



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización del dominio carboxilo-terminal
de la GTPasa de bucle GPN Npa3 en
*Saccharomyces cerevisiae***

Tesis que presenta

Manuel de Jesús Ochoa Valdez

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Roberto Sánchez Olea

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., 20 octubre de 2025



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización del dominio carboxilo-terminal de la GTPasa de bucle GPN Npa3 en *Saccharomyces cerevisiae***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Manuel de Jesús Ochoa Valdez** y aprobada el **20 de octubre de 2025** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Roberto Sánchez Olea

Codirector de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Codirector de la tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Samuel Lara González

Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la codirección de los doctores Roberto Sánchez Olea y Lina Raquel Riego Ruiz.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, hoy SECIHTI, con No. de registro 789339 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de tesis se financió por medio del proyecto de ciencia básica A1-S-21070, otorgado al Dr. Roberto Sánchez Olea por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, ahora Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI).

Hacemos extensivo el reconocimiento por su aportación para la realización de este trabajo a la IBt. Verónica Zárate Chávez del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), por el apoyo técnico en la secuenciación de ADN, y a la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano, del Laboratorio de Microscopía para Muestras Biológicas, por su asistencia técnica para la adquisición de imágenes de microscopía de levaduras.

Dedicatorias

A **Dios**, por acompañarme siempre.

A mis **padres**, mi **hermana** y mis **sobrinos**, por su amor incondicional y por brindarme su apoyo en todo momento.

A mi **esposa** e **hijas**, por su amor, apoyo, y compañía, no solo durante esta etapa, sino cada día de mi vida.

Agradecimientos

Al **CONAHCyT (SECIHTI)**, por otorgarme la beca de doctorado que hizo posible la realización de este trabajo.

Al **IPICyT**, por admitirme en su Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular y por brindarme acceso a sus instalaciones, que fueron fundamentales para mi formación académica y profesional.

Al **Instituto de Física** de la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, por acogerme como parte de su comunidad estudiantil y facilitarme el acceso a sus recursos e infraestructura.

A mis codirectores de tesis el **Dr. Roberto Sánchez Olea** y la **Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**, por su confianza, paciencia, comprensión y constante apoyo durante mi formación doctoral. Asimismo, extendiendo un agradecimiento especial a la **Dra. Mónica Raquel Calera Medina**, quien fue una pieza clave en mi formación y en la realización de este trabajo.

A mi comité tutorial, integrado por los Dres. **Sergio Casas Flores** y **Samuel Lara González**, por su guía, aportaciones valiosas, y conocimientos, los cuales enriquecieron tanto mi formación personal-profesional como mi trabajo doctoral.

A los Dres. **Alejandro De las Peñas Nava** e **Irene Castaño Navarro**, por su importante contribución a mi desarrollo académico y profesional.

A la **IBt. Verónica Zárate Chávez**, la **Dra. Olga Araceli Patrón Soberano**, el **Dr. Nicolás Gómez Hernández** y la **Dra. Esther Layseca Espinosa**, por su invaluable apoyo técnico, que fue crucial para la realización de este proyecto.

Finalmente, mi más profundo agradecimiento a la **M.C. Beatriz Elena González Contreras**, quien fue mi primera maestra en el laboratorio, y cuya enseñanza dejó una huella imborrable en mi formación.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Glosario	xv
Resumen	xvii
Abstract	xviii

1. Introducción	1
1.1 Estructura y regulación de las GTPasas	1
1.2 La familia de GTPasas de bucle GPN	4
1.3 GPN1, la primera proteína GPN descubierta, ¿cómo la llamamos: XAB1, MBDin, RPAP4, Epa1 o Npa3?	4
1.4 Npa3, el ortólogo de GPN1 humana en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.5 La extensión C-terminal de Npa3, ¿para qué existe en eucariontes?	7
1.6 Bud27 una proteína de andamiaje no convencional	9
1.7 La función independiente de la estructura: proteínas intrínsecamente desordenadas	10
1.8 La fosforilación, la modificación postraduccional favorita del desorden	13
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. Materiales y métodos	18
4.1 Cepas y plásmidos	18
4.2 Clonación génica y generación de plásmidos mediante gBlocks	22
4.3 Análisis estructural <i>in silico</i> de proteínas	24
4.4 Alineamiento de proteínas	24
4.5 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	25
4.6 Transformación de levadura	25
4.7 Ensayos de susceptibilidad a inhibidores de la traducción	25
4.8 Estudio de complementación heteróloga mediante ensayo de pérdida de plásmido	26
4.9 Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
4.10 Análisis de Western blot	27

4.11 Microscopia y adquisición de imágenes	27
5. Resultados	29
5.1 Los dominios C-terminal de Npa3 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y GPN1 humana se predicen como regiones intrínsecamente desordenadas con tres MoRFs cada una	29
5.2 El C-terminal de GPN1 humana sustituye parcialmente la función del extremo C-terminal de Npa3 en levadura en un ensayo de interacción genética sintética negativa entre <i>npa3ΔC/bud27Δ</i>	32
5.3 La fosforilación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 del C-terminal de Npa3 es crítico para superar el estrés traduccional causado por la higromicina B y la cicloheximida en células <i>bud27Δ</i>	35
5.4 Experimentos con mutantes dobles y sencillas indican que la Ser308 es crítica para enfrentar el estrés traduccional causado por la higromicina B y la cicloheximida en células <i>bud27Δ</i>	42
5.5 La distribución subcelular y los niveles de proteína no se alteraron en las mutantes <i>npa3-NP1</i> , <i>npa3-NP2</i> ni <i>npa3-NP11</i>	44
5.6 La localización nuclear de las RNA polimerasas I, II y III es independiente de la fosforilación del extremo C-terminal de Npa3 en células <i>bud27Δ</i>	46
5.7 El grupo Ser304/Ser308/Ser313 está altamente conservado en otros hongos filogenéticamente cercanos a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
6. Discusión	51
7. Conclusiones	56
8. Referencias	58
Anexos	71

Lista de tablas

Tabla 1. Residuos fosforilados localizados en el C-terminal de Npa3.	15
Tabla 2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	18
Tabla 3. Plásmidos	21
Tabla 4. Residuos fosforilados y codones utilizados para generar las mutantes no fosforilables (<i>npa3-NPs</i>)	23
Tabla 5. Codones que codifican arginina en GPN1 humana que se intercambiaron por codones de arginina de uso frecuente en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	23

Lista de figuras

Figura 1. Características generales de las GTPasas	2
Figura 2. Los dos ciclos de las GTPasas	3
Figura 3. Bloques que conforman las proteínas: dominios estructurados y regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs)	12
Figura 4. Los dominios C-terminal de Npa3 de levadura y GPN1 humana se predicen como regiones intrínsecamente desordenadas	31
Figura 5. El C-terminal de GPN1 humana rescata parcialmente la interacción genética negativa de <i>npa3ΔC/bud27Δ</i>	34
Figura 6. Diagrama con las posiciones relativas de los ocho residuos fosforilados del C-terminal de Npa3 que se mutaron en este trabajo	36
Figura 7. Las mutantes <i>npa3-NP1</i> , <i>npa3-NP2</i> y <i>npa3-NP3</i> no se ven afectadas en presencia de higromicina B y cicloheximida ni se altera su distribución subcelular	37
Figura 8. La mutación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 a alaninas del C-terminal de Npa3 aumenta la sensibilidad a la higromicina B y la cicloheximida	40
Figura 9. La mutación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 a alaninas del C-terminal de Npa3 aumenta la sensibilidad a la cicloheximida	41
Figura 10. Evaluación de mutantes no fosforilables dobles y sencillas del C-terminal de Npa3 en presencia de higromicina B	43
Figura 11. Evaluación de mutantes no fosforilables dobles y sencillas del C-terminal de Npa3 en presencia de cicloheximida	44
Figura 12. Las mutantes <i>npa3-NP1-GFP</i> , <i>npa3-NP2-GFP</i> y <i>npa3-NP11-GFP</i> muestran una distribución subcelular y niveles de proteína equivalentes a <i>NPA3-GFP</i> silvestre en el fondo genético <i>bud27Δ</i> .	46
Figura 13. Las RNA polimerasas RNAPI, RNAPII y RNAPIII son predominantemente nucleares en células <i>npa3-NP2/BUD27</i> y <i>npa3-NP2/bud27Δ</i>	48
Figura 14. El grupo Ser304/Ser308/Ser313 se conserva en ortólogos de Npa3 de otros hongos filogenéticamente cercanos a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50

Anexos

Artículo publicado

71

Abreviaturas

5-FOA	Ácido 5-fluoroorótico; del inglés 5-FluoroOrotic Acid
AP-MS	Purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas; del inglés, Affinity Purification coupled to Mass Spectrometry
ATP	Trifosfato de Adenosina; del inglés Adenosine TriPhosphate
BUD27	Proteína 27 de selección del sitio de gemación; del inglés, BUD site selection protein 27
CTD	Dominio carboxilo terminal; del inglés Carboxy-Terminal Domain
C-terminal	COOH-terminal o Carboxilo-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico; del inglés DeoxyriboNucleic Acid
EPA1	ATPasa 1 esencial interactora con Pcl1; del inglés, Essential Pcl1-interacting ATPase 1
GAL10	Proteína 10 del metabolismo de galactosa; del inglés GALactose metabolism 10
GAP	Proteína activadora de GTPasa; del inglés GTPase-Activating Protein)
GCR	Corregulador de GTPasa; del inglés GTPase Co-Regulator)
GDP	Difosfato de Guanosina; del inglés Guanosine DiPhosphate
GEF	Factor intercambiador de nucleótido de guanina; del inglés Guanine nucleotide-Exchange Factor
GFP	Proteína verde fluorescente; del inglés Green Fluorescent Protein
GPN	Motivo de Glicina-Prolina-Asparagina; del inglés Glycine-Proline-Asparagine motif
GPN1	GTPasa de bucle GPN 1; del inglés GPN-loop GTPase 1
GPN2	GTPasa de bucle GPN 2; del inglés GPN-loop GTPase 2
GPN3	GTPasa de bucle GPN 3; del inglés GPN-loop GTPase 3
GTP	Trifosfato de Guanosina; del inglés Guanosine TriPhosphate
hs	homo sapiens
IDP	Proteína intrínsecamente desordenada; del inglés Intrinsically Disordered Protein
IDR	Región intrínsecamente desordenada; del inglés Intrinsically Disordered Region
LiAc	Acetato de litio; del inglés Lithium Acetate
MBD2	Proteína 2 del dominio de unión a metil-CpG; del inglés, Methyl-CpG-Binding Domain protein 2
MBDin	Proteína interactora con MBD2; del inglés MBD2-interacting protein
MSG	Glutamato monosódico; del inglés MonoSodium Glutamate

MoRF	Motivos con función de reconocimiento molecular; del inglés M olecular R ecognition F eature
mRNA	ARN mensajero; del inglés m essenger RNA
NES	Señal de exportación nuclear; del inglés N uclear E xport S ignal
NP	No fosforilable; del inglés N on- P hosphorylatable
NPA1	Proteína 1 asociada preribosomal nucleolar; del inglés N ucleolar P reribosomal A ssociated 1
NPA2	Proteína 2 asociada preribosomal nucleolar; del inglés N ucleolar P reribosomal A ssociated 2
NPA3	Proteína 3 asociada preribosomal nucleolar; del inglés N ucleolar P reribosomal A ssociated 3
N-terminal	NH₂-terminal o ami No-terminal
ncRNA	ARN no codificante; del inglés n on-coding RNA
PCL1	Ciclina 1 de Pho85; del inglés P ho85 C yc L in 1
PEG	Polietilenglicol; del inglés P oly E thylene G lycol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés P olymerase C hain R eaction
PHO85	Proteína 85 del metabolismo del fosfato; PHO sphate metabolism 85
PFD	Prefoldina; del inglés P re F ol D in
PTM	Modificación postraducciona; del inglés, P ost- T ranslational M odification.
pb	Pares de bases
Pi	Fosfato inorgánico; del inglés P hosphate i norganic
RBA50	Proteína 50 asociada a la RNA polimerasa II; del inglés, RNA polymerase II (B) A ssociated protein 50
RFP	Proteína roja fluorescente; del inglés R ed F luorescent P rotein
RNA	Ácido ribonucleico; del inglés R ibo N ucleic A cid
RNAPs	ARN polimerasas; del inglés RNA P olymerases
RNAPI	ARN polimerasa I; del inglés RNA P olymerase I
RNAPII	ARN polimerasa II; del inglés RNA P olymerase II
RNAPIII	ARN polimerasa III; del inglés RNA P olymerase III
RPAP1	Proteína 4 asociada a la RNA polimerasa II; del inglés RNA P olymerase II A ssociated P rotein 4
RPAP4	Proteína 4 asociada a la RNA polimerasa II; del inglés RNA P olymerase II A ssociated P rotein 4
RPB1	Subunidad B1 de la RNA polimerasa II; del inglés, RNA P olymerase II subunit B1
RPB2	Subunidad B2 de la RNA polimerasa II; del inglés, RNA P olymerase II subunit B2

RPB3	Subunidad B3 de la RNA polimerasa II; del inglés, RNA Polymerase II subunit B3
RPB5	Subunidad B5 de la RNA polimerasa II; del inglés, RNA Polymerase II subunit B5
RTR1	Regulador de la transcripción 1; del inglés Regulator of TRanscription 1
rRNA	ARN ribosomal; del inglés ribosomal RNA
SCM	Medio sintético completo; del inglés Synthetic Complete Medium
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio; del inglés Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIMBI	Partícula de reconocimiento de señal, MinD y BioD; del inglés Signal recognition particle, MinD and BioD
Sc	Saccharomyces cerevisiae
snoRNP	Ribonucleoproteína nucleolar pequeña; del inglés, small nucleolar RiboNucleoProtein
ssDNA	ADN de cadena sencilla o monocatenario; del inglés single-stranded DeoxyriboNucleic Acid
TIF11	Factor de iniciación de la traducción 11; del inglés, Translation Initiation Factor 11
TRAFAC	Factores de traducción; del inglés TRAnslation FACtors
URI	Prefoldina no convencional Interactora de RPB5; del inglés Unconventional prefoldin RPB5-Interactor 1
XBA	Proteína de unión a XPA; del inglés XP A-Binding protein 1
XPA	Proteína complementaria del grupo A de Xeroderma pigmentoso; del inglés Xeroderma Pigmentosum group A-complementing protein
YNB	Base nitrogenada de levadura; del inglés Yeast Nitrogen Base
YPD	Medio extracto de levadura, peptona y dextrosa; del inglés Yeast extract, Peptone and Dextrose

Glosario

Auxotrofia. Incapacidad de un organismo para sintetizar una molécula esencial.

Cicloheximida. Antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces griseus* que inhibe la síntesis de proteínas en eucariotas bloqueando la actividad peptidiltransferasa del ribosoma 60S y deteniendo la elongación de la proteína naciente.

Cinasa. Enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato de una molécula de ATP a un residuo específico de serina, treonina o tirosina de una proteína.

Cromosoma. Estructura organizada de DNA y proteínas asociadas que contienen la información genética de un organismo.

Filogenia. Historia evolutiva de una especie o grupo de organismos. También puede aplicarse a genes o proteínas, describiendo las relaciones de parentesco entre ellos a lo largo del tiempo.

Filogenético. Relativo a la filogenia, es decir, a la evolución y las relaciones de parentesco.

Filogenéticamente cercano. Se refiere a organismos, genes o proteínas que están próximos en un árbol filogenético por compartir un ancestro común reciente.

Fosfatasa. Enzima que cataliza la eliminación de un grupo fosfato de un aminoácido previamente fosforilado de serina, treonina o tirosina.

Fosforilación. Modificación postraduccional de una proteína por la adición de un grupo fosfato, a un residuo de serina, treonina o tirosina.

Higromicina B. Antibiótico aminoglucósido producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis de proteínas en procariotas y eucariotas impidiendo la translocación del ribosoma y causando errores de lectura del RNA mensajero.

Homólogo. Genes, proteínas o estructuras que comparten un origen evolutivo común, aunque no necesariamente conserven la misma función.

Locus. Posición específica de un gen en un cromosoma.

Marcador génico. Gen o secuencia de ADN que se utiliza para identificar, rastrear o seleccionar células u organismos con características genéticas específicas.

Microgramo (µg). Unidad de masa que equivale a la millonésima (10^{-6}) parte de un gramo.

Microtúbulo. Filamento intracelular y hueco, de naturaleza proteica, que forma parte del citoesqueleto y de otros orgánulos, como centriolos y cilios.

Nanogramo (ng). Unidad de masa que equivale a la milmillonésima (10^{-9}) parte de un gramo.

Ortólogo. Gen homólogo presente en diferentes especies, que descende de un mismo gen ancestral y que, generalmente, conserva la misma función.

Parálogo. Gen homólogo dentro de un mismo genoma, originado por un evento de duplicación génica. Los parálogos pueden divergir y adquirir funciones distintas.

Plásmido. Molécula de DNA de doble cadena circular extracromosómico que se replica de manera independiente al DNA cromosómico.

Revertiente. Organismo o célula en el que una mutación ha sido eliminada o compensada, de modo que se restauran las características previamente alteradas.

Resumen

Caracterización del dominio carboxilo-terminal de la GTPasa de bucle GPN Npa3 en *Saccharomyces cerevisiae*.

La GTPasa de bucle GPN 1 de levadura (Npa3) participa en el ensamblaje y translocación nuclear de la RNA polimerasa II (RNAPII). Npa3 posee un dominio de GTPasa (N-terminal) con una extensión en su dominio carboxilo-terminal (C-terminal) presente únicamente en eucariontes, y ausente en su único ortólogo de arqueas. Previamente, se reportó que el C-terminal tiene funciones no relacionadas con la RNAPII, debido a que células que expresaban una versión trunca de Npa3 carente de los últimos 106 aminoácidos del C-terminal (*npa3ΔC*) mostraron una RNAPII con localización nuclear normal, pero una mayor sensibilidad a la higromicina B y geneticina. Asimismo, un análisis de matrices genéticas sintéticas arrojó que la mutante *npa3ΔC* tenía una fuerte interacción genética negativa con genes en diferentes procesos celulares, y particularmente con la mutante *bud27Δ*. A pesar de esto, se conoce muy poco sobre cómo funciona o se regula el C-terminal de Npa3. En este trabajo, se muestra que los C-terminal de Npa3 y de GPN1 humana tienen características estructurales propias de regiones intrínsecamente desordenadas con tres motivos de reconocimiento molecular (MoRFs). Ambos C-terminal no comparten identidad en su secuencia primaria y, a pesar de esto, el C-terminal de GPN1 pudo reemplazar parcialmente funciones del C-terminal de Npa3 en la levadura *S. cerevisiae*. Adicionalmente, se reportó que Npa3 se fosforila en once residuos de su C-terminal, pero se desconoce su importancia fisiológica. Células de levadura *bud27Δ* que expresan una versión no fosforilable de Npa3 (*npa3-NP*) con ocho de los once residuos fosforilables mutados a alanina, mostraron una mayor sensibilidad a higromicina B y cicloheximida que las células control. El mismo fenotipo se observó mutando únicamente el grupo Ser304/Ser308/Ser313 a alanina. En conclusión, en este trabajo se propone que la función del dominio GTPasa de Npa3 se regula fuertemente por la fosforilación de su extremo C-terminal, una región intrínsecamente desordenada.

PALABRAS CLAVE. Npa3/GPN1, dominio carboxilo-terminal, región intrínsecamente desordenada, fosforilación, *BUD27*

Abstract

Characterization of the Carboxy-Terminal Domain (CTD) in the GPN-loop GTPase Npa3 in *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast GPN-loop GTPase 1 (Npa3) belongs to a family of GTPases involved in the assembly and nuclear targeting of RNA polymerase II (RNAPII). Npa3 features an N-terminal GTPase domain (G-domain) and an extended C-terminal domain (CTD), which is present exclusively in eukaryotes and absent in the sole GPN protein ortholog found in archaea. Previously, we reported that Npa3 possesses additional functions unrelated to RNAPII. Yeast cells expressing a truncated version of Npa3 lacking the last 106 amino acids (*npa3 Δ C*) displayed increased sensitivity to both the translation inhibitors hygromycin B and geneticin. Additionally, a synthetic genetic array analysis revealed that *npa3 Δ C* exhibited strong negative interactions with at least 15 genes involved in different cellular processes, most notably with *bud27 Δ* . However, very little is known about the function or regulatory mechanisms of Npa3 CTD. In this work, we show that the CTDs of Npa3 and GPN1 are predicted to be intrinsically disordered regions (IDRs) containing three molecular recognition features (MoRFs). As expected for an IDR region, yeast Npa3 and human GPN1 CTDs do not share conservation at their primary sequence level. Nonetheless, the GPN1 CTD can partially substitute for Npa3 CTD function in yeast. Furthermore, global proteomic studies have reported that Npa3 is mainly phosphorylated within its CTD, although its physiological relevance remains unknown. In yeast *bud27 Δ* cells expressing a non-phosphorylatable version of Npa3 (*npa3-NP*), in which eight phosphorylatable residues were mutated to alanine, we observed increased sensitivity to hygromycin B and cycloheximide. A similar phenotype was displayed in cells expressing an Npa3-NP mutant with only the Ser304/Ser308/Ser313 cluster mutated to alanine. In conclusion, we propose that the function of the Npa3 G-domain is critically regulated through phosphorylation of the S304/S308/S313 cluster within its disordered CTD.

KEYWORDS. Npa3/GPN1, carboxy-terminal domain, intrinsically disordered region, phosphorylation, *BUD27*

1. Introducción

1.1 Estructura y regulación de las GTPasas

En las células muchas proteínas se regulan por la adición de un grupo fosfato en uno o múltiples aminoácidos específicos, a este proceso bioquímico se le conoce como fosforilación (Alberts et al., 2017). Cada evento de fosforilación esta mediado por la acción de una enzima cinasa que transfiere el grupo fosfato directamente desde una molécula de trifosfato de adenosina (ATP) (Alberts et al., 2017). Asimismo, existe otro tipo de regulación, donde los grupos fosfatos se unen a un nucleósido de guanina para formar trifosfato de guanosina (GTP) que posteriormente se acopla a un tipo particular de proteínas llamadas GTPasas, las cuales tienen la capacidad de unir e hidrolizar el GTP (Alberts et al., 2017). El GTP se asocia con funciones reguladoras en numerosos procesos celulares (Vetter & Wittinghofer, 2001; Wittinghofer & Vetter, 2011).

Las GTPasas pertenecen a una super familia de proteínas reguladoras que involucran la unión e hidrolisis del GTP en su ciclo funcional (Bourne et al., 1990, 1991). Esta superfamilia se divide a su vez en dos grandes subtipos: TRAFAC y SIMIBI (Leipe et al., 2002). El primer subtipo, TRAFAC, incluye enzimas involucradas en la traducción, transducción de señales, motilidad celular y transporte intracelular (Leipe et al., 2002). El segundo subtipo, SIMIBI, se asocia con la localización de proteínas, la partición de cromosomas, transporte de membrana y algunas están asociadas a enzimas con actividad de cinasas y fosfato transferasas (Leipe et al., 2002).

Las GTPasas, entre sí, son similares en estructura y en organización de sus dominios funcionales, lo que sugiere un ancestro común (Bourne et al., 1990, 1991). El dominio de unión a nucleótido (dominio G) está formado por un núcleo hidrofóbico compuesto de seis hojas β que se conectan entre sí por bucles hidrofílicos y hélices α (Bourne et al., 1991; Wittinghofer & Vetter, 2011). De igual modo, las GTPasas comparten cinco motivos polipeptídicos denominados G (G1 – G5) que son críticos para la unión de GTP y GDP, y participan en la hidrólisis del GTP (Figura 1) (Bourne et al., 1991). Para su función, las GTPasas transicionan en tres estados

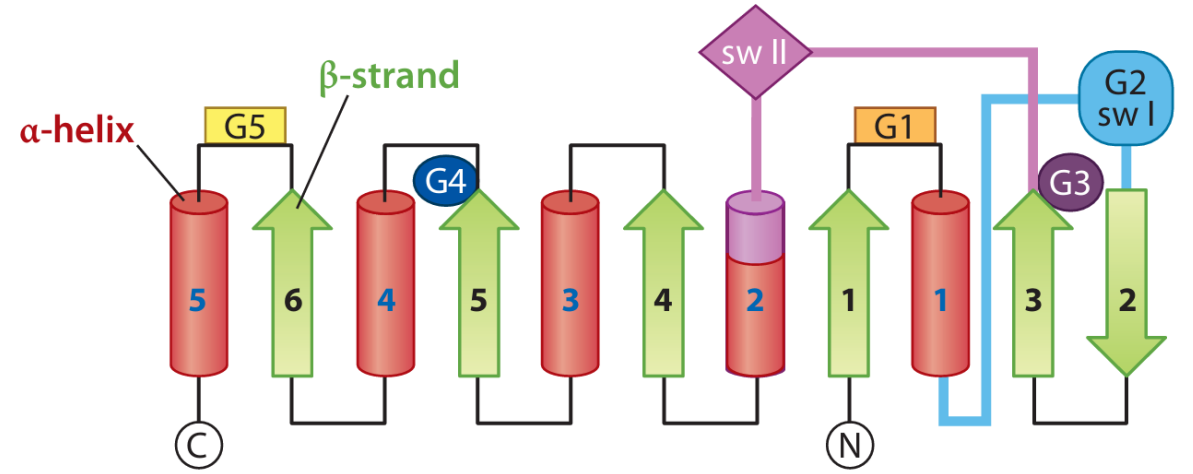


Figura 1. Características generales de las GTPasas. Diagrama del dominio de GTPasa (dominio G) que muestra las hojas β en verde, hélices α en rojo, los dominios G (G1 – G5) y sus respectivos dominios N-terminal y C-terminal. Además, se incluyen las regiones switch I (Sw I) y II (Sw II) que cambian de conformación de acuerdo con el tipo de nucleótido que está unido a la GTPasa, GDP o GTP. Figura tomada de Wittinghofer & Vetter (2011).

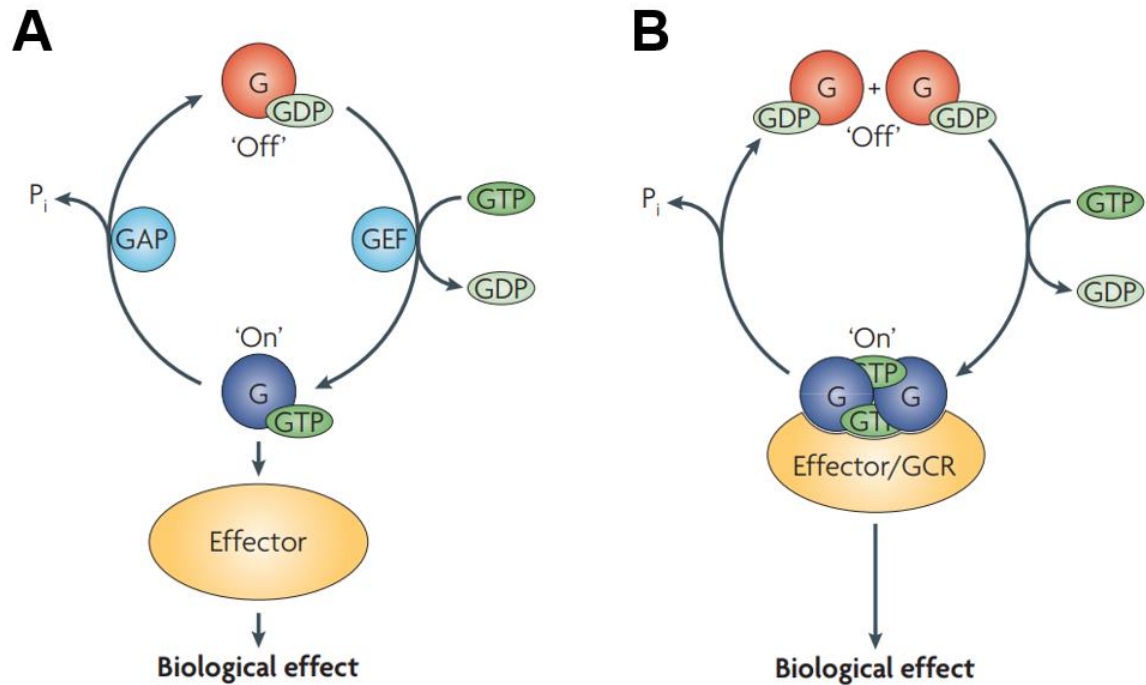


Figura 2. Los dos ciclos de las GTPasas. **A.** Establece un mecanismo convencional, donde la GTPasa se apoya en proteínas accesorias para la disociación del GDP y la unión al GTP por un factor intercambiado de nucleótido de guanina (GEF) y para la hidrólisis del GTP por la proteína activadora de GTPasa (GAP) que complementa o estabiliza el sitio activo. El GTP cargado en la GTPasa permite la interacción con efectores río abajo que se unen preferentemente a la conformación activa de la GTPasa. **B.** Este mecanismo depende de la dimerización de la GTPasa. No necesita de GEF debido a una baja afinidad por el GDP al momento de la dimerización, y para la hidrólisis del GTP el sitio activo de ambas proteínas se complementa o estabiliza mutuamente. La función biológica y la reacción de GTPasa están finamente acoplada por su interacción con sus efectores o correguladores de GTPasa (GCRs), río abajo, que finaliza con la hidrólisis del GTP y la liberación de un fosfato inorgánico (P_i). Figura tomada de Gasper et al. (2009).

1.2 La familia de GTPasas de bucle GPN

En eucariontes se describió una familia de GTPasas de clase SIMIBI que se denominó GTPasas de bucle GPN por un tripéptido invariable de glicina, prolina y asparagina (GPN) en su secuencia primaria (Gras et al., 2007). El motivo GPN participa en el sitio activo de las GTPasas y es crítico para la hidrólisis del GTP (Gras et al., 2007). En las células eucariotas se han descrito tres miembros: Gpn1, Gpn2 y Gpn3 (Niesser et al., 2016). Los genes que codifican para estas tres proteínas se conservan en la levadura *Saccharomyces cereivisae*. *NPA3* (YJR072C) es el gen ortólogo de *GPN1* humana, mientras que *GPN2* (YOR262W) y *GPN3* (YLR243W) mantienen el mismo nombre (Niesser et al., 2016). En arqueas solo existe un miembro, el cual es el ortólogo de *GPN1* humana, mientras que en bacteria no se encontró ninguna proteína GPN (Gras et al., 2007; Niesser et al., 2016). En cuanto su función, en humano y levadura se conoce que participan principalmente en el ensamblaje y la posterior importación nuclear de la RNA polimerasa II (RNAPII), la enzima encargada de la síntesis de todos los RNA mensajeros (RNAm) y de algunos RNA no codificantes (ncRNA) (Boulon et al., 2010; Calera et al., 2011; Carré & Shiekhhattar, 2011; Forget et al., 2010; Liu et al., 2020; Minaker et al., 2013; Staresincic et al., 2011; Zeng et al., 2018). Los tres genes son esenciales en la levadura, por lo tanto, cumplen funciones no redundantes (Giaever et al., 2002).

1.3 GPN1, la primera proteína GPN descubierta, ¿cómo la llamamos: XAB1, MBDin, RPAP4, Epa1 o Npa3?

La GTPasa de bucle GPN 1 (GPN1) se ha identificado por varios nombres. En uno de los primeros trabajos publicados en humanos, los autores describen haber encontrado una GTPasa predominantemente citoplasmática, pero con presencia nuclear que facilitaba la importación al núcleo de la proteína complementaria del grupo A de xeroderma pigmentosa (XPA) involucrada en la reparación del DNA por escisión de nucleótidos, por lo que la llamaron XAB1 (Nitta et al., 2000). Posteriormente, Lembo et al. (2003) identificaron una proteína que

interactuaba con MBD2, por lo que la llamaron *MBDin*. MBD2 reconoce y se une a regiones CpG metiladas del DNA, y actúa como un represor transcripcional o como una desmetilasa. En humanos, una metilación aberrante se ha asociado con varios tipos de enfermedades congénitas y cáncer (Schenkel et al., 2016). En este estudio, encontraron que *MBDin* se une a MBD2 y reactiva la transcripción en genes cuyos promotores fueron metilados, y reprimidos por MBD2 (Lembo et al., 2003). En un trabajo publicado por Jeronimo et al. (2007) se evaluaron los componentes de complejos proteicos solubles de células humanas involucrados en la maquinaria de la transcripción y en el procesamiento del RNA. En este análisis, se identificaron numerosas proteínas no caracterizadas que se asociaban física y funcionalmente con la RNA polimerasa II, entre ellas XAB1, por lo que la renombraron RPAP4.

En la levadura *S. cerevisiae*, también se identificó un ortólogo de GPN1 humana. Entre los primeros trabajos reportados esta proteína se consideró como una ATPasa de función desconocida a la que denominaron Epa1, por su interacción *in vitro* con el complejo cinasa Pcl1-Pho85 (Keniry et al., 2004). Los autores propusieron que Epa1 se asemejaba en secuencia a MinD, una proteína bacteriana involucrada en septación, por lo que sugirieron que tanto el complejo Pcl1-Pho85 como Epa1 participaban en mitosis. Finalmente, Dez et al. (2004) encontraron que la proteína nucleolar Npa1 involucrada en la síntesis de los RNA ribosomales (rRNA) 25S y 5.8S, y por tanto en la biogénesis ribosomal, se asociaba físicamente con múltiples proteínas pertenecientes a complejos ribonucleoproteicos nucleolares pequeños (snoRNPs), entre las cuales destacaron dos proteínas de función desconocida codificadas en los loci YJR041C y YJR072C de *S. cerevisiae*, que se designaron como Npa2 y Npa3, respectivamente. Npa3, a diferencia de Npa2 no se acumulaba en el nucleolo, sino que se concentraba principalmente en el citoplasma, por lo que los autores señalan que Npa3 no participa directamente en la biogénesis ribosomal.

1.4 Npa3, el ortólogo de GPN1 humana en *Saccharomyces cerevisiae*

Como se mencionó anteriormente, la GTPasa de bucle GPN 1 (Npa3) de la levadura *S. cerevisiae* es el ortólogo de GPN1 humana, una enzima altamente

conservada en eucariontes. Forget et al. (2010), mediante ensayos de purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas (AP-MS) encontraron que Npa3 en levadura y GPN1 en humano interactuaban con las subunidades mayores de la RNA polimerasa II (RNAPII), RPB1 y RPB2, proteínas clave para la biogénesis de la RNAPII. En su trabajo señalaron que tanto RPB1 como RPB2 se acumulan en el citoplasma cuando se alteran los niveles de expresión o la integridad de Npa3 y GPN1. Cabe mencionar que, en levadura este fenotipo también se reprodujo en células que expresaban versiones hipomórficas de Npa3 (K16R, D40E, G70A y N72Q) con un fenotipo de lento crecimiento. Por último, también se observó la acumulación citoplasmática de RPB1 y RPB2 en células de levadura y humanas expuestas a altas concentraciones de benomilo, un compuesto que afecta directamente los microtúbulos y que sugiere una función de Npa3 y GPN1 asociada al ensamble o integridad de estas estructuras.

En un segundo estudio, Staresincic et al. (2011) trataron de entender cómo se ensambla y se importa al núcleo la RNAPII. Su trabajo se centró en elucidar la interacción entre Npa3 y la RNAPII, así como en identificar otros posibles interactores. Para esto, se expresó una versión de Npa3 etiquetada en su extremo C-terminal con las secuencias peptídicas de FLAG-TEV₂-Myc₉ en *S. cerevisiae*, posteriormente se inmunoprecipitó, purificó y analizó por espectrometría de masas. Entre las proteínas copurificadas con Npa3 destacaron Rpb1, Rpb2, Rpb3 y Rpb5, subunidades de la RNAPII. Tanto Rpb1 y Rpb3, proteínas analizadas, mostraron una localización exclusivamente nuclear; sin embargo, cuando se afectó la función de Npa3, estas se concentraron en el citoplasma. Por lo anterior, los autores indican que Npa3 es necesaria para la correcta importación nuclear de la RNAPII. No obstante, no pudieron determinar los mecanismos implicados.

Mediante un mecanismo represión/inducción, Alonso et al. (2011) expresaron *NPA3* bajo el control del promotor *GAL10*, reprimible por glucosa e inducible por galactosa. Con este enfoque, trataron de definir la función de Npa3 con base a una regulación controlada de sus niveles de expresión. Entre los primeros hallazgos, notaron una reducción en la tasa de crecimiento y un aumento en el tamaño celular cuando la expresión de *NPA3* se encontraba reprimida. También, la represión de *NPA3* afectaba directamente la progresión del ciclo celular provocando una

acumulación de células en la fase S, que se corregía rápidamente después de adicionar galactosa al medio. Por otra parte, cuando se sobreexpresó a *NPA3* los autores notaron defectos importantes en la segregación de las cromátidas hermanas, donde la célula madre retenía ambas moléculas de DNA.

En trabajos más recientes de Liu et al. (2020), encontraron mediante ensayos de inmunoprecipitación, que Npa3 interactúa físicamente con Gpn3, y que Npa3 coordina los niveles de Gpn3 en la biogénesis de la RNAPII, similar a lo que ocurre en células humanas (Méndez-Hernández et al., 2014). Además, Npa3 interactúa físicamente con Rba50, que cuenta con su ortólogo en humano, Rpap1 (Jeronimo et al., 2004). Rba50, interactúa físicamente con Gpn2, otro miembro de la familia GPN, en la formación del subcomplejo Rpb3 de la RNAPII (Zeng et al., 2018). Por lo anterior, los autores sugieren que Npa3, que se asocia con Rpb2, y Rba50 podrían estar involucrados en la formación del subcomplejo Rpb2 de la RNAPII, aunque señalan que se requiere de mayor evidencia. Asimismo Ma et al. (2022), señalaron que Npa3 se coordina con Rtr1 y Gpn3 para la fusión de los subcomplejos Rpb1 y Rpb2 en la formación del núcleo de la RNAPII, evitando la acumulación citoplasmática de las subunidades de la RNAPII.

1.5 La extensión C-terminal de Npa3, ¿para qué existe en eucariontes?

Nuestro grupo de trabajo se ha especializado en el estudio de la familia de GTPasas de bucle GPN, particularmente de la GPN1 humana, y posteriormente de su ortólogo en levadura Npa3. Reyes-Pardo et al. (2012) caracterizaron en la línea celular humana HEK293T/17 una señal de exportación nuclear (NES), dependiente de la exportina Crm1, localizada en el C-terminal de GPN1 (292-LERLRKDMGSVAL-304). La NES del C-terminal de GPN1 humana se encuentra evolutivamente conservada en diferentes especies, incluido el C-terminal de Npa3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (286-LNGLMKDLGL-295). Ambas señales peptídicas compartían no solo identidad y similitud de secuencia, sino también su naturaleza hidrofóbica; además se ajustan con precisión a la secuencia consenso $\Phi 1-(X)_{2-3}-\Phi 2-(X)_{2-3}-\Phi 3-X-\Phi 4$ descrita para una NES canónica en la literatura (Xu et al., 2010).

Después del descubrimiento de la única NES funcional y suficiente para la exportación nuclear de la GPN1 humana por Crm1, Guerrero-Serrano et al. (2017) generaron una mutante de Npa3 que carecía de los últimos 106 aminoácidos del C-terminal (Δ M280-N385), denominada *npa3 Δ C*, una región que aparte de contener la NES, no tenía funciones anotadas, y se encontraba exclusivamente en los ortólogos de eucariotas, estando ausente en su único ortólogo de arqueas. La delección del C-terminal de Npa3 no afectó la biogénesis ni la localización nuclear de la RNA polimerasa II (RNAPII), ni los niveles de transcritos (mRNAs) dependientes de esta. Lo que se observó fue que la delección del C-terminal condujo a una acumulación nuclear de Npa3, muy posiblemente debido a la eliminación de la señal de exportación nuclear contenida en esta región. De igual modo, también se observó en las células *npa3 Δ C* una acumulación nuclear de la fosfatasa Rtr1, que participa en la transcripción, pero carece de una NES propia. Rtr1 interactúa físicamente con Npa3, por lo que es posible que su transporte entre el núcleo y el citoplasma dependa de la exportación nuclear de Npa3. También, en las células *npa3 Δ C* se detectó un aumento de tamaño, defectos en la progresión del ciclo celular con acumulación de células en anafase media, y un incremento en la sensibilidad a benomilo, esto último, evidenció la participación de Npa3 en la biogénesis y estabilización de los microtúbulos. En conjunto, esta evidencia demostró que la ausencia del C-terminal de Npa3 tenía repercusiones biológicas significativas no documentadas hasta entonces.

Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la función del C-terminal de Npa3, Mora-García et al. (2022) realizaron un ensayo masivo de interacciones genéticas sintéticas entre *npa3 Δ C* y una colección de 4,389 mutantes nulas en genes no esenciales de *S. cerevisiae*. Los resultados fueron reveladores, ya que la mutante *npa3 Δ C* mostró interacciones genéticas negativas principalmente con 15 genes implicados en diversos procesos celulares, como la homeostasis mitocondrial, la síntesis de proteínas, la biogénesis ribosomal, la degradación de proteínas, la transcripción, la progresión del ciclo celular y la reparación del DNA. De este análisis, la interacción más fuerte fue con la mutante *bud27 Δ* , una prefoldina no convencional involucrada principalmente en transcripción. La combinación de la

mutante *npa3ΔC* con las mutantes no esenciales, y especialmente con *bud27Δ*, resaltó la importancia del C-terminal para la función de Npa3 en la célula.

Además del ensamblaje y la translocación nuclear de la RNAPII, el ensayo de interacciones genéticas negativas abrió la posibilidad de evaluar la función de Npa3 en otros procesos celulares, como la traducción. En este contexto, Félix-Pérez et al. (2024) encontraron que las células *npa3ΔC* son más sensibles a los inhibidores de la traducción higromicina B y geneticina, lo que sugiere una participación de Npa3 en la traducción. Esta idea se relaciona estrechamente con la interacción genética negativa descrita entre *npa3ΔC* y *bud27Δ* debido a la función misma de Bud27, ya que previamente se reportó que Bud27 participa en el inicio de la traducción y que las células *bud27Δ* son sensibles a la higromicina B (Deplazes et al., 2009), aunque esta sensibilidad puede ser revertida por la sobreexpresión del factor de inicio de la traducción eIF1A (*TIF11*). De manera interesante, el crecimiento de las células *npa3ΔC* en presencia de higromicina B también puede ser rescatado por la sobreexpresión de *TIF11*, lo que sugiere que Npa3 y Bud27 podrían coparticipar en el inicio de la síntesis de proteínas.

1.6 Bud27 una proteína de andamiaje no convencional

Bud27 en la levadura *S. cerevisiae* es el ortólogo de la proteína humana URI (Prefoldina no convencional interactora con Rpb5), ambos son miembros de una familia de chaperonas moleculares independientes de ATP denominadas prefoldinas (PFD) (Martínez-Fernández et al., 2018). Bud27/URI funcionan como proteínas de andamiaje y ayudan a ensamblar otros miembros de la familia PFD (Gstaiger et al., 2003).

Bud27/URI poseen varios dominios estructurales: el dominio PFD, la caja URI, una región ácida y un dominio de unión a Rpb5 (Martínez-Fernández et al., 2018; Vernekar & Bhargava, 2015). En la levadura, el dominio PFD es esencial para la interacción de los componentes del módulo semejante a prefoldina (Mita et al., 2013). La caja URI no tiene una función definida, aunque se sugiere que participa en la transcripción (Martínez-Fernández et al., 2018). La región ácida interactúa con eIF1a (*TIF11*) y se ha demostrado que participa en el reclutamiento del complejo

ternario en el inicio de la traducción y en la maquinaria de control de calidad cotraduccional (Deplazes et al., 2009). Por último, el dominio de unión a Rpb5 es crítico para la interacción de Bud27 con Rpb5, una subunidad común de las tres RNA polimerasas (RNAPs), y junto con Rpb5 media el ensamblaje citoplasmático de las tres RNAPs previo a su translocación nuclear (Mirón-García et al., 2013). También, Bud27 posee una señal de exportación nuclear (NES) (686-LRDEIRDFQL-695) y una señal de importación nuclear (NLS) (562-RSSKSMKKKFDPKILENISDDDDYDDDDDGNNKLL-595), aunque su localización es predominantemente citoplasmática (Mirón-García et al., 2013).

Adicionalmente, Bud27/URI participan en la regulación génica dependiente de la vía TOR en respuesta a estrés nutricional (Gstaiger et al., 2003). Bud27 modula la elongación del mRNA naciente sintetizado por la RNAPII (Mirón-García et al., 2014), así como la transcripción mediada por la RNAPI y RNAPIII, y el procesamiento del rRNA (Martínez-Fernández et al., 2020). De igual modo, se han propuesto funciones de Bud27 en la reparación del DNA (Muñoz-Galván et al., 2013) y el remodelamiento de la cromatina (Mirón-García et al., 2014).

1.7 La función independiente de la estructura: proteínas intrínsecamente desordenadas

Actualmente, se dispone de las secuencias de un gran número de proteínas, pero un alto porcentaje carece de una función anotada. Para llenar estos vacíos, se emplean herramientas bioinformáticas que permiten asignarles una función teórica o hipotética a partir del análisis de sus secuencias. Por ejemplo, la detección de homología permite transferir información desde las proteínas bien caracterizadas a aquellas con secuencias similares que no cuentan con una función anotada (van der Lee et al., 2014). Parámetros tan sencillos como un 25% o más de identidad entre dos secuencias permiten establecer una homología entre ellas (Jones et al., 1992). No obstante, hasta hoy, no está claro cómo evolucionan, de modo que se modifican sus secuencias sin alterar su función (Brown et al., 2010). El enfoque primario para entender estos fenómenos se centraba en el estudio del código genético, lo que permitía rastrear los cambios en el DNA. Un segundo enfoque, más

práctico, se fundamentó en las características físicas de los aminoácidos y en cómo interactuaban entre sí (Kosiol et al., 2007).

Tradicionalmente, la función de una proteína dependía directamente de su plegamiento y estructura tridimensional; la secuencia primaria de la proteína definía su estructura, que, a su vez, definía la función. Curiosamente, esta función dependiente de la estructura se conserva incluso entre proteínas con secuencias que han divergido considerablemente. Por lo tanto, la similitud estructural también permite rastrear la evolución de las proteínas, incluso en aquellas donde la homología de secuencia no es fácilmente detectable (van der Lee et al., 2014).

Existen proteínas completas o parciales, es decir, con dominios funcionales, que no se ajustan a una estructura tridimensional definida, y cuya secuencia primaria ha evolucionado hasta el grado de no detectarse homología. Estas proteínas o dominios se conocen como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) y regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs), en estos casos los métodos de caracterización basados en homología no funcionan (Figura 3) (Brown et al., 2010). Las IDPs/IDRs son más abundantes en los proteomas de organismos eucariontes (~30%) que en arqueas (~2%) y procariontes (~4.2%), probablemente por el aumento de la regulación y señalización celular, ya que se relacionan con los procesos de transducción de señales, expresión génica, control del ciclo celular y reconocimiento molecular (Mohan et al., 2006; Ward et al., 2004).

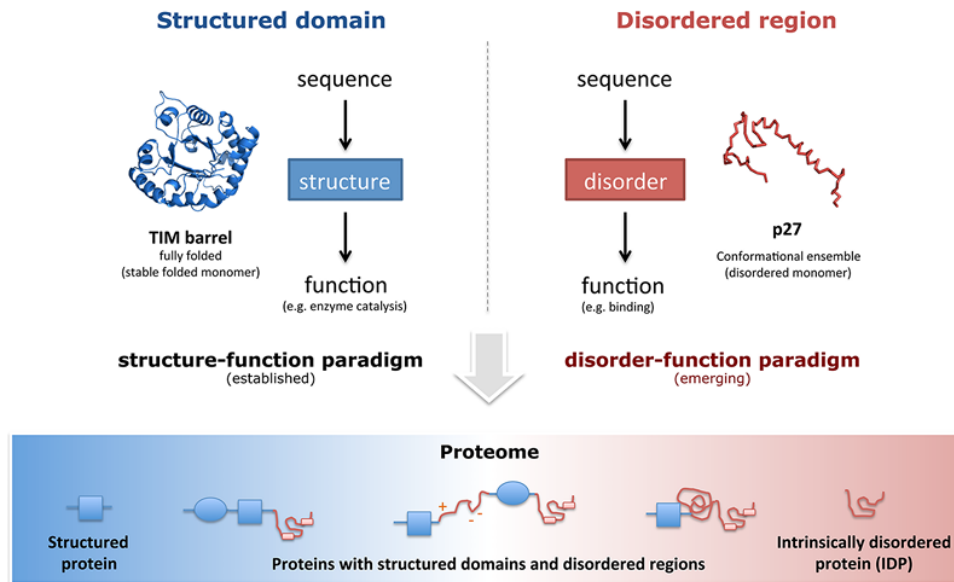


Figura 3. Bloques que conforman las proteínas: dominios estructurados y regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs). La interacción sinérgica entre los dominios estructurados y regiones desordenadas potencia la funcionalidad y versatilidad de las proteínas. Figura tomada de van der Lee et al. (2014).

Bioquímicamente, las IDPs/IDRs tienen una composición pobre en aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, y una proporción relativamente alta de residuos cargados y polares (Dyson, 2016). Esta proporción tan baja de aminoácidos hidrofóbicos impide la formación de núcleos bien organizados, como ocurre en las proteínas con una estructura tridimensional definida o bien estructurada. De igual modo, presentan una carga neta alta y una baja hidropatía (Uversky et al., 2000).

Al no poseer una estructura conformacional definida, el desorden desempeña un papel importante en la función de las IDPs/IDRs, pues les permite establecer interacciones dinámicas y específicas, con la capacidad de unirse a sus blancos en múltiples conformaciones, así como reconocer secuencias en función de su plegamiento (Mohan et al., 2006). Algunas de estas interacciones van a realizarlas mediante secuencias cortas llamadas MoRFs, o motivos con función de reconocimiento molecular. Los MoRFs son regiones pequeñas dentro de las IDPs/IDRs que transicionan generalmente de forma temporal del desorden al orden en estructuras secundarias hélices- α (α -MoRFs), hojas- β (β -MoRFs), espiral (γ -

MoRFs) o combinaciones de estas (complex–MoRFs); esto último depende de su interactor blanco (Disfani et al., 2012).

Por último, las IDPs/IDRs también permiten otro tipo de regulación más extensa, como modificaciones postraduccionales (PTMs). Por ejemplo, la fosforilación que al adicionar una carga negativa superficial puede inducir cambios conformacionales, que promuevan un mayor o menor orden en la proteína/región intrínsecamente desordenada (Shamilov & Aneskievich, 2019).

1.8 La fosforilación, la modificación postraducciona favorita del desorden

Después de ser sintetizadas, muchas proteínas sufren modificaciones químicas que amplían su espectro funcional. Estas modificaciones, que regulan su actividad, se conocen como modificaciones postraduccionales (PTMs). Las PTMs ocurren tanto en proteínas/regiones estructuradas como en proteínas/regiones intrínsecamente desordenadas (IDPs/IDRs). En las proteínas/regiones estructuradas su función principal consiste en facilitar la catálisis, modificar la actividad enzimática o estabilizar su estructura. En cambio, en las IDPs/IDRs, estas modificaciones son débiles (baja afinidad), precisas (alta especificidad) y dinámicas (reversibles y transitorias), lo que implica que actúan principalmente como mecanismos de regulación y señalización celular (Xie et al., 2007).

La fosforilación es la PTM más común en las células eucariotas (Khoury et al., 2011). Se estima que al menos un tercio de todas las proteínas son fosforiladas, y muchos de estos eventos de fosforilación ocurren en las IDPs/IDRs (Bah & Forman-Kay, 2016). Para que ocurra la fosforilación, debe activarse toda una compleja maquinaria que involucra, además de la proteína blanco, a otras proteínas como cinasas, que transfieren el grupo fosfato a un aminoácido específico de la proteína blanco; fosfatasas, que eliminan el grupo fosfato añadido; y dominios de interacción por fosforilación que reconocen y se unen a la proteína fosforilada, cada etapa con consecuencias biológicas particulares. Cabe destacar, que muchos eventos de fosforilación no ocurren de manera independiente sino en grupos dentro (Carmona-Rosas et al., 2019; Hay & Meek, 2000; Holt et al., 2009; Iakoucheva, 2004; Inagaki et al., 2015; Schweiger & Linial, 2010). En la célula, la fosforilación de

proteínas está asociada con procesos como la transducción de señales, la regulación génica mediada por factores de transcripción, eventos de corte y empalme alternativo (splicing), síntesis de proteínas, crecimiento y diferenciación celular (Bah & Forman-Kay, 2016; Iakouchcheva, 2004). Pero particularmente en las IDPs/IDRs, la fosforilación se relaciona sobre todo con cambios conformacionales, que pueden ser locales, como la estabilización o desestabilización de estructuras secundarias, o globales, al inducir la transición reversible entre estados desordenados y ordenados de toda la proteína. Asimismo, la fosforilación puede promover o impedir las interacciones proteína-proteína, o modular la compactación de la proteína al alterar su carga neta (Bah & Forman-Kay, 2016; Johnson & Lewis, 2001).

En este punto, cabe señalar, con base en estudios globales de proteómica que Npa3 se fosforila en trece residuos a lo largo de la proteína. Dos de estas fosforilaciones ocurren en su dominio GTPasa N-terminal (Thr32 y Tyr35), y las once restantes en su dominio C-terminal (Ser285, Ser300, Ser304, Ser308, Ser313, Thr337, Ser352, Thr370, Ser372, Ser373 y Ser375). Al momento de realizar este estudio y trabajo experimental, solo se habían reportado ocho fosforilaciones en el C-terminal, las cuales se describen en la Tabla 1 y constituyeron el objeto de este estudio.

Tabla 1. Residuos fosforilados localizados en el C-terminal de Npa3.

Residuo	Condición	Referencia
Ser285	Fase G1, Fase S y Fase G2/M	(Lanz et al., 2021)
	Anafase	(Zhou et al., 2021)
Ser304	Teórico	(Lanz et al., 2021)
	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)
	Fase logarítmica (OD _{600nm} ~1)	(Swaney et al., 2013)
	Mitosis	(Holt et al., 2009)
	Daño genotóxico por metilmetanosulfonato	(Albuquerque et al., 2008)
Ser308	Fase G2/M	(Lanz et al., 2021)
	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)
	Fase logarítmica (OD _{600nm} ~1)	(Swaney et al., 2013)
	Mitosis	(Holt et al., 2009)
Ser313	Fase G1, Fase S y Fase G2/M	(Lanz et al., 2021)
	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)
	Fase logarítmica (OD _{600nm} ~1)	(Swaney et al., 2013)
	Células asincrónicas, Mitosis y Mitosis tardía	(Holt et al., 2009)
	Daño genotóxico por metilmetanosulfonato	(Albuquerque et al., 2008)
Thr337	Fase G1, Fase S y Fase G2/M	(Lanz et al., 2021)
	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)
	Daño genotóxico por metilmetanosulfonato	(Albuquerque et al., 2008)
Ser352	Fase G1, Fase S y Fase G2/M	(Lanz et al., 2021)
	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)
	Estrés del retículo endoplásmico por DTT	(MacGilvray et al., 2020)
	Fase logarítmica (OD _{600nm} ~1)	(Swaney et al., 2013)
	Fase logarítmica (OD _{600nm} ~1) y rapamicina	(Soulard et al., 2010)
	Mitosis tardía	(Holt et al., 2009)
Ser372	Daño genotóxico por metilmetanosulfonato	(Albuquerque et al., 2008)
	Fase G1	(Lanz et al., 2021)
	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)
	Estrés del retículo endoplásmico por DTT	(MacGilvray et al., 2020)
	Fase logarítmica (OD _{600nm} ~1)	(Swaney et al., 2013)
Ser373	Daño genotóxico por metilmetanosulfonato	(Albuquerque et al., 2008)
	Fase G1	(Lanz et al., 2021)
Ser373	Anafase y metafase	(Zhou et al., 2021)

2. Hipótesis

La función de la GTPasa de bucle GPN Npa3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se regula por la fosforilación en uno o múltiples residuos de su dominio carboxilo-terminal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Comprender la importancia funcional del dominio carboxilo-terminal de la GTPasa de bucle GPN Npa3 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar análisis *in silico* para obtener información relevante de la estructura y la conformación del extremo carboxilo terminal de la proteína Npa3 y su ortólogo en humano GPN1.
2. Generar cepas que expresen únicamente versiones mutantes no fosforilables de Npa3 (*npa3-NPs*) en residuos reportados experimentalmente como fosforilados.
3. Evaluar el crecimiento de las cepas que expresen las versiones mutantes *npa3-NP* o la versión silvestre de Npa3 en ausencia y en presencia de los inhibidores de la traducción higromicina B o cicloheximida.
4. Evaluar la morfología de las cepas que expresen las versiones mutantes *npa3-NP* o la versión silvestre de Npa3.
5. Evaluar la localización subcelular de las versiones mutantes *npa3-NP* y la versión silvestre de Npa3 en células de levadura vivas.

4. Materiales y métodos

4.1 Cepas y plásmidos

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 2. Todas las cepas de *S. cerevisiae* se generaron a partir de la cepa BY4741, en la cual se eliminaron, por diseño, los genes marcadores utilizados en los plásmidos de trabajo (Baker Brachmann et al., 1998). Para la transformación de levadura todos los plásmidos empleados se describen en la Tabla 3, que incluye la descripción genotípica, los genes subclonados de interés y las mutaciones introducidas.

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0</i>	(Baker Brachmann et al., 1998)
BYMG48 <i>bud27Δ</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, bud27Δ::kanMX4</i>	Colección del laboratorio
BYMG57 NPA3 <i>npa3ΔC</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pMA01, pMG7</i>	(Mora-García et al., 2022)
BYMO3 NPA3	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pGL24</i>	Este trabajo
BYMO8 NPA3	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pGL24</i>	Este trabajo
BYMO15 <i>npa3-NP2</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pOV4</i>	Este trabajo
BYMO16 <i>npa3-NP3</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pOV5</i>	Este trabajo
BYMO17 <i>npa3-NP2</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV4</i>	Este trabajo
BYMO18 <i>npa3-NP3</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV5</i>	Este trabajo
BYMO27 <i>npa3-NP4</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV6</i>	Este trabajo
BYMO28 <i>npa3-NP5</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV7</i>	Este trabajo
BYMO35 <i>npa3-NP1</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pOV8</i>	Este trabajo

BYMO36 <i>npa3-NP1</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV8</i>	Este trabajo
BYMO46 <i>npa3-NP6</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV9</i>	Este trabajo
BYMO47 <i>npa3-NP7</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV10</i>	Este trabajo
BYMO49 <i>npa3-NP9</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV12</i>	Este trabajo
BYMO50 <i>npa3-NP10</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV13</i>	Este trabajo
BYMO51 <i>npa3-NP11</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV14</i>	Este trabajo
BYMO67 <i>NPA3</i> <i>NPA3-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pGL24, pMO1</i>	Este trabajo
BYMO68 <i>NPA3</i> <i>npa3-NP1-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pGL24, pMO2</i>	Este trabajo
BYMO69 <i>NPA3</i> <i>npa3-NP2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pGL24, pMO3</i>	Este trabajo
BYMO82 <i>NPA3</i> <i>npa3-NP11-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pGL24, pMO7</i>	Este trabajo
BYMO88 <i>NPA3</i> <i>npa3-NP15</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pMAO1, pOV18</i>	Este trabajo
BYMO117 <i>npa3-NP15</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV18</i>	Este trabajo
BYMO118 <i>npa3-NP16</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV19</i>	Este trabajo
BYMO119 <i>npa3-NP17</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV20</i>	Este trabajo
BYMO107 <i>npa3-NP2</i> <i>pRS313</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV4, pRS313</i>	Este trabajo
BYMO108 <i>npa3-NP2</i> <i>NPA3</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, pOV4, pMJ4</i>	Este trabajo
BYMO147 <i>NPA3</i> <i>RPB2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, RPB2-GFP::HIS3, pGL24, pTF52</i>	Este trabajo

BYMO148 <i>npa3-NP2</i> <i>RPB2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, RPB2-GFP::HIS3, pOV4, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO156 <i>NPA3</i> <i>RPA190-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, RPA190-GFP::HIS3, pGL24, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO157 <i>npa3-NP2</i> <i>RPA190-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, RPA190-GFP::HIS3, pOV4, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO159 <i>NPA3</i> <i>RPO31-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, RPO31-GFP::HIS3, pGL24, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO160 <i>npa3-NP2</i> <i>RPO31-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, bud27Δ::kanMX4, RPO31-GFP::HIS3, pOV4, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO173 <i>NPA3-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pMO1</i>	Este trabajo
BYMO174 <i>npa3-NP1-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pMO2</i>	Este trabajo
BYMO175 <i>npa3-NP2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pMO3</i>	Este trabajo
BYMO178 <i>npa3-NP3-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, pMO6</i>	Este trabajo
BYMO199 <i>NPA3</i> <i>RPA190-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, RPA190-GFP::HIS3, pGL24, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO200 <i>npa3-NP2</i> <i>RPA190-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, RPA190-GFP::HIS3, pOV4, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO201 <i>NPA3</i> <i>RPB2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, RPB2-GFP::HIS3, pGL24, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO202 <i>npa3-NP2</i> <i>RPB2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, RPB2-GFP::HIS3, pOV4, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO203 <i>NPA3</i> <i>RPO31-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, RPO31-GFP::HIS3, pGL24, pTF52</i>	Este trabajo
BYMO204 <i>npa3-NP2</i> <i>RPO31-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, met15Δ0, npa3Δ::natMX4, RPO31-GFP::HIS3, pOV4, pTF52</i>	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos.

Plásmido	Descripción	Referencia
pRS315	Vector de clonación replicativo <i>LEU2</i> , Ap ^R <i>CEN/ARS</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)
pGL24	pRS315/ <i>NPA3</i>	Colección del laboratorio
pMG7	pRS315/ <i>npa3</i> Δ C Δ M280-N385	(Mora-García et al., 2022)
pOV4	pRS315/ <i>npa3-NP2</i> S285A, S304A, S308A, S313A	Este trabajo
pOV5	pRS315/ <i>npa3-NP3</i> T337A, S352A, S372A, S373A	Este trabajo
pOV6	pRS315/ <i>npa3-NP4</i> S285A, S304A	Este trabajo
pOV7	pRS315/ <i>npa3-NP5</i> S308A, S313A	Este trabajo
pOV8	pRS315/ <i>npa3-NP1</i> S285A, S304A, S308A, S313A, T337A, S352A, S372A, S373A	Este trabajo
pOV9	pRS315/ <i>npa3-NP6</i> S304A, S308A	Este trabajo
pOV10	pRS315/ <i>npa3-NP7</i> S285D, S304D, S308D, S313D	Este trabajo
pOV12	pRS315/ <i>npa3-NP9</i> S308A	Este trabajo
pOV13	pRS315/ <i>npa3-NP10</i> S313A	Este trabajo
pOV14	pRS315/ <i>npa3-NP11</i> S304A, S308A, S313A	Este trabajo
pOV18	pRS315/ <i>npa3-NP15</i> Npa3 ^{M1-E279} - <i>hsGPN1</i> ^{E263-K374}	Este trabajo
pOV19	pRS315/ <i>npa3-NP16</i> S285A	Este trabajo
pOV20	pRS315/ <i>npa3-NP17</i> S304A	Este trabajo
pRS416	Vector de clonación replicativo <i>URA3</i> , Ap ^R <i>CEN/ARS</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)
pMA01	pRS416/ <i>NPA3</i>	(Mora-García et al., 2022)
pMO1	pRS416/ <i>NPA3</i> -GFP	Este trabajo
pMO2	pRS416/ <i>npa3-NP1</i> -GFP S285A, S304A, S308A, S313A, T337A, S352A, S372A, S373A	Este trabajo

pMO3	pRS416/ <i>npa3-NP2</i> -GFP S285A, S304A, S308A, S313A	Este trabajo
pMO6	pRS416/ <i>npa3-NP3</i> -GFP T337A, S352A, S372A, S373A	Este trabajo
pMO7	pRS416/ <i>npa3-NP11</i> -GFP S304A, S308A, S313A	Este trabajo
pTF52	pRS416/ <i>NUP2</i> -mCherry	(Félix-Pérez et al., 2024)
pRS313	Vector de clonación replicativo <i>HIS3</i> , Ap ^R , <i>CEN/ARS</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)
pMJ4	pRS313/ <i>NPA3</i>	Este trabajo

4.2 Clonación génica y generación de plásmidos mediante gBlocks

Las secuencias de DNA de las mutantes no fosforilables de *NPA3* (*npa3-NPs*) se diseñaron con base en las secuencias depositadas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y posteriormente se sintetizaron como gBlocks (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Los números de acceso fueron: *NPA3* (NM_001181730.3) y *GPN1* (NM_007266.4). Todos los gBlocks incluían las regiones promotora y terminadora endógenas de *NPA3*, flanqueadas por los sitios de restricción de *HindIII* (5'-AAGCTT-3') (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) y *XhoI* (5'-CTCGAG-3') (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), respectivamente. Los gBlocks se digirieron y clonaron en el vector de clonación replicativo de levadura pRS315 utilizando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Para generar las mutantes *npa3-NPs*, los ocho residuos reportados como fosforilados en la región del dominio C-terminal de Npa3 (*YJR072C*) se obtuvieron de la base de datos de levadura *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>), y posteriormente sus codones nativos fueron reemplazados por codones de alanina, como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Residuos fosforilados y codones utilizados para generar las mutantes no fosforilables (*npa3-NPs*).

Posición	Aminoácido/ Codón nativo	Aminoácido/ Codón mutado
285	Ser – TCA	Ala – GCA
304	Ser – AGC	Ala – GCC
308	Ser – AGC	Ala – GCC
313	Ser – AGC	Ala – GCC
337	Thr – ACG	Ala – GCG
352	Ser – TCT	Ala – GCT
372	Ser – AGT	Ala – GCT
373	Ser – AGC	Ala – GCC

Además de las mutantes *npa3-NPs*, se generó una mutante fosfomimética, en la cual los codones nativos se reemplazaron por el codón GAT que codifica para ácido aspártico. Y se realizó una complementación heteróloga del C-terminal de Npa3 con el C-terminal de GPN1 humana a la que denominamos *npa3-NP15*. En esta última, los residuos E263-K374 del C-terminal de GPN1 se fusionaron con los residuos M1-E279 del N-terminal de Npa3 de levadura, que corresponden a una versión hipomórfica de Npa3 (*npa3ΔC*), que como ya se mencionó ha sido estudiada en nuestro grupo de trabajo. Para una correcta complementación heteróloga, los codones de arginina del C-terminal de GPN1 humana se optimizaron por codones de uso frecuente en levadura, con base en el sitio GenScript® (<https://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table>), como se detalla a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Codones que codifican arginina en GPN1 humana que se intercambiaron por codones de arginina de uso frecuente en la levadura *S. cerevisiae*.

Posición	Codón nativo Humano	Codón de S.c.
294	Arg – CGC	Arg – AGA
296	Arg – CGA	Arg – AGA
326	Arg – CGA	Arg – AGA

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se clonaron y purificaron de *Escherichia coli* utilizando Qiagen® Plasmid Kit QIAprep, y se confirmaron por secuenciación y complementación funcional en levadura.

4.3 Análisis estructural *in silico* de proteínas

Las secuencias de Npa3 (P47122), Gpn2 (Q08726) y Gpn3 (Q06543) de levadura, y GPN1 humana (Q9HCN4) se descargaron de la base de datos de proteínas UniProt database (<http://www.uniprot.org/>). Para los análisis bioinformáticos se utilizó la secuencia parcial o completa de las proteínas. La predicción de desorden con el algoritmo VSL2 y de Carga-Hidropatía se realizaron con el servidor PONDR® (<http://www.pondr.com/>) (Xue et al., 2010). Las diferencias en el perfil de aminoácidos por grado de inducción de desorden se determinaron con Composition-Profiler® (<http://www.cprofiler.org/>) (Vacic et al., 2007), y la clasificación de aminoácidos por tipo se estableció con base en lo reportado por Tossavainen et al. (2020). Finalmente, los motivos con función de reconocimiento molecular (MoRFs) se calcularon y predijeron utilizando MoRFPred® (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/MoRFPred/>) (Disfani et al., 2012).

4.4 Alineamiento de proteínas

Para los alineamientos de proteínas, las secuencias peptídicas de Npa3 (P47122) de *Saccharomyces cerevisiae* y sus ortólogos en otras levaduras, se obtuvieron de la base de datos UniProt database (<http://www.uniprot.org/>), y se alinearon con la herramienta web Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Los números de acceso fueron: *Saccharomyces douglasii* (A0A8B8UUD8), *Saccharomyces kudriavzevii* (J4TT29), *Saccharomyces castellii* (G0VHC9), *Nakaseomyces glabratus* (Q6FNF1), *Kluyveromyces polysporus* (A7TE22), *Candida mogii* (C5DZ80), *Kluyveromyces thermotolerans* (C5DDM9), *Candida sphaerica* (Q6CV79), *Candida kefyr* (W0TB83), y *Ashbya gossypii* (Q753Q6).

4.5 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Todas las cepas de levadura se crecieron a 30 °C por 3 días hasta saturación en medio YPD o medio sintético completo (SCM). El medio YPD contenía extracto de levadura 10 g·L⁻¹, peptona 20 g·L⁻¹, y se suplementó con glucosa 2%. El SCM contenía base nitrogenada de levadura (YNB) 1.7 g·L⁻¹, sin aminoácidos ni sulfato de amonio, glutamato monosódico (MSG) 1 g·L⁻¹, y mezcla completa de aminoácidos 2 g·L⁻¹, que se ajustó de acuerdo con la auxotrofia de cada cepa cuando se requirió, y se suplementó con glucosa 2%. Para producir medio sólido se adicionó agar 2%. Así mismo, cuando se indica, el SCM se suplementó con nourseotricina 100 µg·mL⁻¹ (GoldBio, St. Louis, MO, USA) o geneticina (G418) 200 µg·mL⁻¹ (GoldBio, St. Louis, MO, USA).

4.6 Transformación de levadura

Todas las transformaciones de levadura con plásmido superenrollado se realizaron por el método de LiAc/ssDNA/PEG descrito por Castaño et al. (2003).

4.7 Ensayos de susceptibilidad a inhibidores de la traducción

Para evaluar el efecto de los inhibidores de la traducción higromicina B y cicloheximida en la proliferación de las cepas que expresan las mutantes no fosforilables de Npa3 (*npa3-NPs*) se realizaron ensayos de crecimiento por puntos en diluciones seriadas en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores. Los cultivos saturados se ajustaron a una OD_{600nm} de 1 en agua destilada, y se diluyeron en serie con base 10, para luego crecerlos en placas de YPD suplementadas con higromicina B (GoldBio, St. Louis, MO, USA) o cicloheximida (GoldBio, St. Louis, MO, USA) en las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron a 30 °C y el crecimiento se documentó a las 72 horas. Cada experimento se realizó por triplicado ($n = 3$).

4.8 Estudio de complementación heteróloga mediante ensayo de pérdida de plásmido

Para comprender mejor la importancia funcional del C-terminal de Npa3 y su omnipresencia en sus ortólogos de eucariotas, decidimos evaluar la complementación heteróloga del C-terminal de GPN1 humana fusionada con el N-terminal de la versión hipomórfica de Npa3 (*npa3 Δ C*) que carece de su C-terminal nativo. Con este fin, reevaluamos la fuerte interacción negativa descrita por Mora-García et al. (2022) entre las mutantes *npa3 Δ C* y *bud27 Δ* . Brevemente, las cepas de levadura se crecieron en SCM carente de leucina a 30 °C, y se realizaron tres pases en medio fresco, uno cada 24 horas, al final de los cuales los cultivos se dejaron crecer hasta saturación, y posteriormente se diluyeron 10,000 veces para platear aproximadamente 250 células por cepa en las placas con SCM sin leucina y SCM con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (GoldBio, St. Louis, MO, USA). Las placas se incubaron a 30 °C y el crecimiento se registró a las 72 horas. Este experimento se repitió en tres ocasiones ($n = 3$). El SCM suplementado con 5-FOA también se preparó con YNB 1.7 g·L⁻¹, mezcla completa de aminoácidos 2 g·L⁻¹, 5-FOA 1 g·L⁻¹, y sulfato de amonio 5 g·L⁻¹ en sustitución del glutamato monosódico, además se adicionó agar 2%.

4.9 Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para verificar el resultado obtenido por la complementación heteróloga de la cepa *npa3 Δ C* fusionada con el C-terminal de GPN1 humana (*npa3-NP15*), se buscó descartar la aparición no deseada de una cepa revertiente espontánea originada por un evento de recombinación entre el casete de *NAT* en el genoma y la copia silvestre de *NPA3* en el plásmido de mantenimiento pRS416-*URA3*. Para evaluarlo, se realizó un análisis de PCR punto final en el cual se amplificaron las regiones río arriba (región 5') y río abajo (región 3') del locus de *NPA3* en el cromosoma de la cepa *npa3 Δ /bud27 Δ* , para confirmar la presencia del casete de *npa3 Δ ::natMX4*. El DNA genómico de la cepa parental y de tres colonias aisladas de manera independiente del ensayo de pérdida de plásmido se utilizó como DNA molde. La

cepa parental llevaba, además del plásmido de mantenimiento *NPA3-URA3*, el plásmido pRS315-*LEU2* con *npa3-NP15*. Las reacciones de PCR se hicieron con la enzima comercial iProof™ High-Fidelity PCR kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA), y las condiciones de amplificación se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR fueron el #124 (5'-CAGTATCATCCAAAGTAGTAGAC-3') y el #125 (5'-GTATGAGAGGTATTCCAGGGAGC-3'), previamente reportados por Mora-García et al. (2022), junto con los oligonucleótidos #44 (5'-CACATGCATCGTTGGTTTCTGT-3') y #45 (5'-CTCAGTCTGAACATGGCTCTG-3'), que se añadieron en las combinaciones #44/#124 y #123/#45 correspondientes a las regiones 5' (1388 pb) y 3' (1266 pb), respectivamente. El producto de PCR se analizó por electroforesis de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

4.10 Análisis de Western blot

Los ensayos de Western blot para comparar los niveles de proteína entre Npa3-GFP y Npa3-NPs-GFP se realizaron como se describió en el trabajo de Félix-Pérez et al. (2024). Brevemente, las células se crecieron hasta alcanzar la fase logarítmica ($OD_{600nm} \sim 0.8$) en medio YPD, se recolectaron y se lisaron mediante el método de lisis alcalina, para después separar las proteínas en los extractos crudos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con SDS (SDS-PAGE). Para la detección se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a una dilución 1:1000, así como un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una dilución 1:5000. La tubulina se utilizó como control de carga, representativo del total de proteína cargada.

4.11 Microscopía y adquisición de imágenes

Los análisis de imagen de las cepas de *S. cerevisiae* que expresaban proteínas fluorescentes se realizaron como se indica a continuación. Los cultivos saturados se diluyeron y se crecieron en SCM hasta alcanzar la fase logarítmica ($OD_{600nm} \sim 0.6$

a 0.8). Posteriormente, las células vivas se recolectaron por centrifugación y se examinaron utilizando el microscopio Zeiss Axio Imager M2® (Cincinnati, OH, USA). Para la captura de imágenes se empleó el software ZEN 2012 Blue Edition® (Cincinnati, OH, USA). Para la detección de fluorescencia se utilizó una longitud de onda de excitación de 495 nm para la proteína verde fluorescente (GFP) y, cuando se requirió, otra de 558 nm para la proteína roja fluorescente (RFP, mCherry). Para el procesamiento de las imágenes se empleó el software Adobe Photoshop®, y únicamente se realizaron ajustes de brillo y contraste para mejorar la claridad.

5. Resultados

5.1 Los dominios C-terminal de Npa3 de *S. cerevisiae* y GPN1 humana se predicen como regiones intrínsecamente desordenadas con tres MoRFs cada una.

En el pasado, se intentó determinar la estructura tridimensional de Npa3 por difracción de rayos X; sin embargo, todos los esfuerzos para cristalizar la proteína fracasaron. No fue hasta que un grupo alemán removi6 su C-terminal (residuos 204-210 y 265-385) que la proteína parcial pudo cristalizar y se determin6 su estructura, aunque solo del dominio de GTPasa N-terminal (Niesser et al., 2016). La remoci6n de estos residuos no es menor, ya que constituyen el 33.25% de la proteína, localizados en el C-terminal, que hasta hoy no tiene una funci6n claramente anotada. Por lo anterior, el primer objetivo de este trabajo fue caracterizar los dominios C-terminal de Npa3 de levadura y su ort6logo en humano GPN1 mediante el uso de herramientas bioinformáticas para obtener mayor informaci6n sobre su estructura y ordenamiento.

Utilizando el servidor PONDR® (Xue et al., 2010), analizamos el grado de desorden en ambas proteínas y determinamos que los dominios de GTPasa N-terminal en Npa3 y GPN1 son altamente estructurados, mientras que sus regiones C-terminal se predicen como intrínsecamente desordenadas (IDRs). El dominio C-terminal desordenado de Npa3 se extiende desde el residuo D253 hasta N385, mientras que en GPN1 comprende del residuo E263 hasta K374 (Figura 4A). A partir de este resultado, los análisis siguientes se centraron en caracterizar los dominios C-terminal intrínsecamente desordenados de Npa3 y GPN1.

Mediante la herramienta web Composition Profiler® (Vacic et al., 2007) se evalu6 el perfil de aminoácidos de las secuencias proteicas de los C-terminal de Npa3 y GPN1, y se compar6 contra las bases de datos DisProt 3.4 (Sickmeier et al., 2007) y SwissProt51 (Bairoch, 2004). La primera base de datos contiene los perfiles validados del conjunto de proteínas desordenadas anotadas, y la segunda, los perfiles de todo el conjunto de proteínas anotadas en la naturaleza. Los aminoácidos se clasificaron de acuerdo con su potencial para promover el desorden, del menor

al mayor. Ambos C-terminal son ricos en ácido glutámico y ácido aspártico, que promueven el desorden; sin embargo, únicamente Npa3 está enriquecido en lisina, un aminoácido con carga positiva que también se considera promotor del desorden (Dunker et al., 2001; Uversky, 2013) (Figura 4B).

La carga media neta y la hidropatía media son otras de las características comúnmente utilizadas para evaluar el desorden de una proteína, ya que contrastan fuertemente con los valores obtenidos en proteínas estructuradas (Dunker et al., 2001; Uversky, 2002; Uversky et al., 2000). Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDRs) son ricas en aminoácidos cargados, predominantemente negativos, y presentan una baja prevalencia de aminoácidos hidrofóbicos. Esta composición da como resultado una carga media alta y una baja hidrofobicidad (Uversky et al., 2000). De igual forma, los extremos C-terminal de Npa3 y Gpn1 están enriquecidos en aminoácidos cargados y empobrecidos en aminoácidos hidrofóbicos (Figura 4C, 4E). Cabe resaltar que, a pesar de que la secuencia primaria de ambas proteínas difiere significativamente, su composición de aminoácidos por tipo está bastante conservada (Figura 4E).

Para evaluar más a fondo, nos preguntamos si los perfiles de desorden son exclusivos de los C-terminal de Npa3 y su ortólogo en humano GPN1, o si esta característica es predominante en toda la familia de GTPasas de bucle GPN. Para esto, se llevó a cabo el análisis de desorden de Gpn2 y Gpn3 de levadura, que mostraron solo una pequeña fracción de sus C-terminal como intrínsecamente desordenadas, específicamente del residuo D295 a R347 para Gpn2 y del residuo A256 a E272 para Gpn3 (Figura 4F). Estos segmentos desordenados de Gpn2 y Gpn3 son considerablemente más cortos y no son proporcionalmente comparables con las regiones desordenadas extendidas de Npa3 o GPN1.

Otra característica común en las IDPs/IDRs son los motivos con función de reconocimiento molecular (MoRFs), que son segmentos cortos de la proteína que experimentan cambios transitorios de estructura, del desorden al orden, lo que les permite ser funcionales e interactuar con sus blancos biológicos (Mishra et al., 2018). Para calcular la presencia de MoRFs en los C-terminal de Npa3 y GPN1, se analizaron sus secuencias con MoRFPred® (Disfani et al., 2012) y se obtuvieron tres MoRFs en cada uno. Lo más interesante es que estos MoRFs se sobrelapan

prácticamente en las mismas posiciones dentro de los extremos C-terminal de Npa3 y GPN1 (Figura 4D).

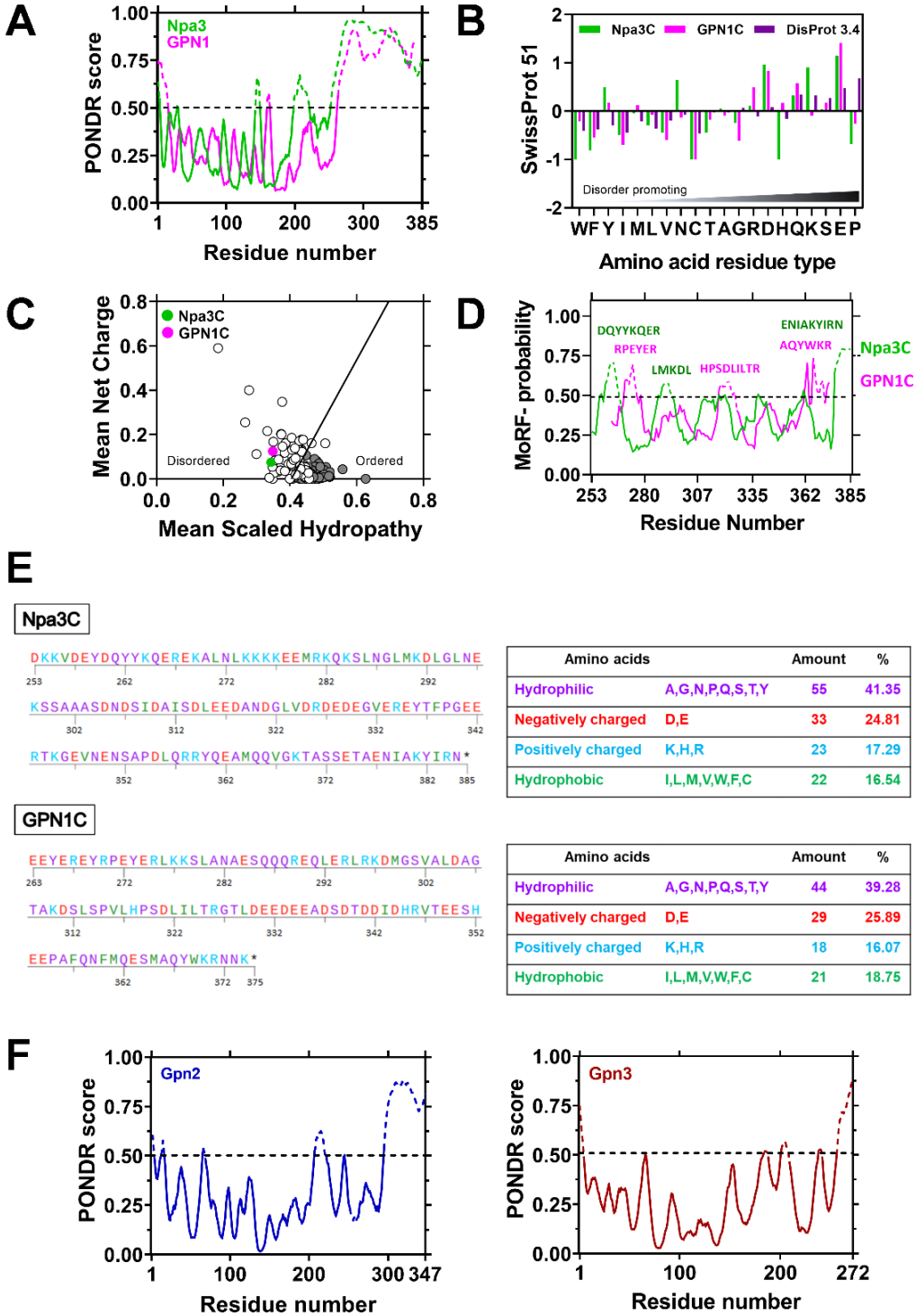


Figura 4. Los dominios C-terminal de Npa3 de levadura y GPN1 humana se predicen como regiones intrínsecamente desordenadas. (A) El análisis de las secuencias del C-terminal de Npa3 (línea verde) y GPN1 (línea magenta) mediante PONDR® VSL2 determinó que son regiones intrínsecamente desordenadas; los residuos con un puntaje igual a 0.5 (línea punteada) o mayor indican una alta probabilidad de desorden. (B) El perfil aminoacídico de los C-terminal de Npa3 y GPN1 coincide con proteínas intrínsecamente desordenadas. La distribución de aminoácidos de los C-terminal de Npa3 (barras verdes) y GPN1 (barras magenta) se comparó con la base de datos DisProt 3.4 (barras moradas) utilizando la base de datos SwissPro51 como referencia. Con base en Composition Profiler, para cada aminoácido, los valores (>0) indican enriquecimiento y los valores (<0) indican empobrecimiento. (C) Los C-terminal de Npa3 (círculo verde) y GPN1 (círculo magenta) se agrupan con las proteínas intrínsecamente desordenadas en la gráfica de Carga-Hidropatía. Las proteínas de referencia desordenadas (círculos blancos) y ordenadas (círculos grises) también se representan y se separan por una diagonal que marca la frontera entre ambas. (D) Se predicen tres motivos con función de reconocimiento molecular (MoRFs) en los extremos C-terminal de Npa3 (línea verde) y GPN1 (línea magenta). Las secuencias de cada motivo se indican en la parte superior de la línea punteada con sus respectivos colores. (E) El análisis de aminoácidos de los extremos C-terminal de Npa3 y GPN1 indica que comparten una proporción similar en el tipo de aminoácidos, son ricos en aminoácidos hidrofílicos y en aminoácidos con carga negativa, mientras que los aminoácidos hidrofóbicos están subrepresentados. (F) Los análisis de desorden de Gpn2 y Gpn3 de levadura mostraron que poseen regiones intrínsecamente desordenadas proporcionalmente menores y no comparables con los C-terminal extendidos de Npa3 y GPN1. En los paneles 1A-D y F, los resultados se obtuvieron mediante análisis *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas; por lo tanto, las réplicas experimentales no son aplicables. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

5.2 El C-terminal de GPN1 humana sustituye parcialmente la función del extremo C-terminal de Npa3 en levadura en un ensayo de interacción genética sintética negativa entre *npa3ΔC/bud27Δ*.

Con base en el hallazgo de los MoRFs y su superposición en los C-terminal de Npa3 y GPN1 humana, decidimos evaluar si el C-terminal de GPN1 podría complementar a *npa3ΔC* en un ensayo de interacción genética negativa entre *npa3ΔC/bud27Δ*, como previamente describió Mora-García et al. (2022). Para este fin, generamos una proteína de fusión y la expresamos en levadura combinando el dominio de GTPasa N-terminal codificado en la mutante *npa3ΔC* con el C-terminal de GPN1, y la denominamos *npa3-NP15*. Para optimizar la fusión, homologamos el código genético de humano con el de levadura, particularmente los codones de

arginina de humano que intercambiaron por codones de arginina de uso frecuente en la levadura *S. cerevisiae*.

A continuación, evaluamos la interacción genética entre las mutantes *npa3-NP15/bud27Δ* en una cepa doble mutante *npa3Δ/bud27Δ* que expresaba *npa3-NP15* desde un plásmido pRS315-*LEU2*, obtenida por medio de la transformación de levadura y un ensayo de pérdida de plásmido posterior (Figura 5A, panel izquierdo). Una pequeña fracción de células perdió el plásmido de mantenimiento original pRS416-*URA3* con *NPA3* silvestre y expresó únicamente la versión contenida en el plásmido con marcador de selección *LEU2*. Las células se crecieron en SCM sin leucina y con 5-FOA. Después de 3 días a 30 °C, en las placas de SCM+5-FOA se observaron colonias claramente en las placas con células que expresaban *npa3-NP15*, pero no en las placas con *npa3ΔC* (Figura 5B, panel derecho). Con esta observación, concluimos que el C-terminal de GPN1 compensaba, al menos parcialmente, las funciones del C-terminal de Npa3 en *npa3ΔC*. Para este experimento, las células que expresaban *NPA3* silvestre del plásmido pRS315-*LEU2* se utilizaron como control positivo.

Para asegurarnos de que las células *npa3-NP15* proliferaban mejor en SCM con 5-FOA por efecto de la fusión heteróloga del C-terminal de GPN1 con *npa3ΔC*, y no por la aparición indeseable de una cepa revertiente espontánea, evaluamos el DNA genómico de las tres colonias aisladas de manera independiente del ensayo de pérdida de plásmido (*npa3-NP15-LEU2*) y de su cepa parental (*NPA3-URA3*, *npa3-NP15-LEU2*), con el fin de descartar cualquier evento de recombinación genética entre el casete de *NAT* en el locus de *NPA3* en el cromosoma (*npa3Δ::natMX4*) y la versión *NPA3* silvestre en el plásmido pRS315-*URA3* de la cepa parental. Confirmamos mediante PCR que el casete de *NAT* permanecía en el locus de *NPA3*, y que el gen *NPA3* seguía correctamente inactivado, con base en los tamaños de los fragmentos de PCR de los extremos 5' y 3' analizados por electroforesis de agarosa y teñidos con bromuro de etidio (Figura 5C). Cabe mencionar que las tres colonias de *npa3-NP15* mostraron una tasa de crecimiento basal menor y una mayor sensibilidad a concentraciones subletales de higromicina B que las células *NPA3* silvestre (Figura 5D), lo que indica que el C-terminal de GPN1 influye directamente en el crecimiento basal de las células *npa3ΔC*, pero no

proporciona las características necesarias para superar el estrés traduccional causado por la higromicina B; por lo tanto, el C-terminal de GPN1 humana puede suplir parcialmente las funciones del C-terminal de Npa3 de levadura, aunque los mecanismos implicados quedan por definirse.

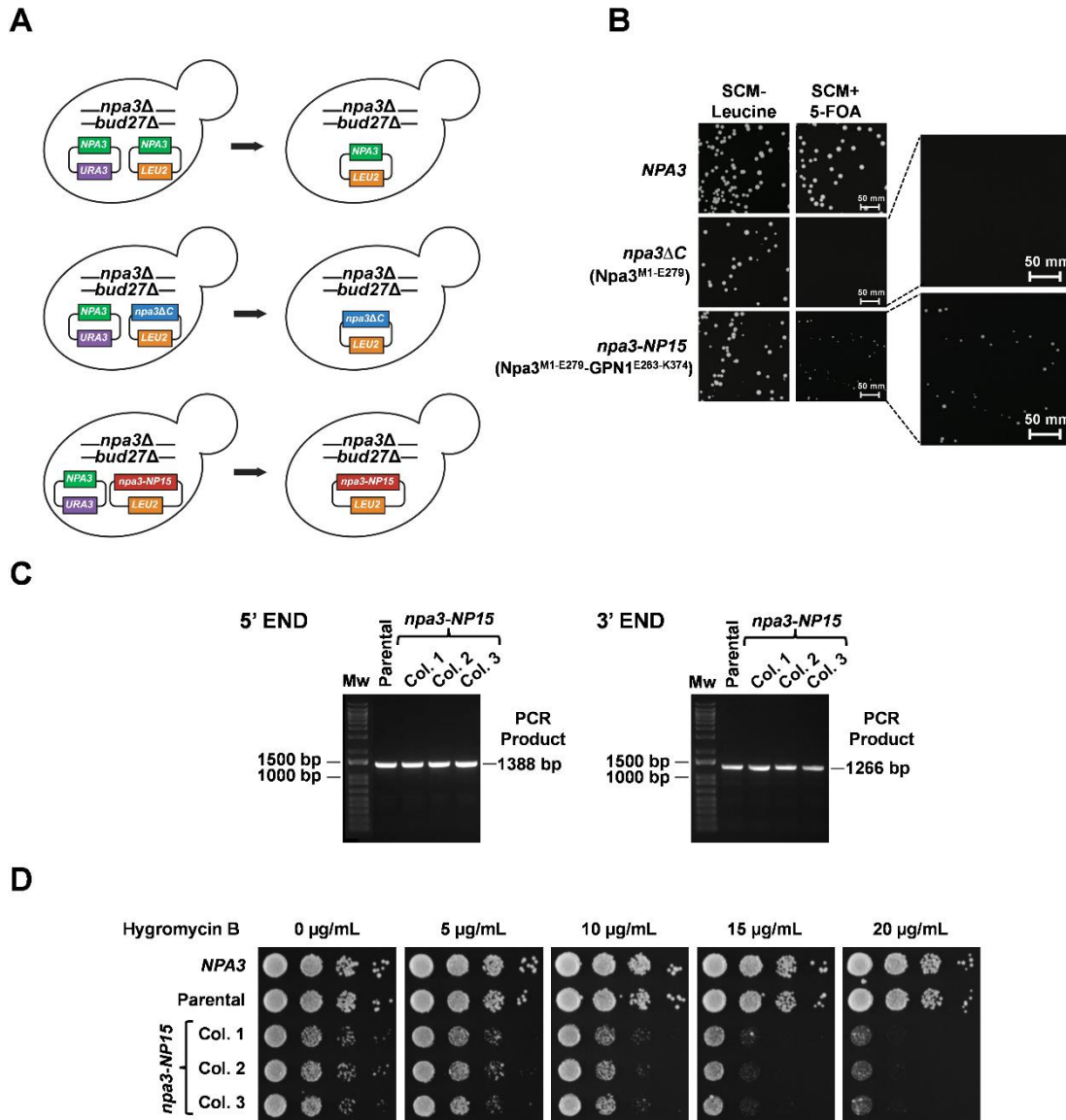


Figura 5. El C-terminal de GPN1 humana rescata parcialmente la interacción genética negativa de *npa3ΔC/bud27Δ*. (A) Diagrama que describe el ensayo de pérdida de plásmido. Todas las células son *npa3Δ/bud27Δ*, y originalmente todas llevaban un plásmido de mantenimiento *NPA3-URA3* y una copia adicional de *NPA3*, *npa3ΔC* o *npa3-NP15* (*npa3ΔC-hsGPN1C*) en un plásmido *LEU2*. Durante el ensayo de pérdida de plásmido las células se crecieron en SCM sin leucina, pero con uracilo; durante la división celular una pequeña fracción de células eventualmente pierde el plásmido

URA3 y retiene el plásmido *LEU2*. **(B)** Las células que expresan la complementación heteróloga *npa3-NP15* mostraron un aumento de su proliferación basal en comparación con las que expresan *npa3ΔC* cuando se crecieron en SCM+5FOA a 30 °C por 3 días. Los recuadros maximizados con una barra de escala de 50 mm representan las cajas SCM+5FOA originales y la escala se añadió para comparar el tamaño de las colonias. Las células que expresan *NPA3-LEU2* se utilizaron como control. **(C)** Las células que expresan únicamente *npa3-NP15* retuvieron el gen *NAT* en el locus de *NPA3* después del ensayo de pérdida de plásmido. La integridad del gen *NAT* en el locus de *NPA3* se evaluó por PCR punto final que se analizó por gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Para la PCR se utilizó el DNA genómico de la cepa parental (BYMO88) y tres colonias aisladas independientes de *npa3-NP15* (BYMO117) confirmándose en todas el reemplazo *npa3Δ::natMX4*. **(D)** Las células *npa3-NP15* (BYMO117) y la cepa parental (BYMO88) mostraron un crecimiento basal similar en ausencia, pero no en presencia de higromicina B. La cepa *NPA3* silvestre (BYMO3) se utilizó como control. Los experimentos de los paneles **B-D** se realizaron 3 veces ($n = 3$), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

5.3 La fosforilación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 del C-terminal de Npa3 es crítico para superar el estrés traduccional causado por la higromicina B y la cicloheximida en células *bud27Δ*.

Npa3 se divide en un dominio GTPasa N-terminal y un dominio C-Terminal, el cual se predice como una región intrínsecamente desordenada (IDR) (Figura 4A). Es común que la función (Bah & Forman-Kay, 2016; Landry et al., 2009)ah & Forman-Kay, 2016; Landry et al., 2009), y curiosamente es en el C-terminal de Npa3 donde ocurren la mayoría de los eventos de fosforilación reportados para Npa3 en estudios globales de proteómica, específicamente en los sitios Ser285 (Lanz et al., 2021; Zhou et al., 2021), Ser304 (Albuquerque et al., 2008; Holt et al., 2009; Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013; Zhou et al., 2021), Ser308 (Holt et al., 2009; Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013; Zhou et al., 2021), Ser313 (Albuquerque et al., 2008; Holt et al., 2009; Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013; Zhou et al., 2021), Thr337 (Albuquerque et al., 2008; Lanz et al., 2021; Zhou et al., 2021), Ser352 (Albuquerque et al., 2008; Holt et al., 2009; Lanz et al., 2021; MacGilvray et al., 2020; Soulard et al., 2010; Swaney et al., 2013; Zhou et al., 2021), Ser372 (Albuquerque et al., 2008;

Lanz et al., 2021; MacGilvray et al., 2020; Swaney et al., 2013; Zhou et al., 2021) y Ser373 (Lanz et al., 2021; Zhou et al., 2021) como se muestra en la Figura 6.

En este trabajo se hizo la propuesta de que la función de Npa3 se regula críticamente por la fosforilación de uno o múltiples residuos de su C-terminal. Para probar esta hipótesis, evaluamos la sensibilidad de mutantes no fosforilables de Npa3 (*npa3-NPs*) a inhibidores de la traducción como higromicina B y cicloheximida. Primero se generó una mutante con los ocho sitios reportados como fosforilados mutados a alaninas, *npa3-NP1* (S285A, S304A, S308A, S313A, T337A, S352A, S372A y S373A), y posteriormente las mutaciones se agruparon en dos mutantes más por su posición/cercanía, *npa3-NP2* (S285A, S304A, S308A y S313A) y *npa3-NP3* (T337A, S352A, S372A y S373A) (Figura 6).

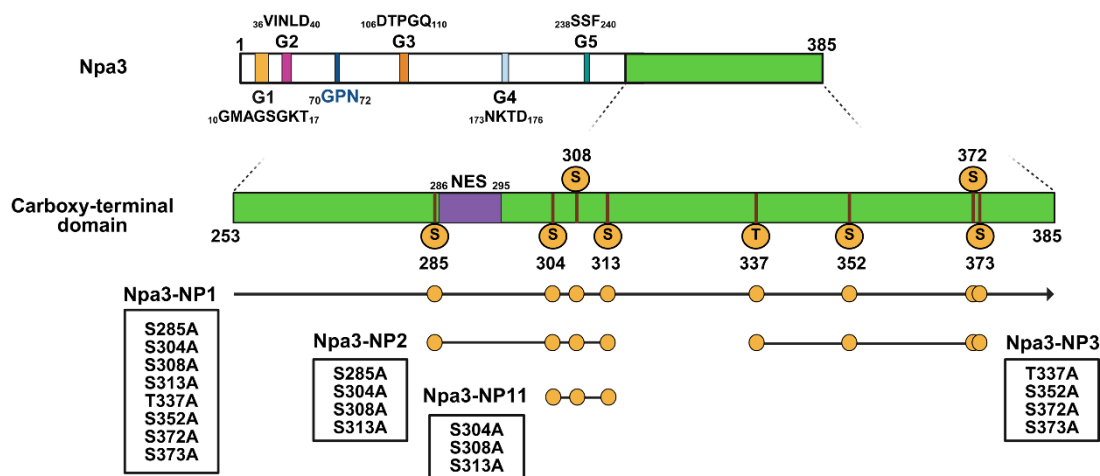


Figura 6. Diagrama con las posiciones relativas de los ocho residuos fosforilados del C-terminal de Npa3 que se mutaron en este trabajo. Se señalan los residuos nativos reportados como fosforilados en estudios globales de proteómica, así como las combinaciones de mutaciones utilizadas para generar las mutantes no fosforilables de Npa3: Npa3-NP1, Npa3-NP2, Npa3-NP3 y Npa3-NP11. También se indican los cinco motivos G conservados en todas las GTPasas, el motivo invariable de glicina, prolina y asparagina (GPN) de la familia de GTPasas de bucle GPN, y la señal de exportación nuclear (NES) identificada en el C-terminal de Npa3. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

Las células de levadura que expresaban *NPA3* silvestre y las mutantes *npa3-NP1*, *npa3-NP2* y *npa3-NP3* se expresaron del plásmido pRS315-*LEU2* en un fondo

genético *npa3Δ*. Las células se crecieron en presencia y ausencia de higromicina B y cicloheximida, pero no se observó ningún efecto en las concentraciones evaluadas (Figura 7A y 7B). Asimismo, no se observaron cambios en la localización subcelular entre las células que expresaban la versión silvestre de *NPA3*-GFP y las mutantes *npa3-NP1*-GFP, *npa3-NP2*-GFP, *npa3-NP3*-GFP (Figura 7C).

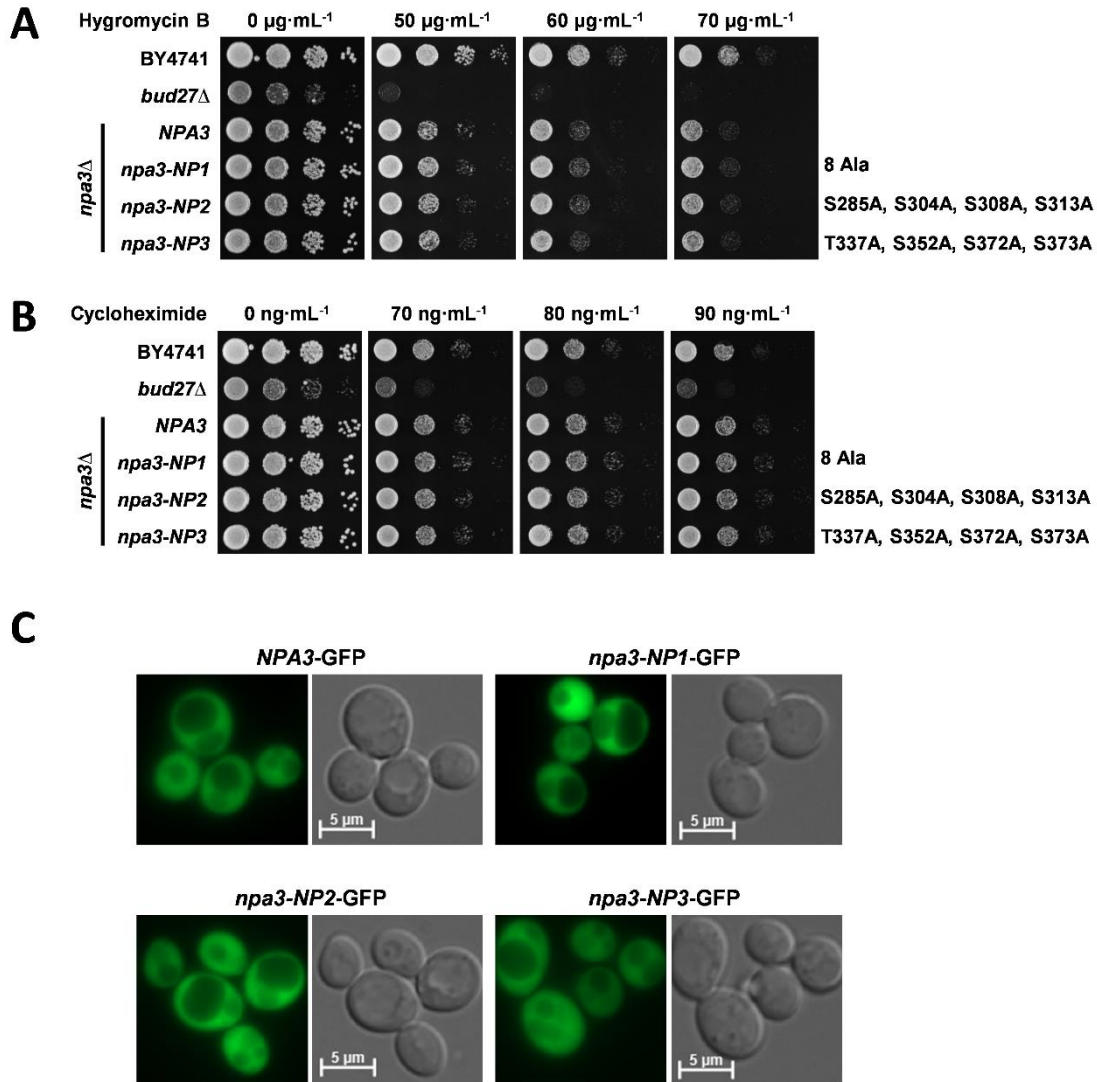


Figura 7. Las mutantes *npa3-NP1*, *npa3-NP2* y *npa3-NP3* no se ven afectadas en presencia de higromicina B y cicloheximida ni se altera su distribución subcelular. (A), (B) En un fondo genético *npa3Δ*, las cepas no fosforilables *npa3-NP1*, *npa3-NP2* y *npa3-NP3* presentaron un crecimiento similar al de la cepa control *NPA3*. Las células se crecieron hasta saturación y se ajustaron a una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$, luego se platearon en medio sólido YPD que contenían (A) higromicina B a 0, 50, 60, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y (B) cicloheximida a 0, 70, 80, 90 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, y se incubaron a 30 °C por 2

días. En ambos paneles **A-B**, la cepa parental BY4741 y la mutante *bud27Δ* se utilizaron como control. **(C)** Las células vivas *npa3Δ* que expresaban la versión silvestre *NPA3*-GFP y las versiones no fosforilables *npa3-NP1*-GFP, *npa3-NP2*-GFP y *npa3-NP3*-GFP, etiquetadas con la proteína verde fluorescente (GFP) del plásmido pRS416-*URA3* se observaron al microscopio para evaluar la distribución subcelular de la proteína. No se detectaron cambios en la distribución ni en la fluorescencia de ninguna de las cepas *npa3-NPs* en comparación con el control *NPA3*-GFP. En el campo claro se muestra una barra de escala de 5 μm. En los paneles **A-C**, los experimentos se realizaron 3 veces (*n* = 3), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

Considerando que las cepas mutantes *npa3-NPs* no mostraron efectos significativos en un fondo genético *npa3Δ*, se decidió evaluarlas en un fondo genético *npa3Δ/bud27Δ*, donde pensamos podrían ser más sensibles debido a la fuerte interacción genética negativa reportada para *npa3ΔC/bud27Δ* por Mora-García et al. (2022), y que indicaba que el C-terminal de Npa3 es más crítico en ausencia de Bud27. Es importante destacar, que las células *bud27Δ* ya muestran una sensibilidad aumentada a la higromicina B y cicloheximida como se reportó por Deplazes et al. (2009), y que se reprodujo en la Figura 7A y 7B. Las cepas *npa3-NP1/bud27Δ* y *npa3-NP2/bud27Δ* mostraron una reducción en su tasa de proliferación basal y un aumento en la sensibilidad a higromicina B (Figura 8A) y cicloheximida (Figura 9A). La cepa *npa3-NP3/bud27Δ* no compartió ninguno de los fenotipos observados en las cepas *npa3-NP1/bud27Δ* y *npa3-NP2/bud27Δ*, y sus fenotipos se asemejaron más a los controles *bud27Δ* y *NPA3/bud27Δ* en ausencia y en presencia de higromicina B (Figura 8A) y cicloheximida (Figura 9A). Las diferencias observadas entre la cepa control BY4741 y el resto se debieron exclusivamente a la ausencia de *BUD27*. Estos resultados indican que impedir la fosforilación del C-terminal de Npa3 en el grupo Ser285/Ser304/Ser308/Ser313 disminuye la capacidad de la célula para enfrentar el estrés causado por la higromicina B y la cicloheximida cuando Bud27 está ausente.

Para correlacionar que el aumento de sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida se debe directamente a las mutaciones del C-terminal de Npa3, se expresó la versión silvestre de *NPA3* del plásmido pRS313-*HIS3* en un fondo *npa3-NP2/bud27Δ*, con el fin de restaurar la resistencia a ambos antibióticos. El plásmido

NPA3-HIS3 rescató la sensibilidad mostrada por las células *npa3-NP2/bud27Δ* frente a ambos antibióticos (Figura 8B y Figura 9B). Estos resultados confirman que el aumento de sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida se asocia directamente con el mal funcionamiento del dominio de GTPasa debido a la mutación simultánea de los residuos de Ser285, Ser304, Ser308 y Ser313 a alanina.

Consecuentemente con la idea de que el aumento en la sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida se debía a la inhibición de la fosforilación del C-terminal de Npa3, decidimos evaluar el efecto de estos antibióticos en una cepa fosfomimética equivalente a *npa3-NP2* (S285A, S304A, S308A y S313A), pero con ácido aspártico en lugar de alanina, lo que simula la fosforilación por la introducción de una carga negativa (Diss et al., 2012), generando la mutante *npa3-NP7* (S285D, S304D, S308D y S313D). La cepa fosfomimética *npa3-NP7/bud27Δ* se creció en presencia de higromicina B a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o cicloheximida a 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. La sustitución de la serina nativa por el ácido aspártico en las posiciones 285, 304, 308 y 313 redujo significativamente la sensibilidad a la higromicina B (Figura 8C) y cicloheximida (Figura 9C) observada en la mutante con alanina *npa3-NP2/bud27Δ*. Sin embargo, la recuperación no fue total, ya que no se equiparó al crecimiento observado en la cepa silvestre *NPA3/bud27Δ*. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza dinámica de la fosforilación/desfosforilación de Npa3 en la regulación de su función celular.

Frecuentemente, la regulación de la función de una proteína por fosforilación ocurre por la fosforilación de un grupo de residuos qu(Carmona-Rosas et al., 2019; Holt et al., 2009; Hsu et al., 2017; Iakoucheva, 2004; Inagaki et al., 2015; Schweiger & Linial, 2010) aki et al., 2015; Schweiger & Linial, 2010). Con este razonamiento, evaluamos el efecto de mutar únicamente tres residuos, los más cercanos entre sí, y generamos la mutante *npa3-NP11* (S304A, S308A y S313A). La mutante *npa3-NP11/bud27Δ* mostró el mismo aumento en la sensibilidad a la higromicina B (Figura 8A) y cicloheximida (Figura 9A) que las mutantes *npa3-NP1/bud27Δ* y *npa3-NP2/bud27Δ*. Por lo tanto, este resultado indica que la fosforilación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 del C-terminal de Npa3 es crítica para que la célula pueda responder de manera adecuada al estrés traduccional inducido por la higromicina B y la cicloheximida en células *bud27Δ*.

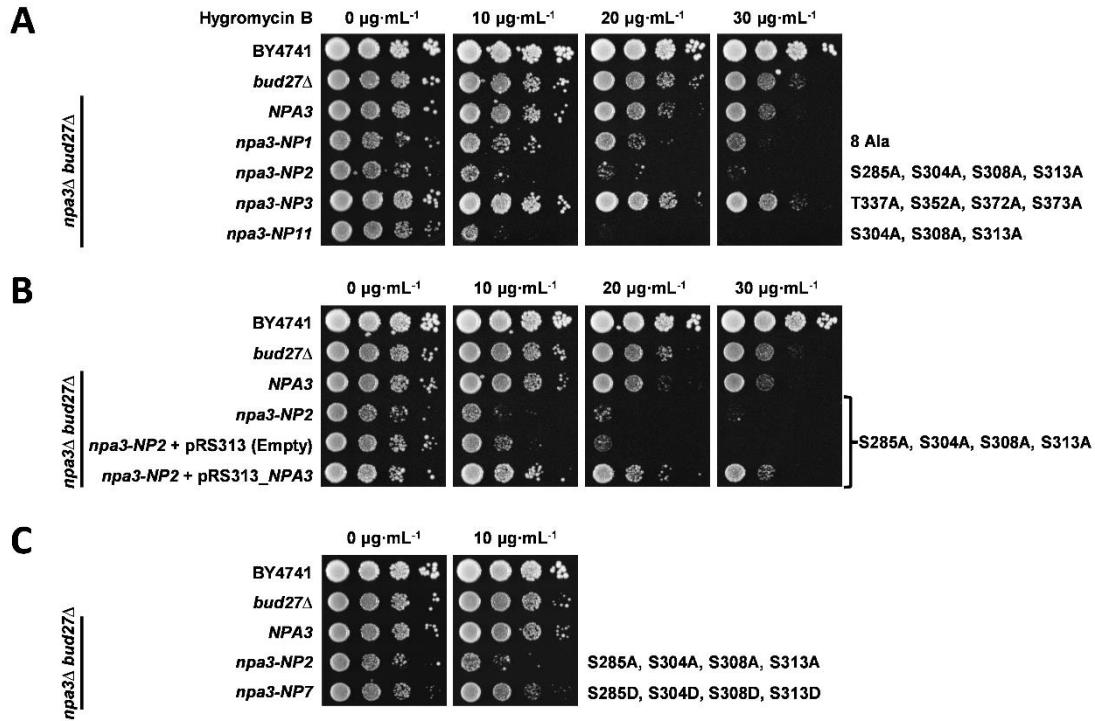


Figura 8. La mutación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 a alaninas del C-terminal de Npa3 aumenta la sensibilidad a la higromicina B y la cicloheximida. (A) Las mutantes *npa3-NP1*, *npa3-NP2*, *npa3-NP3* y *npa3-NP11* expresadas del plásmido pRS315-*LEU2* en células *npa3Δ/bud27Δ* se crecieron hasta saturación, se ajustaron a una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ y se platearon en medio sólido YPD con higromicina B a 0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las mutantes *npa3-NP1*, *npa3-NP2* y *npa3-NP11* son hipersensibles a la higromicina B. **(B)** La expresión de *NPA3* del plásmido pRS313-*HIS3*, pero no el plásmido pRS313-*HIS3* vacío, rescató la sensibilidad de la mutante *npa3-NP2/bud27Δ* a la higromicina B a 0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **(C)** La mutante fosfomimética con ácido aspártico *npa3-NP7* equivalente a la mutante con alanina *npa3-NP2* rescató parcialmente el crecimiento en placas de YPD con higromicina B a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En los paneles **A-C**, la cepa parental BY4741, *bud27Δ* y *NPA3/bud27Δ* se utilizaron como control, y las células se incubaron a 30 °C por 3 días. También, en **A-C**, los experimentos se realizaron 3 veces ($n = 3$), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

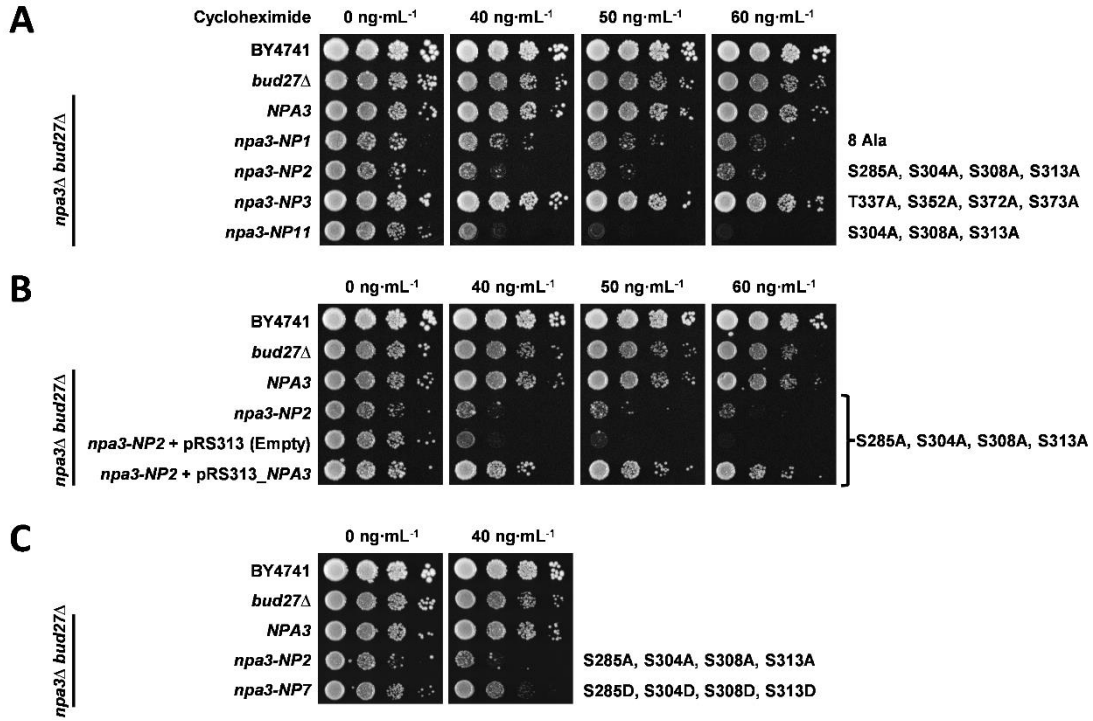


Figura 9. La mutación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 a alaninas del C-terminal de Npa3 aumenta la sensibilidad a la cicloheximida. Las mutantes *npa3-NP1*, *npa3-NP2*, *npa3-NP3* y *npa3-NP11* expresadas del plásmido pRS315-*LEU2* en células *npa3Δ/bud27Δ* se crecieron hasta saturación, se ajustaron a una OD_{600nm} = 1 y se platearon en medio sólido YPD con cicloheximida a 0, 40, 50 y 60 ng·mL⁻¹. Las mutantes *npa3-NP1* y *npa3-NP2* son sensibles, mientras que la mutante *npa3-NP11* es hipersensible a la cicloheximida. **(B)** La expresión de *NPA3* del plásmido pRS313-*HIS3*, pero no el plásmido pRS313-*HIS3* vacío, rescató la sensibilidad de la mutante *npa3-NP2/bud27Δ* a cicloheximida a 0, 40, 50 y 60 ng·mL⁻¹. **(C)** La mutante fosfomimética con ácido aspártico *npa3-NP7* equivalente a la mutante con alanina *npa3-NP2* rescató parcialmente el crecimiento en placas de YPD con cicloheximida a 40 ng·mL⁻¹. En los paneles **A-C**, la cepa parental BY4741, *bud27Δ* y *NPA3/bud27Δ* se utilizaron como control, y las células se incubaron a 30 °C por 3 días. También, en **A-C**, los experimentos se realizaron 3 veces ($n = 3$), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

5.4 Experimentos con mutantes dobles y sencillas indican que la Ser308 es crítica para enfrentar el estrés traduccional causado por la higromicina B y la cicloheximida en células *bud27Δ*.

Con base en los resultados anteriores, realizamos posteriormente un análisis de mutagénesis más detallado para determinar si un número menor de mutaciones podía reproducir los fenotipos observados en la cepa *npa3-NP11/bud27Δ* en presencia de higromicina B y cicloheximida. Para ello, generamos mutantes no fosforilables (*npa3-NPs*) dobles: *npa3-NP4* (S285A, S304A), *npa3-NP5* (S308A, S313A) y *npa3-NP6* (S304A, S308A); y sencillas: *npa3-NP16* (S285A), *npa3-NP17* (S304A), *npa3-NP9* (S308A) y *npa3-NP10* (S313A), y evaluamos su sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida. Para estos experimentos, también se utilizaron la cepa parental BY4741, *bud27Δ* y *NPA3/bud27Δ* como controles.

De las mutantes dobles solo la cepa *npa3-NP5/bud27Δ* con mutaciones en los residuos S308A y S313A mostró una mayor sensibilidad a la higromicina B (Figura 10A) y cicloheximida (Figura 11A). En cuanto a las mutantes sencillas, *npa3-NP17/bud27Δ* con la S304A presentó sensibilidad únicamente a la higromicina B (Figura 10B) y *npa3-NP9/bud27Δ* con S308A tuvo una mayor sensibilidad a la higromicina B (Figura 10B), además de un ligero aumento en sensibilidad a cicloheximida (Figura 11B). Cabe resaltar que las mutantes que tuvieron una mayor sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida compartían la mutación S308A, lo que subraya el papel crítico que desempeña este residuo en la regulación del C-terminal de Npa3 frente al estrés traduccional inducido por la higromicina B y cicloheximida.

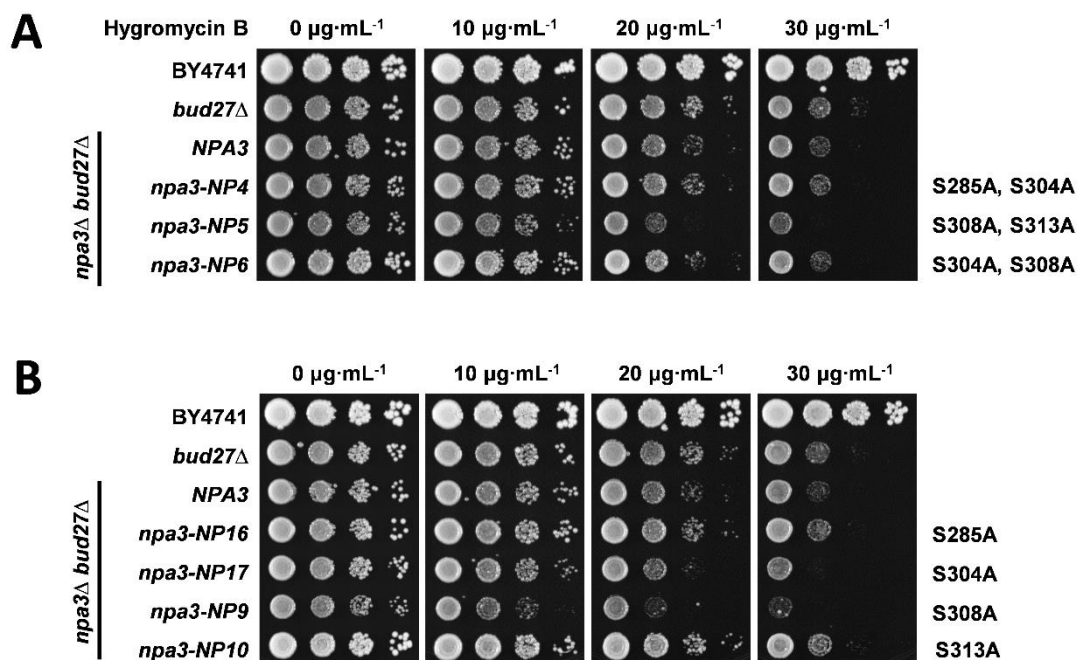


Figura 10. Evaluación de mutantes no fosforilables dobles y sencillas del C-terminal de Npa3 en presencia de higromicina B. Las cepas *npa3 Δ /bud27 Δ* , mutantes dobles no fosforilables (**A**) *npa3-NP4*, *npa3-NP5* y *npa3-NP6*, y sencillas no fosforilables (**B**) *npa3-NP9*, *npa3-NP10*, *npa3-NP16* y *npa3-NP17* expresadas del plásmido pRS315-*LEU2* se crecieron hasta saturación, se ajustaron a una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ y se platearon en medio sólido YPD con higromicina B a 0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En los paneles **A-B**, la cepa parental BY4741, *bud27 Δ* y *NPA3/bud27 Δ* se utilizaron como control, y las células se incubaron a 30 °C por 3 días. También, en **A-B**, los experimentos se realizaron 3 veces ($n = 3$), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

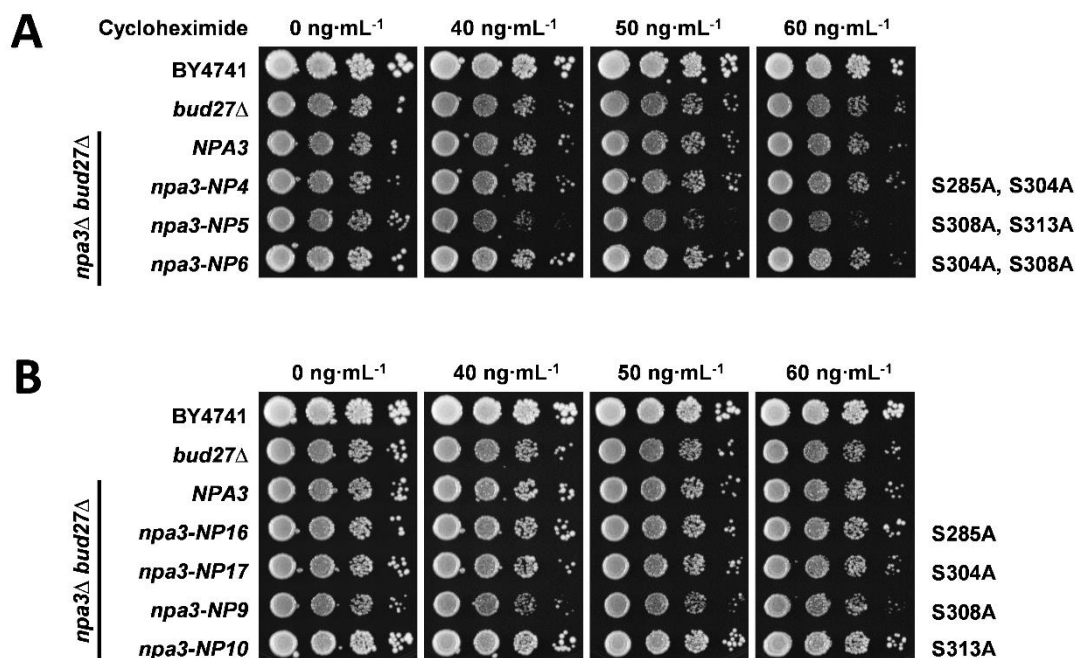


Figura 11. Evaluación de mutantes no fosforilables dobles y sencillas del C-terminal de Npa3 en presencia de cicloheximida. Las cepas *npa3*Δ/*bud27*Δ, mutantes dobles no fosforilables (**A**) *npa3-NP4*, *npa3-NP5* y *npa3-NP6*, y sencillas no fosforilables (**B**) *npa3-NP9*, *npa3-NP10*, *npa3-NP16* y *npa3-NP17* expresadas del plásmido pRS315-*LEU2* se crecieron hasta saturación, se ajustaron a una OD_{600nm} = 1 y se platearon en medio sólido YPD con cicloheximida a 0, 40, 50 y 60 ng·mL⁻¹. En los paneles **A-B**, la cepa parental BY4741, *bud27*Δ y *NPA3*/*bud27*Δ se utilizaron como control, y las células se incubaron a 30 °C por 3 días. También, en **A-B**, los experimentos se realizaron 3 veces (*n* = 3), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

5.5 La distribución subcelular y los niveles de proteína no se alteraron en las mutantes *npa3-NP1*, *npa3-NP2* ni *npa3-NP11*.

El incremento en la sensibilidad a la higromicina B y a la cicloheximida de las cepas *npa3-NP1/bud27*Δ, *npa3-NP2/bud27*Δ y *npa3-NP11/bud27*Δ podría deberse a su incapacidad de ser fosforiladas en sus residuos mutados, aunque estos fenotipos podrían asociarse con efectos imprevisibles de las mutaciones como desestabilización, agregación o cambios en la distribución subcelular de las proteínas. Por ejemplo, la Ser285 flanquea una señal de exportación nuclear (NES) reportada en Npa3 (Reyes-Pardo et al., 2012), lo que plantea la posibilidad de que

la fosforilación de este residuo interfiera con la actividad de la exportina Crm1 y, tentativamente, con el transporte nucleocitoplasmático de Npa3.

Como paso siguiente, investigamos si las mutaciones en *npa3-NP1*, *npa3-NP2* y *npa3-NP11* interferían con la distribución subcelular de las proteínas mutantes en las células *bud27Δ*. Para esto se etiquetaron las mutantes *npa3-NP1* (S285A, S304A, S308A, S313A, T337A, S352A, S372A y S373A), *npa3-NP2* (S285A, S304A, S308A y S313A) y *npa3-NP11* (S304A, S308A y S313A) con la proteína verde fluorescente (GFP). Nos enfocamos en estas mutantes debido a sus fenotipos hipersensibles a la higromicina B y cicloheximida. Todas las mutantes *npa3-NPs-GFP* se expresaron desde un plásmido pRS416-URA3 en un fondo genético *bud27Δ* y se utilizaron células vivas para todos los ensayos de microscopía.

Todas las mutantes *npa3-NP1-GFP*, *npa3-NP2-GFP* y *npa3-NP11-GFP* mostraron una distribución citoplasmática igual que el control *NPA3-GFP*, y no se observaron diferencias detectables en la intensidad de la fluorescencia (Figura 12A). Del mismo modo, cuando se evaluaron los niveles de proteína mediante Western blot, no se detectaron diferencias significativas entre las mutantes *npa3-NPs-GFP* y el control *NPA3-GFP* (Figura 12B). Con estos resultados, descartamos la posibilidad de que las mutaciones causen alguna alteración importante en la solubilidad, distribución o los niveles de proteína cuando se expresan en células *bud27Δ*. No obstante, estas observaciones son consistentes con nuestra hipótesis de que la fosforilación del C-terminal de Npa3 es crítica para su regulación y función, particularmente en presencia de higromicina B y cicloheximida.

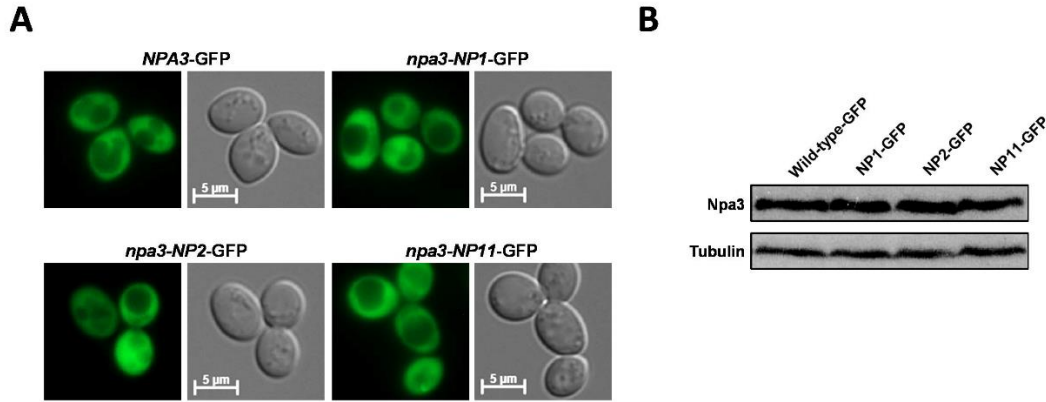


Figura 12. Las mutantes *npa3-NP1-GFP*, *npa3-NP2-GFP* y *npa3-NP11-GFP* muestran una distribución subcelular y niveles de proteína equivalentes a *NPA3-GFP* silvestre en el fondo genético *bud27Δ*. **(A)** Las células vivas al microscopio de las mutantes *npa3-NPs-GFP* no mostraron diferencias en la distribución subcelular respecto a la versión *NPA3-GFP* silvestre. **(B)** Tampoco se detectaron diferencias en los niveles de proteína utilizando un anticuerpo policlonal anti-GFP y un anticuerpo monoclonal anti-tubulina como control de carga de la proteína total. En **A-B**, los experimentos se realizaron 3 veces ($n = 3$), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

5.6 La localización nuclear de las RNA polimerasas I, II y III es independiente de la fosforilación del extremo C-terminal de Npa3 en células *bud27Δ*.

Las RNA polimerasas (RNAPs) son complejos multiproteicos esenciales responsables de la síntesis de los RNA ribosómico (RNAPI), RNA mensajero (RNAPII) y RNA de transferencia (RNAPIII) (Cramer et al., 2008). En levadura, se ha reportado que la ausencia de Bud27 conduce a la acumulación citoplasmática de las tres RNAPs (Mirón-García et al., 2013), mientras que el mal funcionamiento del dominio GTPasa de Npa3 provoca específicamente la acumulación citoplasmática de la RNA polimerasa II (RNAPII) (Guerrero-Serrano et al., 2017). Más recientemente, se observó que la distribución subcelular de la RNAPI y RNAPIII no se ve afectada en células *npa3Δ/BUD27* que expresan *npa3ΔC*, *npa3K16R* o *npa3G70A* (Félix-Pérez et al., 2024).

Bud27 y Npa3 también están involucrados en la síntesis de proteínas y la biogénesis ribosomal (Deplazes et al., 2009; Félix-Pérez et al., 2024; Mora-García

et al., 2022), aunque para Npa3 los mecanismos subyacentes aún necesitan ser estudiados. De manera consistente, células *bud27Δ* y las mutantes hipomórficas *npa3ΔC*, *npa3K16R* y *npa3G70A* mostraron una mayor sensibilidad a la higromicina B (Deplazes et al., 2009; Félix-Pérez et al., 2024), lo que refuerza su participación en la maquinaria de la síntesis de proteínas. Por su parte, nuestros datos indican que las mutantes *npa3-NPs/bud27Δ* presentan una sensibilidad aumentada a la higromicina (Figura 8 y Figura 10), si se comparan con las concentraciones evaluadas por Félix-Pérez et al. (2024) en las mutantes *npa3ΔC*, *npa3K16R* y *npa3G70A*, y *bud27Δ* por Deplazes et al. (2009). Además, este aumento en la sensibilidad no se debe a alteraciones en la integridad celular o en la distribución de las *npa3-NPs* como mostramos en la Figura 12.

Por lo tanto, para dilucidar si las mutantes *npa3-NP* participan en la localización nuclear de las RNAPs en sinergia con la delección cromosómica de *BUD27*, evaluamos la localización de tres de las subunidades asociadas con cada una de las tres RNAPs etiquetadas con la proteína verde fluorescente (GFP): Rpa190 (subunidad de la RNAPI), Rpb2 (subunidad de la RNAPII) y Rpo31 (subunidad de la RNAPIII), en células *npa3Δ/bud27Δ* que expresaban la versión silvestre de *NPA3* o la mutante *npa3-NP2* (S285A, S304A, S308A y S313A) desde el plásmido pRS315-*LEU2*. También, usamos la nucleoporina *NUP2* etiquetada con la proteína roja fluorescente (RFP, mCherry) que se expresó desde el plásmido pRS416-*URA3* como un marcador nuclear.

Nuestros datos muestran, que ninguna de las tres RNAPs se ve afectada en su localización nuclear por la combinación de *bud27Δ* con *NPA3* silvestre o la mutante *npa3-NP2* (Figura 13). La distribución de la RNAPI es predominantemente nucleolar, mientras que la RNAPII y RNAPIII se mantienen principalmente en el (Gillis & Berry, 2024; Hardeland & Hurt, 2006; Russell & Zomerdiijk, 2006)nd & Hurt, 2006; Russell & Zomerdiijk, 2006). La acumulación difusa citoplasmática de las RNAPs se debe únicamente a la ausencia de Bud27 como se mencionó anteriormente y reportó Mirón-García et al. (2013).

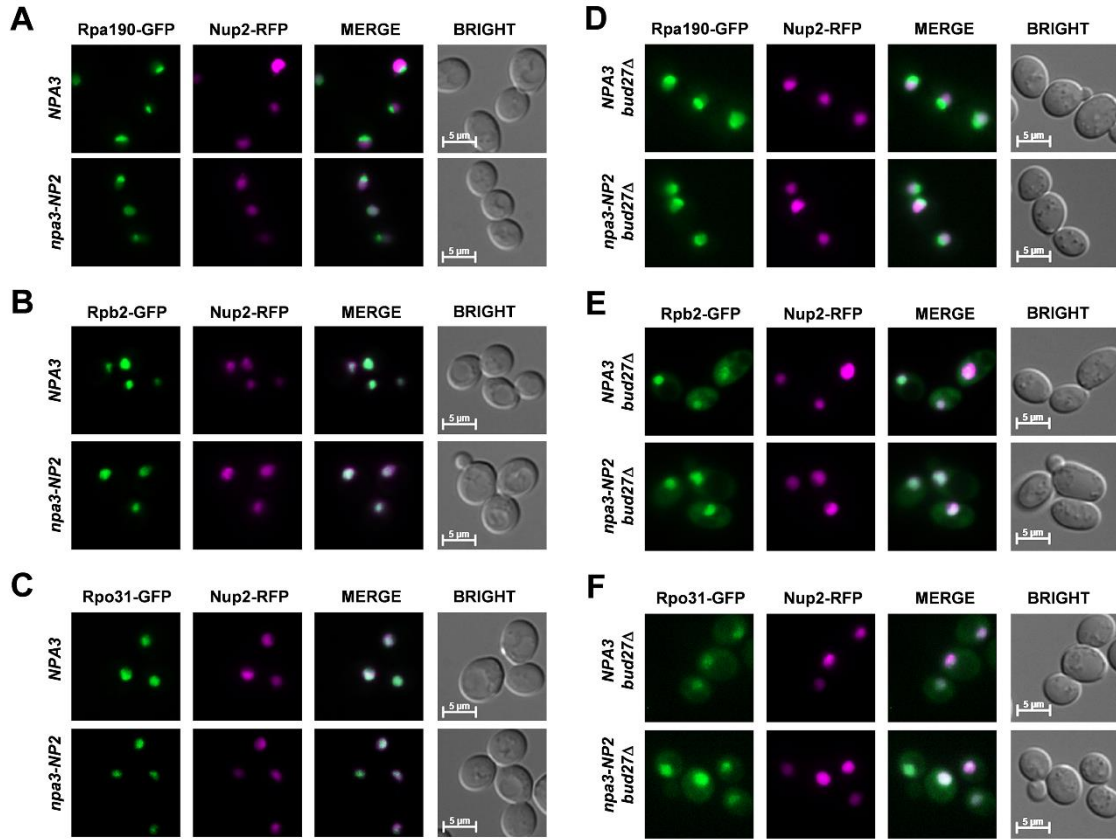


Figura 13. Las RNA polimerasas RNAPI, RNAPII y RNAPIII son predominantemente nucleares en células *npa3-NP2/BUD27* y *npa3-NP2/bud27Δ*. La distribución subcelular de las proteínas (A, D) Rpa190 (subunidad de RNAPI), (B, E) Rpb2 (subunidad de RNAPII) y (C, F) Rpo31 (subunidad de RNAPIII) etiquetadas con la proteína verde fluorescente (GFP) se observó al microscopio en células vivas *npa3Δ/BUD27* (A-C) y *npa3Δ/bud27Δ* (D-F). Las proteínas fluorescentes de las subunidades de las tres RNA polimerasas se expresaban desde sus loci endógenos, mientras que las versiones de *NPA3* y *npa3-NP2* se expresaban desde el plásmido pRS315-*LEU2*. Como marcador nuclear se utilizó la nucleoporina *NUP2* fusionada con la proteína roja fluorescente (RFP, mCherry) expresada desde el plásmido pRS416-*URA3*. Para fines ilustrativos, la fluorescencia roja se reemplazó por color magenta para mejorar su accesibilidad visual. La baja acumulación citoplasmática de las RNA polimerasas I, II y III, detectable únicamente en el fondo genético *bud27Δ*, no se agravó en la cepa mutante *npa3-NP2*. En el campo claro se muestra una barra de escala de 5 μ m. En los paneles A-F, todos los experimentos se realizaron 3 veces ($n = 3$), pero solo se muestra un resultado representativo para mayor claridad. Figura modificada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

5.7 El grupo Ser304/Ser308/Ser313 está altamente conservado en otros hongos filogenéticamente cercanos a *S. cerevisiae*.

Finalmente, investigamos si los residuos de serina del C-terminal de Npa3, específicamente Ser304, Ser308 y Ser313, se conservaban en otros ortólogos de hongos filogenéticamente cercanos a *S. cerevisiae*. Las secuencias proteicas se descargaron de la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y se alinearon con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Para el alineamiento, se delimitó la secuencia de Npa3 a los aminoácidos 282-316 del C-terminal, y se compararon las secuencias.

Los resultados muestran que la Ser308 y Ser313 están altamente conservadas, lo que respalda nuestros hallazgos de que podrían ser fisiológicamente relevantes. La Ser313 está conservada en todas las especies, mientras que la Ser308 se conserva en todas, excepto en *Kluyveromyces thermotolerans* y *Ashbya gossypii*. Por su parte, la Ser304 es la menos conservada, aunque cabe mencionar que en varias especies este residuo, y también el residuo 305, fueron reemplazados por ácido aspártico o ácido glutámico (Figura 14), ambos considerados residuos fosfomiméticos, ya que pueden simular un estado persistentemente fosforilado en estas posiciones. Este resultado refuerza nuestra propuesta de que la fosforilación en estos sitios es importante para regular la función de Npa3 en la célula.

Yeast \ Position	285	304	308	313
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	282 KQK S LEH . . . A KQE E ADV L S DFE	316		
<i>Ashbya gossypii</i>	280 KEK S LEK . . . D TDD G VDV V S DIE	314		
<i>Saccharomyces castellii</i>	282 KEK S LNR . . . E SD S SAEVI S DLE	318		
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	282 KQK S LNG . . . N DND S IDAI S DLE	320		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	282 KQK S LNG . . . S DND S IDAI S DLE	316		
<i>Saccharomyces douglasii</i>	282 KQK S LNG . . . S DND S IDAI S DLE	320		
<i>Candida mogii</i>	283 KDK S LEG . . . D ED S ADV V S DLE	316		
<i>Nakaseomyces glabratus</i>	282 KDK S LNG . . . -ED S ADV I S DLE	313		
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	282 KEK S ING . . . -ED S ADV I S DLE	314		
<i>Candida sphaerica</i>	322 KEK S LEH . . . Q HDD S ADV I S DIE	363		
<i>Candida kefyr</i>	282 KEK S LEH . . . D DDD S ADV I S DLE	318		

Figura 14. El grupo Ser304/Ser308/Ser313 se conserva en ortólogos de Npa3 de otros hongos filogenéticamente cercanos a *S. cerevisiae*. Las secuencias de Npa3 y sus ortólogos en otros hongos se descargaron de la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y se alinearon con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Además del grupo Ser304/Ser308/Ser313 en el C-terminal de Npa3 de *S. cerevisiae*, también mostró un alto grado de conservación la Ser285. Los residuos Ser304, Ser308 y Ser313 se marcan en rojo. Cabe señalar que, para la Ser304 en cuatro especies y la Ser308 en una especie, esas posiciones están ocupadas por un residuo fosfomimético de ácido aspártico o ácido glutámico, marcado en azul. Los aminoácidos diferentes a un residuo fosforilable o fosfomimético se muestran en negrita. Figura tomada de Ochoa-Valdez et al. (2025).

6. Discusión

El extremo C-terminal de Npa3 es una extensión del dominio de GTPasa poco estudiada y sin funciones claramente anotadas, presente en todos los ortólogos de esta GTPasa esencial en células eucariotas, pero ausente en el único ortólogo de arqueas. En este trabajo desarrollamos la hipótesis de que el dominio C-terminal, aún poco caracterizado, de Npa3 regula la función del dominio N-terminal de GTPasa mediante la fosforilación de uno o múltiples residuos. Nuestros análisis mostraron que los extremos C-terminal de Npa3 y GPN1 humana se predicen como regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs), ricas en aminoácidos cargados y deficientes en aminoácidos no polares que promueven el orden y dan estructura (Figura 4A-C). La estructura del dominio GTPasa de Npa3 se ha determinado por cristalografía de rayos X; no obstante, su dominio C-terminal ha eludido este análisis, ya que no se han obtenido cristales de la proteína completa adecuados para su difracción (Niesser et al., 2016). Esto último puede atribuirse directamente a la limitada proporción de aminoácidos no polares que impide que la proteína adquiera una estructura tridimensional compacta. Al mismo tiempo, la falta de restricciones estructurales ha favorecido que las secuencias primarias del extremo C-terminal en Npa3 y GPN1 evolucionen a tal grado que la homología entre ellas resulte indetectable (Figura 4E); aún así, ambas contienen tres motivos con función de reconocimiento molecular (MoRFs) en posiciones prácticamente superponibles (Figura 4D). Cabe señalar, por ejemplo, el segundo MoRF en el C-terminal de Npa3 forma parte de una señal de exportación nuclear (NES), cuya función ya se ha confirmado en levadura y humano (Reyes-Pardo et al., 2012). Es probable que otras funciones mediadas por los MoRFs restantes, aún sin identificar, también se conserven en los extremos C-terminal de Npa3 y GPN1.

A pesar de la divergencia entre la secuencia primaria de los extremos C-terminal de GPN1 humana y de Npa3, la mutante *npa3-NP15* pudo rescatar fenotipos asociados con la mutante *npa3 Δ C* que carece de los últimos 106 aminoácidos del C-terminal de Npa3 en un ensayo de interacción genética con la mutante *bud27 Δ* , previamente publicado por nuestro grupo de trabajo (Mora-García et al., 2022). La complementación heteróloga de la mutante *npa3-NP15* se logró al

fusionar el dominio de GTPasa N-terminal de Npa3 (M1-E279) con el C-terminal de GPN1 humana (E263-K374) y expresarlo en células *bud27Δ*. La mutante *npa3-NP15*, pero no *npa3ΔC*, mostró una mejora en su tasa de crecimiento basal, aunque inferior a la versión *NPA3* silvestre (Figura 5B). Cabe mencionar que las células mutantes *npa3-NP15* también mostraron una mayor sensibilidad a la higromicina B (Figura 5D). Estos resultados sugieren un rescate parcial; no obstante, apoyan nuestra propuesta de que la función de los C-terminal de Npa3 y GPN1, con tres MoRFs, se encuentra conservada.

La espectrometría de masas aplicada en estudios globales de proteómica permite generar una gran cantidad de información de alta resolución, por ejemplo, sobre la fosforilación de proteínas en diferentes condiciones y tipos de estrés. Mucha de esta información queda depositada en las bases de datos públicas como la de *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/>) de la levadura *S. cerevisiae* para ser consultada y posteriormente validada mediante experimentación biológica para identificar su relevancia fisiológica. La fosforilación de proteínas es la modificación postraducciona más frecuente utilizada por las células eucariotas para regular la función de sus proteínas y adecuarlas a situaciones específicas (Khoury et al., 2011; Schweiger & Linial, 2010). Las proteínas y regiones intrínsecamente desordenadas son más propensas a sufrir modificaciones postraduccionales, principalmente fosforilación (Bah & Forman-Kay, 2016; Landry et al., 2009). En Npa3, 11 de 13 eventos totales de fosforilación ocurren en el extremo C-terminal (Albuquerque et al., 2008; Holt et al., 2009; Lanz et al., 2021; MacGilvray et al., 2020; Soulard et al., 2010; Swaney et al., 2013; Zhou et al., 2021). Al carecer el C-terminal de Npa3 de una estructura rígida esto podría favorecer una mayor exposición de los residuos para ser fosforilados por sus cinasas específicas de acuerdo con su ciclo de vida y/o para responder mejor a condiciones ambientales. La alta incidencia de fosforilaciones en el C-terminal de Npa3 respalda nuestros datos, que sugieren que el C-terminal de Npa3 es una región intrínsecamente desordenada.

Experimentos de mutagénesis en ocho de los residuos fosforilados del C-terminal de Npa3 revelaron que la mutante *npa3-NP1* (S285A/S304A/S308A/S313A/T337A/S352A/S372A/S373A) expuesta a

concentraciones subletales de higromicina B no presentaba ningún fenotipo detectable a simple vista; en contraste, la cepa *npa3ΔC*, carente del C-terminal ($\Delta M280-N385$) es hipersensible a la higromicina B (Félix-Pérez et al., 2024). Sin embargo, el cambio de fondo genético con *BUD27* a uno *bud27Δ* reveló la importancia fisiológica de la fosforilación del C-terminal de Npa3, ya que las células *npa3-NP1/bud27Δ* resultaron ser significativamente más sensibles a la higromicina B. Este resultado confirmó nuevamente la fuerte interacción genética entre Npa3 y *bud27Δ* descrita por Mora-García et al. (2022), donde el C-terminal de Npa3 se vuelve prácticamente esencial en ausencia de Bud27.

Ahora bien, ¿por qué los efectos fisiológicos de impedir la fosforilación del C-terminal de Npa3 solo son evidentes cuando Bud27 está ausente? En este punto, aún no podemos especificar la razón, pero nuestros resultados sugieren la existencia de nuevas funciones presentes en Npa3, distintas de su participación en la localización de la RNAPII (Guerrero-Serrano et al., 2017), para las cuales la fosforilación del C-terminal resulta importante. Así mismo, nuestros datos apoyan que Npa3 y Bud27 comparten funciones en uno o varios procesos celulares.

Bud27 tiene un papel destacado en transcripción como mediador en el ensamblaje de las tres RNA polimerasas, en la elongación de los RNA mensajeros y en la síntesis de los RNA ribosomales (Martínez-Fernández et al., 2020; Mirón-García et al., 2013, 2014). De igual modo, se ha reportado que Bud27 participa activamente en el inicio de la traducción (Deplazes et al., 2009). En nuestro grupo de trabajo se propuso que la sensibilidad de la mutante *npa3ΔC* a la higromicina B podría deberse a una deficiencia en traducción. De manera consistente con esta interpretación, la expresión de múltiples copias del factor de inicio de la traducción eIF1A (*TIF11*), incrementa significativamente la síntesis de proteínas y rescata completamente la sensibilidad de la mutante *npa3ΔC* a la higromicina B (Félix-Pérez et al., 2024). Con base en lo anterior, podría ser que la fosforilación del C-terminal regule el papel de Npa3 en la síntesis de proteínas, ya que impedir la fosforilación del C-terminal conduce a un aumento de sensibilidad a la higromicina B en células *bud27Δ* (Figura 8), indicando que Npa3 y Bud27 podrían ser correguladores de la traducción. No obstante, aún falta comprender los detalles bioquímicos involucrados.

Al evaluar la importancia de los ocho residuos fosforilados en las células *bud27Δ*, se encontró que la mutación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 a alanina provocó una disminución en la tasa de crecimiento basal y un aumento en la sensibilidad a la higromicina B (Figura 8A). Adicionalmente, se observó un aumento en la sensibilidad a la cicloheximida (Figura 9A), otro inhibidor de la síntesis de proteínas. Estos fenotipos de sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida fueron similares a los observados en la mutante *npa3-NP1* (S285A/S304A/S308A/S313A/T337A/S352A/S372A/S373A). Estos experimentos sugieren que los residuos fosforilados Ser304, Ser308 y Ser313 son los más importantes para la función de Npa3 y para responder al estrés traduccional causado por la higromicina B y cicloheximida. Además, respaldan nuestra idea de una probable participación de Npa3 en la síntesis de proteínas.

Por otra parte, los fenotipos de sensibilidad a la higromicina B y cicloheximida en células *bud27Δ* fueron rescatados por la expresión de *NPA3* silvestre (Figura 8B y 6B), lo que demuestra la relación directa entre impedir la fosforilación con un malfuncionamiento de Npa3, y, por ende, con el aumento de sensibilidad a ambos antibióticos. En este sentido, la expresión de una mutante fosfomimética nos permitió relacionar la fosforilación con el correcto funcionamiento de Npa3, al introducir de manera sintética las cargas negativas en las posiciones donde nativamente ocurren eventos de fosforilación. La mutante fosfomimética *npa3-NP7* (S285D/S304D/S308D/S313D) permitió un mejor crecimiento de las células *bud27Δ* en presencia de higromicina B (Figura 8C) y cicloheximida (Figura 9C). Aunque la recuperación fue parcial, el resultado fue consistente con la importancia de la fosforilación y con el aumento de sensibilidad derivado de la incapacidad de la célula para fosforilar estos residuos mutados.

El alto grado de conservación del grupo Ser304/Ser308/Ser313 en otros hongos filogenéticamente cercanos a *S. cerevisiae* (Figura 14) respalda la idea de la importancia de la fosforilación en estos residuos, así como lo hemos documentado en este trabajo en cuanto a su impacto en la función celular. El residuo de Ser304 es el menos conservado en los ortólogos analizados, aunque en varios casos se sustituye por un residuo fosfomimético, ya sea ácido aspártico o ácido glutámico (Figura 14), lo que podría reemplazar la función de la carga negativa

generada por la fosforilación. Evolutivamente, estas sustituciones entre residuos fosforilables y residuos fosfomiméticos podrían indicar que estos están involucrados en la función adecuada de la GTPasa. Así, Npa3 se suma a un grupo de proteínas cuya función se regula por la fosforilación simultánea de residuos vecinos (Carmona-Rosas et al., 2019; Hay & Meek, 2000; Holt et al., 2009; Iakouchcheva, 2004; Inagaki et al., 2015; Schweiger & Linial, 2010).

A pesar de que todavía no hemos identificado la cinasa responsable de la fosforilación de Npa3, podemos sugerir una lista de posibles candidatas; por ejemplo, cinasas que han fosforilado a Npa3 *in vitro* como Atg1, Cmk1, Mek1, Pho85 y Yck1 (Ptacek et al., 2005). Otras candidatas potenciales son cinasas que se han copurificado con Npa3 como Bud32, Dbf2, Mkk2 (Ho et al., 2002), Tpk2 (Breitkreutz et al., 2010) y Rio1 (Smurova et al., 2023). Un análisis de la secuencia primaria de Npa3 en ELM (The Eukaryotic Linear Motif) identificó a la Ser304 y Ser313 como parte de las secuencias consenso para GSK-3 y CK2, respectivamente. De igual modo, la Ser308 corresponde a un sitio de reconocimiento para Plk1-2-3, y la Ser313 para Plk2-3. Varias de estas cinasas son constitutivas o se activan en fases específicas del ciclo celular, lo cual sería consistente con la fosforilación en ausencia de estímulos externos que ocurren en los residuos Ser304, Ser308 y Ser313 (Leutert et al., 2023), y con el fenotipo adverso en la proliferación de la mutante *npa3-NP11* (S304A/S308A/S313A). Por último, entre las fosfatasas que podrían regular la fosforilación de Npa3, se encuentran Sit4 que se asocia físicamente con Npa3 (Ho et al., 2002), y Rtr1, una fosfatasa que se acumula en el núcleo en células *npa3ΔC* reportada por nuestro grupo de trabajo (Guerrero-Serrano et al., 2017).

En resumen, en este trabajo se encontró que el C-terminal de Npa3 se predice como una región intrínsecamente desordenada que regula su dominio de GTPasa N-terminal mediante la fosforilación crítica de los residuos Ser304, Ser308 y Ser313. Aunque es importante destacar, que este mecanismo solo fue evidente en células carentes de *BUD27*, nuestros datos apoyan una integración en la célula de las funciones de Npa3 y Bud27.

7. Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la función, regulación e importancia fisiológica del C-terminal de Npa3 en la levadura *S. cerevisiae* mediante análisis bioinformáticos y mutagénesis dirigida en residuos previamente reportados como fosforilados. Nuestros resultados sugieren que tanto el C-terminal de Npa3 como el de GPN1 humana se predicen como regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs). En ambos C-terminales, se identificaron tres motivos con función de reconocimiento molecular (MoRFs) en posiciones superpuestas que, aunque actualmente se desconocen sus funciones específicas, es posible que éstas podrían ser las mismas en ambas proteínas.

De manera interesante, en un ensayo de complementación heteróloga, el C-terminal de GPN1 humana pudo sustituir parcialmente las funciones del C-terminal de Npa3 relacionadas con el crecimiento celular, ya que restauró parcialmente la tasa de crecimiento basal perdida en la mutante *npa3ΔC* en un ensayo de interacción genética negativa con *bud27Δ*. Esto último, a pesar de no detectarse homología entre sus secuencias primarias.

Con base en la integración funcional entre Npa3 y Bud27 evidenciada por la interacción *npa3ΔC/bud27Δ* (Mora-García et al., 2022), encontramos que las fosforilaciones del C-terminal de Npa3 son particularmente importantes en células que carecen de *BUD27*. En especial, la fosforilación de los residuos Ser304, Ser308 y Ser313 resultó esencial para resistir el estrés traduccional inducido por la higromicina B y la cicloheximida, lo cual se confirmó mediante el rescate de la proliferación basal al introducir una versión silvestre de *NPA3* y, de manera parcial, con una mutante fosfomimética. Estos resultados permitieron relacionar directamente el decremento en la proliferación celular con un malfuncionamiento de Npa3 causado por impedir la fosforilación de estos residuos en su C-terminal.

Al mismo tiempo, la Ser304, Ser308 y Ser313 se encuentran altamente conservadas en los ortólogos de Npa3 en otros hongos, siendo la Ser313 la más conservada, seguida de la Ser308, que también mostró ser particularmente importante durante los experimentos con mutantes no fosforilables dobles y sencillas en presencia de higromicina B y cicloheximida, y finalmente la Ser304.

Cabe señalar que en varios ortólogos de Npa3, la Ser304 y Ser308 fueron reemplazadas por residuos fosfomiméticos, ya sea ácido aspártico o ácido glutámico, lo que respalda la importancia de su fosforilación para la función de Npa3.

Para concluir, es importante resaltar que este es el primer estudio realizado de manera extensa sobre la función, regulación e importancia fisiológica del C-terminal de Npa3 en la levadura *S. cerevisiae*, en el cual, no se elimina por completo esta región, sino que se analizó *in silico*, mediante mutaciones puntuales y ensayos de interacción genética entre las mutantes no fosforilables y *bud27Δ*. Nuestros hallazgos confirman que el C-terminal de Npa3 tiene funciones propias, distintas pero complementarias al dominio de GTPasa N-terminal, y que, en ausencia de *BUD27* y bajo estrés traduccional, este se regula por la fosforilación crítica de los residuos de Ser304, Ser308 y Ser313. Entre el trabajo que resta por hacer esta identificar y validar experimentalmente las cinasas/fosfatasas que regulan la función de Npa3, determinar quirúrgicamente su participación en la traducción y los mecanismos involucrados. Dado que Npa3 se trata de un gen esencial, el diseño de nuevas mutantes y estrategias experimentales adecuadas resulta esencial para avanzar en la determinación de la importancia de Npa3 a nivel fisiológico.

8. Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molecular Biology of the Cell* (J. Wilson & T. Hunt, Eds.). W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J., & Zhou, H. (2008). A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(7), 1389–1396. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700468-MCP200>
- Alonso, B., Chaussinand, G., Armengaud, J., & Godon, C. (2011). A role for GPN-loop GTPase yGPN1 in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle*, 10(11), 1828–1837. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15763>
- Bah, A., & Forman-Kay, J. D. (2016). Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6696–6705. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.695056>
- Bairoch, A. (2004). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), D154–D159. <https://doi.org/10.1093/nar/gki070>
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2), 115–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)
- Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.-C., Ahmad, Y., Neel, H., Lamond, A. I., & Bertrand, E. (2010). HSP90 and Its R2TP/Prefoldin-like Cochaperone Are Involved in the Cytoplasmic Assembly of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 39(6), 912–924. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.023>
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348(6297), 125–132. <https://doi.org/10.1038/348125a0>

- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J. R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z.-Y., Breitkreutz, B.-J., Stark, C., Liu, G., Ahn, J., Dewar-Darch, D., Regul, T., Tang, X., Almeida, R., Qin, Z. S., Pawson, T., Gingras, A.-C., Nesvizhskii, A. I., & Tyers, M. (2010). A Global Protein Kinase and Phosphatase Interaction Network in Yeast. *Science*, 328(5981), 1043–1046. <https://doi.org/10.1126/science.1176495>
- Brown, C. J., Johnson, A. K., & Daughdrill, G. W. (2010). Comparing Models of Evolution for Ordered and Disordered Proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3), 609–621. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp277>
- Calera, M. R., Zamora-Ramos, C., Araiza-Villanueva, M. G., Moreno-Aguilar, C. A., Peña-Gómez, S. G., Castellanos-Terán, F., Robledo-Rivera, A. Y., & Sánchez-Olea, R. (2011). Parcs/Gpn3 is required for the nuclear accumulation of RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(10), 1708–1716. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.005>
- Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Alcántara-Hernández, R., Alfonzo-Méndez, M. A., & García-Sainz, J. A. (2019). Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate α 1D-adrenergic receptor subcellular localization and signaling. *Cellular Signalling*, 53, 374–389. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.003>
- Carré, C., & Shiekhhattar, R. (2011). Human GTPases Associate with RNA Polymerase II To Mediate Its Nuclear Import. *Molecular and Cellular Biology*, 31(19), 3953–3962. <https://doi.org/10.1128/MCB.05442-11>
- Castaño, I., Kaur, R., Pan, S., Cregg, R., Peñas, A. D. Las, Guo, N., Biery, M. C., Craig, N. L., & Cormack, B. P. (2003). Tn7 -Based Genome-Wide Random Insertional Mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Research*, 13(5), 905–915. <https://doi.org/10.1101/gr.848203>
- Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C.-D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow,

- J. F., & Vannini, A. (2008). Structure of Eukaryotic RNA Polymerases. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), 337–352. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008>
- Deplazes, A., Möckli, N., Luke, B., Auerbach, D., & Peter, M. (2009). Yeast Uri1p promotes translation initiation and may provide a link to cotranslational quality control. *The EMBO Journal*, 28(10), 1429–1441. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.98>
- Dez, C., Froment, C., Noaillac-Depeyre, J., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M., & Henry, Y. (2004). Npa1p, a Component of Very Early Pre-60S Ribosomal Particles, Associates with a Subset of Small Nucleolar RNPs Required for Peptidyl Transferase Center Modification. *Molecular and Cellular Biology*, 24(14), 6324–6337. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.14.6324-6337.2004>
- Disfani, F. M., Hsu, W.-L., Mizianty, M. J., Oldfield, C. J., Xue, B., Dunker, A. K., Uversky, V. N., & Kurgan, L. (2012). MoRFpred, a computational tool for sequence-based prediction and characterization of short disorder-to-order transitioning binding regions in proteins. *Bioinformatics*, 28(12), i75–i83. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts209>
- Diss, G., Freschi, L., & Landry, C. R. (2012). Where Do Phosphosites Come from and Where Do They Go after Gene Duplication? *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/843167>
- Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., & Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 19(1), 26–59. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00138-8)
- Dyson, H. J. (2016). Making Sense of Intrinsically Disordered Proteins. In *Biophysical Journal* (Vol. 110, Issue 5, pp. 1013–1016). Biophysical Society. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.01.030>
- Félix-Pérez, T., Mora-García, M., Reboloso-Gómez, Y., DelaGarza-Varela, A., Castro-Velázquez, G., Peña-Gómez, S. G., Riego-Ruiz, L., Sánchez-Olea, R., & Calera, M. R. (2024). Translation initiation factor eIF1A rescues hygromycin

- B sensitivity caused by deleting the carboxy-terminal tail in the GPN-loop GTPase Npa3. *The FEBS Journal*, 291(10), 2191–2208. <https://doi.org/10.1111/febs.17106>
- Forget, D., Lacombe, A.-A., Cloutier, P., Al-Khoury, R., Bouchard, A., Lavallée-Adam, M., Faubert, D., Jeronimo, C., Blanchette, M., & Coulombe, B. (2010). The Protein Interaction Network of the Human Transcription Machinery Reveals a Role for the Conserved GTPase RPAP4/GPN1 and Microtubule Assembly in Nuclear Import and Biogenesis of RNA Polymerase II. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(12), 2827–2839. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.003616>
- Gasper, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M., & Wittinghofer, A. (2009). It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 423–429. <https://doi.org/10.1038/nrm2689>
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., ... Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature00935>
- Gillis, A., & Berry, S. (2024). Global control of RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1867(2), 195024. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2024.195024>
- Gras, S., Chaumont, V., Fernandez, B., Carpentier, P., Charrier-Savournin, F., Schmitt, S., Pineau, C., Flament, D., Hecker, A., Forterre, P., Armengaud, J., & Housset, D. (2007). Structural insights into a new homodimeric self-activated GTPase family. *EMBO Reports*, 8(6), 569–575. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400958>
- Gstaiger, M., Luke, B., Hess, D., Oakeley, E. J., Wirbelauer, C., Blondel, M., Vigneron, M., Peter, M., & Krek, W. (2003). Control of Nutrient-Sensitive Transcription Programs by the Unconventional Prefoldin URI. *Science*, 302(5648), 1208–1212. <https://doi.org/10.1126/science.1088401>
- Guerrero-Serrano, G., Castanedo, L., Cristóbal-Mondragón, G. R., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., DeLuna, A., De Las Peñas, A., Castaño, I.,

- Calera, M. R., & Sánchez-Olea, R. (2017). Npa3/ScGpn1 carboxy-terminal tail is dispensable for cell viability and RNA polymerase II nuclear targeting but critical for microtubule stability and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864(3), 451–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.010>
- Hardeland, U., & Hurt, E. (2006). Coordinated Nuclear Import of RNA Polymerase III Subunits. *Traffic*, 7(4), 465–473. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00399.x>
- Hay, T. J., & Meek, D. W. (2000). Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Letters*, 478(1–2), 183–186. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01850-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01850-0)
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., ... Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415(6868), 180–183. <https://doi.org/10.1038/415180a>
- Holt, L. J., Tuch, B. B., Villén, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009). Global Analysis of Cdk1 Substrate Phosphorylation Sites Provides Insights into Evolution. *Science*, 325(5948), 1682–1686. <https://doi.org/10.1126/science.1172867>
- Hsu, S.-C., Lo, C.-W., Pan, T.-C., Lee, K.-Y., & Yu, M.-J. (2017). Serine 235 Is the Primary NS5A Hyperphosphorylation Site Responsible for Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Virology*, 91(14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00194-17>
- Iakoucheva, L. M. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1037–1049. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh253>
- Inagaki, S., Ghirlando, R., Vishnivetskiy, S. A., Homan, K. T., White, J. F., Tesmer, J. J. G., Gurevich, V. V., & Grisshammer, R. (2015). G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) and 5 (GRK5) Exhibit Selective Phosphorylation of the Neurotensin Receptor *in Vitro*. *Biochemistry*, 54(28), 4320–4329. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00285>

- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., Chabot, B., Poirier, G. G., Hughes, T. R., Blanchette, M., Price, D. H., & Coulombe, B. (2007). Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme. *Molecular Cell*, 27(2), 262–274. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.027>
- Jeronimo, C., Langelier, M.-F., Zeghouf, M., Cojocaru, M., Bergeron, D., Baali, D., Forget, D., Mnaimneh, S., Davierwala, A. P., Pootoolal, J., Chandy, M., Canadien, V., Beattie, B. K., Richards, D. P., Workman, J. L., Hughes, T. R., Greenblatt, J., & Coulombe, B. (2004). RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7043–7058. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7043-7058.2004>
- Johnson, L. N., & Lewis, R. J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. In *Chemical Reviews* (Vol. 101, Issue 8, pp. 2209–2242). <https://doi.org/10.1021/cr000225s>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Keniry, M. E., Kemp, H. A., Rivers, D. M., & Sprague, G. F. (2004). The Identification of Pcl1-Interacting Proteins That Genetically Interact With Cla4 May Indicate a Link Between G1 Progression and Mitotic Exit. *Genetics*, 166(3), 1177–1186. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.3.1177>
- Khoury, G. A., Baliban, R. C., & Floudas, C. A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, 1(1), 90. <https://doi.org/10.1038/srep00090>
- Kosiol, C., Holmes, I., & Goldman, N. (2007). An Empirical Codon Model for Protein Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 24(7), 1464–1479. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm064>

- Landry, C. R., Levy, E. D., & Michnick, S. W. (2009). Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends in Genetics*, 25(5), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.03.003>
- Lanz, M. C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E. J., Faça, V. M., Vega, S., Joiner, A. M. N., Fromme, J. C., Yu, H., & Smolka, M. B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Reports*, 22(2), e51121. <https://doi.org/10.15252/embr.202051121>
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 41–72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>
- Lembo, F., Pero, R., Angrisano, T., Vitiello, C., Iuliano, R., Bruni, C. B., & Chiariotti, L. (2003). MBD in, a Novel MBD2-Interacting Protein, Relieves MBD2 Repression Potential and Reactivates Transcription from Methylated Promoters. *Molecular and Cellular Biology*, 23(5), 1656–1665. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.5.1656-1665.2003>
- Leutert, M., Barente, A. S., Fukuda, N. K., Rodriguez-Mias, R. A., & Villén, J. (2023). The regulatory landscape of the yeast phosphoproteome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30(11), 1761–1773. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01115-3>
- Liu, X., Xie, D., Hua, Y., Zeng, P., Ma, L., & Zeng, F. (2020). Npa3 interacts with Gpn3 and assembly factor Rba50 for RNA polymerase II biogenesis. *FASEB Journal*, 34(11), 15547–15558. <https://doi.org/10.1096/fj.202001523R>
- Ma, L., Xie, D., Zhao, X., Wang, L., Hou, L., Liu, X., Li, Z., Cheng, H., Zhang, J., Gao, M., & Zeng, F. (2022). Npa3-Gpn3 cooperate to assemble RNA polymerase II and prevent clump of its subunits in the cytoplasm. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 837–848. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.03.081>
- MacGilvray, M. E., Shishkova, E., Place, M., Wagner, E. R., Coon, J. J., & Gasch, A. P. (2020). Phosphoproteome Response to Dithiothreitol Reveals Unique Versus Shared Features of *Saccharomyces cerevisiae* Stress Responses. *Journal of Proteome Research*, 19(8), 3405–3417. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00253>

- Martínez-Fernández, V., Cuevas-Bermúdez, A., Gutiérrez-Santiago, F., Garrido-Godino, A. I., Rodríguez-Galán, O., Jordán-Pla, A., Lois, S., Triviño, J. C., de la Cruz, J., & Navarro, F. (2020). Prefoldin-like Bud27 influences the transcription of ribosomal components and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 26(10), 1360–1379. <https://doi.org/10.1261/rna.075507.120>
- Martínez-Fernández, V., Garrido-Godino, A. I., Cuevas-Bermudez, A., & Navarro, F. (2018). *The Yeast Prefoldin Bud27* (pp. 109–118). https://doi.org/10.1007/978-3-030-00737-9_8
- Méndez-Hernández, L. E., Pérez-Mejía, A. E., Lara-Chacón, B., Barbosa-Camacho, A. A., Peña-Gómez, S. G., Martínez-Sánchez, M., Robledo-Rivera, A. Y., Sánchez-Olea, R., & Calera, M. R. (2014). Gpn1 and Gpn3 associate tightly and their protein levels are mutually dependent in mammalian cells. *FEBS Letters*, 588(21), 3823–3829. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.08.038>
- Minaker, S. W., Filiatrault, M. C., Ben-Aroya, S., Hieter, P., & Stirling, P. C. (2013). Biogenesis of RNA Polymerases II and III Requires the Conserved GPN Small GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3), 853–864. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.148726>
- Mirón-García, M. C., Garrido-Godino, A. I., García-Molinero, V., Hernández-Torres, F., Rodríguez-Navarro, S., & Navarro, F. (2013). The Prefoldin Bud27 Mediates the Assembly of the Eukaryotic RNA Polymerases in an Rpb5-Dependent Manner. *PLoS Genetics*, 9(2), e1003297. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003297>
- Mirón-García, M. C., Garrido-Godino, A. I., Martínez-Fernández, V., Fernández-Pevida, A., Cuevas-Bermúdez, A., Martín-Expósito, M., Chávez, S., de la Cruz, J., & Navarro, F. (2014). The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription. *Nucleic Acids Research*, 42(15), 9666–9676. <https://doi.org/10.1093/nar/gku685>
- Mishra, P. M., Uversky, V. N., & Giri, R. (2018). Molecular Recognition Features in Zika Virus Proteome. *Journal of Molecular Biology*, 430(16), 2372–2388. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.018>

- Mita, P., Savas, J. N., Ha, S., Djouder, N., Yates, J. R., & Logan, S. K. (2013). Analysis of URI Nuclear Interaction with RPB5 and Components of the R2TP/Prefoldin-Like Complex. *PLoS ONE*, 8(5), e63879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063879>
- Mohan, A., Oldfield, C. J., Radivojac, P., Vacic, V., Cortese, M. S., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2006). Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs). *Journal of Molecular Biology*, 362(5), 1043–1059. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.087>
- Mora-García, M., Ascencio, D., Félix-Pérez, T., Ulloa-Calzonzin, J., Juárez-Reyes, A., Robledo-Márquez, K., Reboloso-Gómez, Y., Riego-Ruiz, L., DeLuna, A., Calera, M. R., & Sánchez-Olea, R. (2022). Synthetic negative genome screen of the GPN-loop GTPase *NPA3* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 68(3–4), 343–360. <https://doi.org/10.1007/s00294-022-01243-1>
- Muñoz-Galván, S., Jimeno, S., Rothstein, R., & Aguilera, A. (2013). Histone H3K56 Acetylation, Rad52, and Non-DNA Repair Factors Control Double-Strand Break Repair Choice with the Sister Chromatid. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003237. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003237>
- Niesser, J., Wagner, F. R., Kostrewa, D., Mühlbacher, W., & Cramer, P. (2016). Structure of GPN-Loop GTPase Npa3 and Implications for RNA Polymerase II Assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 36(5), 820–831. <https://doi.org/10.1128/MCB.01009-15>
- Nitta, M., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Nakatsu, Y., Tamai, H., & Tanaka, K. (2000). A novel cytoplasmic GTPase XAB1 interacts with DNA repair protein XPA. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4212–4218. <https://doi.org/10.1093/nar/28.21.4212>
- Ochoa-Valdez, M. de J., Mora-García, M., Páez-Pérez, E. D., González-Contreras, B. E., Reboloso-Gómez, Y., Riego-Ruiz, L. R., Calera, M. R., & Sánchez-Olea, R. (2025). Characterization of the carboxy-terminal domain of the GPN-loop GTPase Npa3 reveals an intrinsically disordered region and phosphorylation-dependent regulation in the absence of *BUD27*. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.70214>

- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R. R., Schmidt, M. C., Rachidi, N., Lee, S.-J., Mah, A. S., Meng, L., Stark, M. J. R., Stern, D. F., De Virgilio, C., ... Snyder, M. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 438(7068), 679–684. <https://doi.org/10.1038/nature04187>
- Reyes-Pardo, H., Barbosa-Camacho, A. A., Pérez-Mejía, A. E., Lara-Chacón, B., Salas-Estrada, L. A., Robledo-Rivera, A. Y., Montero-Morán, G. M., Lara-González, S., Calera, M. R., & Sánchez-Olea, R. (2012). A nuclear export sequence in GPN-loop GTPase 1, an essential protein for nuclear targeting of RNA polymerase II, is necessary and sufficient for nuclear export. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(10), 1756–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.001>
- Russell, J., & Zomerdijs, J. C. B. M. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochemical Society Symposia*, 73, 203–216. <https://doi.org/10.1042/bss0730203>
- Schenkel, L. C., Rodenhiser, D. I., Ainsworth, P. J., Paré, G., & Sadikovic, B. (2016). DNA methylation analysis in constitutional disorders: Clinical implications of the epigenome. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(3), 147–165. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1113496>
- Schweiger, R., & Linial, M. (2010). Cooperativity within proximal phosphorylation sites is revealed from large-scale proteomics data. *Biology Direct*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-6>
- Shamilov, R., & Aneskievich, B. J. (2019). Intrinsic Disorder in Nuclear Receptor Amino Termini: From Investigational Challenge to Therapeutic Opportunity. *Nuclear Receptor Research*, 6. <https://doi.org/10.32527/2019/101417>
- Sickmeier, M., Hamilton, J. A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M. S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V. N., Obradovic, Z., & Dunker, A. K. (2007). DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(Database), D786–D793. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl893>
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19–27. <https://doi.org/10.1093/genetics/122.1.19>

- Smurova, K., Damizia, M., Irene, C., Stancari, S., Berto, G., Perticari, G., Iacovella, M. G., D'Ambrosio, I., Giubettini, M., Philippe, R., Baggio, C., Callegaro, E., Casagrande, A., Corsini, A., Polese, V. G., Ricci, A., Dassi, E., & De Wulf, P. (2023). Rio1 downregulates centromeric RNA levels to promote the timely assembly of structurally fit kinetochores. *Nature Communications*, 14(1), 3172. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38920-9>
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., & Hall, M. N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Molecular Biology of the Cell*, 21(19), 3475–3486. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0182>
- Staresincic, L., Walker, J., Dirac-Svejstrup, A. B., Mitter, R., & Svejstrup, J. Q. (2011). GTP-dependent Binding and Nuclear Transport of RNA Polymerase II by Npa3 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35553–35561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286161>
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N. J., & Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods*, 10(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2519>
- Tossavainen, H., Salovaara, S., Hellman, M., Ihalin, R., & Permi, P. (2020). Dispersion from Cα or NH: 4D experiments for backbone resonance assignment of intrinsically disordered proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 74(2–3), 147–159. <https://doi.org/10.1007/s10858-020-00299-w>
- Uversky, V. N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry*, 269(1), 2–12. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x>
- Uversky, V. N. (2013). The alphabet of intrinsic disorder. *Intrinsically Disordered Proteins*, 1(1), e24684. <https://doi.org/10.4161/idp.24684>
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why Are “Natively Unfolded” Proteins Unstructured Under Physiologic Conditions? *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 41(3), 415–427. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20001115\)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7)

- Vacic, V., Uversky, V. N., Dunker, A. K., & Lonardi, S. (2007). Composition Profiler: a tool for discovery and visualization of amino acid composition differences. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 211. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-211>
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Oldfield, C. J., Pappu, R. V., Tompa, P., Uversky, V. N., Wright, P. E., & Babu, M. M. (2014). Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical Reviews*, 114(13), 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>
- Vernekar, D. V., & Bhargava, P. (2015). Yeast Bud27 modulates the biogenesis of Rpc128 and Rpc160 subunits and the assembly of RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(11), 1340–1353. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.09.010>
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science*, 294(5545), 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., & Jones, D. T. (2004). Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.002>
- 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>
- Xie, H., Vucetic, S., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z., & Uversky, V. N. (2007). Functional anthology of intrinsic disorder. 3. Ligands, post-translational modifications, and diseases associated with intrinsically disordered proteins. *Journal of Proteome Research*, 6(5), 1917–1932. <https://doi.org/10.1021/pr060394e>
- Xu, D., Farmer, A., & Chook, Y. M. (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6), 782–790. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.008>

- Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(4), 996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.011>
- Zeng, F., Hua, Y., Liu, X., Liu, S., Lao, K., Zhang, Z., & Kong, D. (2018). Gpn2 and Rba50 Directly Participate in the Assembly of the Rpb3 Subcomplex in the Biogenesis of RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 38(13). <https://doi.org/10.1128/mcb.00091-18>
- Zhou, X., Li, W., Liu, Y., & Amon, A. (2021). Cross-compartment signal propagation in the mitotic exit network. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63645>

Anexos

Artículo publicado

Ochoa-Valdez, M. J., Mora-García, M., Páez-Pérez, E. D., González-Contreras, B. E., Reboloso-Gómez, Y., Riego-Ruiz, L. R., Calera, M. R., & Sánchez-Olea, R. (2025). Characterization of the carboxy-terminal domain of the GPN-loop GTPase Npa3 reveals an intrinsically disordered region and phosphorylation-dependent regulation in the absence of BUD27. *The FEBS Journal*, 10.1111/febs.70214. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/febs.70214>