



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA MUTACIÓN EFL1-T137A IMPLICADA EN EL
SÍNDROME DE SHWACHMAN-DIAMOND

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
CARLOS CAL Y MAYOR LUNA

Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig
[Instituto de Química](#)

Dra. Daniela Araiza Olivera Toro
[Instituto de Química](#)

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Corpora non agunt nisi ligata

Paul Ehrlich

Agradecimientos

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

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con número de registro 928526.

A la Dra. Nuria Sánchez Puig por aceptarme en su grupo de investigación y por el acompañamiento durante más dos años de crecimiento científico y personal; por involucrarme en el increíble y contraintuitivo mundo de las proteínas.

A mi familia, Débora Luna Moneda, Miguel Ángel Cal y Mayor Velasco, María Elena Luna Moneda, Andrés Cal y Mayor Luna, quienes siempre me han apoyado.

A Axel Sisniega por nunca haberse ido y acompañarme en la distancia.

A Amairani Kiabeth por siempre estar presente y que pareciera que el tiempo no pasa entre nosotros.

A mis amigos Christian Alfredo Segura Cerda, María Isabel Martínez Ángeles, Juliana Jaramillo Ramírez, Alejandra Moreno, Erick Gustavo Valdés Galindo, David Moreno Gutiérrez, Carlos Calcines Cruz, Andrea Estefanía López Giraldo, quienes contribuyeron en una experiencia que difícilmente olvidaré y que superó con creces mis expectativas, cuyas conclusiones nunca hubiera esperado.

A Juliana Jaramillo Ramírez, cuyos consejos en la parte experimental fueron invaluable.

A la Dra. Patricia Cano por su apoyo en la mutagénesis sitio dirigida de las construcciones pAMG1-EFL1 T657M-R1086Q y pAMG1 T657M-L910K.

Al Instituto de Química, que me permitió introducirme al mundo y estudio de las proteínas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la cual ahora siento un especial orgullo.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi tía María Elena Luna Moneda para que siempre tenga presente que nuestra existencia repercute más de lo que pensamos y que no concibo una vida sin su guía, apoyo y amor. Te llevo siempre en mi corazón y en mis pensamientos. A mis padres Débora Luna Moneda y Miguel Ángel Cal y Mayor Velasco, por siempre guiarme y por siempre hacerme sentir querido sin importar las curiosidades de la vida, por su amor incondicional. A Axel Sisniega que me ha demostrado que las amistades verdaderas existen y que, si pudiera volver a elegir, elegiría las mismas alegrías y penas que me han enseñado que los amigos nunca se dicen adiós. A la vida, con quien he hecho las paces y que ahora me sonrío, y yo a ella, de frente y con orgullo.

Índice	
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	1
Abstract	2
1 Marco teórico	3
1.1 Ribosomas	3
1.2 Biogénesis ribosomal en eucariontes y ribosomopatías	4
1.3 El síndrome de Shwachman-Diamond (SDS)	6
1.4 La proteína SBDS	7
1.4.1 Mutaciones en <i>SBDS</i> que conducen a SDS	8
1.5 La GTPasa EFL1	9
1.5.1 Mutaciones en <i>EFL1</i> que conducen a SDS	11
1.6 El factor de antiasociación eIF6	11
1.7 Mecanismo para la liberación de eIF6 medido por EFL1 y SBDS	12
2 Justificación	17
3 Hipótesis	18
4 Objetivos	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Actividades específicas	19
5 Materiales y métodos	20
5.1 Construcción de las mutantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i>	20
5.2 Evaluación de la complementación funcional de la mutante <i>ScEFL1 T137A</i> en <i>S. cerevisiae efl1Δ</i>	21
5.3 Evaluación de la localización de Tif6-GFP en <i>S. cerevisiae</i> AM1H mediante microscopía de epifluorescencia	22
5.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i>	23
5.5 Espectroscopia de dicroísmo circular de <i>ScEFL1 T137A</i>	24
5.7 Espectro de fluorescencia de <i>ScEFL1 T137A</i>	25
5.8 Espectroscopia de fluorescencia para evaluar la interacción de <i>ScEFL1 T137A</i> con nucleótidos de guanina mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano	25
5.9 Cinética enzimática de <i>ScEFL1 T137A</i>	26
6 Resultados	28

6.1	Construcción de las mutantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i>	28
6.2	Evaluación de la complementación funcional de la mutante <i>ScEFL1 T137A</i> en <i>S. cerevisiae efl1Δ</i>	29
6.3	Localización de Tif6-GFP en células de levaduras complementadas con <i>ScEFL1 T137A</i> mediante microscopía de fluorescencia	32
6.4	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i>	35
6.5	Espectro de Dicroísmo Circular (DC) de <i>ScEFL1 T137A</i>	39
6.6	Espectro de fluorescencia de la proteína <i>EFL1 T137A</i>	42
6.7	Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos para evaluar la interacción de <i>ScEFL1 T137A</i> con nucleótidos de guanina	44
6.8	Cinética enzimática de <i>ScEFL1 T137A</i>	48
6.9	Evaluación de la complementación funcional de las dobles mutantes <i>EFL1 T657M-R1086Q</i> y <i>EFL1 T657M-L910K</i> en células de levadura <i>efl1Δ</i>	50
6.10	Localización de Tif6-GFP en células de levaduras complementadas con <i>EFL1 T657M-R1086Q</i> y <i>EFL1 T657M-L910K</i> mediante microscopía de fluorescencia	52
7	Discusión	56
8	Conclusiones	59
9	Perspectivas	59
10	Referencias	60
11	Anexos	64
11.1	Preparación de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes	64
11.2	Transformación de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes mediante choque térmico	64
11.3	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> mediante el protocolo de acetato de litio/acarreador de ADN/polietilenglicol	65
11.5	Solución amortiguadora de lisis para purificación de <i>ScEFL1 T137A</i>	66
11.6	Solución amortiguadora de baja sal para purificación de <i>ScEFL1 T137A</i>	66
11.7	Solución amortiguadora de elución para la purificación de <i>EFL1 T137A</i>	67
11.8	Medio para esporular	67
11.9	Medio SD/MSG-His/Arg/Lys	67
11.10	Composición del medio SD-Ura-Met (Synthetic defined media sin uracilo ni metionina)	68
11.11	Solución amortiguadora de lavado para la purificación de <i>EFL1 T137A</i>	69

Índice de figuras

Figura 1.1 Estructuras cristalográficas de las subunidades 40S y 60S de <i>S. cerevisiae</i> .	3
Figura 1.2 Descripción general de la biogénesis ribosomal.	5
Figura 1.3 Localización de eIF6 en células de macrófago de pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond.	6
Figura 1.4 Estructura tridimensional de SBDS.	7
Figura 1.5 Estructura tridimensional de HsEFL1.	10
Figura 1.6 Estructura cristalográfica de Tif6.	12
Figura 1.7 Microscopías crioelectrónicas del complejo 60S-eIF6-SBDS-EFL1.	13
Figura 1.8 Superposición de las microscopías crioelectrónicas de EFL1 antes y después de la liberación de eIF6.	13
Figura 1.9 Sitio de unión común entre eIF6 y EFL1 en el complejo 60S-SBDS-EFL1.	14
Figura 1.10 Desplazamiento rotacional de SBDS como resultado de la unión de EFL1.	14
Figura 1.11 Mecanismo de liberación de eIF6 mediante EFL1 y SBDS en el citosol.	15
Figura 1.12 Energética de unión de EFL1, Sdo1, GTP y GDP por ITC en un contexto libre de subunidad ribosomal 60S.	16
Figura 5.1 Metodología para el ensayo de complementación de ScEFL1 T137A en <i>S. cerevisiae efl1Δ</i> .	22
Figura 6.1 Construcción de las mutaciones T127A y T137A en las secuencias codificantes de EFL1 humana y de la levadura.	28
Figura 6.2 Ensayo de complementación genética de la construcción ScEFL1 T137A.	30
Figura 6.3 Conteo de las UFCs obtenidas del ensayo de complementación de ScEFL1 T137A en <i>S. cerevisiae efl1Δ</i> .	30
Figura 6.4 Localización de Tif6-GFP mediante microscopía de epifluorescencia en células de levadura <i>efl1Δ</i> complementadas con EFL1 T137A.	32
Figura 6.5 Disminución de la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las células de <i>S. cerevisiae</i> EFL1 silvestre y complementadas con ScEFL1 T137A.	33
Figura 6.6 Gel SDS-PAGE al 7.5% del proceso de expresión y purificación de la proteína recombinante HsEFL1 T127A.	35
Figura 6.7 Análisis de uso de algunos codones de las secuencias codificantes de HsEFL1 (A) y ScEFL1 (B) usadas en el vector de expresión recombinante.	37
Figura 6.8 Gel SDS-PAGE al 7.5% para el proceso de expresión y purificación de la proteína ScEFL1 T137A a través de una cromatografía de afinidad a iones Ni ²⁺ .	38
Figura 6.9 Espectro de dicroísmo circular de EFL1 silvestre y EFL1 T1371A.	39

Figura 6.10 Modelos tridimensionales de EFL1 y EFL1 T137A obtenidos con el programa MODELLER.	40
Figura 6.11 Curva de desnaturalización de EFL1 y EFL1 T137A.	41
Figura 6.12 Residuos de triptófano de ScEFL1 T137A.	42
Figura 6.13 Espectro de fluorescencia de las proteínas ScEFL1 y ScEFL1 T137A.	43
Figura 6.14 Bolsillo de unión de GTP y GDP en ScEFL1.	44
Figura 6.15 Interacción de ScEFL1 T137A con GDP.	44
Figura 6.16 Interacción de ScEFL1 T137A con GTP.	45
Figura 6.17 Acoplamiento molecular de ScEFL1 y GTP.	46
Figura 6.18 Estructuras cristalográficas del complejo EF-G•GTP y Lsg1•GTP	47
Figura 6.19 Cinética enzimática de ScEFL1 T137A.	48
Figura 6.20 Ensayo de complementación genética de ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K.	51
Figura 6.21 Conteo de la UFCs obtenidas del ensayo de complementación de ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K en <i>S. cerevisiae efl1Δ</i> .	51
Figura 6.22 Localización de Tif6-GFP mediante microscopia de epifluorescencia en células de levadura <i>efl1Δ</i> complementadas con ScEFL1 T657M-L910K y ScEFL1 T657M-R1086Q.	52
Figura 6.23 Porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en células de <i>S. cerevisiae</i> ScEFL1 silevetsre y complementadas con ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K	53
Figura 7.1 Ensayo de liberación <i>in vitro</i> de Tif6.	58

Índice de tablas

Tabla 5.1 Mezcla de reacción para la mutagénesis sitio dirigida por PCR empleada para generar las mutantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i> .	20
Tabla 5.2 Programa PCR para la mutagénesis sitio dirigida empleada para generar las mutantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i> .	20
Tabla 5.3 Secuencia de los cebadores empleados para generar las mutantes <i>HsEFL1 T127A</i> y <i>ScEFL1 T137A</i> resaltando los nucleótidos que introducen la mutación puntual.	21
Tabla 6.1 Relación de la fluorescencia de Tif6-GFP citoplasma/núcleo de las células <i>S. cerevisiae efl1Δ</i> complementadas con EFL1 y EFL1 T137A.	34
Tabla 6.2 Parámetros cinéticos de algunas enzimas.	49
Tabla 6.3 Comparación de los parámetros obtenidos para ScEFL1 y ScEFL1 T137A.	50
Tabla 6.4 Relación de la fluorescencia de Tif6-GFP citoplasma/núcleo de las células <i>S. cerevisiae efl1Δ</i> complementadas con ScEFL1, ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K.	54
Tabla 6.5 Relación de la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las mutantes patogénicas y de las dobles mutantes con relación al porcentaje de fluorescencia de EFL1.	54

Abreviaturas

CD	Dicroísmo circular
ClonNAT	Nourseotricina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
eIF6	Factor de antiasociación eucarionte humano (Eukaryotic Translation Initiation Factor 6)
GAP	Proteína Activadora de GTPasa, del inglés GTPase-Activating Protein
GEF	Intercambiador de Nucleótidos de Guanina, del inglés Guanine Exchange factor
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés Green Fluorescent Protein
HsEFL1	GTPasa Elongation Factor Like-1 de Homo sapiens
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBDS	La proteína Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome
ScEFL1	GTPasa Elongation Factor Like-1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD/MSG-His/Arg/Lys	Medio de selección (+Canavanina, Tialisina, +/- ClonNat). MSG: Ácido Glutámico Monosódico (del inglés Monosodium glutamic acid)
Sdo1	La proteína Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Síndrome de Shwachman-Diamond
SD-Ura	Medio mínimo sin uracilo
SD-Ura-Met	Medio mínimo sin uracilo ni metionina
Tif6	Factor de antiasociación eucarionte de <i>S. cerevisiae</i> (Eukaryotic Translation Initiation Factor 6 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Tm	Temperatura de transición
UFC	Unidad formadora de colonia

Resumen

EFL1 es una GTPasa que participa en el último paso de maduración de la subunidad ribosomal mayor pre-60S. EFL1, en conjunto con SBDS, liberan a Tif6 de la superficie de la subunidad pre-60S para permitir la formación de ribosomas maduros capaces de realizar el proceso de traducción. Se sabe que mutaciones en la proteína SBDS causan el síndrome de Shwachman-Diamond (SDS por sus siglas en inglés) y recientemente también se asociaron mutaciones en EFL1 que conducen a la enfermedad. Desde el primer estudio de mutaciones en EFL1 por nuestro grupo de investigación, algunas otras mutantes han sido reportadas, sin embargo, sigue sin estar claro cómo es que las mutaciones afectan el funcionamiento de la proteína. Se reportó un paciente con sospecha de presentar el síndrome de Shwachman-Diamond con mutaciones en EFL1 en el residuo T127A que se encuentra en el dominio G. Debido a su ubicación se especuló que la actividad enzimática pudiera estar afectada, y que no pudiera hidrolizar GTP en la misma tasa que la proteína silvestre. En este trabajo se buscó comprender el mal funcionamiento de esta mutante usando a la proteína EFL1 de levadura como modelo. Confirmamos que las células de *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con EFL1 T137A (mutación equivalente a la T127A en el ortólogo de levadura) muestran una reducción de Tif6 en núcleo, con una aparente redistribución a la región perinuclear y al citoplasma. Esto muy probablemente porque esta mutante no puede liberar eficientemente a Tif6 de la superficie de la subunidad pre-60S en el citoplasma y entonces, Tif6 no puede regresar al núcleo. Por otro lado, ni el plegamiento ni la interacción con GTP y GDP están afectados por la mutación, no obstante, la cinética enzimática, al comparar con la proteína silvestre, mostró una reducción moderada de 3.35 veces en el valor de la constante catalítica. Experimentos futuros podrán concluir si dicha reducción en la eficiencia catalítica tiene un impacto *in vivo* en las células de los pacientes tal que conducen al síndrome de Shwachman-Diamond, o si, además de la eficiencia catalítica reducida, la mutación afecta otras características de la proteína.

Por otro lado, se sabe que células de *S. cerevisiae EFL1 R1086Q* y *EFL1 L910K* también presentan a Tif6 redistribuido en la región perinuclear y citoplasma. Estas mutaciones conducen al síndrome de Shwachman-Diamond y se encuentran en el extremo C-terminal de EFL1. También, se sabe que la mutación supresora *EFL1 T657M* suprime el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae* cuando se eliminan los últimos 22 residuos del extremo C-terminal de EFL1. En este trabajo también se evaluó que la localización de Tif6 es restablecida a núcleo de células de levadura con las dobles mutaciones *EFL1 T657M-R1086Q* y *EFL1 T657M-L910K*.

Abstract

EFL1 is a GTPase involved in the last maturation step of the pre-60S ribosomal subunit, and together with its partner SBDS, they release eIF6 to allow the formation of ribosomes. It has long been recognized that mutations in the SBDS protein cause the Shwachman-Diamond Syndrome (SDS) and recently, mutations in EFL1 have also been described to cause the disease. Since the initial description of mutations in EFL1 by our group, some other mutants have also been reported but the cause of the malfunction of the protein is still not well understood. A patient with suspected Shwachman-Diamond syndrome was reported to have a mutation in EFL1, but no in SBDS, the mutation leads to the substitution T127A in the G domain. Due to its location in the protein, it has been speculated that it may affect its enzymatic activity (it could not hydrolyze GTP as well as the wild-type EFL1). We sought to understand the malfunction of this mutant using the yeast EFL1 as model. We confirmed that *S. cerevisiae efl1Δ* cells complemented with EFL1 T137A (equivalent mutation to T127A in the yeast ortholog) showed a reduction in the nuclear localization of Tif6, with an apparent redistribution of Tif6 to the perinuclear region and cytoplasm, most likely because this EFL1 mutant fails to release Tif6 from the surface of the 60S subunit in the cytoplasm. Moreover, the mutation did not affect the protein folding or its ability to recognize GTP and GDP. Nevertheless, the enzyme kinetics assay showed a mild reduction of 3.35-fold in the catalytic constant by this mutant compared to the wild-type EFL1. Future experiments are required to conclude if the reduction in the catalytic efficiency has an impact in the cells of patients leading to SDS, or perhaps, it might affect other features of the protein.

On the other hand, it is well known that the complemented *S. cerevisiae* cells with the proteins EFL1 R1086Q and EFL1 L910K present a redistribution of Tif6 to the perinuclear region and cytoplasm. These mutations lead to the Shwachman-Diamond Syndrome and are near the C-terminal of the EFL1. Furthermore, it has also been recognized that the mutation EFL1 T657M is selected to rescue the severe slow growth phenotype in *S. cerevisiae* due to the deletion of the last 22 C-terminal residues of EFL1. Then, in this work was evaluated if the Tif6 protein was localized mainly in the nucleus due to the double mutations EFL1 T657M-R1086Q and EFL1 T657M-L910K in *S. cerevisiae*.

1 Marco teórico

1.1 Ribosomas

Los ribosomas son los complejos macromoleculares que traducen el código genético del mRNA y catalizan la síntesis de proteínas en todos los organismos. Estas nanomáquinas consisten en dos subunidades ribonucleoproteicas; en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la subunidad pequeña 40S contiene un rRNA de 1800 nucleótidos (18S) y 33 proteínas ribosomales diferentes, y es quien decodifica el código genético al unir el mRNA y los tRNA. Mientras que la subunidad grande 60S, incluye tres rRNA, uno de 121 nucleótidos (5S), otro de 158 nucleótidos (5.8S) y otro de 3396 nucleótidos (25S) y 46 proteínas ribosomales, es quien cataliza la reacción peptidiltransferasa (Woolford & Baserga, 2013).

Sin importar el organismo en cuestión, de forma general el ribosoma está compuesto de dos tercios de RNA y un tercio de proteínas. El rRNA es el responsable de la estructura global del ribosoma, y también se encarga de colocar a los tRNA sobre el mRNA y catalizar la formación del enlace peptídico. En contraste, las proteínas ribosomales están localizadas en la superficie o llenando cavidades del RNA plegado y cuya función principal consiste en estabilizar al núcleo de rRNA y permitir los cambios conformacionales necesarios para catalizar eficientemente la síntesis de proteínas (Alberts *et al.*, 2002). En la figura 1.1 se muestran las estructuras cristalográficas de las subunidades 40S y 60S de *S. cerevisiae* a 3.0 Å de resolución.

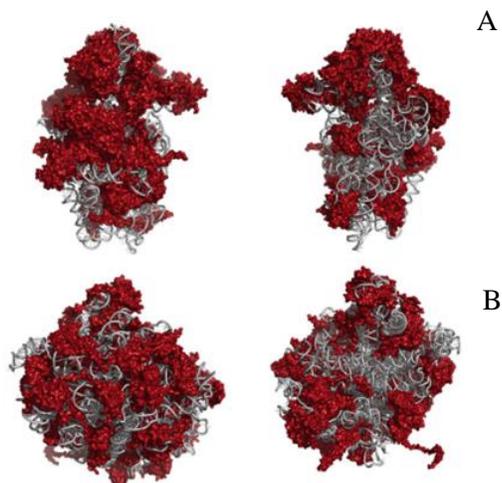


Figura 1.1 Estructuras cristalográficas de las subunidades 40S y 60S de *S. cerevisiae*.
A) Subunidad 40S. B) Subunidad 60S. Imágenes del lado izquierdo muestran la cara expuesta al solvente y las del lado derecho la cara de la interfaz. El rRNA está representado en gris y las proteínas en rojo.
Modificado de (Ben-Shem *et al.*, 2011; Woolford & Baserga, 2013).

1.2 Biogénesis ribosomal en eucariontes y ribosomopatías

La biogénesis ribosomal en eucariontes comienza en el nucléolo donde tres de los rRNA, el 18S, 5.8S y 25S, se transcriben por la RNA polimerasa I como un transcrito policistrónico que sufre diversas modificaciones post-transcripcionales por ribonucleopartículas nucleolares pequeñas (snoRNPs). Durante la transcripción del rRNA se forma una estructura “esférica” que se cree que es la partícula 90S, la cual sufre una escisión endonucleolítica en el sitio denominado A2 que divide las vías de maduración de las subunidades pre-40S y pre-60S en dos rutas distintas (Thomson *et al.*, 2013). Las proteínas ribosomales y los factores de transactivación se transcriben en el nucleoplasma por la RNA polimerasa II, se traducen en el citoplasma y deben regresar al núcleo para su asociación en la partícula 90S. Finalmente, el rRNA 5S se transcribe en el núcleo por la RNA polimerasa III (Sulima *et al.*, 2019). La partícula pre-40S ya contiene la mayoría de las proteínas ribosomales y se exporta relativamente rápido al citoplasma, donde se completa su maduración. Por el contrario, la subunidad 60S requiere reordenamientos mucho más extensos dentro del nucléolo y núcleo antes de su exportación y maduración final en el citoplasma (Thomson *et al.*, 2013). El último paso en la maduración de la subunidad pre-60S es la liberación del factor de antiasociación eIF6 por acción de la GTPasa EFL1 y de la proteína SBDS (Kargas *et al.*, 2019). Detalles de la biogénesis de ribosomas se pueden consultar en la revisión realizada por Klinge & Woolford (2019).

Las ribosomopatías se pueden definir como cualquier enfermedad relacionada con una mutación en una proteína ribosomal o factor de biogénesis cuyo defecto puede ser asociado directamente como causal de la enfermedad. Las ribosomopatías son paradójicas, ya que se caracterizan por presentar cuadros clínicos de hipoproliferación (anemia, fallos en la médula ósea, disostosis) que pueden conducir a fenotipos de hiperproliferación, ya que los pacientes que presentan ribosomopatías tienen un riesgo elevado (de 2 a 8 veces más) de presentar cáncer. Las ribosomopatías más recurrentes son la anemia de Diamond-Blackfan (DBA), el síndrome de Shwachman-Diamond (SDS), la disqueratosis congénita ligada al cromosoma X (X-DC), la hipoplasia cartílago-cabello (CHH) y el síndrome Treacher Collins (TCS), todas ligadas a proteínas no ribosomales con excepción de la anemia Diamond-Blackfan (Sulima *et al.* 2019). Las anomalías genéticas de estos desórdenes perjudican un paso específico de la biogénesis de ribosomas, por ejemplo, aproximadamente el 90% de los casos de SDS presentan mutaciones en el gen *SBDS* (del inglés Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome) que conducen a la pérdida de la función de la proteína. Las células de los pacientes con SDS con mutaciones en *SBDS* son incapaces de liberar eficientemente a eIF6 estancando la maduración de la subunidad 60S. La CHH es causada por mutaciones en el componente de RNA de la endoribonucleasa RMRP involucrada en procesamiento del RNA mitocondrial, el cual es un RNA largo no codificante del complejo RNasa MRP. Mutaciones en

RMRP afectan el procesamiento de los rRNA al inhibir la escisión del pre-rRNA y reduciendo los niveles de los rRNA 18S y 5.8S maduros. Para más detalles de las ribosomopatías y de cómo éstas conducen a cáncer se puede consultar la revisión realizada por Sulima *et al.*, (2019). En la figura 1.2 se muestra una imagen que resume la biogénesis ribosomal incluyendo las principales ribosomopatías e indicando el paso de la biogénesis afectado.

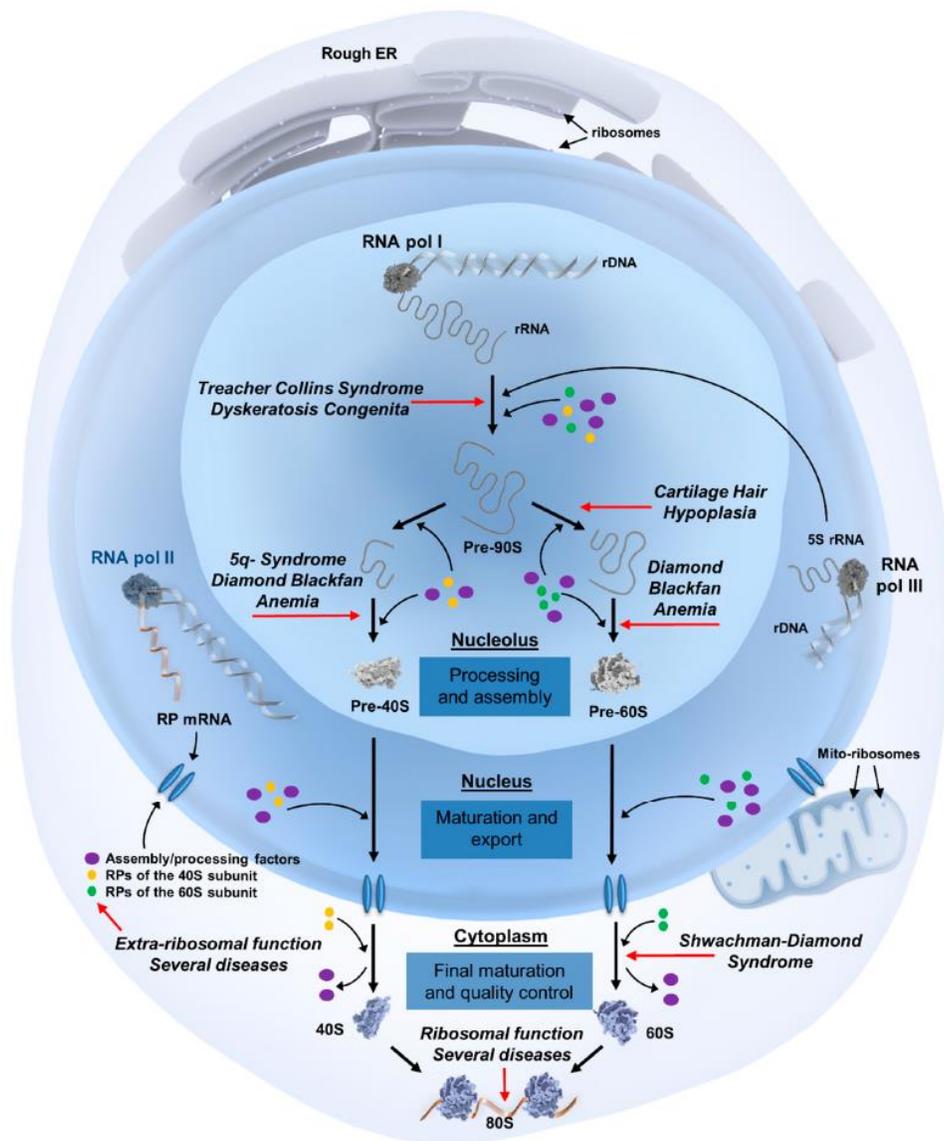


Figura 1.2 Descripción general de la biogénesis ribosomal.

Se indica mediante flechas rojas los pasos de la biogénesis ribosomal perjudicadas que conducen a una ribosomopatía. Tomada de (Sulima *et al.* 2019).

1.3 El síndrome de Shwachman-Diamond (SDS)

El síndrome de Shwachman-Diamond es una ribosomopatía caracterizada por un cuadro clínico que presenta anomalías óseas, aplasia medular con predisposición a desarrollar síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda, insuficiencia pancreática exócrina y condrodisplasia metafisaria y es causado por mutaciones en los genes *SBDS* (Boocock *et al.*, 2003; Shammas *et al.*, 2005) y *EFL1* (Stepensky *et al.*, 2017). Las células de los pacientes con SDS son incapaces de liberar eficientemente al factor de antiasociación eIF6 de la subunidad pre-60.

La liberación de eIF6 de la subunidad 60S es un requisito para el ensamblaje del ribosoma 80S en células de mamífero. Cuando se examina la ubicación de eIF6-eGFP en células de macrófago de pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond, con dos de las mutaciones más típicas en *SBDS* (183-184 TA→CT y 258+2T→C), se observa una reducción de eIF6-eGFP en núcleo, con una aparente redistribución a la región perinuclear y al citoplasma debido a que las mutantes no son capaces de liberar eficientemente a eIF6 de la subunidad 60S citoplasmática (figura 1.3) (Menne *et al.*, 2007). Se ha comprobado que la mutante *SBDS* R126T, descrita en pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond no estimula la actividad de GTPasa de *EFL1* debido a una disminución en su constante de unión (Gijsbers *et al.*, 2018). Además, *SBDS* R126T es incapaz de promover, en conjunto con *EFL1*, la liberación de eIF6 de la subunidad pre-60S (Finch *et al.*, 2011). El hecho que el factor eIF6 quede unido a la superficie de la subunidad 60S citoplasmática impide la maduración de ribosomas 80S maduros en citoplasma. Concluyendo que el fallo en la liberación de eIF6 de la superficie de la subunidad pre-60S causa el síndrome de Shwachman-Diamond.

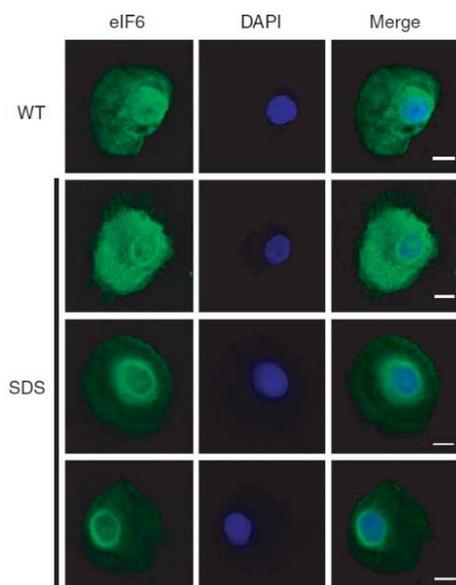


Figura 1.3 Localización de eIF6 en células de macrófago de pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond.

Tomada de (Menne *et al.*, 2007). En la primera columna se observa en verde a eIF6-GFP, en la segunda columna se observa en azul al DNA nuclear teñido con DAPI, y en la tercera columna el traslape de ambas señales. En los pacientes con SDS, eIF6 se redistribuye principalmente en la región perinuclear y citoplasma. La subunidad 60S debe estar unida a eIF6 para su exportación al citoplasma. Una vez que eIF6 es liberada debe regresar al núcleo. Las células silvestres, tienen ubicado a eIF6 principalmente en núcleo, aunque también hay en citoplasma.

1.4 La proteína SBDS

La proteína SBDS (conocida también como Sdo1 para el ortólogo en *S. cerevisiae*) tiene tres dominios estructurales: el dominio I, también denominado FYSH (residuos S2-S96), el dominio II (residuos D97-A170) y el dominio III (H171-E250). El extremo amino (S2-V15) y carboxilo (N238-E250) no están estructurados (figura 1.4). El dominio I tiene un plegamiento típico tipo Ferredoxina, el dominio II consta de un manojo de tres hélices α torcidas a la derecha, mientras que el dominio III está conformado por dos hélices α posicionadas sobre la cara de una lámina β antiparalela (Finch *et al.*, 2011).

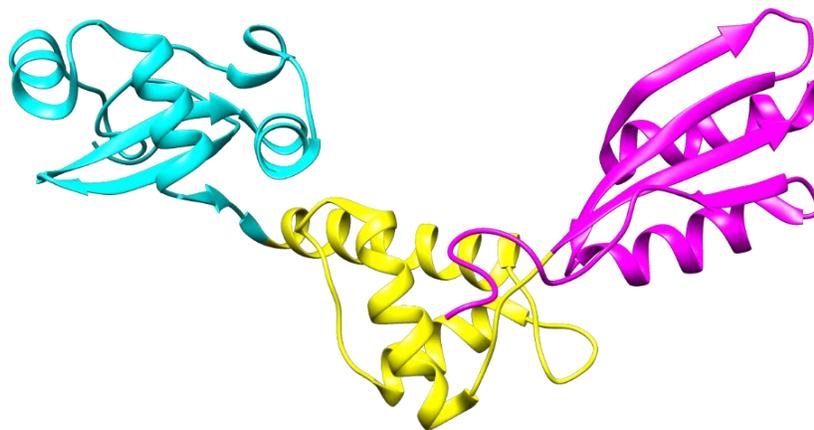


Figura 1.4 Estructura tridimensional de SBDS.

SBDS de *H. sapiens* obtenida por RMN (PDB 2L9N), en cian el dominio I, en amarillo el dominio II y en morado el dominio III.

La proteína SBDS actúa como un Intercambiador de Nucleótidos de Guanina (GEF, por sus siglas en inglés) para la GTPasa EFL1. El complejo EFL1-SBDS no modifica la afinidad por GTP, ni cambia las constantes de velocidad de formación del complejo EFL1-GDP, pero sí aumenta las constantes de velocidad de disociación de EFL1 con GDP, como resultado general se incrementa la constante de disociación (K_d) por este nucleótido (García-Márquez *et al.*, 2015). Se ha reportado que *SBDS* es un gen quasi-esencial y su eliminación en *S. cerevisiae* conduce a un fenotipo severo de lento crecimiento que solo es suprimido por mutaciones en el gen *TIF6*. La eliminación de SBDS conduce a una acumulación de subunidades 60S y un aumento de Tif6 en citoplasma, además, se ha comprobado que en ausencia de Sdo1, Tif6 persiste unido en la subunidad 60S citoplasmática (Menne *et al.*, 2007).

1.4.1 Mutaciones en *SBDS* que conducen a SDS

El gen *SBDS* se compone de cinco exones que comprenden 7.9 kb, que en conjunto con un gen adyacente residen en un bloque de 305 kb de secuencia genómica que está duplicado localmente. El parálogo está localizado a 5.8 Mb de manera distal y contiene una copia de un pseudogen sin procesar de *SBDS* denominado *SBDSP*. El transcrito del pseudogen tiene un 97% de identidad con *SBDS*, pero contiene deleciones y cambios en la secuencia de nucleótidos que evitan la traducción de una proteína funcional. Cuando el gen *SBDS* y el pseudogen *SBDSP* sufren eventos de recombinación se generan mutaciones en la proteína *SBDS* que conducen al síndrome de Shwachman-Diamond. Las mutaciones con mayor frecuencia en individuos con SDS son el cambio del dinucleótido 183-184 TA→TC, que introduce un codón de paro en el marco de lectura en el residuo K62X, y la mutación 258 + 2T→C que interrumpe el sitio donador de empalme del intrón dos, este cambio produce un corrimiento en el marco de lectura que codifica para una proteína trunca en el aminoácido 84, C84fs3 (Boocock *et al.*, 2003). No se han descrito pacientes homocigotos para la mutante C84fs3 (dominio I de *SBDS*) por lo que se ha especulado que la mutación 258 + 2T→C todavía puede producir proteína *SBDS* funcional pese a la interrupción del sitio donador de empalme. Por lo que el fenotipo clínico SDS también está asociado con una expresión reducida de las proteínas *SBDS* (Shammas *et al.*, 2005), fenómeno conocido como haploinsuficiencia. Las mutaciones asociadas a SDS se han clasificado en tres grupos con base en la estructura de *SBDS* y ensayos de complementación con el ortólogo en levadura de *S. cerevisiae* como: 1) generación de proteínas *SBDS* trucas, 2) mutaciones que desestabilizan el plegamiento de la proteína y 3) mutaciones que modifican epítopes superficiales. En el primer grupo se encuentran las mutaciones K62X, S96X y C84fs3 que conducen a la pérdida de función de la proteína. En cuanto al segundo grupo se ha sugerido que las mutaciones C31W, L71P e I87S perjudican la función de *SBDS* probablemente como consecuencia de un mal plegamiento. Finalmente, en el tercer grupo se ha reportado mutaciones que afectan significativamente la función de *SBDS*, sin afectar el plegamiento global de la proteína, por ejemplo, las mutaciones S143L e I212T inhiben casi completamente la unión con EFL1 mientras que las mutaciones R19Q, K67E, R126T, I167T y R175W disminuyen la constante de unión de estas proteínas (Gijsbers *et al.*, 2018).

1.5 La GTPasa EFL1

La GTPasa EFL1 (del inglés Elongation Factor-Like 1) es homóloga a la translocasa ribosomal EF-G en procariontes y al Factor de Elongación de la Traducción 2 (EF-2) en eucariontes. EFL1 posee una organización típica de un factor de translocación compuesto por el dominio G (dominio I) y los dominios II, III, IV y V (Senger *et al.*, 2001). El dominio I abarca los residuos M1-P364, el dominio II los residuos S365-L610, el dominio III consiste en los residuos N611-E687, el dominio IV (no continuo) de los residuos P688-K976 y de los residuos I1059-K1120 y el dominio V va de los residuos P977-E1058. Además, la familia de las proteínas EFL1 contiene una inserción variable en el dominio II que en el ortólogo humano comprende los residuos A419-E499 (figura 1.5A).

Pese al bajo porcentaje de identidad, las GTPasas o proteínas G, pueden ser reconocidas por la secuencia de 5 motivos altamente conservados en el dominio G, denominados G1-G5. El G1 o asa P (por su unión a fosfato) tiene una secuencia consenso GxxxxGKS/T, el motivo G2 (switch I) consiste en un residuo de Thr casi totalmente conservado, el motivo G3 (switch II) tiene una secuencia consenso DxxG, estos dos motivos están implicados en el mecanismo de hidrólisis de GTP. El motivo G4, cuya secuencia consenso es N/TKxD, es el principal encargado de la especificidad por la unión de la base de guanina, y el motivo G5, aunque es muy poco conservado, también es importante para la unión de la base de guanina, a menudo con una secuencia SAK (Wittinghofer & Vetter, 2011). Para el caso de la GTPasa EFL1 de *Homo sapiens* (a partir de ahora HsEFL1) la secuencia de los cinco motivos (G1-G5) son G1: AHVDHGKT (residuos 26-33), G2: RGIT (residuos 66-69), G3: DSPGH (residuos 102-106), G4: NKID (residuos 156-159) y G5: SAI (residuos 235-237) (figura 1.5B, Mendez-Godoy *et al.*, 2017).

El dominio G experimenta grandes cambios conformacionales durante el ciclo funcional de la enzima que alterna de una forma inactiva y unida a GDP (conformación D) a un estado activo en complejo con GTP (conformación T) (Bourne *et al.*, 1991). Se ha reportado que EFL1 de *S. cerevisiae* (a partir de ahora ScEFL1) se une a GTP y GDP mediante un mecanismo de dos etapas que consiste de una unión inicial seguido de un rearrreglo estructural (García-Márquez *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que ScEFL1 puede adoptar cuatro conformaciones distintas: 1) la forma apo, 2) la conformación T que se da cuando ScEFL1 interactúa con GTP (EFL1_T-GTP), la conformación unida a Sdo1 (Sdo1-EFL1_T) u otra conformación unida a ambas moléculas (Sdo1-EFL1_T-GTP), 3) una conformación D que se da cuando ScEFL1 interactúa con GDP (EFL1_{D1}-GDP) y 4) una conformación tipo D diferente inducida por la unión simultánea de Sdo1 y GDP (Sdo1-EFL1_{D2}-GDP) (Luviano *et al.*, 2019).

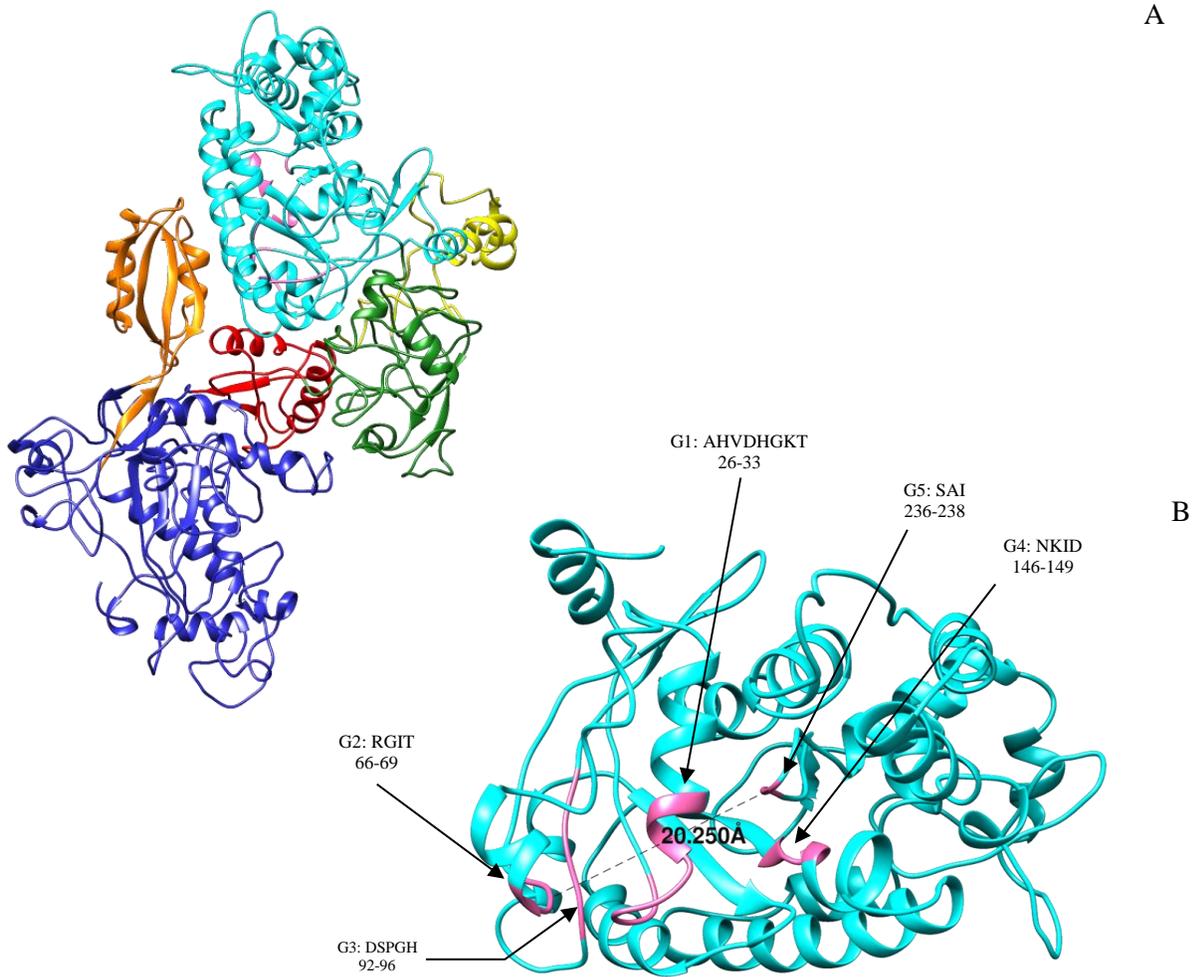


Figura 1.5 Estructura tridimensional de HsEFL1.

A) Modelo tridimensional de HsEFL1 (PDB 5ANB_K). En cian el dominio I, en rosa los motivos G1-G5 encargados de la especificidad, reconocimiento e hidrólisis de GTP, en verde el dominio II, en rojo el dominio III, en azul el dominio IV, en naranja el dominio V y en amarillo la inserción variable. B) Dominio G de HsEFL1, donde se muestran en rosa los 5 motivos encargados de la especificidad, reconocimiento e hidrólisis de GTP (F. Weis *et al.*, 2015).

Se ha reportado que *EFL1* también es un gen quasi-esencial, ya que su eliminación genera un fenotipo de lento crecimiento que solo es suprimido por mutaciones en el gen *TIF6*. Se ha observado que la eliminación de *EFL1* conduce a una acumulación de subunidades 60S en el núcleo y un incremento de Tif6 en citoplasma (Senger *et al.*, 2001). El extremo C terminal es imprescindible para la función de EFL1, ya que pequeñas deleciones en él conducen a fenotipos de lento crecimiento. La eliminación de los últimos 29 residuos presenta el mismo fenotipo severo de lento crecimiento que la eliminación del gen completo, mientras que eliminar 22 residuos conduce a un fenotipo menos severo de lento crecimiento que puede ser suprimido por las mutaciones intragénicas P151L y T657M (Bécam *et al.*, 2001).

1.5.1 Mutaciones en *EFL1* que conducen a SDS

Se sabe que el síndrome de Shwachman-Diamond es genéticamente heterogéneo (Woloszynek *et al.*, 2004). Hasta el momento, sólo se han reportado tres mutaciones en *HsEFL1* en pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond sin mutaciones en *SBDS*. Las primeras dos que se reportaron son las mutaciones homocigotas c.2645 T→A y c.3284 G→A que conducen a las sustituciones M882K y R1095Q. La metionina 882 es un residuo que no está conservado entre las especies, pero dicha posición solo admite variación con residuos hidrófobos, en contraste la arginina 1095 es un residuo invariante entre especies. Las mutaciones equivalentes en el ortólogo de levadura son la L910K y la R1086Q, respectivamente. Los autores demostraron mediante ensayos de complementación genética en *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con ScEFL1 L910K y ScEFL1 R1086Q una re-localización de Tif6-GFP en citoplasma (Stepensky *et al.*, 2017); fenotipo característico de células de pacientes con SDS causado por mutaciones en *SBDS*. También se identificó una mutante homocigota de *HsEFL1* (c.379 A→G, p. T127A) en un paciente con un cuadro clínico SDS sin versiones patogénicas en *SBDS* (Tan *et al.*, 2018). En el estudio de esta mutante no se evaluó si eIF6 se encuentra relocalizado en citoplasma, pero se presupone que la mutante HsEFL1 T127A es la responsable del cuadro clínico SDS. La Thr 127 es un residuo invariante entre especies. Hasta el momento se desconoce el origen de la disfunción cuando este síndrome se genera por mutaciones en *EFL1*.

1.6 El factor de antiasociación eIF6

El factor de antiasociación eIF6 (del inglés Eukaryotic Translation Initiation Factor 6, conocida también como Tif6 para el ortólogo en *S. cerevisiae*) es una proteína de ensamblaje y transporte nuclear que está altamente conservada en *archaea* y *eucaria*. eIF6 es una proteína esencial en levadura y mamíferos requerida para la exportación de la subunidad pre-60S al citoplasma, donde debe ser removida por acción de EFL1 y *SBDS* para permitir la unión de las subunidades 60S y 40S. La liberación de eIF6 es un prerrequisito para la formación de ribosomas competentes para la traducción ya que se une al asa sarcina-ricina y a las proteínas ribosomales uL3, uL14 y eL24 en el puente intersubunitario de la subunidad grande, impidiendo físicamente la unión prematura de ribosomas (Warren, 2018). Tif6 tiene un plegamiento conservado que consiste en cinco copias de un subdominio repetido α/β de 45 residuos con un eje interno de pseudo simetría pentamérico. En la figura 1.6 se muestra la estructura cristalográfica de Tif6 de *S. cerevisiae* (Groft *et al.*, 2000).

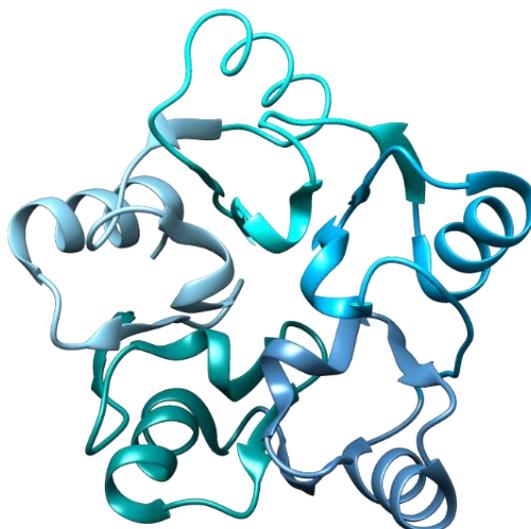


Figura 1.6 Estructura cristalográfica de Tif6.
(PDB 1G62)

1.7 Mecanismo para la liberación de eIF6 medido por EFL1 y SBDS

La subunidad ribosomal 60S debe sufrir una serie ordenada de pasos para su maduración final en el citoplasma antes de que entre al conjunto de ribosomas competentes para la traducción. La proteína SBDS coopera con la GTPasa EFL1 para catalizar la liberación del factor de antiasociación eIF6, éste último bloquea estéricamente la formación del puente intersubunitario B6 al unirse al asa sarciniricina y a las proteínas uL14 y uL24 de la subunidad 60S y debe ser removido para permitir el ensamblaje de ribosomas 80S activos traduccionalmente. Posterior a la liberación, eIF6 debe ser reciclado al núcleo (F. Weis *et al.*, 2015). Se ha comprobado que no existe contacto directo entre la proteína SBDS y eIF6. El dominio I de SBDS ocupa el sitio P de la subunidad 60S, mientras que EFL1 se une al centro GTPasa canónico donde puede interactuar potencialmente con SBDS y eIF6 (figura 1.7).

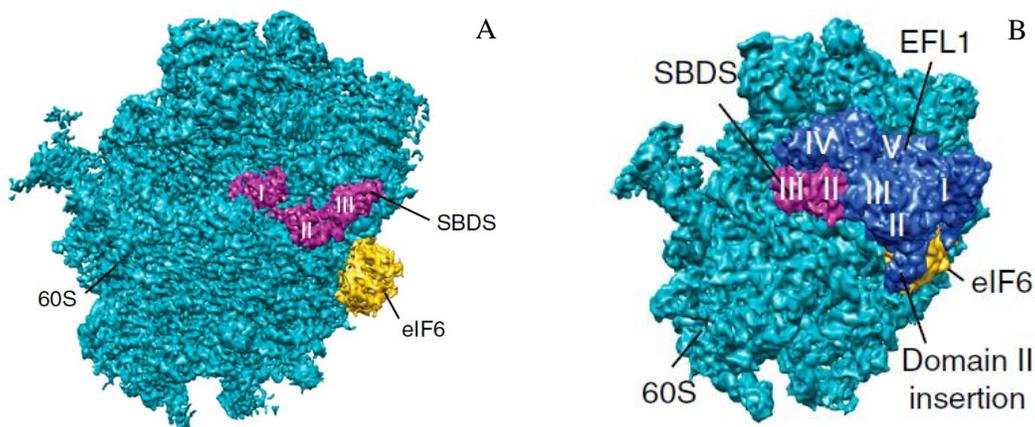


Figura 1.7 Microscopías crioelectrónicas del complejo 60S-eIF6-SBDS-EFL1.

A) Complejo 60S-eIF6-SBDS sin HsEFL1. B) Complejo 60S-eIF6-SBDS-EFL1. Cian – subunidad 60S, morado – SBDS, azul – EFL1, amarillo – eIF6. Tomada de (Weis *et al.*, 2015).

Se ha propuesto un mecanismo secuencial para la liberación de eIF6 (Weis *et al.*, 2015) como sigue: EFL1 adopta dos conformaciones distintas; en el complejo 60S-eIF6-SBDS-EFL1, EFL1 se une a un sitio en la cara intersubunitaria de la subunidad 60S, el 13.5% del área enterrada de EFL1 interactúa con el rRNA, el 33% interacciona con SBDS, el 40% con eIF6, el 12% con uL11 y 1.5% con uL10. En la transición al complejo 60S-SBDS-EFL1, EFL1 experimenta un rearrreglo interdominio (conformación acomodada) con los dominios I, II y IV girando alrededor del eje formado por los dominios III y V, con un mayor número de interacciones con el rRNA (24%), SBDS (42%) y las proteínas ribosomales (34%) (figura 1.8).

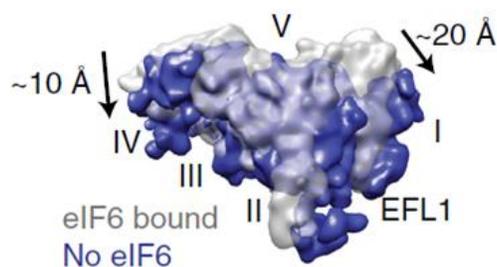


Figura 1.8 Superposición de las microscopías crioelectrónicas de EFL1 antes y después de la liberación de eIF6.

Gris: EFL1 cuando eIF6 se encuentra unido. Azul: EFL1 cuando eIF6 se ha liberado. Tomada de (Weis *et al.*, 2015).

La conformación acomodada de EFL1 es incompatible con la unión simultánea de eIF6 ya que compiten por un sitio de unión común en la unidad 60S. En el estado acomodado, el dominio I de EFL1 se aproxima a la punta del asa sarcina-ricina, y aunque la inserción del dominio II de EFL1

también interactúa con eIF6, experimentos de complementación genética en *S. cerevisiae* han revelado que es prescindible para su función *in vivo*. Se ha concluido que el dominio I tiene una función crítica en la competencia con eIF6 por el sitio de unión traslapado en el asa sarcina-ricina (figura 1.9).

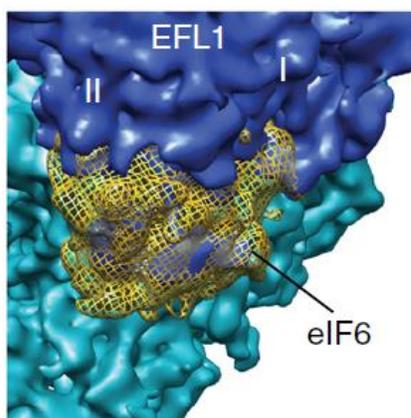


Figura 1.9 Sitio de unión común entre eIF6 y EFL1 en el complejo 60S-SBDS-EFL1.

Densidades de las microscopías crioelectrónicas del complejo 60S-SBDS-EFL1, en maya amarilla se muestra el volumen previamente ocupado por eIF6. Tomada de (Weis *et al.*, 2015).

Así mismo, el dominio II de SBDS experimenta una rotación de 60° cuando EFL1 se une, con un punto de pivote a través del extremo N de la hélice $\alpha 5$. Por lo que el dominio III de SBDS gira a 180° de la base del tallo P (estado cerrado) hacia la hélice 69 del rRNA (estado abierto) mientras que el dominio I de SBDS permanece anclado en el sitio P (figura 1.10).

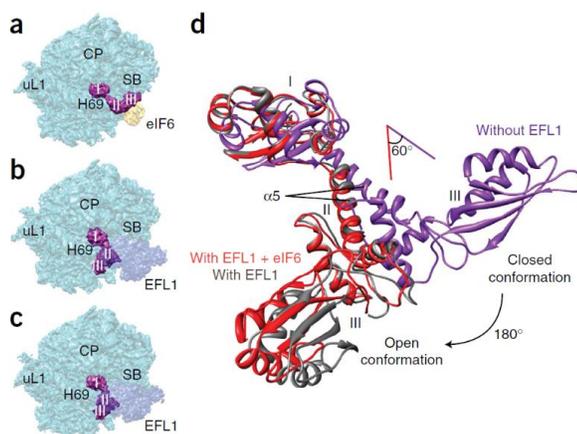


Figura 1.10 Desplazamiento rotacional de SBDS como resultado de la unión de EFL1.

Complejos A) 60S-eIF6-SBDS. B) 60S-eIF6-SBDS-EFL1. C) 60S-SBDS-EFL1. SBDS - morado, eIF6-amarillo, subunidad 60S - cian y EFL1 - azul. D) Superposición de las estructuras de SBDS en los complejos 60S-eIF6-SBDS (morado), 60S-eIF6-SBDS-EFL1 (rojo) y 60S-SBDS-EFL1 (negro). La hélice $\alpha 5$ de SBDS está indicada. Tomada de (Weis *et al.*, 2015).

Lo anterior se puede resumir en los siguientes pasos: a) SBDS en un estado cerrado es reclutada a la subunidad citoplasmática pre-60S cargada con eIF6, posteriormente b) EFL1 unida a GTP se une directamente a SBDS y eIF6 en el centro asociado a GTPasas, promoviendo un desplazamiento rotacional del dominio III de SBDS de la base del tallo P a la hélice 69 (estado abierto) el cual es estabilizado por los residuos K151 y R218 de SBDS. c) EFL1 unida a GTP en el estado acomodado compete con eIF6 por un sitio de unión común a la subunidad 60S, promoviendo la liberación de eIF6. d) La interacción de EFL1 unida a GTP con el asa sarcina-ricina promueve la hidrólisis de GTP, desencadenando un cambio conformacional en EFL1 que promueve un estado de baja afinidad de unión al ribosoma, entonces SBDS y EFL1 unida a GDP se disocian de la subunidad 60S (figura 1.11).

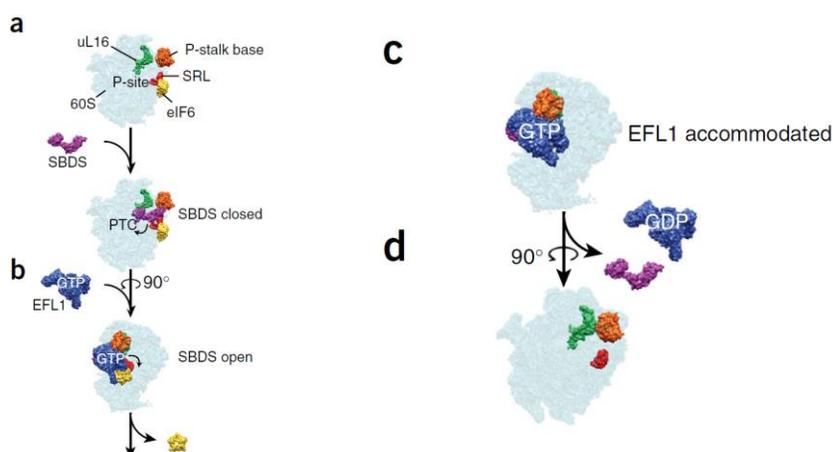


Figura 1.11 Mecanismo de liberación de eIF6 mediante EFL1 y SBDS en el citosol.
Tomada de (Weis *et al.*, 2015).

Hasta ahora, se ha descrito una serie secuencial de pasos para el mecanismo de liberación de eIF6. Este mecanismo propone un reclutamiento de las proteínas EFL1 y SBDS jerárquico y secuencial, en donde SBDS es reclutada primero y luego EFL1 unida a GTP (F. Weis *et al.*, 2015), sin embargo, dicho mecanismo presenta conflictos de información con otros estudios. La energética de unión de EFL1, Sdo1, GTP y GDP se ha descrito a través de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) en un contexto libre de ribosoma (Luviano *et al.*, 2019). Esta caracterización sugiere que EFL1 adopta una conformación tipo T cuando Sdo1 se une a ella, ya que la unión de GTP al complejo Sdo1-EFL1 es tipo cuerpo rígido (figura 1.12). En un contexto *in vivo* EFL1 estaría unida de forma equimolar a GDP y a GTP, respectivamente, entonces SBDS puede modificar dicho equilibrio y desplazarlo a la unión con GTP, ya que Sdo1 disminuye la afinidad por GDP (García-Márquez *et al.*, 2015). Esta evidencia parece indicar que EFL1 y SBDS deben ser reclutadas como heterodímero a la subunidad 60S, en vez de en un orden secuencial y jerárquico, además de que los experimentos de Finch *et al.*, (2011) muestran que ambas proteínas se pueden unir a la subunidad 60S de forma independiente.

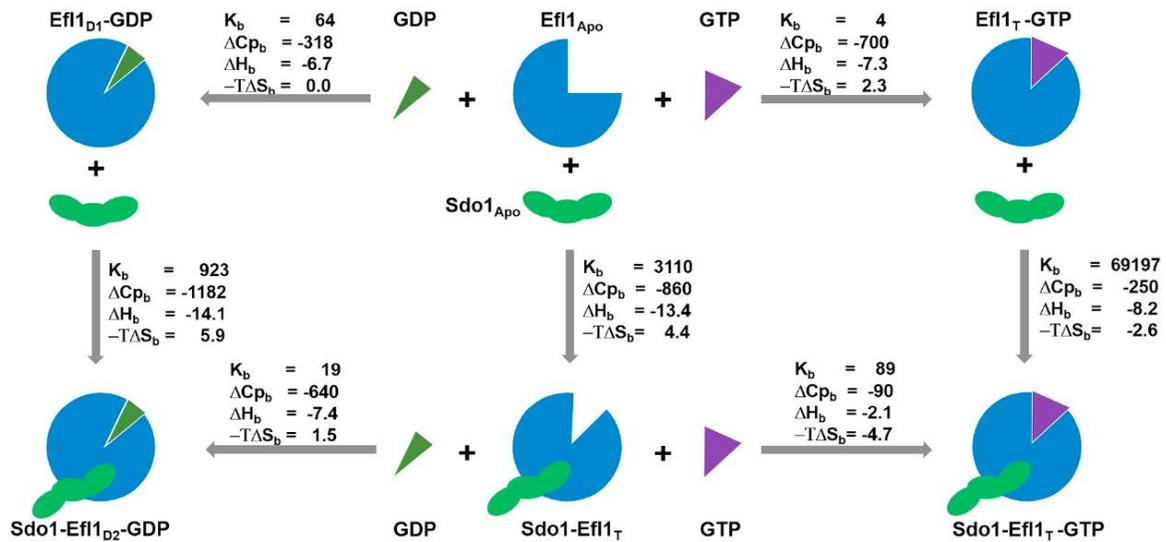


Figura 1.12 Energética de unión de EFL1, Sdo1, GTP y GDP por ITC en un contexto libre de subunidad ribosomal 60S.
Tomada de (Luviano *et al.*, 2019)

También, se reportó que EFL1 interactúa a través de los dominios III y IV con los dominios I y II de SBDS, y entonces el dominio G y la inserción variable del dominio II interactúan con eIF6, aunque también demostraron que la inserción variable es prescindible para la función de EFL1 *in vivo* (F. Weis *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha caracterizado la energética de unión de EFL1, la inserción variable de EFL1, y EFL1 sin inserción variable con Sdo1 en un contexto libre de ribosoma a través de ITC, encontrando que EFL1 sin inserción variable deja de interactuar con Sdo1, y que de hecho, la inserción sola sí lo hace (Asano *et al.*, 2014). Por lo que, se necesitan más estudios para integrar toda la información en un mecanismo que satisfaga las evidencias experimentales, en contexto con y sin ribosoma.

2 Justificación

En 2018 se reportó un paciente con sospecha de presentar el síndrome de Shwachman-Diamond que no presentaba mutaciones patogénicas en el gen de *SBDS*, pero sí en el gen de *EFL1*. La mutación resulta en la sustitución HsEFL1 T127A que se predijo como perjudicial de acuerdo con los algoritmos de agotamiento dependiente de anotación combinada (CADD), polyphen y transformación de características invariantes a la escala (SIFT). Sin embargo, no se comprobó si el factor de antiasociación eIF6 se encuentra relocalizado en citoplasma, fenotipo característico de las células de pacientes con SDS. En este trabajo se evaluó si el factor de antiasociación Tif6 se encuentra redistribuido del núcleo a la región perinuclear y/o citoplasma debido a la mutación EFL1 T137A (mutación equivalente a T127A en la proteína humana) corroborando de esta manera que la mutación conduce al síndrome de Shwachman-Diamond. Además, no se sabe el motivo por el cual un paciente desarrolla el síndrome de Shwachman-Diamond debido a mutaciones en *EFL1*. Entonces, caracterizar bioquímicamente a la mutante HsEFL1 T127A, y a la mutante del ortólogo de levadura, ScEFL1 T137A, permitirá saber cómo la mutación puntual afecta la función de las GTPasas HsEFL1 y ScEFL1.

Por otro lado, se ha comprobado que las células de *S. cerevisiae* complementadas con las proteínas EFL1 R1086Q y EFL1 L910K tienen redistribuido a Tif6 en la región perinuclear y citoplasma. Estas mutaciones conducen al síndrome de Shwachman-Diamond y además se encuentran próximas al extremo C-terminal de EFL1. También, se sabe que la mutación supresora EFL1 T657M es seleccionada para suprimir el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae* cuando se eliminan los últimos 22 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal de EFL1. Entonces, en este trabajo se evaluó si Tif6 se relocaliza principalmente en núcleo debido a las dobles mutantes EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K en *S. cerevisiae*.

3 Hipótesis

Dado que la mutación HsEFL1 T127A es homocigota para el paciente con síndrome de Shwachman-Diamond, y EFL1 es un gen quasi-esencial en eucariontes, entonces la mutante ScEFL1 T137A complementará la función de ScEFL1 en un ensayo de complementación genética. Además, rescatará el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae efl1Δ*. Sin embargo, el factor de antiasociación, Tif6, se relocalizará en la región perinuclear y/o citoplasma.

Dado que la mutación homocigota T127A se ubica entre los motivos G3 y G4 en el dominio G de EFL1 y éstos se encargan de la hidrólisis de GTP y de la unión de GTP y GDP, entonces las mutantes HsEFL1 T127A y ScEFL1 T137A unirán GTP y GDP con menor afinidad que sus respectivas proteínas EFL1 silvestres. Además, hidrolizarán GTP con una tasa menor con respecto a la proteína silvestre.

Dado a que las mutaciones ScEFL1 L910K y ScEFL1 R1086Q se encuentran próximas al extremo C-terminal de EFL1 y la mutación supresora ScEFL1 T657M se selecciona para rescatar el fenotipo de lento crecimiento en *S. cerevisiae* debido a la eliminación de los últimos 22 residuos en el extremo C-terminal de ScEFL1, entonces el factor de antiasociación Tif6 se redistribuirá principalmente en núcleo debido a las dobles mutantes EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K en un ensayo de complementación en *S. cerevisiae efl1Δ*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Entender las causas del mal funcionamiento de la mutante HsEFL1 T127A presente en pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond.

4.2 Actividades específicas

- Construir los plásmidos *pRS426-HsEFL1 T127A* y *pRS426-ScEFL1 T137A* para la expresión de las proteínas.
- Construir el plásmido *pAMG1-ScEFL1 T137A* para el ensayo de complementación en células *S. cerevisiae efl1Δ*.
- Evaluar la complementación funcional de la mutante ScEFL1 T137A en células *S. cerevisiae efl1Δ*.
- Evaluar la localización de Tif6-GFP en células *S. cerevisiae ScEFL1 T137A* mediante microscopía de fluorescencia.
- Expresar y purificar a las proteínas recombinantes HsEFL1 T127A y ScEFL T137A mediante técnicas convencionales de cromatografía.
- Verificar el plegamiento de las mutantes HsEFL1 T127A y ScEFL T137A mediante técnicas biofísicas.
- Determinar la T_m de las mutantes HsEFL1 T127A y ScEFL T137A.
- Determinar la K_d de las mutantes HsEFL1 T127A y ScEFL T137A por GTP y GDP.
- Determinar la K_M y la k_{cat} de las mutantes HsEFL1 T127A y ScEFL T137A mediante espectroscopía de absorción con un ensayo enzimático acoplado.
- Construir los plásmidos *pAMG1-ScEFL1 T657M-R1086Q* y *pAMG1-ScEFL1 T657M-L910K* para el ensayo de complementación en células *S. cerevisiae efl1Δ*.
- Evaluar la localización de Tif6-GFP en células *S. cerevisiae ScELF1 T657M-R1086Q* y *ScEFL1 T657M-L910K* mediante microscopía de fluorescencia.

5 Materiales y métodos

5.1 Construcción de las mutantes *HsEFL1 T127A* y *ScEFL1 T137A*

Las mutantes *HsEFL1 T127A*, *ScEFL1 T137A* en el vector *pRS426*, y *ScEFL1 T137A* en el vector *pAMG1* fueron generadas mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR, la mezcla de reacción está descrita en la tabla 5.1. Se usó como DNA molde los plásmidos *pRS426-HsEFL1*, *pRS426-ScEFL1* y *pAMG1-ScEFL1*. Se realizó una PCR de dos pasos cuyo programa se describe en la tabla 5.2. Los plásmidos se amplificaron con cebadores cuya secuencia contiene la mutación puntual T127A y T137A respectivamente (tabla 5.3). El producto PCR se digirió con la enzima *DpnI* (16 h, 37 °C) y posteriormente todo el volumen de la reacción de PCR se transformó en la cepa de *Escherichia coli* DH10 β (anexo 11.1) mediante choque térmico (anexo 11.2) empleando como marcador de selección la resistencia a ampicilina.

Tabla 5.1 Mezcla de reacción para la mutagénesis sitio dirigida por PCR empleada para generar las mutantes *HsEFL1 T127A* y *ScEFL1 T137A*.

Reactivo	Volumen (μL)
Solución amortiguadora (10X LA Mg^{2+} plus)	1.5
Takara LA Taq polimerasa (5 U μL^{-1})	0.075
Mezcla de dNTPs (2.5 mM cada uno)	1.2
ADN molde (10-90 ng μL^{-1})	1.2
Cebador directo (10 mM)	0.45
Cebador reverso (10 mM)	0.45
MgCl_2 (25 mM)	0.3
Agua libre de nucleasas	9.825
Volumen final	15

Tabla 5.2 Programa PCR para la mutagénesis sitio dirigida empleada para generar las mutantes *HsEFL1 T127A* y *ScEFL1 T137A*.

Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
94 °C	1 min	1
98 °C	10 s	30
70 °C	15 min	
70 °C	10 min	1
4 °C	∞	

Tabla 5.3 Secuencia de los cebadores empleados para generar las mutantes *HsEFL1 T127A* y *ScEFL1 T137A* resaltando los nucleótidos que introducen la mutación puntual.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Sentido
EFL1 T127Afor	GGAGTCTGTCCACAG G CACAGGCAGTTCTGCGAC	Directo
EFL1 T127Arev	GTCGCAGAACTGCCTGT G CCTGTGGACAGACTCC	Reverso
EFL1 T137Afor	GGGTATGCTCGCA A G C TGTCACAGTGTGAG	Directo
EFL1 T137Arev	CTCAACACTGTGAC A G C TTGCGAGCATACCC	Reverso

De las clonas transformadas se extrajo DNA plasmídico y las regiones codificantes *HsEFL1 T127A* y *ScEFL1 T137A* se secuenciaron para corroborar las mutaciones respectivas y verificar que no hubo mutaciones aleatorias.

5.2 Evaluación de la complementación funcional de la mutante *ScEFL1 T137A* en *S. cerevisiae efl1A*

Los plásmidos *pAMG1-ScEFL1*, *pAMG1-ScEFL1 T137A* y *pAMG1* se transformaron en la cepa *S. cerevisiae* AM1 respectivamente mediante el protocolo de acetato de litio/acarreador de DNA/polietilenglicol (Gietz & Woods, 2002) (anexo 11.3). Las clonas transformadas se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio mínimo sin uracilo (anexo 11.4). Posteriormente, *S. cerevisiae* AM1 *pAMG1-ScEFL1*, *S. cerevisiae* AM1 *pAMG1-ScEFL1 T137A* y *S. cerevisiae* AM1 *pAMG1* se estiraron respectivamente en una superficie de aproximadamente 2 por 2 cm en medio mínimo sin uracilo (anexo 11.4) Los tapetes celulares se estiraron en una superficie de 2 por 2 cm en medio para esporular (anexo 11.8) y se incubaron durante 2 semanas a 23 °C. De los tapetes celulares obtenidos se realizó una suspensión de esporas en agua destilada estéril a una $D_{600\text{ nm}} = 1$ y 20 μL se sembraron por extensión en medio SD/MSG-His/Arg/Lys (anexo 11.9) con canavanina y tialisina a una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para seleccionar a la progenie meiótica silvestre. De la misma solución de esporas se plaquearon 80 μL en medio SD/MSG-His/Arg/Lys (anexo 11.9) con canavanina y tialisina a una concentración final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nourseotricina (ClonNAT) para seleccionar a la progenie meiótica *efl1A::natMX6* (figura 5.1). Se evaluó el crecimiento de colonias transcurridos 2 días de incubación a 30 °C (Kuzmin *et al.*, 2016). Las cepas de *S. cerevisiae* AM1 haploides obtenidas bajo esta metodología se denominan *S. cerevisiae* AM1H.

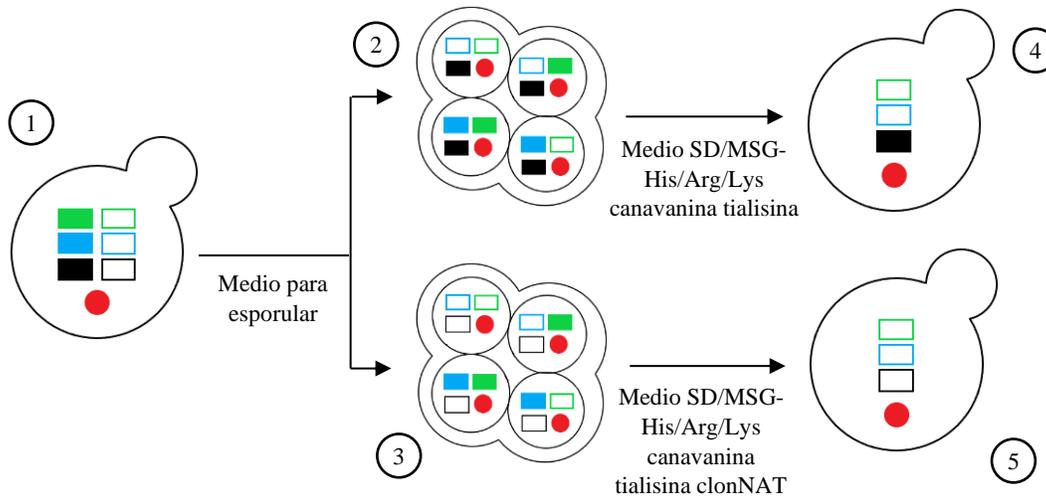


Figura 5.1 Metodología para el ensayo de complementación de ScEFL1 T137A en *S. cerevisiae efl1Δ*. En 1) está representada *S. cerevisiae* AM1 diploide, en rectángulo sólido verde, azul y negro se representan a los genes *CAN1*, *LYP1* y *EFL1* respectivamente. Rectángulos sin relleno y con borde verde, azul y negro representan a los genes *can1Δ*, *lyp1Δ* y *efl1Δ::natMX6* respectivamente. Círculo rojo se representa el plásmido con el gen de interés a complementar. Las células se siembran en medio para esporular, y se obtiene las tétradas de esporas con las posibles combinaciones de genes, representadas por 2 y 3. Finalmente, dependiendo del medio de cultivo donde se siembran las esporas, se puede elegir la progenie meiótica silvestre representada en 4, o la progenie meiótica *efl1Δ::natMX6* representada en 5, que es donde se evalúa si el gen de interés complementa la función.

5.3 Evaluación de la localización de Tif6-GFP en *S. cerevisiae* AM1H mediante microscopía de epifluorescencia

El plásmido *pRS411-Tif6-GFP* se transformó en las cepas *S. cerevisiae* AM1H *pAMG1-ScEFL1* y *S. cerevisiae* AM1H *pAMG1-ScEFL1 T137A* (cepas haploides de *S. cerevisiae* AM1 obtenidas bajo la metodología 5.2) mediante el protocolo de acetato de litio/acarreador de DNA/polietilenglicol (Gietz & Woods, 2002) (anexo 11.3). Las clonas transformadas se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio mínimo sin uracilo y metionina (anexo 11.10). Brevemente, 3 mL de medio SD-Ura-Met se inocularon con una colonia de *S. cerevisiae* AM1H *pAMG1-ScEFL1*, *pRS411-Tif6-GFP* y *S. cerevisiae* AM1H *pAMG1-ScEFL1 T137A*, *pRS411-Tif6-GFP* respectivamente. El cultivo se incubó a 30 °C durante 12 h a 200 rpm, posteriormente se utilizó para inocular 50 mL de medio SD-Ura-Met a una $D.O_{600\text{ nm}} = 0.1$ (30 °C a 200 rpm), cuando el cultivo alcanzó una $D.O_{600\text{ nm}} = 0.8$ se colectó el paquete celular y se resuspendió en 1 mL de una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final de $2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ en solución amortiguadora de fosfatos (25 mM, pH 7), y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (25 mM, pH 7) y se resuspendió en 500 μL de solución amortiguadora de fosfatos. En un portaobjetos recubierto con poli L-lisina se colocaron 20 μL de dicha suspensión y se observó en un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara CCD, utilizando los canales para DAPI y para

GFP a una magnificación de 100x. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software ImageJ; se cuantificó la cantidad de píxeles en el núcleo, citoplasma y en el fondo de cada imagen en 81 dpi, tanto para el canal de GFP como para el de DAPI. La fluorescencia en núcleo se obtuvo mediante la ecuación 5.1 y la fluorescencia en citoplasma mediante la ecuación 5.2.

$$\% \text{ Fluorescencia Núcleo} = \left[\frac{N - F}{(N - F) + (C - F)} \right] \cdot 100 \quad (5.1)$$

$$\% \text{ Fluorescencia Citoplasma} = \left[\frac{C - F}{(N - F) + (C - F)} \right] \cdot 100 \quad (5.2)$$

Donde:

N: es el número de píxeles en núcleo

F: es el número de píxeles en el fondo de la imagen

C: es el número de píxeles en el citoplasma

5.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes HsEFL1 T127A y ScEFL1 T137A

Los plásmidos *pRS426-HsEFL1 T127A* y *pRS426-ScEFL1 T137A* se transformaron en *S. cerevisiae* BYC123 mediante el protocolo de acetato de litio/acarreador de DNA/polietilenglicol (Gietz & Woods, 2002) (anexo 11.3). Las clonas transformadas se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio mínimo sin uracilo (anexo 11.4). Las proteínas se expresaron como sigue: 3 mL de medio SD-Ura se inocularon con una colonia transformada *S. cerevisiae* BYC123 *pRS426-HsEFL1 T127A* o *S. cerevisiae* BYC123 *pRS426-ScEFL1 T137A*, respectivamente. El cultivo se incubó durante 12 h a 30 °C, posteriormente, se utilizó para inocular 50 mL de medio SD-Ura durante 12 h a 30 °C. Finalmente, dicho cultivo se empleó para inocular 1L de medio SD-Ura ($D.O_{600 \text{ nm}} = 0.1$, concentración final de glucosa a 0.5%). Cuando el cultivo alcanzó una $D.O_{600 \text{ nm}} = 1.8$ se indujo la expresión de las mutantes HsEFL1 T127A y ScEFL1 T137A añadiendo una solución de galactosa a una concentración final de 2.5%. Se dejó incubando durante 20 h a 30 °C. Concluidas 20 h de expresión se colectó el paquete celular por centrifugación. El paquete celular se resuspendió en 50 mL de solución amortiguadora de lisis (anexo 11.5). A continuación, se provocó la lisis celular en un equipo BeadBeater lleno hasta la mitad con perlas de vidrio de 500 μm de diámetro durante 7 ciclos de 1.5 min de fricción mecánica y 10 min de descanso a -20 °C. El extracto crudo se centrifugó por 1 h a 11000 rpm a 4 °C en una centrífuga Heraeus MEGAFUGE 16R y la fracción soluble se filtró con una membrana hidrofílica de

0.45 μm (Merck Milipore). Posteriormente la fracción soluble se purificó a través de una columna His Trap FF (GE Healthcare) de 5 mL (previamente equilibrada con 3 volúmenes de columna de solución amortiguadora de lisis) a un flujo de 1 mL min^{-1} . Una vez introducido el sobrenadante se realizó un lavado con 6 volúmenes de columna con la solución amortiguadora de lisis, seguido de un segundo lavado con 6 volúmenes de columna con solución amortiguadora de baja sal y 60 mM de imidazol (anexo 11.6), se realizó un tercer lavado con 3 volúmenes de columna con una solución amortiguadora de lavado (anexo 11.11) finalmente se realizó la elución con 3 volúmenes de columna con una solución amortiguadora de elución (anexo 11.7). La columna se recuperó pasando 5 volúmenes de columna de agua destilada y 3 volúmenes de columna de etanol al 20%.

5.5 Espectroscopia de dicroísmo circular de ScEFL1 T137A

El espectro de dicroísmo circular se obtuvo a 25 °C en un espectropolarímetro JASCO J-720 equipado con un control de temperatura Peltier. El espectro de dicroísmo se registró usando una celda de 1 mm, a una concentración de ScEFL1 T137A de 0.5 y 2.6 μM , respectivamente. El barrido de las longitudes de onda se realizó de 260 a 190 nm, con un incremento de 0.5 nm, con un tiempo promedio de 5 s y un ancho de banda de 1 nm. Las muestras se encontraban en una solución amortiguadora de fosfatos a 5 mM, pH 8 y fuerza iónica de 100 μM . Los valores de elipticidad se normalizaron a elipticidad molar de acuerdo con la ecuación 5.3.

$$\theta_i \cdot 10^3 \text{ (grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}\text{)} = \frac{\text{DC}_i \cdot 1000}{\text{L} \cdot \text{C} \cdot \text{N}} \quad (5.3)$$

Donde:

- θ_i : es la elipticidad de la muestra a la i -ésima longitud de onda
- DC_i : es el valor de la elipticidad observada de la i -ésima longitud de onda
- L: es el paso de luz de la celda en mm
- C: es la concentración de la proteína en μM
- N: es el número de residuos de la proteína

5.6 Curva de desplegamiento siguiendo la dependencia de la elipticidad con respecto a la temperatura de ScEFL1 T137A

La dependencia de la elipticidad con respecto a la temperatura se siguió a 208 nm en un intervalo de 20 a 90 °C, con un ancho de banda de 1 nm, un tiempo de respuesta de 5 s y un gradiente de temperatura de 1 °C min^{-1} . Los datos se ajustaron al modelo de Boltzmann (ecuación 5.4) describiendo un modelo de dos estados y una transición para obtener la T_m .

$$\theta_T = \theta_u \frac{\theta_f - \theta_u}{1 + e^{-\frac{T-T_m}{dT}}} \quad (5.4)$$

Donde:

θ_T : es la elipticidad a 208 nm de la muestra dependiente de la temperatura

θ_u : es la elipticidad a 208 nm del estado desplegado

θ_f : es la elipticidad a 208 nm del estado plegado

T: es la temperatura en K

T_m : es la temperatura de transición

dT: es la pendiente de la transición

5.7 Espectro de fluorescencia de ScEFL1 T137A

El espectro de fluorescencia para ScEFL1 T137A se obtuvo en un espectrofluorímetro OLIS DM45 con una lámpara de xenón de 150 V, con un contador de fotones como detector y rendijas de 3.16 nm. La concentración de ScEFL1 T137A fue 1 μ M en solución amortiguadora Hepes 25 mM pH 8, 300 mM NaCl. Se realizó la excitación a 295 nm y se registró la emisión en un barrido de longitud de onda de 310 a 410 nm. Posteriormente la pérdida de estructura terciaria se verificó al medir el espectro de fluorescencia en presencia de urea 8M, en la misma solución amortiguadora y la misma concentración de proteína.

5.8 Espectroscopia de fluorescencia para evaluar la interacción de ScEFL1 T137A con nucleótidos de guanina mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano

El espectro de fluorescencia intrínseca de triptófanos presentes en la proteína fue medido usando un espectrofluorímetro OLIS DM45. La muestra fue irradiada a 295 nm para excitar al grupo indol de los residuos de triptófano, y el espectro de emisión fue registrado entre 310 y 410 nm. El apagamiento de la fluorescencia intrínseca de triptófanos de ScEFL1 T137A se siguió como resultado del incremento en la concentración de nucleótidos de guanina. La adición de 2 μ L de nucleótido (concentración inicial de 9.8 mM) se realizó en un intervalo de 0 a 400 μ M de nucleótidos de guanina a una solución de 1 μ M de ScEFL1 T137A en amortiguador Hepes 50 mM pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ a 25 °C. La constante de disociación (K_d) se determinó mediante un ajuste no lineal a un modelo de interacción 1:1 a partir de los valores de máxima emisión, corregidos por el efecto de filtro interno (ecuación 5.5), en función de la concentración de ligando adicionada de acuerdo con la ecuación 5.6.

Para corregir el efecto de filtro interno se consideró un ajuste de los datos con la siguiente ecuación (Lakowicz, 2008)

$$F_{\text{corr}} = F_i \cdot 10^{\left(\frac{OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}}}{2}\right)} \quad (5.5)$$

Donde:

F_{corr} : Es la fluorescencia corregida por filtro interno.

F_i : Es la fluorescencia observada en el máximo de emisión de la i -ésima titulación con nucleótidos de guanina.

OD_{ex} : es la absorbancia del nucleótido a la longitud de onda de excitación (295 nm).

OD_{em} : es la absorbancia del nucleótido a la longitud de onda de máxima emisión.

Para el ajuste no lineal a un modelo de interacción 1:1 se empleó la siguiente ecuación:

$$F_{\text{obs}} = F_{\text{inicial}} + \frac{A \cdot [L_i]}{K_d + [L_i]} \quad (5.6)$$

Donde:

F_{obs} : Es la fluorescencia experimental observada a la i -ésima concentración de nucleótido de guanina.

F_{inicial} : Es la fluorescencia inicial de ScEFL1 T137A sin la adición de nucleótido de guanina.

A : Es la diferencia en la fluorescencia inicial de ScEFL1 T137A y la fluorescencia observada en el último punto de la titulación con nucleótidos de guanina de ScEFL1 T137A.

$[L_i]$: Es la concentración de ligando para los i -ésimos puntos de la titulación.

K_d : Es la constante de disociación de ScEFL1 T137A por los nucleótidos de guanina.

5.9 Cinética enzimática de ScEFL1 T137A

La hidrólisis de GTP se midió mediante un ensayo enzimático acoplado (Webb, 1992). Brevemente, se realizaron reacciones estándar de 150 μL de una solución que contiene 50 mM de Tris·HCl pH 7.5, 1 mM de MgCl_2 , 0.2 mM MESG, 1 U mL^{-1} de Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) y las cantidades correspondientes de GTP. Las reacciones se iniciaron al añadir una concentración final de 3.71 μM

de ScEFL1 T137A. El aumento en la absorbancia a 360 nm se registró en un espectrofotómetro Cary®50 UV-Vis (Agilent Technologies). El ruido en la absorbancia se registró previamente a la adición de GTPasa y se sustrajo de la señal de la muestra. La reacción acoplada a la fosforilasa es una reacción extremadamente rápida, por lo cual la pendiente medida en el transcurso del tiempo es proporcional a la tasa de hidrólisis de GTP por ScEFL1 T137A. La concentración de los iones fosfato liberados en la reacción fue estimada considerando un coeficiente de absorción molar a 360 nm de $14386 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ obtenido de una curva patrón experimental. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Los datos cinéticos se ajustaron a una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten con el programa Origin.

6 Resultados

6.1 Construcción de las mutantes *HsEFL1 T127A* y *ScEFL1 T137A*

Para caracterizar como las mutaciones T127A y T137A afectan a la función de las GTPasas *HsEFL1* y *ScEFL1*, las proteínas mutantes se expresaron de manera recombinante. Esto se hizo mutando la secuencia codificante de las proteínas silvestres mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR. En la figura 6.1 se muestran los electroferogramas de las secuenciaciones de *EFL1*, resaltando la sustitución de nucleótidos que conducen a las mutaciones T127A y T137A.

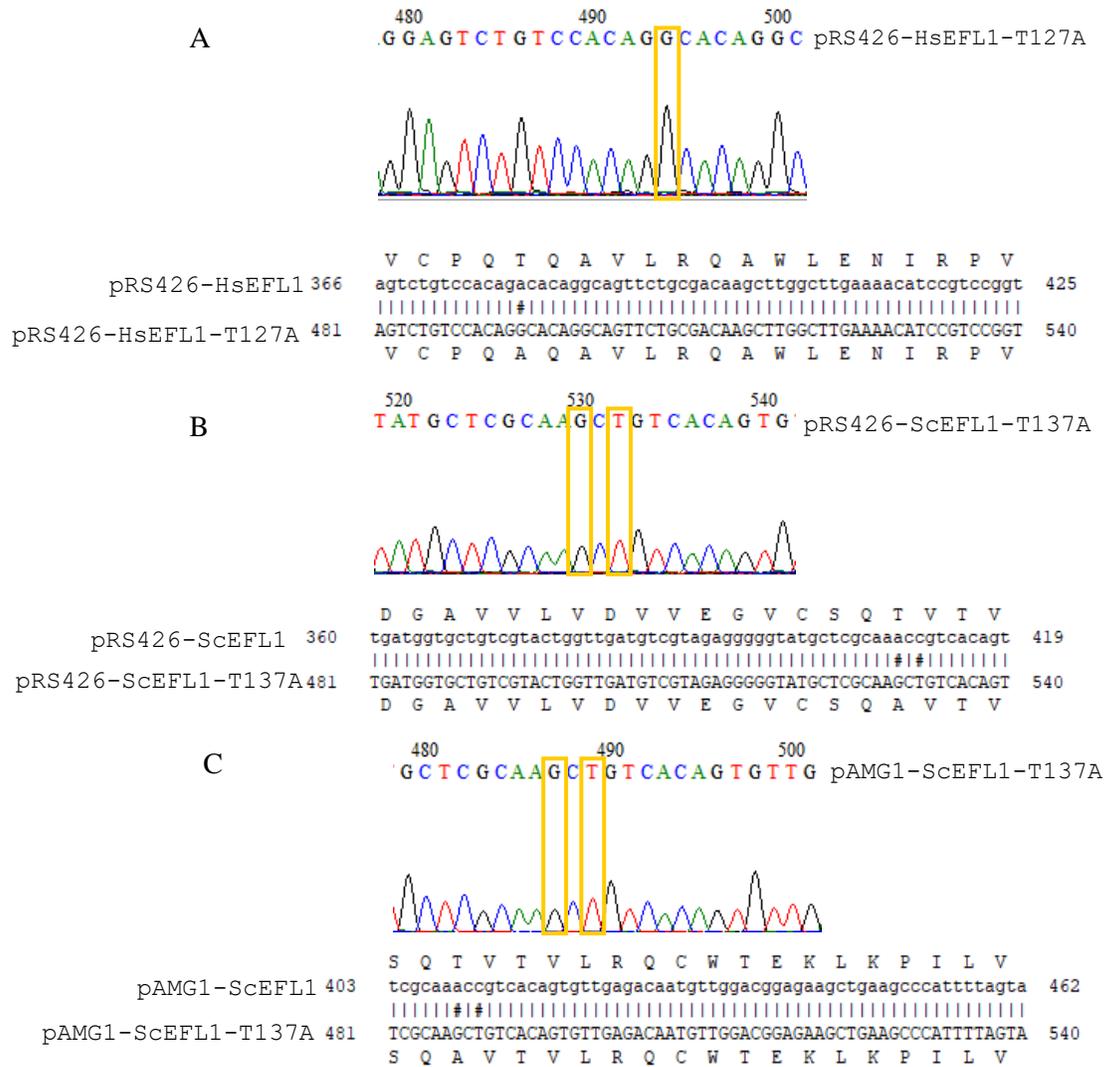


Figura 6.1 Construcción de las mutaciones T127A y T137A en las secuencias codificantes de EFL1 humana y de levadura.

A) Electroferograma de la secuenciación de *HsEFL1 T127A* y alineamiento de la secuencia de *pRS426-HsEFL1* y *pRS426-HsEFL1 T127A*, indicado el cambio A→G. B) Electroferograma de la secuenciación *ScEFL1 T137A* y alineamiento de las secuencias de *pRS426-ScEFL1* y *pRS426-ScEFL1 T137A* indicado el cambio ACC→GCT. C) Electroferograma de la secuenciación *ScEFL1-T137A* y alineamiento de las secuencias de *pAMG1-ScEFL1* y *pAMG1-ScEFL1 T137A* indicado el cambio ACC→GCT.

Las secuenciaciones confirmaron que las mutaciones ocurrieron sin ninguna otra mutación aleatoria en el gen *EFL1*. A continuación, era necesario confirmar si la mutante ScEFL1 T137A complementaba la función de ScEFL1 y rescataba el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae efl1Δ*.

6.2 Evaluación de la complementación funcional de la mutante ScEFL1 T137A en *S. cerevisiae efl1Δ*

Para evaluar la complementación funcional de la mutante ScEFL1 T137A, la cepa *S. cerevisiae* AM1 se transformó con el plásmido *pAMG1-ScEFL1 T137A*. Como control positivo se empleó la cepa *S. cerevisiae* AM1 transformada con el plásmido *pAMG1-ScEFL1*, cuya progenie meiótica *efl1Δ::natMX6* es indistinguible de la progenie meiótica silvestre. Como control negativo se empleó la cepa *S. cerevisiae* AM1 transformada con el plásmido *pAMG1*, este último no debe presentar unidades formadoras de colonias (UFC) para la progenie *efl1Δ::natMX6* durante el tiempo de incubación, ya que *S. cerevisiae efl1Δ* presenta un fenotipo severo de lento crecimiento. Una vez que las levaduras esporularon se seleccionó a la progenie meiótica silvestre y a la progenie meiótica *efl1Δ* complementada (figura 5.1). La cepa *S. cerevisiae* AM1 tiene en un alelo a los loci *CAN1* y *LYP1* que confieren sensibilidad a canavanina y tialisina, respectivamente, pero en el otro alelo se encuentran eliminados. El gen *CAN1* expresa una permeasa capaz de transportar al interior de la célula a la arginina y a sus análogos como la canavanina, y el gen *LYP1* expresa una permeasa capaz de transportar a la lisina y a sus análogos como la tialisina. No obstante, la canavanina y la tialisina son tóxicos para *S. cerevisiae* (Broach *et al.*, 1979; Sychrova & Chevallier, 1993) y se usan para impedir el crecimiento de células diploides que no esporularon. Además, estas cepas contienen en un alelo un casete de resistencia a clonNAT en reemplazo del gen *EFL1* (*efl1Δ::natMX6*), mientras que en el otro alelo se encuentra el gen *EFL1* silvestre, este marcador se emplea para seleccionar a la progenie meiótica complementada con el gen de interés. Los tres marcadores son independientes cuyas combinaciones permiten elegir el arreglo deseado de genes en la progenie meiótica (Kuzmin *et al.*, 2016).

En la figura 6.2 se observan las placas Petri resultantes de los ensayos de complementación: en la fila A se indica la progenie meiótica silvestre y en la fila B se indica la progenie *efl1Δ::natMX6* para los tres plásmidos. Cada ensayo de complementación cuenta con un duplicado para un total de 12 placas.

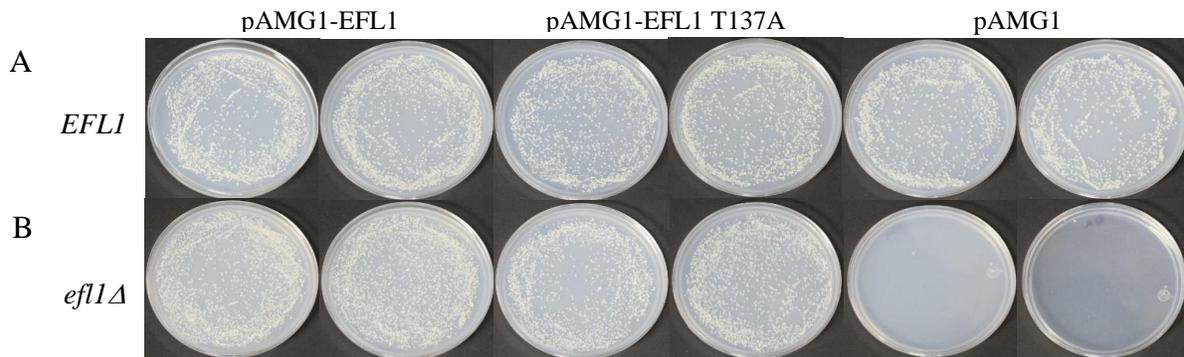


Figura 6.2 Ensayo de complementación genética de la construcción ScEFL1 T137A.

Selección de la progenie meiótica silvestre *EFL1* (A) y *efl1Δ* (B) previamente transformada con el plásmido que codifica para la expresión de la mutante EFL1 T137A.

En la figura 6.3 se muestra el conteo de las UFC del ensayo de complementación, representado como la media de los duplicados con desviación estándar como barra de error. Se realizó un análisis de varianza empleando una prueba Tukey para identificar aquellos tratamientos que variaron significativamente.

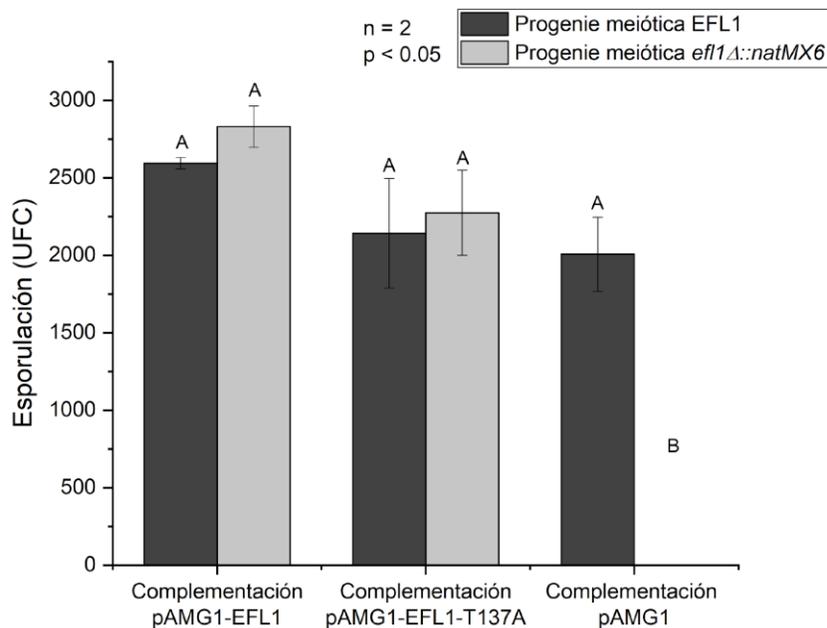


Figura 6.3 Conteo de las UFCs obtenidas del ensayo de complementación de ScEFL1 T137A en *S. cerevisiae efl1Δ*.

Las columnas representan la media de los duplicados de las UFC para cada ensayo de complementación con desviación estándar como barra de error. El tratamiento que no comparte una letra difiere significativamente.

El ensayo de complementación funcional permitió concluir que la variante EFL1 T137A rescata el fenotipo de lento crecimiento de células *S. cerevisiae efl1Δ*. Además de complementar la función de EFL1 (figura 6.2), ya que las UFC de la progenie meiótica *efl1Δ::natMX6* no difirieron significativamente con respecto de las colonias de la progenie meiótica silvestre ($p < 0.05$, figura 6.3). Lo anterior concuerda con la literatura ya que la mutación *EFL1 T137A* es homocigota (Tan *et al.*, 2018) y a su vez es congruente con lo reportado por Stepensky *et al.*, (2017) cuyos ensayos de complementación genética con las mutantes EFL1 R1086Q y EFL1 L910K rescataban el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae efl1Δ*. Por otra parte, no se observaron UFC en la línea B para el control negativo con el plásmido *pAMG1* ya que la eliminación de *EFL1* conduce a un fenotipo severo de lento crecimiento que solo es suprimido por mutaciones en *TIF6* después de 7-10 días de incubación (Bécam *et al.*, 2001; Senger *et al.*, 2001).

Contra intuitivamente los ensayos de *S. cerevisiae efl1Δ* complementados con EFL1 T137A no muestran diferencia en el crecimiento respecto del observado para *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con la proteína silvestre. De forma similar, células de *S. cerevisiae* carentes de la proteína Sdo1 presentan un fenotipo de lento crecimiento que al ser complementado con la mutante Sdo1 K118A, presente en pacientes con SDS, recuperan su ritmo normal de crecimiento en medio de cultivo rico como el YEPD a 30°C. No obstante, estas células *sdo1Δ* complementadas con Sdo1 K118A sí muestran una afectación en el crecimiento cuando se cultivan en medios que contienen antibióticos que interactúan directamente con el ribosoma como la paromomicina e higromicina (Menne *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que las tasas de crecimiento no necesariamente reflejan funcionalidad. Por ejemplo, células de *S. cerevisiae* carentes de la proteína ribosomal Rps27a exhiben deficiencias en el procesamiento del rRNA aun cuando tienen la misma tasa de crecimiento que el fenotipo silvestre (Baudin-Baillieu *et al.*, 1997). Finalmente, se sabe que las células *S. cerevisiae sdo1Δ* además de mostrar un fenotipo de lento crecimiento, también muestran sensibilidad a condiciones de estrés, como calor y estrés oxidativo (Kanprasoet *et al.*, 2015). Por lo que se requieren futuros experimentos para evaluar si las células de *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con EFL1 T137A muestran sensibilidad en diferentes condiciones de estrés y dilucidar como la mutación afecta en el modelo de levadura.

6.3 Localización de Tif6-GFP en células de levaduras complementadas con ScEFL1 T137A mediante microscopía de fluorescencia

Posteriormente se evaluó la localización de Tif6-GFP mediante microscopía de epifluorescencia. Para ello, la cepa *S. cerevisiae* AM1 haploide (*S. cerevisiae* AM1H) de la progenie *efl1Δ::natMX6* complementadas con los plásmidos *pAMG1-ScEFL1* (como control positivo) y *pAMG1-ScEFL1 T137A* (como tratamiento) se cotransformaron con el plásmido *pRS411-Tif6-GFP* que codifica para la proteína Tif6 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Una vez cotransformadas se inocularon en medio líquido SD-ura-met hasta alcanzar una $D.O_{.600} = 0.8$, para después teñirse con DAPI el cual se une a regiones ricas en adenina y timina del DNA, y sirve para delimitar el núcleo. Además, la señal de DAPI se usó como control de las condiciones de visualización y evitar que la cuantificación de la fluorescencia se viera afectada por el microscopio. El porcentaje de fluorescencia de DAPI no debe variar significativamente ($p < 0.05$) entre las células complementadas con los genes de interés, si lo hace, se entiende que las condiciones de visualización para los diferentes canales de fluorescencia no son las mismas. Una vez teñidas, 50 células ($n = 50$) se observaron al microscopio con el filtro para GFP y DAPI. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ y se realizó la superposición correspondiente para delimitar las regiones del núcleo y citoplasma. La fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo y en citoplasma se cuantificó de acuerdo con las ecuaciones 5.1 y 5.2 para las células *S. cerevisiae* AM1H complementadas con ScEFL1 y ScEFL1 T137A respectivamente (figura 6.4). Posteriormente se realizó una prueba t-student para verificar si el porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP difería significativamente, el mismo procedimiento y análisis estadístico se realizó para DAPI.

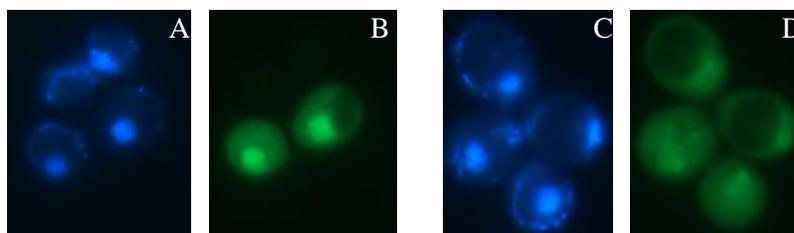


Figura 6.4 Localización de Tif6-GFP mediante microscopía de epifluorescencia en células de levadura *efl1Δ* complementadas con EFL1 T137A.

Localización del núcleo (A) y Tif6-GFP (B) en células *S. cerevisiae* AM1H complementada con ScEFL1 silvestre. Localización de del núcleo (C) y Tif6-GFP (D) en *S. cerevisiae* AM1H complementada con ScEFL1 T137A.

En la figura 6.5 se observa el porcentaje medio de fluorescencia para DAPI y Tif6-GFP para las 50 células de *S. cerevisiae* AM1H analizadas.

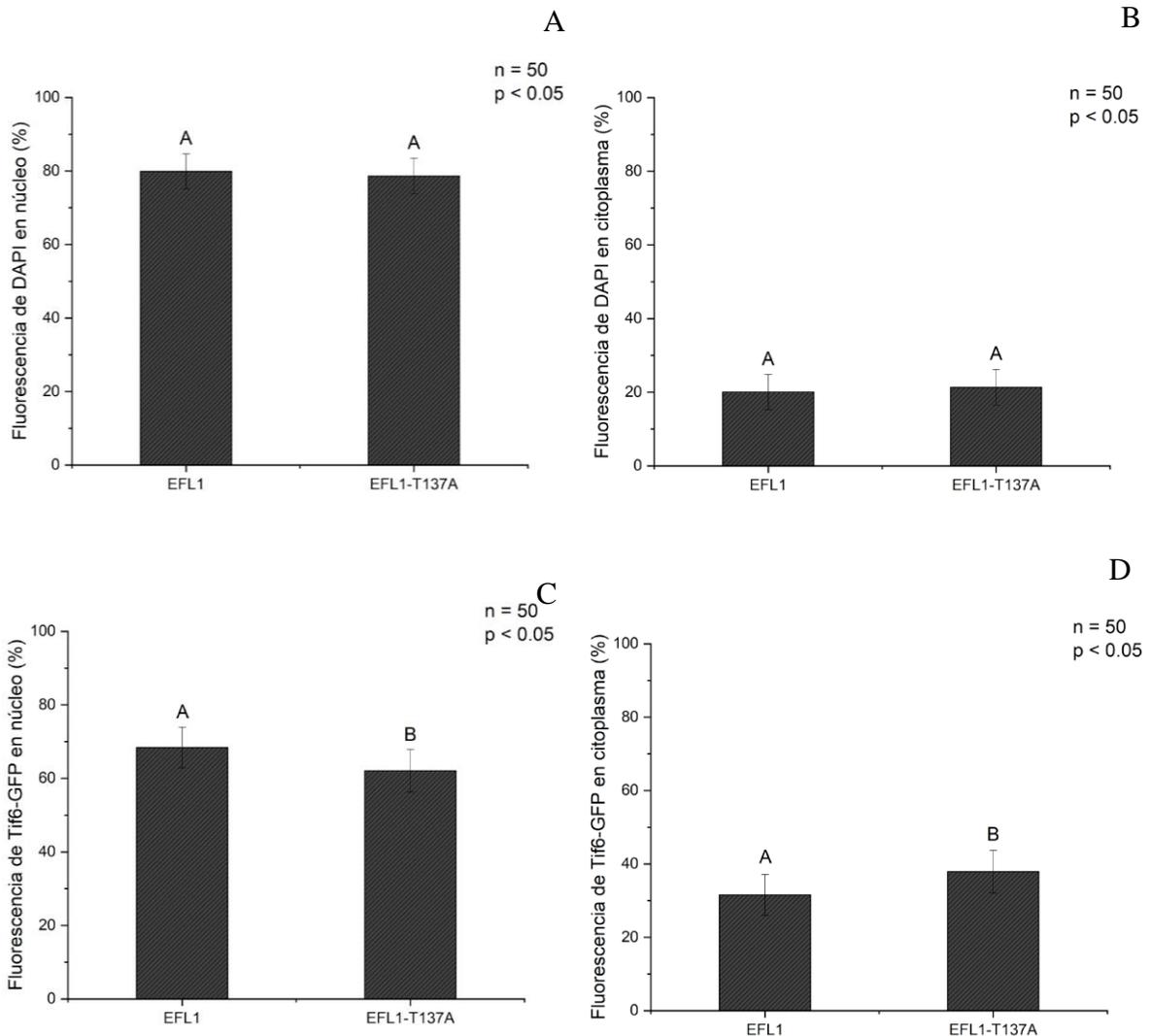


Figura 6.5 Disminución de la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las células de *S. cerevisiae* EFL1 silvestre y complementadas con ScEFL1 T137A.

A) Porcentaje de fluorescencia de DAPI en el núcleo de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con ScEFL1 y ScEFL1 T137A. B) Porcentaje de fluorescencia de DAPI en el citoplasma de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con ScEFL1 y ScEFL1 T137A. C) Porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en el núcleo de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con ScEFL1 y ScEFL1 T137A. D) Porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en el citoplasma de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con ScEFL1 y ScEFL1 T137A. La desviación estándar se presenta como barras de error. Tratamientos que no compartan una letra difieren significativamente.

El porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP para las células de *S. cerevisiae* AM1H complementadas con ScEFL1 T137A mostró una disminución en núcleo y un aumento en citoplasma con respecto a las mismas células complementadas con ScEFL1 silvestre (figura 6.5). El análisis estadístico indicó que dicha disminución es debida a la mutación ($p < 0.05$). En la tabla 6.1 se indica el cociente citoplasma/núcleo de los porcentajes de fluorescencia para Tif6-GFP de las células complementadas.

Tabla 6.1 Relación de la fluorescencia de Tif6-GFP citoplasma/núcleo de las células *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con EFL1 y EFL1 T137A.

	EFL1	EFL1 T137A
Proporción Tif6-GFP citoplasma/núcleo	0.46	0.61

Se puede observar que el cociente para aquellas células complementadas con ScEFL1 es de 0.46 y para las complementadas con ScEFL1 T137A es de 0.61, ambos cocientes son menores a 1, es decir, hay mayor porcentaje de fluorescencia en núcleo que en citoplasma. Sin embargo, las células complementadas con ScEFL1 T137A presentan un aumento del porcentaje de fluorescencia en citoplasma, sugiriendo una relocalización de la proteína Tif6-GFP en este compartimiento celular. Los resultados del ensayo de complementación son congruentes con lo reportado por Tan *et al.*, (2018) con relación a que la mutación T137A conduce al síndrome de Shwachman-Diamond, ya que, como se ha reportado, las células de pacientes con SDS presentan una relocalización de eIF6 a citoplasma (Menne *et al.*, 2015). El coeficiente de Tif6-GFP citoplasma/núcleo para EFL1 R1086Q es de 0.62 y para EFL1 L910K de 0.52 (Stepensky *et al.*, 2017).

Los resultados anteriores demostraron que la mutante ScEFL1 T137A relocaliza a Tif6-GFP a citoplasma, muy probablemente porque esta mutante no puede liberar eficientemente a Tif6 de la superficie de la subunidad 60S en el citoplasma. Para indagar acerca de las causas de esta observación se evaluó si alguna de las siguientes funciones de la GTPasa se vio afectada por la mutación T137A:

- El plegamiento de la proteína
- La unión de GTP y GDP
- La catálisis de GTP a GDP

6.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes HsEFL1 T127A y ScEFL1 T137A

Una vez que se confirmó que la mutante EFL1 T137A rescata el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae efl1Δ* y que la proteína Tif6-GFP se encuentra relocalizada a citoplasma se decidió estudiar cómo las mutaciones T127A para la proteína de *H. sapiens* o T137A para *S. cerevisiae* afectan la función de la correspondiente GTPasa. Para ello se caracterizó la interacción de la mutante con los nucleótidos de guanina, así como sus parámetros cinéticos K_M y k_{cat} . Las mutantes se expresaron de forma recombinante en *S. cerevisiae*. Sin embargo, la expresión de la mutante HsEFL1 T127A no resultó exitosa de acuerdo con lo observado en la figura 6.6. En el gel SDS-PAGE no se observó una banda correspondiente a 127 kDa (peso molecular de la mutante) en el carril de elución, concluyendo que la proteína no se pudo expresar de forma recombinante. Sin embargo, en el carril correspondiente a la fracción insoluble se observa una banda de intensidad notoria con un peso aparente al esperado para la proteína. Por lo que es posible que la mutante en el ortólogo humano tenga una baja estabilidad y se agregue.

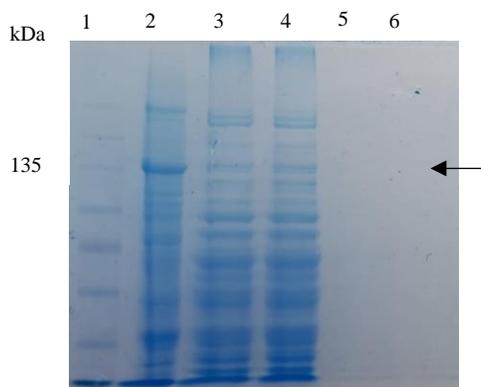
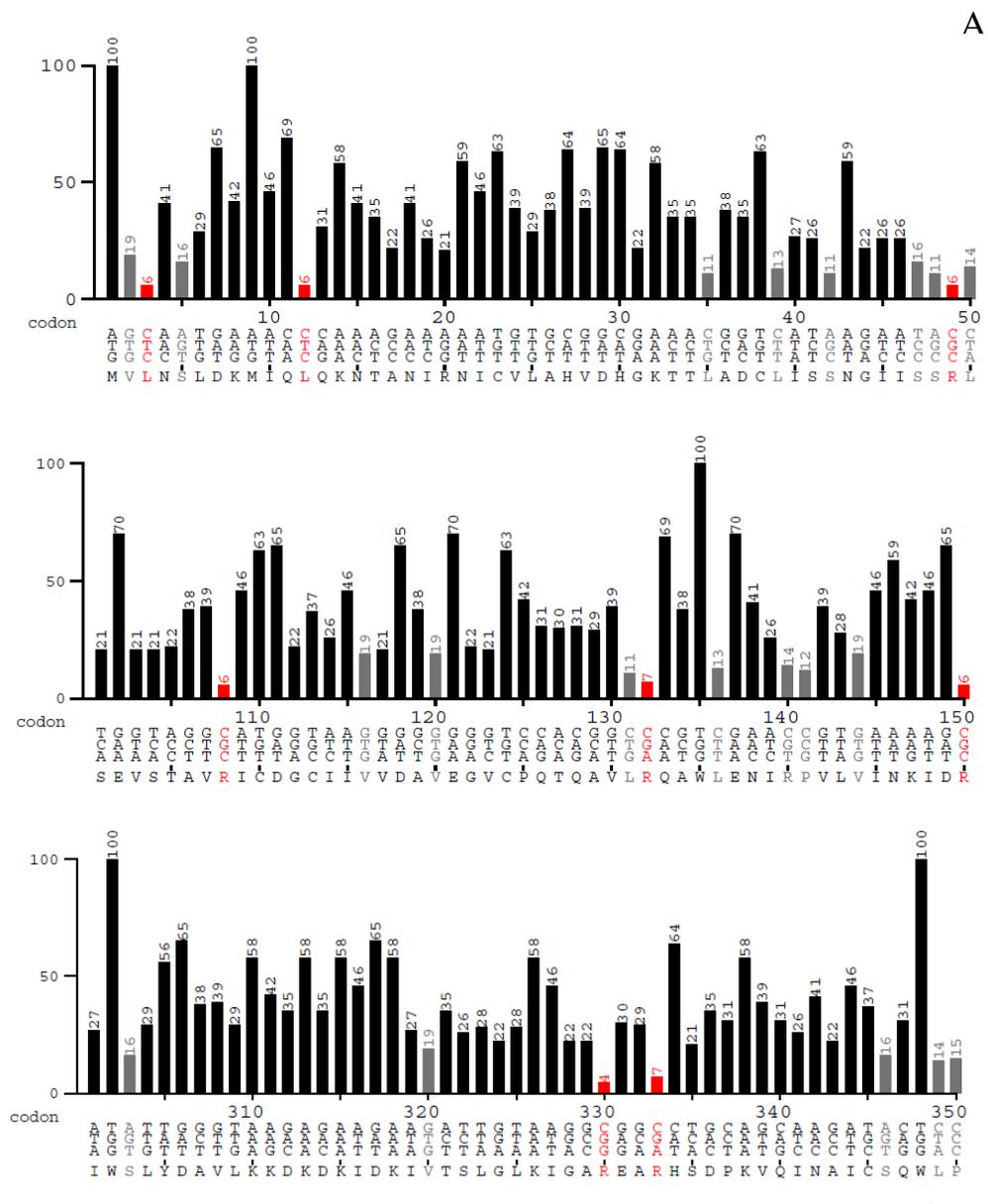


Figura 6.6 Gel SDS-PAGE al 7.5% del proceso de expresión y purificación de la proteína recombinante HsEFL1 T127A.

1) Marcador de peso molecular. 2) Fracción insoluble. 3) Fracción soluble. 4) Fracción no retenida por la columna. 5) Lavado de alta sal. 6) Elución. Mediante una flecha se indica el lugar donde se esperaría ver una banda correspondiente a la proteína HsEFL1 T127A si esta se hubiera expresado de forma soluble.

Otra posible explicación es que *S. cerevisiae* BYC123 no fue capaz de expresar a la GTPasa HsEFL1 T127A debido a que la secuencia codificante no fue optimizada para el uso de codones para la expresión en levadura. La figura 6.7A muestra el uso de codones para la secuencia de *HsEFL1*: en el eje *x* se encuentra el codon correspondiente para la proteína HsEFL1 y en el eje *y* la frecuencia de uso de ese codon en *S. cerevisiae*, indicando en rojo aquellos codones cuya frecuencia de uso es menor al 10% y en gris aquellos cuyo uso es menor al 20%. El análisis sugiere que la secuencia de

HsEFL1 contiene varios codones que son de uso poco frecuente en *S. cerevisiae*, lo cual disminuye los rendimientos de expresión de proteínas. Además, se observa que existen codones de uso poco frecuente adyacentes, tal es el caso de los codones 330 y 332, que codifican para arginina, cuya frecuencia de uso es menor al 10%. En la figura 6.7B se muestra el uso de condones del gen de la proteína EFL1 de levadura y se comparó contra el uso de condones proio de este organismo. Se observa queaunque la secuencia contiene codones de uso poco frecuente en *S. cerevisiae*, estos son menos que los que hay en la secuencia de la proteína human. Esta distribución de uso de condones poco frecuente también podría explicar el poco rendimiento de la expresión recombinante de la proteína ScEFL1 T137A.



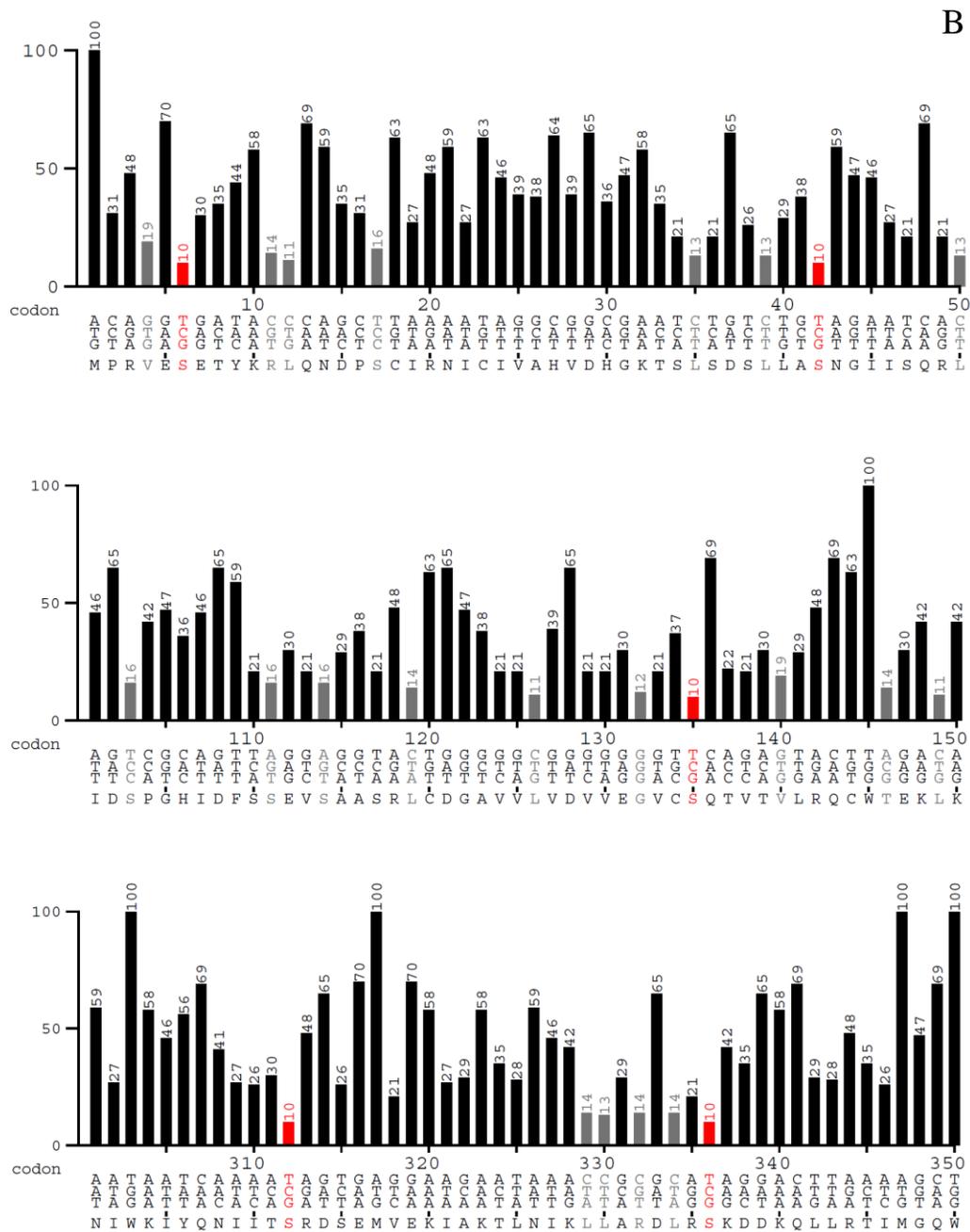


Figura 6.7 Análisis de uso de algunos codones de las secuencias codificantes de HsEFL1 (A) y SefEFL1 (B) usadas en el vector de expresión recombinante.

En el eje x se encuentran los codones de la secuencia codificante y en el eje y la frecuencia de uso de es codón en *S. cerevisiae* indicando en rojo aquellos cuya frecuencia es menor al 10% y en gris aquellos cuya frecuencia es menor al 20%.

No obstante, la proteína ScEFL1 T137A sí se expresó en *S. cerevisiae* BYC123. Cuando el proceso de purificación de ScEFL1 T137A se corrió en un gel SDS-PAGE al 7.5% se observó una banda correspondiente a 127 kDa en el carril de elución (figura 6.8).

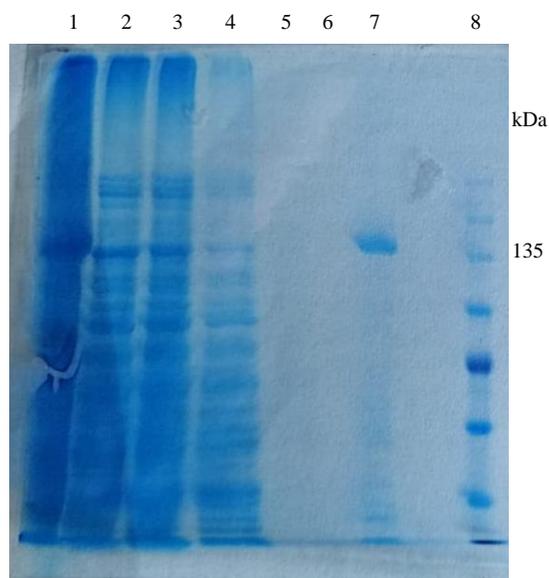


Figura 6.8 Gel SDS-PAGE al 7.5% para el proceso de expresión y purificación de la proteína ScEFL1 T137A a través de una cromatografía de afinidad a iones Ni²⁺.

1) Fracción insoluble. 2) Fracción soluble. 3) Fracción no retenida por la columna. 4) Lavado con buffer de lisis. 5) Lavado con buffer 60 mM de imidazol. 6) Lavado con buffer baja sal. 7) Elución. 8) Marcador de peso molecular.

Debido a que la mutante del ortólogo de *H. sapiens* no se pudo expresar de forma recombinante la caracterización bioquímica se realizó únicamente con el ortólogo de levadura. Ambas proteínas tienen un 38.67% de identidad y los residuos de Trp de estas dos proteínas se encuentran conservados, con excepción de aquellos que son variables en la familia de las proteínas EFL1. También, los motivos encargados del reconocimiento e hidrólisis de GTP se encuentran conservados (Méndez-Godoy *et al.*, 2021).

6.5 Espectro de Dicroísmo Circular (DC) de ScEFL1 T137A

La proteína ScEFL1 T137A purificada se utilizó para los ensayos subsecuentes, entre los cuales se obtuvo su espectro de dicroísmo circular (CD) para evaluar si la mutación afectaba el plegamiento y/o contenido de estructura de la proteína (Greenfield, 2009). El espectro indicó que la proteína contiene estructura secundaria ya que se observaron los picos mínimos característicos de hélices α y láminas β a 208 y 222 nm y a 218 y 195 nm, respectivamente. En la figura 6.9 se muestran los espectros de dicroísmo circular de ScEFL1 T137A obtenidos a dos concentraciones distintas y su comparación con el de la proteína silvestre.

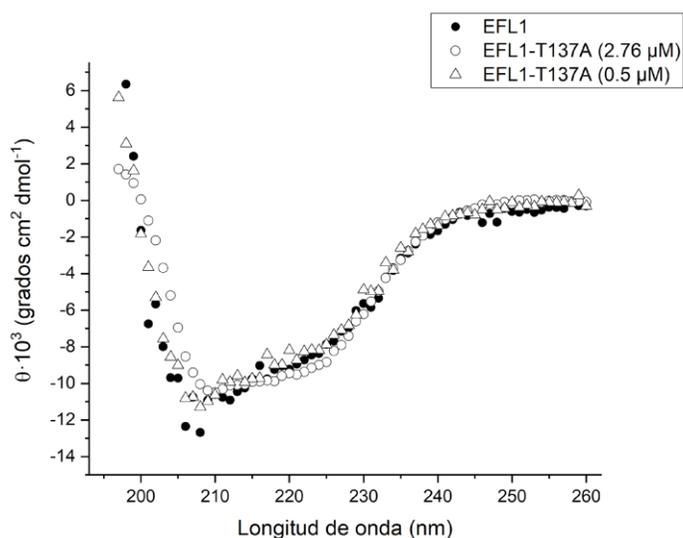


Figura 6.9 Espectro de dicroísmo circular de EFL1 silvestre y EFL1 T137A.
EFL1 (●, Stepensky *et al.*), EFL1 T137A a 2.76 μM (○) y EFL1 T137A a 0.5 μM (Δ).

La mayoría de las señales de los espectros de dicroísmo circular de ScEFL1 y ScEFL1 T137A se superpusieron, lo que sugiere que la estructura secundaria no se vio afectada, pese a la pérdida del grupo -OH en la cadena lateral del residuo de la Thr137. Esto concuerda con los modelos tridimensionales de ScEFL1 y ScEFL1 T137A, desarrollados por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres mediante MODELLER, en los cuales, no se observan cambios en la estructura secundaria ni en la terciaria entre las proteínas. También, se observa que el hidroxilo de la Thr137 no forma puentes de hidrógeno con ningún grupo aledaño. Se obtuvieron los modelos tridimensionales de ScEFL1 y ScEFL1 T137A empleando como molde el PDB 5anb_K (mapa de densidades electrónicas obtenido por microscopía crioelectrónica de HsEFL1). En la figura 6.10A se observan las estructuras de ScEFL1 y ScEFL1 T137A superpuestas en la zona a 5 Å de los residuos Thr 137 y Ala 137, respectivamente. En la figura 6.10B la zona a 5 Å del hidroxilo de la Thr 137. Se observa que no forma puentes de hidrógeno.

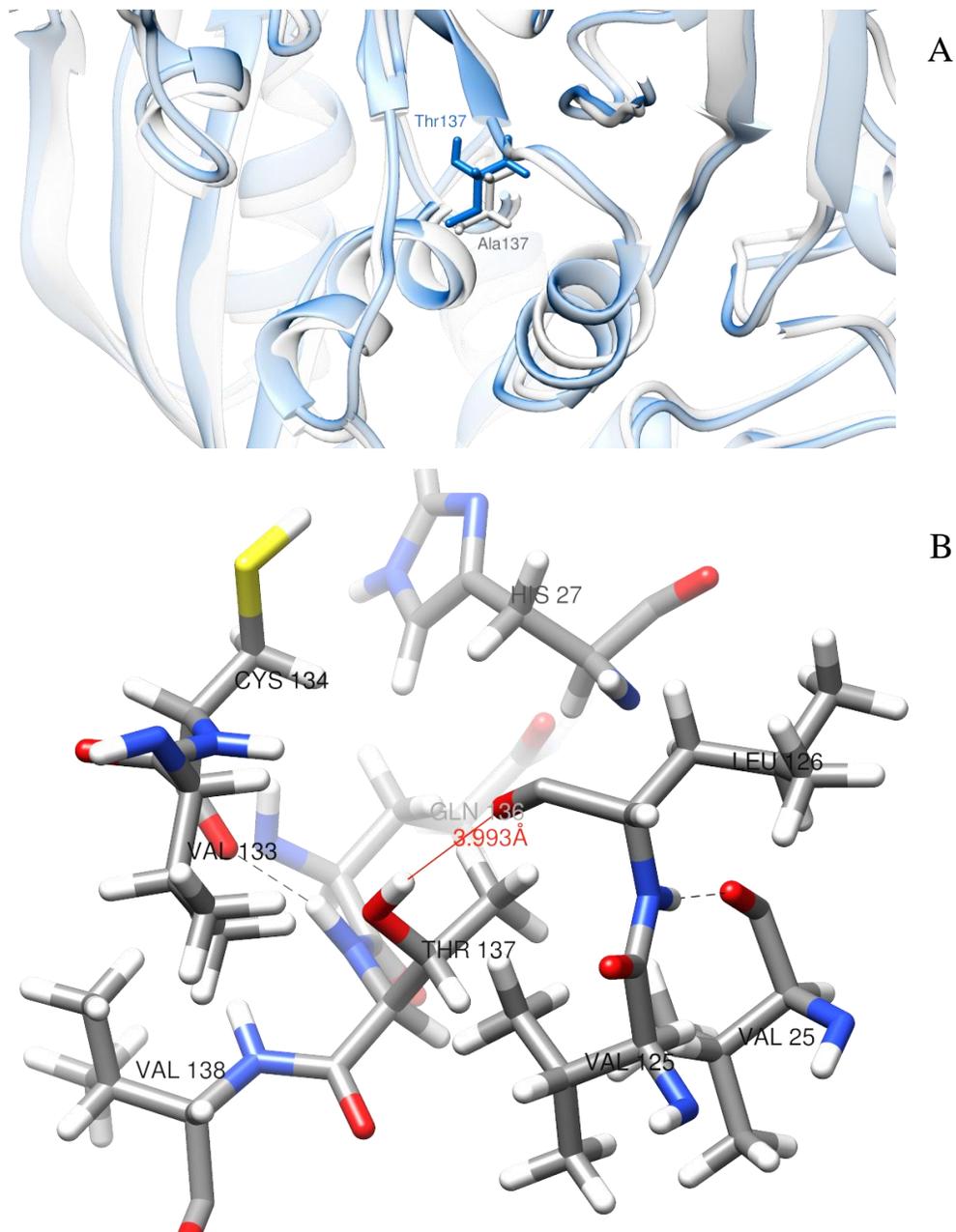


Figura 6.10 Modelos tridimensionales de EFL1 y EFL1 T137A obtenidos con el programa MODELLER.

A) Acercamiento a 5 Å de la Thr y Ala 137, EFL1 silvestre en azul y EFL1 T137A en gris.
 B) Acercamiento a 5 Å del hidroxilo de la Thr 137. Se observa que no forma puentes de hidrógeno. También se ve que está ubicado a 4 Å de distancia del grupo carbonilo de la Leu126. El PDB molde fue 5anb_K.

Se observa que tanto la Thr 137 como la Ala 137 se encuentran al final de una hélice α , además, el análisis de empalme estructural mediante Chimera arrojó un RMSD de 1.028 Å entre 1006 pares de residuos, y considerando todas las parejas de residuos (1110) fue de 1.271 Å, indicando que ambas proteínas presentan la misma estructura, y que la mutación T137A no afecta la estructura secundaria

y terciaria. La idea de que la pérdida del grupo -OH del residuo de Thr pudiera generar la posible pérdida de puentes de hidrógeno, y, por tanto, afectar la estructura secundaria es de interés ya que se sabe que las mutaciones puntuales sí pueden afectar el contenido de estructura secundaria. Aunque se ha observado que las mutaciones puntuales en residuos con cadenas laterales con grupos -OH no cambian el contenido de estructura secundaria ni terciaria, como el caso de la RNasa Sa, que cuando se mutan los residuos con grupos -OH, por ejemplo, tirosina por fenilalanina y treonina y serina por alanina, su estructura secundaria y terciaria no se afecta, ya que las estructuras cristalográficas de la proteína silvestre y de las mutantes no difirieron (Pace *et al.*, 2014) este mismo caso parece suceder en la GTPasa EFL1 T137A.

La espectroscopía de dicroísmo circular también se emplea para evaluar la estabilidad térmica de proteínas y cómo se afecta debido a mutaciones evidenciado mediante cambios en la temperatura de transición (T_m) de la proteína, y se puede comparar con la T_m de la GTPasa silvestre. Se siguió la dependencia de la elipticidad molar a 208 nm con respecto a la temperatura, se identificó la señal de elipticidad molar del estado plegado y desplegado, y posteriormente se obtuvo la temperatura de transición mediante una regresión no lineal al modelo de Boltzmann (ecuación 5.4). En la figura 6.11 se muestra la curva de desnaturalización de ScEFL1 y ScEFL1 T137A en función de la temperatura.

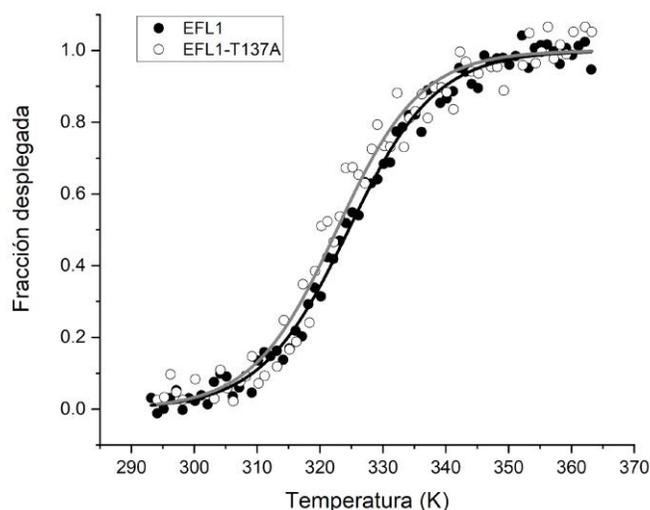


Figura 6.11 Curva de desnaturalización de EFL1 y EFL1 T137A.
EFL1 (●, Luviano *et al.*) y EFL1 T137A (○).

La temperatura de transición para EFL1 fue de 324 ± 0.3 K y de EFL1 T137A de 322.7 ± 0.6 K indicando una disminución de 1.9 ± 0.7 K.

Se sabe que los puentes de hidrógeno favorecen a la estabilidad de las proteínas en conjunto, ya que individualmente solo contribuyen de 0.1 hasta 5 kcal mol⁻¹. En el caso la GTPasa EFL1, el grupo -OH del residuo de Thr no forma puentes de hidrógeno (figura 6.10), por lo cual, se sugiere que el grupo -OH, y por tanto el residuo de Thr, tienen un rol funcional más que estructural y de estabilidad, y que dicha función se pierde al hacer la sustitución por Ala.

6.6 Espectro de fluorescencia de la proteína EFL1 T137A

Una vez que se corroboró que la estructura secundaria y la estabilidad térmica no estaban afectadas por la mutación, se verificó que la proteína presentara estructura terciaria mediante el espectro intrínseco de fluorescencia de la mutante. ScEFL1 T137A tiene 9 residuos de triptófano (figura 6.12), por lo cual, se puede medir el espectro de fluorescencia de la proteína en solución amortiguadora y compararlo con el espectro de fluorescencia en presencia de un agente desnaturizante. Si el espectro muestra un corrimiento al rojo indicaría que los triptófanos se expusieron a un ambiente más hidrofílico que se puede explicar como resultado de la desnaturalización de la proteína.

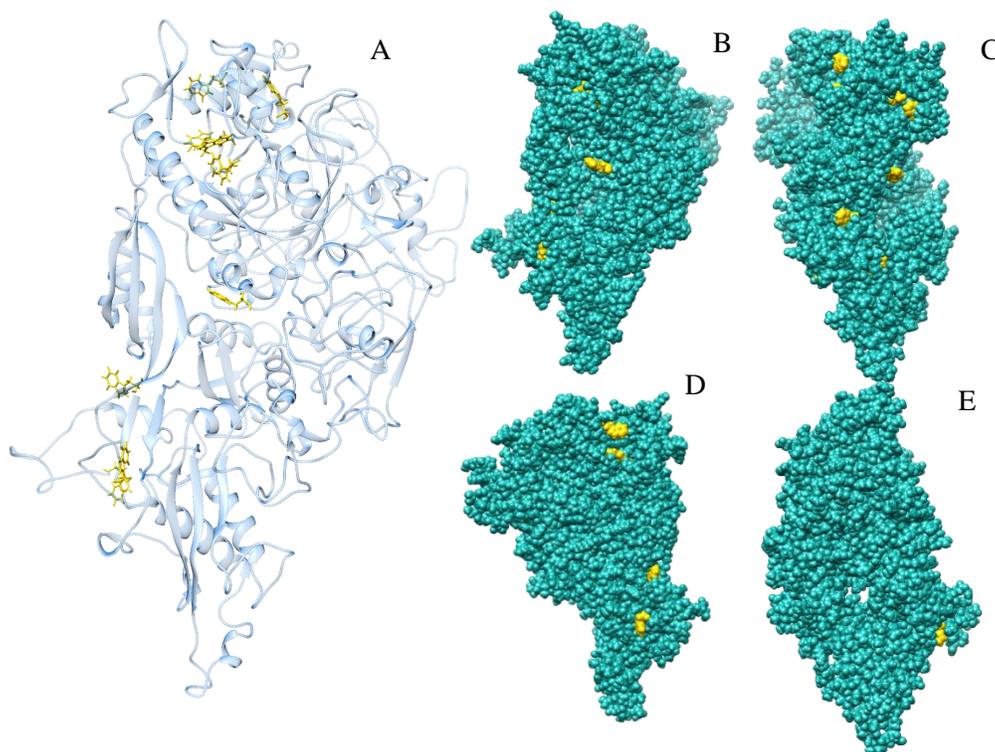


Figura 6.12 Residuos de triptófano de ScEFL1 T137A.

A) Representación de listones de ScEFL1 T137A resaltados en amarillo y en representación de bastones los residuos de Trp. B) Vista frontal de ScEFL1 T137A en representación de esferas indicados en amarillo los residuos de Trp. C) Rotación de 90° de la vista frontal de ScEFL1 T137A. D) Rotación de 180° de la vista frontal de ScEFL1 T137A. E) Rotación de 270° de la vista frontal de ScEFL1 T137A.

El espectro de fluorescencia para ScEFL1 T137A mostró un máximo de emisión a 329 nm en solución amortiguadora 25 mM Hepes pH 7.5, 300 mM de NaCl. Posteriormente, cuando se registró el espectro de fluorescencia para ScEFL1 T137A en la misma solución con 8M de urea se observó un corrimiento del máximo de emisión a 338 nm y una disminución de la fluorescencia, indicando que los residuos aromáticos están más expuestos al solvente debido a la pérdida de estructura terciaria. Esto mismo se observó para la proteína ScEFL1 silvestre cuyo máximo de emisión a también se observó a 329 nm seguido de un corrimiento del máximo de emisión a 342 nm y una disminución de la fluorescencia al ser desnaturada con urea. En la figura 6.13 se muestran los espectros de fluorescencia para ScEFL1 y ScEFL1 T137A.

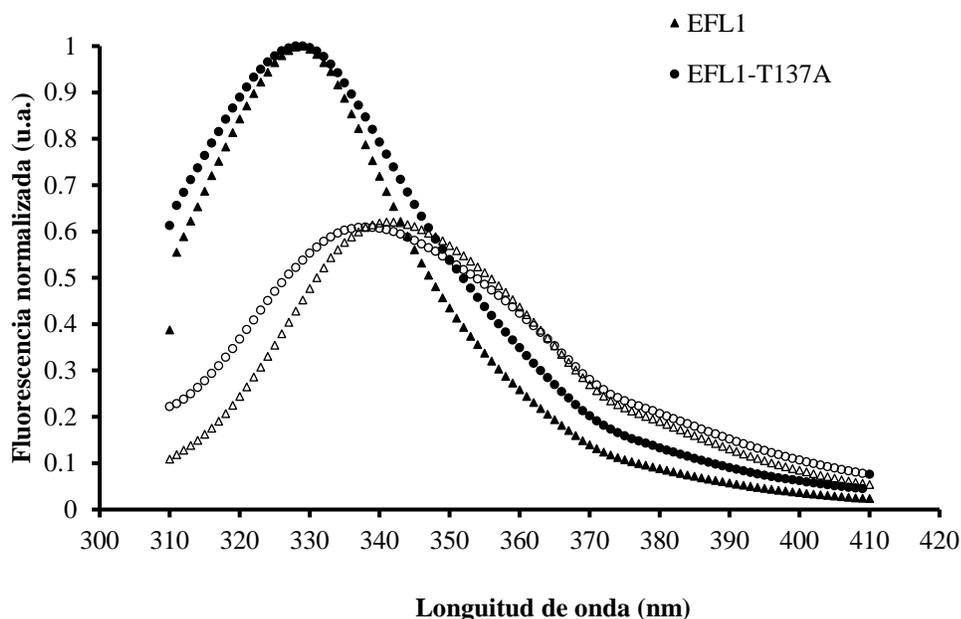


Figura 6.13 Espectro de fluorescencia de las proteínas ScEFL1 y ScEFL1 T137A.

ScEFL1: Estado nativo (▲) y desnaturado (Δ). ScEFL1 T137A: Estado nativo (●) y desnaturado (○).

La información obtenida mediante las técnicas de dicroísmo circular y de la espectroscopia de fluorescencia intrínseca permiten concluir que la mutación T137A no afectó el contenido de estructura secundaria ni su estabilidad aparente, además, la mutante presenta estructura terciaria, indicando que la mutación no afectó el plegamiento de la GTPasa.

6.7 Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos para evaluar la interacción de ScEFL1 T137A con nucleótidos de guanina

Puesto que los resultados de las secciones anteriores demostraron que el plegamiento de la mutante no parece estar alterado, pero existen pacientes con SDS que presentan esta mutación, entonces deben existir otras alteraciones que expliquen su malfuncionamiento. A continuación, se evaluó la interacción de esta proteína con nucleótidos de guanina y su actividad catalítica. Debido a que la mutación T137A se encuentra entre el motivo G3 y G4 en la secuencia primaria de la proteína y en el plegamiento se encuentra próxima a los motivos encargados de la unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina (figura 6.14) es posible que la interacción con GTP y/o GDP se encuentre afectada.

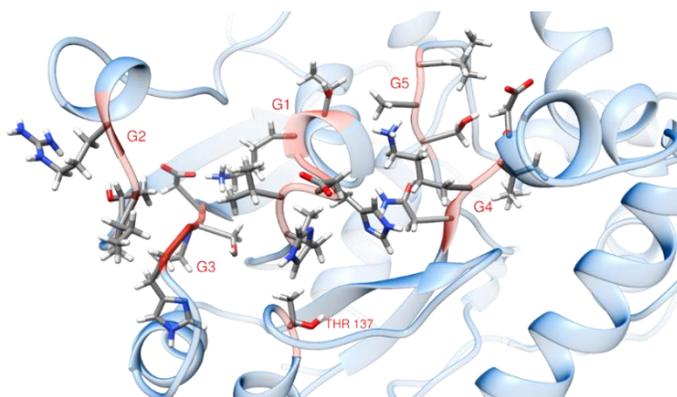


Figura 6.14 Bolsillo de unión de GTP y GDP en ScEFL1. Indicados en naranja los motivos G1-G5 y la Thr 137.

Se realizó la titulación de ScEFL1 T137A con GTP y GDP a 25 °C para determinar la constante de disociación a través de una regresión no lineal de acuerdo con la ecuación 5.6. En la figura 6.15 se muestra la dependencia de la fluorescencia de ScEFL1 T137A con respecto al aumento en la concentración de GDP.

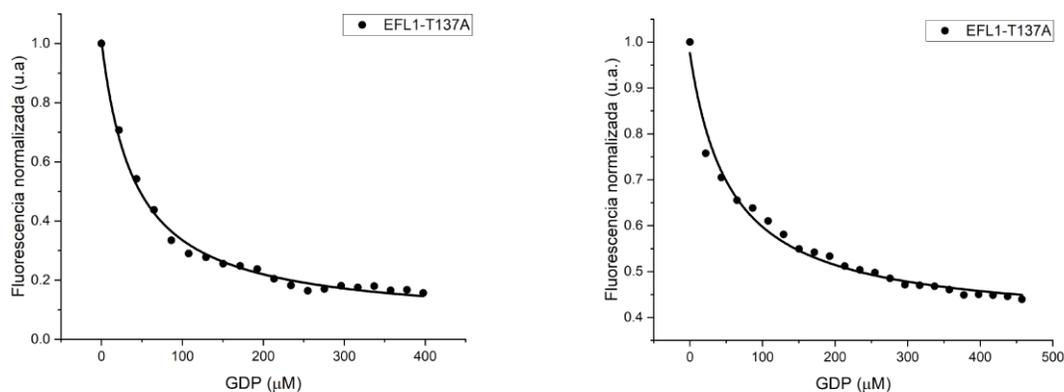


Figura 6.15 Interacción de ScEFL1 T137A con GDP.

Se muestran dos ensayos de titulación independientes de ScEFL1 T137A con GDP. Las gráficas corresponden a la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión en función de la concentración de GDP.

En la figura 6.16 se muestra la dependencia de la fluorescencia de ScEFL1 T137A con respecto al aumento en la concentración de GTP.

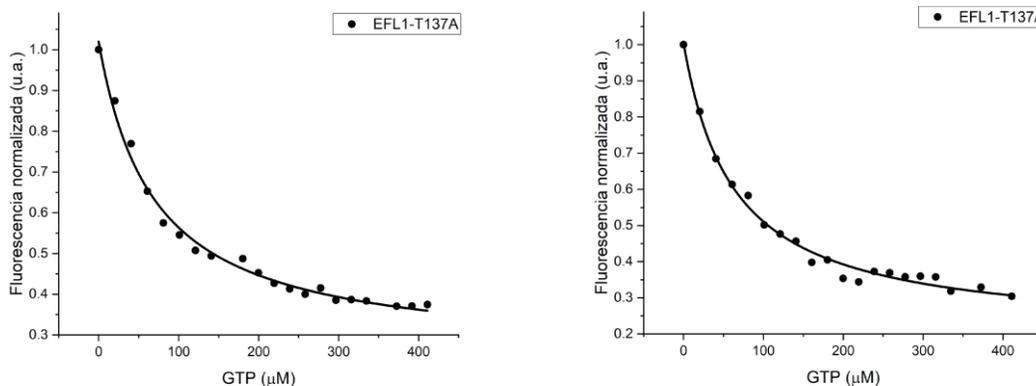


Figura 6.16 Interacción de ScEFL1 T137A con GTP.

Se muestran dos ensayos de titulación independientes de ScEFL1 T137A con GTP. Las gráficas corresponden a la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión en función de la concentración de GDP.

Las K_d medias para la interacción de ScEFL1 T137A con GDP a 25 °C es de $48 \pm 3 \mu\text{M}$ y para GTP es de $66 \pm 5 \mu\text{M}$, mientras que las reportadas para ScEFL1 silvestre con GDP es de $31 \pm 3 \mu\text{M}$ y para GTP es de $66 \pm 9 \mu\text{M}$ a la misma temperatura (Luviano *et al.*, 2019). Puesto que los valores son muy similares se puede concluir que la interacción con nucleótidos de guanina no está afectada por la mutación T137A, pese a la proximidad del residuo de Thr a los motivos 3 y 4 del dominio G. El hecho de que la K_d no se haya visto afectada por la mutación T137A es congruente con la literatura reportada (Wittinghofer & Vetter, 2011) ya que aunque los residuos de Thr 137 o Ala 137 se encuentra cerca de los motivos encargados de la unión con GTP y GDP éstos no interactúan con los nucleótidos de guanina. Una evidencia lo provee el acoplamiento molecular de la GTPasa con GTP, ya que muestra que el residuo Thr 137 no tiene contacto con el nucleótido de guanina, es decir, no está involucrado en la unión de GTP o GDP (figura 6.17).

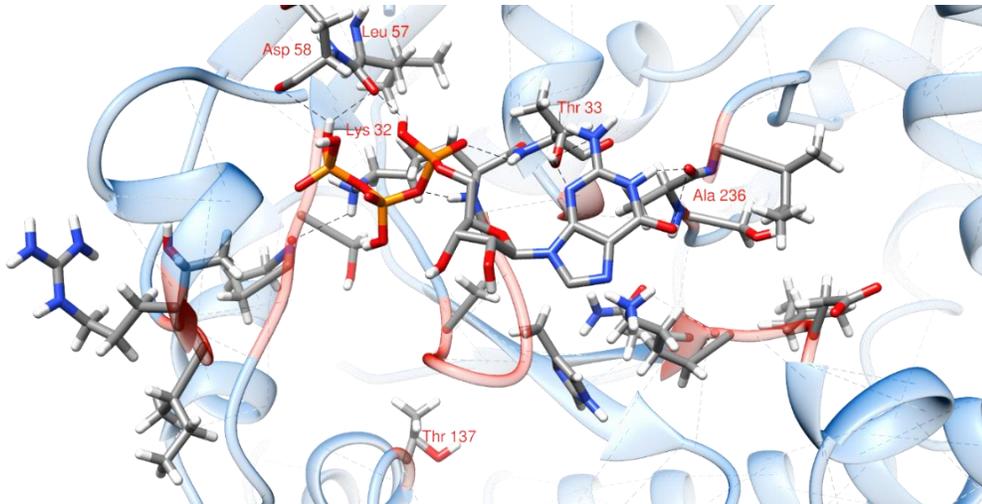
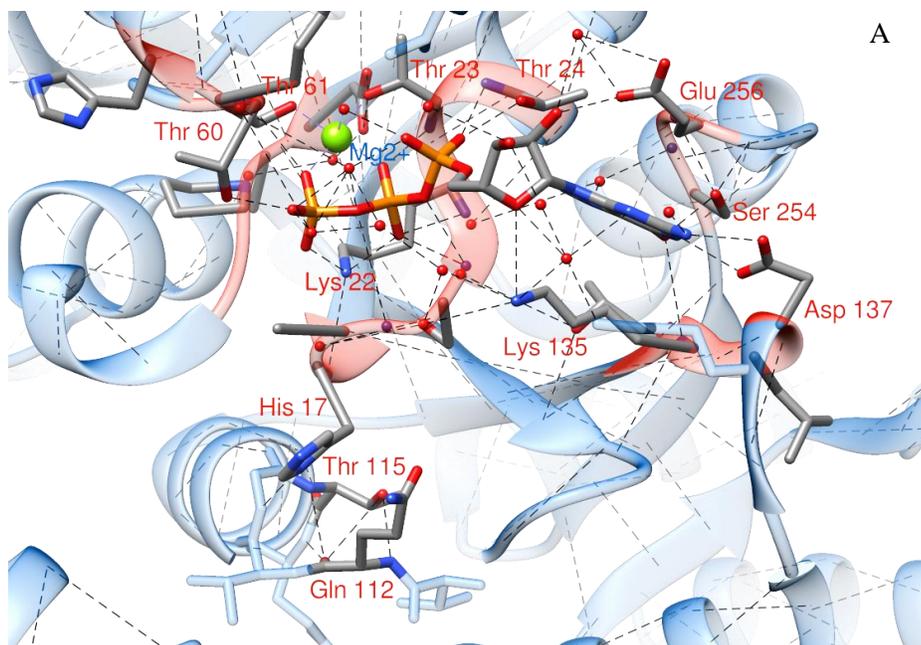


Figura 6.17 Acoplamiento molecular de ScEFL1 y GTP.

Vista frontal del residuo T137 donde se observa que no hace contacto con el GTP. Los puentes de hidrógeno están representados mediante líneas punteadas.

El acoplamiento molecular coincide con la estructura cristalográfica de la GTPasa EF-G de *Thermus thermophilus* y GTP y con la microscopía crioelectrónica de Lsg 1 y GppNHp (figura 6.18) con respecto a qué residuos hacen contacto con el GTP y GDP. También, en la estructura cristalográfica de la GTPasa EF-G de *T. thermophilus* con GTP se observa que la Thr 115 (Thr equivalente a la Thr 137 de *S. cerevisiae*) no hace contacto con el GTP (figura 6.18A).



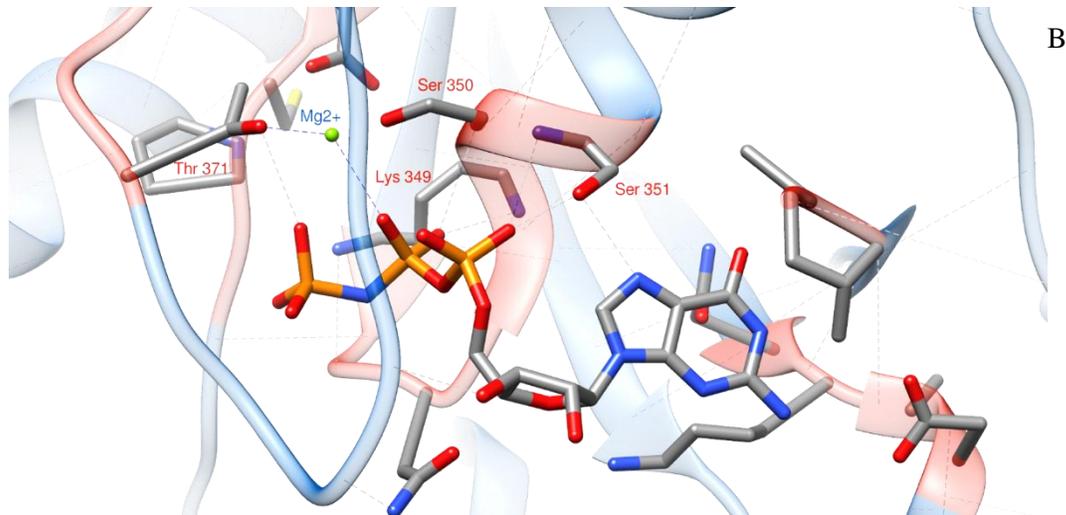


Figura 6.18 Estructuras cristalográficas del complejo EF-G•GTP y Lsg1•GTP

A) Estructura cristalográfica de EF-G de *T. thermophilus* con GTP (PDB 2DY1). B) Microscopía crioelectrónica de Lsg1 de *S. cerevisiae* con GppNHp (PDB 5T62). En ambos casos, los residuos que hacen contacto con los nucleótidos de guanina están etiquetados, los puentes de hidrógeno están representados mediante líneas punteadas. En el panel A se resalta a la Thr 115, que es el residuo equivalente en EF-G de *T. thermophilus* de la Thr 137 de *S. cerevisiae*.

El acoplamiento molecular permanece como un modelo, ya que no tiene incluido al Mg^{2+} que es un ion importante para neutralizar las cargas de los fosfatos β y γ . Lo que se puede concluir, en comparación con la estructura cristalográfica de EF-G y la microscopía crioelectrónica de Lsg1, es que:

- El fosfato α hace contacto con un residuo de Thr o Ser (que no es la Thr 137)
- El fosfato β hace contacto con una Lys y con el Mg^{2+}
- El fosfato γ se coordina con el Mg^{2+} y hace contacto con una Thr (que tampoco es la Thr 137).
- La presencia de un residuo de Lys es muy importante ya que hace contacto con los fosfatos β y γ .

Las titulaciones de ScEFL1 T137A con GTP y GDP y el análisis del acoplamiento molecular de la GTPasa con el GTP, muestran que la mutación no participa en la interacción con los nucleótidos de guanina y por tanto no afecta la unión con GTP y GDP. Por otro lado, es interesante que en los modelos de EFL1 y en la estructura cristalográfica de EF-G de *T. thermophilus* se observe que cuando estas proteínas unen GTP, la His del motivo 1 se desplaza a una zona a 5 Å de la Thr 137 (para *S. cerevisiae*) y de la Thr 115 (para *T. thermophilus*). También, se observa que la His del motivo 1 forma interacciones con los residuos cercanos en estructura primaria a la Thr 137 y Thr 115.

6.8 Cinética enzimática de ScEFL1 T137A

Una vez que se comprobó que la mutación T137A no afecta el plegamiento, estabilidad térmica y la unión con GTP y GDP, se evaluó si la actividad catalítica de ScEFL1 T137A se había visto afectada por la mutación. Se estudió la cinética enzimática de ScEFL1 T137A para determinar la V_{\max} , K_M y k_{cat} mediante una regresión no lineal al modelo de Michaelis-Menten. En la figura 6.19 se muestra la dependencia de la V_0 de hidrólisis de GTP de ScEFL1 T137A.

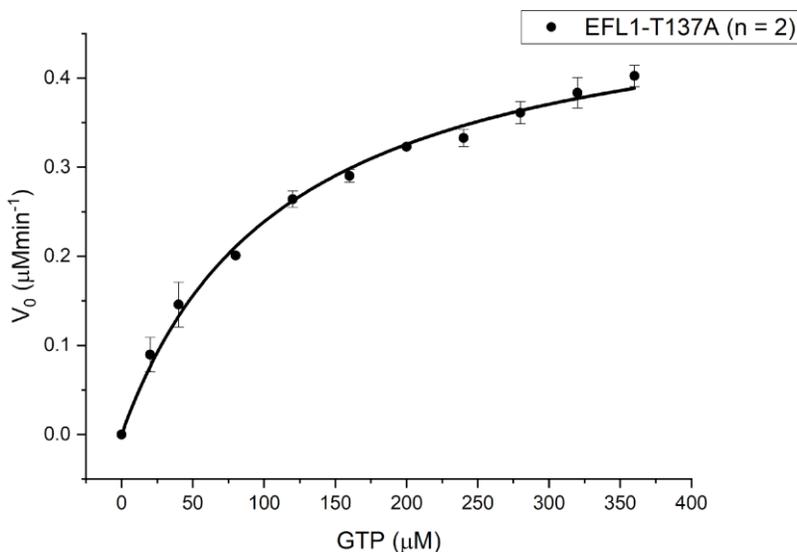


Figura 6.19 Cinética enzimática de ScEFL1 T137A.

La gráfica corresponde a la concentración de iones fosfato liberados por minuto en función de la concentración de GTP, con dos réplicas para cada punto con desviación estándar como barra de error.

La V_{\max} de ScEFL1 T137A fue de $0.51 \pm 0.02 \mu\text{M min}^{-1}$, sin embargo, como este parámetro depende de la concentración de enzima, se debe obtener el parámetro k_{cat} de acuerdo con la ecuación 6.1.

$$V_{\max} = k_{cat}[E_T] \therefore k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E_T]} \quad (6.1)$$

Entonces:

$$k_{cat} = \frac{0.51 \pm 0.02 \mu\text{Mmin}^{-1}}{3.71 \pm 0.37 \mu\text{M}} = 0.14 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$$

La incertidumbre de la concentración de enzima corresponde a la incertidumbre por la pipeta Gilbson que se empleó para la dilución de la concentración final de enzima en los ensayos cinéticos.

La K_M y k_{cat} de ScEFL1 T137A son $114.3 \pm 10.84 \mu\text{M}$ y $0.14 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, respectivamente, en contraste con los datos correspondientes para ScEFL1 silvestre que son $110 \pm 16 \mu\text{M}$ y $0.47 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ (Gijsbers *et al.*, 2013). A su vez, las eficiencias catalíticas son de $20.90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $70.90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Las GTPasas no son consideradas como enzimas eficientes debido a que sus eficiencias catalíticas son muy bajas. En la tabla 6.2 se muestra un resumen de parámetros cinéticos de algunas enzimas y de algunas GTPasas.

Tabla 6.2 Parámetros cinéticos de algunas enzimas.

Enzima	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Fuente
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8	(Nelson & Cox, 2008)
Anhidrasa carbónica	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7	(Nelson & Cox, 2008)
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7	(Nelson & Cox, 2008)
Catalasa	H_2O_2	4×10^7	1.1	4×10^7	(Nelson & Cox, 2008)
Crotonasa	Crotonil-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8	(Nelson & Cox, 2008)
Fumarasa	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8	(Nelson & Cox, 2008)
	Malato	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7	(Nelson & Cox, 2008)
β -Lactamasa	Bencilpenicilina	2×10^3	2×10^{-5}	1×10^8	(Nelson & Cox, 2008)
EFL1 T137A (<i>S. cerevisiae</i>)	GTP	2.3×10^{-3}	1.1×10^{-4}	21	Este trabajo
EFL1 (<i>S. cerevisiae</i>)	GTP	7.8×10^{-3}	1.1×10^{-4}	71	(Gijsbers <i>et al.</i> , 2013)
EFL1•Sdo1 (<i>S. cerevisiae</i>)	GTP	7.1×10^{-3}	6×10^{-5}	110	(Gijsbers <i>et al.</i> , 2013)
EF-G•L7/12 (<i>E. coli</i>)	GTP	3	7×10^{-8}	4.2×10^8	(Savelsbergh <i>et al.</i> , 2005)
Lsg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	GTP	1.7×10^{-2}	3.4×10^{-5}	500	(Jaramillo-Ramírez <i>et al.</i> , 2021)
Lsg1 (<i>A. thaliana</i>)	GTP	2.16×10^{-3}	nd	nd	(B. L. Weis <i>et al.</i> , 2014)
ftsY (<i>M. tuberculosis</i>)	GTP	1.2×10^{-2}	3.9×10^{-5}	4.7×10^2	(Shivangi <i>et al.</i> , 2021)
Nug2 (<i>O. sativa</i>)	GTP	2×10^{-3}	nd	nd	(Im <i>et al.</i> , 2011)
Nug2 (<i>A. thaliana</i>)	GTP	1.45×10^{-3}	nd	nd	(Im <i>et al.</i> , 2011)

En concordancia con los experimentos de apagamiento de la fluorescencia, la K_M no se vio afectada por la mutación T137A, ya que la proteína silvestre muestra la misma constante. No obstante, la k_{cat} mostró una reducción moderada de 3.35 veces con respecto a la proteína silvestre, y consecuentemente, su eficiencia catalítica disminuyó en la misma proporción con respecto a la proteína silvestre, pasando de $70.90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ de ScEFL1 a $20.90 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ de ScEFL1 T137A. El hecho que los valores de la K_M sean similares entre las proteínas significa que ambas tienen la misma afinidad por los nucleótidos de guanina. Por otro lado, el que haya habido una reducción moderada en la k_{cat} por parte de la mutante implica que la tasa de hidrólisis de GTP es menor para EFL1 T137A. Es decir, ambas unen GTP con la misma afinidad, pero la mutante lo hidroliza en una tasa moderadamente menor.

En la tabla 6.3 se resumen los parámetros estudiados para ScEFL1 T137A y su comparación con ScEFL1.

Tabla 6.3 Comparación de los parámetros obtenidos para ScEFL1 y ScEFL1 T137A.

Parámetro	EFL1	ScEFL1 T137A
Proporción Tif6-GFP citoplasma/núcleo	0.46	0.61
Estructura secundaria	-	Similar a la silvestre
Estructura terciaria	-	Similar a la silvestre
Temperatura de transición	324.54 ± 0.3 K	322.67 ± 0.61 K
K _d GDP	31 ± 2.9 μM	48.77 ± 3.41 μM
K _d GTP	66 ± 8.8 μM	66 ± 4.62 μM
K _M	110 ± 16 μM	114.3 ± 10.84 μM
k _{cat}	0.47 ± 0.02 min ⁻¹	0.14 ± 0.02 min ⁻¹
k _{cat} /K _M	70.90 M ⁻¹ s ⁻¹	20.90 M ⁻¹ s ⁻¹

6.9 Evaluación de la complementación funcional de las dobles mutantes EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K en células de levadura *efl1Δ*

Se ha descrito que cuando una mutación puntual afecta el funcionamiento de una proteína se seleccionan mutaciones supresoras, intragénicas o extragénicas, que compensan la falta de función. Tal es el caso de las mutaciones que se seleccionan en Tif6 en células de *S. cerevisiae sdo1Δ* (Menne *et al.*, 2007), o las mutaciones intragénicas en la misma *ScEFL1* carente de los últimos 22 residuos (Bécam *et al.*, 2001). Bajo esta evidencia, se quiso probar si la mutación intragénica en *ScEFL1* (ScEFL1-T657M) seleccionada por la eliminación de los últimos 22 residuos en el extremo C-terminal de la proteína podían restaurar la función de las mutantes ScEFL1 R1086Q y ScEFL1 L910K, ya que por ejemplo el residuo R1086 corresponde al aminoácido 24 del extremo C-terminal. Si las dobles mutantes pueden favorecer el reciclaje de Tif6-GFP a núcleo, querría decir que las mutaciones funcionan como mutaciones supresoras también para las proteínas ScEFL1 R1086Q y ScEFL1 L910K. Se empleó la misma metodología que para el ensayo de complementación de la mutante ScEFL1 T137A y se evaluó la complementación funcional de las dobles mutantes ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K. La cepa *S. cerevisiae* AM1 se transformó con los plásmidos *pAMG1-ScEFL1 T657M-R1086Q* y *pAMG1-ScEFL1 T657M-L910K*. Como control positivo se empleó la cepa *S. cerevisiae* AM1 transformada con el plásmido *pAMG1-ScEFL1*, cuya progenie meiótica *efl1Δ::natMX6* es indistinguible de la progenie meiótica silvestre. Como control negativo se empleó la cepa *S. cerevisiae* AM1 transformada con el plásmido *pAMG1* vacío, este último no debe presentar UFC para la progenie *efl1Δ::natMX6* durante el tiempo de incubación. En la figura 6.20 se observan las placas de cultivo empleadas para los ensayos de complementación: en la fila A se indica la progenie meiótica silvestre y en la fila B se indica la progenie *efl1Δ::natMX6*

para los cuatro plásmidos. Cada ensayo de complementación cuenta con un duplicado para un total de 16 placas.

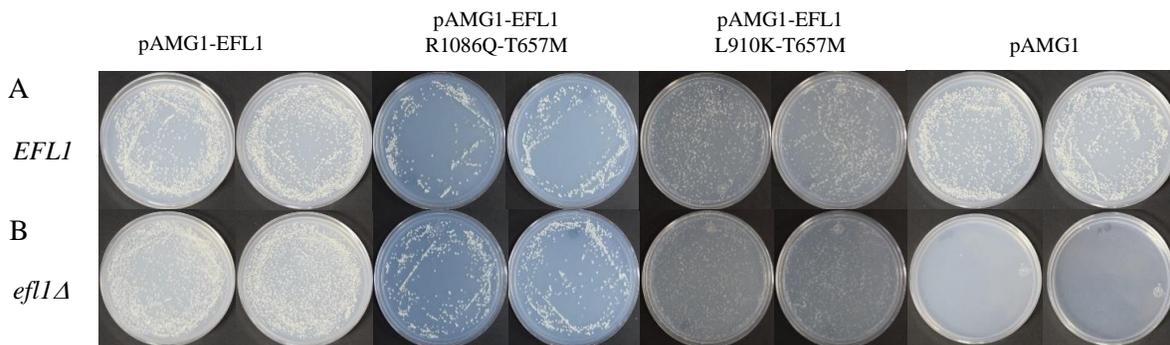


Figura 6.20 Ensayo de complementación genética de ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K.

Selección de la progenie meiótica silvestre *EFL1* (A) y *efl1Δ* (B) previamente transformada con plásmidos que codifican para la expresión de las dobles mutantes EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K.

En la figura 6.21 se muestra la cuantificación de las UFC del ensayo de complementación. Se realizó un análisis de varianza empleando una prueba de Tukey para identificar aquellos tratamientos que varían significativamente.

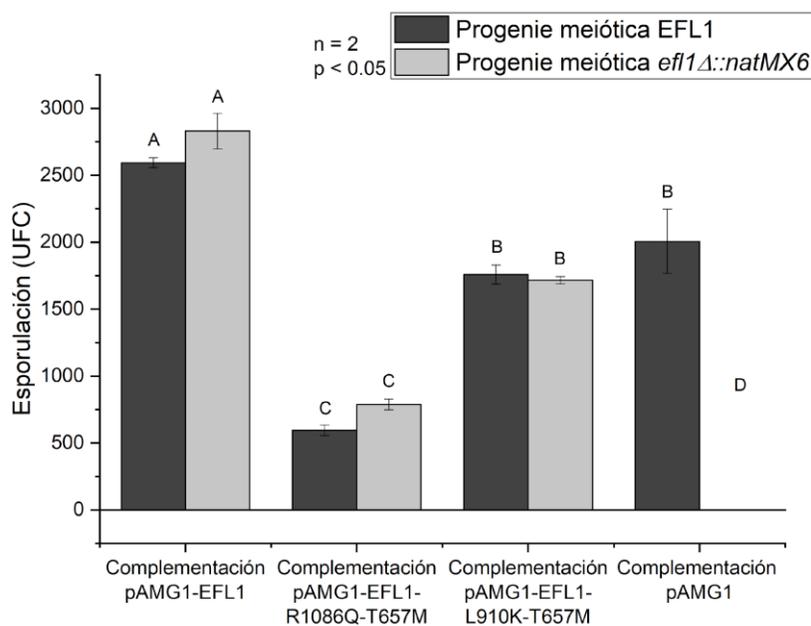


Figura 6.21 Conteo de la UFCs obtenidas del ensayo de complementación de ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K en *S. cerevisiae efl1Δ*.

Se muestran las UFC para cada ensayo. Los tratamientos que no compartan una letra difieren significativamente.

El ensayo de complementación funcional permite concluir que las dobles mutantes ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K rescatan el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae efl1Δ* y además, complementan la función de ScEFL1 (figura 6.20), ya que las UFC de la progenie meiótica *efl1Δ::natMX6* no difirieron significativamente con respecto a las colonias de la progenie meiótica silvestre ($p < 0.05$, figura 6.21). Por otra parte, no se observan UFC en la línea B para el control negativo con el plásmido *pAMG1*, esto es congruente con lo reportado por Senger *et al.*, y Bécam *et al.* ya que la eliminación de *EFL1* conduce a un fenotipo severo de lento crecimiento que solo es suprimido por mutaciones en *TIF6* después de 7 días de incubación.

6.10 Localización de Tif6-GFP en células de levaduras complementadas con EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K mediante microscopía de fluorescencia

Una vez que se comprobó que las dobles mutantes complementaban la función de ScEFL1, se cuantificó la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo y en citoplasma de acuerdo con la ecuación 5.1 y 5.2 para las células *S. cerevisiae* AM1H complementadas con ScEFL1, ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K. De igual forma se cuantificó la fluorescencia de DAPI en núcleo y en citoplasma (figura 6.22). Se realizó un análisis de varianza para verificar si el porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP de las células de *S. cerevisiae* AM1H complementadas con ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K difería significativamente con respecto al porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP de las células de *S. cerevisiae* AM1H complementadas con ScEFL1 (figura 6.23).

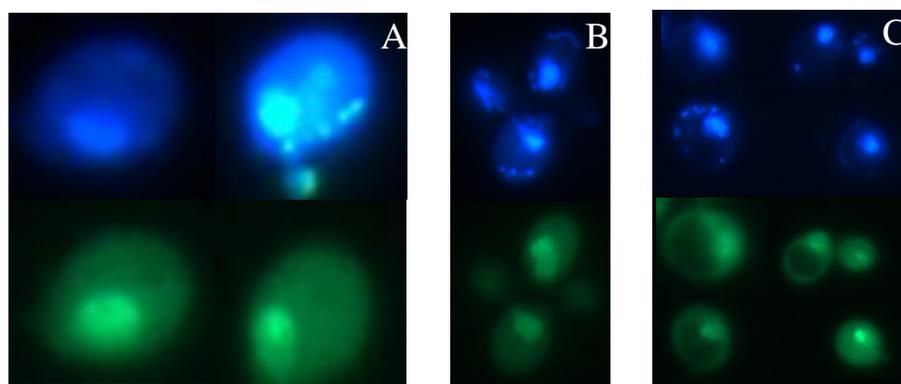


Figura 6.22 Localización de Tif6-GFP mediante microscopía de epifluorescencia en células de levadura *efl1Δ* complementadas con ScEFL1 T657M-L910K y ScEFL1 T657M-R1086Q.

A) Localización del núcleo y Tif6-GFP en células *S. cerevisiae* AM1H complementada con ScEFL1 silvestre. B) Localización del núcleo y Tif6-GFP en células *S. cerevisiae* AM1H complementada con ScEFL1 T657M-L910K. C) Localización del núcleo y Tif6-GFP en células *S. cerevisiae* AM1H complementada con ScEFL1 T657M-R1086Q

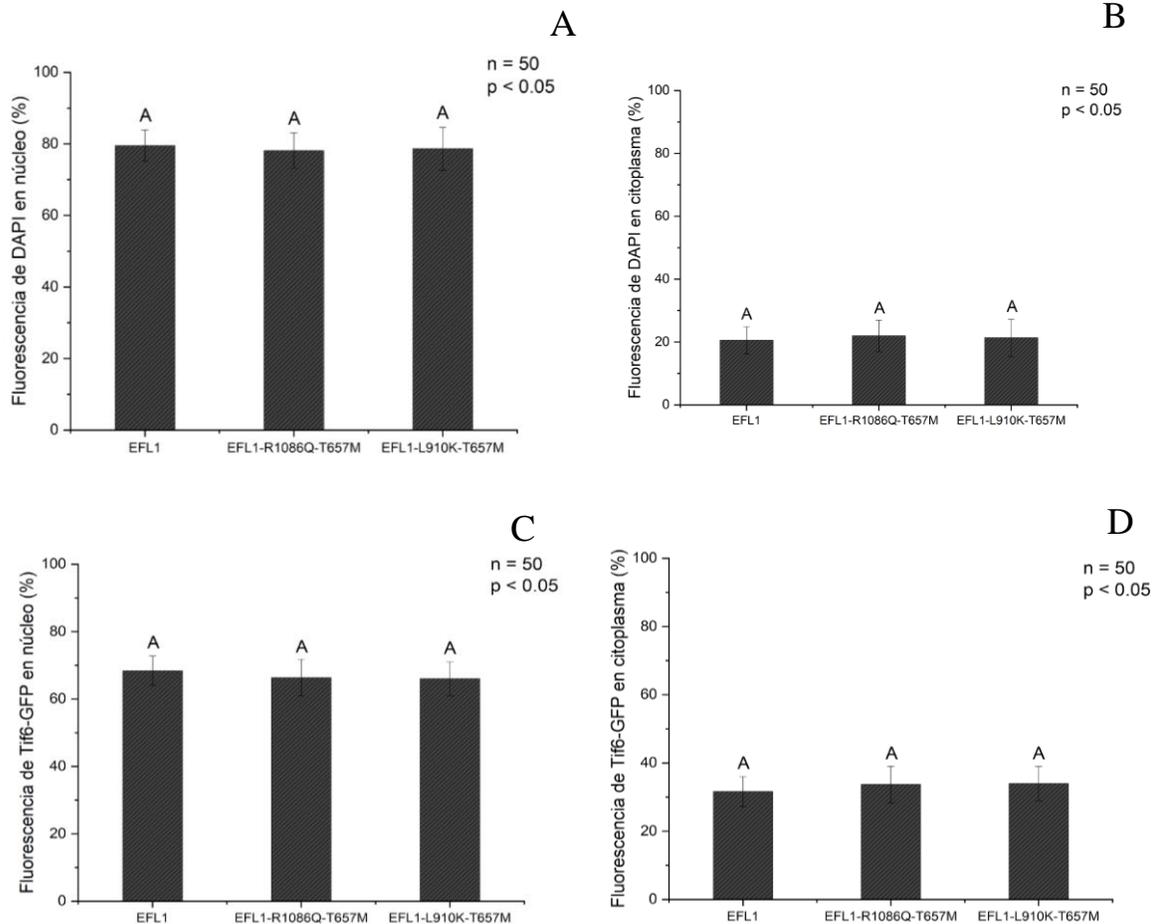


Figura 6.23 Porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en células de *S. cerevisiae* ScEFL1 silivetsre y complementadas con ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K

A) Porcentaje de fluorescencia de DAPI en el núcleo de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con ScEFL1, EFL1-T657M-R1086Q y EFL1-T657M-L910K. B) Porcentaje de fluorescencia de DAPI en el citoplasma de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con EFL1, EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K. C) Porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en el núcleo de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con EFL1, EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K. D) Porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en citoplasma de *S. cerevisiae efl1Δ* complementada con EFL1, EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K. Tratamientos que no compartan una letra difieren significativamente.

El porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP para las células de *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K no difirió significativamente con respecto a las células de *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con ScEFL1 ($p < 0.05$, figura 6.23). En la tabla 6.4 se indica el cociente citoplasma/núcleo de los porcentajes de fluorescencia para Tif6-GFP de las células complementadas.

Tabla 6.4 Relación de la fluorescencia de Tif6-GFP citoplasma/núcleo de las células *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con ScEFL1, ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K.

	EFL1	EFL1- T657M-R1086Q	EFL1-T657M-L910K
Proporción Tif6-GFP citoplasma/núcleo	0.46	0.51	0.51

Se puede observar que el cociente para aquellas células complementadas con EFL1 es de 0.46 y para las complementadas con EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K es de 0.51, ambos cocientes son menores a 1, es decir, hay mayor porcentaje de fluorescencia en núcleo que en citoplasma. Se observa un aumento del porcentaje de fluorescencia en citoplasma para las células complementadas con EFL1 T657M-R1086Q y EFL1 T657M-L910K, no obstante, el análisis estadístico arrojó que el aumento no es significativo ($p < 0.05$). En la tabla 6.5 se puede observar los valores de fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de aquellas células complementadas con las mutantes patogénicas y las dobles mutantes en relación con la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las células complementadas con ScEFL1 silvestre. Debido a que la proporción está dada como el porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las células complementadas con las mutantes sobre el porcentaje de fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las células complementadas con EFL1, tener un coeficiente de 1 indicaría que las células complementadas con las mutantes y EFL1 tienen el mismo porcentaje de fluorescencia en núcleo, si el coeficiente es mayor a 1 indicaría que el porcentaje de fluorescencia en núcleo es mayor en las células complementadas con las mutantes que en las células complementadas con EFL1, y un coeficiente menor a 1 indica que el porcentaje de fluorescencia en núcleo es menor en las células complementadas con las mutantes que en las células complementadas con EFL1.

Tabla 6.5 Relación de la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo de las mutantes patogénicas y de las dobles mutantes con relación al porcentaje de fluorescencia de EFL1.

	EFL1 R1086Q/EFL1	EFL1 T657M- R1086Q/EFL1	EFL1 L910K/EFL1	EFL1 T657M- L910K/EFL1
Proporción Tif6-GFP en núcleo mutante/EFL1	0.83	0.97	0.88	0.97

Como se observa, el coeficiente de la fluorescencia en núcleo de las células complementadas con las mutantes patogénicas de ScEFL1 es de 0.83 para ScEFL1 R1086Q y de 0.88 para ScEFL1 L910K, indicando que hay una disminución de la fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo con respecto a la silvestre. Esto es congruente con lo reportado ya que se sabe que estas mutantes relocalizan a Tif6-GFP en citoplasma. Luego entonces, los coeficientes de las dobles mutantes son de 0.97,

indicando que casi se obtiene la misma fluorescencia de Tif6-GFP en núcleo para aquellas células complementadas con ScEFL1 silvestre, indicando que Tif6-GFP se relocaliza predominante en núcleo. De este ensayo de complementación con las dobles mutantes se puede concluir que la mutación intragénica supresora que originalmente fue seleccionada para rescatar el lento crecimiento debido a la eliminación de los últimos 22 residuos de ScEFL1 también funciona como mutación supresora para las mutantes ScEFL1 R1086Q y ScEFL1 L910K ya que la fluorescencia de Tif6-GFP se relocalizó predominantemente a núcleo.

7 Discusión

En este trabajo estudiamos a la mutante EFL1 T137A que fue reportada en un paciente con sospecha de presentar el síndrome de Shwachman-Diamond. Corroboramos que el factor de antiasociación Tif6 se encuentra distribuido en la región perinuclear y citoplasma debido a la mutación, confirmando que la proteína EFL1 T137A conduce al síndrome de Shwachman-Diamond. Además, encontramos que la estructura secundaria, terciaria, la interacción con GTP y GDP y la hidrólisis de GTP no se afectaron por la mutación. No obstante, dado que el paciente presenta el síndrome de Shwachman-Diamond debido a la mutación, alguna otra característica de la proteína debe estar afectada por la mutación.

Existen varios reportes de mutaciones puntuales que afectan de diferente forma a las ATPasas de la familia Heat Shock Protein 70 (Hsp70) que constituyen el eje central de vigilancia para el control de calidad de las proteínas (Kityk *et al.*, 2018). Se sabe que esta familia de proteínas sufre un cambio conformacional cuando unen ATP. Sin embargo, se ha observado que la mutación T37G de la ATPasa Hsp70 de hámster inhibe los cambios conformacionales de esta enzima, sugiriendo que la Thr 37 es un residuo necesario para transducir el cambio conformacional que se da cuando se une el ATP (Wei *et al.*, 1995). Otro ejemplo se ha observado con el ortólogo de bovino de la misma familia. Se ha evidenciado que la Thr 13 es necesaria para transducir el cambio conformacional que se da cuando se une ATP. Se demostró que las mutantes T13V y T13G no eran capaces de sufrir un cambio conformacional. No obstante, la mutante T13S si fue capaz de transducir los cambios conformacionales de la enzima. Se concluyó que específicamente el hidroxilo de la treonina 13 es necesario para transducir los cambios conformacionales (Sousa & McKay, 1998). Esta evidencia parece reflejar lo que puede estar ocurriendo con la mutante ScEFL1 T137A. Además, el modelo tridimensional de ScEFL1 T137A y el acoplamiento molecular sugieren que el hidroxilo de la Thr 137 no forma puentes de hidrógeno con algún residuo de la proteína, por lo que es probable que el hidroxilo de la Thr 137 sea necesario para transducir cambios conformacionales necesarios para el funcionamiento de la enzima, como ocurre en las ATPasas Hsp70. Sin embargo, se requieren más experimentos, como fluorescencia en flujo detenido o SAXS, para entender si este es el caso.

Por otro lado, se han estudiado mutaciones puntuales en las GTPasas de traducción que afectan su cambio conformacional alterando su funcionamiento. La GTPasa eIF5B promueve la unión de las subunidades ribosomales, aunque su actividad de GTPasa no es necesaria para esta función. La mutación en la T439A correspondiente al residuo en el switch I que hace contacto con el fosfato γ y que está involucrado en el proceso de hidrólisis de GTP genera un fenotipo de lento crecimiento. Ensayos bioquímicos demostraron que esta mutación no impedía la unión de GTP ni GDP, pero sí

abolía la actividad de GTPasa. La mutante eIF5B-T439A sí es capaz de inducir la formación de complejos 80S, pero fallaba en su liberación del ribosoma afectando la función ribosomal. Cuando se buscaron mutaciones intragénicas supresoras se encontró, entre varias, que la mutación H505Y suprimía mejor el fenotipo de lento crecimiento, aunque esta no restauraba la actividad de GTPasa. La doble mutante eIF5B-T439A-H505Y promueve el inicio de la traducción *in vivo*, genera complejos 80S y restaura el fenotipo de lento crecimiento aún sin actividad de GTPasa, concluyendo que la mutación H505Y permite la liberación de la GTPasa del ribosoma por disminución de la afinidad (Shin *et al.*, 2002). Esto parece recapitular lo ocurrido con la mutante ScEFL1 T137A. Aunque el residuo de Thr 137 no forma parte del switch I disminuye moderadamente la eficiencia catalítica de la proteína. Si bien es cierto que en el caso de la GTPasa de traducción se demostró que la actividad catalítica no es la responsable directa del funcionamiento de la enzima, también se evidenció que prescindir de ella afecta su función, aunque indirectamente. Este estudio parece ejemplificar lo que puede estar ocurriendo con EFL1; se sabe que la hidrólisis de GTP es necesaria en el ciclo funcional de la enzima, pero no se ha podido determinar el momento exacto en el que ocurre. Sin embargo, el estudio de la mutación de eIF5B parecen demostrar que realmente no importa si la actividad de GTPasa es estrictamente necesaria para el funcionamiento directo de EFL1, prescindir de ella, o tenerla disminuida puede traer consecuencias como lo es el síndrome de Shwachman-Diamond.

La última evidencia que se tiene con respecto a mutantes de EFL1 que conducen a SDS se da con las mutantes HsEFL1 T1069A y HsEFL1 H30R. Se demostró que la mutante HsEFL1 H30R es incapaz de liberar al factor de antiasociación eIF6 afectando la formación de ribosomas competentes para la traducción y genera un fenotipo SDS severo. Mientras que la mutante HsEFL1 T1069A sí puede liberar al factor de antiasociación eIF6, por lo que se cree que esta mutante conduce al SDS por un fenómeno de haploinsuficiencia recapitulando lo sucedido con las mutantes de SBDS. Se demostró que el fallo en la función de las mutantes no se debía a una deslocalización celular de HsEFL1, cambios en la afinidad con SBDS o como en el caso de HsEFL1 T1069A por fosforilación de la Thr 1069 (Lee *et al.*, 2018). Pese a que ambos residuos están conservados entre las especies, el residuo de His pertenece al motivo G1 (figura 1.5B), por lo que, es congruente que el fenotipo sea más severo para esta mutación.

En los párrafos anteriores se resumieron algunos de los efectos de mutaciones puntuales en ATPasas y GTPasas, afectando de diversas formas a estas enzimas. Esto evidencia que la mutante ScEFL1 T137A puede tener alguno de estos efectos. Sin embargo, la unión con los nucleótidos no está afectada ya que las constantes de disociación son similares a las de la proteína silvestre, también

se demostró que la mutante se encuentra plegada y la estabilidad térmica aparente es similar a la proteína silvestre, pero, interesantemente, la eficiencia catalítica arrojó una reducción moderada de 3.35 veces ¿Hasta qué punto esta reducción tiene un impacto en un contexto *in vivo*? no es fácil de concluir. El caso de la proteína ScEFL1 T137A parece tener similitud con los casos de las ATPasas Hsp70, cuyos residuos de Thr son necesarios para acoplar la unión de ATP con un cambio conformacional, además, como lo evidencia la GTPasa ribosomal eIF5B, la actividad catalítica parece ser más un punto de control, en vez de un requerimiento estricto para su función, y considerando el modelo actual para el funcionamiento de EFL1, que la mutante tenga reducida la eficiencia catalítica puede no tener un efecto directo en la liberación de eIF6, pero sí en la liberación de EFL1 del ribosoma. Finalmente, estudios preliminares de nuestro grupo de investigación sugieren que la mutante ScEFL1 T137A no libera eficientemente al factor Tif6 de la subunidad pre-60S (figura 7.1). Entonces, si la liberación defectuosa de Tif6 por ScEFL1 T137A es causada por la imposibilidad de acoplar o sufrir cambios conformacionales, podría recapitular lo sucedido con las ATPasas Hsp70, quienes han demostrado tener residuos importantes de Thr para acoplar cambios conformacionales. Por otro lado, si la actividad de GTPasa resultara imprescindible para la liberación de Tif6, entonces, la reducción en la eficiencia catalítica podría tener un impacto directo en la liberación de Tif6, y en como esta mutación conduciría a SDS por un fenómeno de haploinsuficiencia, como la mutante HsEFL1 T1069A.

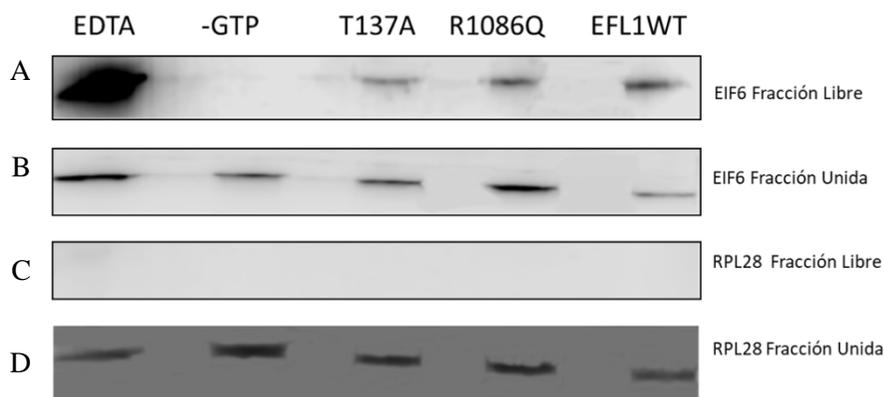


Figura 7.1 Ensayo de liberación *in vitro* de Tif6.

Se muestra el western blot del ensayo de liberación *in vitro* de Tif6 para ScEFL1, ScEFL1 T137A y ScEFL1 R1086Q. La inmunotransferencia reveló la distribución de Tif6 en la fracción libre (A) y la fracción unida a la subunidad 60S (B). Como control positivo se usó un tratamiento con EDTA para desestabilizar las subunidades ribosomales y como control negativo se eliminó el GTP del ensayo. La proteína Rpl28 indica la presencia de la subunidad pre-60S en la fracción libre (C) y las subunidades (D).

8 Conclusiones

- La mutante ScEFL1 T137A complementa la función de ScEFL1 y rescata el fenotipo de lento crecimiento de *S. cerevisiae efl1Δ*.
- Las células de *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con ScEFL1 T137A presentan una redistribución del factor de antiasociación Tif6-GFP a la región perinuclear y/o citoplasma.
- La estructura secundaria y la T_m de la mutante ScEFL1 T137A son similares a las de ScEFL1.
- La mutante ScEFL1 T137A contiene estructura terciaria.
- La mutación T137A no afectó el plegamiento ni la estabilidad térmica aparente de ScEFL1.
- Las K_d de la mutante ScEFL1 T137A para el GTP y GDP son similares a las de ScEFL1.
- La mutación T137A no afectó la interacción de ScEFL1-T137A con GTP y GDP.
- La eficiencia catalítica, k_{cat}/K_M , de la mutante ScEFL1 T137A presenta una reducción de 3.35 veces respecto a la de ScEFL1.
- Las células de *S. cerevisiae efl1Δ* complementadas con las dobles mutantes ScEFL1 T657M-R1086Q y ScEFL1 T657M-L910K presentan una re-localización del factor de antiasociación Tif6-GFP predominantemente en núcleo
- La mutación supresora ScEFL1 T657M también funciona como mutación supresora para las mutantes patogénicas ScEFL1 R1086Q y ScEFL1 L910K.

9 Perspectivas

- Realizar la cinética de unión entre ScEFL1 T137A y nucleótidos de guanina mediante fluorescencia en flujo detenido para obtener las constantes microscópicas de unión, y detectar si existen cambios en el mecanismo de unión.
- Realizar la cinética de hidrólisis de GTP de ScEFL1 T137A en presencia de SBDS y la unidad 60S para evaluar si la mutación T137A afecta la catálisis cuando está presente en este complejo.
- Realizar el ensayo de complementación y localización de Tif6-GFP con las dobles mutantes EFL1 R1086Q-P151L y EFL1 L910K-P151L para corroborar que la mutación P151L también funciona como mutación supresora para las mutantes patogénicas ScEFL1 R1086Q y ScEFL1 L910K.

10 Referencias

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.*, Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Asano, N., Atsumi, H., Nakamura, A., Tanaka, Y., Tanaka, I., & Yao, M. (2014). Direct interaction between EFL1 and SBDS is mediated by an intrinsically disordered insertion domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(4), 1251–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.143>
- Baudin-Baillieu, A., Tollervey, D., Cullin, C., & Lacroute, F. (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5023–5032. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.9.5023>
- Bécam, A. M., Nasr, F., Racki, W., Zagulski, M., & Herbert, C. (2001). Ria1p (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(3), 454–462. <https://doi.org/10.1007/s004380100548>
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*, 334(6062), 1524–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>
- Boocock, G. R. B., Morrison, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. R., & Rommens, J. M. (2003). Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature Genetics*, 33(1), 97–101. <https://doi.org/10.1038/ng1062>
- Broach, J. R., Strathern, J. N., & Hicks, J. B. (1979). Transformation in yeast: Development of a hybrid cloning vector and isolation of the *can1* gene. *Gene*, 8(1), 121–133. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(79\)90012-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(79)90012-X)
- Finch, A. J., Hilcenko, C., Basse, N., Drynan, L. F., Goyenechea, B., Menne, T. F., Fernández, Á. G., Simpson, P., D'Santos, C. S., Arends, M. J., Donadieu, J., Bellanné-Chantelot, C., Costanzo, M., Boone, C., McKenzie, A. N., Freund, S. M. V., & Warren, A. J. (2011). Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes shwachman-diamond syndrome. *Genes and Development*, 25(9), 917–929. <https://doi.org/10.1101/gad.623011>
- García-Márquez, A., Gijbers, A., De La Mora, E., & Sánchez-Puig, N. (2015). Defective guanine nucleotide exchange in the elongation factor-like 1 (EFL1) GTPase by mutations in the Shwachman-Diamond syndrome protein. *Journal of Biological Chemistry*, 290(29), 17669–17678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626275>
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350(2001), 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)
- Gijbers, A., García-Márquez, A., Luviano, A., & Sánchez-Puig, N. (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), 349–354.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.077>

- Gijsbers, A., Montagut, D. C., Méndez-Godoy, A., Altamura, D., Saviano, M., Siliqi, D., & Sánchez-Puig, N. (2018). Interaction of the GTPase elongation factor like-1 with the shwachman-diamond syndrome protein and its missense mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19124012>
- Greenfield, N. J. (2009). Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nature Protocols*, *1*(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>. Using
- Groft, C. M., Beckmann, R., Sali, A., & Burley, S. K. (2000). Crystal structures of ribosome anti-association factor IF6. *Nature Structural Biology*, *7*(12), 1156–1164. <https://doi.org/10.1038/82017>
- Im, C. H., Hwang, S. M., Son, Y. S., Heo, J. B., Bang, W. Y., Suwastika, I. N., Shiina, T., & Bahk, J. D. (2011). Nuclear/nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of Y1qF/YawG GTPases function in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(10), 8620–8632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200816>
- Jaramillo-Ramírez, J., Marcial-Bazaldua, N., & Sánchez-Puig, N. (2021). Characterisation of the interaction of guanine nucleotides with ribosomal GTPase Lsg1. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1869*(1), 140538. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140538>
- Kanprasoet, W., Jensen, L. T., Sriprach, S., Thitianapakorn, K., Rattanapornsompong, K., & Jensen, A. N. (2015). Deletion of Mitochondrial Porin Alleviates Stress Sensitivity in the Yeast Model of Shwachman-Diamond Syndrome. *Journal of Genetics and Genomics*, *42*(12), 671–684. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.09.004>
- Kargas, V., Castro-Hartmann, P., Escudero-Urquijo, N., Dent, K., Hilcenko, C., Sailer, C., Zisser, G., Marques-Carvalho, M. J., Pellegrino, S., Wawiórka, L., Freund, S. M., Wagstaff, J. L., Andreeva, A., Faille, A., Chen, E., Stengel, F., Bergler, H., & Warren, A. J. (2019). Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *ELife*, *8*, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.44904>
- Kityk, R., Kopp, J., & Mayer, M. P. (2018). Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell*, *69*(2), 227–237.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.003>
- Klinge, S., & Woolford, J. L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(2), 116–131. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0078-y>
- Kuzmin, E., Costanzo, M., Andrews, B., & Boone, C. (2016). Synthetic genetic array analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(4), 359–372. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot088807>
- Lakowicz, J. R. (2008). Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 390, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1822-x>
- Lee, S., Shin, C. H., Lee, J., Jeong, S. D., Hong, C. R., Kim, J.-D., Kim, A.-R., Son, S. J., Kokhan, O., Yoo, T., Ko, J. S., Sohn, Y. B., Kim, O.-H., Ko, J. M., Cho, T.-J., Wright, N., Seong, J. K., Jin, S.-W., Kang, H. J., ... Choi, M. (2018). Somatic uniparental disomy mitigates the most damaging EFL1 allele combination in Shwachman-Diamond syndrome. *BioRxiv*, 483362. <https://doi.org/10.1101/483362>
- Luviano, A., Cruz-Castañeda, R., Sánchez-Puig, N., & García-Hernández, E. (2019). Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides

- modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase. *Biophysical Chemistry*, 247(February), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.02.003>
- Méndez-Godoy, A., García-Montalvo, D., Martínez-Castilla, L. P., & Sánchez-Puig, N. (2021). Evolutionary and functional relationships in the ribosome biogenesis SBDS and EFL1 protein families. *Molecular Genetics and Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01814-w>
- Menne, T. F., Goyenechea, B., Sánchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Brost, R. L., Costanzo, M., Boone, C., & Warren, A. J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nature Genetics*, 39(4), 486–495. <https://doi.org/10.1038/ng1994>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. In *W. H. Freeman and Company* (5th ed.).
- Pace, C. N., Fu, H., Fryar, K. L., Landua, J., Trevino, S. R., Schell, D., Thurlkill, R. L., Imura, S., Scholtz, J. M., Gajiwala, K., Sevcik, J., Urbanikova, L., Myers, J. K., Takano, K., Hebert, E. J., Shirley, B. A., & Grimsley, G. R. (2014). Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein Science*, 23(5), 652–661. <https://doi.org/10.1002/pro.2449>
- Savelsbergh, A., Mohr, D., Kothe, U., Wintermeyer, W., & Rodnina, M. V. (2005). Control of phosphate release from elongation factor G by ribosomal protein L7/12. *EMBO Journal*, 24(24), 4316–4323. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600884>
- Senger, B., Lafontaine, D. L. J., Graindorge, J. S., Gadal, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J. M., Breitenbach, M., Hurt, E., & Fasiolo, F. (2001). The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Molecular Cell*, 8(6), 1363–1373. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00403-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00403-8)
- Shammas, C., Menne, T. F., Hilcenko, C., Michell, S. R., Goyenechea, B., Boocock, G. R. B., Durie, P. R., Rommens, J. M., & Warren, A. J. (2005). Structural and mutational analysis of the SBDS protein family: Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 19221–19229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414656200>
- Shin, B. S., Maag, D., Roll-Mecak, A., Arefin, M. S., Burley, S. K., Lorsch, J. R., & Dever, T. E. (2002). Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell*, 111(7), 1015–1025. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01171-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01171-6)
- Shivangi, Ekka, M. K., & Meena, L. S. (2021). Essential biochemical, biophysical and computational inputs on efficient functioning of Mycobacterium tuberculosis H37Rv FtsY. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.182>
- Sousa, M. C., & McKay, D. B. (1998). The hydroxyl of threonine 13 of the bovine 70-kDa heat shock cognate protein is essential for transducing the ATP-induced conformational change. *Biochemistry*, 37(44), 15392–15399. <https://doi.org/10.1021/bi981510x>
- Stepensky, P., Chacón-Flores, M., Kim, K. H., Abuzaitoun, O., Bautista-Santos, A., Simanovsky, N., Siliqi, D., Altamura, D., Méndez-Godoy, A., Gijssbers, A., Eddin, A. N., Dor, T., Charrow, J., Sánchez-Puig, N., & Elpeleg, O. (2017). Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile

- pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 54(8), 558–566. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104366>
- Sulima, S., Kampen, K., & De Keersmaecker, K. (2019). Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells*, 8(3), 229. <https://doi.org/10.3390/cells8030229>
- Sychrova, H., & Chevallier, M. R. (1993). Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene LYP1 coding for a lysine-specific permease. *Yeast*, 9(7), 771–782. <https://doi.org/10.1002/yea.320090711>
- Tan, Q. K. G., Cope, H., Spillmann, R. C., Stong, N., Jiang, Y. H., McDonald, M. T., Rothman, J. A., Butler, M. W., Frush, D. P., Lachman, R. S., Lee, B., Bacino, C. A., Bonner, M. J., McCall, C. M., Pendse, A. A., Walley, N., Shashi, V., & Pena, L. D. M. (2018). Further evidence for the involvement of EFL1 in a Shwachman-Diamond-like syndrome and expansion of the phenotypic features. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 4(5), 1–13. <https://doi.org/10.1101/mcs.a003046>
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(21), 4815–4821. <https://doi.org/10.1242/jcs.111948>
- Warren, A. J. (2018). Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome. *Advances in Biological Regulation*, 67, 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.09.002>
- Webb, M. R. (1992). A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 4884–4887. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4884>
- Wei, J., Gaut, J. R., & Hendershot, L. M. (1995). In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26677–26682. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.44.26677>
- Weis, B. L., Missbach, S., Marzi, J., Bohnsack, M. T., & Schleiff, E. (2014). The 60S associated ribosome biogenesis factor LSG1-2 is required for 40S maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 80(6), 1043–1056. <https://doi.org/10.1111/tpj.12703>
- Weis, F., Giudice, E., Churcher, M., Jin, L., Hilcenko, C., Wong, C. C., Traynor, D., Kay, R. R., & Warren, A. J. (2015). Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(11), 914–919. <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(1), 943–971. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062708-134043>
- Woloszynek, J. R., Rothbaum, R. J., Rawls, A. S., Minx, P. J., Wilson, R. K., Mason, P. J., Bessler, M., & Link, D. C. (2004). Mutations of the SBDS gene are present in most patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*, 104(12), 3588–3590. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1516>
- Woolford, J. L., & Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643–681. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197>

11 Anexos

11.1 Preparación de células *E. coli* quimiocompetentes

Tres mL de medio LB se inocularon con una colonia de *E. coli* DH10 β durante 12 h a 37 °C bajo agitación constante a 200 rpm. Un mL de este cultivo se usó para inocular 100 mL de medio LB que se incubó el tiempo necesario para alcanzar una $D.O_{600\text{ nm}} = 0.3 - 0.6$. Posteriormente se colocó el matraz en hielo y el cultivo se transfirió a tubos falcon nuevos y estériles previamente enfriados. Todos los pasos subsecuentes se realizaron en frío. Los tubos falcon se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C, el paquete celular se resuspendió en 5 mL de medio LB-CC (0.05 del volumen original) previamente enfriado y se incubó en hielo durante 10 min. Se hicieron alícuotas de 100 μ L las cuales se congelaron en nitrógeno líquido a -80 °C.

Medio LB

- Triptona 16 g/L
- Extracto de levadura 10g/L
- NaCl 5g/L

El pH se ajusta a 7.0 con NaOH. Esterilizar por autoclave.

Medio LB-CC

- Medio LB 60 mL
- NaCl 0.7 g
- PEG (3350, 4000, 8000) 10 g
- Glicerol 100% 10 mL
- MgCl₂ 1M 1 mL
- MgSO₄ 1M 1 mL
- DMSO 5 mL

Ajustar el pH a 6.5 – 7.0 y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Filtrar con membranas hidrofílicas de 0.45 μ m de ancho de poro y posteriormente esterilizar por filtración hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.

11.2 Transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes mediante choque térmico

Las células competentes se descongelaron en hielo y se adicionó de entre 2 a 10 μ L de ADN de interés. Se adicionó 1 volumen de KCM por 1 volumen de células quimiocompetentes y se incubó por 30 min en hielo. Se dio un choque térmico durante exactamente 1.5 min a 42 °C y posteriormente se incubó en hielo durante 2 min. Se agregó 400 μ L de medio LB a las muestras y se incubaron a 37 °C bajo agitación constante (200 rpm) durante 1 h. Posteriormente se colectó el paquete celular y se redujo el volumen a aproximadamente 50 μ L, se sembró todo el volumen por extensión en cajas con agar LB empleando la marca de resistencia adecuada. Se incubaron durante 16 h a 37°C.

KCM

- 100 mM KCl
- 30 mM CaCl₂
- 50 mM MgCl₂

11.3 Transformación de *S. cerevisiae* mediante el protocolo de acetato de litio/acarreador de ADN/polietilenglicol

En 5 mL de medio YEPD (o el medio apropiado a inocular) se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* y se incubó durante 12 h a 30 °C bajo agitación constante a 200 rpm. Este cultivo se usó para inocular 50 mL de medio YEPD (o del medio apropiado) a una D.O_{600 nm} = 0.1 y se incubó hasta alcanzar un D.O_{600 nm} = 0.6 – 0.7. En este momento se colectó el paquete celular en un tubo falcon nuevo y estéril a 3500 rpm por 5 min a 21 °C (no a 4 °C) y resuspenderlo en 5 mL de agua estéril. Centrifugar las células a 3500 rpm por 5 min a 21 °C y resuspender en 500 µL de 1x TE/LiAc estéril y recién hecha (estas son células competentes). Mezcle 200 ng de ADN de interés con 100 µg de ADN acarreador de esperma de salmón (20 µL) calentado mediante baño maría hirviendo durante 5 min. En general mezcle 5 µL del plásmido obtenido por miniprep con 20 µL de ADN acarreador de esperma de salmón para un volumen final de 25 µL. Añadir 100 µL de células competentes a la mezcla de reacción anterior y mezcle mediante vórtex, posteriormente, añadir 600 µL de 1x TE/LiAc/PEG preparada recientemente y estéril, mezcle mediante vórtex. Incubar a 30 °C por 2 h en agitación constante a 200 rpm (voltar los tubos porque las levaduras se asientan). Añadir 70 µL de DMSO y mezcle gentilmente por inversión (No utilice vórtex). Aplique choque térmico a 42 °C durante 15 min, incube los tubos en hielo durante 2 min y centrifugue las células a 3500 rpm por 5 min. Realizar un lavado con agua estéril. Resuspender en 100 µL de 1x TE y siembre por extensión 50 – 100 µL de las células en el medio apropiado. Incubar a 30 °C (o a la temperatura apropiada) durante 2 – 3 días.

1x TE/LiAc.

- 4 mL de H₂O
- 0.5 mL TE 10x
- 0.5 LiAc 1M

1x TE/LiAc/PEG

- 4 mL PEG (50%)
- 0.5 TE 10X
- 0.5 LiAc 1 M

10x TE

- 100 mM Tris-HCl pH 7.4
- 10 mM EDTA pH 8

11.4 Medio SD-Ura (Synthetic defined medium sin uracilo)

Medio SD-Ura

- Medio YM4 900 mL
- Glucosa (20%) 100 mL
- Drop-out Trp-Leu 100x 10 mL

La glucosa al 20% se esteriliza aparte, y el drop-out se esteriliza mediante filtración.

Medio YM4

- Base nitrogenada sin aminoácidos 8 g/L
- Casaaminoácidos 11 g/L
- Sulfato de adenina 55 mg/L
- Tirosina 55 mg/L

Drop-out 100x Trp-Leu

- Triptófano 0.4 mg/100 mL
- Leucina 0.6 mg/100 mL

11.5 Solución amortiguadora de lisis para purificación de ScEFL1 T137A

Composición de la solución amortiguadora de lisis para la purificación de EFL1 T137A.

- Hepes 50 mM pH 8
- NaCl 1 M
- Imidazol 40 mM
- MgCl₂ 5 mM
- Glicerol 10%

Cuando se vaya a emplear se debe adicionar

- β-mercaptoetanol 10 mM
- Benzamidina 1 mM
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM

11.6 Solución amortiguadora de baja sal para purificación de ScEFL1 T137A

Composición de la solución amortiguadora de alta sal para la purificación de EFL1 T137A.

- Hepes 50 mM pH 8
- NaCl 100 mM
- MgCl₂ 5 mM

11.7 Solución amortiguadora de elución para la purificación de EFL1 T137A

Composición de la solución amortiguadora de lisis para la purificación de EFL1 T137A.

- Hepes 50 mM pH 8
- NaCl 300 mM
- Imidazol 350 mM
- MgCl₂ 5 mM

11.8 Medio para esporular

Composición del medio para esporular

- Dextrosa 0.5 g
- Acetato de potasio 10 g
- Extracto de levadura 1 g
- Polvo de aminoácidos para esporular 0.1 g
- Agua destilada 1 L

Esterilizar mediante autoclave.

Si la cepa posee auxotrofia suplementar el medio de esporulación con los aminoácidos apropiados para este trabajo se suplemento con la siguiente mezcla de aminoácidos:

Polvo de aminoácidos para esporular:

- Histidina 2 g
- Leucina 2 g
- Lisina 2 g
- Uracilo 2 g

11.9 Medio SD/MSG-His/Arg/Lys

Composición del medio SD/MSG: En un matraz de 500 mL combinar:

- Base nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio 1.7 g
- Ácido glutámico monosódico 1 g
- Suplemento de aminoácidos en polvo (sin His, Arg y Lys) 2 g
- H₂O 200 mL

En un matraz de 1 L combinar:

- Bacto-Agar 20 g
- H₂O 750 mL

Esterilizar ambas soluciones por autoclave, posteriormente mezclar ambas soluciones y agregar:

● Dextrosa (40%)	50 mL
● Canavanina (100 mg/mL)	0.5 mL
● Tialisina (100 mg/mL)	0.5 mL
● Nourseotricina (ClonNAT, 100 mg/mL) *	1 mL

*Según se necesite.

Mezclar por 15 min y verter en placas Petri. La solución de dextrosa esterilizar por autoclave, las soluciones de Canavanina, Tialisina y Nourseotricina se esterilizan por filtración.

Composición del suplemento de aminoácidos en polvo sin His, Arg y Lys.

● Adenina	3 g
● Uracilo	2 g
● Inositol	2 g
● Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0.2 g
● Alanina	2 g
● Asparagina	2 g
● Ácido aspártico	2 g
● Cisteína	2 g
● Ácido glutámico	2 g
● Glicina	2 g
● Isoleucina	2 g
● Leucina	10 g
● Metionina	2 g
● Fenilalanina	2 g
● Prolina	2 g
● Serina	2 g
● Treonina	2 g
● Triptófano	2 g
● Tirosina	2 g
● Valina	2 g

11.10 Composición del medio SD-Ura-Met (Synthetic defined media sin uracilo ni metionina)

Composición del medio SD -Ura-Met

● Base nitrogenada sin aminoácidos	8 g/L
● Adenina	0.06 g/L
● Tirosina	0.06 g/L
● Arginina	0.02 g/L
● Histidina	0.01 g/L
● Isoleucina	0.06 g/L
● Leucina	0.06 g/L
● Lisina	0.04 g/L
● Fenilalanina	0.06 g/L
● Treonina	0.05 g/L
● Triptófano	0.04 g/L

- Glucosa* 2%
- Agar** 2%

*La glucosa se esteriliza aparte por filtración.

**Sólo para medio sólidos.

11.11 Solución amortiguadora de lavado para la purificación de EFL1 T137A

- Heps 50 mM pH 8
- NaCl 100 mM
- Imidazol 60 mM
- MgCl₂ 5 mM