Emission of the intrinsic tryptophan fluorescence has proven to be a sensitive mean to detect local conformational changes in the G2 and G3 regions of GTPases and to calculate the binding affinities for guanine nucleotides. As previously mentioned, the emission spectrum of Lsg1 at 332 nm is dominated by the three buried tryptophans present in the G-domain (Fig. 1C and Fig. 2). Upon binding to guanine nucleotides, not

only was the emission intensity of Lsg1 markedly quenched in the presence of GTP, but the emission spectrum bound to GDP also exhibited a red shift in the wavelength of maximum emission (from 332 to 340 nm). This suggests that the local environment of the tryptophan residues is altered upon guanine nucleotide exchange and becomes less hydrophobic in the presence of GDP (Supplementary Fig. 1). Intriguingly, inspection of the cryo-EM structure of Lsg1 bound to the non-hydrolysable analogue GppNHp does not reveal which tryptophan is responsible for the quenching of the emission signal upon binding to the nucleotides. None of the tryptophans are in contact with the nucleotide (Fig. 2) suggesting that either local changes near the interaction site or binding-induced conformational changes modify the chemical environment causing the decrease in the signal. We used the quenching of intrinsic tryptophan fluorescence to measure the dissociation constant (K_d) of Lsg1 for unmodified guanine nucleotides (Table 1). The protein tryptophans were excited at 295 nm and their fluorescence was recorded at the corresponding maximum emission wavelength. Control titrations using equivalent volumes of buffer as those used in the nucleotide titrations did not change the fluorescence signal, confirming that the dilution effect was negligible. A similar observation was made after the addition of increasing amounts of ATP and ADP, establishing the specificity of Lsg1 for guanine nucleotides and dismissing the presence of spurious activity in the sample (Fig. 3). The K_d values were calculated by re-plotting the fluorescence intensity as a function of the nucleotide concentration and fitting the data to a one binding site model. The affinity of Lsg1 for GTP is 1.5-fold greater than that measured for GDP with K_d values of 108 μ M and 175 μ M, respectively. As mentioned in the methodologies section, these measurements were

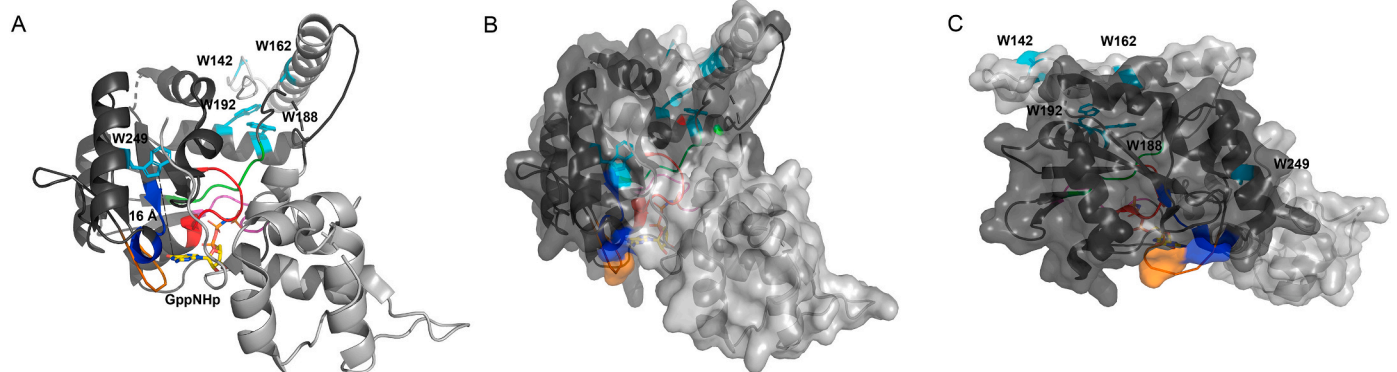


Fig. 2. Structure of the GTPase domain of Lsg1 bound to GppNHp. (A) Ribbon representation of the circularly permuted GTPase domain is shown in dark grey and the extra helical domain is depicted in light grey. Motifs responsible for nucleotide recognition are as follow: G1 – red, G2 – purple, G3 – green, G4 – blue, G5 – tan. Tryptophan residues are coloured in cyan. (PDB 5T62). (B) Surface representation. (C) Surface representation rotated 75° in the vertical axis.

Table 1

Dissociation constants for the interaction between Lsg1 and guanine nucleotides alone and in a ternary complex with Nmd3 and the ribosomal 60S subunit.

Complex	Guanine nucleotide	K_d (μM)
Lsg1	GDP	175 ± 31 (176 ± 26^a)
	mant-GDP	189 ± 89^a
	GTP	108 ± 19 (91 ± 16^a)
	GppNHp	212 ± 19^a
	GTP γ S	$> 370^a$
Lsg1•Nmd3•60S	mant-GDP	62 ± 8
	mant-GTP	22 ± 4
	mant-GTP γ S	185 ± 24

^a Dissociation constants measured in 50 mM Hepes-KOH pH 6.5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.001% triton X-114.

carried out in two different buffer systems optimized to either aid the stability of the Lsg1 protein or that of the 60S subunits. The nature of the buffer did not affect the interaction of free Lsg1 with the guanine nucleotides as confirmed by almost identical K_d values (Table 1). Considering the concentration of guanine nucleotides in exponentially growing yeast cells (200 μM GTP and 50 μM GDP [26]), the free Lsg1 protein present in the cell cytoplasm would be predominantly bound to GTP in a proportion 2.5-fold greater than that bound to GDP. It is known, however, that the pool of GTP and GDP in yeast cells is largely influenced by the availability of nutrients. The GTP/GDP ratio in exponentially growing cells in the presence of abundant glucose is about 4, in contrast this ratio can drop up to 1.5 during late exponential phase or become less than one in glucose-starved cells [26]. Thus, shifts in the guanine nucleotide concentration resulting from changes in the nutritional status can modulate the amount of loaded Lsg1 from predominantly bound to GTP towards mainly bound to GDP. The affinity for the non-hydrolysable GTP analogues GppNHp and GTP γ S was also determined, and the binding was found to be 2–4 times weaker compared to that of GTP, with dissociation constants of 212 and > 370 μM , respectively. It is commonly assumed that non-hydrolysable GTP analogues are good substitutes for GTP, but this is not always the case. Furthermore, analogues can be functionally different depending on the GTPase being studied. For example, GTP γ S is a *bona fide* analogue for the translation factor SelB and presents a higher affinity than that for the natural substrate while GppNHp is not a good analogue [27]. Weakening of the binding affinity of Lsg1 for both GTP-analogues suggests that neither may be a good substitute of GTP.

Besides using the tryptophan emission to study the interaction of GTPases with guanine nucleotides, another frequently used strategy

involves measuring the emission of fluorescent guanine nucleotide analogues labelled with the reporter group methyl-antraniloyl (mant-). Fluorescence changes upon binding can be monitored either by direct excitation of the fluorophore or through indirect excitation via Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) using the tryptophan residues present in the binding pocket as fluorescence donors and the mant-nucleotide as acceptor. Irrespective of the methodology used to determine the dissociation constant, values should be similar if the fluorescent reporter group does not disturb the binding. We explored the possibility of using these fluorescent analogues through direct excitation and FRET as further means of characterising the binding of guanine nucleotides to Lsg1. It was, however, difficult to use these signals in equilibrium titration experiments since titrating increasing amounts of fluorescent nucleotide resulted in 1) a fluorescence change of 20% or less for both scenarios, FRET and direct excitation, and 2) a strong increase in the background signal from excess of unbound nucleotide (Supplementary Fig. 2). Only the emission spectra of Lsg1 bound to mant-GDP using FRET presented a moderate increase in the fluorescence signal (17%) which allowed us to estimate a K_d value of 189 ± 89 μM (data not show). Experimental signals were very noisy due to the small change in the fluorescence emission mentioned above and this was reflected in the large uncertainty of the fit. Nevertheless, the dissociation constant is similar to that obtained by quenching of tryptophan fluorescence using unmodified GDP which suggests that the mant-group does not affect the binding of nucleotides to Lsg1. The low FRET signal was unexpected given the location of tryptophan 249 at 16 Å from the nucleotide (Fig. 2) and the fact that FRET occurs when donors and acceptors are in close proximity (10–100 Å) [25]. However, the distance between this tryptophan and the nucleotide is occluded by the presence of the loop formed by residues 206–209 which may prevent efficient energy transfer.

3.3. Interaction of Lsg1 present in the complex Lsg1•Nmd3•60S with guanine nucleotides

Bearing in mind the different fluorescence experiments discussed above, we chose to measure the increase in the fluorescence signal of the mant-nucleotides upon binding to Lsg1 in the ternary system Lsg1•Nmd3•60S by direct excitation of the fluorophore at 355 nm (Fig. 4). Other scenarios were not considered because quenching of the tryptophan fluorescence of Lsg1 was obscured by the emission of the tryptophan residues of Nmd3 and those of the structural proteins of the 60S subunit. Moreover, the FRET signal was negligible due to the large inner filter effect originated from absorption at the excitation wavelength, not only from the titrated mant-nucleotides but also from the

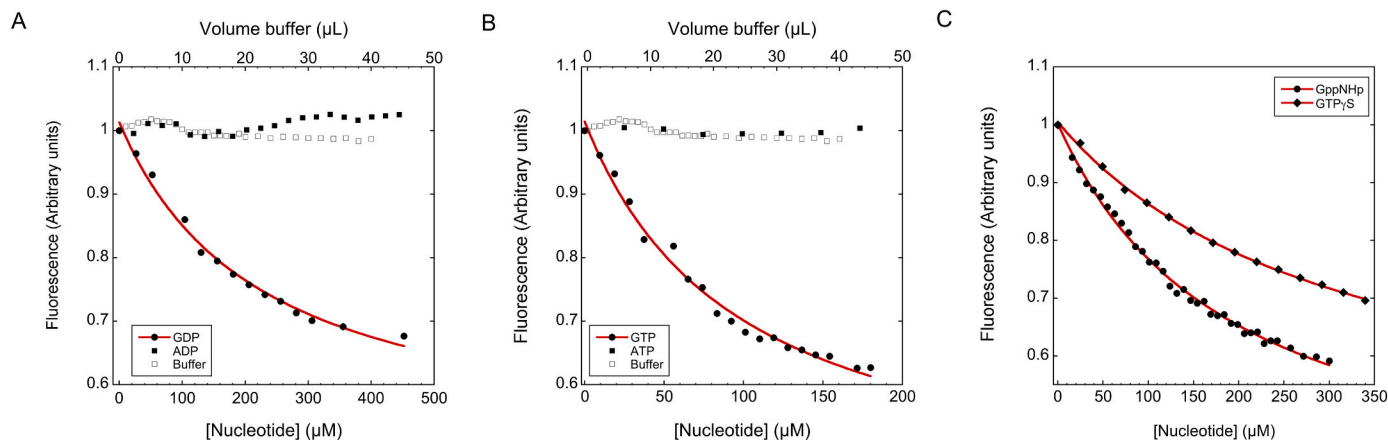


Fig. 3. Lsg1 binding to different guanine nucleotides. Binding of Lsg1 to guanine nucleotides was examined by measuring the fluorescence decay of the tryptophan residues (Solid circles and diamonds). Lines represent the fit of the data to a one binding site model. Control titrations to adenine nucleotides (solid squares) and buffer (empty squares) are also shown.

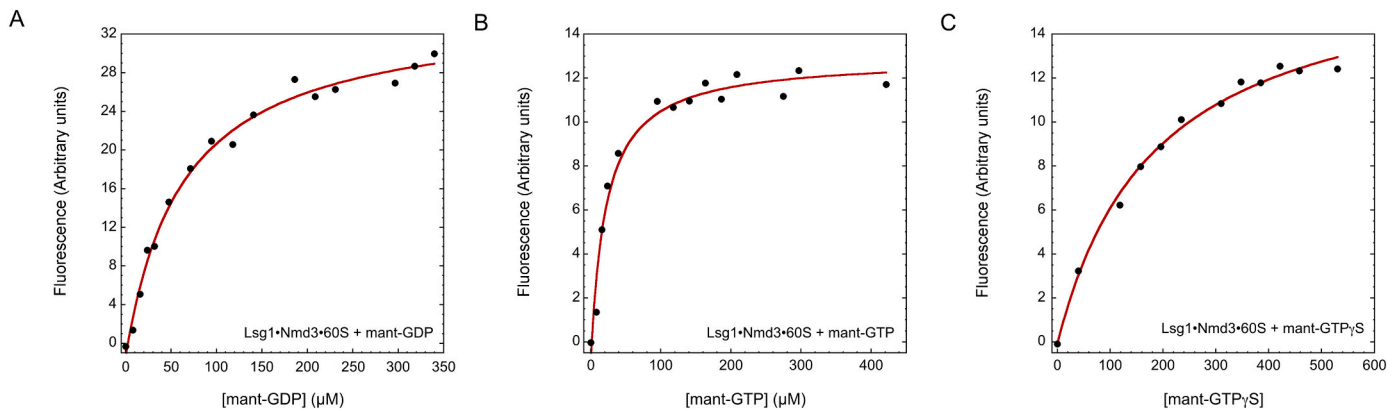


Fig. 4. Binding of mant-guanine nucleotides to Lsg1 in complex with Nmd3 and the ribosomal 60S subunit. (A) mant-GDP. (B) mant-GTP. (C) mant-GTP γ S. Mant-nucleotides were excited directly at 355 nm and the emission at 450 nm was plotted as a function of nucleotide concentration. Lines represent the fit of the data to a one binding site model.

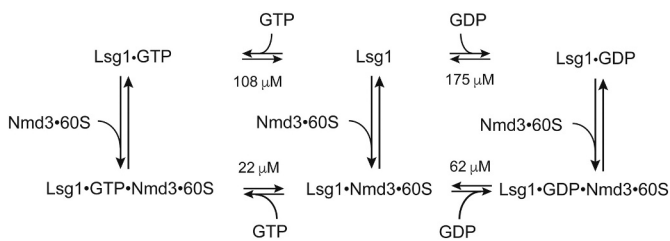


Fig. 5. Equilibrium scheme of the interaction of Lsg1 with guanine nucleotides.

rRNA and the structural proteins present in the complex Nmd3•60S. Fluorescence intensities were plotted as a function of increasing nucleotide concentrations and the K_d values were obtained by fitting the data to a one binding site model (Table 1). The affinity of the GTPase for both of the nucleotides when present in the ternary complex Lsg1•Nmd3•60S increased in comparison with that for the protein alone. The K_d of Lsg1•Nmd3•60S for mant-GTP corresponded to 22 μ M, a value five times smaller than that obtained for Lsg1 alone with GTP (108 μ M) while that for mant-GDP decreased 2.8-fold (62 μ M). Despite the decrease in both dissociation constants, binding of Lsg1 to the complex Nmd3•60S shifts the equilibrium further towards the GTP-bound form in a proportion 8-fold compared to that bound to GDP. The affinity of the non-hydrolysable analogue GTP γ S with Lsg1 when present in the ternary complex also increased. This suggests that the complex Nmd3•60S functions as a GTP Stabilising Factor or GSF [28] for Lsg1 favouring the interaction of the GTPase with its substrate. GTPases depend on external proteins to fire GTP hydrolysis (GAPs), a role that in the case of ribosome-associated GTPases is fulfilled by ribosomal RNA, followed by the exchange of GDP for GTP mediated by GEFs [29]. In the case of Lsg1, it has been suggested that the interaction of the bases G2261 and U2269 in helix 69 of the 25S RNA with a strand of Lsg1 next to the G2 subdomain activates its catalysis [6,15]. So, it is tempting to speculate that the pre-ribosomal Nmd3•60S particle serves a dual purpose in the activation of Lsg1 with different regions acting synergistically as GSF and GAP to increase the low activity of Lsg1.

Closer inspection of the emission spectra of the mant-nucleotides bound to Lsg1 alone or in complex with Nmd3•60S revealed differences in the intensity of the fluorescence signal of the nucleotide in each GTPase-ligand complex (Supplementary Fig. 3). The fluorescence emission intensity was the largest for the complex Lsg1•mant-GDP while it was insignificant for Lsg1•mant-GTP. These variations in the emission magnitude suggest that the environment of the nucleotide in the Lsg1 binding pocket is different for each and can only be explained by the protein adopting distinct conformations in each complex. This is in agreement with the results presented in the Supplementary Fig. 1 for

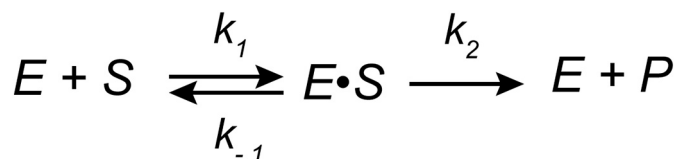
the unmodified nucleotides. Furthermore, the signal of the mant-nucleotides bound to Lsg1•Nmd3•60S does not resemble any of the two described for the free protein indicating that Lsg1 may adopt a yet different conformation when present in the ternary complex. Therefore, it seems that Lsg1 can adopt at least three clearly different conformational states: a GTP-bound conformation, a GDP-bound conformation and a third conformation bound to either nucleotide in complex with Nmd3 and the 60S subunit. However, in the absence of structural information is not possible to discern the differences or similarities between these complexes. Detailed investigations of Lsg1 conformational changes elicited by the guanine nucleotides and the effector biomolecule Nmd3•60S will shed light on its regulation. Fig. 5 presents some of the interactions between Lsg1 and the guanine nucleotides studied here. On the whole, the affinity of Lsg1 free or bound to Nmd3•60S is greater for GTP than for GDP and considering there is a four-fold excess of the former in the cell cytoplasm, the cellular pool of Lsg1 will be predominantly bound to this nucleotide.

3.4. Enzyme kinetic studies of the Lsg1 GTPase

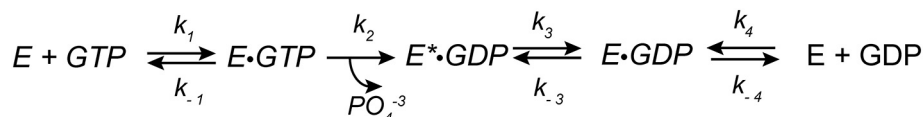
GTPases hydrolyse GTP at very slow rates which is why they are better known as “GTP-binding proteins”. Thus, measuring the small intrinsic activity of a GTPase in the absence of effector molecules can be obscured by potential contaminating activities. Using a qualitative colorimetric assay, we demonstrated that free yeast Lsg1 has GTP hydrolysis activity which is robustly increased in the presence of Nmd3 and 60S subunits. Neither Nmd3 nor free 60S subunits exhibited any significant activity towards GTP demonstrating that not only did Lsg1 stimulation result from the influence of both effector molecules but also that our Nmd3 and 60S subunit preparation lacked nonspecific GTPase activity. Additionally, we also verified the absence of non-specific ATPase activity in our Lsg1 sample (Supplementary fig. 4). The enzyme kinetics of Lsg1 in the absence of effector biomolecules was measured using an enzymatic coupled assay with purine nucleoside phosphorylase (PNP) enzyme. Steady-state kinetic analysis demonstrated slow but saturable kinetics of GTP hydrolysis with the subsequent production of inorganic phosphate. Activity time courses were measured in triplicate and showed on average 10–15 turnovers per active site during the experimental activity time course. The initial velocities were plotted as a function of GTP concentration and data were adjusted to the Michaelis-Menten model (Fig. 6). The kinetic parameters obtained for the free yeast Lsg1 corresponded to $k_{cat} = 1 \text{ min}^{-1}$ and $K_m = 34 \mu\text{M}$, and a catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of $468 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In the absence of effector proteins such as GAPs (GTPase Activating Proteins) or GEFs (Guanine Exchange Factors) most GTPases have low intrinsic activity with k_{cat} values as low as $< 0.03 \text{ min}^{-1}$ for Ras-like GTPases [30]. In

contrast, ribosomal and translational GTPases which do not necessarily require effector biomolecules, present higher catalytic rates such as 3.6 min^{-1} [31] or 5 min^{-1} for the idle Bms1 and rat EF-2 [32] enzymes, respectively. The steady-state rate of GTP hydrolysis observed for the yeast Lsg1 protein, despite being low, is an order of magnitude higher than that reported for other circularly permuted ribosomal GTPases such as *S. cerevisiae* Nug2 (k_{cat} 0.09 min^{-1} , [33]) or the *Arabidopsis thaliana* Lsg1-2 ortholog (k_{cat} 0.13 min^{-1} , [34]). Furthermore, the rate enhancement k_{cat}/k_{uncat} for GTP hydrolysis corresponds to $10^{5.6}$, a similar enhancement previously reported for EFL1, another ribosomal GTPase [35]. The observation of multiple turn-over reaction for Lsg1 suggests that release of GDP is spontaneous with a low binding affinity as has been confirmed in the binding experiments shown above (Table 1). Previous reports have found that yeast Lsg1 expressed recombinantly in a similar fashion as presented here had no detectable GTP hydrolysis activity and only becomes evident when reconstituted in a complex with Nmd3 and the 60S ribosomal subunits [15]. This data contrasts, not only with the results presented in Fig. 6, but also with other observations showing that free human [14] and *A. thaliana* Lsg1 [34] have GTPase activity *in vitro*. We speculate that, although low, all members of the Lsg1 protein family have intrinsic GTPase activity and discrepancies with Malyutin et al. arose from the low concentration of enzyme used in their assay (an order of magnitude less).

The equilibrium dissociation constant (K_d) is commonly used to evaluate and rank the strength, and thus, the binding affinity between a biomolecule and its ligand/binding partner. When dealing with enzymes, the dissociation equilibrium for a ligand often relates to partial reactions of its catalytic cycle. As such, the kinetic Michaelis-Menten constant K_m , is often misinterpreted as the substrate dissociation constant, because in the overly simplified model



K_m is described as $(k_{-1} + k_2)/k_1$ and in the specific condition where $k_{-1} \gg k_2$ then $K_m = K_d$. This also leads to another wrong assumption that K_m is always greater than K_d . In the present characterisation of Lsg1, the measured K_m is three times smaller than the K_d for GTP suggesting that this minimal kinetic scheme is insufficient to describe the behaviour of Lsg1. In light of the observation that the conformation of Lsg1 bound to GDP is different to that of the free enzyme or bound to GTP, a more suitable mechanism would be



in which the release of the inorganic phosphate renders the equilibrium irreversible in one direction and $E^* \cdot GDP$ represents a unique and distinguishable kinetically conformational state.

The K_m describing this equilibrium would be [36]:

$$K_m = \frac{k_{-1}(k_3k_4) + (k_2k_3k_4)}{k_1(k_2(k_{-3} + k_4 + k_3) + k_3k_4)}$$

From this expression it is clear that depending on the intrinsic rate constants, K_m can be less than, greater than, or equal to the K_d for substrate binding. Because its value is a complex function of all the reactions occurring in the enzyme, the individual reaction steps including the dissociation constant for the binding of the substrate are

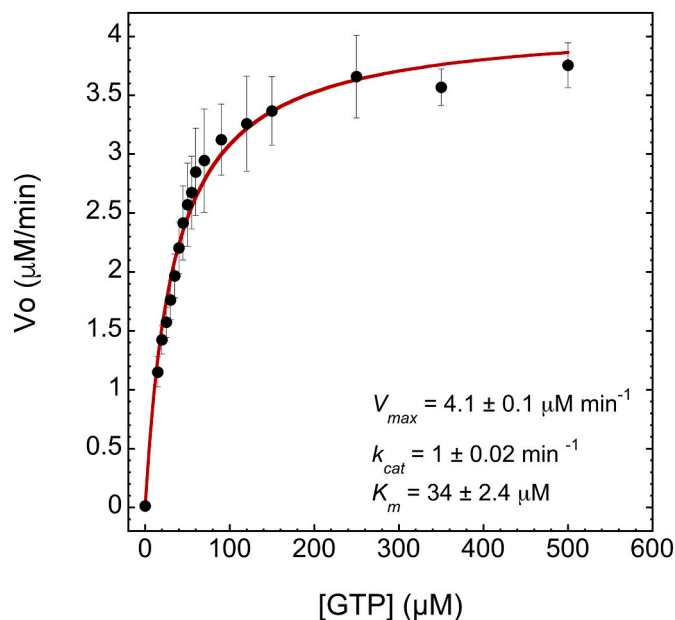


Fig. 6. Enzyme kinetics of free Lsg1. Each data point represents the average of three independent experiments and error bars correspond to their standard deviation. Solid red line represents the fit to the Michaelis-Menten equation.

buried within it and cannot be resolved. Furthermore, the K_d data contained in Table 1 were obtained under equilibrium measurements and thus it is not possible to obtain mechanistic information of the pathway and the values represent the global dissociation constant containing both constants, that of the binding process and that of the conformational change. All these limitations can be overcome by examination of the reaction pathway using transient-state kinetic methods, wherein Lsg1 is examined as a stoichiometric reactant, allowing the individual steps in the pathway to be established by direct measurement.

4. Conclusions

Lsg1 is a circularly permuted GTPase that participates in the removal of the export factor Nmd3 and the completion of the PTC. Structural studies have increased our knowledge on the intricate rearrangements that occur in the ribosomal proteins and regions of the rRNA leading to the proper assemble of the PTC. However, the exact

role of Lsg1 in this maturation step is still not clear, nor the function of its GTPase activity in this process. Here, we characterised the interaction between guanine nucleotides and Lsg1 alone and in complex with Nmd3•60S, resembling the scenario of the protein free in the cell cytoplasm and that bound to the pre-60S ribosomal subunit, respectively. The affinity of Lsg1 for GTP is greater than that for GDP favouring a population of the free enzyme bound to its substrate. The equilibrium is further shifted towards the GTP-bound conformation when Lsg1 interacts with the complex Nmd3•60S as a result of a five-fold decrease in the dissociation constant. This suggests that complex formation between Lsg1 and the Nmd3•60S ribosomal particle promotes GTP binding to Lsg1, with Nmd3•60S acting as the GTP Stabilising Factor or

GSF. In exponentially growing yeast cells, it is possible to envisage a mechanism in which mainly all the Lsg1 molecules incorporated into the Nmd3•60S particle are in the GTP-bound state promoted by the GTP stabilising activity of the latter. Subsequently, GTP hydrolysis also promoted by the ribosomal particle occurs and the resulting Lsg1 bound to GDP is released and readily exchanges GDP for GTP without the need of a dedicated exchange factor. Exchange of GDP for GTP is accompanied by a conformational change in the free Lsg1, which undergoes a successive conformational change upon binding to the Nmd3•60S complex. Unfortunately, experiments presented here were not able to establish whether the conformations of Lsg1 in this ternary complex are different in the presence of either nucleotide. Characterisation of the enzyme kinetics of free Lsg1 demonstrated a modest catalytic rate constant that increases upon binding to the ribosomal particle as previously reported elsewhere. Thus, the Nmd3•60S particle may have dual functionality in the activation of Lsg1 acting as a GTP Stabilising Factor as well as a GTP Activating Protein. Unexpectedly, the thermal denaturation of Lsg1 starts at a temperature as low as 30 °C, a coincidental value for the optimal growth temperature of *S. cerevisiae*. Thus, Lsg1 is only marginally stable at physiological temperature and stress conditions resulting in an increase in the environment temperature may reduce the pool of active free Lsg1.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

NSP acknowledges the financial support from CONACyT Project 283909. JJR was a doctoral student from the program Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a CONACyT fellowship number 603910. Authors thank Arlen Johnson (University of Texas at Austin) for kindly providing the plasmid pAJ1381 used as template to amplify the Nmd3 expression cassette and Jonathan Dinman for providing the yeast strain JD1370.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140538>.

References

- [1] J. Bassler, E. Hurt, Eukaryotic ribosome assembly, *Annu. Rev. Biochem.* 88 (2019) 281–306.
- [2] D. Kressler, E. Hurt, J. Bassler, A puzzle of life: crafting ribosomal subunits, *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017) 640–654.
- [3] P. Nerurkar, M. Altvater, S. Gerhardy, S. Schutz, U. Fischer, C. Weirich, V.G. Panse, Eukaryotic ribosome assembly and nuclear export, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 319 (2015) 107–140.
- [4] J.L. Woolford Jr., S.J. Baserga, Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 195 (2013) 643–681.
- [5] B.S. Strunk, K. Karbstein, Powering through ribosome assembly, *RNA* 15 (2009) 2083–2104.
- [6] V. Kargas, P. Castro-Hartmann, N. Escudero-Urquijo, K. Dent, C. Hilcenko, C. Sailer, G. Zisser, M.J. Marques-Carvalho, S. Pellegrino, L. Wawiora, S.M. Freund, J.L. Wagstaff, A. Andreeva, A. Faille, E. Chen, F. Stengel, H. Bergler, A.J. Warren, Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes, *Elife* 8 (2019).
- [7] O. Gadal, D. Strauss, J. Kessler, B. Trumpower, D. Tollervy, E. Hurt, Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 3405–3415.
- [8] J.H. Ho, G. Kallstrom, A.W. Johnson, Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 1057–1066.
- [9] A. Fernandez-Pevida, O. Rodriguez-Galan, A. Diaz-Quintana, D. Kressler, J. de la Cruz, Yeast ribosomal protein L40 assembles late into precursor 60 S ribosomes and is required for their cytoplasmic maturation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 38390–38407.
- [10] J. Hedges, M. West, A.W. Johnson, Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p, *EMBO J.* 24 (2005) 567–579.
- [11] M. West, J.B. Hedges, A. Chen, A.W. Johnson, Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 3802–3813.
- [12] Y. Zhou, S. Musalgaonkar, A.W. Johnson, D.W. Taylor, Tightly-orchestrated rearrangements govern catalytic center assembly of the ribosome, *Nat. Commun.* 10 (2019) 958.
- [13] D.D. Leipe, Y.I. Wolf, E.V. Koonin, L. Aravind, Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases, *J. Mol. Biol.* 317 (2002) 41–72.
- [14] E.G. Reynaud, M.A. Andrade, F. Bonneau, T.B. Ly, M. Knop, K. Scheffzek, R. Pepperkok, Human Lsg1 defines a family of essential GTPases that correlates with the evolution of compartmentalization, *BMC Biol.* 3 (2005) 21.
- [15] A.G. Malyutin, S. Musalgaonkar, S. Patchett, J. Frank, A.W. Johnson, Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis, *EMBO J.* 36 (2017) 854–868.
- [16] J.A. Glasel, Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios, *Biotechniques* 18 (1995) 62–63.
- [17] R.W. West Jr., S.M. Chen, H. Putz, G. Butler, M. Banerjee, GAL1-GAL10 divergent promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences, *Genes Dev.* 1 (1987) 1118–1131.
- [18] M.A. Algire, D. Maag, P. Savio, M.G. Acker, S.Z. Tarun Jr., A.B. Sachs, K. Asano, K.H. Nielsen, D.S. Olsen, L. Phan, A.G. Hinnebusch, J.R. Lorsch, Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system, *RNA* 8 (2002) 382–397.
- [19] J.A. Leshin, R. Heselpoth, A.T. Belew, J. Dinman, High throughput structural analysis of yeast ribosomes using hSHAPE, *RNA Biol.* 8 (2011) 478–487.
- [20] A. Micsonai, F. Wien, E. Bulyaki, J. Kun, E. Moussong, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Refregiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W315–W322.
- [21] M.R. Webb, A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 4884–4887.
- [22] E.B. Cogan, G.B. Birrell, O.H. Griffith, A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates, *Anal. Biochem.* 271 (1999) 29–35.
- [23] M. Nakashima, R. Yamagami, C. Tomikawa, Y. Ochi, T. Moriya, H. Asahara, D. Fourmy, S. Yoshizawa, T. Oshima, H. Hori, Long and branched polyamines are required for maintenance of the ribosome, tRNA(His) and tRNA(Tyr) in *Thermus thermophilus* cells at high temperatures, *Genes Cells* 22 (2017) 628–645.
- [24] H. Takada, M. Roghanian, V. Murina, I. Dzhygyr, R. Murayama, G. Akanuma, G.C. Atkinson, A. Garcia-Pino, V. Haurlyuk, The C-terminal RRM/ACT domain is crucial for fine-tuning the activation of 'Long' RelA-SpoT homolog enzymes by ribosomal complexes, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 277.
- [25] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed, Springer, 2011.
- [26] S. Rudoni, S. Colombo, P. Coccetti, E. Martegani, Role of guanine nucleotides in the regulation of the Ras/cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1538 (2001) 181–189.
- [27] A. Paleskava, A.L. Konevega, M.V. Rodnina, Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 27906–27912.
- [28] V. Haurlyuk, S. Hansson, M. Ehrenberg, Cofactor dependent conformational switching of GTPases, *Biophys. J.* 95 (2008) 1704–1715.
- [29] N. Clementi, N. Polacek, Ribosome-associated GTPases: the role of RNA for GTPase activation, *RNA Biol.* 7 (2010) 521–527.
- [30] H.R. Bourne, D.A. Sanders, F. McCormick, The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature* 349 (1991) 117–127.
- [31] K. Karbstein, J.A. Doudna, GTP-dependent formation of a ribonucleoprotein sub-complex required for ribosome biogenesis, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 432–443.
- [32] U. Carlberg, A. Nilsson, O. Nygard, Functional properties of phosphorylated elongation factor 2, *Eur. J. Biochem.* 191 (1990) 639–645.
- [33] C.H. Im, S.M. Hwang, Y.S. Son, J.B. Heo, W.Y. Bang, I.N. Suwastika, T. Shiina, J.D. Bahk, Nuclear/nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of Y1qF/YawG GTPases function in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 8620–8632.
- [34] B.L. Weis, S. Missbach, J. Marzi, M.T. Bohnsack, E. Schleiff, The 60S associated ribosome biogenesis factor LSG1-2 is required for 40S maturation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 80 (2014) 1043–1056.
- [35] A. Gijbers, A. Garcia-Marquez, A. Luviano, N. Sanchez-Puig, Guanine nucleotide exchange in the ribosomal GTPase EFL1 is modulated by the protein mutated in the Schwachman-Diamond syndrome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437 (2013) 349–354.
- [36] K.A. Johnson, 1 Transient-state kinetic analysis of enzyme reaction pathways, in: D.S. Sigman (Ed.), *The Enzymes*, Academic Press, 1992, pp. 1–61.