



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE  
BIOMEDICINA DE  
VALENCIA **CSIC**



# **Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas**

Doctorado en Biotecnología

Tesis Doctoral presentada por

**Lidia Orea Ordóñez**

Dirigida por **Dr. Jerónimo Bravo Sicilia**

Valencia, noviembre 2021



---

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo económico de los proyectos de investigación enumerados a continuación:

SAF2015-67077-R

SAF2017-89901-R

PROMETEO/2018/0

Durante el periodo de realización de esta tesis, la autora, Lidia Orea Ordóñez, ha sido beneficiaria de una subvención para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral denominada “Ayudas para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral”, (ACIF) (ACIF/2016/103), otorgada por la Generalitat Valenciana, Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital, concedida en la convocatoria 2016.

Este estudio se ha realizado en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), bajo la dirección del Dr. Jerónimo Bravo Sicilia.





**Dr. D. Jerónimo Bravo Sicilia**, Investigador Científico en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas** ha sido realizada por Dña. **Lidia Orea Ordóñez** bajo su dirección en el Instituto de Biomedicina de Valencia, enmarcada en el Programa de Doctorado de Biotecnología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos legales oportunos, se presenta esta Tesis Doctoral y se extiende la presente certificación en Valencia, a 11 de noviembre de 2021.

Fdo.: Jerónimo Bravo Sicilia

Valencia, 11 de noviembre 2021



*A mi familia*



# AGRADECIMIENTOS



Un gran amigo me dijo una vez: si te atreves a hacer la tesis, empiézala con ganas. Y así fue. Empecé en el IBV con muchas ganas de aprender y descubrir el mundo de la investigación. Realizar esta tesis ha sido una carrera de fondo, con altibajos, que me han ayudado a mejorar como persona y creo que también como científica. En estos años he vivido momentos de todo tipo entre estas paredes rodeada de probetas y matraces. Con este manuscrito finaliza una de las etapas más enriquecedoras, no sólo de mi carrera científica, sino también de mi vida. He tenido el privilegio de conocer a grandes personas que siempre llevaré conmigo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de tesis Dr. Jerónimo Bravo, a Jero, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza y apoyo. Parece que fue ayer cuando empecé en tu laboratorio, nerviosa y con ganas de descubrir al complejo PeBoW que tantos quebraderos de cabeza nos ha dado. Al fin llegó el día de escribir estas palabras y me siento muy agradecida por todo lo que he aprendido.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, los que os fuísteis y los que continuáis aquí. A Susana por las excursiones al citómetro, tus consejos y ánimos en estos años. A Alba, para que esta tesis te sirva como último *sprint* para terminar la tuya por todo lo alto. A Rafa, gracias por tus consejos, no te puedes hacer una idea de lo que me has ayudado, te estoy muy agradecida. A Guille, por los buenos cafés de por la mañana, por las risas, por el apoyo cuando las fuerzas decaían, gracias Guille por todo. A todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio, mis babys, muchísimas gracias. Tenéis a una amiga para lo que lo que necesitéis que siempre estará dispuesta a echaros una mano.

Y, como no, a la gente del IBV. Qué grandes sois. Me siento muy afortunada de haber pertenecido a esta gran familia. Fue curioso cuando entré por primera vez en este centro. Me sorprendió que todo el mundo saludaba efusivamente con un ¡hola! cuando te veía, y a lo largo de los años ha seguido siendo así, saludando incluso hasta 3 veces al día a la misma persona. Con esto se pueden hacer a la idea de cómo es el ambiente en este centro. Gracias a Ada, por tu apoyo incondicional, por levantarme el ánimo, ayudarme cuando lo he necesitado y siempre estar dispuesta con una sonrisa. A los Investigadores, en especial a los estructurólogos por acercarme al mundo crio. Gracias a todos los laboratorios del centro porque habéis contribuido de alguna u otra manera en este trabajo. Gracias a técnicos, postdocs...por hacerme siempre un huequito y ayudarme en todo lo que he necesitado. Al

personal de limpieza, seguridad, mantenimiento, administración, biblioteca e informática por siempre estar dispuestos a ayudar y sacarme de los apuros del día a día. Gracias al laboratorio de F. Iborra por permitirme realizar unos cuantos ensayitos y al laboratorio de Carlos F. Tornero por permitirme conocer más a mi famoso complejo.

Quiero agradecer enormemente a mi laboratorio favorito, por ser amigos, por apoyarme, ayudarme, dejarme reactivos, protocolos, por las meriendas y almuerzos...ya sabéis lo importante que sois para mí. Al resto de mis amigos del IBV, sabéis quiénes sois y lo agradecida que estoy por haberos conocido y de que estéis en mi vida. Por las cervezas, risas, quedadas y el día a día. Estoy segura de que muchos conocéis incluso más la tesis que yo misma. Estoy convencida de que allá donde estemos, en unos años, seguiremos compartiendo momentos.

A mis amigas, las de siempre, las de Alcalá, por animarme y estar siempre junto a mí. Os quiero. A mis bioquímicas@s. Chicos, una menos! Ya sabéis lo agradecida que estoy por teneros en mi vida, por no dejar que el tiempo borre lo que construimos, gracias por seguir estando ahí. A los amigos que me llevo de Valencia, mil gracias a todos. No puedo explicar con palabras lo bien que me habéis acogido y lo bien que me he sentido en esta ciudad. A mi compi y amiga, por animarme y cuidarme, por recibirme siempre con una sonrisa al llegar a casa. A mi kytesurfista favorita, por ser tú, eres genial. Has estado siempre ahí para escucharme y aconsejarme. A mi catalana, por ser tan buena amiga. A Laura, gracias por todos los momentos que hemos vivido juntas. A María Jesús, gracias por estar ahí siempre. Gracias a todo este grupo de personas por estar siempre al pie del cañón. Me habéis ayudado a ser una mejor versión de mi misma.

A mi familia, mis pilares. Os debo todo lo que soy.

Esta tesis está hecha de cachitos de cada uno de ustedes.



# **ÍNDICE GENERAL**



# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	13
ABREVIATURAS	15
<b>RESUMEN</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>25</b>
<b>RESUM</b>	<b>29</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>33</b>
<b>1. Los ribosomas</b> .....	<b>35</b>
1.1. Evolución del estudio de los ribosomas .....	35
1.2. Estructura y composición del ribosoma procariota y eucariota .....	36
<b>2. Biogénesis del ribosoma eucariota</b> .....	<b>40</b>
2.1. Transcripción del ADN ribosomal e inicio del procesamiento .....	41
2.2. Procesamiento transcripcional y ensamblaje de la subunidad menor ribosomal....	44
2.3. Procesamiento transcripcional y ensamblaje de la subunidad mayor ribosomal ....	46
2.3.1. Estadios tempranos del procesamiento.....	46
2.3.2. Estadios intermedios de procesamiento.....	47
2.3.3. Estadios finales de procesamiento y exportación al citoplasma .....	47
2.3.4. Maduración citoplasmática.....	47
<b>3. El complejo PeBoW</b> .....	<b>49</b>
3.1. Erb1 .....	50
3.2. Nop7.....	53
3.3. Ytm1 .....	54
3.4. Interacciones y formación del complejo PeBoW .....	57

<b>4. Enfermedades humanas relacionadas con la biogénesis ribosomal .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. La biogénesis ribosomal y su relación con cáncer.....</b>	<b>62</b>
4.1.1. Biogénesis ribosomal como diana contra el cáncer .....	65
4.1.2. Bloqueo del complejo PeBoW como estrategia antitumoral.....	67
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>69</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
<b>1. Clonaje y construcciones en <i>E.coli</i> .....</b>	<b>75</b>
1.1. Plásmidos y oligonucleótidos.....	75
1.2. Amplificación de fragmentos por PCR y su purificación .....	76
1.3. Clonaje independiente de ligación (LIC).....	78
1.4. Transformación en células <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ químicamente competentes y selección de transformantes .....	78
1.5. Construcciones de las proteínas de interés en <i>E.coli</i> .....	79
<b>2. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> .....</b>	<b>80</b>
2.1. Transformación en cepas de expresión .....	80
2.2. Ensayos de expresión de proteínas a pequeña escala en bacterias.....	81
2.3. Sobreexpresión de proteínas recombinantes a gran escala en bacterias .....	82
2.3.1. Sobreexpresión por IPTG.....	82
2.3.2. Sobreexpresión por autoinducción .....	83
<b>3. Expresión de proteínas en células de insecto mediante baculovirus.....</b>	<b>83</b>
<b>4. Purificación de proteínas y caracterización de proteínas.....</b>	<b>84</b>
4.1. Pruebas de expresión de proteínas a pequeña escala .....	84
4.2. Purificación de proteínas a gran escala .....	85
4.2.1. Lisis celular y extracción de proteínas.....	85
4.2.2. Cromatografía de afinidad para proteínas con etiqueta de Histidinas .....	85
4.2.3. Cromatografía de afinidad para proteínas con etiqueta de GST.....	86

4.2.4. Purificación de proteínas con etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP) ..	86
4.2.5. Cromatografía de afinidad usando columnas de heparina .....	86
4.2.6. Cromatografía de intercambio iónico .....	87
4.2.7. Digestión de la etiqueta .....	87
4.2.8. Cromatografía de exclusión molecular.....	88
4.2.9. Cuantificación de proteínas.....	90
4.2.10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y en condiciones nativas (Native-PAGE) .....	90
<b>4.3. Caracterización por sistema de dispersión de luz multiángulo (MALS) y dispersión de luz dinámica (DLS) .....</b>	<b>91</b>
<b>5. Péptidos sintéticos.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Experimentos de unión <i>in vitro</i> .....</b>	<b>93</b>
6.1. Ensayos de precipitación .....	93
6.2. Ensayos de Interferometría de bicapa (BLI) .....	93
6.2.1. Ensayos de interferencia por péptidos sintéticos .....	95
6.3. Entrecruzamiento de proteínas .....	96
6.4. Ensayos de estabilidad térmica de proteínas en presencia de péptidos sintéticos ..	97
6.5. Termoforesis a microescala (MST) .....	98
<b>7. Caracterización estructural .....</b>	<b>99</b>
7.1. Dispersión de Rayos X de ángulo reducido (SAXS) .....	99
7.2. Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (NS-TEM) .....	102
7.2.1. Procesado de las muestras de NS-TEM .....	103
7.3. Crio-microscopía electrónica .....	103
7.4. Ensayos de cristalización .....	104
7.4.1. Recogida y procesado de datos cristalográficos .....	104
7.5. Procesamiento para análisis y representación de estructuras y secuencias .....	106
<b>8. Ensayos realizados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>107</b>
8.1. Plásmidos, oligonucleótidos y cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	107

8.2. Transformación para integración de producto de PCR en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	108
8.3. Extracción de ADN genómico de levaduras y comprobación por PCR .....	109
8.4. Extracción de proteínas de levaduras.....	109
8.5. Purificación por afinidad en tándem (TAP) .....	110
<b>9. Experimentación en células de mamífero .....</b>	<b>112</b>
9.1 Cultivos de células de mamífero .....	112
9.2. Ensayo de viabilidad celular .....	112
9.3. Estudios de apoptosis celular .....	113
9.3.1. Ensayos de activación de caspasas.....	113
9.3.2. Ensayos por citometría de flujo.....	114
9.4. Caracterización del estado celular .....	114
9.5. Estudios de la integridad del ADN celular.....	116
9.6. Ensayos de fluorescencia.....	117
<b>10. Identificación de proteínas por Western Blot .....</b>	<b>118</b>
10.1. Anticuerpos utilizados.....	118
10.2. Transferencia a membrana, bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado	119
 <b>IV. RESULTADOS - PARTE I</b>	 <b>121</b>
<b>1. Reconstitución del complejo PeBoW de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>123</b>
1.1. Expresión y purificación de las proteínas Erb1, Ytm1 y Nop7 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	123
1.2. Caracterización de la interacción de Nop7/Erb1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> requeridas para la formación del complejo PeBoW ..	125
1.3. Reconstitución <i>in vitro</i> del heterotrímero Nop7/Erb1/Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	130
2. Resolución estructural del complejo Nop7/Erb1/Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	133

2.1. Envoltura del complejo PeBoW por SEC-SAXS.....	134
2.2. Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (NS-TEM).....	140
2.3. Estudio de las interacciones del complejo PeBoW mediante entrecruzamiento y análisis por cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas (LC-MS/MS) .....	154
<b>3. Identificación de proteínas que interaccionan con las proteínas del complejo PeBoW .....</b>	<b>158</b>
3.1. Identificación de posibles interacciones de las proteínas Nop7 e Ytm1 mediante purificación por afinidad en tándem (TAP) .....	161
3.1.1. Interacciones de Ytm1 identificados por TAP TAG.....	161
3.1.2. Interacciones de Nop7 identificados por TAP TAG .....	164
<b>IV. RESULTADOS - PARTE II</b>	<b>171</b>
1. Análisis de la superficie de interacción del complejo Erb1/Ytm1 .....	173
1.1. Escaneo de alaninas <i>in silico</i> .....	173
1.2. Diseño de péptidos sintéticos que interfieren en la interacción entre Erb1 e Ytm1 .....	177
2. Ensayos de competición de péptidos sintéticos .....	180
2.1. Análisis de la interacción directa entre las proteínas CtErb1 y CtYtm1 y los péptidos diseñados .....	182
3. Ensayos de caracterización de los efectos en la fisiología celular producidos tras la exposición a péptidos penetrantes .....	185
3.1. Ensayos de viabilidad celular y activación de caspasas.....	185
3.2. Incremento de apoptosis celular en presencia de péptidos penetrantes.....	190
3.3. Cambios fisiológicos celulares inducidos por péptidos de interferencia .....	192
3.4. Estudio de la integridad del ADN de células HCT-116 en presencia de péptidos de interferencia .....	195
3.5. Deslocalización de la nucleolina tras el tratamiento con péptidos penetrantes....	197

---

<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>199</b>
1. Estabilidad y conformación del subcomplejo Nop7 en solución.....	201
2. Búsqueda de nuevos puntos de intervención contra la biogénesis ribosomal ....	207
3. Perspectivas futuras.....	215
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>217</b>
<b>VII. ANEXO I</b>	<b>221</b>
<b>VIII. ANEXO II</b>	<b>235</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>249</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Composición de los ribosomas bacterianos y eucariotas .....	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura secundaria y terciaria del ARNr de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura cristalográfica de la subunidad menor (SSU) y mayor (LSU) ribosomal en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura de una unidad de repetición de ADNr en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 5.</b> Procesamiento del ARNr en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 6.</b> Ensamblaje de la subunidad menor ribosomal.....	<b>45</b>
<b>Figura 7.</b> Ensamblaje de la subunidad mayor ribosomal .....	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura del $\beta$ - <i>propeller</i> de Erb1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 9.</b> Interacciones de Erb1 en la prepartícula ribosomal (estadio E) con factores de ensamblaje y PRs.....	<b>52</b>
<b>Figura 10.</b> Estructura de Nop7 en el prerribosoma .....	<b>54</b>
<b>Figura 11.</b> Estructura e interacción de Ytm1 y el dominio MIDAS de Rea1 .....	<b>56</b>
<b>Figura 12.</b> Estructura del subcomplejo Nop7 en el prerribosoma y representación esquemática de los dominios estructurales de Nop7, Erb1 e Ytm1 .....	<b>57</b>
<b>Figura 13.</b> Modelo de transporte del complejo PeBoW .....	<b>58</b>
<b>Figura 14.</b> Interacción Erb1/Ytm1 .....	<b>60</b>
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática de la biogénesis ribosomal en condiciones normales y estrés nucleolar .....	<b>64</b>
<b>Figura 16.</b> Esquema del ensayo de Interferometría de bicapa (BLI).....	<b>94</b>
<b>Figura 17.</b> Representación esquemática de un experimento de SEC-SAXS.....	<b>99</b>
<b>Figura 18.</b> Esquema de la purificación por afinidad en tándem .....	<b>110</b>
<b>Figura 19.</b> Purificaciones de las proteínas Erb1, Nop7 e Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>124</b>
<b>Figura 20.</b> Caracterización de la interacción entre Erb1 y Nop7 .....	<b>126</b>
<b>Figura 21.</b> Caracterización de la interacción entre Erb1/Nop7 y Erb1/Ytm1 .....	<b>127</b>
<b>Figura 22.</b> El extremo amino-terminal de Erb1 interacciona con Nop7 <i>in vitro</i> .....	<b>129</b>
<b>Figura 23.</b> Purificación de los complejos ScPeBoW y CtPeBoW.....	<b>131</b>
<b>Figura 24.</b> Las proteínas del complejo PeBoW se asocian de forma estable.....	<b>132</b>
<b>Figura 25.</b> Perfil de intensidad de señal de ScPeBoW y CtPeBoW mediante SEC-SAXS .....	<b>135</b>
<b>Figura 26.</b> Representación del análisis de los datos de dispersión de SEC-SAXS de los complejos ScPeBoW y CtPeBoW .....	<b>136</b>

<b>Figura 27.</b> Mapa de densidad electrónica <i>ab initio</i> originado a partir de los datos procesados de SEC-SAXS mediante la herramienta DENSSWeb .....	<b>138</b>
<b>Figura 28.</b> Envolturas obtenidas por SEC-SAXS de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> .....	<b>139</b>
<b>Figura 29.</b> Superposición del complejo <i>PeBoW</i> prerribosomal en la envoltura SAXS de <i>ScPeBoW</i> .....	<b>140</b>
<b>Figura 30.</b> Purificación de muestras de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> .....	<b>141</b>
<b>Figura 31.</b> Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de <i>ScPeBoW</i> .....	<b>143</b>
<b>Figura 32.</b> Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de <i>CtPeBoW</i> .....	<b>144</b>
<b>Figura 33.</b> Superposición de la estructura cristalina de <i>CtEbr1<sub>β-propeller</sub> /CtYtm1</i> en los volúmenes obtenidos de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> obtenidos por microscopía de tinción negativa.....	<b>145</b>
<b>Figura 34.</b> Superposición de la estructura cristalina de <i>Nop7, Erb1</i> e <i>Ytm1</i> en la envoltura promedio de <i>ScPeBoW</i> y la envoltura de la clase 1 de <i>CtPeBoW</i> .....	<b>147</b>
<b>Figura 35.</b> Superposición del modelo atómico de la clase promedio de <i>ScPeBoW</i> y la clase 1 de <i>CtPeBoW</i> en las envolturas de SAXS de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> .....	<b>148</b>
<b>Figura 36.</b> Reconstrucción del complejo <i>CtPeBoW-MBP</i> .....	<b>150</b>
<b>Figura 37.</b> Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de <i>CtPeBoW-MBP</i> .....	<b>151</b>
<b>Figura 38.</b> Superposición de los modelos tridimensionales y los modelos atómicos de la clase promedio de <i>ScPeBoW</i> (A) y la clase 1 de <i>CtPeBoW</i> (B) en el volumen tridimensional de la clase 2 de <i>CtPeBoW-MBP</i> .....	<b>152</b>
<b>Figura 39.</b> Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de <i>ScPeBoW</i> en el volumen 3D de la clase 2 de <i>CtPeBoW-MBP</i> .....	<b>153</b>
<b>Figura 40.</b> Ensayo químico de entrecruzamiento de los heterotrimeros <i>CtNop7/CtErb1/CtYtm1</i> en presencia de concentraciones crecientes de agente entrecruzante sulfo-SMPB, BS <sup>3</sup> y AMAS .....	<b>155</b>
<b>Figura 41.</b> Representación de los péptidos entrecruzados en el modelo originado por tinción negativa de la clase 1 de <i>CtPeBoW</i> .....	<b>156</b>
<b>Figura 42.</b> Representación de los péptidos entrecruzados del heterotrimerico <i>ScErb1/ ScNop7/ ScYtm1</i> en la estructura con PDB ID: 6ELZ .....	<b>157</b>
<b>Figura 43.</b> Proteínas que interaccionan con <i>Erb1</i> descritas en la base de datos Uniprot .....	<b>158</b>
<b>Figura 44.</b> Identificación de proteínas que interaccionan con el complejo <i>PeBoW</i> .....	<b>160</b>
<b>Figura 45.</b> Purificación de cepas <i>Ytm1-TAP</i> y silvestre.....	<b>162</b>

<b>Figura 46.</b> Representación en círculo de las funciones de las proteínas identificadas en el TAP TAG de Ytm1.....	<b>164</b>
<b>Figura 47.</b> Purificación de cepas Nop7-TAP y silvestre .....	<b>165</b>
<b>Figura 48.</b> Identificación de las bandas de proteínas del eluído de calmodulina de la purificación de Nop7-TAP .....	<b>166</b>
<b>Figura 49.</b> Representación en círculo de las funciones de las proteínas identificadas en el TAP TAG de Nop7. ....	<b>168</b>
<b>Figura 50.</b> Co-purificación de Nop7-TAP e Ipi3-HA .....	<b>169</b>
<b>Figura 51.</b> Superficie de interacción CtErb1/CtYtm1 .....	<b>175</b>
<b>Figura 52.</b> Residuos seleccionados del escáner de alaninas <i>in silico</i> localizados en la superficie de interacción de CtErb1/CtYtm1 .....	<b>176</b>
<b>Figura 53.</b> Alineamiento de secuencia de Erb1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> (CHATD), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YEAST) y humano (HUMAN) .....	<b>177</b>
<b>Figura 54.</b> Alineamiento de secuencia de Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> (CHATD), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YEAST) y humano (HUMAN) .....	<b>179</b>
<b>Figura 55.</b> Péptidos sintéticos diseñados en base a la estructura del complejo CtErb1/CtYtm1 .....	<b>180</b>
<b>Figura 56.</b> Ensayos de competición por BLI en presencia de péptidos sintéticos .....	<b>181</b>
<b>Figura 57.</b> Curvas de interferometría de bicapa usando péptidos sintéticos biotinilados .....	<b>182</b>
<b>Figura 58.</b> Curvas de termofluor de CtYtm1 aislado y en presencia de los péptidos sintéticos P1 y P3.....	<b>183</b>
<b>Figura 59.</b> Curva de unión de CtYtm1 y péptido P1 mediante termoforesis a microescala (MST) .....	<b>184</b>
<b>Figura 60.</b> Cuantificación de la viabilidad celular y la activación de caspasas 3/7 de células de carcinoma de colon HCT-116 en presencia de los péptidos penetrantes P10hs, P11hs y PTAT .....	<b>187</b>
<b>Figura 61.</b> Cuantificación de la supervivencia celular de células HCT-116 en presencia de los péptidos de interferencia P10hs, P11hs y PTAT nuevos y conservados a 4 y -20°C .....	<b>189</b>
<b>Figura 62.</b> Detección de las distintas poblaciones celulares tras el tratamiento de 24 h con péptidos penetrantes mediante la tinción Anexina FITC V/PI por citometría de flujo .....	<b>191</b>
<b>Figura 63.</b> Caracterización de los cambios fisiológicos celulares producidos en células HCT-116 tras el tratamiento con péptidos penetrantes mediante citometría de flujo.....	<b>194</b>
<b>Figura 64.</b> Estudio de la integridad del ADN tras el tratamiento con los péptidos penetrantes P10hs y PTAT .....	<b>196</b>

<b>Figura 65.</b> Estudio de la integridad del ADN tras el tratamiento con péptidos penetrantes P11hs y PTAT.....	<b>196</b>
<b>Figura 66.</b> Deslocalización de nucleolina tras el tratamiento con 100 $\mu$ M de P10hs durante 24 h .....	<b>197</b>
<b>Figura 67.</b> Localización celular del péptido FITC-P10hs en células HCT-116 .....	<b>198</b>
<b>Figura 68.</b> Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de ScPeBoW por tinción negativa.....	<b>223</b>
<b>Figura 69.</b> Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de CtPeBoW por tinción negativa.....	<b>224</b>
<b>Figura 70.</b> Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en la envoltura promedio de CtPeBoW.....	<b>225</b>
<b>Figura 71.</b> Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de ScPeBoW (A) y clase 1 de CtPeBoW (B) en el volumen 3D de la clase 1 de CtPeBoW-MBP.....	<b>226</b>
<b>Figura 72.</b> Superposición del modelo tridimensional de la clase 1 de CtPeBoW en el volumen 3D de la clase 2 de CtPeBoW-MBP.....	<b>227</b>
<b>Figura 73.</b> Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de ScPeBoW (A) y clase 1 de CtPeBoW (B) en el volumen 3D de la clase 3 de CtPeBoW-MBP .....	<b>228</b>
<b>Figura 74.</b> Fotografía de las gradillas (izquierda) y micrografías de crio-microscopía electrónica (derecha) de los complejos CtPeBoW y CtPeBoW-MBP .....	<b>229</b>
<b>Figura 75.</b> Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de ScPeBoW por tinción negativa en colaboración con Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid) .....	<b>230</b>
<b>Figura 76.</b> Micrografías del complejo CtPeBoW obtenidas por NS-TEM en colaboración con Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid).....	<b>231</b>
<b>Figura 77.</b> Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de CtPeBoW por tinción negativa en colaboración con Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid) .....	<b>232</b>
<b>Figura 78.</b> Superposición del modelo atómico de CtPeBoW originado en colaboración con el Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid) en las envolturas de SAXS de ScPeBoW y CtPeBoW	<b>233</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Lista de cebadores empleados en este trabajo para preparar las diferentes construcciones .....	<b>75</b>
<b>Tabla 2.</b> Reacciones de PCR para la amplificación del inserto de interés con ADN polimerasas de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart y tiHybrid.....	<b>76</b>
<b>Tabla 3.</b> Protocolo de amplificación por PCR con la ADN polimerasa KAPA HiFi HotStart y tiHybrid.....	<b>77</b>
<b>Tabla 4.</b> Construcciones de las proteínas de interés utilizadas en este trabajo .....	<b>80</b>
<b>Tabla 5.</b> Tampones utilizados en las purificaciones de las proteínas en este trabajo .....	<b>88</b>
<b>Tabla 6.</b> Proteínas expresadas y purificadas a gran escala y el tipo de cromatografía usada en este estudio .....	<b>89</b>
<b>Tabla 7.</b> Ensayos de BLI realizados en este trabajo.....	<b>95</b>
<b>Tabla 8.</b> Características de los entrecruzadores utilizados en este trabajo.....	<b>97</b>
<b>Tabla 9.</b> Cepas de levaduras utilizadas en este estudio.....	<b>107</b>
<b>Tabla 10.</b> Descripción de los plásmidos empleados para etiquetar genes en levaduras. ....	<b>107</b>
<b>Tabla 11.</b> Oligonucleótidos diseñados para la transformación de proteínas en levaduras.....	<b>108</b>
<b>Tabla 12.</b> Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia .....	<b>117</b>
<b>Tabla 13.</b> Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot durante este estudio.....	<b>118</b>
<b>Tabla 14.</b> Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot durante este estudio .....	<b>118</b>
<b>Tabla 15.</b> Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de <i>CtNop7/ CtErb1</i> ; <i>ScNop7/ ScErb1</i> y <i>CtErb1/ CtYtm1</i> .....	<b>128</b>
<b>Tabla 16.</b> Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de <i>CtErb1<sub>1-435</sub>/CtNop7</i> .....	<b>129</b>
<b>Tabla 17.</b> Radio de giro (Rg), distancia máxima intramolecular (Dmax) y pesos moleculares (PM) de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> teórico y experimental calculados mediante el paquete ATSAS y el servidor SAXSMoW.....	<b>137</b>
<b>Tabla 18.</b> Análisis de la superposición de las envolturas originadas tras el procesado de SAXS de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> con los distintos modelos atómicos originados por tinción negativa....	<b>146</b>
<b>Tabla 19.</b> Mejores condiciones de entrecruzamiento de <i>CtPeBoW</i> con los entrecruzadores sulfo-SMPB, BS <sup>3</sup> y AMAS .....	<b>154</b>
<b>Tabla 20.</b> Péptidos identificados por LC-MS/MS del entrecruzamiento de <i>CtPeBoW</i> con BS <sup>3</sup> , AMAS y sulfo-SMPB.....	<b>156</b>

<b>Tabla 21.</b> Análisis de las posibles interacciones relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Ytm1-TAP por LC-MS/MS .....	<b>162</b>
<b>Tabla 22.</b> Análisis de las posibles interacciones no relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Ytm1-TAP por LC-MS/MS .....	<b>164</b>
<b>Tabla 23.</b> Análisis de las posibles interacciones relacionadas con biogénesis ribosomal de una purificación de Nop7-TAP por LC-MS/MS .....	<b>165</b>
<b>Tabla 24.</b> Análisis de las posibles interacciones no relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Nop7-TAP por LC-MS/MS .....	<b>167</b>
<b>Tabla 25.</b> % Cobertura (95) de la aparición de los componentes del subcomplejo Rix1 (Rix, Ipi3, Ipi1) y la AAA <sup>+</sup> -ATPasa Rea1 en el TAP TAG de Nop7 .....	<b>168</b>
<b>Tabla 26.</b> Valores de variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) y profundidad de cada residuo de CtErb1 y CtYtm1 de la superficie de interacción del complejo CtErb1/ CtYtm1 calculados mediante un escáner de alaninas <i>in silico</i> con el programa DrugScorePPI ( $\Delta\Delta G_{\text{cal}} = \Delta G_{\text{complejo}}^{\text{ALA}} - \Delta G_{\text{complejo}}^{\text{WT}}$ ) .....	<b>174</b>
<b>Tabla 27.</b> Péptidos sintéticos diseñados para ensayos de interacción <i>in vitro</i> proteína-proteína y ensayos celulares.....	<b>178</b>
<b>Tabla 28.</b> Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de CtYtm1-CtErb1 (+ P1/P2/P3) .....	<b>181</b>
<b>Tabla 29.</b> Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de CtErb1-CtYtm1 (+ P4/P5/P6) .....	<b>182</b>
<b>Tabla 30.</b> Valores de la constante de afinidad, asociación y disociación y errores estadísticos de ensayos BLI CtYtm1 con Biot-P1 y Biot-P3 .....	<b>183</b>

# **ABREVIATURAS**





<b>Å</b>	Angstroms
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
<b>AFs</b>	Factores de ensamblaje
<b>AMAS</b>	<i>N-α-maleimidoacet-oxysuccinimide ester</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARN pol I</b>	ARN polimerasa I
<b>ARN pol II</b>	ARN polimerasa II
<b>ARN pol III</b>	ARN polimerasa III
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico transferente
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BLI</b>	Interferometría de bicapa
<b>BME</b>	β-mercaptoetanol
<b>BSA</b>	Suero fetal bovino
<b>BS<sup>3</sup></b>	<i>bis(sulfosuccinimidyl)suberate</i>
<b>CP</b>	Protuberancia central
<b>CPT</b>	Camptotecina
<b>Ct</b>	<i>Chaetomium thermophilum</i>
<b>Cryo-EM</b>	Crio-microscopía electrónica
<b>dATP</b>	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
<b>DCF</b>	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
<b>DIBAC</b>	<i>DIBAC<sub>4</sub>(3) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol)</i>
<b>Dmax</b>	Máxima dimensión lineal o Distancia máxima intramolecular
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOXO</b>	Doxorrubicina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>dTTP</b>	<i>Deoxythymidine triphosphate</i>
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>ETS</b>	Espaciador transcrito externo

<b>FCCP</b>	<i>2-[2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]hydrazinylidene]-propanedinitrile</i>
<b>FCS-A</b>	<i>forward scatter area</i>
<b>FCS-H</b>	<i>forward scatter height</i>
<b>FITC</b>	Fluoresceína isocianato
<b>FPLC</b>	Modalidad de cromatografía líquida para proteínas de alta velocidad
<b>Fw</b>	Sentido directo ( <i>Forward</i> )
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	Agua ultrapura (bidestilada)
<b>I</b>	Intensidad de señal (relacionado con SAXS)
<b>IMAC</b>	Cromatografía de metales inmovilizados
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>ITS</b>	Espaciador transcrito interno
<b>ka</b>	Constante de asociación
<b>kb</b>	Kilopares de bases
<b>kd</b>	Constante de disociación
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de afinidad
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas ( <i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> )
<b>LIC</b>	Clonación independiente de ligación ( <i>Ligation Independent Cloning</i> )
<b>LSU</b>	Subunidad mayor del ribosoma
<b>MBP</b>	Proteína de unión a maltosa ( <i>Maltose binding protein</i> )
<b>MDa</b>	MegaDalton
<b>miRISC</b>	MicroARNs de interferencia
<b>MST</b>	Termoforesis a microescala
<b>MW</b>	Marcador de pesos moleculares
<b>NMP1</b>	Nucleofosmina 1
<b>NS</b>	Nucleotesmina
<b>NSD</b>	Menor discrepancia normalizada
<b>NSR</b>	Respuesta de estrés nucleolar
<b>NS-TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa
<b>NTS</b>	Espaciador no transcrito
<b>O.D.</b>	Densidad óptica

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> ). También utilizada en referencia al código de acceso de estructuras en la misma base de datos.
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PET</b>	Túnel de salida de la cadena polipeptídica
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>Pol</b>	Polimerasa
<b>PP</b>	<i>PreScission protease</i>
<b>PR</b>	Proteína ribosomal
<b>P(r)</b>	Función de distribución
<b>PTC</b>	Centro peptidiltransferasa
<b>q</b>	Amplitud del vector de dispersión
<b>Rg</b>	Radio de giro
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Rv</b>	Sentido opuesto ( <i>Reverse</i> )
<b>S</b>	Coficiente de sedimentación
<b>SAXS</b>	Dispersión de Rayos X de ángulo reducido
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular
<b>siRNA</b>	ARNs pequeños de interferencia
<b>snoRNAs</b>	ARNs pequeños nucleolares
<b>SSU</b>	Subunidad menor del ribosoma
<b>Sulfo-SMPB</b>	<i>Sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidophenil)butyrate</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>t-BHP</b>	<i>tert-butylhidroperoxide</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris Buffered Saline</i>

<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Td</b>	Temperatura de desnaturalización
<b>Tm</b>	Temperatura de fusión ( <i>melting temperatura</i> )
<b>TMRM</b>	<i>tetramethylrhodamine methyl ester</i>
<b>UBL</b>	Dominio parecido a ubiquitina
<b>VC</b>	Volúmenes de columna
<b>WB</b>	Western Blot

# RESUMEN



La biogénesis ribosomal es uno de los procesos más complejos, esenciales y costosos energéticamente de la célula eucariota. La formación de las subunidades ribosomales en levaduras comienza en el nucléolo con la transcripción del ARNr. En este proceso se requiere la participación de más de doscientos factores de ensamblaje y ARNs pequeños nucleolares (snoARNs) que no formarán parte del ribosoma maduro aunque son necesarios para un apropiado procesamiento del ARNr y organización estructural de las subunidades ribosomales. Los estudios estructurales de los estadios de maduración de la subunidad 60S han permitido la identificación de algunas interacciones funcionales entre los distintos factores de ensamblaje. Entre ellos se encuentran las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1 que forman un heterotrímero discreto denominado subcomplejo Nop7 en levaduras, o complejo PeBoW en mamíferos, compuesto por los ortólogos Pes1, Bop1 y WDR12, respectivamente. Este complejo puede detectarse de forma aislada de las partículas prerribosomales. La formación de este heterotrímero es esencial para el ensamblaje de la subunidad 60S ya que garantizan la correcta maduración del extremo 5' del ARNr 5,8S facilitando así su asociación con el ARNr 25S, aunque se desconoce en detalle el papel exacto en la biogénesis ribosomal. En este trabajo se ha realizado un análisis de las interacciones entre los componentes del PeBoW así como una aproximación a la resolución estructural del complejo en solución. Usando una combinación de técnicas biofísicas, nuestros resultados indican que la conformación estructural que adopta el complejo PeBoW en el nucleoplasma es diferente a la descrita en el contexto prerribosomal. Además, se han identificado posibles funciones que podría estar ejerciendo el complejo PeBoW o bien las distintas proteínas del complejo de forma aislada fuera del prerribosoma.

Asimismo se conoce que la biogénesis ribosomal es un mecanismo altamente regulado y estrechamente relacionado con crecimiento y proliferación celular. La imperiosa necesidad de síntesis de ribosomas y proteínas que tiene una célula tumoral convierte a este proceso en un punto débil de la misma. Por esta razón, hay un gran interés para estudiar la biogénesis ribosomal como diana terapéutica contra el cáncer. Se ha observado que la paralización de esta vía es capaz de promover la activación no genotóxica del supresor tumoral p53, a diferencia de los efectos indeseados que provocan las terapias convencionales contra el cáncer. Como primer paso hacia el desarrollo de herramientas inhibitoras de la biogénesis del ribosoma, hemos utilizado la información cristalográfica que poseíamos del complejo de *Chaetomium thermophilum* entre los factores de ensamblaje Erb1 e Ytm1 para realizar una selección guiada por la estructura de péptidos de interferencia. Los péptidos de interferencia han sido analizados *in vitro* para determinar su capacidad de interacción utilizando técnicas biofísicas. Además, se han generado péptidos de interferencia con la secuencia humana de Erb1/Ytm1 para evaluar

sus efectos en cultivo de células de cáncer de colon HCT-116. Nuestros resultados indican que el estrés ribosómico se puede inducir en diferentes etapas del proceso de maduración al dirigirse a las interacciones proteína-proteína, elevándolas como una alternativa al uso de inhibidores de la ARN pol I.



# **ABSTRACT**



Ribosomal biogenesis is a complex, essential and one of the most energy consuming processes in eukaryotic cells. The assembly of the ribosomal subunits, in yeast, starts with the RNA transcription inside the nucleolus. This process requires the participation of more than two hundred assembly factors and small nucleolar RNAs (snoRNAs) that will not be part of the mature ribosome, however, they are still necessary to perform the appropriate rRNA processing and structural management. The structural studies on the maturation stages of the 60S subunit have shown functional interactions between different assembling factors. Nop7, Erb1 and Ytm1 form a discrete heterotrimer called Nop7 subcomplex in yeast, or PeBoW in mammals, composed by the respective orthologues Pes1, Bop1 and WDR12. This complex can be found isolated from the pre-ribosomal particles. The presence of this complex is crucial to the 60S subunit assembling, once it ensures the correct maturation of the 5' end of the rRNA 5,8S, supporting the association with the 25S rRNA. Yet, the details of the PeBoW complex role in ribosomal biogenesis remain unknown. Hereafter, there are some analysis of interaction assays between the PeBoW component proteins, as well as an approach to structural of the complex in solution. Using different biophysical techniques, the results suggest that PeBoW complex adopts a different conformation in the nucleoplasm than the described in the pre-ribosomal context. Furthermore, it hints some other functions of the PeBoW complex, or the isolated component proteins out of the pre-ribosome path.

Besides that, the ribosomal biogenesis is a highly regulated process and strictly related with cellular growth and proliferation. The mandatory demand of ribosome and protein synthesis of tumoral cells make this process a weak point of it. This is the reason why ribosomal biogenesis as cancer treatment target is a point of great interest. According to some studies, it is expected that the interruption of this pathway can lead the non-genotoxic activation of the tumor suppressor p53, unlike other conventional cancer therapies. As a first step to development of ribosomal biogenesis inhibiting tools, the structural information of Erb1 and Ytm1 in *Chaetomium thermophilum* complex, was taken to design structure-guided interfering peptides. Using biophysical techniques, the interfering peptides were evaluated *in vitro* to determine their interaction ability. Then, human-sequenced Erb1/Ytm1 interfering peptides were designed to look over the effects on colon cancer cells HCT-116. The results indicate that the ribosomal stress can be induced in different stages of the maturation process, by approaching protein-protein interactions, planting it as an alternative to RNA pol I inhibitors.



# RESUM



La biogènesi ribosomal és un dels processos més complexos, essencials i costosos energèticament de la cèl·lula eucariota. La formació de les subunitats ribosomals en llevats comença en el nuclèol amb la transcripció de l'ARNr. En aquest procés es requereix la participació de més de dos-cents factors d'assemblatge i ARNs xicotets nucleolars (snoARNs) que no formaran part del ribosoma madur encara que són necessaris per a un apropiat processament de l'ARNr i organització estructural de les subunitats ribosomals. Els estudis estructurals dels estadis de maduració de la subunitat 60S han permès la identificació d'algunes interaccions funcionals entre els diferents factors d'assemblatge. Entre ells es troben les proteïnes Nop7, Erb1 i Ytm1 que formen un heterotrímer discret denominat subcomplex Nop7 en llevats, o complex PeBoW en mamífers, compost pels ortòlegs Pes1, Bop1 i WDR12, respectivament. Aquest complex pot detectar-se de forma aïllada de les partícules prerribosomals. La formació d'aquest heterotrímer és essencial per a l'assemblatge de la subunitat 60S ja que garanteix la correcta maduració de l'extrem 5' de l'ARNr 5,8S facilitant així la seua associació amb l'ARNr 25S, encara que es desconeix detalladament el paper exacte en la biogènesi ribosomal. En aquest treball s'ha realitzat una anàlisi de les interaccions entre els components del PeBoW així com una aproximació a la resolució estructural del complex en solució. Utilitzant una combinació de tècniques biofísiques, els nostres resultats indiquen que la conformació estructural que adopta el complex PeBoW en el nucleoplasma és diferent a la descrita en el context prerribosomal. A més, s'han identificat possibles funcions que podria estar exercint el complex PeBoW o bé les diferents proteïnes del complex de forma aïllada fora del prerribosoma.

Així mateix es coneix que la biogènesi ribosomal és un mecanisme altament regulat i estretament relacionat amb creixement i proliferació cel·lular. La imperiosa necessitat de síntesi de ribosomes i proteïnes que té una cèl·lula tumoral converteix a aquest procés és un punt feble d'aquesta. Per aquesta raó, hi ha un gran interès per a estudiar la biogènesi ribosomal com a diana terapèutica contra el càncer. S'ha observat que la paralització d'aquesta via és capaç de promoure l'activació no genotòxica del supressor tumoral p53, a diferència dels efectes indesitjats que provoquen les teràpies convencionals contra el càncer. Com a primer pas cap al desenvolupament d'eines inhibidores de la biogènesi del ribosoma, hem utilitzat la informació cristal·logràfica que posseïem del complex de *Chaetomium thermophilum* entre els factors d'assemblatge Erb1 i Ytm1 per a realitzar una selecció guiada per l'estructura de pèptids d'interferència. Els pèptids d'interferència han sigut analitzats in vitro per a determinar la seua capacitat d'interacció utilitzant tècniques biofísiques. Així mateix, s'han generat pèptids d'interferència amb la seqüència humana de Erb1/Ytm1 per a avaluar els seus efectes en cultiu

de cèl·lules de càncer de còlon HCT-116. Els nostres resultats indiquen que l'estrès ribosòmic es pot induir en diferents etapes del procés de maduració en dirigir-se a les interaccions proteïna-proteïna, elevant-les com una alternativa a l'ús d'inhibidors de l'ARN pol I.



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. Los ribosomas

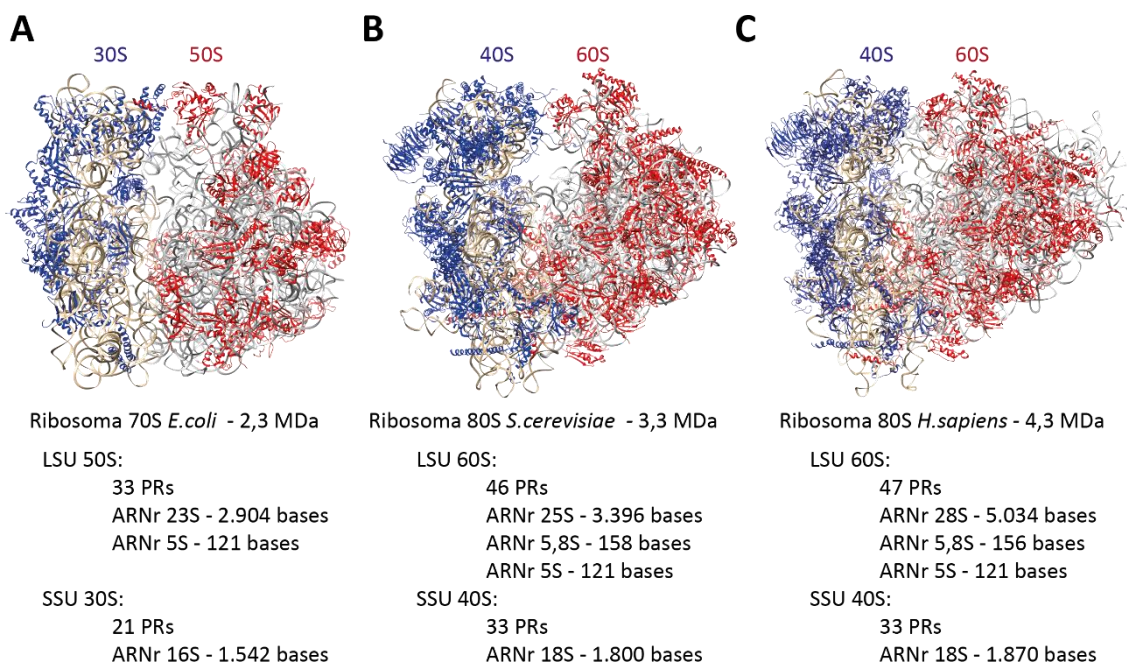
### 1.1. Evolución del estudio de los ribosomas

La capacidad de todos los organismos vivos de traducir la información genómica en proteínas funcionales es un complejo proceso resultado de billones de años de evolución. El flujo de información desde el ADN a proteína requiere una orquestada organización de tres procesos fundamentales para la vida: replicación, transcripción y traducción. El libro publicado por Francis Crick en 1958, *On protein synthesis*, basado en la idea “un gen - un ribosoma - una proteína”, expresó por primera vez el dogma central de la biología molecular: la información genética contenida en el ADN se transcribe a ARN y éste se traduce a proteínas [1].

El sistema de traducción se lleva a cabo por máquinas celulares de síntesis de proteínas conocidas como ribosomas. Los ribosomas han sido el foco de atención de numerosos estudios biofísicos y estructurales en los últimos 50 años. Fueron inicialmente descritos en 1955 por George E. Palade que describió por primera vez a pequeños orgánulos celulares libres o anclados a la membrana del retículo endoplasmático, nombrados como microsomas, en tempranas imágenes capturadas por microscopía electrónica [2]. Posteriormente, el término ribosoma fue acuñado durante un simposio de la Sociedad de Biofísica en 1958 [3]. En los años 60, con el descubrimiento del ARN mensajero (ARNm), se alzó la figura anteriormente marginada del ribosoma como la máquina celular de síntesis de proteínas [4]. Sin embargo, se extendió la visión extrema de que los ribosomas eran estructuras no especializadas que sintetizaban la proteína dictada por el mensajero. La idea de homogeneidad estructural de los ribosomas, designados como mediadores pasivos de regulación, se extendió en las décadas posteriores. En esa época incluso era arriesgado publicar estudios que sugirieran algo discrepante [5,6]. En las décadas de 1980 y 1990, comenzaron a surgir indicios de una mayor dinámica y modularidad de los componentes ribosomales con el estudio de múltiples organismos como *Dictyostelium discoideum* con modificaciones postraduccionales de varias proteínas ribosomales (PRs) [7] y en *Arabidopsis thaliana* que poseía múltiples parálogos de las proteínas ribosomales debido a duplicaciones del genoma [8,9], entre otros.

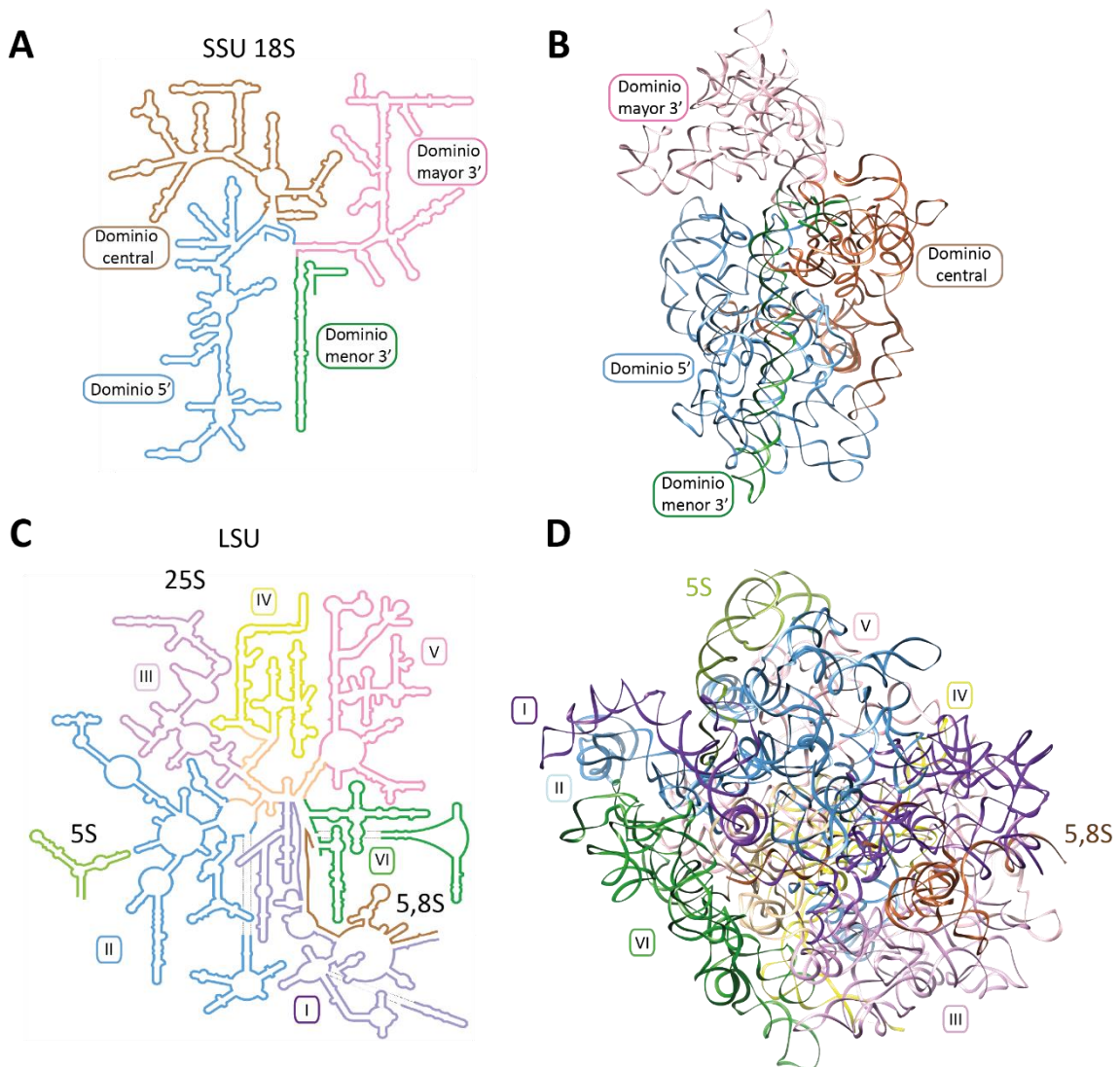
## 1.2. Estructura y composición del ribosoma procariota y eucariota

Los ribosomas son grandes complejos ribonucleoproteicos celulares encargados de la traducción del ARNm en cadenas polipeptídicas. A pesar de la conservación de su estructura central y función a lo largo de todos los reinos de la vida, los ribosomas procariotas y eucariotas difieren en tamaño y composición. Varían sustancialmente el ratio ARN/proteína y el peso molecular que oscila entre 2,3 MDa en bacteria a 4,3 MDa en eucariotas superiores [10]. Los ribosomas citosólicos eucariotas 80S (Svedberg, coeficiente de sedimentación) contienen dos subunidades ribosomales compuestas por ARN ribosomal (ARNr) y PRs. La subunidad pequeña (SSU; 40S) formada por los ARNr 18S y 33 PRs y la subunidad mayor (LSU; 60S), que es casi el doble de tamaño que la SSU, formada por los ARNr 25-28S, 5,8S y 5S y 46 PRs en levaduras y 47 en humanos. En cambio, el ribosoma 70S de bacterias y arqueas presenta la subunidad pequeña 30S con el ARNr 16S y la subunidad mayor 50S con los ARNr 23S, 5S y 21 y 33 PRs, respectivamente, en el caso de *Escherichia coli* (*E.coli*) (Figura 1) [10–12]. Sin embargo, la composición estructural y funcional de los ribosomas mitocondriales (mitorribosomas) es diferente a los bacterianos y citoplasmáticos. Los mitorribosomas de mamífero 55S presentan la LSU 39S y la SSU 28S con varias PRs específicas [13,14].



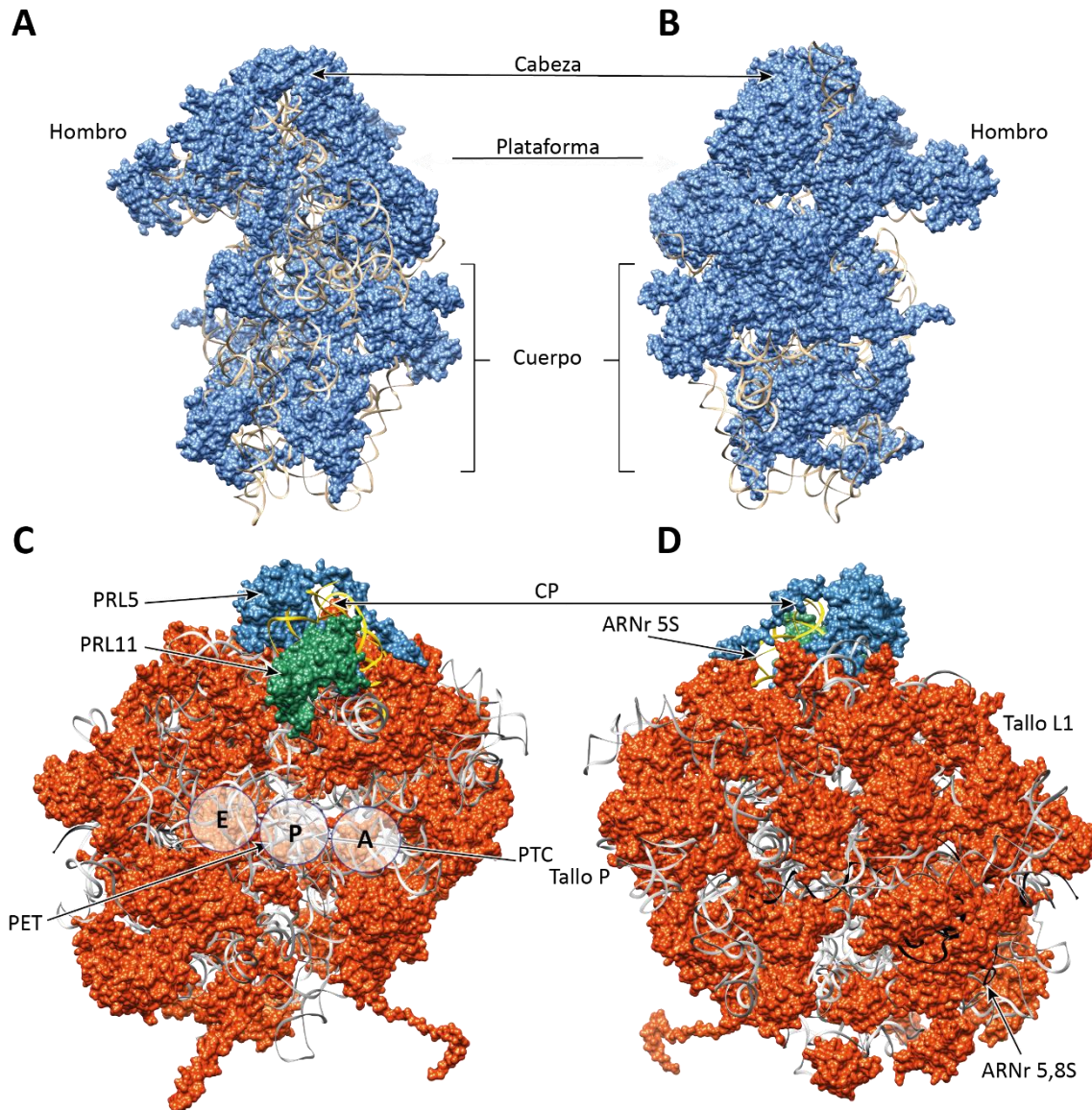
**Figura 1. Composición de los ribosomas bacterianos y eucariotas.** (A) Ribosoma 70S de *Escherichia coli* (PDB ID: 6Y69). (B) Ribosoma 80S de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 4V88). (C) Ribosoma 80S humano (PDB ID: 6QZP). Las PRs de la subunidad mayor ribosomal (LSU) se encuentran en color rojo y el ARNr en color plateado. Las PRs de la subunidad menor (SSU) en color azul y el ARNr en color dorado. Figura modificada de Melnikov *et al.*, 2012 [10] usando los PDBs 6Y69; 4V88; 6QZP.

En la estructura de los ribosomas, el ARN ocupa el núcleo de cada subunidad y las PRs se encuentran agregadas a lo largo de su superficie. El ARNr 18S contiene 4 dominios conservados de estructura secundaria conocidos como dominio 5', central, 3' mayor y 3' menor. El ARNr 25S junto con el 5S forman 6 dominios estructurales (I-VI) que se pliegan en estructuras terciarias junto con las PRs en las partículas ribosomales maduras (**Figura 2**). En la subunidad SSU, el ARNr 18S junto con las PRs forman varias estructuras tridimensionales conocidas como cuerpo, hombro, plataforma y cabeza. La LSU presenta la protuberancia central, el tallo L1 y el tallo L7/L12 (talco P en eucariotas) (**Figura 3**) [10,15].



**Figura 2. Estructura secundaria y terciaria del ARNr de *Saccharomyces cerevisiae*.** (A y B) Estructura secundaria (A) y estructura terciaria del ARNr 18S (B). Los colores de los dominios en la SSU son: dominio central, marrón; dominio menor 3', verde; dominio mayor 3', rosa; dominio 5', celeste. (C y D) Estructura secundaria (C) y estructura terciaria del ARNr 25S con 6 dominios (I-VI) compactados junto con el ARNr 5,8S y el ARNr 5S (D). Los colores de los dominios del ARNr 25S son: I, morado; II, azul, III, lila, IV, amarillo, V, rosa, VI, verde oscuro. El ARNr 5S en verde claro y ARNr 5,8S en marrón. Las estructuras secundarias

fueron obtenidas de <http://aepollo.chemistry.gatech.edu/RibosomeGallery>. Las estructuras terciarias de todos los ARNr provienen de la estructura cristalográfica PDB ID: 4V88.



**Figura 3. Estructura cristalográfica de la subunidad menor (SSU) (A,B) y mayor (LSU) (C,D) ribosomal en *Saccharomyces cerevisiae*.** (A y C) Interfaz de superficie de las subunidades SSU y LSU, respectivamente. (B y D) Superficies expuestas al solvente de la SSU y LSU, respectivamente. El ARNr 18S y 25S están en plateado, el ARNr 5S, en amarillo, englobado entre las PRs L5 (azul) y L11 (verde) y el ARNr 5,8S en color negro. CP: protuberancia central; PET: túnel de salida de la cadena polipeptídica; PTC: centro peptidiltransferasa. Estructura cristalográfica adaptada de Ben-Shem *et al.*, 2011 [16]; PDB ID: 4V88. Figura modificada de De La Cruz *et al.*, 2015 [12].

El núcleo estructural del ribosoma está altamente conservado presentando varios sitios funcionales: el centro de decodificación en la SSU, encargado del proceso de decodificación al mediar la información contenida en los codones del ARNm con los anticodones del ARNt para dirigir la síntesis del polipéptido naciente; el centro peptidiltransferasa (PTC) en la LSU, que



cataliza la formación del enlace peptídico; el túnel de salida de la cadena polipeptídica (PET) a través de la subunidad 60S; el sitio de unión GTP en LSU; el sitio de entrada del ARNm y los sitios de unión del ARN transferente (ARNt) (A, P y E) formado por ambas subunidades. En el sitio A se une el aminoacil-ARNt, posteriormente el sitio P mantiene el ARNt comenzando la síntesis de la cadena polipeptídica y en el sitio E se disocia el ARNt del ribosoma (**Figura 3**) [11,17].

La síntesis de proteínas es un proceso altamente regulado en la célula que se puede dividir en 4 etapas principales: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de los ribosomas. En cada una de ellas participan diferentes factores proteicos [10]. Durante el proceso de traducción, varios ribosomas se ensamblan a un ARNm formando grandes complejos helicoidales conocidos como polirribosomas o polisomas en bacterias y en eucariotas [18,19].

El entendimiento del proceso de traducción ha avanzado en las últimas décadas con la determinación de estructuras tridimensionales por cristalografía de Rayos X y crio-microscopía electrónica (cryo-EM). Estos métodos se complementaron gracias a la implementación de técnicas de purificación por afinidad en tándem [20–22], doble y triple híbrido en levaduras [23], entrecruzamientos de factores de ensamblaje [24], entre otros, que permitieron el aislamiento y caracterización de varios intermediarios de las partículas ribosomales en formación. De esta forma, se pudo establecer una línea temporal de formación y composición de las prepartículas ribosomales [25,26]. La primera estructura del ribosoma a gran resolución resuelta por cristalografía de rayos X fue a 2,4 Å de la subunidad 50S de la arquea *Haloarcula marismortui* [27]. Un año más tarde, se publicó la estructura de la LSU 50S de la bacteria *Deinococcus radiodurans* a 3,1 Å [28]. También se publicaron las estructuras de la subunidad menor 30S y del ribosoma completo 70S de la bacteria *Thermus thermophilus* [29], del ribosoma 70S de *E.coli* [30] así como la subunidad 40S del organismo eucariota *Tetrahymena thermophila* [31]. En 2011, se determinó la estructura cristalográfica del ribosoma 80S de *Saccharomyces cerevisiae* a 3 Å de resolución. Este modelo describió la localización y la arquitectura de todas las proteínas específicas eucarióticas y las interacciones entre las subunidades ribosomales [16]. En los últimos años, ha habido un crecimiento exponencial de deposición de estructuras por cryo-EM en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) de los grandes complejos ribosomales. La primera reconstrucción fue de la subunidad pre-60S de levaduras en 2012 [32] continuándose con la resolución de numerosos intermediarios de las prepartículas ribosomales [33–35]. La estructura del mitorribosoma [36] y la estructura a alta resolución del ribosoma 80S humano se publicaron en 2015 [37]. En resumen, todas las estructuras disponibles de los organismos citados anteriormente, como de otros, *Drosophila*, levaduras, plantas y mamíferos, han permitido la

caracterización de las PRs y el estudio de la asociación con el ARNr en la formación de las subunidades ribosomales [12].

## 2. Biogénesis del ribosoma eucariota

La biogénesis ribosomal es uno de los procesos más complejos, esenciales y costosos energéticamente de la célula cuyo mecanismo está conservado desde levaduras hasta mamíferos. Además, es un mecanismo altamente regulado y estrechamente relacionado con el crecimiento y proliferación celular [25,26,38,39].

La formación del ribosoma eucariota comenzó a estudiarse en los años 1960 y 1970 con el aislamiento de algunos precursores de ARNr (pre-ARNr) asociados con proteínas formando grandes complejos ribonucleoproteicos [38,39]. Debido a la disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares, este mecanismo ha sido extensamente estudiado y caracterizado en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Se conoce que en levaduras en fase exponencial de crecimiento, el 80% de todo el ARN de la célula es ARNr, el 15% ARNt y el 5% restante es ARNm. La tasa de producción de ribosomas es de 2.000 ribosomas por minuto y existen aproximadamente 200.000 ribosomas/célula [40].

La formación de las subunidades ribosomales en *Saccharomyces cerevisiae* comienza en el nucléolo celular, donde el ADN ribosomal (ADNr) es transcrito por la ARN polimerasa I (ARN pol I) en un largo precursor pre-ARNr 35S (**Figura 4**). Este es procesado por cortes endo- y exonucleolíticos por la secuencial asociación y disociación de múltiples factores desde el nucléolo a través del nucleoplasma, cruzando el poro nuclear hasta el citoplasma, para dar lugar a las subunidades maduras y la formación del ribosoma 80S. La maduración ribosomal eucariota requiere la participación de más de 200 factores de biogénesis ribosomal o factores de ensamblaje (más de 500 en eucariotas superiores) y ARNs pequeños nucleolares (snoRNAs) (77 en levaduras y 300 en humanos) que no formarán parte del ribosoma maduro aunque son necesarios para un apropiado procesamiento del ARNr y organización estructural de las subunidades ribosomales [12,15,41,42]. Los snoARNs y los ARNm que codifican a las PRs son sintetizados por la ARN polimerasa II (ARN pol II) [26]. Los factores de ensamblaje incluyen una gran variedad de proteínas con actividades biológicas diversas como GTPasas, ATPasas, quinasas, nucleasas y ARN helicasas además de proteínas estructurales que actúan como soporte o chaperonas estabilizando e interaccionando con las partículas prerribosomales desde

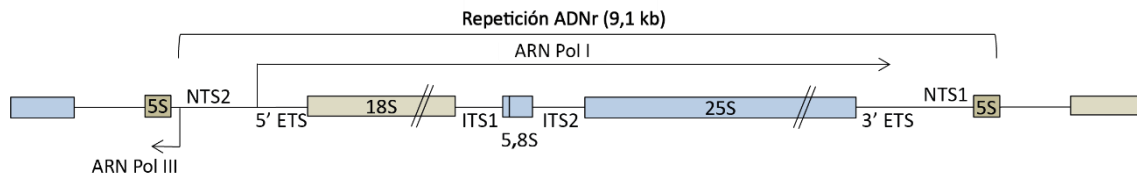


el nucléolo hasta el citoplasma [15,43]. Los snoARNs, que se activan cuando forman pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleolares (snoRNPs), producen modificaciones durante la transcripción y procesamiento del ARNr [44]. Los snoRNAs pueden clasificarse en C/D box y H/ACA-box snoARN que provocan modificaciones químicas como metilaciones o pseudouridilaciones, respectivamente, teniendo un papel fundamental en el correcto plegamiento del pre-ARNr, ensamblaje, e incluso, las interacciones con moléculas de agua [44–48].

Durante todo el procesamiento del ARNr se incorporan las sucesivas PRs que entran en el núcleo de múltiples formas: (1) de forma pasiva, (2) por transportadores que reconocen su señal de localización nuclear como la  $\beta$ -karyopherin Kap123 en levaduras [49,50], (3) mediante mecanismos específicos como la simportina no esencial Syo1 que importa las proteínas de la subunidad mayor L5 y L11 que se unen al ARNr 5S y forman el complejo ribonucleoproteico 5S (5S RNP) [51], (4) con ayuda de otros factores proteicos como la proteína Rrb1 con L3 [52,53], (5) o mediante chaperonas como Yar1 con la S3 [54].

## 2.1. Transcripción del ADN ribosomal e inicio del procesamiento

Los genes del ADNr se encuentran organizados en repeticiones en tándem en casi todos los eucariotas y, en levaduras, codifican los 4 ARNr existiendo alrededor de 100-200 copias/célula de ADNr de unos 9,1 kb cada una de ellas. El ARNr 18S, 5,8S y 25S se transcriben juntos por la ARN pol I como una cadena policistrónica dando como resultado un precursor pre-ARNr 35S. Este precursor está flanqueado por dos espaciadores externos en ambos extremos (5' ETS y 3' ETS), y contiene dos espaciadores internos: ITS1 que separa el ARNr 18S del 5S y el ITS2 entre el ARNr 5,8S y 25S. En levaduras, el ARNr 5S se encuentra dentro de la unidad de repetición de ADNr y es transcrito en dirección opuesta por la ARN polimerasa III (ARN pol III) integrándose posteriormente en la subunidad mayor ribosomal (**Figura 4**) [25,55]. En cambio, en eucariotas superiores, se encuentra localizado en un *locus* cromosomal diferente y su transcripción no ocurre en el nucléolo [56,57]. Además, el precursor del ARNr 5S sufre un procesamiento independiente del pre-ARNr 35S. Se sintetiza el extremo 5' maduro mientras que el extremo 3' posee alrededor de 12 nucleótidos extra rico en uridinas que funciona como señal de terminación del ARN [58]. El ARNr 5S maduro recluta a las proteínas ribosomales L5 y L11 para formar la ribonucleoproteína 5S (5S RNP) que se incorpora en bloque en estadios tempranos de la subunidad pre-60S [59].



**Figura 4. Estructura de una unidad de repetición de ADNr en *Saccharomyces cerevisiae*.** Cada unidad de repetición (9,1 kb aproximadamente) contiene los precursores del ARNr 18S, 5,8S y 25S que son transcritos por la ARN pol I y el ARNr 5S que es transcrito por la ARN pol III. Los sitios de inicio de la transcripción se encuentran indicados por flechas. ETS: espaciador transcrito externo; ITS: espaciador transcrito interno; NTS: espaciadores no transcritos. Figura adaptada de Fernández-Pevida, *et al.*, 2015 [55].

La ARN pol I es un complejo formado por 14 subunidades cuya actividad transcripcional da lugar al 60% de todos los transcritos nucleares [40,60]. Aunque la transcripción de las repeticiones de ADNr es catalizada con una alta eficiencia mayoritariamente por la ARN pol I, también pueden ser transcritos por la ARN pol II ya que se ha demostrado que ante un defecto en la ARN pol I, la actividad transcripcional no disminuye [61].

Los experimentos realizados a comienzos de los años 70 demostraban la idea del procesamiento post-transcripcional mostrando que se sintetizaba un precursor 35S completo dando lugar a ambas subunidades maduras [38,39]. Sin embargo, trabajos posteriores publicaron que existía un procesamiento co-transcripcional del pre-ARNr tras analizar la estructura de la cromatina a través de la técnica conocida como *Miller spreads* [62].

Por tanto, el procesamiento del pre-ARNr puede ocurrir tanto co- como post-transcripcionalmente, siendo un 70% más activo el procesamiento co-transcripcional cuando la célula está en fase exponencial de crecimiento [55].

En el procesamiento co-transcripcional, al extremo 5' del precursor pre-ARNr 35S se unen numerosos factores de ensamblaje y snoRNAs para dar lugar a grandes complejos ribonucleoproteicos de 2,2 MDa conocidos como procesoma de la subunidad pequeña o prerribosoma 90S. Los eventos de corte dentro del ITS1 (sitios de corte A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>) permiten la separación de la SSU y LSU para su posterior procesamiento (**Figura 5**) [63–65].



## 2.2. Procesamiento transcripcional y ensamblaje de la subunidad menor ribosomal

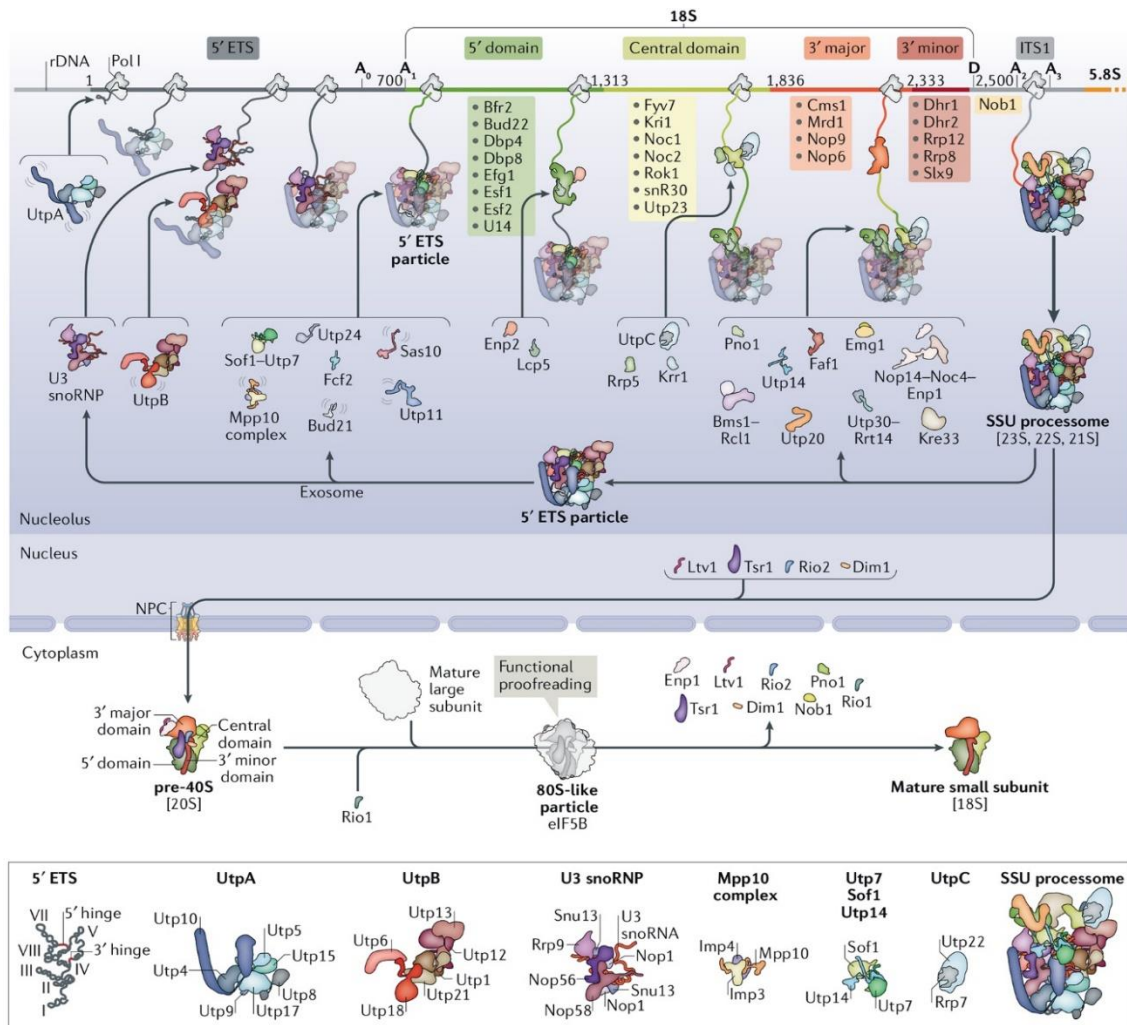
En levaduras, el procesoma de la subunidad pequeña ribosomal o prerribosoma 90S está formado por aproximadamente 70 factores de ensamblaje como endonucleasas, helicasas, ATPasas, GTPasas, proteínas ribosomales de unión temprana y varios snoRNAs como el box C/D snoRNA U3, U14, snR30 y snR10 [44,67–69]. También participan los complejos de 7 subunidades UtpA (Utp4, Utp5, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15 y Utp17) que, a su vez, permite la asociación del complejo de 6 subunidades UtpB (Utp1/Pwp2, Utp6, Utp12, Utp13, Utp18 y Utp21) y UtpC (Utp22, Rrp7, Cka1, Cka2, Ckb1, Ckb2) (**Figura 6**) [70,71].

El ensamblaje completo del procesoma permite el procesamiento del pre-RNAs 35S en el sitio de corte  $A_0$  en el extremo 5'-ETS, en el  $A_1$  al 5' final del ARNr 18S maduro y en el  $A_2$  dentro de ITS1 formando el pre-ARNr 20S y pre-ARNr 27SA<sub>2</sub> que darán lugar a la subunidad menor y mayor del ribosoma, respectivamente. Estos cortes pueden ocurrir tanto co- como postranscripcionalmente [55,65,72]. El corte  $A_0$  ocurre casi al mismo tiempo que el  $A_1$ , pero es dispensable, no es un prerrequisito para el corte  $A_1$ . Sin embargo, el corte  $A_2$  parece que sí depende de  $A_1$  [55]. Las nucleasas Rcl1 y Utp24 son esenciales para los sitios de corte  $A_1$  y  $A_2$ , sin embargo, la nucleasa responsable para el sitio de corte  $A_0$  no se ha identificado claramente [73–75].

Finalmente, después de la liberación de los factores del procesoma, la pre-partícula 43S, que ya dispone de las típicas conformaciones de cabeza, plataforma y cuerpo, junto con factores de exportación, migra al citoplasma donde se completa su procesamiento. El corte en el sitio D, catalizado por la nucleasa Nob1, genera el extremo 3' maduro del ARNr 18S. Esta escisión en el sitio D parece producirse dentro de los complejos pre-40S/60S [55]. También depende de otros factores no ribosomales como Rio1, Rio2, Tsr1 y Fap7 [76–79].

La caracterización de los sitios de corte y los intermediarios en el procesamiento del ARNr 18S se realizaron a través de estudios de purificación e identificación de complejos y análisis de mutantes de los factores de ensamblaje [65,71,80–82].

El procesamiento del ARNr 18S viene acompañado de la secuencial asociación de varias PRs y factores de ensamblaje, como ya se indicó anteriormente. Generalmente, en los primeros estadios de la transcripción (corte  $A_0$  y  $A_1$ ), las PRs comienzan a unirse al dominio 5' del ARNr 18S, lo que formará el cuerpo de la SSU. Posteriormente, se ensamblan al dominio de la cabeza (extremo 3') tras el corte  $A_2$ . También hay PRs que participan específicamente en la exportación de la prepartícula y otras en el procesamiento citoplasmático [55,83].



**Figura 6. Ensamblaje de la subunidad menor ribosomal.** Se muestran los diferentes estadios de maduración de la SSU mediante la asociación y disociación de múltiples factores de ensamblaje y snoARNs desde el nucléolo hasta las etapas finales en el citoplasma (Klinge and Woolford, 2019 [25]).

Además, numerosos factores de ensamblaje, entre 40-50, participan en el comienzo del procesamiento denominados factores tempranos como Bud22, Kri1, Cms1, Nop9, Nop6, entre otros. Posteriormente, se unen los factores intermedios para facilitar el transporte nuclear y en las etapas citoplasmáticas participan entre 10-12 factores para finalizar el ensamblaje, el procesamiento del ARNr y la formación de la partícula 40S madura (**Figura 6**) [25,83].

## 2.3. Procesamiento transcripcional y ensamblaje de la subunidad mayor ribosomal

### 2.3.1. Estadios tempranos del procesamiento

Mientras que el ensamblaje de la subunidad SSU ocurre principalmente co-transcripcionalmente, en la LSU sólo ocurre en los estadios iniciales. El corte en el sitio A<sub>2</sub> libera el pre-ARNr 27SA<sub>2</sub> que es procesado para dar lugar al ARNr 25S y 5,8S que formarán la subunidad mayor junto con el ARNr 5S [55]. El extremo 3' del 27SA<sub>2</sub> se origina tras el corte B<sub>0</sub> por la ARNasa Rnt1 que es posteriormente procesado por la exonucleasa Rex1 generando el extremo 3' maduro del ARNr 25S [84]. En este estadio comienzan a unirse factores de ensamblaje tales como ARN helicasas dependientes de ATP o metiltransferasas y PRs que, junto con modificaciones químicas al ARNr originadas por las snoRNPs, inician la compactación y plegamiento del ARNr. Algunas de las proteínas que participan en este estadio poseen dominios de unión a ARN como Rrp5, Mak21, Noc2 y Nop4. Otras, como los factores Npa1, Npa2, Rsa3 y Nop8 junto con Dbp6 tienen función estructural [25]. Además, para el plegamiento correcto del ARNr participan 6 ARN helicasas (Dbp2, Dbp3, Dbp7, Dbp9, Mak5 y Prp43) y la PR L3 que aseguran una adecuada configuración del extremo 3' (**Figura 7**). Concretamente, las PRs suelen unirse al dominio I y II del extremo 5' final del ARNr 25S/5,8S [25,85,86].

Existen dos mecanismos de procesamiento del pre-ARNr 27SA<sub>2</sub> generando los fragmentos 25S y dos formas del 5,8S: 5,8S<sub>s</sub> y 5,8S<sub>L</sub> siendo el 5,8S<sub>L</sub> 7-8 nucleótidos más largo que el 5,8S<sub>s</sub> [55]. Se desconoce cuál es el papel de la diversidad del ARNr 5,8S ya que ambas formas son funcionales y se encuentran en las subunidades 60S maduras [87]. En el mecanismo mayoritario, 85-90% de los casos, el pre-ARNr 27SA<sub>2</sub> es procesado en el sitio de corte A<sub>3</sub> (extremo 5') por la ARNasa MRP, un complejo ribonucleoproteico eucariota con un motivo catalítico de ARN, generando el pre-ARNr 27SA<sub>3</sub> [87-89]. También, los factores de ensamblaje Rat1 y Xrn1 con la proteína Rrp17 están involucrados en este paso del procesamiento generando el 27SB<sub>s</sub> y produciendo el extremo 5' del ARNr 5,8S<sub>s</sub> [55,90,91]. En el 10-15% de los casos restantes, el 27SA<sub>2</sub> es digerido directamente en el sitio de corte B<sub>1L</sub> por una endonucleasa aún desconocida generando el extremo final 5' del 5,8S<sub>L</sub> [55] (**Figura 5**). En este punto del proceso, se comienzan a unir 12 factores denominados factores A<sub>3</sub>: Ebp2, Brx1, Pwp1, Nop12, Nop7, Ytm1, Erb1, Rlp7, Nop15, Cic1/Nsa3, Drs1 y Has1 (**Figura 7**). Son proteínas esenciales ya que la delección de cualquiera de ellas produce un incremento del ARNr 27SA<sub>3</sub> y una disminución del 27SB [76,83,92-98]. A partir de ese momento, tanto los pre-ARNr 27SB<sub>s</sub> como 27SB<sub>L</sub>, comparten la misma ruta de procesamiento (**Figura 7**) [55].

### 2.3.2. Estadios intermedios de procesamiento

En el estadio intermedio se lleva a cabo la eliminación del ITS2 y la salida de la prepartícula al citoplasma. La supresión del ITS2, que se encuentra entre los precursores del ARNr 25S y 5,8S, comienza por el sitio de corte C<sub>2</sub>. Dicho corte, producido de forma post-transcripcional por el complejo Las1 (Las1-Grc3-Rat1-Rai1) junto con los factores Nsa2 y Nog2/Nug2, genera los pre-ARNr 7S y 25,5S (**Figura 5**) [55,72,99–101]. La eliminación del ITS2 se combina con la formación del PET y PTC. En este estadio, los factores de ensamblaje tempranos salen del ribosoma como los factores Nsa1, Ytm1 y Erb1 liberados por la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rix7 y Rea1 (**Figura 7**) [12,34,102–104] provocando un remodelamiento que permite la asociación de PRs alrededor de PET, en los dominios I y III del ARNr, y el ensamblaje de otros factores con el PTC [83].

### 2.3.3. Estadios finales de procesamiento y exportación al citoplasma

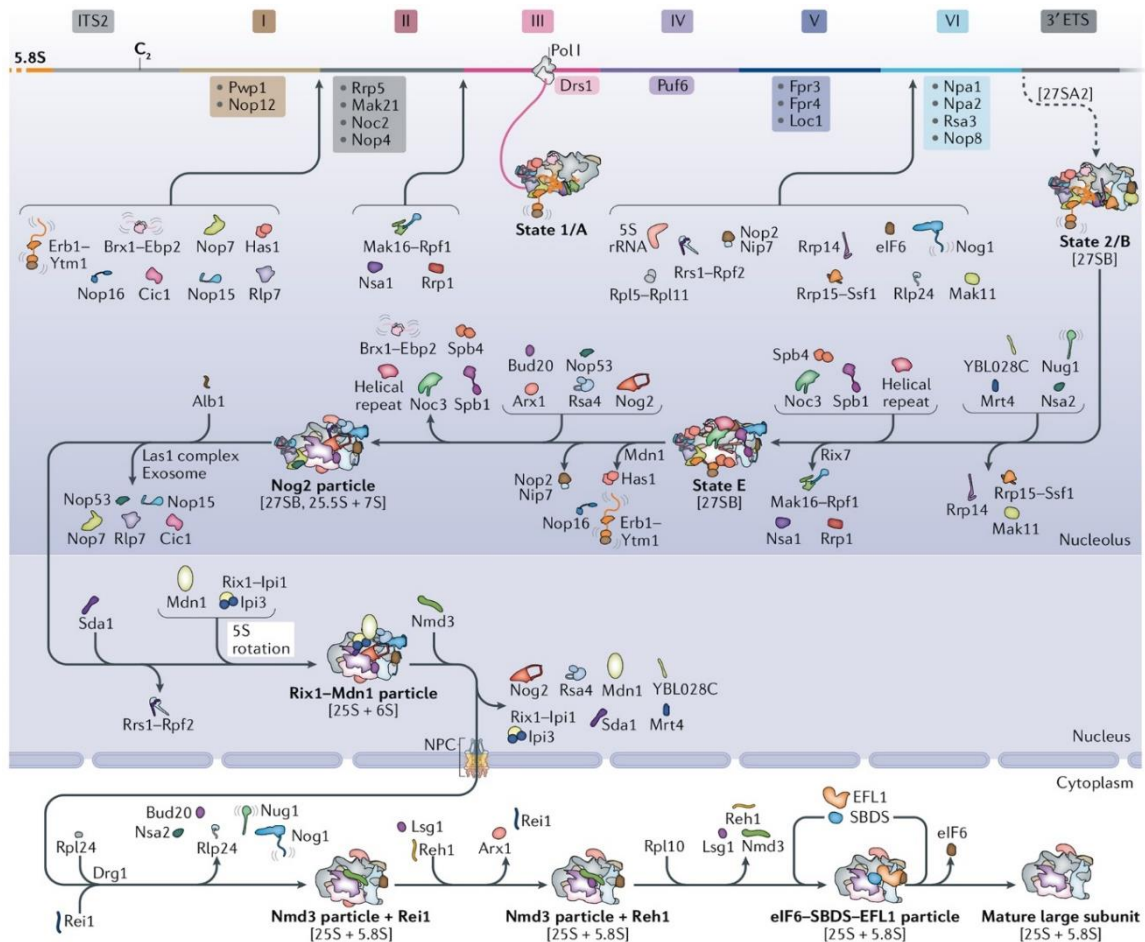
El procesamiento del extremo 5' del pre-ARNr 25,5S por la quinasa Grc3, las nucleasas Rat1 y Rai1 y la proteína Rrp17 lo transforman en el ARNr 25S maduro. Además, los extremos 3' del pre-ARNr 7S generados tras el corte C<sub>2</sub>, se procesan por el exosoma nuclear, complejo multiproteico de 14 subunidades, y los factores Nop53 y Mtr4 para formar el pre-ARNr 6S. Específicamente, la proteína Rrp4 corta el extremo 3' del pre-ARNr 7S dejando una extensión de 30 nucleótidos y, posteriormente, la Rrp6 elimina 8 nucleótidos más originando el pre-ARNr 6S (**Figura 5**) [43,55].

Además sucede un remodelamiento del CP que contiene a la 5S RNP y el ensamblaje final del dominio V del ARNr 25S [12]. La incorporación de la 5S RNP se produce por la acción de las proteínas Rpf2 y Rrs1. Durante las últimas etapas nucleares, la 5S RNP gira aproximadamente 180° hasta su posición madura tras la eliminación de las proteínas Rpf2 y Rrs1 mediadas por la acción de Rea1, subcomplejo Rix1, Rsa4 y la GTPasa Nog1 y Nog2 (**Figura 7**) [33,34].

### 2.3.4. Maduración citoplasmática

Finalmente, estas prepartículas migran al citoplasma a través de los complejos del poro nuclear y la acción de varios factores de ensamblaje como Arx1, Alb1, Rrp12, Bud20, Nmd3, Mtr2, Mex67, Npl3 y Gle2 [105]. En esta etapa, las PRs suelen localizarse cerca de la CP, del PTC

y en la superficie de la interfaz con la subunidad menor para finalizar la maduración de la prepartícula LSU [83]. Ya en el citoplasma, las exonucleasas Ngl2 y Rex1-3 catalizan el procesamiento del ARNr 6S para formar el ARNr 5,8S maduro (**Figura 7**) [25].



**Figura 7. Ensamblaje de la subunidad mayor ribosomal.** Se muestran los distintos estadios de maduración de la partícula ribosomal 60S y la consecutiva asociación y disociación de factores de ensamblaje desde los inicios más tempranos de procesamiento en el nucléolo hasta las etapas finales de maduración en el citoplasma. Se representan 6 intermediarios de las partículas prerribosomales caracterizados por cryo-EM: estadio 1/A; 2/B; E; partícula Nog2; partícula Rix1-Mdn1 y partículas Nmd3. NPC: complejo poro nuclear (Klinge and Woolford, 2019 [25]).

La caracterización de las distintas partículas prerribosomales intermediarias ha sido posible por la purificación de factores de ensamblaje etiquetados, espectrometría de masas y mutantes condicionales [22,106–108]. Se pueden clasificar los intermediarios de la subunidad mayor ribosomal en 6 estadios diferentes guiados por las estructuras resueltas por cryo-EM: estado 1, estado A o partículas Nsa1 y Rpf1 (estado 1/A) (PDB ID: 6EM3, 5Z3G, 6EM4), estado



2/B o partículas Nsa1/Nop2 (PDB ID: 6C0f), estado E (PDB ID: 6ELZ), partículas Nog2 (PDB ID: 3JCT), partículas Rix1-Mdn1 (PDB ID: 5JCS) y partículas Nmd3 (PDB ID: 5H4P) [25]. En la **Figura 7** se muestran los intermediarios de las prepartículas LSU y los factores de ensamblaje que se asocian y disocian a lo largo de la maduración. En los estadios 1/A y 2/B comienzan a formarse los dominios I, II y VI del ARNr 25S, la escisión del ITS2 y el acoplamiento del 5S RNP. En los estadios siguientes se ensamblan los dominios III, IV y V del ARNr, el PET, el CP y, por último, el PTC [22,109]. Cuando llegan al citoplasma, se liberan los factores de ensamblaje y se completa el procesamiento de los sitios funcionales [25].

### 3. El complejo PeBoW

Nop7, Erb1 e Ytm1 son factores de ensamblaje que forman un heterotrímero discreto denominado subcomplejo Nop7, en levadura, o complejo PeBoW en mamífero, compuesto por los ortólogos Pes1, Bop1 y WDR12, respectivamente. Este complejo puede detectarse de forma aislada de las partículas prerribosomales y es fundamental para una correcta maduración de la subunidad ribosómica 60S [93,94,110,111]. Los tres componentes garantizan la correcta maduración del extremo 5' del ARNr 5,8S facilitando así su asociación con el ARNr 25S en el ribosoma maduro [112]. Además, sus componentes establecen interacciones proteína-proteína y proteína-ARN que podrían ayudar al plegamiento y estabilización de la estructura terciaria del dominio I y III del ARNr 25S, cerca del ITS2 [34,112]. En este trabajo, a todos los efectos, se hace referencia al subcomplejo Nop7 y complejo PeBoW, para levaduras y mamíferos, indistintamente.

Como se indicó en el apartado 2.3.1, las proteínas del complejo PeBoW pertenecen a un conjunto de factores de ensamblaje denominados factores A<sub>3</sub>. Estos factores están implicados en la eliminación del ITS1 del pre-ARNr 27SA<sub>3</sub> durante los estadios tempranos de biogénesis de la LSU, en la correcta maduración del extremo 5' del ARNr 5,8S maduro, en facilitar la unión de varias PRs con el pre-ARNr 25S en las prepartículas ribosomales y en tener un papel estructural en la biogénesis ribosomal [83,113,114]. La asociación de la mayoría de estos factores con las prepartículas ribosomales es interdependiente. La pérdida de alguno de ellos afecta a la asociación estable y el reclutamiento de varias PRs (RPL17, RPL26, RPL35 y RPL37) requeridas para el corte C<sub>2</sub> y de los factores Drs1 y Has1. Además, dicha pérdida causa efectos en el procesamiento del pre-ARNr 27SA<sub>3</sub> y la reducción del 27SB<sub>5</sub> y el 5,8S<sub>5</sub>, sin embargo, los niveles del pre-ARNr 27SB<sub>L</sub> y 5,8S<sub>L</sub> no se ven afectados [112,115]. Ninguno de ellos presenta actividad

enzimática salvo las DEAD-box ARN helicasas Drs1 y Has1 [112]. Asimismo, la ausencia de los factores A<sub>3</sub> no afecta a la presencia de las nucleasas Rat1 y Xrn1 pero sí a la asociación de la exonucleasa Rrp17 que procesa el pre-ARNr 27SA<sub>3</sub> a 27SBS<sub>5</sub> [83,115].

Las proteínas del subcomplejo Nop7 y su función en la biogénesis ribosomal están altamente conservadas desde levaduras hasta humanos [94,116–120]. Además de su participación en la biogénesis ribosomal, a sus ortólogos en humanos también se le han atribuido la participación en otras funciones celulares como proliferación celular, segregación cromosómica y tumorigénesis colorrectal [118,121–125].

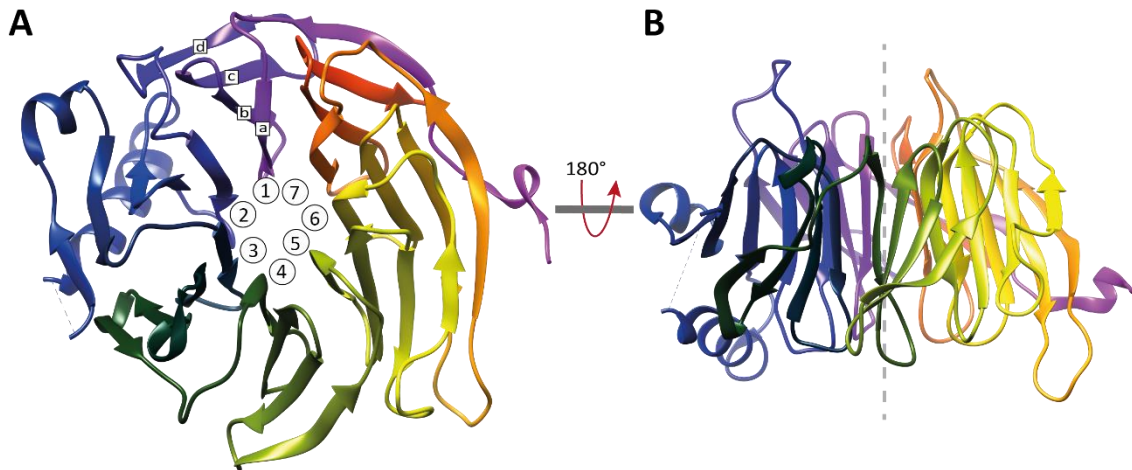
### 3.1. Erb1

Erb1, *Eukaryotic ribosome biogenesis 1* o Bop1, *Block of proliferation 1*, en eucariotas superiores, es una proteína de expresión ubicua, localizada en el nucléolo y altamente conservada caracterizada por primera vez en ratón [123,126,127]. En el estudio realizado por Strezoska *et al.*, 2000 desarrollaron un mutante de Erb1 sin los primeros 231 aminoácidos que producía una parada en la fase G1 del ciclo celular y una disminución de los ARNr 25S y 5,8S [127]. Otro mutante con el N-terminal truncado mostró que tanto Erb1 como su homólogo en mamíferos, Bop1, eran esenciales para la biogénesis ribosomal sin perjudicar a la formación de la subunidad menor ribosomal [126]. Además, la expresión de un mutante dominante negativo, Bop1 $\Delta$ , en ratón, no sólo bloqueaba la síntesis de la subunidad mayor ribosomal sino que también actuaba como un fuerte inhibidor de la progresión del ciclo celular a través de la respuesta de p53, implicando a esta proteína en la regulación de la biogénesis ribosomal [123].

Por otra parte, la sobreexpresión de Bop1 afectaba negativamente a la proliferación celular y a los niveles celulares de las proteínas Nop7 e Ytm1 demostrando que Erb1 es una proteína esencial para la formación del subcomplejo Nop7 [111]. También, se ha relacionado una inactivación de Bop1 y Pes1 con una inestabilidad cromosomal y una mitosis aberrante en células de cáncer de colon [124]. Además, se ha encontrado una sobreexpresión de Erb1 en la mayoría de los tumores hepatocelulares [128].

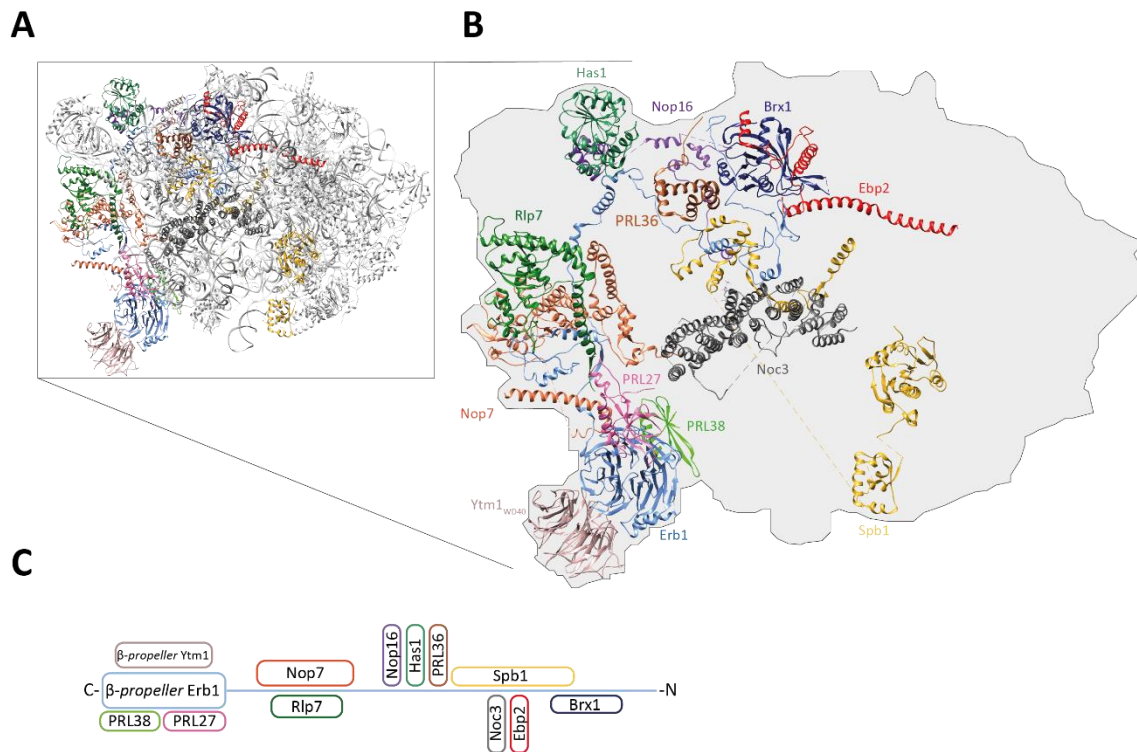
Respecto a su función en biogénesis ribosomal, en un estudio se construyeron diversos mutantes de su extremo amino terminal para estudiar sus efectos en la composición y formación de los ARNr. Se demostró que Erb1 interactuaba con el dominio I, III y V del ARNr 25S facilitando la organización del ARNr 25S y el plegamiento del ARNr 5,8S así como en elementos

de remodelación previos a la eliminación del ITS2 [129]. Por otra parte, mutaciones en el extremo C-terminal también afectaba a la eliminación del ITS1 al perjudicar la interacción de Erb1-Ytm1 y su asociación al prerribosoma [93,94,130].



**Figura 8. Estructura del  $\beta$ -propeller de Erb1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScErb1).** (A y B) Visión frontal (A) y lateral (B) de la estructura de los 7 dominios estructurales (con repeticiones WD40) compuestos por 4 láminas  $\beta$  antiparalelas (a-d) que forman un dominio  $\beta$ -propeller. Modificada de Węgrecki *et al.*, 2015 [131]. PDB ID: 4U7A.

Erb1 presenta una mitad con 7 repeticiones WD40 que forman un dominio  $\beta$ -propeller en el extremo carboxi-terminal y otra mitad con una región amino-terminal extensa con la señal de localización nuclear (con residuos cargados positivamente) y una secuencia conservada PEST en posición central [94,116,121,127,129,131]. Los motivos PEST, encontrados principalmente en proteínas nucleares, son grupos de aminoácidos cargados (Prolina y ácido glutámico y/o aspártico) que forman bucles flexibles [132]. Las repeticiones WD40 no son frecuentes en bacteria, aunque sí son bastante abundantes en eucariotas [133]. Son repeticiones entre 40-50 residuos de longitud que suelen contener un dipéptido de Triptófano-Aspártico (WD) y cada repetición se pliega en 4 láminas u hojas  $\beta$  antiparalelas que tienden a cerrarse y formar un hueco en el centro originando una superficie rígida [134,135]. Las láminas están conectadas entre sí a través de lazos de longitud variable. La nomenclatura de la primera lámina designada con la letra d forma parte del dominio estructural agrupado n-1 seguido de las tres láminas a, b y c del siguiente dominio n (**Figura 8**) [136]. En general, las proteínas con dominios  $\beta$ -propellers suelen estar involucradas en funciones de regulación celular y en interacciones proteína-proteína [135,137].



**Figura 9. Interacciones de Erb1 en la prepartícula ribosomal (estadio E) con factores de ensamblaje y PRs.** (A) Estructura terciaria del estadio de maduración E de la subunidad mayor ribosomal. (B) Estructura terciaria en forma de lazos de las proteínas que interactúan con Erb1 en el estadio E. (C) Descripción esquemática de las interacciones de Erb1 a lo largo de su estructura. Figura modificada de Kater *et al.*, 2017 [22]; PDB ID: 6ELZ.

En el contexto prerribosomal, el extremo amino terminal de Erb1 se extiende a lo largo de la prepartícula interactuando con numerosos factores de ensamblaje (Nop7, Nop16, Has1, Spb1, Brx1, Ebp2 y Noc3) así como con dominios de ARNr y PRs (Rlp7) (**Figura 9**) [22]. Aún se desconoce de forma detallada cómo se produce la entrada y asociación de Erb1 en las primeras etapas de la biogénesis ribosomal y cómo se facilita la liberación de su extremo N-terminal al encontrarse tan extendido a lo largo de la prepartícula. Sin embargo, se conoce que la salida de muchos factores de ensamblaje del prerribosoma está acoplada a la salida de Erb1 [22,25]. Por otra parte, el extremo C-terminal interactúa con el dominio  $\beta$ -*propeller* de Ytm1. Además, la disociación de Erb1 junto con Ytm1 del prerribosoma es necesario para la posterior unión de Nop53 y el acoplamiento del exosoma para el corte C<sub>2</sub> [25,138]. También se ha relacionado a Erb1 con otros factores de ensamblaje como Noc2, Urb1, Drs1 y Nog1 mediante experimentos de purificación por afinidad en tándem, coimmunoprecipitación y ensayos de doble híbrido [139,140]. Asimismo, se ha demostrado la interacción de forma ARN dependiente del homólogo en humanos de la DEAD-box helicasa Drs1, Ddx27, al complejo PeBoW, concretamente con Bop1 y Pes1 (Nop7 en humanos), en ensayos de co-precipitación de extractos celulares [141].

### 3.2. Nop7

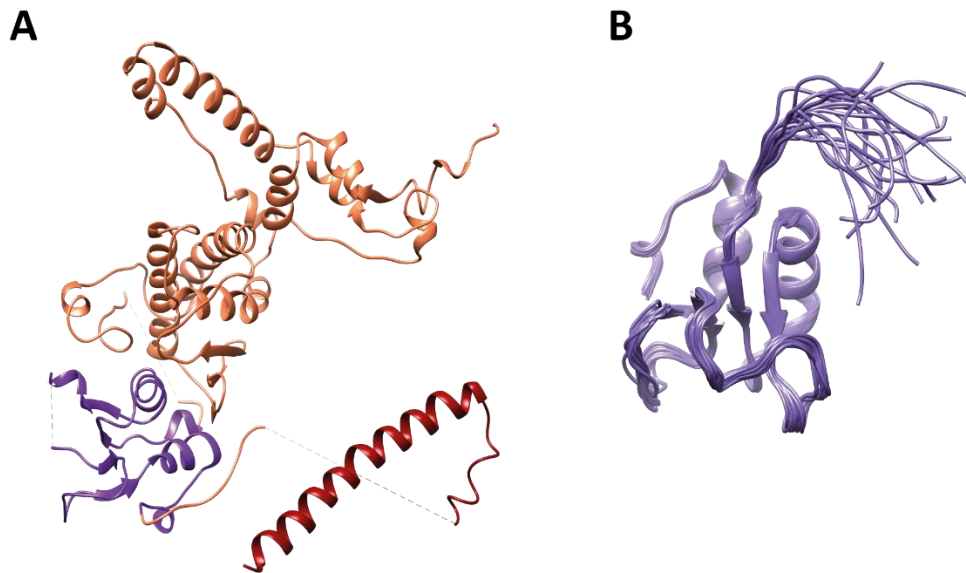
Nop7, *nuclear protein 7* o Pes1, *Pescadillo-homolog 1*, en eucariotas superiores, es una proteína altamente conservada desde levaduras a humanos necesaria para la viabilidad celular [113,142]. Se caracterizó por primera vez en el organismo modelo pez cebra como proteína esencial para el desarrollo embriogénico. Se demostró que mutaciones en el gen *pescadillo* (*pes*) ocasionaba una disminución del tamaño ocular y un crecimiento deficiente del cerebro y de las vísceras en los primeros días del desarrollo. Sin embargo, en el organismo adulto solamente se encontraba en los ovarios. Estos resultados indicaban un papel autónomo de Nop7 durante la proliferación en tejidos celulares específicos [143]. Además, se ha encontrado a Nop7 altamente expresada en el núcleo de células hepáticas de embriones de ratón y también involucrada en el desarrollo de las raíces de *Arabidopsis thaliana* [144,145].

Por otra parte, se ha descrito que la delección completa de Nop7 implicaba un desarrollo aberrante del organismo *Xenopus laevis* sugiriendo que su función está conservada [146]. También se ha relacionado a Nop7 con la proteína fosfatasa Yph1p, requerida para la esporulación en levaduras [147]. Curiosamente, extractos celulares tratados con inhibidores de proteasas disociaban al subcomplejo Nop7 de los prerribosomas en formación [93]. Asimismo, se ha identificado a Pes1 como un factor de unión y activador del elemento respuesta a cadmio en el promotor hemo oxigenasa-1 en células epiteliales renales [148].

Por otra parte, Nop7 también está implicada en el ensamblaje nucleolar, inestabilidad cromosomal, regulación génica, formación del citoesqueleto y proliferación celular [117,124,149–151]. De hecho, se ha detectado una alta expresión de Pes1 en astrocitomas humanos y en otros tipos celulares [142]. Además, se ha descrito que la continua inactivación de Pes1 aumenta la mitosis anormal en células de adenocarcinoma colorrectal [124] y produce una disminución de la reparación de daño al ADN en células de cáncer colorrectal [152]. De tal modo que, defectos de expresión de Nop7 provoca defectos en la biogénesis ribosomal y en proliferación celular [94].

Además de su implicación en todos estos procesos, Nop7 se relacionó por primera vez con la biogénesis ribosomal en un estudio publicado por Adams *et al.*, en 2002. La inactivación de Nop7 afectaba al procesamiento del pre-ARNr 27S y, por tanto, a la formación de la LSU [117]. En la partícula prerribosomal, Nop7 interacciona con el dominio III del ARNr 25S uniéndose a Erb1 a través de los residuos 52-484 colaborando en el ensamblaje de la LSU y liberándose de la prepartícula antes del sitio de corte C<sub>2</sub> del ITS2 [94,112].

Nop7 contiene en el extremo N-terminal una secuencia conservada denominada *pescadillo* de función desconocida, en la parte central un dominio BRCT (BRCA1 C-terminal), dos motivos para modificaciones postraduccionales por SUMO-1-3, 3 señales de localización nuclear y dos *coiled coil* (**Figura 10**) [94,144,153,154]. El dominio BRCT, identificado por primera vez en la región C-terminal de la proteína BRCA1, ha sido descrito en multitud de proteínas y se ha propuesto que media interacciones proteína-proteína. Además, se encuentra en proteínas involucradas en reparación de daño al ADN y control del ciclo celular [144,155–157]. En Nop7, este dominio es esencial para la localización nucleolar y el procesamiento del ARNr [153,157]. De hecho, se ha demostrado que en cepas de levaduras que presentaban mutaciones en el dominio BRCT de Nop7, tenían retrasos en la progresión del ciclo celular [142]. El dominio BRCT de Nop7, resuelto por resonancia magnética nuclear (RMN) (PDB ID: 2EP8), está formado por un núcleo central de 4 hebras  $\beta$  paralelas rodeado por varias  $\alpha$ -hélices [158].



**Figura 10. Estructura de Nop7 en el prerribosoma.** (A) Estructura resuelta por cryo-EM sustraída de la preparícula ribosomal en el estadio E. Figura modificada de Kater *et al.*, 2017 [22]; PDB ID: 6ELZ. El dominio BRCT se muestra en morado y el *coiled coil 2* (CC2) en rojo. (B) Estructura del dominio BRCT resuelto por RMN de la proteína humana Pes1. PDB ID: 2EP8.

### 3.3. Ytm1

Ytm1 en levaduras o WDR12, *WD repeat domain 12*, en eucariotas superiores, se caracterizó por primera vez en *S.cerevisiae* como una proteína de unión a microtúbulos ya que la sobreexpresión de Ytm1 en levaduras producía inestabilidad cromosómica [159]. Como se ha nombrado anteriormente, Ytm1 y su homólogo WDR12, son proteínas de localización nucleolar

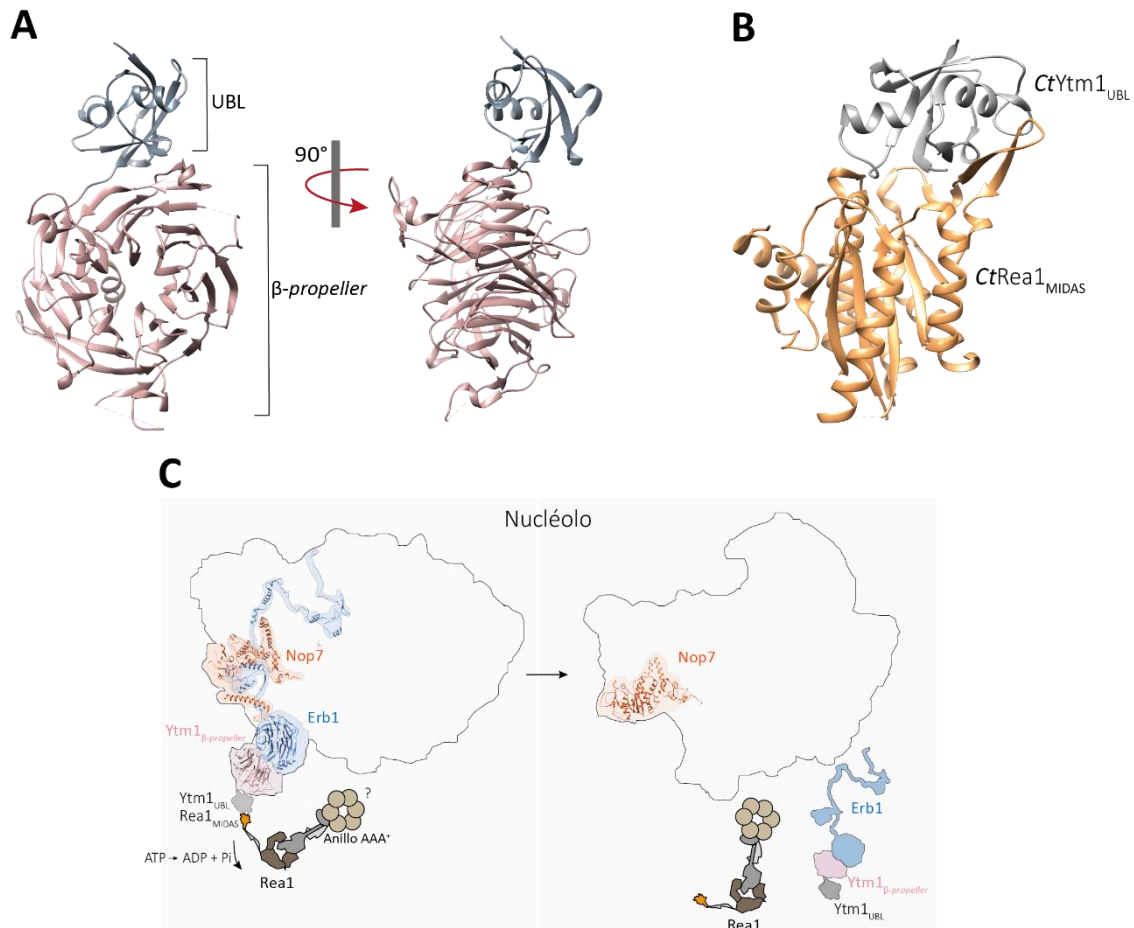
que forman un complejo estable con las proteínas Nop7 y Erb1 (Pes1 y Bop1 en mamíferos) [93,159,160]. De hecho, la función mejor caracterizada de Ytm1 es su participación en la biogénesis de la subunidad mayor ribosomal a través de su interacción con Erb1 mediada por sus dominios  $\beta$ -*propellers* [94,130]. Sin embargo, también se ha relacionado a Ytm1 con otras funciones celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que WDR12 se expresaba de forma ubicua durante la embriogénesis y con altos niveles en el timo y los testículos de ratones adultos [118]. Por otra parte, WDR12 también está relacionado con proliferación celular. Se ha publicado que contribuye al progreso de hepatocarcinoma y glioblastoma [161,162]. Asimismo, se ha descrito que está sobrerregulado en fallos de corazón y deterioro de la función cardiaca en ratas adultas [163].

La proteína Ytm1 contiene un pequeño dominio parecido a ubiquitina (UBL) en el extremo N-terminal, un dominio  $\beta$ -*propeller* en el C-terminal con 7 repeticiones WD40 y una señal de localización nuclear (SN) entre la tercera y cuarta repetición (**Figura 11A**) [102,164]. Además, se han descrito varios mutantes de los distintos dominios de Ytm1. En el mutante WDR12 $\Delta$ NI, sin el dominio UBL, se inhibía la proliferación celular pero WDR12 continuaba manteniendo su localización nucleolar [165]. Además, las mutaciones en la zona de interacción de Ytm1 con Erb1 afectaba a la asociación estable de ambas proteínas lo que conducía a una acumulación del pre-ARNr 27SA<sub>3</sub> [130].

Respecto a su papel en la biogénesis ribosomal, se conoce que la disociación del factor Ytm1 del prerribosoma se produce a través de la acción de la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1. La AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1, Midasin (Mdn1) en mamíferos, se une al dominio UBL de Ytm1 a través de su dominio MIDAS y libera al complejo Ytm1/Erb1 de la partícula prerribosomal en los primeros estadios de procesamiento de la LSU. La hidrólisis de ATP producida por esta proteína genera las fuerzas mecanoquímicas para impulsar a Ytm1 y a su proteína asociada Erb1 (**Figuras 11B y 11C**) [22,102,109,121]. La salida de Ytm1/Erb1 por Rea1 impulsa también a los factores Nop16 y Has1 provocando el reclutamiento de Nop53 y el exosoma para el procesamiento del separador ITS2 [102,109].

Por otra parte, Ytm1 es estructuralmente homóloga al factor Rsa4 (Nle en eucariotas superiores) que también contiene un dominio parecido a ubiquitina en el extremo N-terminal y un dominio WD40 en el C-terminal. Asimismo, interacciona a través del UBL con el dominio MIDAS de Rea1 liberándolo de la partícula prerribosomal en un paso posterior. El dominio UBL tanto de Ytm1 como de Rsa4 contiene un residuo glutámico conservado (E80) que coordina un ión Mg<sup>2+</sup> y cinco residuos conservados más del dominio MIDAS (DxSxS-x<sub>70</sub>-T-x<sub>30</sub>-(S/T)DG) de Rea1

[166]. La creación del mutante dominante letal Ytm1 E80A impide la liberación del complejo Erb1/Ytm1. Este hecho imposibilita el reordenamiento de los dominios IV y V del ARNr no produciéndose la eliminación del separador ITS2 y bloqueando el proceso de maduración de la LSU [22].

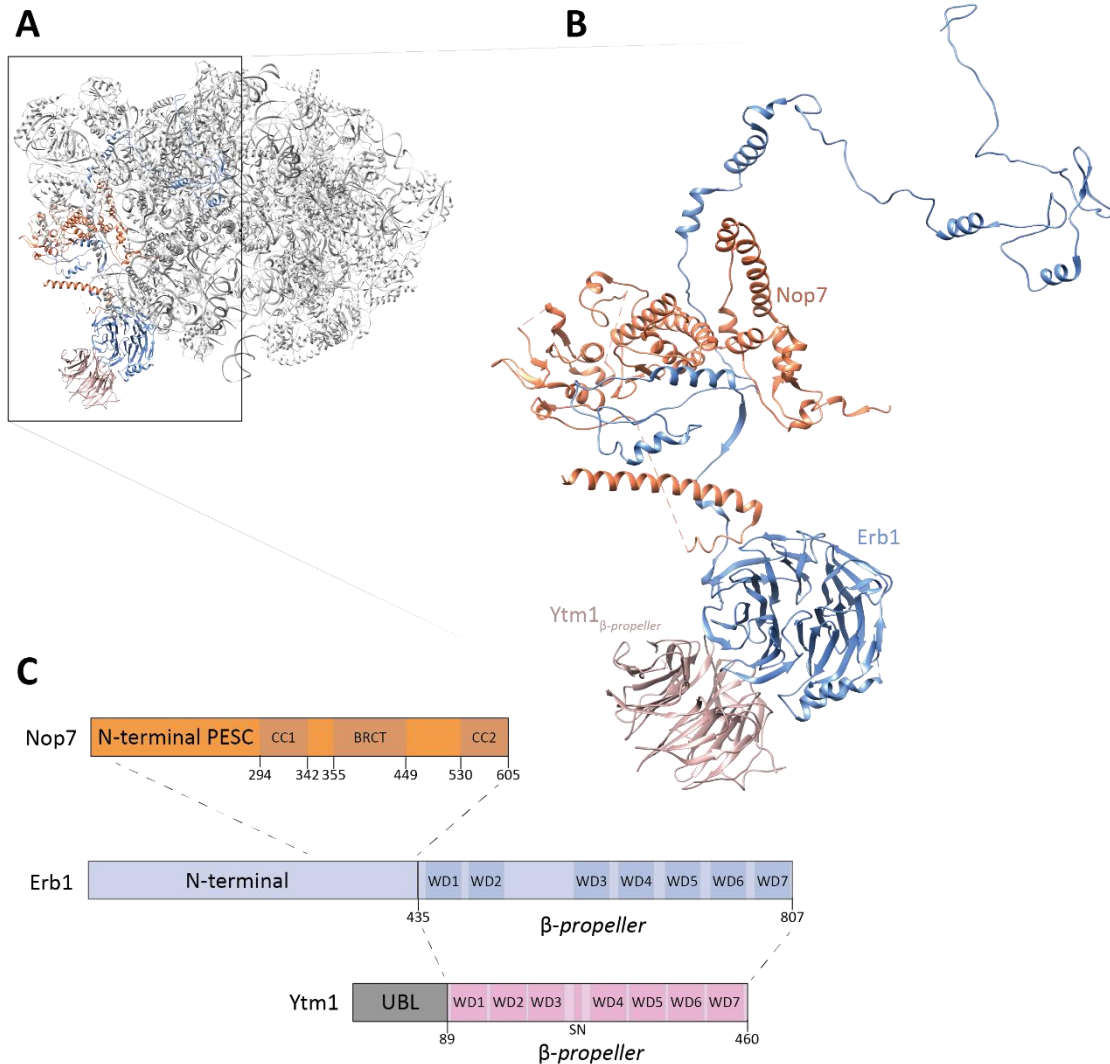


**Figura 11. Estructura e interacción de Ytm1 y el dominio MIDAS de Rea1.** (A) Estructura cristalográfica de Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* (CtYtm1) en posición frontal (izquierda) y lateral (derecha). Figura modificada de Wegrecki, *et al.*, 2015 [130]; PDB ID: 5CXB. (B) Estructura cristalográfica del dominio MIDAS de Rea1 y el dominio UBL de Ytm1 de *Ct*. Figura modificada de Ahmed *et al.*, 2019 [167]; PDB ID: 6QTB. (C) Representación esquemática de la reacción de liberación del complejo Erb1/Ytm1 de la prepartícula ribosomal por parte de la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1 (estado E- partícula Nog2). La interacción del dominio MIDAS con el dominio UBL de Ytm1 genera fuerzas mecanoquímicas tras la hidrólisis de ATP que liberan a Erb1/Ytm1 provocando un reordenamiento de la partícula. Se muestran las envolturas de LSU linealizadas del estado E, izquierda, (PDB ID: 6ELZ) y partícula Nog2, derecha (PDB ID: 3JCT).



### 3.4. Interacciones y formación del complejo PeBoW

En el contexto prerribosomal, Erb1 es el componente central del complejo PeBoW interactuando con Ytm1 a través de sus motivos WD40 conservados y con Nop7 a través de su mitad amino-terminal (**Figura 12**) [22,94,111,168].

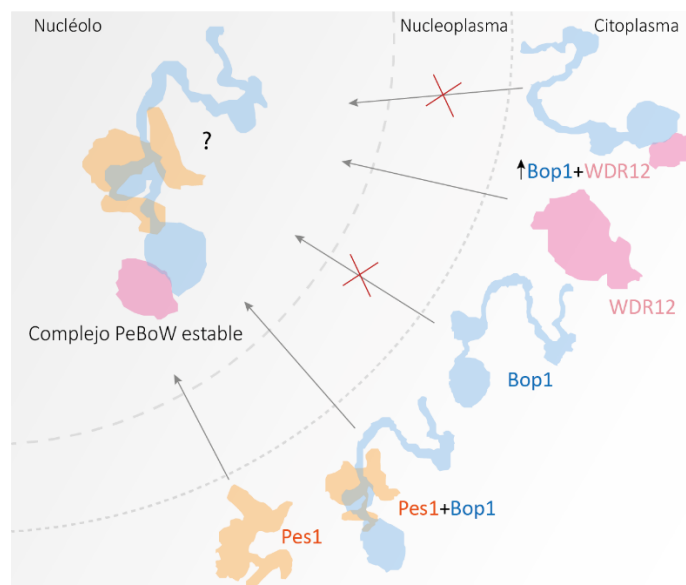


**Figura 12. Estructura del subcomplejo Nop7 en el prerribosoma y representación esquemática de los dominios estructurales de Nop7, Erb1 e Ytm1.** (A) Representación de las proteínas Erb1, Nop7 e Ytm1 en la estructura resuelta por cryo-EM de la prepartícula LSU (estadio E). Figura modificada de Kater *et al.*, 2017 [22]; PDB ID: 6ELZ. (B) Subcomplejo Nop7 extraído del PDB ID: 6ELZ. Erb1 e Ytm1 interactúan a través de sus dominios  $\beta$ -propellers y Erb1 con Nop7 a través de un segmento de su extremo amino-terminal. (C) Representación esquemática de los dominios estructurales de Erb1, Nop7 e Ytm1.

Sin embargo, aún se desconoce de forma detallada el modo en que estas proteínas se ensamblan al prerribosoma y cuál es su estructura cuando se encuentra libre en la célula. Las

estructuras resueltas por cryo-EM muestran que en los primeros estadios de formación de los intermediarios de las partículas se incorpora Nop7 y, por separado, Ytm1/Erb1 al dominio I del ARNr rodeando al ITS2 (**Figura 7**) [25,169]. La disociación del complejo de la pre-60S también se produce por separado. El heterodímero Erb1/Ytm1 se disocia del prerribosoma por la acción de Rea1 realizándose el corte C<sub>2</sub> y, posteriormente, se produce la liberación de Nop7 [25].

Hay evidencias que demuestran que el complejo PeBoW se encuentra como heterotrímero en la célula. El ensamblaje del complejo PeBoW se produce en el nucléolo y es un proceso dependiente de la estabilidad y los niveles de proteína de sus componentes. Se ha descrito que el transporte de Bop1 al nucléolo parece que es dependiente de Pes1, sin embargo, Pes1 puede migrar aislado al nucléolo. Además, el desplazamiento de WDR12 al nucléolo se bloquea con altos niveles de Bop1 (**Figura 13**) [111,168].



**Figura 13. Modelo de transporte del complejo PeBoW.** Bop1 requiere a Pes1 para el transporte nucleolar, sin embargo, el transporte de Pes1 es independiente de Bop1. El transporte de WDR12 se bloquea con altos niveles de Bop1 celulares. Se representan los relieves de las estructuras de Bop1, Pes1 y WDR12 cuando forman parte del prerribosoma (estadio E) (PDB ID: 6ELZ). Figura adaptada de Rohrmoser *et al.*, 2007 [111].

En el contexto prerribosomal, la interacción de Nop7 con Erb1 se produce principalmente a través del segmento comprendido entre los residuos 52-484 de Nop7 con el extremo amino-terminal de Erb1, concretamente con los residuos 265-383 de su extremo amino-terminal, previo al dominio  $\beta$ -propeller (**Figura 12**) [22,94]. El dominio BRCT y el primer y

segundo *coiled coil* (residuos 294-342, 530-605, respectivamente) de Nop7 participan en la interacción con Erb1. Por otra parte, en la prepartícula ribosomal, el complejo Erb1-Ytm1 interaccionan a través de sus dominios  $\beta$ -*propellers* [22].

En este trabajo, nos hemos centrado en la interacción entre Erb1 e Ytm1, analizando la estructura cristalográfica de ambas proteínas. La estructura cristalina del complejo de *Chaetomium thermophilum* Erb1/Ytm1 muestra a CtYtm1 unido a la porción carboxi-terminal de CtErb1 [130]. La cara superior del  $\beta$ -*propeller* de CtYtm1 establece extensos contactos con la parte lateral del  $\beta$ -*propeller* de CtErb1 con un papel predominante del motivo estructural número 7 (**Figura 14**). De forma detallada, la parte central del  $\beta$ -*propeller* de CtYtm1 proporciona una gran superficie de acoplamiento para la cara inferior de los motivos número 1, 2 y 7 de CtErb1 que es adicionalmente mantenida por dos extensiones laterales de CtYtm1 (**Figura 14**). El dominio parecido a ubiquitina (UBL) del extremo N-terminal de CtYtm1 no participa en la interacción [130].

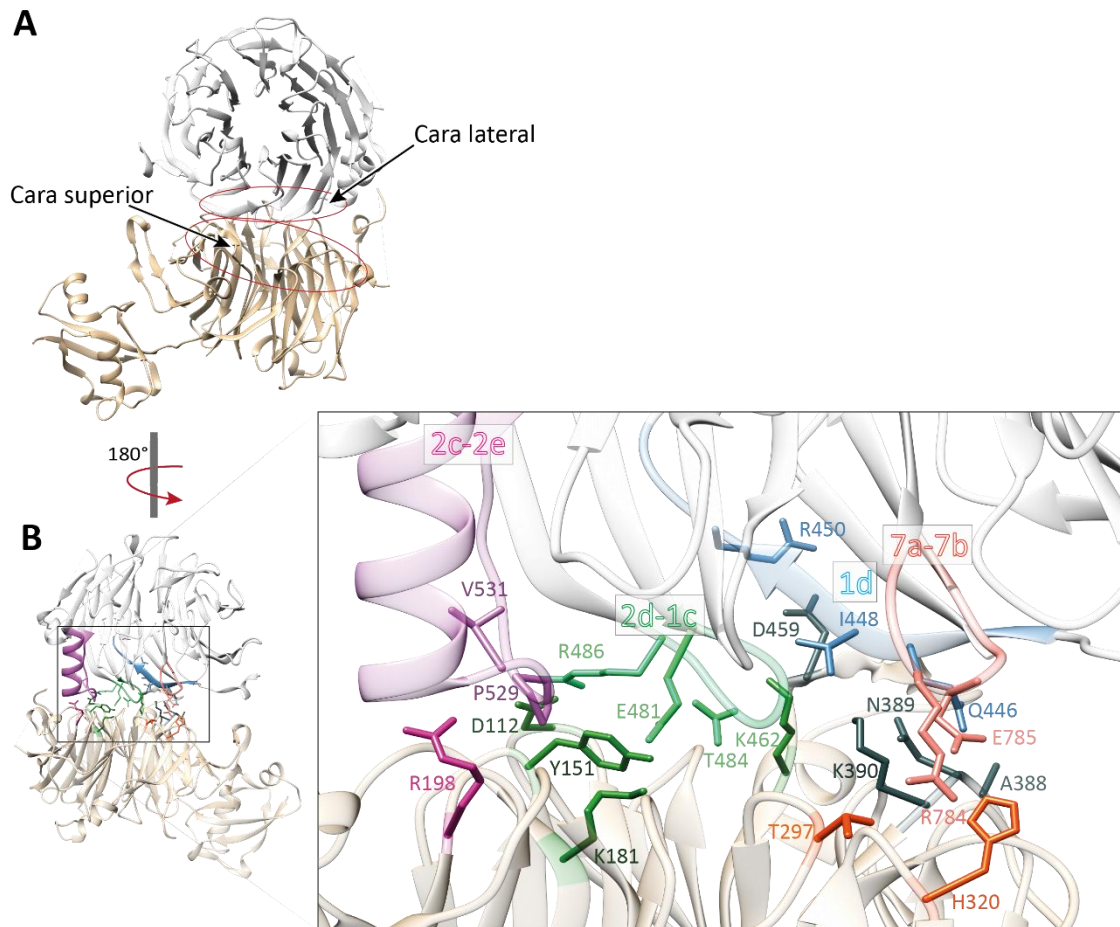
Las áreas de contacto entre CtErb1 y CtYtm1 se pueden agrupar principalmente en tres zonas (**Figura 14**):

- La lámina  $\beta$  (1d) del motivo estructural 7 en CtErb1 contacta con el lazo situado entre las láminas 6d-6a y con una larga extensión que parece estar entre las láminas 7d y 7a de CtYtm1 (el *knob* formado por los residuos 444-460).

- Una segunda área de interacción involucra al lazo entre las hojas 1c-2d de CtErb1 que parece entrar en el túnel central del  $\beta$ -*propeller* de CtYtm1. El lazo situado entre las láminas 1c-2d de CtErb1 (481-486) involucrado en la entrada al túnel central del  $\beta$ -*propeller* de CtYtm1 contiene tres residuos conservados, E481, T484 y R486, que establecen interacciones electrostáticas con los residuos también conservados de los motivos estructurales con número 1, 2, 3 y 7 de CtYtm1 [130]. Nuestro grupo, en 2015, describió la importancia de estos residuos conservados para la interacción. La mutación R486E, en la segunda área de interacción, disminuyó la afinidad entre CtErb1/CtYtm1 en dos órdenes de magnitud sin afectar a la integridad estructural. La mutación equivalente en levaduras impedía su crecimiento y afectaba a la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S [130].

- La tercera área de interacción parece involucrar al motivo estructural 2 de CtErb1 con el túnel del *propeller* de CtYtm1 y un lazo extendido seguido de una  $\alpha$ -hélice (**Figura 14**). El lazo de CtErb1 a-b del motivo 7 participa en otra área de interacción con los lazos de CtYtm1 del

motivo 3. Finalmente, una inserción entre la lámina  $\beta$  2c y 2e del motivo número 2 del  $\beta$ -propeller de CtErb1 interacciona con lazos entre los motivos estructurales 2 y 3 y una extensión entre las láminas 3c y 4d de CtYtm1. Esta área de inserción de CtErb1 muestra pobre conservación de secuencia. La mayoría de los residuos que contribuyen a la interacción del complejo se encuentran dentro de lazos que son más cortos en el caso de CtYtm1 (**Figura 14**) [130].



**Figura 14. Interacción Erb1/Ytm1.** (A) Representación en forma de lazos del heterodímero Erb1-Ytm1 de Ct. La cara superior del  $\beta$ -propeller de CtYtm1 (beige) interacciona con la cara lateral del  $\beta$ -propeller de CtErb1 (gris claro). (B) Representación de las áreas de contacto principales de CtErb1 con el  $\beta$ -propeller de CtYtm1 en diferentes colores. La zona de interacción entre los residuos 444-460 de CtErb1 (primera área de interacción) se representa en tonos azules (1d). La segunda área de interacción, correspondiente al lazo entre las láminas 1c-2d, en tonos verdes. El lazo entre las láminas 7a-7b, tercera área de interacción, en tonos anaranjados. La zona de interacción correspondiente al lazo entre el motivo 2c-2e de CtErb1 seguido de una  $\alpha$ -hélice se encuentra en rosa. Figura adaptada de Węgrecki *et al.*, 2015 [130]; PDB ID: 5CXB.

La integridad del conjunto de heterotrímeros es esencial para ejercer su acción biológica. De hecho, mostramos previamente que comprometer la estabilidad de la interacción Erb1/Ytm1 tiene un efecto sobre la proliferación en levaduras. La mutación R486E en la segunda área de interacción disminuyó la afinidad entre CtErb1/CtYtm1 en dos órdenes de magnitud sin afectar a la integridad estructural del complejo. La mutación equivalente en levaduras impedía su crecimiento y afectaba a la biogénesis de la subunidad 60S ribosomal [130]. También se han descrito otros mutantes de la interfaz de ambas proteínas (CtErb1-R470E; CtYtm1-D104R) que disminuyen o impiden su interacción causando efecto en la biogénesis de la subunidad LSU [121].

No obstante, no sólo mutantes de la superficie de interacción causan una desregulación de la biogénesis ribosomal, también la nula expresión de Pes1, Bop1 y WDR12 mediante mutantes dominantes negativos o ARN pequeños de interferencia (siARNs), bloquean la formación de los precursores del ARNr 25S y 5,8S sin afectar a la formación de la subunidad SSU [118,119,122,123].

#### **4. Enfermedades humanas relacionadas con la biogénesis ribosomal**

El ensamblaje de los ribosomas es el proceso que más energía consume en las células en crecimiento, requiriendo una coordinación regulada con otros mecanismos celulares. Se ha descrito que, en células eucariotas proliferantes, un 80% de la energía se invierte en producir proteínas y aumentar la biogénesis de los ribosomas [170]. Sin embargo, a veces existe un porcentaje de ribosomas que no se ensamblan correctamente y que pueden sintetizar proteínas defectuosas. En la célula hay mecanismos de control para detectar alteraciones en los ribosomas y los ARNr aberrantes y provocar su degradación, como el complejo E3 ubiquitin ligasa que degrada a las subunidades 60S incompletas o la actividad exonucleasa del exosoma que puede degradar ARNr defectuosos [42,171,172].

Existen enfermedades genéticas englobadas bajo el término de ribosomopatías causadas por alteraciones en la biogénesis ribosomal. Pueden producirse por mutaciones o alteraciones de las PRs o factores de ensamblaje [42]. Algunas de ellas son: la anemia de Diamond-Blackfan, la disqueratosis congénita, el síndrome Shwachman-Diamond y la hipoplasia cartílago-cabello [173]. En general, los síntomas que manifiestan son defectos en el desarrollo de órganos y esqueleto, envejecimiento prematuro, disfunciones hematológicas como la síntesis

de glóbulos rojos no funcionales y proliferación celular [42,173]. Dado que las PRs y los factores de ensamblaje son esenciales para la formación de los ribosomas, cualquier mutación que impida realizar su función producirá insuficiente formación de ribosomas con lo que se bloquearía la proliferación celular produciendo graves consecuencias para el organismo [12]. Aunque también se ha especulado que insuficiencias en la biogénesis ribosomal puede impulsar la predisposición a cáncer con la aparición de otras mutaciones que contrarrestarían la falta de ribosomas produciendo ribosomas que continuarían siendo defectuosos [12,174].

La biogénesis ribosomal también está relacionada con el crecimiento y ciclo celular. De hecho, durante el ciclo celular existen cambios de producción de los ribosomas durante las diferentes etapas. En la fase G1 aumenta la síntesis de ARNr y ribosomas para producir suficientes proteínas para la fase S, donde se alcanza el máximo nivel de producción de ARNr, disminuyendo la síntesis durante la fase M [56,175].

#### **4.1. La biogénesis ribosomal y su relación con cáncer**

La biogénesis ribosomal está estrechamente relacionada con el crecimiento y proliferación celular y su desregulación podría tener profundas consecuencias como la aparición de las enfermedades descritas en el apartado anterior. Se conoce que la biogénesis de los ribosomas está aumentada en la transformación celular o la tumorigénesis y se asume como una tendencia general que las células cancerosas necesitan producir ribosomas adicionales para producir más proteínas y así mantener la división celular descontrolada [176,177]. Algunas características celulares observadas en tumores de hígado o pulmón es el aumento en número y tamaño del nucléolo así como cambios en su estructura que se relaciona con una hiperactivación de la producción de ribosomas [178,179].

Curiosamente, se ha demostrado que la proliferación celular puede bloquearse inhibiendo la producción de nuevos ribosomas, ya que la alteración de la biogénesis ribosomal induce un punto de control que previene la progresión del ciclo celular [180]. Por lo tanto, no es sorprendente que la biogénesis de los ribosomas haya ido acumulando atención como una posible diana terapéutica para el tratamiento del cáncer [12,40,174,181,182].

Además, se ha observado que la paralización de la biogénesis ribosomal es capaz de promover la activación del supresor tumoral p53 [178,183]. Por ejemplo, se ha descrito que la delección condicional de la proteína Rps6 de la subunidad 40S paralizaba la proliferación celular

mediada por p53 de células hepáticas de ratones adultos así como mutaciones en Rps19 y Rps20 que producían un desarrollo deteriorado del sistema hematopoyético dependiente de p53 [180,184]. Estas observaciones abren el campo a la utilización de la biogénesis del ribosoma como diana terapéutica ya que su alteración es capaz de inducir la activación de p53 sin que se produzcan los efectos genotóxicos indeseados que provocan las terapias convencionales aplicadas en la actualidad contra el cáncer.

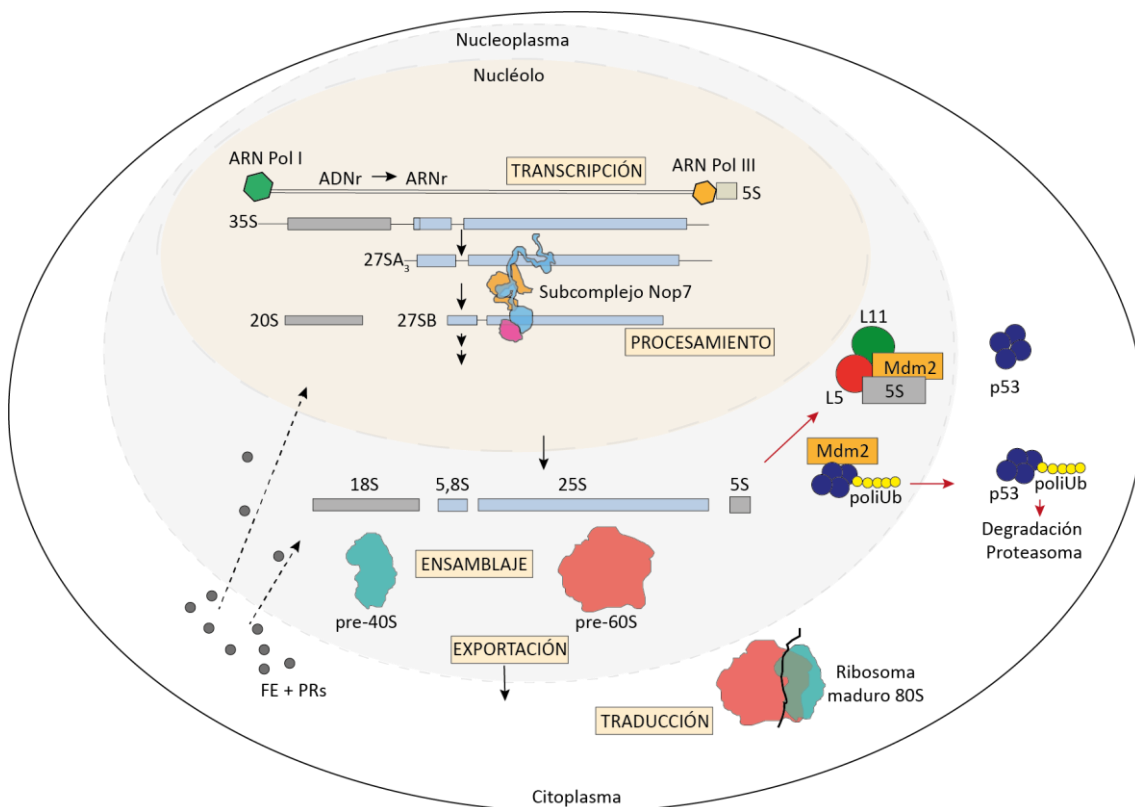
La relación entre la inhibición de la biogénesis ribosomal y el estrés nucleolar con p53 fue propuesto por Rubbi y Milner tras experimentos de irradiación con luz ultravioleta. Sugirieron que el nucléolo se comportaría como un sensor celular para las respuestas mediadas por p53 [185]. Existen diferentes formas de producir la conocida respuesta a estrés nucleolar (NSR, *nuclear stress response*) como exposición a radiación ultravioleta, hipoxia, falta de nutrientes, la acción de oncogenes, falta de supresores de tumores y alteraciones de la biogénesis ribosomal [176]. La NSR puede desencadenar mecanismos dependientes o independientes de p53.

El proceso de NSR mejor conocido es el mecanismo dependiente de p53. Bajo condiciones normales de crecimiento, las PRs y los factores de ensamblaje se unen a las prepartículas ribosomales para comenzar el proceso de maduración. En esas etapas, p53 se transcribe y es secuestrada por la E3 ubiquitin ligasa Mdm2 (Hdm2 en humanos) a través de su extremo N-terminal. Esta proteína ubiquitina a p53 y se degrada por el proteasoma continuando el proceso de proliferación celular. Sin embargo, cuando existe alguna alteración de la biogénesis ribosomal como daño en el ADN o problemas de procesamiento de la ARN pol I, las PRs L5 y L11 quedan libres al no estar asociadas a la partícula 5S RNP y secuestran a Mdm2 dejando libre a p53 (**Figura 15**). De esa forma, p53 queda disponible para la regulación de su propia transcripción, la activación del inhibidor del ciclo celular p21 y otros genes de respuesta a p53 para llevar a cabo las reacciones de parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia o autofagia [176,186–188]. Incluso se ha descrito que Mdm2 puede interactuar directamente con el ARNm de p53 [189,190].

También se han identificado otras PRs capaces de unirse a Mdm2 como Rps3, Rps7, Rps14, Rps20, Rps15, Rps25, Rps27, Rpl26, Rpl23 y Rpl37, entre otras, que bajo condiciones de estrés son liberadas desde el nucléolo [191].

Existen otras proteínas reguladoras de Mdm2 como Arf que es una proteína supresora de tumores localizada normalmente en el nucléolo. El estrés nucleolar libera a Arf al nucleoplasma donde se une a Mdm2 a través de su región ácida central permitiendo la

acumulación de p53 y el consecuente bloqueo del ciclo celular [192,193]. La nucleofosmina 1 (NMP1), además de ser una proteína nucleolar que actúa en el corte ITS2 durante el procesamiento del ARNr, ayuda a mantener la estabilidad del genoma y es un regulador de NSR. NMP1 se une a Arf y este complejo interacciona con Mdm2 [194,195]. La nucleotesmina (NS) también es una proteína reguladora de p53. Tanto la sobreexpresión como la reducción de NS activan p53 mediante la inhibición de Mdm2 [196]. Además, la proteína nucleolina también estabiliza a p53 por la supresión de Mdm2 a través de una vía paralela a Arf [197].



**Figura 15. Representación esquemática de la biogénesis ribosomal en condiciones normales y estrés nucleolar.** El ADNr es transcrito por la ARN pol I generando los pre-ARNrs 18S, 5,8 y 25S que, junto con el 5S, transcrito por la ARN pol III, forma la subunidad mayor y menor ribosomal. En el procesamiento del ARNr participan numerosos factores de ensamblaje (FE) como el subcomplejo Nop7 y PRs que originan los ARNr maduros. En condiciones normales de crecimiento, las concentraciones celulares de p53 se encuentran controladas por la E3 ubiquitin ligasa Mdm2 que la poliubiquitina promoviendo su degradación por el proteasoma. Sin embargo, en condiciones de estrés nucleolar, el ARNr 5S se acumula formando un complejo con las PRL5 y PRL11 que secuestran a Mdm2 (indicado por las flechas rojas). De esta forma, p53 se acumula en la célula induciendo la transcripción de genes involucrados en parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia y reparación del ADN.



Sin embargo, existen múltiples respuestas de estrés nucleolar independientes de p53. Una de ellas es a través de la proteína c-Myc. En condiciones normales de crecimiento, c-Myc promueve el crecimiento celular regulando positivamente la biogénesis ribosomal. En condiciones de estrés nucleolar, RPL11 se une al ARNm de c-Myc y recluta al complejo de silenciamiento inducido por microARNs de interferencia (miRISC) y miR-24 promoviendo la degradación del ARNm y reduciendo los niveles de c-Myc [198]. Por otra parte, bajo condiciones normales, Mdm2 es estabilizada por el factor de transcripción E2F-1 promoviendo la progresión normal del ciclo celular. Tras un estrés nucleolar, la RPL11 se une a Mdm2 promoviendo la poliubiquitinación de E2F-1 y degradación por el proteasoma reduciendo así sus niveles celulares y evitando la progresión del ciclo celular [199]. Otro ejemplo es a través del factor de transcripción 4 (ATF4) que se encuentra sobreexpresado en algunos tumores o la PRL41 que promueve la fosforilación de ATF4 promoviendo su degradación por el proteasoma [200,201].

#### 4.1.1. Biogénesis ribosomal como diana contra el cáncer

La quimioterapia citotóxica se utiliza ampliamente en la lucha contra el cáncer. A pesar de los beneficios que ofrece, también existen inconvenientes graves asociados al carácter genotóxico de la quimioterapia sistémica. Algunos de ellos son los síntomas desarrollados por los pacientes tras la terapia como náuseas, diarreas, cataratas, complicaciones dentales, pérdida auditiva o enfermedades crónicas de pulmón, entre otras [202]. Por ello, es de gran interés encontrar agentes terapéuticos que no produzcan efectos genotóxicos con el fin de mejorar los tratamientos actuales. La activación de p53 en ausencia de daño al ADN ha atraído la atención científica y farmacéutica y, por ello, la vía de biogénesis ribosomal se ha convertido en un objetivo atractivo para la lucha contra el cáncer. Hay varias iniciativas que están inspeccionando la activación de p53 y la mayoría se han centrado en la inactivación de la ARN pol I [176].

Los pasos iniciales del ensamblaje del ribosoma tienen lugar en el nucléolo donde el ARNr es transcrito por la ARN pol I [26] bajo el control tanto de genes supresores de tumores (incluidos p53, pRb y Arf) como de oncogenes (incluidos c-Myc, MAPK / ERK, PI3K y AKT) [178,203]. Los intentos iniciales de inhibir la biogénesis de los ribosomas se han centrado en la inhibición de la transcripción dirigiéndose selectivamente a la ARN pol I. Se han descrito recientemente varias moléculas pequeñas como CX-5461, CX-3543, BMH-21 o CID-765471 evidenciando que la inhibición de la biogénesis de los ribosomas a nivel de la transcripción dirigida del ADNr tiene un potencial terapéutico esperanzador. Concretamente, los derivados

CX- impiden la activación de la ARN pol I y los derivados de BM- desencadenan la degradación por el proteasoma de la subunidad mayor catalítica de la ARN pol I [204,205].

A pesar de ser un campo de investigación prometedor, se han identificado varias limitaciones durante el desarrollo de inhibidores de la ARN pol I. Algunas de ellas es la falta de especificidad y la adquisición de resistencia sugiriendo que debería desarrollarse una nueva generación de inhibidores de la pol I o se deberían considerar otras etapas de regulación después de la síntesis de ARN en la vía de biogénesis del ribosoma. Además, el único inhibidor que llegó a estadios avanzados en los ensayos clínicos ha mostrado actividades adicionales que contribuyen a su perfil de toxicidad y resistencia, por lo que deben explorarse otros puntos de intervención durante el proceso de maduración del ribosoma. Recientemente, se están realizando estudios de tratamientos combinados de estas moléculas con otras drogas que permitiría reducir las concentraciones tóxicas de estos medicamentos [186,206].

Pese a la complejidad del proceso de biogénesis ribosomal, donde intervienen más de 200 factores de ensamblaje y numerosas PRs, se tiende a pensar en la existencia de un gran repertorio de objetivos potenciales. Sin embargo, hasta ahora solo se conocen muy pocos inhibidores químicos de la biogénesis de los ribosomas. Por ejemplo la diazaborina, inhibidor de la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Drg1 que bloquea la liberación y reciclaje de los factores de la LSU [207]. A pesar de la falta de detalles moleculares en el proceso, la razón principal de este número limitado de inhibidores es que la compleja vía de biogénesis del ribosoma está orquestada por una amplia gama de interacciones macromoleculares coordinadas secuencialmente para promover la maduración correcta del ribosoma. Como se indicó anteriormente, los factores de ensamblaje con frecuencia requieren interacciones proteína-proteína para ejercer sus acciones biológicas y dada la ausencia de ranuras o bolsillos en la superficie de interacción dificulta el ataque de fármacos de moléculas pequeñas. El uso de moléculas biológicas más grandes tiene el inconveniente de no ser útil contra las proteínas intracelulares, ya que los productos biológicos no pueden atravesar las membranas celulares con facilidad [208].

En este sentido, existe una nueva clase de compuestos farmacéuticos clasificados funcionalmente en pequeñas moléculas biológicas conocidos como péptidos pequeños de interferencia (CPPs). Esta herramienta terapéutica ha demostrado bloquear de forma exitosa las interacciones proteína-proteína de forma selectiva. Además, los CPPs han demostrado que inhiben varios impulsores oncogénicos que están ahora en ensayos clínicos [209,210]. Se han constituido como una alternativa terapéutica prometedora ya que han demostrado ser lanzaderas eficientes para introducir diferentes tipos de moléculas como proteínas y ARN en una

gran variedad de tipos celulares [210]. Además, se ha demostrado que los CPPs poseen alta eficacia y selectividad [211]. Según el diseño del péptido, entre 5 y 30 aminoácidos de longitud, puede entrar en las células por difusión pasiva o por endocitosis. Además presentan baja toxicidad dado que sus productos de degradación son aminoácidos, y presentan baja bioacumulación, puesto que poseen una vida media corta. Una de las estrategias más utilizadas para el diseño de CPPs es usando el péptido penetrante del activador transcripcional del virus VIH, TAT [212,213]. Esta secuencia tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares y llegar al núcleo [210].

#### 4.1.2. Bloqueo del complejo PeBoW como estrategia antitumoral

Se conoce que alteraciones de los componentes del complejo PeBoW parecen desempeñar un papel fundamental en la coordinación entre biogénesis ribosomal y progresión del ciclo celular. En este sentido, se ha demostrado que el desarrollo de mutantes de dos componentes del complejo PeBoW conduce no sólo a la interrupción de la síntesis, sino también al procesamiento del ARNr conllevando una activación de p53. La expresión de un mutante dominante negativo de Bop1 en ratón bloqueó la síntesis de ribosomas al inducirse una parada del ciclo celular inducida por p53 [122]. Recientemente se ha publicado un estudio que muestra que el silenciamiento de Bop1 mediante pequeños ARNs de interferencia (siRNA) en células de cáncer gástrico suprimió la proliferación celular y aumentó los niveles de p53 [214]. De manera similar, el desarrollo de un mutante dominante condicional de WDR12 puede promover una detención del ciclo celular reversible por p53 [165]. De modo que se ha propuesto que la disrupción del complejo PeBoW puede producir una respuesta de estrés como las observadas para Bop1 y WDR12 [215].

En este trabajo describimos un nuevo enfoque para apuntar a la biogénesis de los ribosomas utilizando péptidos cortos sintéticos. En particular, hemos diseñado péptidos potencialmente dirigidos a la interacción de Erb1 con Ytm1 basados en la información estructural previamente resuelta por nuestro grupo del complejo Erb1/Ytm1 del organismo *Chaetomium thermophilum* [130] (PDB ID: 5CXB). Además, basado en la tecnología de los CPPs, hemos diseñado péptidos de interferencia con la secuencia penetrante TAT en el extremo amino-terminal dirigidos hacia el heterodímero Erb1/Ytm1 con el objetivo de bloquear la biogénesis ribosomal como una posible estrategia terapéutica contra el cáncer. Asimismo, es un enfoque novedoso para el desarrollo de inhibidores de otros complejos bien establecidos en la biogénesis ribosomal. Nuestros resultados abren la posibilidad de obtener péptidos con la

capacidad de interferir en la vía de biogénesis como alternativa al uso de inhibidores de la ARN pol I.

## **II. OBJETIVOS**



## OBJETIVO GENERAL

El complejo PeBoW, compuesto por las proteínas Erb1/Ytm1/Nop7 forman un heterotrímero en solución que participa en la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S. Sin embargo, se desconoce la conformación del complejo en solución y las posibles funciones que podría ejercer fuera del contexto prerribosomal.

En la primera parte de la tesis se profundiza en las interacciones entre los componentes del complejo y su resolución estructural así como discernir las posibles interacciones del complejo o de sus proteínas por separado independientes del ribosoma.

En la segunda, evaluamos la capacidad de interferencia de péptidos sintéticos contra el complejo PeBoW usando la información cristalográfica del complejo Erb1/Ytm1 (PDB ID: 5CXB) para bloquear la biogénesis ribosomal ya que se conoce que juega un papel crucial en las células cancerígenas.

Este trabajo agrupa un enfoque estructural con diferentes técnicas biofísicas y estructurales así como un enfoque bioquímico y celular a través del diseño de péptidos de interferencia.

## OBJETIVOS CONCRETOS

### Parte I

1. Sobreexpresar usando sistemas de expresión heterólogos, purificar y reconstituir el heterotrímero Nop7/Erb1/Ytm1 de *Saccharomyces cerevisiae* y *Chaetomium thermophilum in vitro*.
2. Estudiar las interacciones entre sus proteínas individuales y dominios implicados en dicha interacción.
3. Estudio estructural del complejo PeBoW de *Saccharomyces cerevisiae* y *Chaetomium thermophilum*.
4. Identificar posibles funciones de Nop7/Erb1/Ytm1 fuera del contexto prerribosomal.

**Parte II**

5. Diseño y evaluación del potencial de interferencia de péptidos sintéticos contra el heterodímero Erb1/Ytm1 mediante técnicas biofísicas.
6. Evaluación del efecto de péptidos penetrantes de interferencia en cultivos celulares.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Clonaje y construcciones en *E.coli*

### 1.1. Plásmidos y oligonucleótidos

Los plásmidos utilizados en este estudio fueron adquiridos y modificados previamente por el laboratorio del Dr. Jerónimo Bravo. Los vectores denominados pGKI y pMBPKI se obtuvieron por modificación del vector pET28-NKI/LIC 6His/3C (pNKI) originariamente obtenido del grupo del Dr. Anastassis Perrakis (NKI, Ámsterdam). Se les ha sustituido la etiqueta de 6 histidinas (6xHis) por Glutación-S-transferasa (GST) en el caso de pGKI y la proteína de unión a maltosa (MBP) en el plásmido pMBPKI. Los plásmidos pOPIN fueron cedidos por el grupo del Dr. R. Owen's (OPPF, Oxford) y del Dr. Vicente Rubio (IBV, Valencia).

**Tabla 1. Lista de cebadores empleados en este trabajo para preparar las diferentes construcciones.** Los nucleótidos que aparecen en minúsculas corresponden a secuencias compatibles con los vectores utilizados. (Fw: sentido directo, Rv: sentido inverso).

Cebadores	Secuencia 5' - 3'
ScNop7 pNKI Fw	cagggaccggtATGAGAATCAAGAAGAAAAAC
ScNop7 pNKI Rv	cgaggagaagcccggttaCTATTCTTGGAACTAGTTT
ScErb1 pNKI Fw	cagggaccggtATGATGGCTAAGAACAACAAA
ScErb1 pNKI Rv	cgaggagaagcccggttaCTAGGTGGTCCATAAGCGAGC
ScYtm1 pOPINF Fw	aagttctgtttcagggcccACAGAAGATAAATCGCAGGTTAAAATCAGG
ScYtm1 pOPINF Rv	atggtctagaaagctttaGTTTTGAAAATGTTGTCTCCTTTATTTATTTGAATC
CtNop7 pNKI Fw	cagggaccggtATGGGCAAGGCCAAGAAG
CtNop7 pNKI Rv	cgaggagaagcccggttaAGCCTTCTTCGCTGCCATTTCTTC
CtNop7-350 pNKI/pGKI Rv	cgaggagaagcccggttaGCCGCCGGGCGCGACTGGCTC
CtErb1 pNKI/pMBPKI Fw	cagggaccggtATGGGGTCAAAAATAGTTGAAAAGAAGCG
CtErb1 pNKI/pMBPKI Rv	cgaggagaagcccggttaCATCCATAACCTCGCCGTCCC
CtErb1-435 pNKI Rv	cgaggagaagcccggttaGGGTGAGGGGAGCTTCGGCAA
CtYtm1 pOPINF Fw	aagttctgtttcagggcccATGGACGCCCCATGGAGGACG
CtYtm1 pOPINF Rv	atggtctagaaagctttaTTTTGCTCGGTAACAATATTTCTTC
ScDrs1 pGKI Fw	cagggaccggtATGGTGGTAGGAACTAAAAAA
ScDrs1 pGKI Rv	cgaggagaagcccggttaCCTACGGCTTTTGAAGCCCTT
ScHas1 pNKI/pGKI Fw	cagggaccggtATGGCTACCCCGTCAAATAAAC
ScHas1 pNKI/pGKI Rv	cgaggagaagcccggttaCTTATGAGTTTTACGTCTTTTGG
ScNoc2 pNKI Fw	cagggaccggtATGGGTAAAGTTTCTAAATCG
ScNoc2 pNKI Rv	cgaggagaagcccggttaTTAAGCGTCTGACATTTT
CtDrs1 pNKI Fw	cagggaccggtATGGCGCCTAGCAAACGCAAG
CtDrs1 pNKI Rv	cgaggagaagcccggttaCTCCGGCCCTTCCCTT

Los genes codificantes de las proteínas de interés fueron amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando los cebadores listados en la **Tabla 1**. Los oligonucleótidos diseñados incluyen secuencias específicas solapantes (en minúscula) con el plásmido y el método de clonaje empleado. Los genes clonados en el vector pNKI se encuentran fusionados a una cola 6xHis codificada, un sitio de corte para la *PreScission Protease* 3C y los residuos glicina-prolina-glicina (GPG) en su extremo amino-terminal bajo el control del promotor T7. El plásmido pNKI y sus derivados pGKI y pMBPKI contienen genes de resistencia a kanamicina para la selección de los transformantes positivos.

## 1.2. Amplificación de fragmentos por PCR y su purificación

La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) y se utilizaron las ADN polimerasas de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart (Kapa Biosystems, Roche) y tiHybrid DNA polymerase (EURx®) siguiendo las reacciones de PCR indicadas en la **Tabla 2** y el protocolo de amplificación detallado en la **Tabla 3** para cada polimerasa.

**Tabla 2. Reacciones de PCR para la amplificación del inserto de interés con ADN polimerasas de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart y tiHybrid.** dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos, T<sub>m</sub>: temperatura de fusión (*melting temperature*).

Componente Reacción polimerasa KAPA HiFi	Volumen (reacción 25 µl)	Concentración final
Tampón KAPA HiFi 5x	5 µl	1x
10 mM Mezcla dNTPs	0,75 µl	0,3 mM
10 µM Cebador sentido directo	0,75 µl	0,3 µM
10 µM Cebador sentido reverso	0,75 µl	0,3 µM
ADN molde	1-2 µl (50 ng aprox.)	50 ng
1 U/µl ADN polimerasa HiFi HotStart	0,5 µl	0,5 U
H <sub>2</sub> O miliQ	Hasta completar 25 µl	-

Componente reacción polimerasa tiHybrid	Volumen (reacción 50 µl)	Concentración final
Tampón Hybrid 10x (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	1x
5 mM Mezcla dNTPs	2 µl	0,2 mM
10 µM Cebador sentido directo	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Cebador sentido reverso	2,5 µl	0,5 µM
ADN molde	1-2 µl (50 ng aprox)	50 ng
2 U/µl tiHybrid ADN polimerasa	0,5 µl	1 U
DMSO	4 µl	2-10 %
H <sub>2</sub> O miliQ	Hasta completar 50 µl	-

**Tabla 3. Protocolo de amplificación por PCR con la ADN polimerasa KAPA HiFi HotStart y tiHybrid.**  
 (\*)Depende de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los cebadores.

ADN Polimerasa KAPA HiFi HotStart			
Etapa	Temperatura	Duración	Ciclos de amplificación
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	98°C	20 s	
Hibridación de cebadores	55-68°C*	15 s	30-35
Extensión	72°C	15-60 s/kb	
Extensión final	72°C	1 min/kb	1
ADN Polimerasa tiHybrid			
Etapa	Temperatura	Duración	Ciclos de amplificación
Desnaturalización inicial	98°C	30 s	1
Desnaturalización	98°C	20 s	
Hibridación de cebadores	55-68°C*	20 s	30-35
Extensión	72°C	30 s/kb	
Extensión final	72°C	5-7 min	1

El ADN molde para la amplificación de insertos procedía de ADN genómico (ADNg) de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), ADN complementario (ADNc) del hongo filamentoso *Chaetomium thermophilum* (*Ct*), ADN plasmídico o fragmento de PCR de alguna construcción o inserto ya amplificado y purificado en el laboratorio. Los productos resultantes de la PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con 3 µl de RedSafe™ 20.000x (iNtRON Biotechnology) en tampón TAE (40 mM Tris (hidroximetil)-metilamina (Tris-HCl) pH 8,3, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) a 100 V durante 30 min con una fuente PowerPac™ Basic (Bio-Rad). Para la visualización de las bandas en el gel se usó un transiluminador de radiación ultravioleta Ultima 16si Plus (Isogen Life Science). Se utilizó DNA Ladder 1Kb RTU (GeneDireX) como marcador de pesos moleculares.

Los productos obtenidos fueron purificados siguiendo el protocolo de purificación de ADN de reacciones enzimáticas del sistema NZYGelPure (Nzytech). Posteriormente, la pureza (ratio 260/280) y la concentración de ADN amplificado se cuantificaron con un equipo NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™). Los fragmentos de ADN resultantes fueron incorporados a los correspondientes plásmidos mediante un método de clonaje especificado en la **Tabla 4**.

### 1.3. Clonaje independiente de ligación (LIC)

El sistema de clonación independiente de ligación (LIC) utiliza la actividad exonucleasa 3'→ 5' de la T4 ADN polimerasa y la presencia de desoxirribonucleótidos para producir una extensión de 12-15 pares de bases (pb) de secuencia compatible entre el vector y el inserto [216].

En el sistema LIC, el inserto es amplificado por PCR con oligonucleótidos que contienen secuencias específicas solapantes (*overhangs*) en su extremo 5' (**Tabla 1**). Los plásmidos se linealizaron por la enzima de restricción KpnI (New England Biolabs® (NEB)) y se purificaron usando el sistema NZYGelPure (Nzytech). La digestión de los vectores se realizó mezclando tampón 1xKpnI (NEB), 2,5 U de enzima KpnI (10.000 U/ml) (NEB), 2 µg de plásmido y se completó hasta 40 µl con H<sub>2</sub>O miliQ. Se incubaron durante 2-3 h a 37°C y se comprobó la correcta digestión del vector por visualización en un gel de agarosa al 1% (p/v).

En este sistema de clonación, tanto el vector como el inserto, fueron tratados separadamente con la T4 ADN polimerasa (Thermo Scientific™) en una mezcla de reacción de un volumen final de 20 µl con los siguientes reactivos: 0,1-0,2 pmol de vector o inserto, tampón T4 ADN polimerasa, 50 mM 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP) (para el inserto) o 50 mM 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP) (para el vector) y 1 U de T4 ADN polimerasa (5 U/µl). La reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y 10 min a 70°C para inactivar la polimerasa. El vector y el inserto tratados se mezclaron en proporción 2:1 en cantidades molares, respectivamente, durante 5 min a TA. Se añadió EDTA a una concentración final de 2,5 mM y se incubaron 5 min adicionales antes de ser transformadas en células *E.coli* DH5α químicamente competentes.

### 1.4. Transformación en células *E.coli* DH5α químicamente competentes y selección de transformantes

La mezcla de ligación se transformó por choque térmico en cepas *E.coli* DH5α (Stratagene®). Se mezclaron 50 µl de bacterias químicamente competentes con la reacción de ligación y se incubaron durante 20-30 min en hielo. Las células fueron sometidas a un choque térmico durante 90 s a 42°C y en hielo 5 min. Se añadieron 200 µl de medio LB (Luria-Broth (Miller's LB Broth)) estéril y se incubaron durante 1 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, fueron repartidas en placas conteniendo LB agar (2% (p/v) agar) suplementadas con el correspondiente

antibiótico dependiendo de la resistencia contenida en el plásmido (100 µg/ml de ampicilina, 33 µg/ml de kanamicina) e incubadas a 37°C durante 16-18 h.

El resultado del clonaje fue confirmado por PCR de colonia. Se suspendieron varias colonias aisladas de cada transformación aparecidas en las placas LB-agar tras la incubación en una mezcla de reacción de PCR de 20 µl llevándose a cabo el siguiente protocolo de amplificación por la ADN polimerasa FIREPol® (Solis BioDyne): tampón BD, 1,5-2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de mezcla de dNTPs, 0,1-0,3 µM de cebador en sentido directo e inverso y 2-5 U de ADN polimerasa FIREPol® (5 U/µl). La reacción de PCR colonia es la siguiente: 5 min a 95°C seguido de 35 ciclos de amplificación (45 s a 95°C; 45 s a la T<sub>m</sub> deseada y 1 min/kb a 72°C) y, finalmente, 10 min a 72°C.

Las colonias aisladas positivas de cada transformación se inocularon en 10 ml de LB conteniendo los antibióticos apropiados y crecieron a 37°C durante 16-18 h a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™). Los antibióticos se utilizaron a una concentración final de 100 µg/ml de ampicilina y 33 µg/ml de kanamicina y cloranfenicol. Las células se recogieron por centrifugación durante 20 min a 3.000 x g (Sorvall™ ST 16 Centrifuge, rotor TX-400, Thermo Scientific™) y los plásmidos se extrajeron usando NZYMiniprep kit (Nzytech) siguiendo las instrucciones del manual. La concentración de ADN aislado fue cuantificada por NanoDrop® y secuenciada por la compañía Humanizing Genomics MacroGen (MacroGen Spain, Madrid).

### 1.5. Construcciones de las proteínas de interés en *E.coli*

Las construcciones usadas en este estudio están resumidas en la **Tabla 4** con el correspondiente método de clonación empleado. El gen codificante de la proteína CtDrs1 se diseñó con codones optimizados para la expresión en *E.coli* y se sintetizó químicamente a través de la empresa Integrated DNA Technologies (IDT™).

**Tabla 4. Construcciones de las proteínas de interés utilizadas en este trabajo.** (\*) Construcciones realizadas por otros miembros del laboratorio. Los cebadores se muestran en la **Tabla 1**.

Construcción	Cebadores	ADN molde	Vector	Método de clonaje
ScNop7 pNKI*	ScNop7 pNKI Fw ScNop7 pNKI Rv	ADNg de Sc	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
ScErb1 pNKI*	ScErb1 pNKI Fw ScErb1 pNKI Rv	ADNg de Sc	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
ScYtm1 pOPINF*	ScYtm1 pOPINF Fw ScYtm1 pOPINF Rv	ScYtm1 pNKI	pOPINF	In-fusion
CtNop7 pNKI*	CtNop7 pNKI Fw CtNop7 pNKI Rv	ADNg Ct	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
CtNop7 <sub>1-350</sub> pNKI	CtNop7 pNKI Fw CtNop7-350 pNKI/pGKI Rv	CtNop7 pNKI	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
CtNop7 <sub>1-350</sub> pGKI	CtNop7 pNKI Fw CtNop7-350 pNKI/pGKI Rv	CtNop7 pNKI	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
CtErb1 pNKI*	CtErb1 pNKI/pMBPKI Fw CtErb1 pNKI/pMBPKI Rv	ADNc Ct	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
CtErb1 <sub>1-435</sub> pNKI	CtErb1 pNKI/pMBPKI Fw CtErb1-435 pNKI Rv	CtErb1 pNKI	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
CtErb1 pMBPKI	CtErb1 pNKI/pMBPKI Fw CtErb1 pNKI/pMBPKI Rv	CtErb1 pNKI	pMBPKI	LIC
CtYtm1 pOPINF*	CtYtm1 pOPINF Fw CtYtm1 pOPINF Rv	CtYtm1 pNKI*	pOPINF	SLIC
ScDrs1 pGKI	ScDrs1 pGKI Fw ScDrs1 pGKI Rv	ADNg de Sc	pGKI	LIC
ScHas1 pNKI	ScHas1 pNKI/pGKI Fw ScHas1 pNKI/pGKI Rv	ADNg de Sc	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
ScHas pGKI	ScHas1 pNKI/pGKI Fw ScHas1 pNKI/pGKI Rv	ScHas1 pNKI	pGKI	LIC
ScNoc2 pNKI	ScNoc2 pNKI Fw ScNoc2 pNKI Rv	ADNg de Sc	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC
CtDrs1 pNKI	CtDrs1 pNKI Fw CtDrs1 pNKI Rv	Inserto sintético (IDT™)	pET28-NKI/LIC 6His/3C	LIC

## 2. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

### 2.1. Transformación en cepas de expresión

Para realizar la sobreexpresión de las distintas proteínas, los vectores que contenían dichas construcciones fueron transformados en bacterias *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Stratagene®). La construcción de CtDrs1 pNKI fue transformada en una cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene®). Se añadieron 50 ng de ADN plasmídico a 50 µl de células químicamente



competentes y se incubaron durante 30 min en hielo. Se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 1.4. pero con un choque térmico a 42°C durante 45 s. Se sembraron en condiciones estériles 100 µl de células transformadas en placas de LB-agar con el antibiótico apropiado dependiendo de la resistencia del plásmido y se incubaron a 37°C durante toda la noche. En el caso de las cepas *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, las placas contenían cloranfenicol a una concentración final de 33 µg/ml. Para preservar las nuevas construcciones el cultivo crecido durante 16 h a 37°C se mezcló con un 22% (v/v) de glicerol estéril de concentración final y se congelaron a -80°C.

## 2.2. Ensayos de expresión de proteínas a pequeña escala en bacterias

La expresión de las construcciones transformadas se realizó, en primer lugar, testando su expresión a pequeña escala, y si la proteína era soluble y presentaba niveles altos de expresión, se continuaba con la expresión a gran escala. En este trabajo se usaron dos técnicas de inducción de expresión diferentes. La primera de ellas utiliza el inductor IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), análogo químico de la galactosa, que induce la actividad de la T7 ARN polimerasa. Esta polimerasa activa la expresión de las proteínas recombinantes que han sido clonadas en los vectores del tipo pET [217]. En el segundo método, el sistema de expresión conocido como autoinducción permite la expresión de las proteínas recombinantes sin añadir inductor. Se usa una mezcla de diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol y lactosa) en diferentes fases de crecimiento. La glucosa se añade en primer lugar para aumentar la velocidad de crecimiento del cultivo al mismo tiempo que limita la expresión de la proteína como resultado de usar vías alternativas de utilización del carbono. A medida que la glucosa se agota, cambia el metabolismo celular hacia el consumo de glicerol y lactosa como fuente de carbono que actúa como inductor de la expresión de proteínas controladas por el promotor T7 *lac* [217–219].

- Testar la expresión usando como inductor IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) a diferentes concentraciones. Una colonia aislada es inoculada en 10 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente según la resistencia del plásmido y el tipo celular. El cultivo se incubó durante 5-6 h a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) de 0,6-0,8. Una vez alcanzada la D.O.<sub>600</sub> se añadió 0,1 mM o 0,5 mM de IPTG para una incubación de 16 h a 20°C y 1 mM de IPTG para 5 h a 37°C a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™).

▪ Testar la expresión por autoinducción. Una colonia transformada en cepas de expresión es inoculada en un cultivo con 9,3 ml de medio de cultivo ZY (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura); 1 mM de  $MgSO_4$ ; 5052 1x; NPS 1x más el antibiótico correspondiente a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0,8-1,2. Posteriormente, el cultivo se cambió a 20°C durante 16 h en agitación a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™). La composición de los reactivos utilizados en este protocolo es la siguiente: NPS 20x (0,5 M  $(NH_4)_2SO_4$ , 1 M  $KH_2PO_4$ , 1 M  $Na_2HPO_4$ ); 5052 50x (25% (v/v) glicerol, 2,5% (p/v) glucosa, 10% (p/v)  $\alpha$ -lactosa).

Al día siguiente, los cultivos de ambos ensayos se centrifugaron a 3.000 x g durante 20 min a 4°C. Las células recogidas se conservaron a -20°C hasta su purificación a pequeña escala.

### **2.3. Sobreexpresión de proteínas recombinantes a gran escala en bacterias**

Las proteínas que mostraron buena expresión y solubilidad a pequeña escala fueron expresadas a mayor volumen para su posterior purificación. Los sistemas de expresión empleados a gran escala dependían de las mejores condiciones a pequeña escala.

#### **2.3.1. Sobreexpresión por IPTG**

Se preparó un cultivo de 20-25 ml con medio LB y antibiótico y una colonia de una placa de LB-agar o de un glicerinado de una cepa de expresión incubándose a 37°C durante 16 h en agitación a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™). Al día siguiente, se añadieron 20 ml de cultivo saturado a 1 L (dilución 1/50) de medio LB estéril con antibiótico. Se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> 0,6-0,8 con la misma agitación. Posteriormente, se añadió 0,1 mM o 0,5 mM IPTG para una incubación a 20°C durante 16 h o 1 mM para 5 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron las células por centrifugación a 3.700 x g (Heraeus Multifuge™ X3 FR Centrifuge, rotor TX-1000, Thermo Scientific™) durante 25 min a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 30 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifugó 20 min a 3.000 x g. Las células se conservaron a -80°C hasta su futura purificación.

### 2.3.2. Sobreexpresión por autoinducción

Se inoculó una colonia de una placa LB-agar o de un glicerinado de una cepa de expresión en 10 ml de cultivo con 9,3 ml medio ZY, 1 mM de  $MgSO_4$ , 0,8% (p/v) glucosa, NPS 1x y el antibiótico correspondiente y se incubó 16 h a 37°C en agitación a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™). Al día siguiente, se añadió el cultivo saturado a 930 ml de medio ZY fresco para comenzar la autoinducción suplementado con 1 mM de  $MgSO_4$ , 5052 1x, NPS 1x y los correspondientes antibióticos. Se crecieron en matraces Erlenmeyer con 0,5 L de cultivo a 37°C y cuando alcanzaron la D.O.<sub>600</sub> de 0,8-1,2 se cambió a 20°C durante 16 h con la misma agitación. Las células fueron recogidas como se describe en el apartado 2.3.1. y se congelaron a -80°C hasta su uso.

## 3. Expresión de proteínas en células de insecto mediante baculovirus

En este trabajo se han utilizado las construcciones de ScYtm1 y CtYtm1 pOPINF realizadas en nuestro laboratorio por el Dr. Marcin Węgrecki. Estas construcciones fueron clonadas en vectores pOPINF (extremo amino terminal 6xHis escindible por la proteasa 3C) por el sistema de clonaje In-fusion (Clontech). Para la expresión de las distintas proteínas se ha seguido el protocolo de expresión en células de insecto de Oxford Protein Production Facility (OPPF, Reino Unido).

Se añadieron 2 ml de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) a  $1 \times 10^6$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos durante 1 h a 27°C. Mientras tanto, se preparó la mezcla de transfección que contenía 200 µl de medio Sf900II SFM (Gibco), 1 µg de bÁcmido Ian Jones linealizado [220], 1-1,5 µg de ScYtm1/CtYtm1 pOPINF y 4 µl del agente de transfección FuGENE®HD (Promega) por pocillo, permaneciendo durante 30 min a TA. Toda la mezcla de transfección se añadió a cada pocillo con células Sf9 y las placas se incubaron a 27°C durante 5 días. Se recogieron 500 µl de sobrenadante de cada pocillo (baculovirus recombinantes generados) y se añadieron a 30 ml de células Sf9 a  $1,5 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo Sf900II SFM incubándose a 27°C durante 5 días a 150 rpm produciéndose una segunda progenie viral con un título de virus mayor. Se añadieron 10 ml de virus amplificado a 300 ml de células Sf9 a  $1,5 \times 10^6$  células/ml y los cultivos fueron incubados a 27°C durante 72 h con la misma agitación. Las células infectadas se recogieron por centrifugación a 1.000 x g durante 15 min y 4°C y se lavaron con PBS. El precipitado celular se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la titulación o cuantificación del virus producido en los sucesivos pases de infección se utilizó la línea celular denominada Sf9 ET, (CRL-3357<sup>TM</sup>, ATCC<sup>®</sup> (American Type Culture Collection)), que expresa la proteína fluorescente GFP de manera proporcional cuando son infectadas por virus. Se repartieron 100 µl de medio Sf900II SFM y 100 µl de células Sf9 ET a  $0,8 \times 10^6$  células/ml en placas de 96 pocillos. El virus diluido 1/100 se repartió de forma seriada diluyendo 1/5 entre cada pocillo. Se incubaron las placas a 27°C durante 4-5 días y las células fueron visualizadas en un microscopio invertido de fluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems). El título de virus (virus/ml) se calculó multiplicando la dilución de todos los pocillos hasta llegar al último donde se observó un sólo punto verde de fluorescencia por 100 (primera dilución del virus) y dividido entre 0,1 ml (volumen de virus del primer pocillo).

## 4. Purificación de proteínas y caracterización de proteínas

### 4.1. Pruebas de expresión de proteínas a pequeña escala

Las proteínas expresadas a pequeña escala en células *E.coli* (apartado 2.2) se purificaron utilizando diferentes resinas según el tipo de etiqueta fusionada a la proteína recombinante: resina quelantes cargadas de níquel (6BCL-QHNi-100, ABT) para proteínas con cola de polihistidinas, resina de glutatión (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare) para proteínas con etiqueta de Glutatión-S-transferasa (GST) y resina de amilosa (NEB) para proteínas con proteína de unión a maltosa (MBP).

El sedimento celular fue resuspendido en 500 µl de tampón de lisis (**Tabla 5**) y lisado mecánicamente con perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec. Products) en 10 ciclos de 30 s intermitentes a 7.500 rpm con Precellys<sup>®</sup> Evolution (bertin Technologies). Los tubos se centrifugaron a 20.000 x g durante 20 min a 4°C. Al sobrenadante se añadió 100 µl de resina previamente lavada con H<sub>2</sub>O miliQ y equilibrada con tampón A (**Tabla 5**) en rotación constante durante 1 h a 4°C. La resina se precipitó por centrifugación durante 1 min a 6.000 x g (Microcentrífuga Sorvall<sup>TM</sup> Legend Micro 21R, Thermo Scientific<sup>TM</sup>) y se lavó 3 veces con 1 ml de tampón C (**Tabla 5**). Finalmente, se añadieron 30 µl de tampón de carga Laemmli SDS-PAGE 5x (312 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (p/v) dodedil sulfato de sodio (SDS), 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol (BME), 0,02 % (p/v) azul de bromofenol) y se calentaron durante 20 min a 95°C. Las alícuotas de todos los pasos de purificación fueron analizadas en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%.

## 4.2. Purificación de proteínas a gran escala

### 4.2.1. Lisis celular y extracción de proteínas

El sedimento celular de *E.coli* de 1 ó 2 L de cultivo con las proteínas sobreexpresadas a gran escala se resuspendió en un volumen de 50-70 ml de tampón de lisis (**Tabla 5**) suplementado con una pastilla de un cóctel de inhibidor de proteasas (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Posteriormente, se lisaron por sonicación con pulsos de 1 s y descanso de 1 s durante 30 min a 24% de amplitud en un sonicador Vibra-Cell™ 75042 (Biolock Scientific). Para las proteínas expresadas en células de insecto el tiempo de sonicación fue de 15 min. El lisado celular se centrifugó a 27.000 x g (Sorvall™ RC 6 Plus, rotor SS34, Thermo Scientific™) durante 35 min a 4°C. El sobrenadante resultante se pasó a través de filtros de 0,45 µm de diámetro de poro y fue cargado en la correspondiente columna de cromatografía por una bomba peristáltica (Minipuls®3, Gilson). Se tomaron alícuotas del sedimento de la centrifugación y del sobrenadante para visualizar la buena sonicación de la muestra y su solubilidad en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%.

### 4.2.2. Cromatografía de afinidad para proteínas con etiqueta de Histidinas

Las cromatografías de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) se llevaron a cabo con columnas de resinas quelantes cargadas de Níquel HisTrap HP (GE Healthcare) de 1 ó 5 ml. Las columnas fueron previamente lavadas con 10 volúmenes de columna (VC) de H<sub>2</sub>O miliQ y equilibradas con 10 VC de tampón A (**Tabla 5**). El sobrenadante del clarificado celular se cargó a través de una bomba peristáltica (Minipuls®3, Gilson) y se realizaron etapas de lavado y elución con el sistema FPLC ÄKTAPurifier (GE Healthcare). La columna se lavó con 5 VC de tampón A para retirar las proteínas no retenidas a la columna y la elución se realizó con un gradiente de imidazol (20-500 mM) de tampón B (**Tabla 5**) durante al menos 15 VC. Se recogieron fracciones de 1 ó 5 ml dependiendo del tamaño de la columna que fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE al 10%. El programa utilizado por el sistema FPLC ÄKTAPurifier (GE Healthcare) para la monitorización de todas las purificaciones fue Unicorn 4.0.

#### 4.2.3. Cromatografía de afinidad para proteínas con etiqueta de GST

El sobrenadante del lisado celular de las construcciones etiquetadas con GST se cargaron en columnas de 5 ml GSTrap HP (GE Healthcare) lavadas previamente con 10 VC de H<sub>2</sub>O miliQ y 10 VC de tampón C (**Tabla 5**) con la bomba peristáltica. Una vez cargada la columna con el sobrenadante filtrado, la purificación se realizó con el sistema FPLC ÄKTAPurifier (GE Healthcare) comenzando con 4 VC de tampón C (**Tabla 5**) y eluyendo la muestra con un gradiente de glutatión reducido con tampón E (0-20 mM) a flujo constante de 0,2-0,4 ml/min. Las fracciones de 5 ml fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE al 10%.

#### 4.2.4. Purificación de proteínas con etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP)

El lisado celular filtrado se incubó con 1-3 ml de resina de amilosa (NEB), previamente equilibrada con tampón C (3 centrifugaciones de 1 min a 6.000 x g) (**Tabla 5**), durante 1 h en rotación constante a 4°C. Posteriormente se centrifugó 2 min a 6.000 x g y se lavó 3 veces con 5-10 ml del mismo tampón. Se eluyó la proteína incubando la resina con 5-10 ml de tampón F (**Tabla 5**) en sucesivos pasos de centrifugación recogiendo el sobrenadante en cada uno de ellos. Los lavados y las eluciones fueron visualizados en un gel SDS-PAGE al 10%.

#### 4.2.5. Cromatografía de afinidad usando columnas de heparina

Como un paso adicional de purificación tras la HisTrap, se utilizó la cromatografía de afinidad HiTrap Heparin (GE Healthcare) de 5 ml con las proteínas que copurifican con ácidos nucleicos (**Tabla 6**). Las columnas se lavaron con 10 VC de H<sub>2</sub>O miliQ y se equilibraron con 10 VC de tampón C (**Tabla 5**). El tampón donde se encuentra la muestra disuelta debe tener una baja concentración de sales. Las columnas se lavaron con 10 VC con tampón C en el sistema FPLC ÄKTAPurifier (GE Healthcare). La elución se realizó con tampón D (**Tabla 5**) mediante un gradiente lineal con alta concentración de cloruro sódico (0,15-1,5 M NaCl). La absorbancia a 260 y 280 nm se monitorizó durante toda la purificación para detectar las fracciones de proteína libre de ácidos nucleicos. Todas las eluciones fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE al 10%.

#### 4.2.6. Cromatografía de intercambio iónico

Para la purificación de algunas proteínas fue necesario una cromatografía de intercambio iónico (**Tabla 6**). Esta técnica permite la separación de las moléculas en base a su carga. Conociendo el pH del tampón donde está la proteína de interés y su punto isoeléctrico (pI) podemos utilizar HiTrap Q HP (GE Healthcare) para intercambio aniónico o HiTrap SP HP (GE Healthcare) para intercambio catiónico. Las columnas utilizadas de 5 ml fueron lavadas con 10 VC de H<sub>2</sub>O miliQ y equilibradas con 10 VC de tampón C (**Tabla 5**). Tras la cromatografía de afinidad HisTrap, se seleccionaron las eluciones donde se encontraba la proteína de interés y se pasaron a través de la columna correspondiente (Q o S según su carga) con la bomba peristáltica Minipuls®3 (Gilson). Con el ÄKTAPurifier (GE Healthcare) se programaron 10 volúmenes de lavado con tampón A (**Tabla 5**) y posteriormente un gradiente lineal para la elución con tampón G (**Tabla 5**), rico en sales (0,15-1 M NaCl). Finalmente, las eluciones aparecidas en el cromatograma se cargan en un gel SDS-PAGE al 10%.

#### 4.2.7. Digestión de la etiqueta

Para algunos ensayos biofísicos fue necesario eliminar la etiqueta de Histidinas o de GST de algunas proteínas mediante la proteasa de precisión (PreScission Protease, PP). La PP es una proteína de fusión genéticamente modificada de la proteasa humana de rinovirus humano (HRV) tipo 14 3C etiquetada con GST. Escinde específicamente entre los residuos glutamina (Gln) y glicina (Gly) de la secuencia de reconocimiento LeuGluValLeuPheGln/GlyPro.

Las digestiones se realizaron mezclando las proteínas con la PP a un ratio molar 1:50 (proteasa: proteína purificada). La digestión se realizó durante una diálisis en *cassettes* de diferentes tamaños según el volumen y tamaño de muestra (entre 0,5-15 ml de volumen y 3,5-10 kDa) (Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette-Thermo Scientific™) a 4°C durante 16 h para eliminar el imidazol o el glutatión utilizando el tampón C (**Tabla 5**) suplementado con 5 mM de BME.

Transcurrido el tiempo de digestión, las construcciones que contenían una etiqueta de GST se cargaron en una columna GSTrap que permitió capturar tanto la etiqueta como la PP mientras que las proteínas con etiqueta de His se cargaron primero en una Histrap para separar la etiqueta y, posteriormente, en una GSTrap para capturar la PP. En ambos casos, las columnas GSTrap y Histrap se lavaron con 5 VC con tampón C (**Tabla 5**) para recoger la proteína digerida y con 5 VC con tampón B para Histrap y tampón E para GSTrap (**Tabla 5**) para la elución de las

etiquetas y la PP. Para seguir el éxito del proceso de digestión se cargaron las fracciones de sobrenadante sin digerir, lavados y eluciones en un gel de SDS-PAGE al 10%.

#### 4.2.8. Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones resultantes de las proteínas tras las cromatografías descritas anteriormente se concentraron por centrifugación a 3.000 x g y a 4°C en concentradores Amicon® Ultracel 10K, 30K o 50K de límite de peso molecular.

En la cromatografía de exclusión molecular (SEC) se utilizaron las columnas Superdex 200 HiLoad 16/60, Superdex 75 HiLoad 16/60 (Amershan Pharmacia Biotech) y Superdex 200 increase 10/300 (GE Healthcare). Además se utilizó la columna Superosa 6 increase 10/300 GL (GE Healthcare) para la purificación de heterocomplejos para microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (NS-TEM) y crio-microscopía electrónica (cryo-EM). Todas las purificaciones se realizaron con el sistema FPLC ÄKTAPrime (GE Healthcare). Las columnas se lavaron con 1 VC de H<sub>2</sub>O miliQ y se equilibraron con 1 VC de tampón C (**Tabla 5**) antes de la inyección de la muestra. Además, las columnas de exclusión molecular fueron previamente calibradas por estándares de proteínas con pesos moleculares conocidos para una apropiada estimación de los resultados (Molecular Weight Marker Kit, MW-GF-70, Sigma-Aldrich®). La elución de las proteínas fue monitorizada midiendo la absorbancia a 280 nm a través del programa Unicorn 4.0 y las muestras de los picos de elución se cargaron en geles SDS-PAGE al 10%. Las alícuotas de proteínas puras fueron concentradas con concentradores Amicon® Ultracel 10K, 30K o 50K, distribuidas en alícuotas entre 3-40 mg/ml dependiendo de la proteína y congeladas en nitrógeno líquido antes de conservarlas a -80°C.

**Tabla 5. Tampones utilizados en las purificaciones de las proteínas en este trabajo.**

Nombre Tampón	Componentes
<b>Tampón de lisis</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 0,5 M NaCl; 10 % (v/v) glicerol; 0,1% (v/v) Tritón X-100; 5 mM BME
<b>Tampón A</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 0,2 M NaCl; 5 % (v/v) glicerol; 20 mM imidazol; 2 mM BME
<b>Tampón B</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 0,2 M NaCl; 5 % (v/v) glicerol; 500 mM imidazol; 2 mM BME
<b>Tampón C</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 0,15 M NaCl; 2 mM BME
<b>Tampón D</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 1,5 M NaCl; 2 mM BME
<b>Tampón E</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 0,15 M NaCl; 20 mM glutatión reducido; 2 mM BME
<b>Tampón F</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 0,15 M NaCl; 20 mM maltosa; 2 mM BME
<b>Tampón G</b>	50 mM Hepes pH 7,5; 1 M NaCl; 5 % (v/v) glicerol; 2 mM BME



Para la construcción ScNoc2 pNKI se utilizó 50 mM MES pH 6,5 en todos los tampones y la columna HiTrap SP HP (GE Healthcare). Para ScHas1 pNKI también se utilizó la cromatografía de intercambio catiónico con la columna HiTrap SP HP (GE Healthcare). En el caso de CtDrs1, todos los tampones contenían 0,5 M de NaCl. La siguiente tabla resume el sistema de expresión y el método de purificación utilizado para cada proteína en este estudio.

**Tabla 6. Proteínas expresadas y purificadas a gran escala y el tipo de cromatografía usada en este estudio.** BL21: cepa *E.coli* BL21 (DE3); BL21 C+: cepa *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL; Sf9: células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*); His: cromatografía de afinidad para proteínas con etiqueta de Histidinas; Hep: cromatografía de afinidad usando columnas Hitrap Heparina; GST: cromatografía de afinidad para proteínas con etiqueta GST; E.mol: cromatografía de exclusión molecular; I.Iónico: intercambio iónico; 6xHis: etiqueta de 6 histidinas; aas: aminoácidos.

Proteína	aas	kDa	Etiqueta/sitio de corte	Cepa Huésped	Modelo de expresión	Purificación
ScNop7 pNKI	1-605	69,87	6xHis (3C)	BL21C+	0,5 mM IPTG/ 20°C/16 h	His- E.Mol
ScErb1 pNKI	1-807	91,70	6xHis (3C)	BL21C+	Autoinducción	His- Hep- E.Mol
ScYtm1 pOPINF	1-460	51,36	6xHis (3C)	Sf9	Baculovirus / 72 h	His- E.Mol
CtNop7 pNKI	1-679	77,06	6xHis (3C)	BL21C+	0,5 mM IPTG/ 20°C/16 h	His- E.Mol
CtNop7 <sub>1-350</sub> pNKI	1-350	33,60	6xHis (3C)	BL21C+	Autoinducción	His-E-Mol
CtNop7 <sub>1-350</sub> pGKI	1-350	33,60	GST (3C)	BL21C+	Autoinducción	His- E.Mol
CtErb1 pNKI	1-801	90,70	6xHis (3C)	BL21C+	Autoinducción	His-Hep- E.Mol
CtErb1 <sub>1-435</sub> pNKI	1-435	50,37	6xHis (3C)	BL21C+	Autoinducción	His- E.Mol
CtErb1 pMBPKI	1-801	90,70	MBP (3C)	BL21C+	Autoinducción	Resina amilosa
CtYm1 pOPINF	1-495	52,94	6xHis (3C)	Sf9	Baculovirus / 72 h	His-E.Mol
ScDrs1 pGKI	1-752	84,84	GST (3C)	BL21C+	2% etanol IPTG 1 mM/5 h/ 37°C	GST-E.Mol
ScHas1 pNKI	1-505	56,72	6xHis (3C)	BL21C+	Autoinducción	His-I.Iónico- E.mol
ScHas1 pGKI	1-505	56,72	GST (3C)	BL21C+	Autoinducción	GST-E.mol
ScNoc2 pNKI	1-710	81,60	6xHis (3C)	BL21C+	Autoinducción	I.Iónico-His- E.mol
CtDrs1 pNKI	1-806	89,47	6xHis (3C)	BL21	0,5 mM IPTG/ 20°C/16 h	His-E.mol

#### 4.2.9. Cuantificación de proteínas

La concentración final de proteína pura se determinó por el método Bradford [221]. Se diluyeron 1-10  $\mu$ l de proteína pura en 1 ml de solución Bradford (Bio-Rad) en cubetas transparentes y se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) determinando la concentración de las muestras a partir de la recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) (Thermo Scientific™). También se han cuantificado las proteínas usando NanoDrop® (Thermo Scientific™) con el coeficiente de extinción molar teórico calculado por el programa ProtParam (Expasy) [222] a partir de la secuencia de aminoácidos de cada proteína.

#### 4.2.10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y en condiciones nativas (Native-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para el análisis de la purificación de las proteínas. Los geles estaban formados por dos partes diferenciadas: la parte superior/concentradora al 5% de poliacrilamida y la parte inferior/separadora. La parte inferior permite separar las proteínas en función de tamaño y/o carga y la parte superior concentra las muestras antes de que penetren en la parte inferior.

La mezcla del gel de separación fue preparada con volúmenes específicos de un *stock* al 40% (v/v) de mezcla de acrilamida (Acrylamide- 4K Solution, Mix 37.5:1, PanReac AppliChem) según el porcentaje de acrilamida que nos interese. Para la parte separadora de un gel al 10% de 0,75 mm de espesor se necesita un volumen total de 4,2 ml con la siguiente mezcla: 1,05 ml de Tris-HCl pH 8,8, 42  $\mu$ l de persulfato de amonio (APS) al 10% (p/v), 42  $\mu$ l de SDS al 10% (p/v) y 5  $\mu$ l N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED). Para prevenir el contacto con el oxígeno que inhibe la polimerización y alinear el frente, se añadieron unos microlitros de 2-propanol sobre la parte separadora. La parte concentradora del gel al 5% de acrilamida fue una mezcla de 174  $\mu$ l de acrilamida al 40% (v/v), 117  $\mu$ l de Tris-HCl pH 6,8, 14  $\mu$ l de SDS al 10% (v/v), 14  $\mu$ l de APS al 10% (v/v), 1,4  $\mu$ l de TEMED y 1,02 ml de H<sub>2</sub>O miliQ.

Los geles fueron de grosor entre 0,75 y 1,0 mm y de 10 ó 15 pocillos (Bio-Rad) según la cantidad y el número de muestras. La electroforesis vertical se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®3 Cell (Bio-Rad) en una fuente PowerPac™ Basic (Bio-Rad) a un voltaje y tiempo determinado para cada tipo de gel descrito en los siguientes apartados.

▪ Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE): es un sistema de electroforesis discontinuo donde las proteínas están desnaturalizadas en presencia del detergente aniónico SDS. Las proteínas migran en función del tamaño, pero no de la carga. Durante todos los pasos de purificación, las alícuotas de proteínas fueron preparadas con tampón de carga Laemmli 5x y se calentaron a 95°C durante 10 min. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 7,5, 8, 10 ó 12% [223] según el peso molecular de la proteína. Las proteínas migraron durante 35 min a 180 V constante en tampón MOPS-SDS (Alfa Aesar) o en tampón de electroforesis SDS-Running (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glicina y 0,1% (p/v) SDS). Se utilizaron 3 µl/gel de un marcador BlueStar Prestained Protein Marker (NIPPON Genetics Europe) para estimar el peso molecular relativo de las proteínas.

▪ Electroforesis de proteínas en geles nativos (Native-PAGE): esta técnica permite la migración de proteínas en condiciones nativas en geles de poliacrilamida según su forma, tamaño y carga. La electroforesis nativa se utilizó para visualizar cambios de movilidad electroforética entre distintas proteínas y la formación de complejos. Entre 15 y 25 µg de proteína se mezclaron con tampón de carga nativa 5x (0,3 M Tris-HCl pH 8,5, 40% (v/v) glicerol, 0,05% (p/v) azul de bromofenol) y se resolvieron en geles al 8% de acrilamida (sin SDS) en el mismo sistema que la electroforesis SDS-PAGE pero a 100 V constante durante 5 h a 4°C. El tampón de electroforesis nativo contenía 25 mM Tris-HCl y 192 mM glicina a pH 8,3. Antes de cargar las muestras, el gel se expuso durante 40 min a 100 V en tampón de electroforesis nativo 4°C.

Una vez terminada las electroforesis SDS-PAGE y Native-PAGE se tiñeron los geles durante 20 min con la solución de tinción de Coomassie Blue Brilliant G (Sigma-Aldrich) (2,5 g (p/v), 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético, 50% (v/v) H<sub>2</sub>O) y se destiñeron durante otros 20 min con la solución 10% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético y 80% (v/v) de H<sub>2</sub>O pudiéndose observar bandas coloreadas donde se encontraban las distintas proteínas.

#### **4.3. Caracterización por sistema de dispersión de luz multiángulo (MALS) y dispersión de luz dinámica (DLS)**

Se realizó cromatografía analítica para la caracterización de proteínas por cromatografía de exclusión molecular acoplado a un sistema de dispersión de luz multiángulo (MALS). Se realizó con una columna PROTEIN KW-803 (8x300 mm, Shodex™) conectada a un sistema FPLC

ÅKTA Pure (GE Healthcare). La columna conservada en H<sub>2</sub>O miliQ se equilibró con tampón C (**Tabla 5**) a un flujo constante. Las especificaciones de esta columna son un pH máximo de 7,5 y de 0,3 M de NaCl. Para evitar el ruido, la cromatografía se realizó a flujo constante (0,45 ml/min) filtrando y desgasificando el tampón y la muestra antes de la inyección. El detector Multi angle light scattering (MALS, TREOS II - Wyatt Technology), considerando la absorbancia UV a 280 nm y las señales del índice de refracción diferencial (dRI, Optilab® T-rEX - Wyatt Technology), permite conocer el peso molecular absoluto de las poblaciones de proteínas separadas previamente por SEC, incluyendo proteínas puras, oligómeros nativos y heterocomplejos en solución. Los programas empleados fueron Unicorn 7.1 para el FPLC y ASTRA 7.1.2 para el MALS.

Por último, se caracterizó el grado de dispersión de la muestra mediante el sistema de dispersión de luz dinámica en cubeta (Dynamic light scattering, DynaPro® NanoStar® - Wyatt Technology).

## 5. Péptidos sintéticos

Usando las coordenadas de la estructura resuelta del complejo Erb1/Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* [130], se realizó un diseño guiado por la estructura de una serie de péptidos sintéticos. A partir de los resultados del apartado 1.2. de la parte II de Resultados, diseñamos una variedad de péptidos sintéticos (**Tabla 27**). Tres se sintetizaron con una molécula de biotina en su extremo N-terminal para ensayos de interacción péptido-proteína y dos fueron diseñados con la secuencia homóloga en humanos de Erb1 (Bop1) y una secuencia denominada TAT en el extremo N-terminal para atravesar las membranas celulares [210,212]. Asimismo, uno de ellos se sintetizó con la molécula fluoresceína isocianato (FITC), precursor activado de la fluoresceína, en el extremo N-terminal [224]. Los péptidos fueron comercialmente obtenidos de Synpeptide Co., Ltd Shanghai, China. La pureza y composición de cada péptido fueron confirmadas por espectrometría de masas y HPLC por Synpeptide.

## 6. Experimentos de unión *in vitro*

### 6.1. Ensayos de precipitación

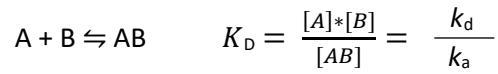
Los ensayos de precipitación permiten detectar interacciones físicas proteína-proteína. Se utiliza una proteína diana etiquetada inmovilizada a una determinada resina y se incuba con una segunda proteína sin etiqueta o con una etiqueta diferente. Si ambas proteínas interactúan entre sí coeluirán juntas en las fracciones finales de elución.

En este estudio, se incubaron 100-200 µg de proteína etiquetada pura con 50-100 µl de resina previamente lavada con H<sub>2</sub>O miliQ y equilibradas con tampón C (**Tabla 5**) durante 1 h a 4°C con rotación constante. El tipo de resina utilizada depende del tipo de etiqueta fusionada a la proteína diana. Para proteínas con etiqueta 6xHis se usa la resina de níquel High Density Nickel (ABT), para proteínas con etiqueta GST la resina Sepharose Glutathione 4B Beads (GE Healthcare) y para etiquetas de MBP la resina de amilosa (NEB). Tras la incubación de la proteína diana con la resina correspondiente, se lavó con 1 ml de tampón C (**Tabla 5**) por centrifugación durante 1 min a 6.000 x g a 4°C para eliminar la fracción de proteína no unida. Posteriormente, se añadió la segunda proteína sin etiqueta o con una etiqueta diferente a la primera en cantidades equimolares y se dejó incubar durante 1 h a 4°C a rotación constante. Se recogió el sobrenadante que contenía la fracción no unida y se lavó la resina 3 veces con 1 ml de tampón C en pulsos de centrifugación de 5 s a 6.000 x g. Finalmente, la resina con las proteínas unidas se calentó 10 min a 95°C con 30 µl de tampón de carga SDS-PAGE 5x. Las muestras recogidas durante el ensayo (las fracciones de proteína no unida, lavados y resina) se cargaron en geles SDS-PAGE al 10%.

### 6.2. Ensayos de Interferometría de bicapa (BLI)

La interferometría de bicapa (BLitz®, Pall Fortébio Corp.) es un sistema que permite la identificación de las interacciones entre proteínas y otras biomoléculas en gotas de unos 4 µl de muestra. En BLI se inmoviliza la molécula ligando en la punta del biosensor de fibra óptica y, posteriormente, se sumerge en la solución analítica que contiene la segunda molécula de unión. El sistema mide la luz que se refleja al incidir luz blanca en la capa interna del biosensor, capa de referencia, y en la proteína inmovilizada. Si se produce la unión, hay un desplazamiento en la

longitud de onda reflejada en la punta del biosensor y, de este modo, calcula las constantes de asociación ( $k_a$ ), disociación ( $k_d$ ) y constante de afinidad  $K_D$ .

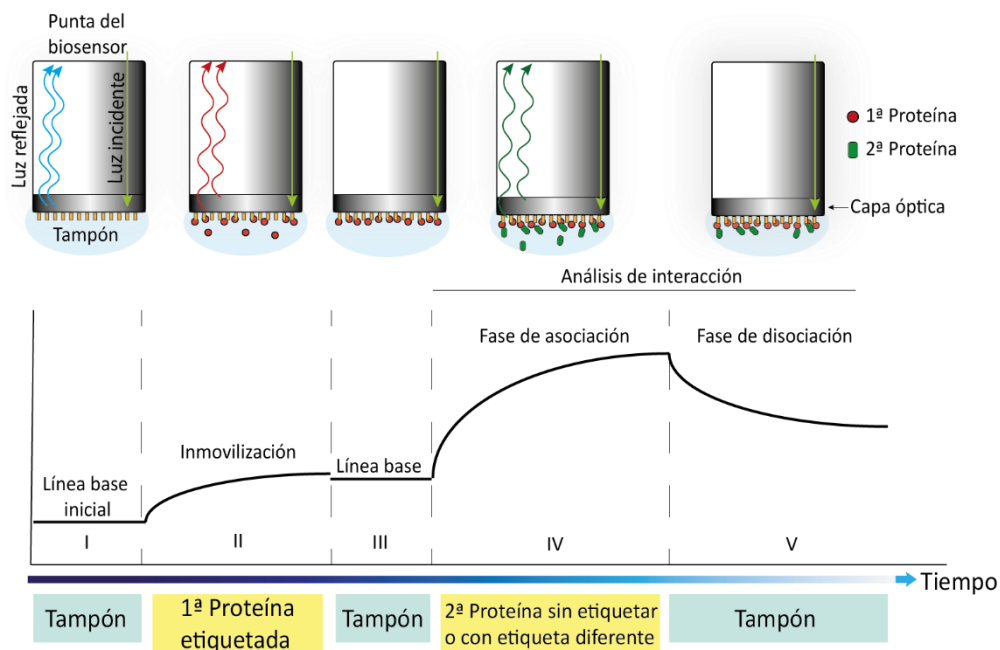


Las ecuaciones de la fase de asociación y disociación implementadas en el sistema BLITz® en una reacción de interacción 1:1 se detalla a continuación:

$$y = R_{\max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a * [\text{Analito}]}} (1 - e^{-(k_a * [\text{Analito}] + k_d)x})$$

siendo  $y = y_0 e^{-k_d(x-x_0)}$

$$y_0 = R_{\max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a * [\text{Analito}]}} (1 - e^{-(k_a * [\text{Analito}] + k_d)x_0})$$



**Figura 16. Esquema del ensayo de Interferometría de bicapa (BLI).** Figura adaptada de Müller-Esparza *et al.*, 2020 [225].

Para los ensayos BLI se realizó el siguiente protocolo: los sensores se equilibraron con 250  $\mu$ l de tampón C (**Tabla 5**) durante 10 min. Se estableció la línea base incubando el sensor en tampón C. Posteriormente, 4  $\mu$ l de la proteína diana se inmovilizó en sensores de Ni-NTA (FortéBio) que contenían níquel para proteínas con etiqueta de histidinas, sensores anti-GST

(FortéBio) para proteínas con etiqueta GST y sensores de estreptavidina (FortéBio) para péptidos marcados con biotina durante 180 s. A continuación, se equilibró durante 60 s en tampón C y se incubó con 4  $\mu$ l de la segunda proteína sin etiqueta o con una etiqueta diferente para evitar uniones inespecíficas al sensor a diferentes concentraciones (0,5 – 20  $\mu$ M) durante 180 s, etapa de asociación y, finalmente, se añadió tampón C durante 180 s para completar la etapa de disociación. Los ensayos con distintas proteínas diana se encuentran resumidos en la **Tabla 7**. El programa para el cálculo de las constantes de afinidad fue BLItz Pro1.2. El sistema de BLI está representado esquemáticamente en la **Figura 16**.

La regeneración de los biosensores de Ni-NTA se produjo sumergiendo la superficie del biosensor en 10 mM glicina pH 1,9 durante 5 s, PBS 5 s, 10 mM NiCl<sub>2</sub> durante 1 min, PBS durante 5 s y 15% (p/v) sacarosa en PBS durante 5 min. Los biosensores anti-GST fueron regenerados con 10 mM glicina pH 1,9 durante 5 s y PBS y los de estreptavidina con 0,5 mM NaOH pH 10 durante 10 min y PBS. Finalmente, todos los biosensores se secaron durante 5 min a TA.

**Tabla 7. Ensayos de BLI realizados en este trabajo.** (\*) El ensayo se realizó con tampón C (**Tabla 5**) suplementado con 0,05% (p/v) de BSA.

Tipo de biosensor	Proteína inmovilizada al biosensor	Concentración 1ª Proteína ( $\mu$ g/ml)	Proteína secundaria
Ni-NTA	CtNop7	50 $\mu$ g/ml	CtErb1
	CtNop7	30 $\mu$ g/ml	CtErb1 <sub>1-435</sub>
	CtErb1	80 $\mu$ g/ml	CtYtm1
	CtYtm1	80 $\mu$ g/ml	CtErb1
	ScNop7	30 $\mu$ g/ml	ScErb1
	ScErb1	30 $\mu$ g/ml	ScDrs1
	ScPeBoW	50 $\mu$ g/ml	ScDrs1
	ScNoc2	50 $\mu$ g/ml	ScErb1
Anti-GST	ScDrs1	30 $\mu$ g/ml	ScErb1
	ScDrs1	30 $\mu$ g/ml	ScPeBoW
	ScHas1	50 $\mu$ g/ml	ScErb1
Estreptavidina	Biot-P1*	50 $\mu$ g/ml	CtYtm1
	Biot-P3*	50 $\mu$ g/ml	CtYtm1
	Biot-P6*	50 $\mu$ g/ml	CtErb1

### 6.2.1. Ensayos de interferencia por péptidos sintéticos

El potencial de interferencia de los péptidos se evaluó según su capacidad de interferir en la cinética y afinidad del complejo entre CtErb1 y CtYtm1 usando BLI con biosensores de Ni-NTA

y tampón C (**Tabla 5**) con 5% (v/v) de glicerol. Inicialmente se estableció la constante de afinidad de referencia entre *CtErb1* y *CtYtm1* como se ha descrito en el apartado anterior. Una solución a 80 µg/ml de *CtErb1* fue inmovilizada al biosensor para obtener las curvas de afinidad con concentraciones crecientes de *CtYtm1*. De acuerdo con esto, la evaluación de los péptidos derivados de *CtErb1* (P1-P3, **Tabla 27**) se realizó usando 5 µM de *CtYtm1* previamente incubada durante 30 min con concentraciones equimolares de cada péptido determinándose nuevos valores de  $K_D$  frente a *CtErb1* a 80 µg/ml inmovilizado en sensores Ni-NTA. De forma similar, para estudiar la competencia en la unión que ejercían los péptidos derivados de *CtYtm1* (P4-P6), una solución a 80 µg/ml de *CtYtm1* fue inmovilizada en biosensores Ni-NTA para obtener las curvas de afinidad con concentraciones crecientes de *CtErb1*. La concentración seleccionada de *CtErb1* usado como analito fue de 20 µM. Cada péptido derivado de *Ytm1* (P4-P6) fue evaluado preincubando con concentraciones equimolares y 20 µM de *CtErb1* a contra *CtYtm1* inmovilizado a 80 µg/ml.

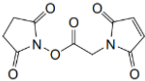
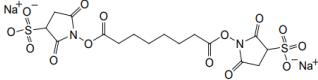
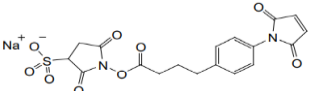
### 6.3. Entrecruzamiento de proteínas

El entrecruzamiento de proteínas estabiliza interacciones entre proteínas mediante la formación de enlaces covalentes usando diferentes reactivos para unir químicamente dos o más moléculas. Existe un amplio conjunto de agentes químicos para marcar o unir proteínas. En este caso, hemos usado los reactivos descritos en la **Tabla 8** (Thermo Scientific™).

El complejo *CtPeBoW* a 1 mg/ml se mezcló con diferentes concentraciones de entrecruzadores (de 10 a 200 veces más en molaridad) en tampón 50 mM Hepes pH 7,5 y 150 mM NaCl en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a diferentes tiempos y temperatura, desde 5 min a TA hasta 16 h a 4°C y/o TA para identificar la mejor condición de entrecruzamiento. Tras el tiempo de incubación, la mezcla de reacción con Sulfo-SMPB y AMAS se paró añadiendo 20 mM de Tris-HCl pH 8 y para el BS<sup>3</sup> 40 mM Tris-HCl pH 7,5 y 15 min a TA. Posteriormente, se añadieron 2 µl de tampón de carga Laemmli 5x y se calentaron las muestras 10 min a 95°C. Como control se utilizaron las proteínas en ausencia de entrecruzador. Los 10 µl de reacción final se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 7,5% de acrilamida durante 1-2 h a 100 V en tampón MOPS-SDS. Las bandas de proteínas de interés fueron extraídas del gel y enviadas al Servicio de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (Burjassot, UV) para su análisis por cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas (LC-MS/MS, Liquid chromatography tandem-mass spectrometry).



Tabla 8. Características de los entrecruzadores utilizados en este trabajo.

Nombre entrecruzador	Fórmula química	Peso molecular	Longitud espaciadora
AMAS (N- $\alpha$ -maleimidoacetoxysuccinimide ester)		252,18 Da	4,4 Å
BS <sup>3</sup> (bis(sulfosuccinimidyl)suberate)		572,43 Da	11,4 Å
Sulfo-SMPB (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidophenil)butyrate)		458,38 Da	11,6 Å

#### 6.4. Ensayos de estabilidad térmica de proteínas en presencia de péptidos sintéticos

Los ensayos de termofluor (differential scanning fluorimetry, DSF) [226] sirven para conocer la estabilidad de las proteínas basándose en la desnaturalización térmica de las mismas. El fluoróforo SYPRO® Orange Protein Stain Gel (Supelco, Merck-Sigma®) en disolución acuosa no tiene capacidad de emisión, pero la adquiere cuando está en un entorno hidrofóbico. La proteína cuando se encuentra en su forma nativa no interacciona con el fluoróforo y no hay emisión y, a medida que aumenta la temperatura, se desnaturaliza uniéndose el fluoróforo a las superficies hidrofóbicas expuestas emitiendo fluorescencia.

Antes de comenzar el ensayo, el péptido P3 (Tabla 27) se resuspendió en el mismo tampón que la proteína diana CtYtm1 (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl) y el péptido P1 fue solubilizado en tampón 10 mM Tris-HCl pH 8,8. Se mezclaron 10  $\mu$ M de CtYtm1 con concentraciones de péptidos sintéticos de 1 mM en reacciones de 60  $\mu$ l de volumen final. Se añadió SYPRO® Orange a 5x de concentración final en los 60  $\mu$ l de reacción y se dispensaron 20  $\mu$ l/pocillo para hacer triplicados de cada concentración en placas de 96 pocillos. Se usó como referencia la determinación de la temperatura de desnaturalización (Td) de la proteína aislada. Posteriormente, se selló la placa con un plástico transparente, se centrifugó 1 min para bajar el volumen de los pocillos y se introdujo en un sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). El aparato midió la fluorescencia gradual generada por SYPRO® Orange cuando aumentó 1°C/min la temperatura desde los 20 a los 85°C en 65 ciclos. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración y el promedio de los datos fue analizado usando el programa GraphPad Prism 9.

### 6.5. Termoforesis a microescala (MST)

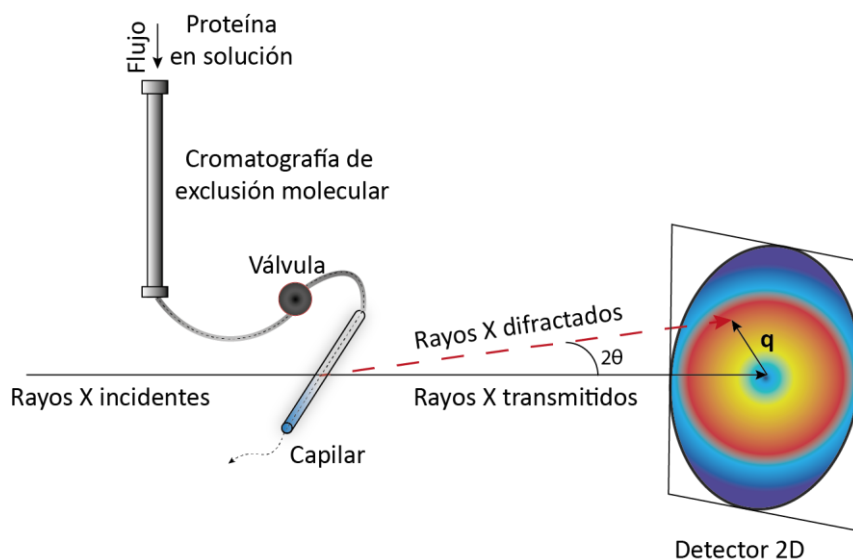
La termoforesis a microescala (MST) permite la determinación de los parámetros de afinidad entre una molécula y un ligando. Se basa en cuantificar un cambio de fluorescencia de la muestra inducido por un cambio de temperatura. Se marca la proteína con un determinado fluoróforo y se mezcla con el ligando no marcado sometiendo a la muestra a un gradiente de temperatura dentro de un capilar de vidrio. El protocolo de termoforesis de NanoTemper Technologies permite cuantificar el grado de marcaje de la proteína con el fluoróforo y determinar si existe interacción con una concentración fija de proteína marcada frente a la concentración máxima de ligando permitida. Finalmente, se preparan 16 capilares de vidrio con la misma concentración de proteína marcada con la molécula fluorescente y diluciones seriadas de ligando. El movimiento de las moléculas en los capilares es producido por un microgradiente de temperatura (2 a 6°C) inducido por un láser infrarrojo. Un láser con luz excita a la molécula fluorescente unida a la proteína y la fluorescencia emitida es monitorizada en el tiempo. MST permite cuantificar la fluorescencia emitida por el fluoróforo unido a la proteína determinando las constantes de afinidad del complejo proteína-ligando. Las curvas resultantes representan la fluorescencia normalizada de todas las trazas de MST frente a la concentración de ligando [227].

La termoforesis se utilizó para determinar la afinidad entre CtYtm1 y el P1 (**Tabla 27**). CtYtm1 fue marcada con el fluoróforo Red-NHS 2nd Generation (NanoTemper Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. Posee un grupo éster que reacciona con aminas primarias (residuos de lisina) para formar enlaces covalentes. Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{M}$  de proteína con 300  $\mu\text{M}$  de fluoróforo durante 30 min a TA en oscuridad. Se usó 5 nM de proteína marcada en tampón 50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl suplementado con 0,1% (v/v) de Plurónico F-127 y se mezcló con 16 diluciones seriadas de P1 (1.230  $\mu\text{M}$  a 0,0751  $\mu\text{M}$ ) en capilares de vidrio *Premium Coated Capillaries* (K005, NanoTemper Technologies) en el mismo tampón. De forma similar, la unión entre CtYtm1 y P3 usando MST fue testada usando el mismo tampón para CtYtm1 y P3. Las mediciones se realizaron cada 10 min durante 50 min en el instrumento Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). El ajuste de las curvas y los cálculos de la  $K_D$  fueron analizados de tres experimentos independientes con el programa M.O. Affinity Analysis software (NanoTemper Technologies).

## 7. Caracterización estructural

### 7.1. Dispersión de Rayos X de ángulo reducido (SAXS)

La dispersión de Rayos X de ángulo reducido (SAXS) es una técnica analítica que mide las intensidades de los rayos X dispersados por una muestra en función del ángulo de dispersión. Las mediciones de SAXS se realizan en ángulos de dispersión muy pequeños, generalmente de 0,1 a 5°. La información obtenida de los experimentos de SAXS permite estimar el peso molecular, oligomerización, flexibilidad, plegamiento y proporcionar una envoltura tridimensional de las proteínas, entre otras aplicaciones [228,229]. La información proporcionada por SAXS es de baja resolución, entre 15-50 Å. Un haz de rayos X es focalizado a través de una serie de filtros atravesando una muestra en solución. Cuando los rayos interactúan con la muestra el detector recoge el patrón de dispersión producido (**Figura 17**).



**Figura 17. Representación esquemática de un experimento de SEC-SAXS.**

El rango de dispersión del ángulo es controlado por cambios en la distancia de la muestra con el detector. La información antes del procesado es el patrón de dispersión generado por la muestra, representando sus distancias atómicas. Uno de los puntos clave para los experimentos de SAXS es la preparación de la muestra que debe ser altamente pura, monodispersa y diluida en un tampón sin detergente y baja concentración de sales. SAXS cubre todos los átomos presentes en la muestra, incluyendo los componentes del tampón. Por tanto, si el tampón

presenta componentes que perturben el patrón de dispersión inicial, la sustracción de dicho ruido dificultaría obtener el patrón de dispersión de la muestra [230].

Las muestras CtPeBoW y ScPeBoW se enviaron a la línea B21 del sincrotrón Diamond Light Source Ltd (Didcot, Oxfordshire, Reino Unido) a través de una ruta de acceso rápido para su análisis estructural mediante SEC-SAXS [231]. Una vez admitida la solicitud, se enviaron 100  $\mu$ l de las muestras a una concentración de 3,7 y 5,5 mg/ml, respectivamente, en tampón 50 mM Hepes pH 7,5 y 150 mM NaCl. La muestra se inyectó en una columna Shodex™ KW-403 (10-700 kDa) a un flujo de 0,16 ml/min en un sistema HPLC Agilent 1200. Las eluciones fueron atravesadas por un haz de rayos X (6-23 keV) cuando pasaban a través de un capilar fino y el patrón de dispersión producido fue detectado por un Eiger-detector 4M.

Los datos crudos proporcionados por el sincrotrón son un conjunto de imágenes en secuencia de la dispersión de rayos X (*frame by frame*) conforme el flujo de muestra pasa por el capilar. Los datos crudos fueron procesados por el sincrotrón utilizando la herramienta Dawn (archivos de salida .dat) (Diamond Light Source). Una vez procesados, se continuó el análisis usando la herramienta ScÅtterIV (desarrollada por Robert Rambo, Diamond Light Source). Cargando los archivos .dat en la pestaña SEC, el programa organizó por orden los fotogramas procesados por Dawn trazando el perfil del cromatograma. ScÅtterIV permitió seleccionar la región de menor intensidad (tampón) y la de mayor intensidad, región correspondiente al analito (pico), para sustraer el perfil de dispersión del tampón. Una vez seleccionada la región del pico de interés, el programa comparó cada fotograma de dispersión con todos los demás fotogramas seleccionados en esa área mostrando un mapa de correlación por colores. Los puntos en color cian son los que muestran mayor similitud de perfiles de dispersión y los de color magenta los más discrepantes. Se seleccionó un punto de color cian (de alta correlación) generándose una gráfica de intensidad de señal ( $I$ ) en escala logarítmica frente a  $q$  (amplitud del vector de dispersión). A continuación, se unieron los fotogramas correlacionados con la función Merge. En la pestaña Analysis, en el apartado Guinier Peak Analysis, se eliminaron algunos puntos para ajustarlos lo máximo posible a la recta de la gráfica  $\ln [I(q)]$  frente a  $q^2$  (Guinier Plot). Se realizó para descartar los datos de baja resolución, posibles errores en la correlación y para tener más fiabilidad del valor del radio de giro ( $R_g$ ), es decir, el análisis Guinier fue usado como criterio preliminar para evaluar la calidad de los datos de SAXS siendo el primer punto de modulación de los datos. Además, con esta gráfica podemos determinar si existe interferencia interpartículas o agregación de la muestra y el valor del radio de giro ( $R_g$ ). El  $R_g$  describe el volumen de distribución de una muestra, es decir, se refiere a la distancia cuadrática media de

todas las partículas desde el eje de rotación del espacio recíproco de la partícula. Finalmente, se truncaron los datos a una  $q$  máxima de 0,15.

También se generó el gráfico Kratky ( $[q^2 \times I(q)]$  vs  $q$ ) para averiguar el estado de plegamiento de la proteína. Según la forma de la curva se puede deducir si la proteína está bien, parcialmente plegada o desplegada. Posteriormente, se analizó la función de distribución de distancia por pares ( $P(r)$ ) a un valor máximo de  $q$  de 0,3 Å. La función de distribución  $P(r)$  es una transformada de Fourier del perfil de difracción. Esta función estima la probabilidad de forma de la partícula y la  $D_{\max}$  (máxima dimensión lineal o distancia intramolecular máxima) ajustando sus valores al perfil esperado según la naturaleza estructural del analito. Para proteínas globulares, se espera que la curva de la  $P(r)$  sea parecida a una campana de Gauss centrada. La  $D_{\max}$  representa la distancia lineal más larga de una proteína, en otros términos, el ancho máximo de la partícula y se obtiene cuando la curva de  $P(r)$  cae suavemente hasta el valor cero. Si la  $P(r)$  llega abruptamente al valor cero indicaría que la  $D_{\max}$  elegida es demasiado pequeña y debe aumentarse. Se acortaron los datos experimentales a una  $D_{\max}$  diferente para el complejo ScPeBow y CtPeBoW. También se generaron las curvas Porod-Debye [232] para el estudio de la flexibilidad de cada complejo, en las cuales una curva ascendente que alcanza una meseta en fase final indica proteínas con flexibilidad baja; en cambio, para moléculas con alta flexibilidad la curva continúa ascendiendo.

Además del programa ScÅtterIV, el procesamiento de los datos se continuó con el paquete de programas ATSAS [233] (EMBL, Biological Small Angle Scattering, BioSAXS, Hamburg):

- Primusqt. Fue el primer programa usado para determinar la calidad de los datos experimentales. Se cargaron los archivos de salida del programa ScÅtter generando también los gráficos de Guinier, Kratky, estimación del radio de giro y del peso molecular.

- Damminf (*Fast Dummy Atom Model Minimization*). Los archivos de salida del programa Primusqt (gnom) con una determinada  $D_{\max}$  seleccionada se cargaron en el programa online Damminf. Es un programa de modelado molecular que generó 20 envolturas de cada complejo. Además, creó los archivos de salida tipo texto damsel y damsup donde se clasificaron los modelos obtenidos según la menor discrepancia espacial normalizada (NSD). Los modelos tridimensionales *ab initio* originados se promediaron con el programa Damaver. Damaver alineó las estructuras y generó un modelo promedio. Finalmente, se filtraron las envolturas obtenidas con Damfilt. La herramienta Supcomb permitió la superposición del modelo filtrado por Damfilt

con una estructura modelo. La visualización de las envolturas generadas se realizó a través de PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.).

El ajuste de la curva experimental de SAXS y la curva teórica para comparar modelos atómicos y envolturas de SAXS se realizó a través del servidor web FoXS [234,235] obteniendo valores de  $\chi^2$ .

El peso molecular experimental de cada complejo se obtuvo mediante el programa primusqt del paquete ATSAS [233] y el servidor SAXSMoW (SAXS Molecular Weight) [236].

La herramienta informática DENSSWeb (Density from Solution Scattering, Center for Computational Research, University of Buffalo) se utilizó para calcular el mapa de densidad electrónica promedio *ab initio* de cada complejo de los datos procesados de SEC-SAXS [237].

## 7.2. Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (NS-TEM)

La obtención de un modelo tridimensional del complejo PeBoW se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa. Se prepararon gradillas de tinción negativa de las muestras CtPeBoW, CtPeBoW [MBP-CtErb1] y ScPeBoW. Las eluciones de cada complejo correspondientes al pico del cromatograma de exclusión molecular (columna Superosa 6 increase 10/300 GL, GE Healthcare) fueron diluidas a 0,05 y 0,025 mg/ml en tampón C (**Tabla 5**) y se usaron para preparar rejillas de tinción negativa de tipo 400 Square Mesh Copper 3,05 mm (G2400C, Agar Scientific). La tinción de las gradillas fue realizada por el Servicio de Microscopía electrónica del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV, Valencia). El depósito de carbono de 7 nm de espesor/gradilla se realizó con el recubridor de alto vacío Leica EM ACE600 (Leica Microsystems). El carbono depositado sobre ellas se sometió a un tratamiento de ionización conocido como *glow discharge* que consigue eliminar impurezas y generar una superficie hidrofílica para depositar la muestra. Se realizó utilizando la misma máquina Leica EM ACE600 (Leica Microsystems) a 10 mA durante 30 s y 3,0E-1 mbar de presión. Tras el tratamiento, se procedió a la preparación de distintas muestras con el siguiente protocolo de tinción. Se depositaron 4  $\mu$ l de proteína en cada gradilla incubándose 30 s. Usando papel Whatman® No.1 (*blotting*) se retiró el exceso de muestra y las gradillas fueron teñidas con 3 gotas sucesivas de acetato de uranilo al 0,5% (p/v) dejando la última gota durante 30 s. Por último, se procedió a la retirada completa de líquido dejando seca la gradilla y lista para su visualización al microscopio. Las gradillas preparadas se visualizaron a 100 V usando un

microscopio TEM Hitachi HT7800 120 Kv en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Valencia (UV) con una cámara digital 20 Mpx CMOS EMSIS XAROSA a 70K u 80K de magnificación. El tamaño de píxel calibrado fue de 1,863 Å/píxel. Se recogieron entre 40-50 micrografías de cada muestra.

### 7.2.1. Procesado de las muestras de NS-TEM

Las distintas micrografías fueron procesadas mediante el paquete de programas Scipion 3 desarrollado por el Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid). Junto con el Servicio de Microscopía Electrónica del IBV, se procesaron las micrografías recogidas con la aplicación Xmipp3. Con la herramienta manual-picking Xmipp3 se seleccionaron entre 15 y 20 partículas de un área de una micrografía, con auto-picking Xmipp3 se seleccionaron automáticamente todas las partículas del mismo tipo y se exportaron sus coordenadas con el programa Extract Xmipp3. Cl2D align Xmipp3prot alineó todas las partículas seleccionadas. Posteriormente, se clasificaron las imágenes mediante un algoritmo de agrupación en un determinado número de clases con el programa cl2d Xmipp3 y Cryosparc. En todos los casos, se realizó el modelo inicial con Cryosparc. Para el refinado de estos modelos se usó el programa 3D non-uniform-refinement de Cryosparc. Finalmente, se realizó una clasificación 3D con Relion. La visualización del mapa 3D final se realizó con UCSF Chimera [238].

### 7.3. Crio-microscopía electrónica

Los complejos CtPeBoW y CtPeBoW [MBP-CtErb1] purificados por exclusión molecular (columna Superosa 6 increase 10/300 GL, GE Healthcare) fueron diluidos entre 0,5 y 1 mg/ml en tampón C (**Tabla 5**) para preparación de crio-gradillas de Quantifoil R 1.2/1.3 grid Cu 300 (Electron Microscopy Sciences) utilizando el sistema Automatic Plungee Freeze EM GP2 (Leica Microsystems) a distintos tiempos de *blotting* (3,5 a 5 s). El *glow discharge* de las gradillas se realizó siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado anterior con el recubridor de alto vacío Leica EM ACE600 (Leica Microsystems). Posteriormente, las gradillas fueron congeladas en etano líquido y almacenadas en crio-cajas en nitrógeno líquido. Se realizó un cribado de cada una de las gradillas de cada condición por el Servicio de Microscopía Crioelectrónica del CNB (Madrid) con el microscopio 200 kV FEI TALOS Artica, equipado con un cargador automático y un detector de electrones directo Falcon III.

## 7.4. Ensayos de cristalización

Los ensayos de cristalización se realizaron utilizando la técnica de difusión de vapor en gota sentada en placas de 96 pocillos tipo MRC2 o MRC3, según el número de gotas por placa. Se disponían 2 gotas de proteína purificada en las placas MRC2 y 3 en MRC3 a distinta concentración con solución madre junto con un pocillo reservorio de tampón de cristalización. La concentración de agente precipitante en el reservorio es mayor que la de la gota permitiendo que se realice un equilibrio a través de la difusión de vapor hasta que ambas concentraciones se igualen por la evaporación de agua o de otros precipitantes más volátiles, como el isopropanol. Las placas de cristalización eran cribados comerciales con distintos tampones a distintos pH y precipitantes denominados JBScreen Classic HTS I y HTS II (Jena Bioscience) y Wizard I y II (Emerald BioSystems). Se dispensaron 0,3  $\mu$ l de proteína purificada junto con 0,3  $\mu$ l de solución madre por un equipo de nanodispersión (HoneyBee X8, Genomic Solutions) por el servicio de Cristalogenésis del IBV. Las placas se incubaron a 21°C durante un tiempo variable (de semanas a 6 meses) para la aparición de cristales. Los cristales se congelaron en nitrógeno líquido captándolos con lazos de nylon de diámetros variables entre 0,025 y 0,1 mm (Hampton Research) según su tamaño y pasándolos por solución con condiciones crioprotectoras.

Se dispusieron placas para cristalización con las proteínas ScNop7/ScErb1 apareciendo cristales a 28,5 mg/ml en tampón C (**Tabla 5**) con 5% (v/v) de glicerol junto con la solución madre 100 mM Tris-HCl pH 8,5 y 2% (v/v) etanol. También aparecieron cristales en placas con el heterotrímero CtPeBoW a 34 mg/ml en la condición 20% (v/v) PEG 8.000, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 200 mM cloruro de magnesio. Fueron congelados con 30% (v/v) PEG 8.000. Asimismo, aparecieron cristales en placas con la proteína CtDrs1 a 8,24 mg/ml en tampón C (**Tabla 5**) con 0,5 M de NaCl junto con la solución reservorio 12% (v/v) PEG 4.000, 100 mM Hepes pH 7,5 y 100 mM acetato de sodio.

### 7.4.1. Recogida y procesado de datos cristalográficos

Los cristales fueron difractados en sesiones remotas o presenciales en la línea BL13-XALOC del sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallés, España) y las líneas I4 e I24 de Diamond Light Source Ltd. (Didcot, Oxfordshire, Reino Unido). En una recolección de datos cristalográficos, el cristal es difractado por una fuente de rayos X en muchos rayos discretos cada uno de los cuales produce una reflexión (*spot*) en una pantalla. Las posiciones y las intensidades de esas reflexiones contienen la información necesaria para determinar la estructura molecular. Los



datos de difracción fueron procesados usando IMosflm v 7.2.1. [239] del paquete CCP4 [240] o partiendo de los datos procesados por el sincrotrón a través del programa XDS [241]. IMosflm realiza el indexado de los *spots* del patrón de difracción de forma automática y la integración de las imágenes y genera un archivo de salida en formato mtz que incluye índices de reflexión, las intensidades de cada reflexión y desviaciones estándar. Una vez indexado, se conoce la orientación del cristal, las dimensiones de la celda unidad y la geometría de la red cristalográfica en base a las dimensiones de la celda unidad [242]. La celda unidad es el elemento de volumen más pequeño y simple que es completamente representativo del cristal entero. Si conocemos el contenido exacto de la celda unitaria, podemos imaginar el cristal entero como una matriz de muchas celdas unitarias apiladas una encima del otro. El programa Matthews\_coef [243] de CCP4 permitió estimar el número de moléculas en la unidad asimétrica a partir de las dimensiones de la celda unidad y del peso molecular o el número de residuos de una molécula [244]. Para una reducción y escalado de los datos de difracción y asignación del grupo espacial se utilizó el programa Aimless de CCP4. Este programa corre simultáneamente los subprogramas Pointless, Scala y C-truncate. El proceso de escalado compara las reflexiones del mismo índice que fueron medidas desde más de un cristal o en más de una posición y reescalar las intensidades. Así, a reflexiones idénticas se les da idénticas intensidades. Tras el escalado y la agrupación, C-truncate se encarga de determinar la amplitud (F) de las reflexiones a partir de las intensidades (I). A lo largo de todo el procesado existe una serie de indicadores que reflejan la calidad de los datos. Mean  $I/\sigma$ , representa la intensidad de señal sobre el ruido, su valor debe ser superior a 1,5. El indicador de precisión Rmerge es el error en la asignación de la intensidad de los *spots*. Rmeas=Rrim es el error anterior, pero teniendo en cuenta el número de observaciones realizadas. Rpim es el error en la asociación de la intensidad de los datos ya agrupados, valor inferior a 0,4. El coeficiente de correlación  $CC_{1/2}$ , divide los datos experimentales aleatoriamente en dos mitades y mide la correlación entre las intensidades de las reflexiones entre ambos grupos. Su valor oscila entre 1 como buena correlación y 0 como máxima discrepancia [245–247].

Para conseguir una representación de la densidad electrónica de la celda unidad, se deben calcular los factores de estructura que describen los rayos X difractados que producen las reflexiones medidas. Una completa descripción de un rango difractado, como cualquier descripción de una onda, debe incluir tres parámetros: amplitud, frecuencia y fase. La frecuencia lo da la fuente de rayos X, la amplitud es proporcional a la intensidad de cada reflexión, pero la fase es desconocida. Las fases cristalográficas fueron obtenidas por reemplazo molecular usando Phaser-MR o Balbes de CCP4 [248,249].

## 7.5. Procesamiento para análisis y representación de estructuras y secuencias

▪ El servidor IUPred2 [250] se utilizó para identificar regiones desordenadas en las secuencias de proteínas.

▪ El programa Prosite (Expasy) [251] para el estudio de los dominios y sitios funcionales de las proteínas.

▪ ProtParam (Expasy) [222] se utilizó para averiguar el peso molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de extinción molar teórico de cada secuencia aminoacídica.

▪ Los alineamientos multiseuencia se realizaron con el servidor ClustalW [252] con una penalización de creación de huecos de 10,0 y de extensión de 0,1 a través de la matriz BLOSUM.

▪ La asignación de estructura secundaria se realizó con el programa DSSP (diccionario de estructura secundaria de proteína) (CMBI versión 3.1.4) [253].

▪ Los cálculos de superficie se realizaron utilizando las interfaces de proteínas, las superficies y los ensamblajes con el servidor PISA del Instituto de Bioinformática Europeo [254] usando un modelo del Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank, PDB) y escáner de alaninas *in silico* de la superficie de interacción usando DrugScorePPI Web Interface [255].

▪ El escaneo de alaninas realizado por DrugScore<sup>PPI</sup> [255] permite predecir cambios en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) al sustituir *in silico* los residuos que se encuentran en la interfaz proteína-proteína por alaninas. Este escáner produce un mapa de interacciones críticas para la unión de proteínas. Los residuos que presentan un valor más alto de energía libre al mutarlos por alanina indicarían una mayor contribución a la formación del complejo proteína-proteína. El programa también calcula los valores de profundidad en relación a la superficie de un residuo en la proteína diana. Cuanto mayor sea su valor, mayor grado de profundidad tendría ese residuo en la proteína diana. El programa computa la variación de la energía libre de Gibbs del complejo "mutado" de la siguiente forma:  $\Delta\Delta G_{\text{DrugScore}^{\text{PPI}}} = \Delta G_{\text{complejo}}^{\text{ALA}} - \Delta G_{\text{complejo}}^{\text{WT}}$ .

▪ El programa Contact del paquete CCP4 [240] se utilizó para identificar los residuos involucrados en la interacción del heterodímero Erb1/Ytm1 usando como archivo de entrada un fichero de coordenadas PDB.

▪ Los gráficos moleculares fueron visualizados con COOT [256], UCSF Chimera [238] y PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.).

## 8. Ensayos realizados en *Saccharomyces cerevisiae*

### 8.1. Plásmidos, oligonucleótidos y cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 9**. Las construcciones de Nop7-TAP y Ytm1-TAP se obtuvieron de la librería Horizon (PerKinElmer company) cedidas por el Dr. Markus Proft (IBV, Valencia). El plásmido para la construcción de Ipi3-HA fue generosamente donado por el grupo de la Dra. Susana Rodríguez (IBV, Valencia).

**Tabla 9. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio.**

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741 (WT)	MAT a, leu2- $\Delta$ 0, his3- $\Delta$ 0, met15- $\Delta$ 0, ura3- $\Delta$ 0	Brachmann <i>et al.</i> , 1998 [257]
Nop7-TAP	MAT a, leu2- $\Delta$ 0, his3- $\Delta$ 0, met15- $\Delta$ 0, ura3- $\Delta$ 0, Nop7-TAP::HIS3	Horizon (PerKinElmer company)
Ytm1-TAP	MAT a, leu2- $\Delta$ 0, his3- $\Delta$ 0, met15- $\Delta$ 0, ura3- $\Delta$ 0, Ytm1-TAP::HIS3	Horizon (PerKinElmer company)
Ipi3-HA	MAT a, leu2- $\Delta$ 0, his3- $\Delta$ 0, met15- $\Delta$ 0, ura3- $\Delta$ 0, IPI3-HA3::URA3	Este estudio

**Tabla 10. Descripción de los plásmidos empleados para etiquetar genes en levaduras.**

Plásmido	Descripción	Referencia
pFA6a-URA3	Integración un ADN <i>cassette</i> con el marcador URA3 y la etiqueta HA	Longtine <i>et al.</i> , 1998 [258]

Los cebadores diseñados para la integración de la secuencia de Ipi3 en el plásmido se aparece en la siguiente tabla:

**Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para la transformación de proteínas en levaduras.** Las secuencias en minúscula corresponden a secuencias de solapamientos con el vector (Fw: sentido directo; Rv: sentido inverso).

Nombre cebador	Secuencia 5' - 3'
Ipi3 Fw	ACATGCACGAAAAGCTGTACGAGGAACACCAACAGATGCTTGACAAGCAA tccggttctgctgtag
Ipi3 Rv	TATTTTAATAACATTCTATTTTATTGTACAAAATGCGCGACTATTCCGT cctcgaggccagaagac

## 8.2. Transformación para integración de producto de PCR en *Saccharomyces cerevisiae*

El etiquetado de un determinado epítipo (HA) se realizó mediante la integración con previa amplificación por PCR de un *cassette* de ADN [259]. Este método utiliza cebadores diseñados con dos regiones distintas. Una de ellas permite la recombinación homóloga de la secuencia diana cromosomal y la otra permite la amplificación por PCR de una región contenida en un plásmido con un marcador de selección y una etiqueta. Los marcadores de selección que se usaron en este trabajo fueron genes que completan la auxotrofia presente en las cepas (*URA3*).

La reacción de PCR se realizó utilizando 10-50 ng de plásmido en una reacción de 50  $\mu$ l de volumen total siguiendo el protocolo de la polimerasa KAPA HiFi HotStart (Kapa Biosystems, Roche) (apartado 1.2). El producto de PCR se purificó con el sistema NZYGelPure (Nzytech).

El *cassette* amplificado por PCR se transformó en levaduras mediante el siguiente protocolo. En primer lugar, las células de levadura se inocularon en 30 ml de medio rico Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) (1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona y 2% (p/v) glucosa) hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0,5-0,8 a 180 rpm en un incubador a 30°C (Innova® 43 Incubator Shaker, New Brunswick™). Posteriormente, se centrifugaron 3 min a 3.000 x g a 4°C y se lavaron suavemente con 10 ml de H<sub>2</sub>O fría estéril y se volvieron a centrifugar. Las células se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O fría estéril. A continuación, se repartieron 120  $\mu$ l de células/transformación en tubos de 1,5 ml, se centrifugaron a la misma velocidad y se descartó el sobrenadante. Al precipitado celular se añadieron 350  $\mu$ l de la siguiente mezcla: 34.28 % (v/v) PEG 3.350, 102 mM de Acetato de litio, tampón TE (10 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris-HCl pH 8), 100  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón (previamente hervido en TE durante 5 min a 95°C y enfriado en hielo) y 1-2  $\mu$ g de producto de PCR. Tras una incubación de 30 min a 30°C se calentó 20 min a 42°C en agitación y, posteriormente, se mantuvo en hielo durante 2 min. Se centrifugó 2 min a 900 x g y se resuspendió en 5 ml de medio YPD. Se dejó recuperando mínimo 2 h a 30°C,

se centrifugaron y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril extendiéndose posteriormente en placas de selección de YPD-agar (2% (p/v) agar). Las placas de selección utilizadas fueron placas SC-agar (0,17% (p/v) de Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 0,5% (p/v) sulfato de amonio, 2% (p/v) glucosa, 0,2% (p/v) mezcla de aminoácidos y 2% (p/v) agar para las auxotrofías o marcadores (URA). Según la auxotrofia se realizó una mezcla para 500 ml de 10 mg de adenosina (ADE); 50 mg de leucina (LEU); 10 mg de histidinas (HIS); 10 mg triptófano (TRP); 10 mg metionina (MET) y 15 mg lisina (LYS). Las colonias aparecidas se sometieron a análisis por PCR y secuenciación para confirmar el éxito de la transformación. Para preservar las distintas construcciones se mezcló el cultivo crecido durante 16 h a 30°C con un 22% (v/v) de glicerol estéril de concentración final y se congelaron a -80°C.

### **8.3. Extracción de ADN genómico de levaduras y comprobación por PCR**

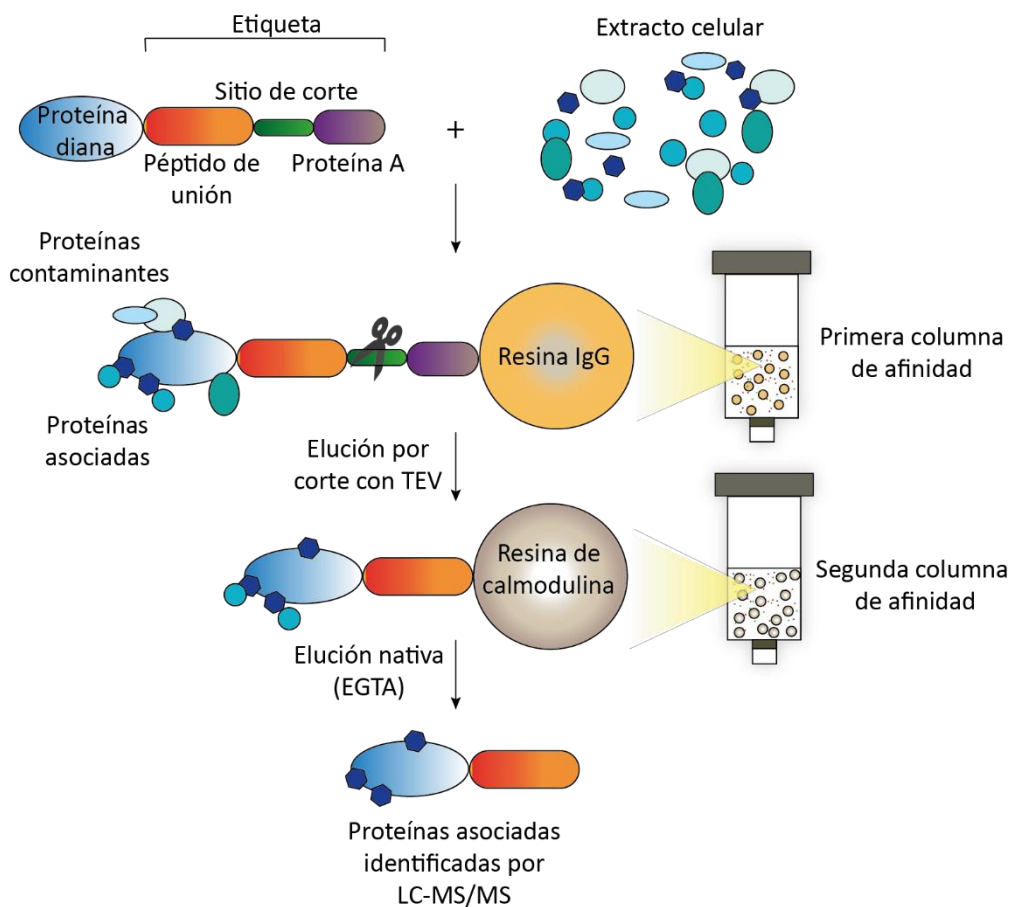
Las colonias que aparecieron a las 48-72 h después de la transformación, se mezclaron en 100  $\mu$ l de cellex al 5% (p/v) con perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec. Products). Se alternaron 4 min de agitación en vórtex a 4°C con 4 min a 95°C para romper las células y se centrifugaron 1 min a 21.000 x g. El sobrenadante se pasó a nuevo tubo y se midió la concentración de ADN genómico con NanoDrop® (Thermo Scientific™). Posteriormente, se realizó una PCR de comprobación a partir de 100 ng de ADN extraído de cada construcción y cebadores internos diseñados de cada proteína de interés con la polimerasa KAPA HiFi HotStart (Kapa Biosystems, Roche) (apartado 1.2). El fragmento amplificado se mandó a secuenciar a la compañía Humanizing Genomics MacroGen (MacroGen Spain, Madrid).

### **8.4. Extracción de proteínas de levaduras**

Para la extracción total de proteína de cepas de levadura se usó el protocolo modificado de NaOH [260]. Se resuspendió una colonia positiva en 150  $\mu$ l de NaOH/BME (1,85 M NaOH y 7,5% (v/v) de BME) y tras 10 min en hielo para romper la célula y precipitar las proteínas, se centrifugó durante 1 min a 21.000 x g y se retiró el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón de carga SDS-PAGE 2x, se calentó durante 3 min a 95°C y se centrifugó 3 min a 21.000 x g. Se cargaron 8  $\mu$ l en un gel SDS-PAGE al 10% y se realizó un Western Blot (WB) (apartado 10). Los anticuerpos utilizados para la identificación de proteínas con la etiqueta correspondiente se detallan en las **Tablas 13 y 14**.

### 8.5. Purificación por afinidad en tándem (TAP)

La técnica de purificación por afinidad en tándem (TAP) permite la purificación de complejos proteicos en levaduras bajo condiciones nativas. El método TAP requiere la fusión de una etiqueta TAP a una proteína de interés en el extremo carboxi o amino terminal. La etiqueta TAP contiene una proteína A (PA) que interacciona fuertemente con IgG y un péptido de unión a calmodulina (CBP) separados por un sitio de corte de la proteasa del virus de tabaco (TEV) (Figura 18). El protocolo realizado en este estudio sigue el procedimiento descrito en Puig *et al.*, 2001 con algunas modificaciones.



**Figura 18. Esquema de la purificación por afinidad en tándem (TAP).** Figura adaptada de Huber, 2003 [262].

Las cepas que expresaban proteínas fusionadas con TAP crecieron a una D.O.<sub>600</sub> 2-2,5 en medio YPD, absorbancia correspondiente a unos 12-15 g de precipitado celular. El crecimiento de 1 L de cada construcción se realizó en el incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™) en matraces con aireadores de 2 L de capacidad a 30°C y 180 rpm. Se utilizaron 6

L de cultivo de cada cepa para cada purificación TAP. Posteriormente, las células fueron colectadas por centrifugaciones de 5 min a 3.700 x g a 4°C, lavadas con H<sub>2</sub>O y finalmente resuspendidas en 40 ml de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM PMSF). Los precipitados se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Las células se suspendieron en 25 ml tampón de lavado suplementado con 1 mM DTT, media pastilla de un cóctel de inhibidor de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) y 25 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec. Products). Las células fueron lisadas en un agitador mecánico (Fritsch-Pulversitte) a 4°C en 3 ciclos de 4 min a 490 rpm con 1 min de reposo. El lisado fue centrifugado en varias fases. La primera de ellas a 23.400 x g durante 1 h a 4°C seguida de una ultracentrifugación a 180.000 x g (Beckman Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, rotor 70Ti, Beckman Coulter) durante 40 min a la misma temperatura. El sobrenadante se incubó con 500 µl de resina de IgG (IgG-Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare), previamente lavada y equilibrada con tampón de lavado, durante 1 h a 4°C a rotación constante. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 940 x g durante 10 min y la resina se lavó con 10 ml de tampón de lavado y 0,5 mM DTT a través de una columna con un filtro de 35 µm de tamaño de poro (MoBiTec Molecular Biotechnology). Se incubó con 32 µg de la proteasa TEV en rotación constante durante 16 h. Esta digestión en el sitio de corte de la proteasa TEV libera al péptido de unión a calmodulina como etiqueta de la proteína de interés generando el denominado eluido TEV. Finalmente, el eluido TEV se purificó usando 250 µl de resina de calmodulina (Stratagene®) en presencia de 4 mM CaCl<sub>2</sub> incubándolo durante 1 h en rotación constante. Tras la incubación, la resina fue lavada con 10 ml de tampón de lavado suplementado con 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de DTT. La elución final se produjo incubando la resina con 350 µl de tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl y 5 mM EGTA) durante 10 min a 37°C y 700 rpm (Thermomixer® comfort, Eppendorf®). Este paso se repitió 3 veces. El eluido se sometió a una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 15-18% (v/v) durante 16 h a 4°C. El extracto de proteínas precipitado con TCA se resuspendió en 50 µl de tampón de carga para proteínas 5x y se calentó durante 5 min a 95 °C antes de ser separado por electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y analizado por incubación con anticuerpos por WB (apartado 10) para el correcto seguimiento de la técnica TAP. El análisis del contenido proteico del precipitado final fue resuelto por electroforesis en geles de gradiente del 4-15% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (Mini-Protean TGX Precast Gels, Bio-Rad) y, en algunos casos, las muestras se sometieron a análisis por LC-MS/MS. Las purificaciones TAP se realizaron por duplicado. Los análisis por LC-MS/MS se realizaron por el servicio de proteómica

del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (UV) siguiendo los estándares de ProteoRed España ([www.proteored.org](http://www.proteored.org)) y el SCISIE de la UV ([www.scsie.uv.es](http://www.scsie.uv.es)).

Los geles SDS-PAGE en gradiente se fijaron con una mezcla de 7% (v/v) ácido acético y 40% (v/v) etanol durante 30 min en agitación. La tinción de las proteínas se llevó a cabo con Coomassie coloidal por el Servicio de Proteómica de la UV sumergiendo el gel en una solución comercial durante 16 h. El gel fue desteñido con sucesivos lavados de una solución con 30% (v/v) de metanol y 5% (v/v) ácido acético.

Por otra parte, para la visualización del subcomplejo Nop7 aislado, se crecieron 3 L de cepas con Ytm1-TAP hasta una D.O.<sub>600</sub> 0,8. Se recogieron los cultivos y se resuspendieron en tampón de lisis como se ha descrito en el apartado anterior. Posteriormente, se sometieron a sucesivas centrifugaciones hasta una ultracentrifugación a 180.000 x g durante 45 min. Se tomaron muestras de 8 µl del sobrenadante, se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 7,5% y se visualizaron las diferentes proteínas mediante un WB (apartado 10) incubando con anticuerpos policlonales frente a Nop7 y Erb1 y anticuerpo anti-TAP para Ytm1-TAP (**Tabla 13**).

## 9. Experimentación en células de mamífero

### 9.1 Cultivos de células de mamífero

La línea celular empleada en este trabajo fue HCT-116 (carcinoma de colon humano), cedida por el laboratorio del Dr. Manuel Serrano (IRB, Madrid). Las células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBS), 1% (v/v) de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Lonza) en una atmósfera humidificada a 37°C con una saturación de CO<sub>2</sub> del 5% (v/v).

### 9.2. Ensayo de viabilidad celular

El uso extendido de las sales de tetrazolium para medir la supervivencia celular depende de la actividad enzimática de las deshidrogenasas mitocondriales. Las enzimas oxidorreductadas



dependientes de NAD(P)H reducen las sales de tetrazolium a formazán [263]. El agente de proliferación celular WST-1 (Roche) es una solución ligeramente roja que contiene WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) y un reactivo de acoplamiento de electrones en tampón PBS. La formación de formazán (color rojo oscuro) por la reducción de WST-1 se cuantifica mediante espectrofotometría. La medida de absorbancia correlaciona con el número de células viables.

Las células HCT-116 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 2.500 células/pocillo en un volumen final de 100  $\mu$ l/pocillo. Tras el tratamiento con los diferentes péptidos de interferencia (**Tabla 27**) a diferentes concentraciones: 50, 100, 150 y 200  $\mu$ M del P10hs; 100, 200, 300, 400 y 600  $\mu$ M del P11hs y 100 y 600  $\mu$ M del péptido control PTAT, se cuantificó la viabilidad celular a 24, 48 y 72 h de tratamiento. Para ello, se añadieron 10  $\mu$ l de WST-1 a cada pocillo (dilución final 1:10) por triplicado. Las células se incubaron en presencia de WST-1 durante 3 h en un incubador Forma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Electron Corporation) con atmósfera humidificada a 37°C y 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se agitó la placa durante 1 min y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro VICTOR<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter (Wallac).

### 9.3. Estudios de apoptosis celular

#### 9.3.1. Ensayos de activación de caspasas

El ensayo Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 (Promega) es un ensayo luminiscente que mide las actividades de las caspasas 3 y 7. La adición del sustrato proluciferina DEVD de las caspasas 3/7 provoca su activación produciéndose la liberación de un sustrato para la luciferasa (aminoluciferina) y en presencia de luciferasa y ATP, se desencadena la reacción luciferasa emitiéndose luz.

Las células HCT-116 fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo y tratadas con diferentes concentraciones de cada péptido por triplicado. A 100  $\mu$ l de células cultivadas se añadieron 50, 100, 150 y 200  $\mu$ M de P10hs; 100, 200, 300, 400 y 600  $\mu$ M de P11hs y 100 y 600  $\mu$ M del péptido PTAT (**Tabla 27**). Después de cada tratamiento se añadió el agente Caspase-Glo 3/7 en proporción 1:1 y tras 2 h a TA y en oscuridad, se midió la señal de luminiscencia en VICTOR<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter (Wallac) siendo la señal de luminiscencia proporcional a la actividad caspasa presente en cada muestra.

### 9.3.2. Ensayos por citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó para determinar el porcentaje de apoptosis temprana, apoptosis tardía, necrosis y células vivas tras el tratamiento con los péptidos de interferencia en las células HCT-116.

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de 75.000 células/pocillo y a las 24 h se trataron con 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$  de P10hs; 200 y 400  $\mu\text{M}$  de P11hs; 150 y 400  $\mu\text{M}$  de PTAT (**Tabla 27**). Como control positivo de apoptosis se trató un pocillo a la misma densidad celular con 1  $\mu\text{M}$  de camptotecina (CPT), inhibidor de la topoisomerasa I [264].

Las células se tripsinaron (Lonza) tras 24 h de tratamiento y se centrifugaron a 300 x g durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de unión a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Posteriormente, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de Anexina-FITC V y 5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (PI) en cada tubo (FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I, BD Biosciences) [265], se vortexó y se incubaron durante 15 min a TA en oscuridad añadiéndose posteriormente 400  $\mu\text{l}$  de tampón de unión a cada tubo. Se procedió a la selección de las células no agregadas con los parámetros de dispersión frontal de área (FSC-A, *forward scatter area*) frente a dispersión frontal de altura (FCS-H, *forward scatter height*). La fluorescencia de 20.000 eventos se monitorizó en un citómetro de flujo LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) en el servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (Valencia). Se usaron los láseres *Blue* (488nm) y *Yellow-Green* (561 nm) para medir Anexina-FITC V ( $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 530/515$  nm) y PI ( $\lambda_{\text{ex}} = 561$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 586/515$  nm).

### 9.4. Caracterización del estado celular

La caracterización del estado celular se puede realizar a través del estudio de la alteración de diversos parámetros celulares inducidos por el tratamiento con péptidos de interferencia. Se realizó utilizando diferentes sondas fluorescentes y midiendo la emisión o disminución de fluorescencia por citometría de flujo. Los parámetros celulares estudiados han sido: potencial de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, niveles de calcio intracelular y estrés oxidativo. Para evaluar la validez de los procedimientos de análisis por citometría se utilizaron inductores para cada uno de los parámetros celulares en estudio.

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos a 75.000 células/pocillo 24 h a 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> antes de tratarlas con 100  $\mu\text{M}$  de P10hs y 100  $\mu\text{M}$  de PTAT (**Tabla 27**).

Posteriormente, se tripsinizaron, se lavaron con PBS frío y se centrifugaron dos veces a 400 x g durante 10 min. Cada muestra fue resuspendida en 400  $\mu$ l de medio DMEM. Como controles positivos se utilizaron inductores específicos para cada parámetro a estudiar. Para la caracterización de cada parámetro, se partió del mismo número de células tratadas con péptidos de interferencia. Cada ensayo se ha realizado por cuadruplicado, excepto la muestra tratada con ionomicina. La fluorescencia de 10.000 eventos se monitorizó por citometría de flujo LSR Fortessa™ X-20 (BD Biosciences) en el servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (Valencia). Se procedió a la selección de las células no agregadas con los parámetros de FSC-A frente a FSC-H.

- El potencial de membrana plasmático se ha medido utilizando el reactivo aniónico DIBAC<sub>4</sub>(3) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol) ( $\lambda_{ex}$  =488 nm,  $\lambda_{em}$  =516 nm) (Invitrogen™). DIBAC entra en las células despolarizadas uniéndose a proteínas intracelulares emitiendo fluorescencia. Por el contrario, la hiperpolarización impide la entrada del fluoróforo en la célula disminuyendo la señal. Se añadió el agente DIBAC a 0,75  $\mu$ M de concentración final y se incubaron las células 30 min a 37 °C en un baño húmedo. Como control positivo se utilizó el tratamiento con gramidicina A (Sigma-Aldrich®) a 0,216  $\mu$ M de concentración final añadida 5 min antes de medir por citometría de flujo. La gramidicina A es un ionóforo capaz de insertarse en la bicapa lipídica de la membrana plasmática permitiendo el paso libre de cationes monovalentes eliminando el gradiente iónico y despolarizando las membranas [266].

- El potencial de membrana mitocondrial es un parámetro útil para el estudio del estado de las mitocondrias cuando las células entran en apoptosis. En este trabajo se ha utilizado el reactivo MitoProbe™ TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester, Thermo Scientific™) ( $\lambda_{ex}$  =561 nm,  $\lambda_{em}$  =625 nm). El TMRM es un fluorocromo catiónico y lipofílico que, en células vivas, es secuestrado emitiendo señal de fluorescencia roja-naranja, pero si se induce la apoptosis celular, la membrana mitocondrial se despolariza y la señal del TMRM disminuye. TMRM se añadió a una concentración final de 0,375  $\mu$ M incubándose 30 min en un baño húmedo a 37°C. La despolarización de la membrana mitocondrial provocada por el agente FCCP (2-[2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]hydrazinylidene]-propanedinitrile) a 9,4  $\mu$ M de concentración final fue usado como control positivo. El FCCP (Sigma-Aldrich®) es un potente desacoplador de la fosforilación oxidativa mitocondrial, que disminuye la síntesis de ATP transportando protones a través de las membranas [267].

▪ Los niveles de calcio intracelular se han medido utilizando el fluorocromo Fluo-4 AM (Thermo Scientific™) ( $\lambda_{ex}$  =561 nm,  $\lambda_{em}$  =525 nm). Las células se incubaron durante 30 min a 37°C con Fluo-4 AM a una concentración final de 6,25 nM. Para la monitorización de los niveles de calcio se trataron con el ionóforo de calcio Ionomicina a 2  $\mu$ M utilizado como control positivo [268].

▪ El aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), es indicativo de inducción de apoptosis celular. Para su estudio, se utilizó la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ) (Thermo Scientific™). Este reactivo penetra en las células para detectar la generación de ROS generando fluorescencia al ser oxidado y pasar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) ( $\lambda_{ex}$  =488 nm,  $\lambda_{em}$  =525 nm). El fluorocromo se añadió a una concentración final de 10,5 nM y se incubaron durante 30 min a 37°C. Como control positivo se utilizó t-BHP (tert-butylhidroperoxide), inductor de estrés oxidativo celular [269] a 1 mM de concentración final.

### 9.5. Estudios de la integridad del ADN celular

Las células fueron sembradas en placas de 60 mm a una densidad de 175.000 células/placa 24 h antes del tratamiento. Las concentraciones de péptidos utilizadas fueron: 50, 100 y 150  $\mu$ M de P10hs; 200 y 400  $\mu$ M de P11hs y 150 y 400  $\mu$ M de PTAT (**Tabla 27**). Se usaron como control de daño al ADN 1  $\mu$ M de CPT y 1  $\mu$ M de doxorubicina (DOXO). DOXO es un conocido agente anticancerígeno que se intercala entre las cadenas de ADN usado en el tratamiento de una gran variedad de cánceres [270]. A las 24, 48 y 72 h de tratamiento, las células se lavaron con PBS frío y se levantaron con ayuda de un raspador de células. Se centrifugaron a 2.000 x g durante 2 min a 4°C y se resuspendió el sedimento celular en 60  $\mu$ l de tampón RIPA (tampón de radioinmunoprecipitación) (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA y 0,5% (v/v) de Nonidet P-40 conteniendo inhibidores de proteasas (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) y fosfatasas (PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Se agitaron las muestras con un vórtex vigorosamente y se incubaron durante 20 min en hielo para posteriormente centrifugarlas a 21.000 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas con el método de Bradford (Bio-Rad) [221] usando una recta de calibrado con concentraciones conocidas de BSA (Thermo Scientific™). La reacción colorimétrica producida en placas de 96 pocillos fue cuantificada a 595 nm en el espectrofotómetro VICTOR<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter (Wallac). Se cargaron 18  $\mu$ g de

proteína de cada muestra en un gel SDS-PAGE al 12% y se realizó un WB (apartado 10) incubándolo con el anticuerpo frente a la histona  $\gamma$ -H2A.X fosforilada (**Tablas 13 y 14**). La cuantificación de las bandas de proteína fue llevada a cabo con Multigauge de FujiFilm versión 2.1.

## 9.6. Ensayos de fluorescencia

Los ensayos de fluorescencia se realizaron con células HCT-116 que se sembraron a una densidad de 20.000 células/pocillo sobre cubreobjetos tratados previamente con laminina a 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS durante al menos 1 h. Las células se incubaron con diferentes péptidos con el objetivo de identificar la localización del péptido y el efecto que puede tener en nucleolina. Se trataron con 100  $\mu\text{M}$  de los péptidos P10hs y PTAT o con 10  $\mu\text{M}$  de FITC-P10hs (**Tabla 27**) durante 24 h. Tras la incubación, se fijaron con una solución al 4% (p/v) de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 15 min y se lavaron dos veces con PBS.

Para la localización de nucleolina, las células fijadas se permeabilizaron con metanol/acetona (1:1) durante 10 min y se bloquearon con 4% de FBS en PBS durante 2 h a TA. Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Tras 1 h de incubación, se lavaron 3 veces con PBS y se trataron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 1 h a TA. Se volvieron a lavar con PBS, se tiñeron con DAPI 1x y se montaron en portaobjetos usando Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes de las células marcadas fueron visualizadas en un sistema Leica TCS Sp5 multispectral confocal system (Leica MicroSystem) con 20x 0.7 HCX PL APO CS en el laboratorio del Dr. Francisco Iborra (Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)- IBV, CSIC). Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (NIH).

**Tabla 12. Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia.**

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Compañía
Anti-C23/Nucleolin (sc-8031)	1:100	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpo Secundario	Dilución	Especie	Compañía
Alexa Fluor 546 (#A-10036)	1:400	Anti-ratón	Invitrogen

Para el análisis con el péptido marcado FITC-P10hs (**Tabla 27**), las células fijadas se incubaron en DAPI durante 15 min, se lavaron dos veces con PBS y se montaron utilizando el

medio para cubreobjetos Aqua-Poly/Mount coverslip médium (Polysciences, Inc. Eppelheim). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP8 (Leica MicroSystem) a x63 aumentos y se procesaron con el programa ImageJ (NIH).

## 10. Identificación de proteínas por Western Blot

### 10.1. Anticuerpos utilizados

En este trabajo se han usado una variedad de anticuerpos primarios y secundarios para la detección de proteínas por WB usando quimioluminiscencia (ECL) o señales de fluorescencia (IRDye) en diferentes ensayos.

**Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot durante este estudio.** (\*) Anticuerpos policlonales creados en el servicio del Centro de Producción y Experimentación Animal (Sevilla) y cedidos por el grupo del Dr. Jesús de la Cruz (IBIS, Sevilla). (\*\*) Anticuerpos cedidos por el grupo de la Dra. Susana Rodríguez Navarro (IBV, Valencia).

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Compañía
$\alpha$ -Nop7 *	1:5.000	Conejo	Centro de Producción y Experimentación Animal (Sevilla)
$\alpha$ -Erb1 *	1:5.000	Conejo	Centro de Producción y Experimentación Animal (Sevilla)
$\alpha$ -TAP	1:5.000	Conejo	Thermo Scientific™ (Pierce)
$\alpha$ -HA **	1:10.000	Ratón	Roche
$\alpha$ -Phospho-Histone H2A.X	1:5.000	Conejo	Cell Signaling Technology
$\alpha$ -actina	1:1.000	Conejo	Sigma-Aldrich®

**Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot durante este estudio.**

Anticuerpos secundarios	Dilución	Compañía
Anti-Rabbit IRDye 800CW	1:10.000	LI-COR Biosciences
Anti-Mouse IRDye 680LT	1:10.000	LI-COR Biosciences
Anti-Rabbit-IgG-NA934	1:1.000	Cytiva

## 10.2. Transferencia a membrana, bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado

Tras la resolución de las proteínas en un SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Protan 0,5  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare) mediante el sistema de transferencia Mini Trans-Blot (Bio-Rad) usando el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 20% (v/v) metanol) a 100 V constante durante 2 h a 4°C. Al finalizar la transferencia, se comprobó la correcta migración y carga de las muestras con la tinción reversible rojo-Ponceau-S 0,2% (p/v) (Serva).

Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) o 5% (p/v) de BSA en PBS o TBS con 0,1% (v/v) de Tween-20 (PBST o TBST, respectivamente) durante 1 h a TA en agitación para impedir uniones inespecíficas y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 16 h a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBST o TBST durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1 h a TA en oscuridad y agitación. Después, con sucesivos lavados de 10 min se eliminó el exceso de anticuerpo secundario. Las bandas fueron visualizadas usando el paquete de detección Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific™) y la señal de quimioluminiscencia fue detectada en el equipo ImagenQuant™ LAS 4000 Mini (GE Healthcare) si el anticuerpo estaba conjugado con HRP. Para anticuerpos fluorescentes la visualización directa de la membrana de nitrocelulosa se realizó con el sistema Odyssey Imaging System (LICOR Biosciences).

Para poder reutilizar la misma membrana se realizó un tratamiento con la solución 2% (p/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl y 0,7% (v/v) BME durante 20 min a 56°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la membrana con PBST o TBST, dependiendo del anticuerpo utilizado, hasta eliminar totalmente la solución anterior, se bloqueó con solución de bloqueo y se incubó con el siguiente anticuerpo.





## **IV. RESULTADOS**

### **PARTE I**

Caracterización biofísica y estructural de  
Nop7/Erb1/Ytm1, factores de ensamblaje de la  
biogénesis ribosomal

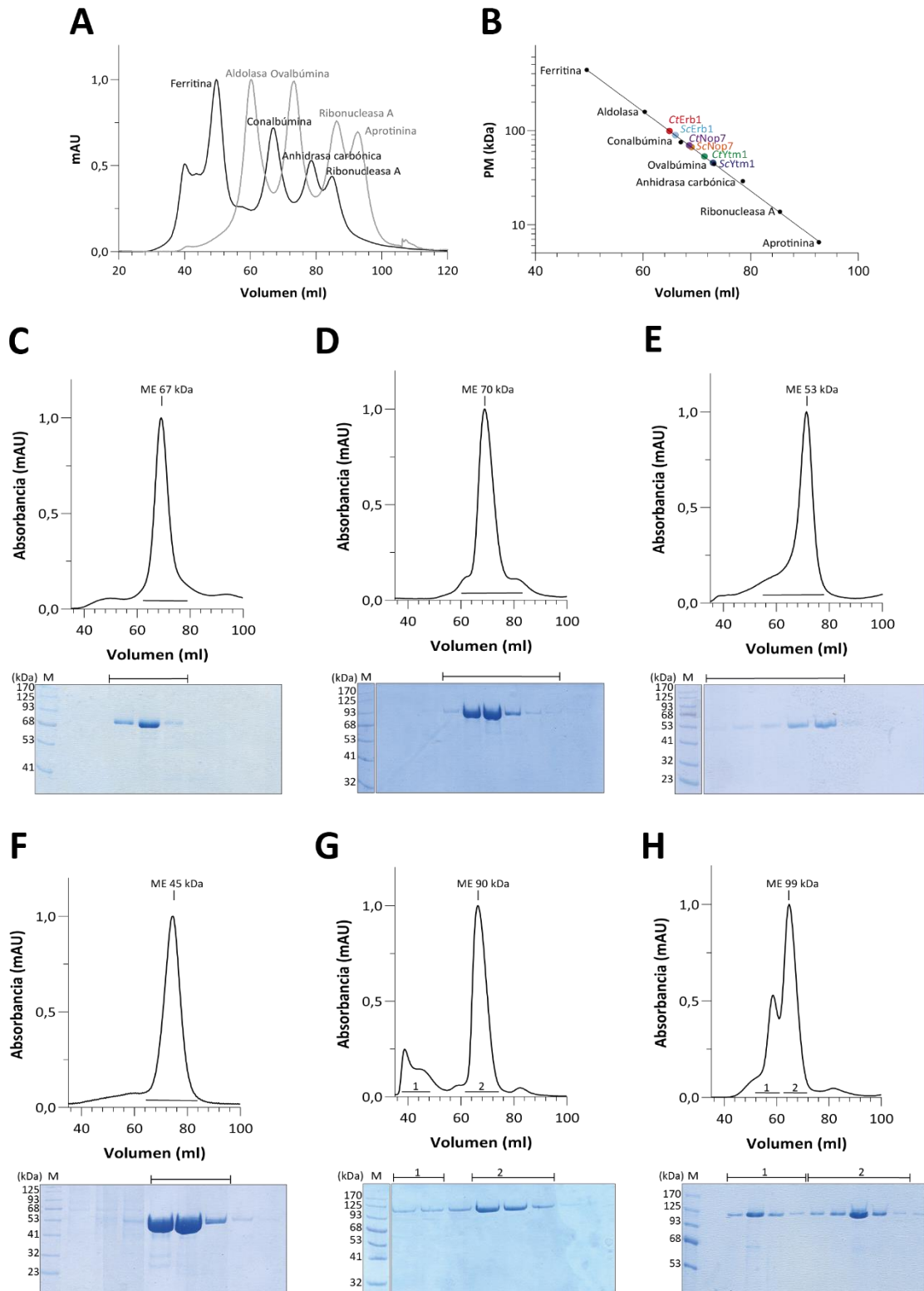


El subcomplejo Nop7 en levaduras, o complejo PeBoW en mamíferos, es esencial para la formación de la subunidad ribosomal 60S [94,168]. En el complejo PeBoW, Erb1 es considerado el núcleo del heterotrímero interactuando a través de su dominio  $\beta$ -*propeller* con Ytm1 y a través de su extremo N-terminal con Nop7 cuando está formando parte de la partícula prerribosomal [22]. No obstante, existen evidencias que demuestran que el complejo también se encuentra como heterotrímero en solución [168]. La estructura cristalina resuelta por nuestro grupo de Erb1 e Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* nos permitió redefinir las interacciones macromoleculares que mantienen al complejo unido, que difería de lo que se pensaba anteriormente para la organización del complejo [94,130]. En este capítulo se presenta la caracterización biofísica y estructural de los componentes del complejo PeBoW (haciendo referencia al subcomplejo Nop7 y complejo PeBoW, indistintamente), y para ello, usaremos diferentes aproximaciones como SEC-SAXS, SEC-MALS, microscopía de tinción negativa y ensayos de entrecruzamiento seguido de análisis por cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas (LC-MS/MS).

## **1. Reconstitución del complejo PeBoW de *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae***

### **1.1. Expresión y purificación de las proteínas Erb1, Ytm1 y Nop7 de *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae***

Para la formación del complejo PeBoW y el estudio de las interacciones entre sus componentes, se expresaron y purificaron las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1 de los organismos *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae*. A lo largo de este trabajo, las proteínas se nombrarán con el prefijo *Sc* si pertenecen a *Saccharomyces cerevisiae* o *Ct* si son de *Chaetomium thermophilum*.



**Figura 19. Purificaciones de las proteínas Erb1, Nop7 e Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae*.** (A y B) Calibración de la columna Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare) mediante la inyección de proteínas de pesos moleculares conocidos (A) y la recta de calibrado con las proteínas de interés en diferentes colores (B). Los perfiles de la cromatografía de exclusión molecular se muestran en el panel superior y el gel SDS-PAGE al 10% de las fracciones de la elución en el panel inferior. (C-H) Perfil cromatográfico de las proteínas ScNop7 (C), CtNop7 (D), ScYtm1 (E), CtYtm1 (F), ScErb1 (G) y CtErb1 (H). M: marcador de pesos moleculares; ME: masa molecular estimada.

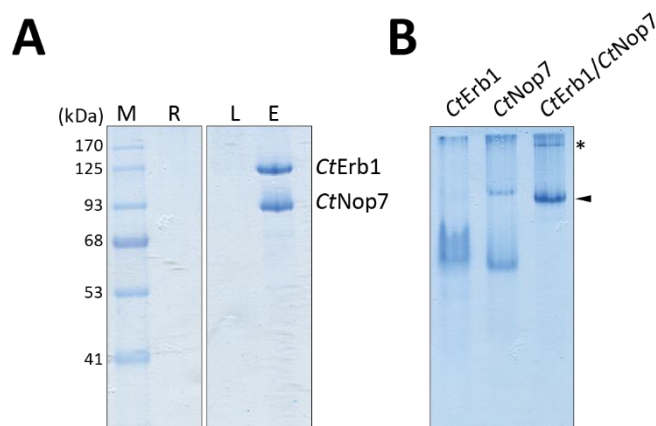
Las proteínas Erb1 y Nop7 de *Sc* y *Ct* fueron satisfactoriamente sobreexpresadas en cepas de *E.coli* (DE3) BL21 CodonPlus mientras que CtYtm1 y ScYtm1 se produjeron en células de insecto. Las proteínas 6xHis-Ytm1, 6xHis-Nop7 y 6xHis-Erb1 se purificaron usando una cromatografía de afinidad con columnas quelantes cargadas de Níquel Histrap HP (GE Healthcare). Para la purificación de Erb1 se incluyó un paso adicional de purificación a través de una columna de Heparina. Finalmente, se pasaron a través de una cromatografía de exclusión molecular (SEC) con el objetivo de eliminar el imidazol y otras proteínas contaminantes, así como para analizar su estado de oligomerización. En la **Figura 19** se muestran los perfiles de elución medidos a 280 nm. La calibración de dicha columna se muestra en las **Figuras 19A y 19B** con el nombre de las proteínas de pesos moleculares conocidos. ScNop7, CtNop7, ScYtm1 y CtYtm1 eluyeron en SEC como un solo pico cuyo volumen concuerda con la masa molecular correspondiente a cada monómero (**Figuras 19C, 19D, 19E, 19F**, respectivamente). En cambio, en los perfiles de ScErb1 y CtErb1, además del pico correspondiente a la masa molecular del monómero, se observan otros picos de volumen de elución inferior que indican la formación de oligómeros de orden superior (**Figuras 19G y 19H**, arriba). El análisis por SDS-PAGE confirma la presencia de Erb1 en todas las fracciones (**Figuras 19G y 19H**, abajo).

### **1.2. Caracterización de la interacción de Nop7/Erb1 de *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae* requeridas para la formación del complejo PeBoW**

La estructura cristalográfica de CtErb1/CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) nos permitió definir la superficie de interacción entre estas proteínas del complejo PeBoW [130]. No obstante, la interacción entre Nop7/Erb1 no había sido descrita con anterioridad. Con el fin de dilucidar la estructura que presenta el complejo ternario en la célula, en primer lugar, decidimos caracterizar la interacción entre sus componentes Nop7/Erb1 para poder reconstituir, posteriormente, el complejo ternario *in vitro*. En este apartado determinamos la afinidad entre estas dos proteínas mediante diferentes técnicas biofísicas como interferometría de bicapa (BLI), ensayos de precipitación y geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

Inicialmente, se realizaron ensayos de precipitación con las proteínas de *C. thermophilum* Erb1 y Nop7. Para ello, CtNop7, con etiqueta de His, se utilizó como cebo quedando retenida a resina de níquel. A continuación, se incubó con la segunda proteína sin etiqueta en cantidades equimolares. Tras varios lavados, ambas proteínas unidas a la resina fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE al 10% (**Figura 20A**). Asimismo, se realizó una

electroforesis en condiciones nativas apareciendo una banda correspondiente al heterodímero (Figura 20B, flecha), confirmando de nuevo la asociación estable entre estas proteínas *in vitro*. Además, se detectó, en menor proporción, la formación de grandes complejos (Figura 20B, asterisco).

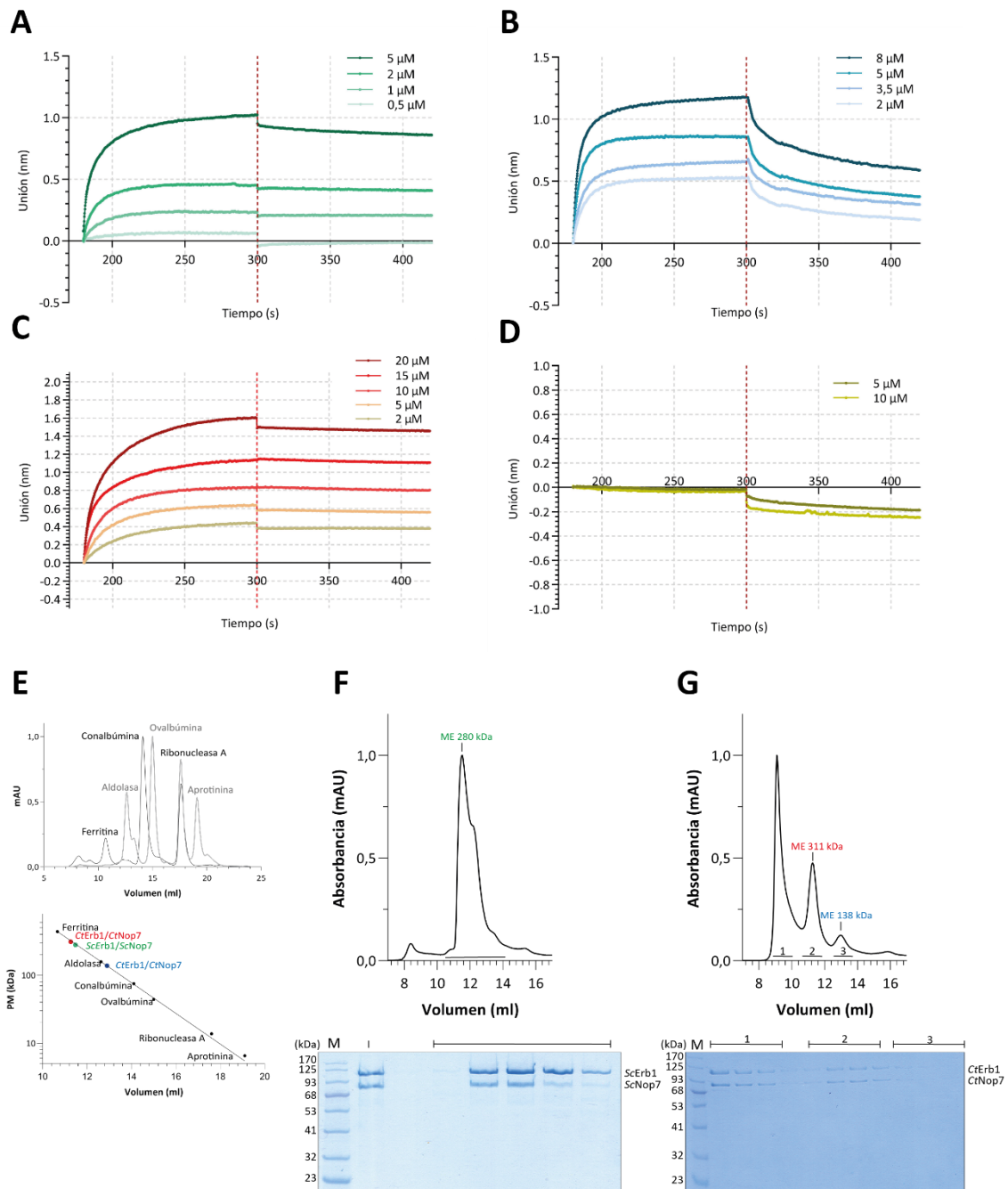


**Figura 20. Caracterización de la interacción entre Erb1 y Nop7.** (A) Ensayo de precipitación de las proteínas CtNop7 y CtErb1. (B) Electroforesis en condiciones nativas de CtNop7, CtErb1 y CtNop7/CtErb1. Se detectó una banda correspondiente al heterodímero (flecha) y la formación de grandes complejos en menor proporción (\*). M: marcador de pesos moleculares; R: resina; L: 3<sup>er</sup> lavado; E: elución.

En combinación con estos ensayos, se determinó la constante de afinidad ( $K_D$ ) entre las proteínas Erb1 y Nop7 de *Ct* (Figura 21A) y *Sc* (Figura 21B) a través de ensayos de BLI. Curiosamente, las proteínas procedentes de *S. cerevisiae* interactúan con una constante de disociación 20 veces inferior que las procedentes de *C. thermophilum* (Tabla 15). También se determinó la constante de afinidad entre Erb1 e Ytm1 siendo del mismo orden que la observada entre Nop7 y Erb1 (Figura 21C, Tabla 15). Usando esta misma técnica, descartamos la interacción entre Nop7 e Ytm1 (Figura 21D).

Posteriormente, para completar el estudio de la asociación entre Nop7 y Erb1 de ambos organismos, se estudió su estable asociación mediante cromatografía de exclusión molecular. En SEC, coeluyeron tanto el heterodímero de levaduras (Figura 21F) como de hongo (Figura 21G) indicando que están formando un complejo estable que tolera la dilución a la que es sometido en esta cromatografía. Cabe destacar que el heterodímero de levaduras eluye a un volumen correspondiente a 280 kDa (Figura 21F), un peso molecular diferente a la suma de sus pesos moleculares individuales (164 kDa). No obstante, en el cromatograma obtenido del complejo de *Ct*, se observa un pico que eluye prácticamente en el volumen de vacío de la columna, correspondiente a tamaños mayores de 500 kDa, y otros dos picos con volúmenes aparentes

correspondientes a 311 y 138 kDa (**Figura 21G**). Estos datos concuerdan con la visualización de grandes complejos en el gel en condiciones nativas, pudiendo ser debido a la capacidad de Erb1 para formar oligómeros y agregados.



**Figura 21. Caracterización de la interacción entre Erb1/Nop7 y Erb1/Ytm1.** (A-D) Determinación de la constante de afinidad de las proteínas CtNop7/CtErb1 (A), ScNop7/ScErb1 (B), CtErb1/CtYtm1 (C) y ScNop7/ScYtm1 (D) mediante BLI a diferentes concentraciones. (E) Calibración de la columna Superdex 200 increase 10/300 (GE Healthcare) mediante la inyección de proteínas de pesos moleculares conocidos (arriba) y la recta de calibrado con las proteínas de interés en diferentes colores (abajo). (F) Perfil de elución de cromatografía de exclusión molecular de ScErb1/ScNop7 en el que se observa un pico mayoritario correspondiente a la formación de grandes complejos. (G) Perfil de elución de cromatografía de exclusión molecular de CtErb1/CtNop7 observándose la presencia de agregados supramoleculares y

la formación de grandes complejos. M: marcador de pesos moleculares; E: eluciones; I: muestra inyectada; ME: masa molecular estimada.

**Tabla 15. Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de CtNop7/CtErb1; ScNop7/ScErb1 y CtErb1/CtYtm1.**

Proteína-Proteína	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_a$ Error	$k_d$ (1/s)	$k_d$ Error	$\chi^2$	$R^2$
CtNop7/ CtErb1	$4,277 \times 10^{-8}$	$2,566 \times 10^4$	$4,464 \times 10^2$	$1,097 \times 10^{-3}$	$1,097 \times 10^{-3}$	0,3339	0,3339
ScNop7/ ScErb1	$9,829 \times 10^{-7}$	$2,658 \times 10^4$	$9,022 \times 10^2$	$9,022 \times 10^2$	$9,022 \times 10^2$	3,257	3,257
CtErb1/ CtYtm1	$1,351 \times 10^{-8}$	$5,033 \times 10^3$	$1,39 \times 10^2$	$6,798 \times 10^{-5}$	$7,386 \times 10^{-5}$	4,452	0,9856

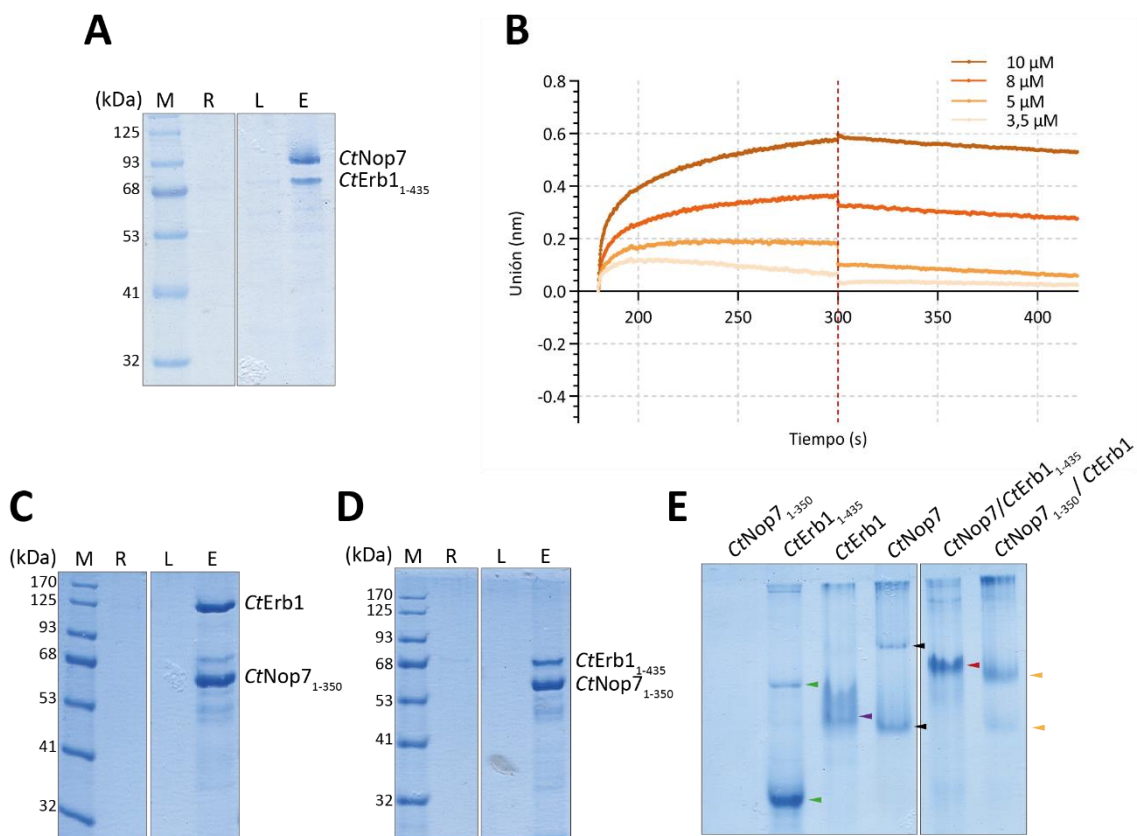
Como han sugerido estudios previos, la asociación del heterodímero Nop7/Erb1 ocurre mediante la interacción de un segmento del extremo amino-terminal de Erb1 con Nop7 en el contexto prerribosomal [22]. Además, los estudios realizados por el Dr. Marcin Węgrecki de nuestro laboratorio sugerían que la interacción entre ambas proteínas *in vitro* acontecía entre los residuos 1-435 de Erb1 y el extremo 1-350 de Nop7. Este segmento de Nop7 incluye el extremo N-terminal, denominado *pescadillo*, y el primer *coiled-coil* de Nop7 de lo que se deduce que el dominio BRCT (355-449) no es esencial para la interacción. Basándonos en estos datos, decidimos determinar la afinidad entre el extremo amino-terminal de Erb1 (residuos 1-435) con el segmento 1-350 de Nop7.

Inicialmente, realizamos un ensayo de precipitación del extremo 1-435 de CtErb1 (CtErb1<sub>1-435</sub>) con CtNop7, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, apareciendo ambas proteínas en el paso final de elución (**Figura 22A**). Posteriormente, se determinó la constante de afinidad mediante BLI entre ambas construcciones. Nuestros resultados sugieren que el dominio amino-terminal de CtErb1 es suficiente para interactuar con Nop7 ya que muestra una  $K_D$  del mismo orden de magnitud que la  $K_D$  de las proteínas completas (**Figura 22B, Tablas 15 y 16**).

De forma similar, se realizaron ensayos de precipitación con el extremo amino-terminal de Nop7 (CtNop7<sub>1-350</sub>) con CtErb1. En este caso, CtNop7<sub>1-350</sub>, con etiqueta GST (GST-CtNop7<sub>1-350</sub>), quedó retenida por afinidad en resina de glutatión y se incubó con CtErb1, con etiqueta de His, en cantidades equimolares. Ambas proteínas coelúan al observarse dos bandas correspondientes a cada una de ellas en el gel SDS-PAGE (**Figura 22C**). Posteriormente, decidimos realizar otro ensayo de precipitación siguiendo el mismo procedimiento para



demostrar si también interaccionaban ambos extremos N-terminales (**Figura 22D**). En dicho experimento, ambas proteínas coelúan indicando que el segmento 1-350 de Nop7 es necesario para la interacción con el N-terminal de Erb1, tal y como sugiere la literatura [22].



**Figura 22. El extremo amino-terminal de Erb1 interacciona con Nop7 *in vitro*.** (A) Experimento de precipitación usando CtNop7 retenida por afinidad, coeluyendo con CtErb1<sub>1-435</sub>. (B) Ensayo BLI de CtErb1<sub>1-435</sub> y CtNop7 a diferentes concentraciones. (C) Ensayo de precipitación de CtErb1 y CtNop7<sub>1-350</sub>. (D) Ensayo de precipitación de CtErb1<sub>1-435</sub> y CtNop7<sub>1-350</sub>. Los experimentos de precipitación (C) y (D) mostraron que GST-CtNop7<sub>1-350</sub>, retenida por afinidad en resina de glutatión, coeluyó con CtErb1 y CtErb1<sub>1-435</sub> con etiqueta de His. (E) Electroforesis en condiciones nativas de CtNop7<sub>1-350</sub>, CtErb1<sub>1-435</sub> (flechas verdes), CtErb1 (flecha morada), CtNop7 (flechas negras) y los heterodímeros CtNop7/CtErb1<sub>1-435</sub> (flecha roja) y CtNop7<sub>1-350</sub>/CtErb1 (flechas amarillas). M: marcador de pesos moleculares; R: resina; L: 3<sup>er</sup> lavado; E: elución.

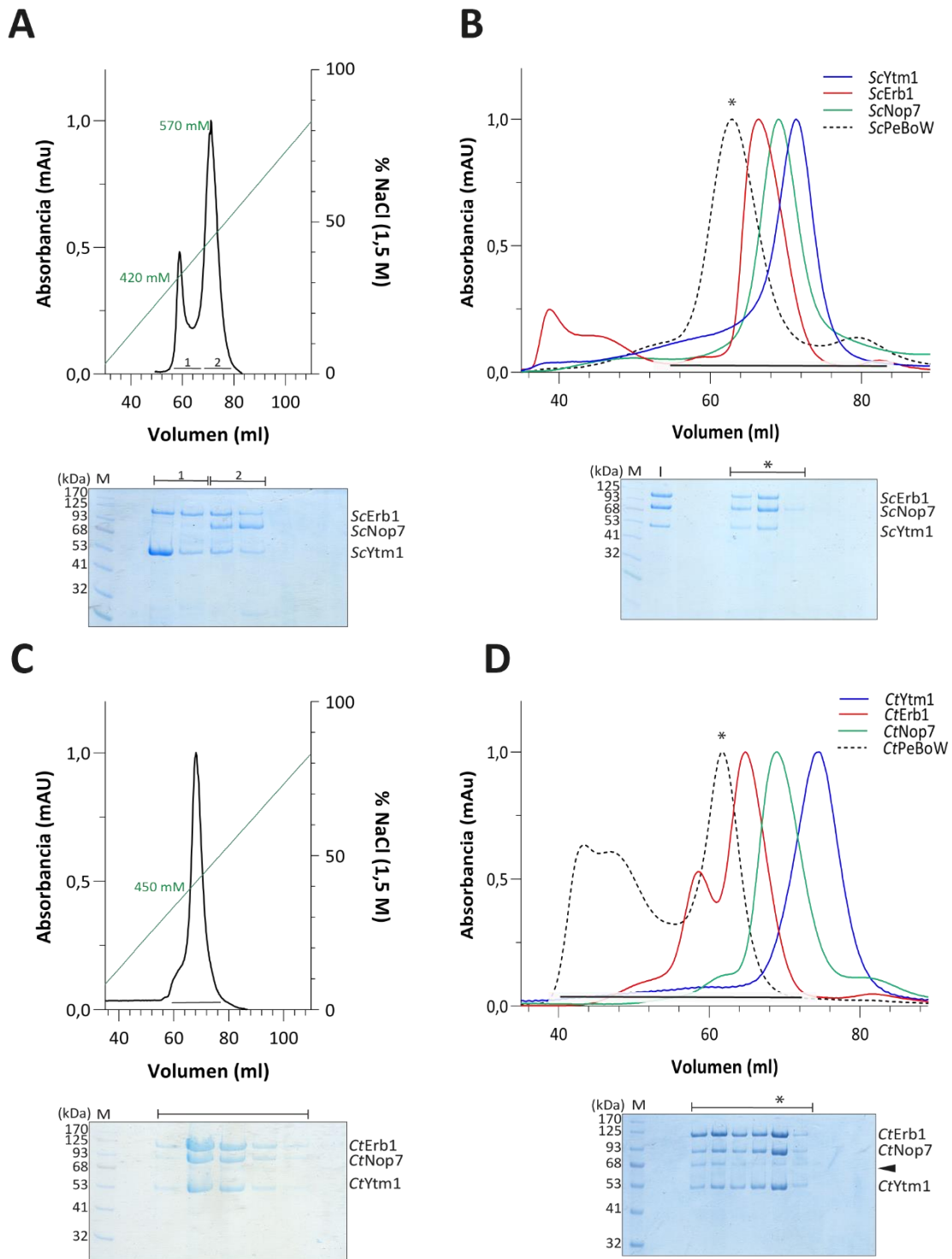
**Tabla 16. Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de CtErb1<sub>1-435</sub>/CtNop7.**

Proteína-Proteína	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>a</sub> Error	k <sub>d</sub> (1/s)	k <sub>d</sub> Error	χ <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
CtErb1 <sub>1-435</sub> /CtNop7	8,19 x 10 <sup>-8</sup>	8,19 x 10 <sup>-8</sup>	7,002 x 10 <sup>2</sup>	1,072 x 10 <sup>-3</sup>	1,072 x 10 <sup>-3</sup>	1,172	0,9812

Para confirmar la interacción entre los extremos N-terminales con sus proteínas diana completas se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones nativas. Para ello, se analizó cada una de las proteínas por separado para observar su comportamiento en condiciones nativas y, por otra parte, se incubaron durante 10 min las proteínas CtNop7/CtErb1<sub>1-435</sub> y CtNop7<sub>1-350</sub>/CtErb1 en proporciones equimolares resolviéndose posteriormente en el gel. En la **Figura 22E** se muestra el gel en condiciones nativas con todas las combinaciones de proteínas descritas anteriormente. Curiosamente, el fragmento CtNop7<sub>1-350</sub> no penetra en el gel, mientras que sí lo hacen CtErb1<sub>1-435</sub>, CtErb1 y CtNop7. Respecto al heterocomplejo CtNop7/CtErb1<sub>1-435</sub>, se observa una banda (flecha roja) que no corresponde en tamaño con las bandas aparecidas de cada una de las proteínas por separado (flechas verdes y negras) indicando la formación del heterocomplejo. Asimismo, se observa una banda más nítida (flecha naranja arriba) en el pocillo de CtNop7<sub>1-350</sub>/CtErb1 que no presenta el mismo tamaño que CtErb1, sugiriendo que podrían interactuar, excepto por una mínima cantidad de CtErb1 que puede ser debido a un exceso en la mezcla de incubación (flecha naranja abajo).

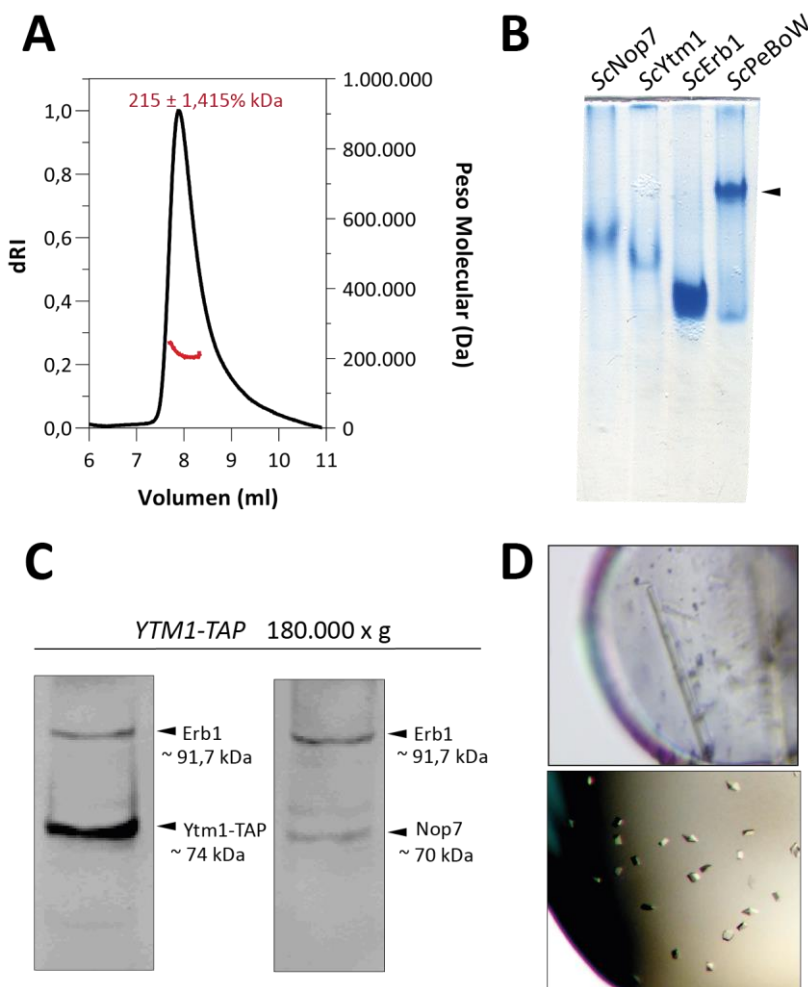
### **1.3. Reconstitución *in vitro* del heterotrímero Nop7/Erb1/Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae***

La reconstitución del heterotrímero *in vitro* se realiza mezclando en proporción equimolar las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1 purificadas previamente por separado. Posteriormente, la mezcla se pasa a través de una columna de Heparina para eliminar los ácidos nucleicos de la preparación y se purifican a través de SEC. Se inyectó el complejo tanto de *Ct* como de *Sc* en una columna Superdex 200 16/60 mostrando el siguiente perfil a 280 nm (**Figura 23**). En ambos casos, las proteínas coeluyeron confirmando la formación de heterotrímero ya que eluyen a volúmenes menores que en los cromatogramas de Nop7, Erb1 e Ytm1 por separado. El perfil cromatográfico del complejo de *Sc* presenta un pico homogéneo (**Figura 23B**) mientras que el complejo de *Ct* muestra varios picos debido posiblemente a la formación de agregados o de grandes oligómeros (**Figura 23D**). Sin embargo, la formación de estos oligómeros es reversible ya que en la reinyección vuelve a eluir como complejo ternario (datos no mostrados). Además, en el gel se observa un producto de degradación de CtErb1 analizado por LC-MS/MS (flecha).



**Figura 23. Purificación de los complejos ScPeBoW y CtPeBoW.** (A) Perfil de elución de cromatografía de heparina de ScPeBoW. ScPeBoW eluye a partir de 570 mM de NaCl. (B) Perfiles de elución de SEC de ScYtm1 (azul), ScNop7 (verde) y ScErb1 (rojo) superpuestos con el perfil de elución del heterotrímero ScPeBoW (línea negra punteada). (C) Perfil de elución de cromatografía de heparina de CtPeBoW. CtPeBoW eluye con 450 mM de NaCl. (D) Perfiles de elución de SEC de CtYtm1 (azul), CtNop7 (verde) y CtErb1 (rojo) superpuestos con el perfil de elución del heterotrímero CtPeBoW (línea negra punteada). En el gel se observa un producto de degradación de CtErb1 (flecha). Las SEC se realizaron en una columna Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare). Línea verde: % de NaCl (1,5 M) usado como eluyente en la cromatografía de heparina. M: marcador de pesos moleculares; I: muestra inyectada.

Asimismo, para determinar con precisión el peso molecular del complejo, se inyectó el heterotrímero de levaduras en SEC-MALS obteniéndose un único pico de  $215 \pm 1,415\%$  kDa (**Figura 24A**), correspondiente a la suma del peso molecular de Erb1, Nop7 e Ytm1. Asimismo, comprobamos la estabilidad del complejo en solución a través de electroforesis en condiciones nativas apareciendo una única banda con un tamaño superior a cada una de las proteínas por separado (**Figura 24B**, flecha). También aparece una banda más tenue en la parte inferior debido posiblemente a un exceso de Erb1 en la mezcla de incubación.



**Figura 24. Las proteínas del complejo PeBoW se asocian de forma estable.** (A) Análisis de SEC-MALS del complejo ScPeBoW usando una columna PROTEIN KW-803 (8x300 mm, Shodex™). (B) Electroforesis en condiciones nativas de las proteínas ScNop7, ScYtm1, ScErb1 por separado y formando el complejo ScPeBoW (flecha). (C) WB de sobrenadantes de extractos de levaduras sometidos a ultracentrifugación (180.000 x g) para visualizar, usando anticuerpos específicos, cada de una de las proteínas que forman el complejo. (D) Cristales de CtPeBoW (arriba) y cristales de ScErb1/ScNop7 (abajo) usados en la difracción.

Según la literatura, el complejo PeBoW se forma antes de la interacción con el ribosoma [93]. Para comprobar que el subcomplejo Nop7 se encuentra como heterotrímero fuera del

contexto prerribosomal, se lisaron 3 L de cultivo de levaduras que expresaban Ytm1 etiquetada con TAP, para su posterior identificación, y se sometieron a una ultracentrifugación a 180.000 x g para sedimentar los grandes complejos ribosomales (ribonucleoproteínas). Posteriormente, usando anticuerpos policlonales específicos para Nop7 y Erb1 y anticuerpos anti-TAP para Ytm1-TAP se identificaron las tres proteínas en el sobrenadante del extracto celular (**Figura 24C**) confirmando que el complejo PeBoW existe como complejo ternario en la célula independiente del prerribosoma.

## 2. Resolución estructural del complejo Nop7/Erb1/Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* y *Saccharomyces cerevisiae*

Una vez establecidos los protocolos de purificación del complejo ternario, así como la caracterización biofísica de la interacción entre sus componentes, se procedió a su resolución estructural mediante diferentes técnicas como SEC-SAXS (Dispersión de Rayos X de ángulo reducido), microscopía electrónica de transmisión usando tinción negativa (NS-TEM) y entrecruzamiento y análisis por LC-MS/MS.

Como primera aproximación, se intentó la cristalización del heterotrímero para conocer la estructura tridimensional usando diferentes cribados comerciales de precipitantes. Se obtuvieron cristales de CtPeBoW con forma de varilla que se difractaron en el sincrotrón ALBA (Barcelona) a una resolución de 3,5 Å y grupo espacial P 6<sub>5</sub>22 (**Figura 24D**, arriba). Tras el análisis de las dimensiones de la celda unidad (a=171,36 Å; b=171,36 Å; c=150,68 Å; α=90°; β=90°; γ=120°), éstas sugirieron que no se encontraría el heterotrímero completo en la unidad asimétrica. Efectivamente, el resultado del reemplazo molecular mostró que en el cristal sólo se encontraba CtYtm1 y el dominio β-*propeller* de CtErb1, cuya estructura había sido resuelta previamente en nuestro laboratorio (PDB ID: 5CXB) [130].

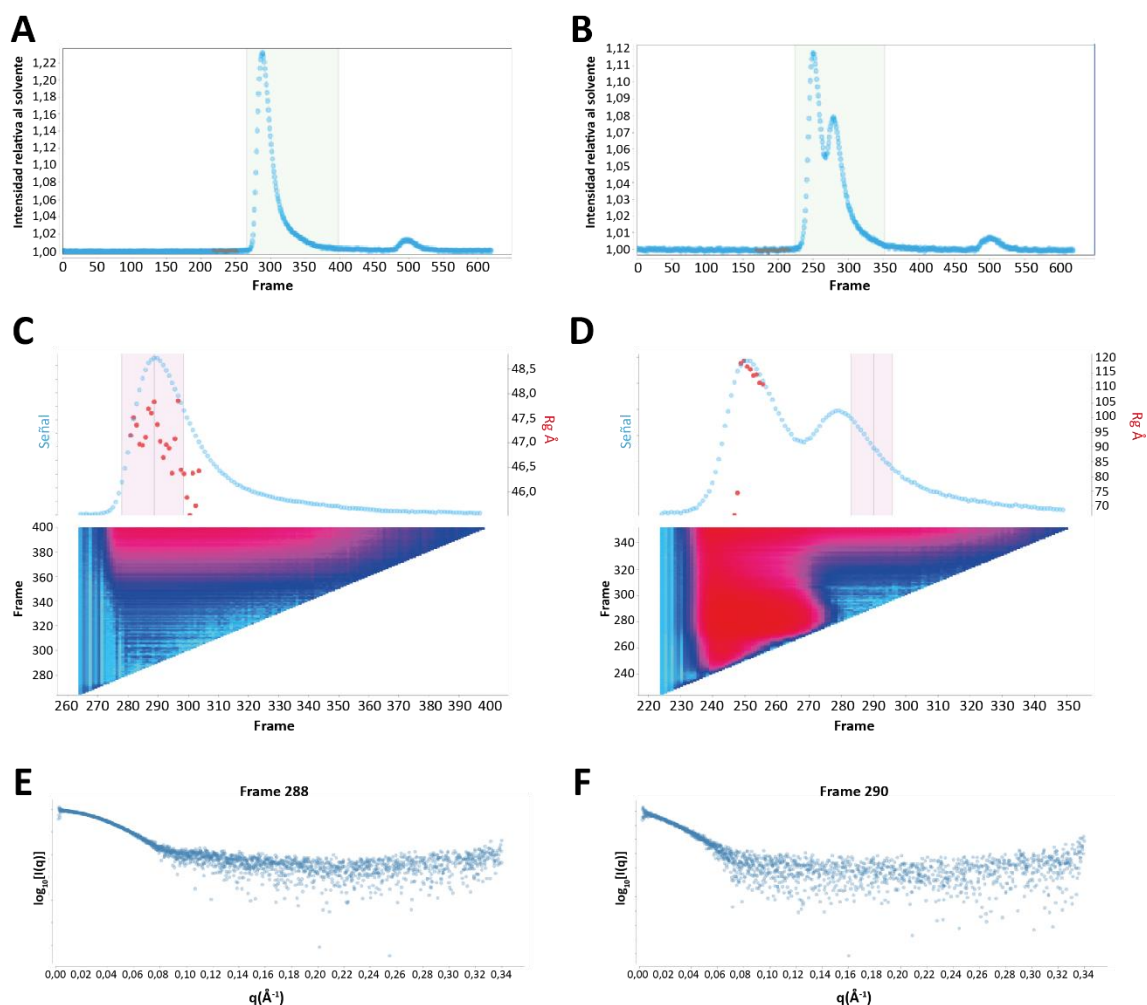
Igualmente, también se cristalizó el heterodímero Erb1/Nop7 de levaduras mediante cribados comerciales. Se obtuvieron cristales que fueron difractados en el sincrotrón ALBA (Barcelona) a una resolución de 1,64 Å y grupo espacial P 2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> (**Figura 24D**, abajo). Sin embargo, las dimensiones de la celda unidad (a=51,84 Å; b=59,25 Å; c=162,22 Å; α=90°; β=90°; γ=90°) no eran compatibles con el heterodímero completo. De hecho, el reemplazo molecular indicó que en el cristal sólo se encontraba el dominio β-*propeller* de ScErb1, previamente publicado por nuestro grupo (PDB ID: 4U7A) [131]. La cristalización de dicho dominio podría deberse a que Erb1, en posición previa al β-*propeller*, presenta un motivo PEST, que se caracteriza por una elevada flexibilidad y susceptibilidad a proteasas en *E.coli* [132].

Tras los intentos de cristalización del complejo, se decidió abordar la resolución estructural del complejo mediante la combinación de SEC-SAXS y microscopía electrónica. Estas técnicas permitirían determinar si la conformación del complejo en solución difiere de la configuración observada cuando forma parte de la partícula prerribosomal (PDB ID: 6ELZ), además de esclarecer la posible conformación que adoptarían dichas proteínas en el espacio celular.

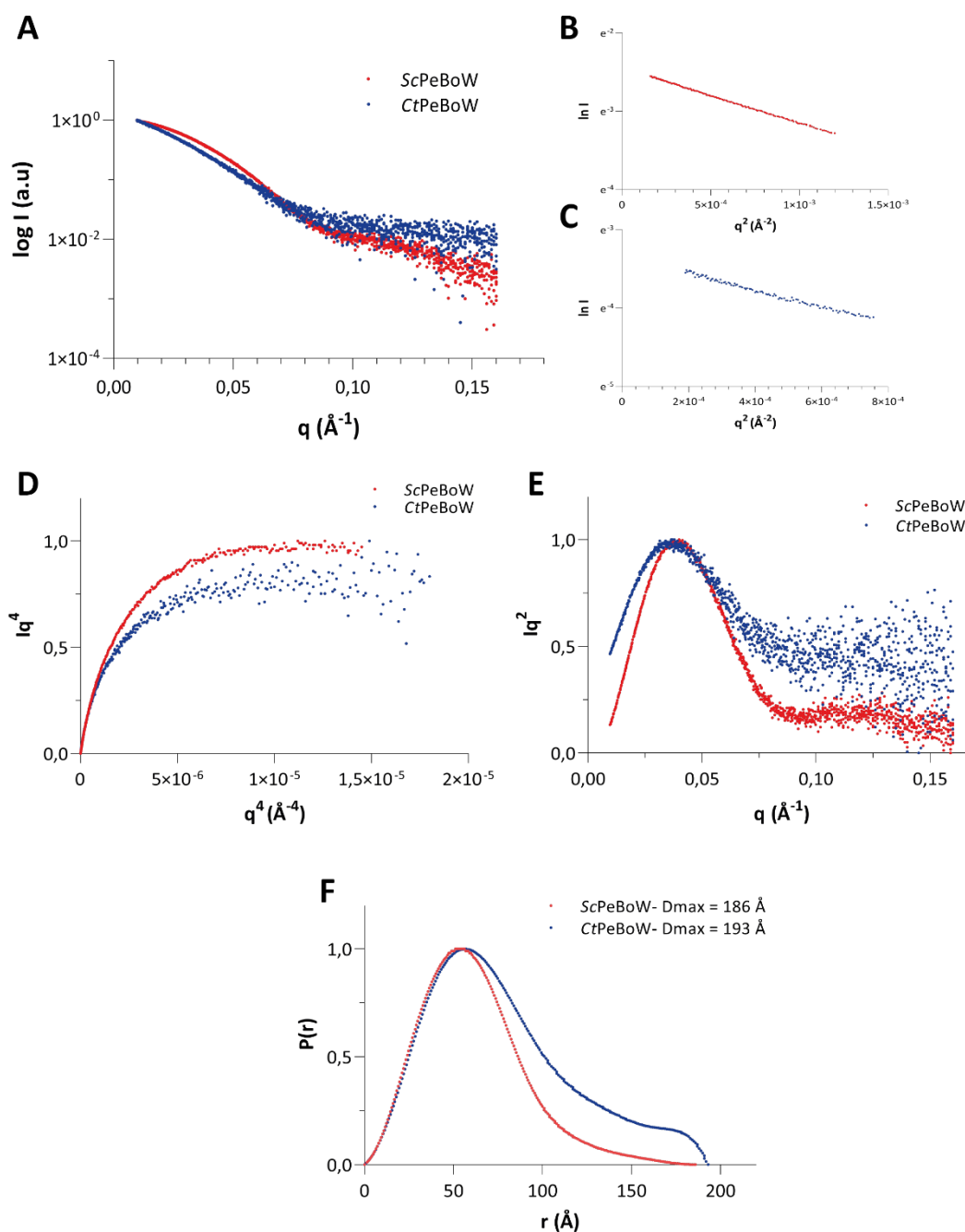
### 2.1. Envoltura del complejo PeBoW por SEC-SAXS

La técnica SEC-SAXS permite la generación de envolturas tridimensionales para el estudio estructural de proteínas y/o ARN. A diferencia de la microscopía electrónica, esta técnica proporciona información del peso molecular, dimensiones, oligomerización, plegamiento y flexibilidad de la proteína [228,229]. Sin embargo, dado que es una técnica de baja resolución, es necesario complementar la información con NS-TEM. Por ello, las envolturas generadas mediante el procesamiento de los datos de SEC-SAXS, nos permitirían validar los modelos tridimensionales que se obtendrán por microscopía de tinción negativa, descritas en el siguiente apartado.

Para llevar a cabo la técnica SEC-SAXS, se purificaron los complejos PeBoW de *Sc* y *Ct* y se enviaron a la línea B21 del sincrotrón Diamond Light Source Ltd (Didcot, Oxfordshire, Reino Unido) [231]. Los perfiles de intensidad de señal de SEC-SAXS de *Sc*PeBoW y *Ct*PeBoW se muestran en la **Figuras 25A y 25B** analizados mediante el programa ScÅtterIV (desarrollado por Robert Rambo, Diamond Light Source). El diagrama de intensidad de *Sc*PeBoW presenta un pico de intensidad correspondiente a un tamaño de partícula homogéneo al contrario que *Ct*PeBoW que presenta un comportamiento heterogéneo con dos poblaciones diferentes, lo que podría indicar agregación de partículas. De acuerdo con el diagrama de correlación obtenido tras la elección de la zona de mayor intensidad, se seleccionaron el *frame* 288 para *Sc*PeBoW y el *frame* 290 para *Ct*PeBoW por su buena correlación con los demás puntos del área de mayor intensidad (**Figuras 25C y 25D**). Sin embargo, el radio de giro ( $R_g$ ) del complejo *Ct*PeBoW no era estable, no aparecen puntos rojos, debido a la dispersión de los datos del área seleccionada del diagrama (**Figura 25D**).



**Figura 25. Perfil de intensidad de señal de ScPeBoW y CtPeBoW mediante SEC-SAXS.** (A y B) Diagrama de intensidad frente a *frame* de ScPeBoW (A) y CtPeBoW (B). Los puntos de menor intensidad correspondientes a la dispersión del tampón se utilizan como referencia (línea naranja). (C y D) Gráfico de correlación ampliado del perfil de intensidad entre *frames* de ScPeBoW (C) y CtPeBoW (D). Los puntos rojos representan el Rg en cada *frame* sobre los puntos del pico de intensidad. El panel inferior muestra el mapa de calor de acuerdo al análisis de autocorrelación de Durbin-Watson. Los puntos en color cian son los que muestran mayor similitud de perfiles de dispersión y los de color magenta los más discrepantes. (E) Representación del perfil de dispersión del *frame* 288 de ScPeBoW. (F) Representación del perfil de dispersión del *frame* 290 de CtPeBoW. Las muestras se inyectaron en una columna KW-403 (Shodex<sup>TM</sup>) a 5,5 y 3,7 mg/ml (ScPeBoW y CtPeBoW, respectivamente).  $q$ : amplitud del vector de dispersión;  $I$ : intensidad de dispersión.



**Figura 26. Representación del análisis de los datos de dispersión de SEC-SAXS de los complejos ScPeBoW y CtPeBoW.** (A) Gráfico de la intensidad de dispersión ( $\log I$ ) frente al vector de dispersión ( $q$ ). (B y C) Región de Guinier de ScPeBoW (B) y CtPeBoW (C). (D) Representación Porod-Debye. (E) Gráfico Kratky normalizado. (F) Función de distribución de distancia por pares.

El procesamiento de los datos de dispersión del área seleccionada anteriormente se realiza en diferentes etapas (**Figura 26**). En la **Figura 26A** se representa la intensidad de señal frente al vector de dispersión ( $q$ ) de ambos complejos. La caída de la pendiente de la curva da información sobre el tamaño de la partícula. En el caso de CtPeBoW, la parte lineal de la gráfica



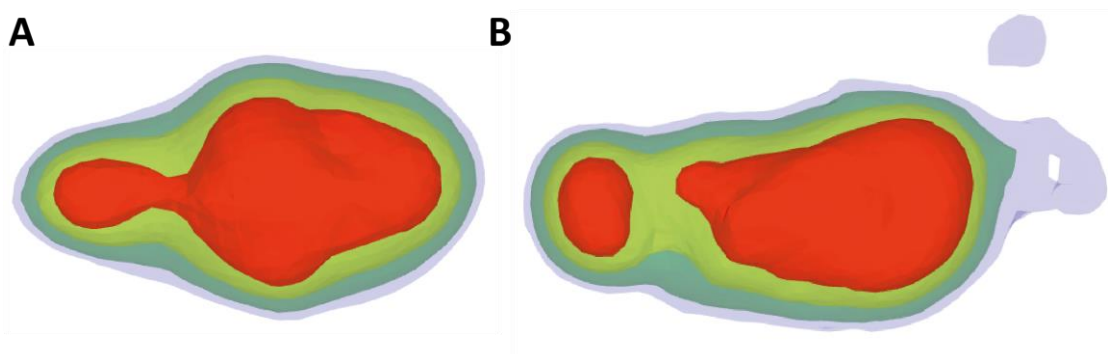
cae a valores menores de  $q$  que ScPeBoW, sugiriendo un tamaño de partícula ligeramente superior. Además, se observa linealidad en los gráficos Guinier de ambos complejos, indicio de buena calidad de los datos experimentales y homogeneidad de muestra (**Figuras 26B y 26C**). Ambos complejos tienen una representación Porod-Debye similar alcanzando un perfil de meseta lo que sugiere la presencia de una partícula compacta y de baja flexibilidad (**Figura 26D**). En el gráfico Kratky la organización de los puntos indica que los complejos ScPeBoW y CtPeBoW se encuentran bien plegados ya que la curva presenta un pico máximo con una caída pronunciada, característico de proteínas que adoptan un correcto y estable plegamiento [232] (**Figura 26E**). La función de distribución por pares ( $P(r)$ ) señala una mayor incidencia de distancias alrededor de 50-55 Å para los dos complejos siendo la distancia máxima intramolecular ( $D_{max}$ ) de ScPeBoW 186 Å y CtPeBoW de 193 Å. Además, el perfil de la  $P(r)$ , parecido a una campana de Gauss centrada, indica una forma globular para las dos partículas (**Figura 26F**).

El programa ScÅtterIV calcula el  $R_g$  del complejo ScPeBoW y CtPeBoW indicando que el complejo de *C. thermophilum* es mayor que el de levadura (**Tabla 17**). Esto puede ser debido a una posible agregación de las partículas, como se ha visto en el perfil de intensidad (**Figura 26D**), donde tampoco se indica una zona estable del  $R_g$  en la zona seleccionada del perfil. Además, los cálculos del peso molecular a partir de los datos experimentales de SAXS son similares al peso molecular teórico del ScPeBoW. Sin embargo, la estimación para CtPeBoW difiere respecto al peso molecular teórico. Hay que tener en cuenta que el cálculo para el peso molecular que realiza el paquete ATSAS considera la capa de solvatación de la partícula. Asimismo, en el caso de SAXSMoW [236], el programa calcula el peso molecular sin previa selección de datos. Entonces, en la muestra de CtPeBoW, debido a la presencia de agregados o formación de oligómeros, existiría una mayor capa de solvatación explicando la diferencia en los pesos moleculares.

**Tabla 17. Radio de giro ( $R_g$ ), distancia máxima intramolecular ( $D_{max}$ ) y pesos moleculares (PM) de ScPeBoW y CtPeBoW teórico y experimental calculados mediante el paquete ATSAS y el servidor SAXSMoW. Los valores de los pesos moleculares experimentales están normalizados respecto al peso molecular teórico, mostrados entre paréntesis.**

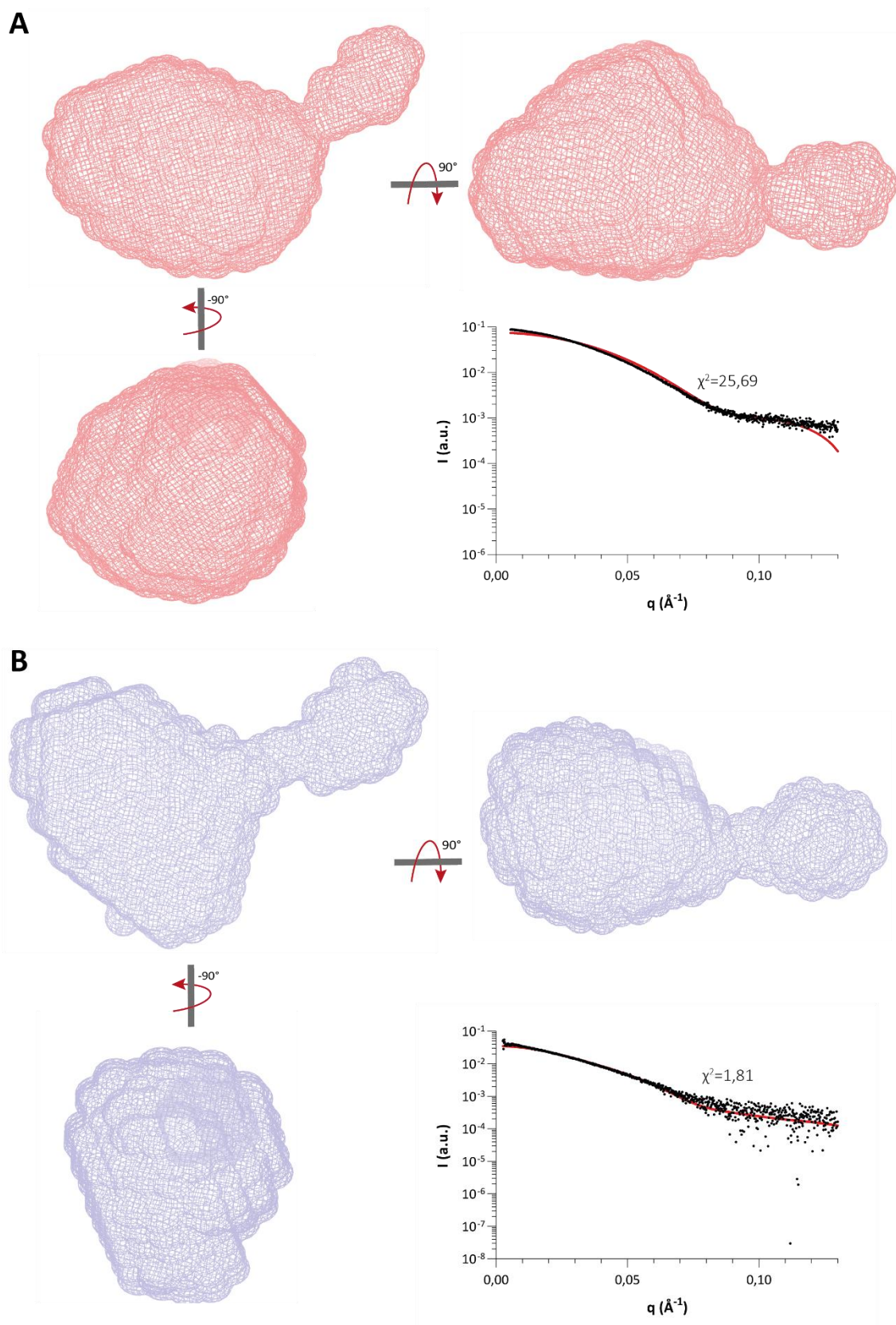
Complejo	$R_g$ (Å)	$D_{max}$ (Å)	PM teórico (+His) (kDa)	PM experimental SAXS (kDa)	SAXSMoW (kDa)
ScPeBoW	46,64 ± 0,05	186	219,042	266,389 (1,21)	276,000 (1,26)
CtPeBoW	63,36 ± 0,34	193	226,819	389,609 (1,71)	413,000 (1,82)

Antes de originar las envolturas moleculares de cada complejo, se originó un mapa de densidad electrónica *ab initio* a partir de los datos procesados de SEC-SAXS mediante la herramienta DENSSWeb (Density from Solution Scattering, Center for Computational Research, University of Buffalo) para tener una idea aproximada de las envolturas que pretendíamos originar (**Figura 27**). La densidad de ambos complejos es bastante similar mostrando una discontinuidad de una parte de CtPeBoW, posiblemente el extremo amino-terminal de Erb1, debido a su alta flexibilidad (**Figura 27B**).



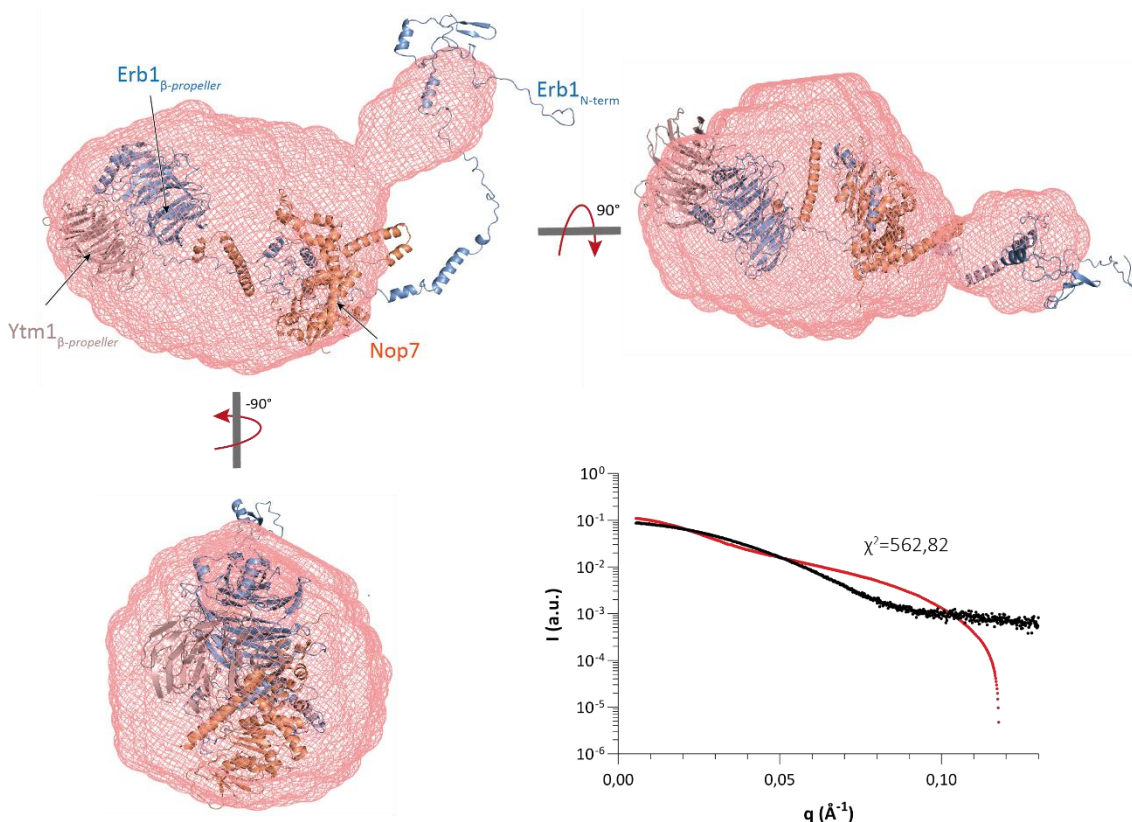
**Figura 27.** Mapa de densidad electrónica *ab initio* originado a partir de los datos procesados de SEC-SAXS mediante la herramienta DENSSWeb. (Density from Solution Scattering, Center for Computational Research, University of Buffalo). (A y B) Mapa de densidad electrónica de ScPeBoW (A) y CtPeBoW (B).

Posteriormente, se clasificaron las 20 envolturas generadas con cada  $D_{\text{máx}}$  de cada complejo según la discrepancia espacial normalizada (NSD). Posteriormente, los modelos tridimensionales originados se alinearon y se superpusieron obteniendo un modelo promedio final. De esta forma, se consiguió una envoltura para los complejos ScPeBoW y CtPeBoW (**Figuras 28A y 28B**). La calidad de los datos procesados se refleja en el valor de  $\chi^2$ , mostrando una mayor fiabilidad a menor valor de este parámetro estadístico. Para la muestra de ScPeBoW, la  $\chi^2$  es de 25,69, indicativo de buena correlación con los datos experimentales. Sin embargo, para CtPeBoW, se obtuvo una  $\chi^2$  con valor de 1,81, que indica un buen ajuste pero existe mayor dispersión de los datos.



**Figura 28. Envolturas obtenidas por SEC-SAXS de ScPeBoW y CtPeBoW.** (A y B) Se muestran tres perspectivas de las envolturas de ScPeBoW (A) y CtPeBoW (B). Cada gráfica muestra la superposición de la curva de los datos crudos de SAXS (negro) con el perfil teórico calculado tras el procesamiento de los datos crudos (rojo).

Por otra parte, para comprobar que el complejo PeBoW sufre un reajuste conformacional cuando se encuentra formando parte del prerribosoma, se superpusieron las estructuras de Erb1/Nop7/Ytm1 sustraídas del PDB 6ELZ [22] en el interior de la envoltura de SAXS de ScPeBoW calculándose un valor de  $\chi^2$  de 562,82 (**Figura 29, Tabla 18**). De este modo, nuestros resultados indican que la estructura del complejo en solución difiere de cuando está en el prerribosoma.

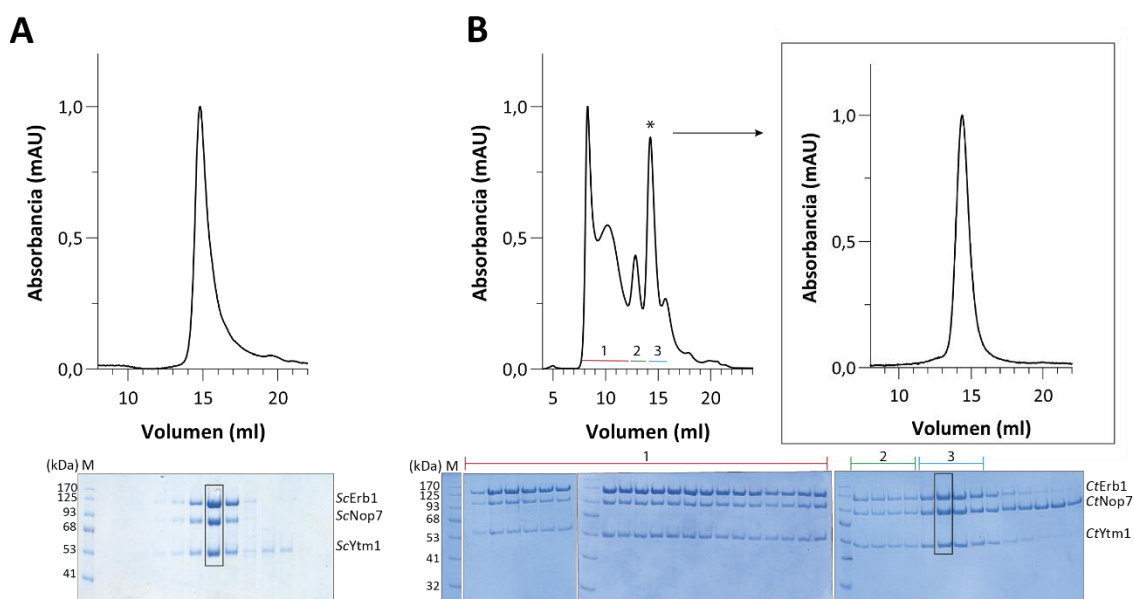


**Figura 29. Superposición del complejo PeBoW prerribosomal en la envoltura SAXS de ScPeBoW.** Se muestran tres perspectivas de la superposición en la envoltura de ScPeBoW (PDB ID:6ELZ). Cada gráfica muestra la superposición de la curva de los datos crudos de SAXS (negro) con el perfil teórico calculado para el modelo (rojo).

## 2.2. Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (NS-TEM)

Para complementar los datos experimentales de SAXS, abordamos el estudio de la estructura del complejo PeBoW mediante la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM. Para obtener los complejos ScPeBoW y CtPeBoW se purificaron por SEC usando una columna Superosa 6 increase 10/300 GL (GE Healthcare) (**Figuras 30A y 30B**). Mientras que

ScPeBoW eluye como un pico simétrico (**Figura 30A**), el perfil de CtPeBoW muestra más heterogeneidad diferenciándose varios picos indicando posible oligomerización. Para obtener una mejor muestra para microscopía por tinción negativa se reinyectó el pico seleccionado mostrando un perfil homogéneo (**Figura 30B**, derecha). Se prepararon gradillas de ambas muestras usando una dilución de la fracción correspondiente a cada pico simétrico del cromatograma y se visualizaron mediante tinción negativa con acetato de uranilo. El flujo de trabajo realizado para cada complejo y los volúmenes obtenidos se encuentran detallados en las **Figuras 31 y 32**. Brevemente, en las micrografías obtenidas de los complejos de ScPeBoW y CtPeBoW conseguimos obtener muestras de aspecto homogéneo (**Figuras 31 y 32**, izquierda arriba). Se obtuvieron 32 y 53 micrografías de ScPeBoW y CtPeBoW, respectivamente, y se seleccionaron más de 25.000 partículas de cada complejo. Posteriormente, las partículas fueron ordenadas y clasificadas inicialmente en 50 clases 2D (**Figuras 31 y 32**, derecha arriba), originándose un modelo inicial y una clasificación en 3D. A partir de las 50 clases iniciales, se obtuvieron 3 clases de volúmenes diferentes de cada complejo.



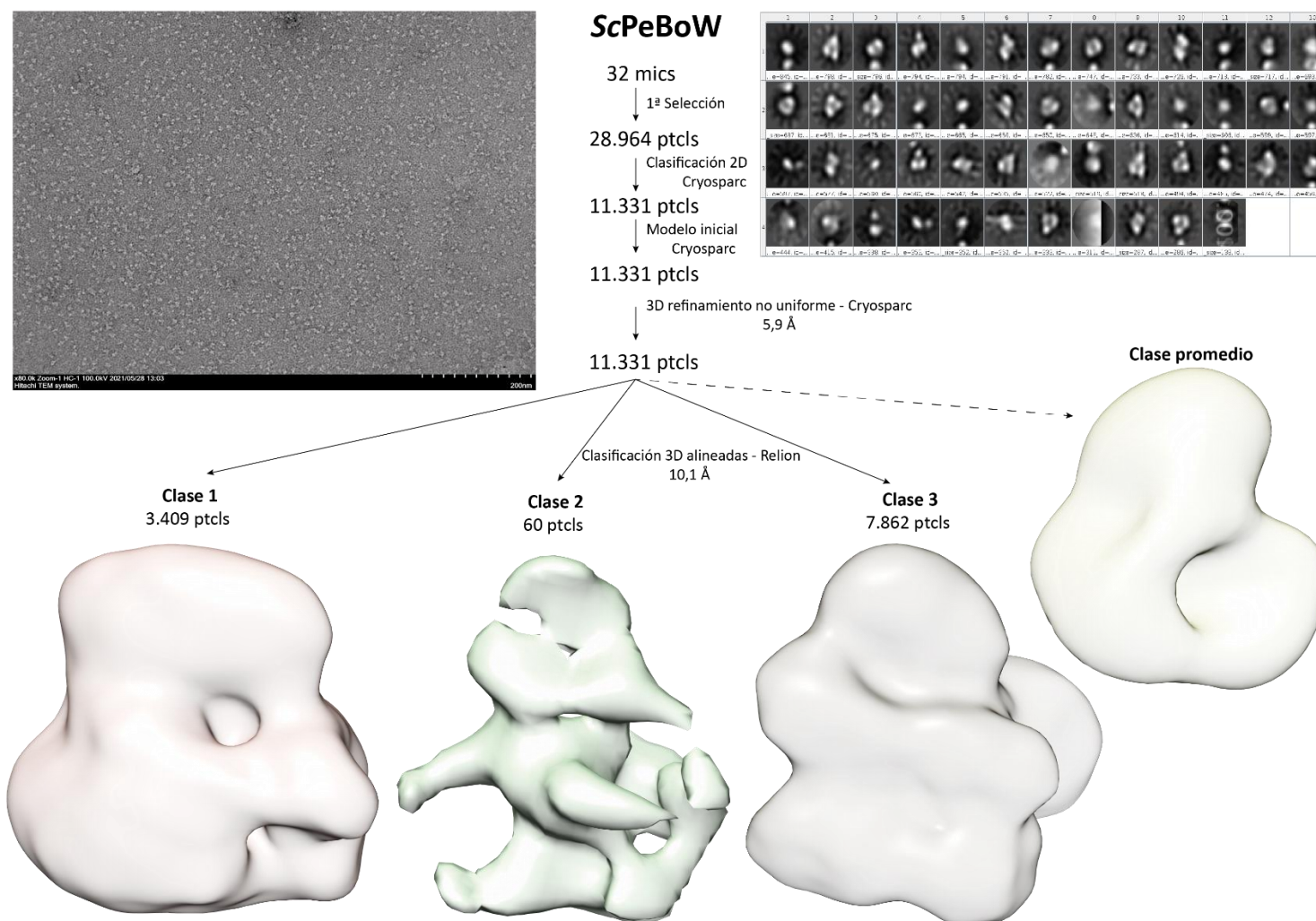
**Figura 30. Purificación de muestras de ScPeBoW y CtPeBoW.** (A y B) Perfil de cromatografía de exclusión molecular del complejo ScPeBoW (A) y CtPeBoW (B) a través de una columna Superosa 6 increase 10/300 GL (GE Healthcare). El pico seleccionado con asterisco se reinyectó en la misma columna obteniéndose un pico homogéneo. Las fracciones de elución enmarcadas en un rectángulo negro se seleccionaron para la preparación de gradillas de tinción negativa.



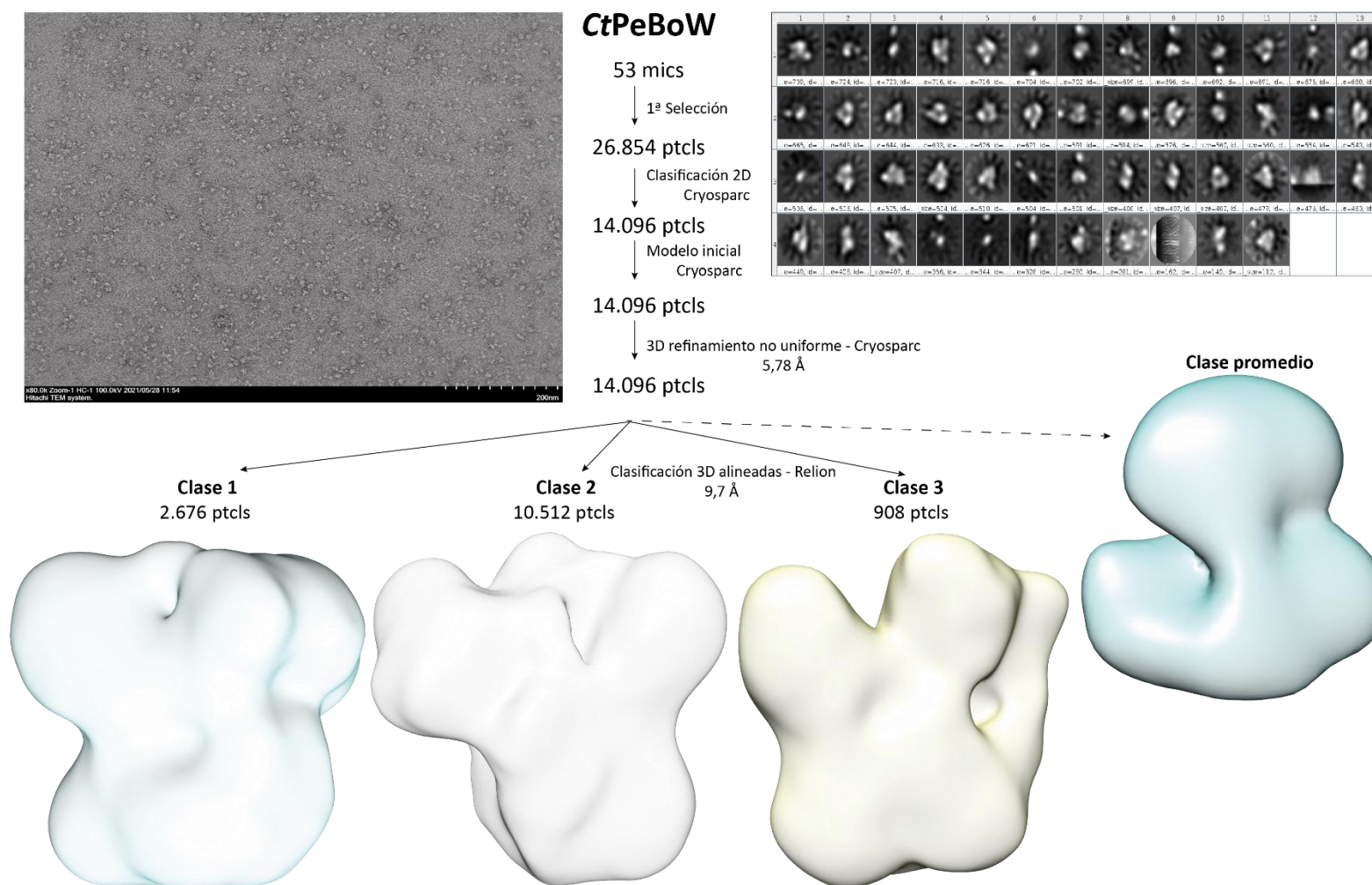
Los volúmenes tridimensionales obtenidos del complejo de ScPeBoW presentan ciertas diferencias (**Figura 31**). Las partículas clasificadas en la clase 1 (3.409 partículas) y la clase 3 (7.862 partículas), a pesar de presentar protuberancias localizadas en posiciones diferentes, parece que mantienen una envoltura similar (**Figura 31**). Sin embargo, el volumen final de la clase 2 no se obtuvo de forma satisfactoria ya que estaba originado por un número insuficiente de partículas (60 partículas). Respecto a CtPeBoW, en los volúmenes de las 3 clases (2.676; 10.512 y 908 partículas, respectivamente), se aprecian protuberancias cuya distancia y orientación relativa varían de una clase a otra (**Figura 32**). Además, para los complejos ScPeBoW y CtPeBoW se realizó un paso adicional de clasificación de los volúmenes obtenidos originándose un volumen tridimensional promedio de cada complejo, resultado de la unificación de todas las clases (**Figuras 31 y 32**).

Para superponer el complejo PeBoW en los volúmenes obtenidos, decidimos posicionar primero el heterodímero CtErb1 $_{\beta}$ -propeller/CtYtm1 (PDB ID:5CXB), dado que la interacción entre dos  $\beta$ -propellers presenta baja variabilidad conformacional. La superposición se realizó usando las estructuras cristalinas de CtErb1 $_{\beta}$ -propeller/CtYtm1 (PDB ID:5CXB) usando el programa Chimera [238] (**Figura 33**). Además, estos resultados indicarían que la estructura del complejo en solución es diferente a la conformación en el prerribosoma ya que los volúmenes 3D presentan formas globulares y compactas, consistente con los resultados obtenidos de SEC-SAXS.

En todos las superposiciones, existen regiones vacías que podrían corresponder a Nop7 y el extremo N-terminal de Erb1. Para completar el complejo, en todos los volúmenes se superpuso la estructura por cryo-EM de Nop7 obtenida del PDB 6ELZ posicionándola al inicio del extremo del  $\beta$ -propeller de CtErb1. Dicho extremo también orientado hacia Nop7 ya que, según la literatura y nuestros experimentos, la interacción con Nop7 comienza justo antes del  $\beta$ -propeller [22] (**Figura 34**) (**Figuras 68, 69, 70, ANEXO I**). Sin embargo, al colocar Nop7 en los modelos tridimensionales, existen ciertas regiones de Nop7 que sobresalen. Esto podría indicar que Nop7 se encontraría con una conformación más plegada en el complejo PeBoW en solución que en el prerribosoma. La región vacía observada en todas las superposiciones de ScPeBoW y CtPeBoW podría corresponder al N-terminal de Erb1 (**Figura 34**) (**Figuras 68, 69, 70, ANEXO I**).



**Figura 31. Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de ScPeBoW.** En la figura se muestran los tres mapas de densidad originados tras el procesamiento de las micrografías de ScPeBoW. mics: micrografías; ptcls: partículas.



**Figura 32. Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de CtPeBoW.** En la figura se muestran los tres mapas de densidad originados tras el procesamiento de las micrografías de CtPeBoW. mics: micrografías; ptcls: partículas.



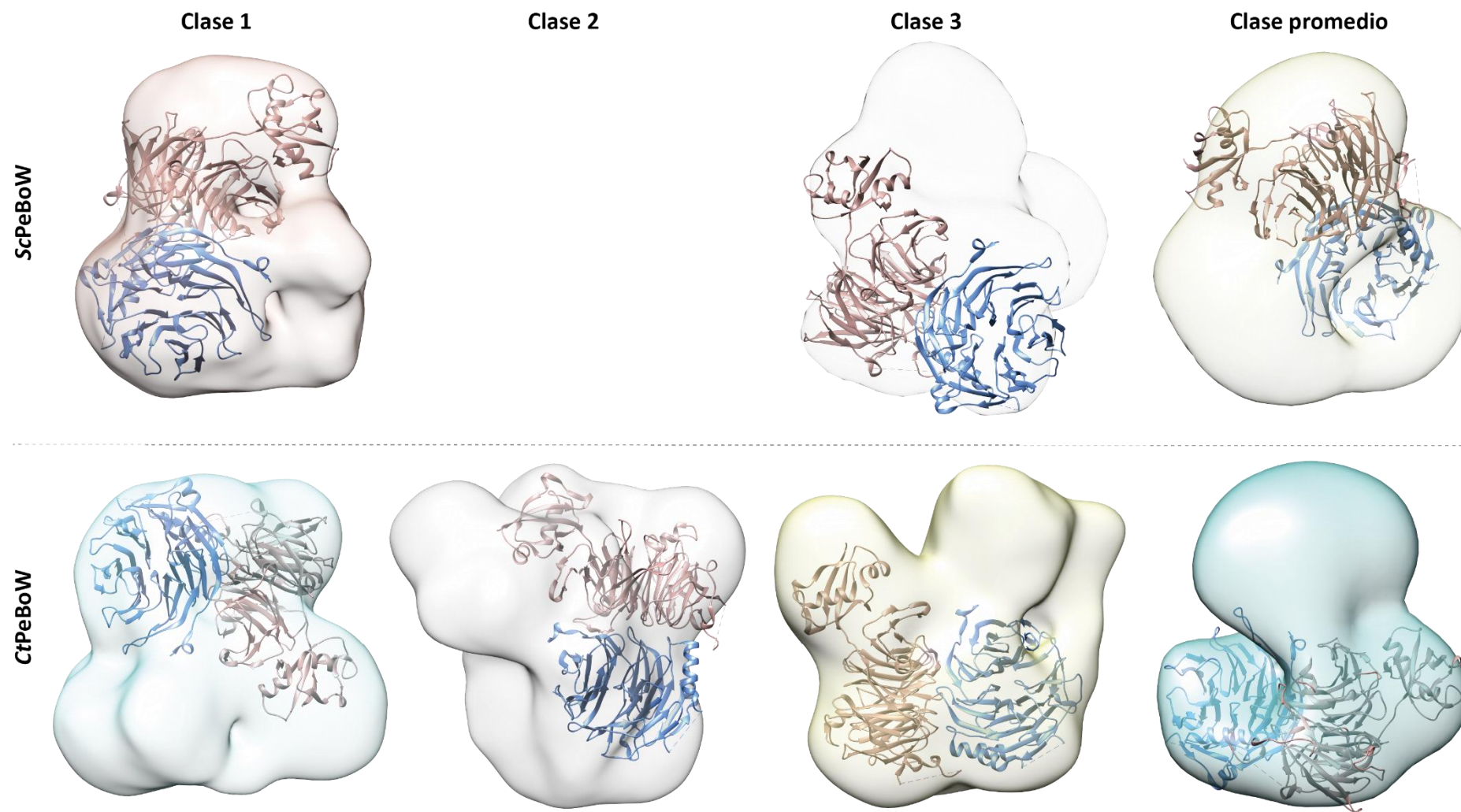


Figura 33. Superposición de la estructura cristalina de *CtEbr1 $\beta$ -propeller* / *CtYtm1* en los volúmenes obtenidos de *ScPeBoW* y *CtPeBoW* obtenidos por microscopía de tinción negativa. Vistas de los mapas tridimensionales de las clases del complejo *ScPeBoW* (fila arriba) y del *CtPeBoW* (fila abajo). *CtEbr1 $\beta$ -propeller* / *CtYtm1* (PDB ID: 5CXB).

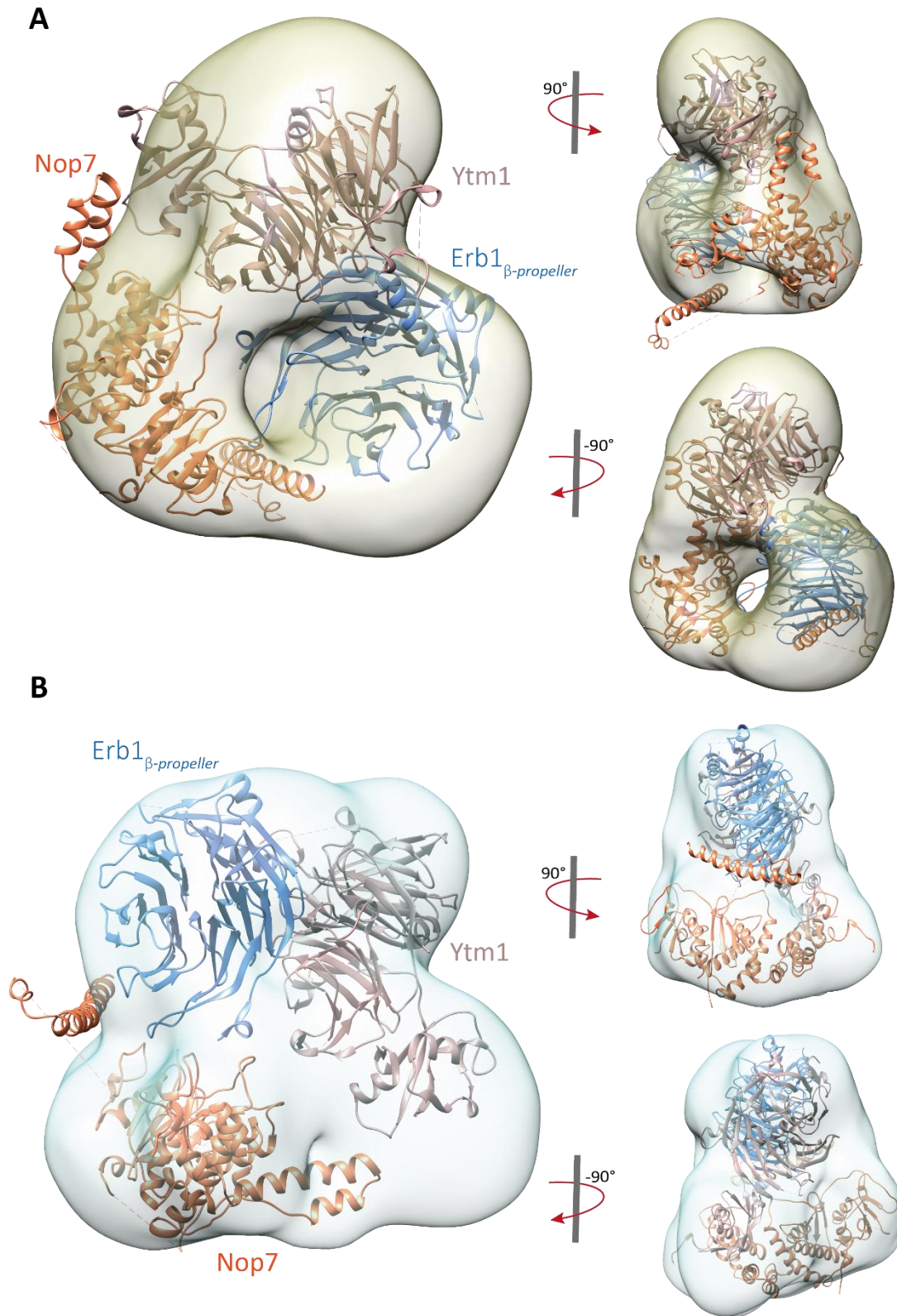
Para validar los modelos atómicos obtenidos por tinción negativa de las tres proteínas formando el complejo, se superpusieron en las envolturas obtenidas por SAXS. De esta forma se obtienen valores de  $\chi^2$  para cada superposición (**Tabla 18**). De forma general, los modelos de tinción negativa de CtPeBoW coordinan mejor en la envoltura de SAXS que los de ScPeBoW con una  $\chi^2$  menor.

Los modelos atómicos por tinción negativa seleccionados por presentar un mejor ajuste en la superposición en las envolturas de SAXS fueron la clase promedio de ScPeBoW (**Figura 34A, Tabla 18, asterisco**) y el modelo de la clase 1 de CtPeBoW (**Figura 34B, Tabla 18, asterisco**).

**Tabla 18. Análisis de la superposición de las envolturas originadas tras el procesado de SAXS de ScPeBoW y CtPeBoW con los distintos modelos atómicos originados por tinción negativa. (\*) Clases de volúmenes tridimensionales seleccionadas por presentar una menor  $\chi^2$ .**

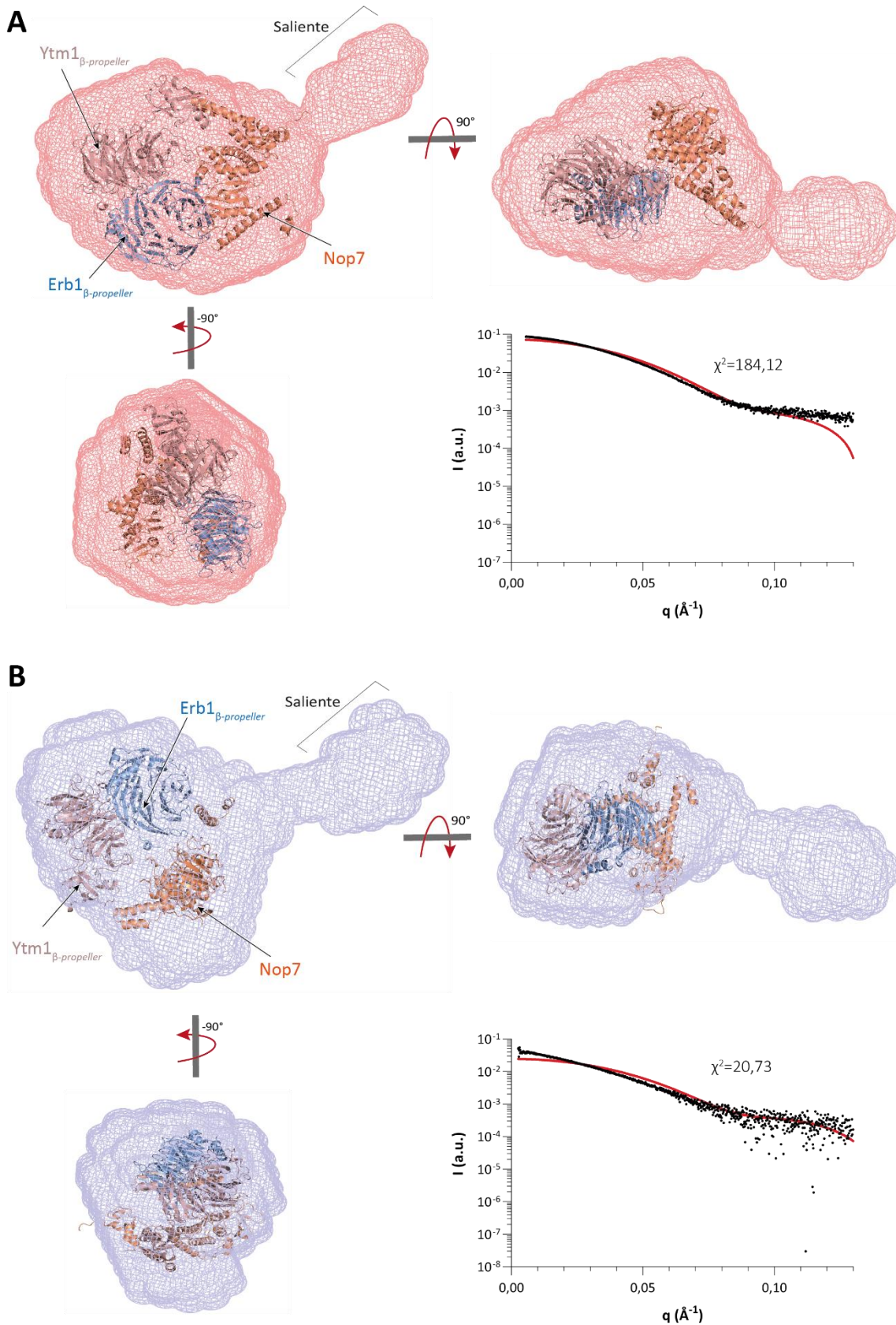
Envuelta SAXS	Modelo PDB/tinción negativa	$\chi^2$
ScPeBoW	PDB ID: 6ELZ	562,82
ScPeBoW	Clase 1 ScPeBoW	411,39
ScPeBoW	Clase 3 ScPeBoW	270,85
ScPeBoW	Clase promedio ScPeBoW	184,12*
CtPeBoW	Clase 1 CtPeBoW	20,73*
CtPeBoW	Clase 2 CtPeBoW	21,70
CtPeBoW	Clase 3 CtPeBoW	21,03
CtPeBoW	Clase promedio CtPeBoW	23,20

En las superposiciones en las envolturas por SAXS de dichos modelos, Nop7 está orientada hacia el saliente de la envoltura y Erb1/Ytm1 en el extremo opuesto. Sin embargo, la posición de dichas proteínas difiere en la superposición del modelo de la clase 1 de CtPeBoW y la clase promedio de ScPeBoW. En el primer caso, la orientación del heterodímero Erb1/Ytm1 y de Nop7 parecen encajar con un abultamiento de la envoltura cuando se observa desde la parte superior (**Figura 35A**). En el modelo de la clase 1 de CtPeBoW, Erb1/Ytm1 se encuentran rotados 180° en comparación con la estructura de ScPeBoW, pero manteniendo Nop7 orientada hacia el saliente de la envuelta (**Figura 35B**).



**Figura 34. Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en la envoltura promedio de ScPeBoW y la envoltura de la clase 1 de CtPeBoW. (A) Vistas de los mapas tridimensionales de la clase promedio de ScPeBoW. (B) Vistas de los mapas tridimensionales de la clase 1 de CtPeBoW. CtErb1 $_{\beta}$ -propeller /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6ELZ).**



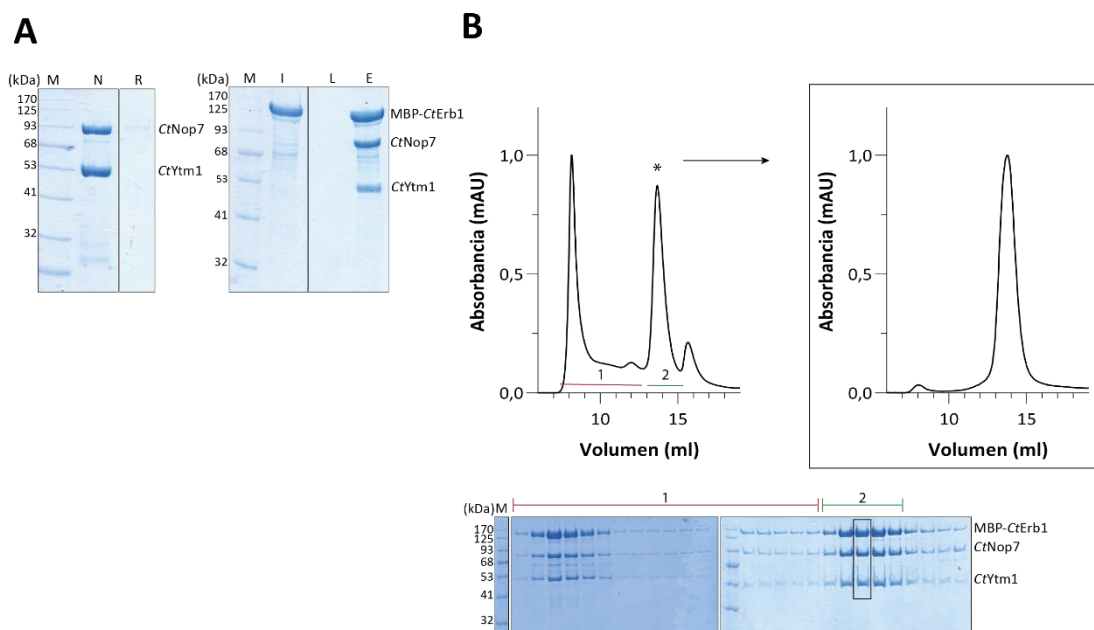


**Figura 35. Superposición del modelo atómico de la clase promedio de *ScPeBoW* y la clase 1 de *CtPeBoW* en las envolturas de SAXS de *ScPeBoW* y *CtPeBoW*. (A y B) Se muestran tres perspectivas de la superposición de la envoltura de *ScPeBoW* con el modelo originado tras la unión de las clases de *ScPeBoW*. (A) y el modelo de la clase 1 de *CtPeBoW* superpuesto en la envoltura de *CtPeBoW* de SAXS (B). Cada**

gráfica muestra la superposición de la curva de los datos crudos de SAXS (negro) con el perfil teórico calculado para el modelo (rojo). CtEbr1 $\beta$ -propeller /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6ELZ).

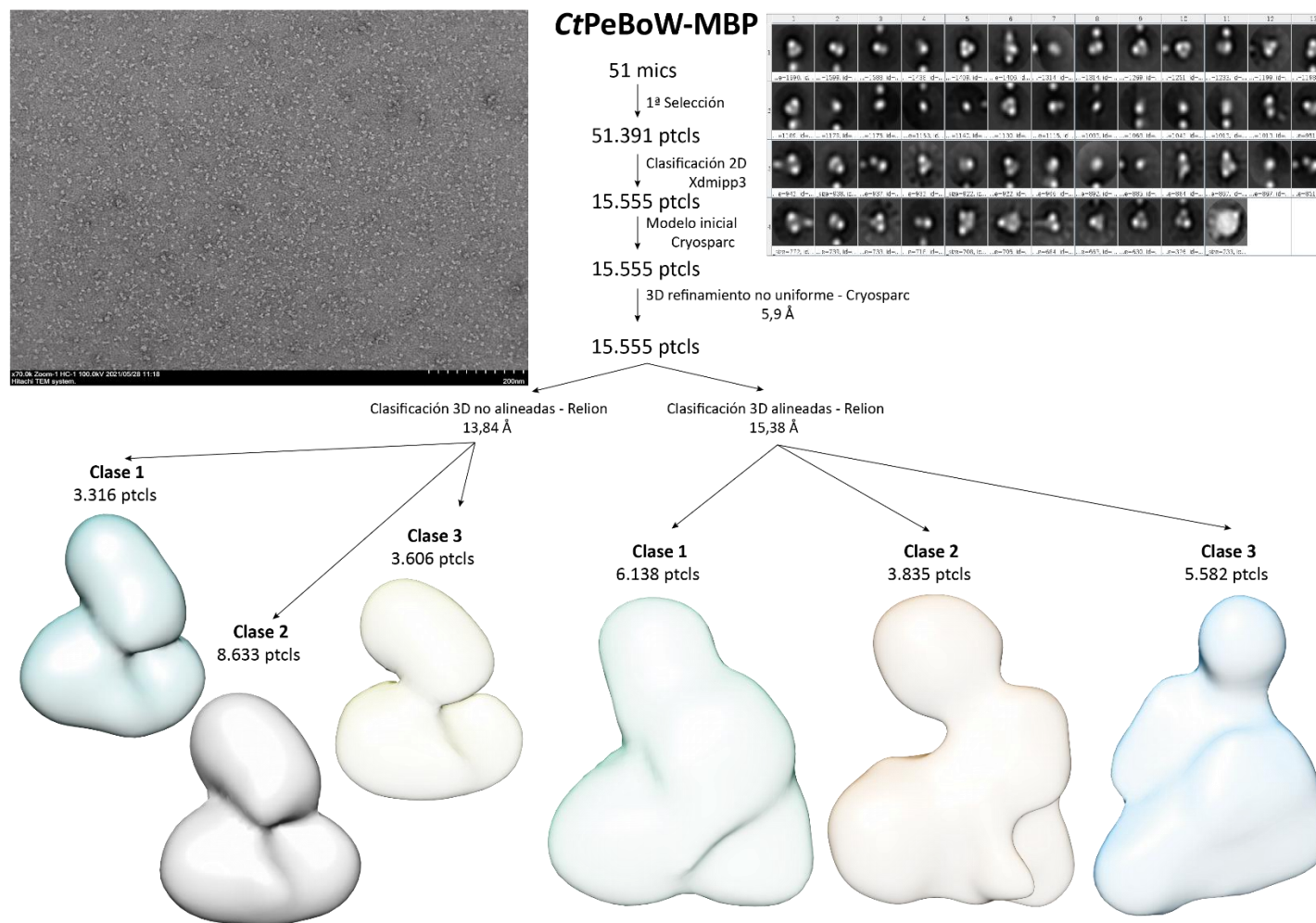
Una forma de poder localizar el extremo N-terminal de Erb1 es mediante la inserción de alguna molécula como la proteína de unión a maltosa (MBP) o algún anticuerpo. Decidimos clonar CtErb1 con MBP en el extremo amino terminal y realizar ensayos de precipitación para comprobar si permanecía la interacción con CtNop7 y CtYtm1. MBP-CtErb1 fue anclado a resina de amilosa (NEB) y se incubó con concentraciones equimolares de CtNop7 y CtYtm1. Para confirmar la presencia del heterotrímero en la fracción de elución, las muestras se desnaturalizaron a 95°C y se analizaron en un gel SDS-PAGE observándose tres bandas correspondientes a CtNop7, CtYtm1 y MBP-CtErb1 (**Figura 36A**). Posteriormente, se reconstituyó el heterotrímero *in vitro* (denominado CtPeBoW-MBP) en proporción molar 1:1:1 y se purificó de forma satisfactoria a través de una columna de heparina y, posteriormente, una cromatografía de exclusión molecular apareciendo un pico simétrico en la reinyección de la muestra (**Figura 36B**).

Se realizó tinción negativa del complejo CtPeBoW-MBP para tener un modelo 3D del heterotrímero con MBP y poder localizar así el extremo N-terminal de Erb1. El flujo de trabajo seguido para el procesamiento de las micrografías se muestra en la **Figura 37**. Se originaron 6 envolturas usando dos estrategias diferentes: una clasificación sin previo alineamiento de partículas y otro con las partículas alineadas. En el primer caso, se obtuvieron tres mapas con volúmenes muy diferentes a los resultados anteriores. Sin embargo, en la clasificación alineada de las partículas de CtPeBoW-MBP, se obtuvieron 3 volúmenes formados aproximadamente con un número similar de partículas (6.138, 3.835 y 5.582, respectivamente). También se observa que existe una protuberancia destacable en la parte superior que no se percibe en las demás envolturas. La presencia de dicho abultamiento posiblemente sea producido por la presencia de MBP.

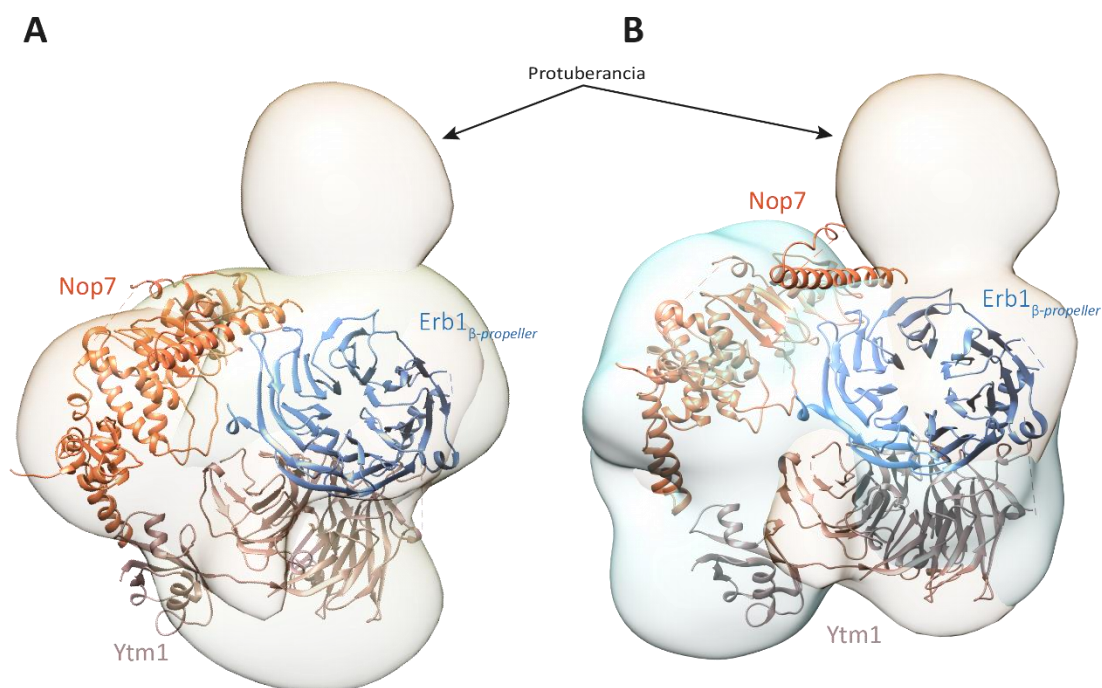


**Figura 36. Reconstrucción del complejo CtPeBoW-MBP.** (A) Ensayos de precipitación de MBP-CtErb1, CtNop7 y CtYtm1. MBP-CtErb1, retenido en resina de amilosa, coeluyó con 6xHis-CtNop7 y 6xHis-CtYtm1. (B) Perfil de cromatograma de exclusión molecular de CtPeBoW-MBP (arriba). Gel SDS-PAGE al 10% con las eluciones de la cromatografía (abajo). La fracción de elución enmarcada con un rectángulo negro se seleccionó para la preparación de gradillas de tinción negativa. M: marcador de peso molecular; N: no retenido; R: resina; I: muestra inyectada; L: 3<sup>er</sup> lavado; E: elución.

Tras la obtención de los volúmenes 3D del complejo CtPeBoW-MBP, se superpusieron los modelos tridimensionales y los modelos atómicos de clase 1 de CtPeBoW y la clase promedio de ScPeBoW, que dieron los mejores ajustes en la envoltura de SAXS, obteniendo un volumen en la parte superior donde se situaría la MBP (**Figura 38**). Asimismo, se superpuso la estructura depositada de MBP con PDB ID: 1N3W en la protuberancia de cada volumen (**Figura 39**, color verde). De esta manera, tendríamos una vista general del modelo atómico del complejo completo en el volumen 3D. Cabe destacar que la superposición del modelo atómico completo del complejo de la clase promedio de ScPeBoW (**Figura 38**) y clase 1 de CtPeBoW (**Figura 72**, **ANEXO I**) encajan perfectamente en el volumen de la clase 2 de CtPeBoW-MBP y, en menor grado, en las otras clases (**Figuras 71 y 73**, **ANEXO I**).



**Figura 37. Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de CtPeBoW-MBP.** En la figura se muestran los tres mapas de densidad originados mediante una clasificación de las partículas sin alinear (3 clases, izquierda) y tres mapas mediante el procesamiento con partículas alineadas (3 clases, derecha). mics: micrografías; ptcls: partículas.



**Figura 38. Superposición de los modelos tridimensionales y los modelos atómicos de la clase promedio de ScPeBoW (A) y la clase 1 de CtPeBoW (B) en el volumen tridimensional de la clase 2 de CtPeBoW-MBP.** (A y B) El volumen 3D de la clase 2 de CtPeBoW-MBP se muestra en color naranja claro, la clase promedio de ScPeBoW en amarillo (A) y la clase 1 de CtPeBoW en celeste (B). Ambos volúmenes concuerdan con la densidad del modelo atómico del complejo CtPeBoW-MBP. Se observa una protuberancia en la parte superior donde se situaría la MBP. CtErb1 $\beta$ -propeller/ CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6ELZ).

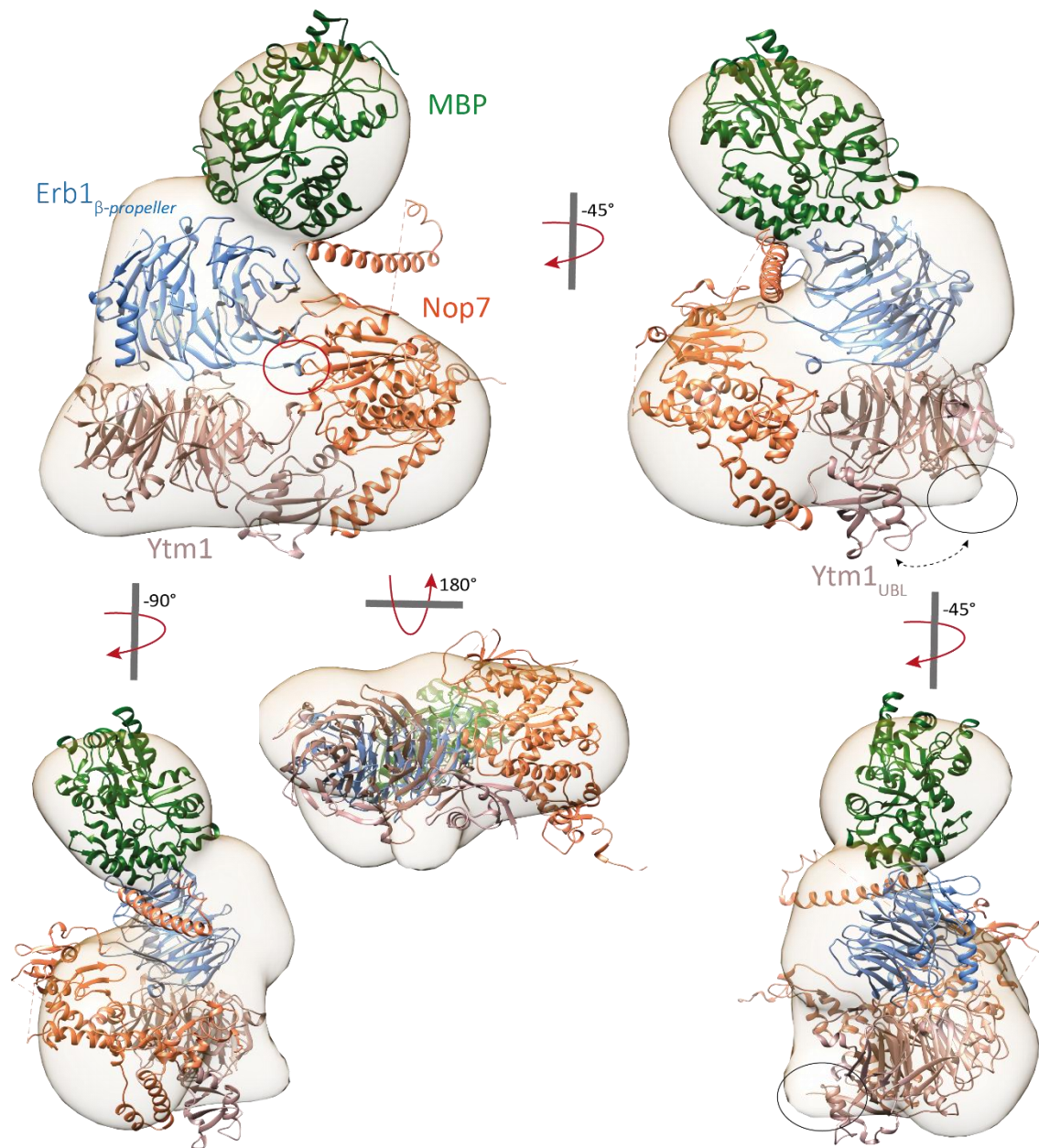
En nuestro modelo, los dominios  $\beta$ -propellers de CtErb1 y CtYtm1 se encuentran enfrentados a Nop7 señalando el inicio del  $\beta$ -propeller de Erb1 hacia ésta última. Además, esta conformación también sugiere que el extremo amino-terminal de Erb1 se sitúa en torno a Nop7 terminando en la posición de la MBP (**Figura 39**). En resumen, es posible que el complejo adquiera una conformación manteniendo ambos  $\beta$ -propellers unidos, siendo Erb1 el núcleo del complejo, y que el extremo N-terminal de Erb1 esté plegado en torno a Nop7 y termine en un lateral del dominio  $\beta$ -propeller de Erb1. Esta configuración del complejo parece mantenerse en todos los volúmenes tridimensionales obtenidos por tinción negativa o por SAXS (**Figuras 68, 69 y 70, ANEXO I**).

Por otra parte, los modelos obtenidos por tinción negativa sugieren una cierta flexibilidad en algunas regiones del complejo como el dominio UBL de Ytm1 [130] que, dependiendo del modelo, se encuentra dentro o fuera del mapa de densidad (**Figura 39**, círculo



negro). Igualmente, Nop7 presenta ciertas regiones que sobresalen del mapa, indicando que puede existir un cambio conformacional respecto a como se encuentra en el prerribosoma.

En conclusión, los resultados de tinción negativa sugieren que la conformación del complejo PeBoW en solución difiere de la configuración observada cuando forma parte de la partícula prerribosomal.



**Figura 39.** Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de *ScPeBoW* en el volumen 3D de la clase 2 de *CtPeBoW-MBP*. El círculo rojo representa el extremo del  $\beta$ -propeller de *CtErb1* orientado hacia *Nop7*. El círculo negro representa la densidad vacía del volumen 3D que podría ser ocupada por el dominio UBL de *CtYtm1*. *CtErb1* $_{\beta}$ -propeller / *CtYtm1* (PDB ID: 5CXB) y *ScNop7* (PDB ID: 6ELZ).

### 2.3. Estudio de las interacciones del complejo PeBoW mediante entrecruzamiento y análisis por cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas (LC-MS/MS)

Una aproximación para confirmar las interacciones entre las proteínas del complejo PeBoW fuera del contexto prerribosomal es mediante experimentos de entrecruzamiento y análisis por LC-MS/MS. Los experimentos de entrecruzamiento estabilizan interacciones entre proteínas mediante la formación de enlaces covalentes usando diferentes reactivos químicos como sulfo-SMPB, AMAS y BS<sup>3</sup> y, posteriormente, analizar los péptidos entrecruzados por LC-MS/MS.

Por tanto, la caracterización de la superficie de interacción del complejo PeBoW mediante entrecruzamiento nos permite dilucidar si el modo de interacción entre estas proteínas difiere al observado en el contexto prerribosomal así como la validación de las envolturas modelo propuestas mediante tinción negativa.

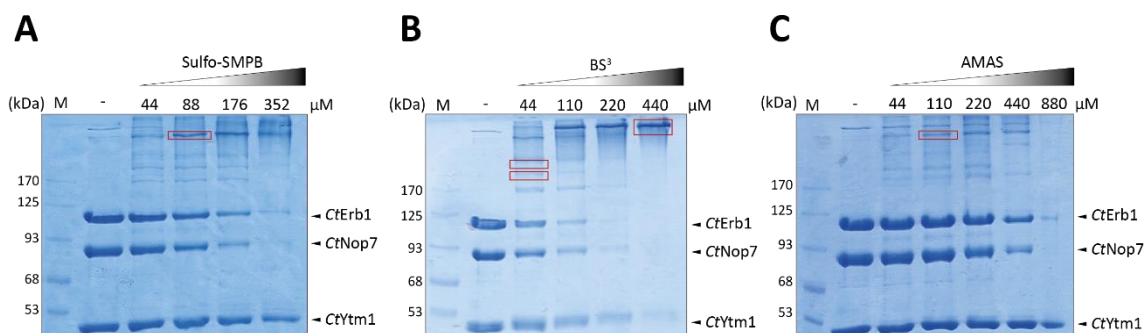
Para estudiar mejor las interacciones entre estas proteínas realizamos ensayos de entrecruzamiento con los reactivos sulfo-SMPB, BS<sup>3</sup> y AMAS y el complejo CtPeBoW. Se probaron diferentes condiciones con cada reactivo a diferentes tiempos de incubación y temperatura. Las mejores condiciones de entrecruzamiento están resumidas en la **Tabla 19**.

**Tabla 19. Mejores condiciones de entrecruzamiento de CtPeBoW con los entrecruzadores sulfo-SMPB, BS<sup>3</sup> y AMAS.** TA: temperatura ambiente.

Proteínas	Entrecruzador	Mejor condición de reacción
CtPeBoW	Sulfo-SMPB	16 h TA
	BS <sup>3</sup>	1 h TA
	AMAS	5 min TA

El entrecruzamiento del complejo ternario se realiza mezclando en proporción equimolar las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1, previamente purificadas, con concentraciones crecientes de los reactivos sulfo-SMPB, AMAS y BS<sup>3</sup> diluidos en el mismo tampón optimizando los tiempos de incubación (**Tabla 19**). Las reacciones en las diferentes condiciones se resolvieron en un gel SDS-PAGE y las bandas aparecidas con un tamaño superior al heterotrímero (225 kDa) se enviaron al Servicio de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (Burjassot, UV) para su análisis por LC-MS/MS (**Figura 40**). Se enviaron bandas de diferente tamaño para tener el mayor número posible de

entrecruzamientos. Los péptidos entrecruzados identificados mediante LC-MS/MS se encuentran resumidos en la **Tabla 20**.



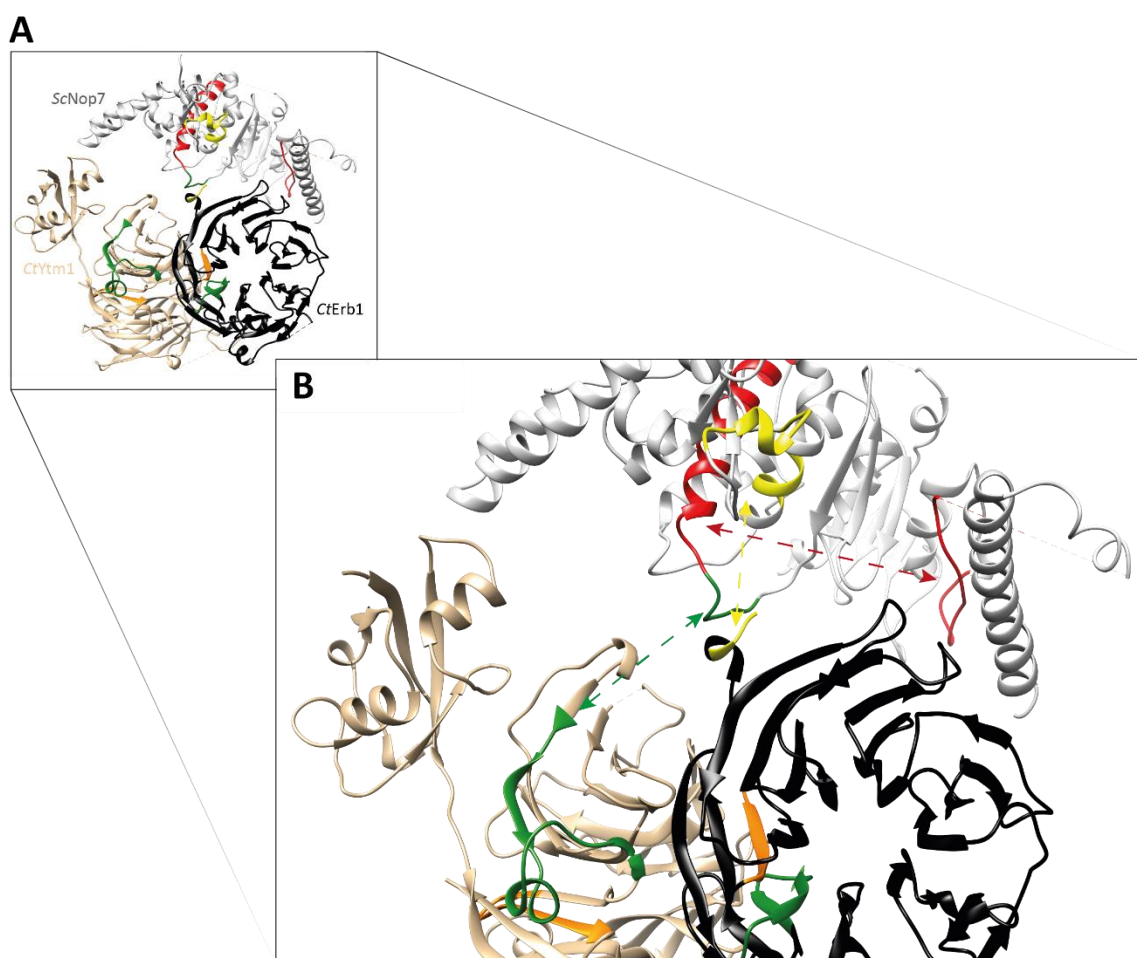
**Figura 40.** Ensayo químico de entrecruzamiento de los heterotrimeros *CtNop7/CtErb1/CtYtm1* en presencia de concentraciones crecientes de agente entrecruzante sulfo-SMPB (A),  $BS^3$  (B) y AMAS (C). Las bandas del gel SDS-PAGE marcadas en rojo se enviaron a analizar por LC-MS/MS.

Los resultados tras el análisis de los péptidos entrecruzados sugirieron que los péptidos 427-CmDLYLAPR-435 y 412-KVPAWGNFVK-421 de *CtErb1*, localizados justo antes del  $\beta$ -*propeller* (residuos 435-807), interactúan con los péptidos 136-TGKPR-140, 447-AAVSEGDGEDNQTSQKLPNGR-469, 214-GIYYQANIQGEDILWLVPYKFNQR-237 y 45-KLQLSLPDFR-54 de *CtNop7* (**Tabla 20**). Asimismo, se han identificado 4 péptidos entrecruzados entre *CtErb1* y *CtYtm1* producido entre sus dominios  $\beta$ -*propellers*. Sorprendentemente, también se ha identificado un péptido entrecruzado entre *CtNop7* y *CtYtm1*. Posteriormente, localizaron todos los péptidos entrecruzados en los modelos de la clase promedio de *ScPeBoW* y la clase 1 *CtPeBoW*, siendo mejor explicados por éste último (**Figura 41**).

Como se observa en la **Figura 41**, los péptidos entrecruzados entre los dominios  $\beta$ -*propellers* de *CtErb1* y *CtYtm1* se representan en color verde y naranja. Además, el péptido 435-SVRPATKEEGSLGGVSEPVYVIER-458 de *CtYtm1* también aparece entrecruzado con un lazo de *Nop7* (flecha verde punteada). Este resultado sugiere que, aunque puede que *Ytm1* y *Nop7* no estén interactuando en solución, el complejo sufra un cambio conformacional posicionándose dichas proteínas cerca en el complejo de forma nativa. Por otra parte, el péptido de *CtErb1* localizado en el extremo N-terminal, previo al  $\beta$ -*propeller*, (427-CmDLYLAPR-435, solo se han coloreado los residuos 433-435), se ha entrecruzado con dos hélices de *Nop7* (color amarillo). Sin embargo, no se ha identificado ningún péptido entrecruzado del extremo 1-412 de *CtErb1*.

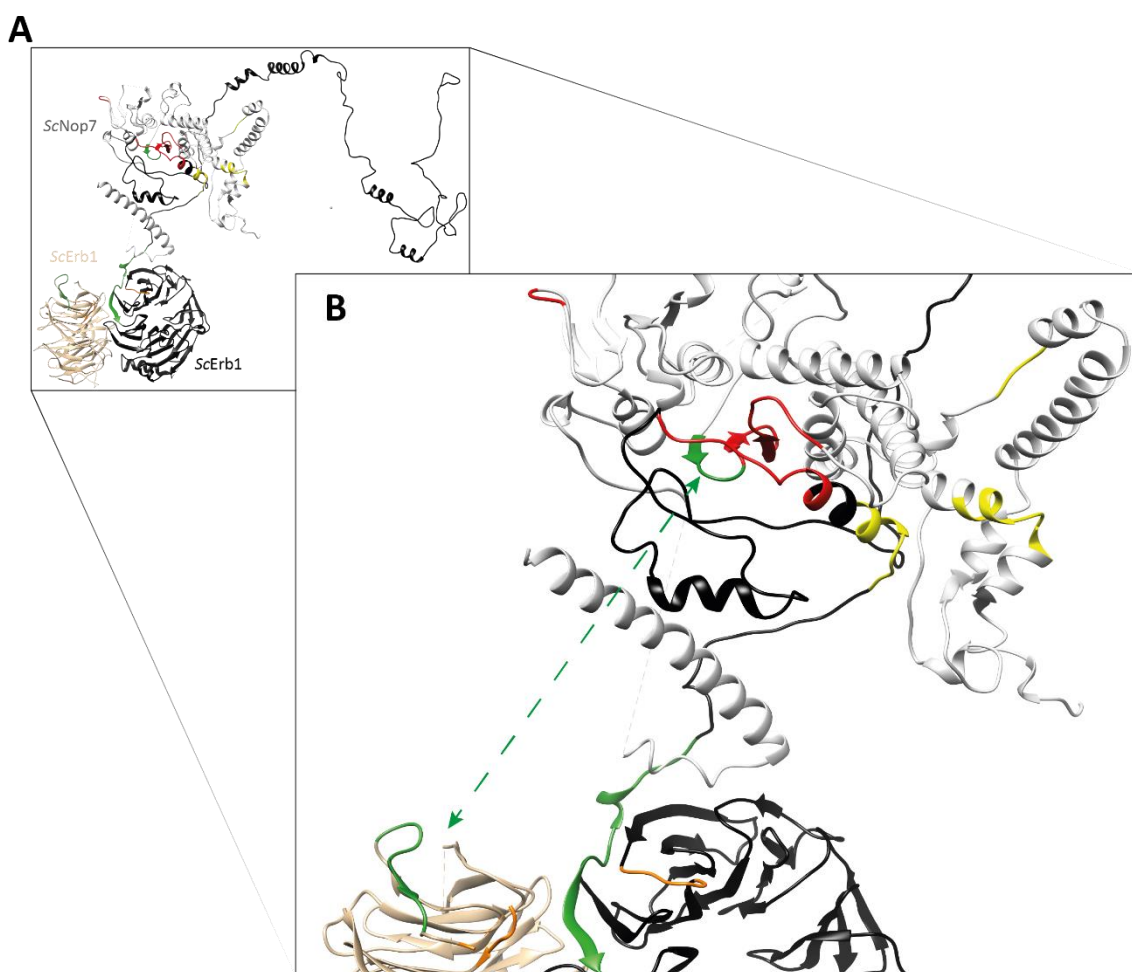
**Tabla 20. Péptidos identificados por LC-MS/MS del entrecruzamiento de CtPeBoW con BS<sup>3</sup>, AMAS y sulfo-SMPB.** Aas: aminoácidos, P1: péptido entrecruzado 1; P2: péptido entrecruzado 2.

Proteína 1	P1	Aas	Proteína 2	P2	Aas
CtErb1	[CmDLYLAPR]	427-435	CtNop7	[TGKPR]	136-140
CtErb1	[KVPAWGNFVK]	412-421	CtNop7	[AAVSEGDGEDNQTSQKLAPNGR]	447-469
CtErb1	[KVPAWGNFVK]	412-421	CtNop7	[GIYYQANIQGEDILWLVPYKFNQR]	214-237
CtErb1	[CmDLYLAPR]	427-435	CtNop7	[KLQLSLPDR]	45-54
CtErb1	[LPSPDELKPFPTVQQ TIFR]	452-470	CtYtm1	[SVRPATKEEGSLGGVSEPVYVIER]	435-458
CtErb1	[GHKVVNK]	787-793	CtYtm1	[KRPVAGDGBK]	468-477
CtNop7	[KSFLSIK]	207-213	CtYtm1	[SVRPATKEEGSLGGVSEPVYVIER]	435-458



**Figura 41. Representación de los péptidos entrecruzados en el modelo originado por tinción negativa de la clase 1 de CtPeBoW.** (A) Estructura terciaria del modelo de tinción negativa de la clase 1 de CtPeBoW con los péptidos entrecruzados seleccionados por colores. CtErb1 aparece en color negro, ScNop7 en gris y CtYtm1 en bronce. (B) Representación de los péptidos entrecruzados resultantes del análisis por LC-MS/MS. Los péptidos entrecruzados entre sí se muestran en los mismos colores.

Curiosamente, los péptidos de Nop7, coloreados en rojo, entrecruzan con el segmento 412- KVPAWGNFVK-421 de CtErb1, que no puede ser trazado en la estructura. Nuestros resultados sugieren que el extremo previo al  $\beta$ -*propeller*, (427-435), interaccionaría primero con los péptidos de Nop7 coloreados en amarillo y, posteriormente, con los coloreados en rojo (**Figura 41**). Considerando estos resultados y las superposiciones de los modelos de tinción negativa, suponemos que Nop7 adoptaría una conformación más plegada cuando forma parte del complejo ternario.



**Figura 42. Representación de los péptidos entrecruzados del heterotrímero ScErb1/ ScNop7/ ScYtm1 en la estructura con PDB ID: 6ELZ.** (A) Estructura terciaria de las proteínas Erb1, Nop7 e Ytm1 en el prerribosoma (PDB ID: 6ELZ). ScErb1 aparece en color negro, ScNop7 en gris y ScYtm1 en bronce. (B) Representación de los péptidos entrecruzados resultantes del análisis por LC-MS/MS. Los péptidos entrecruzados entre sí se muestran en los mismos colores.

Por otra parte, decidimos comprobar la localización de esos péptidos en la estructura publicada del complejo PeBoW de levaduras en el prerribosoma para reafirmar nuestra



hipótesis. Para ello, mediante alineamiento de secuencia obtuvimos los péptidos entrecruzados de *S.cerevisiae* y que se muestran en la **Figura 42**. En esta estructura, los péptidos entrecruzados de Erb1 con Nop7, en amarillo y en rojo, están muy próximos, al igual que lo hacían en la estructura del modelo de tinción negativa (**Figura 41**). Sin embargo, la diferencia más destacable entre ambas estructuras es la localización de los péptidos entrecruzados entre Ytm1 y Nop7 (flecha verde punteada) que se encuentran alejados. De nuevo, estos resultados sugieren que las proteínas del complejo, en especial Nop7, sufriría un reajuste conformacional junto con el extremo amino-terminal de Erb1 encontrándose más próxima al heterodímero Erb1/Ytm1 cuando está en solución.

### 3. Identificación de proteínas que interaccionan con las proteínas del complejo PeBoW

Durante la maduración de la subunidad 60S, las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1, además, establecen contactos con otros factores de ensamblaje ribosomales que actúan en estadios diferentes de la maduración ribosomal [25]. Las proteínas que interaccionan, recogidas en la base de datos Uniprot (**Figura 43**), han sido identificadas mediante experimentos de doble híbrido, coimmunoprecipitación o purificación por afinidad en tándem (TAP). Entre las proteínas que interaccionan con Erb1 se encuentran los factores Drs1 y Noc2 que no aparecen en las estructuras ribosomales publicadas desconociéndose su estructura y el papel que desempeñan en la biogénesis ribosomal.

	Erb1	Noc2	Ytm1	Has1	Drs1	Nop7	Nog1
Erb1							
Noc2							
Ytm1							
Has1							
Drs1							
Nop7							
Nog1							

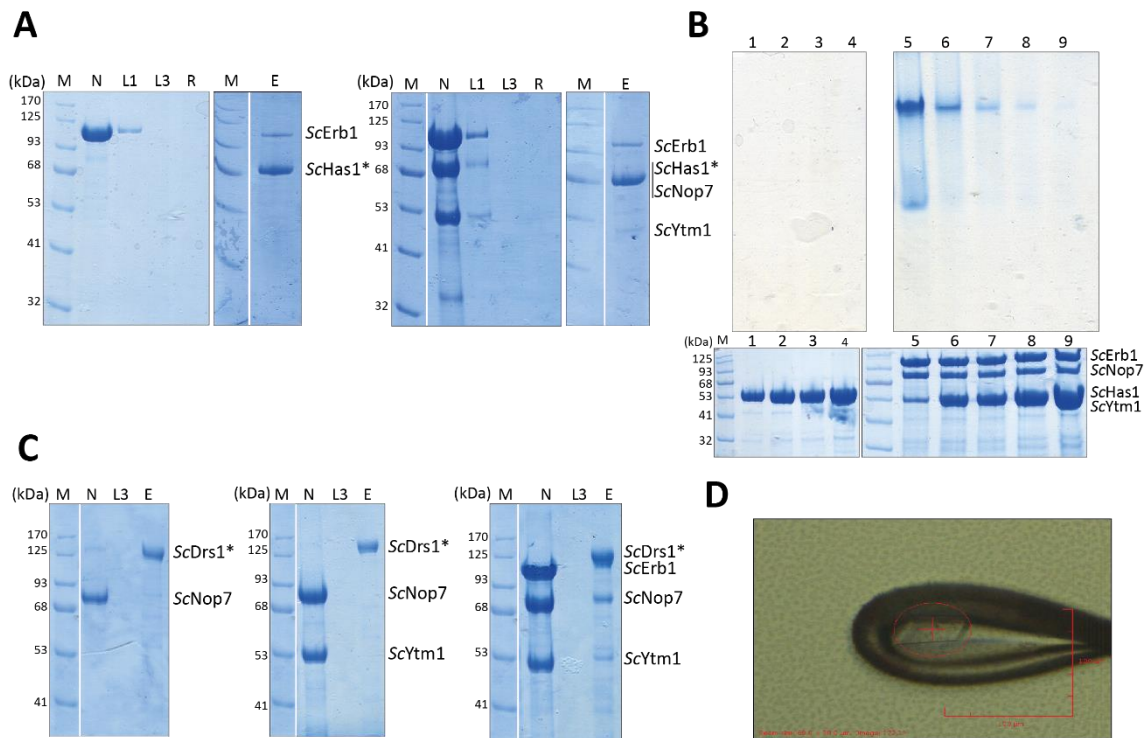
**Figura 43. Proteínas que interaccionan con Erb1 descritas en la base de datos Uniprot.** Se representan las interacciones usando una escala de colores en la que el color azul oscuro indica que existen de 8-12 experimentos que prueban esta interacción, azul medio entre 2-5 experimentos, y en blanco no existen experimentos de interacción. Tabla adaptada de la base de datos Uniprot.

Para determinar la interacción entre estas proteínas y los componentes del complejo PeBoW se realizaron ensayos de precipitación, electroforesis en condiciones nativas y BLI.

En primer lugar, se expresaron y purificaron las proteínas Has1, Drs1 y Noc2 de levadura y Drs1 de *C. thermophilum* y se realizaron los ensayos nombrados anteriormente con las proteínas Erb1, Nop7 e Ytm1 aisladas y en complejo (**Figura 44**).

Respecto a la helicasa de ARN dependiente de ATP Has1, se ha descrito que interacciona con Erb1 a través de su extremo N-terminal en los primeros estadios de biogénesis ribosomal [22]. Para confirmar dicha interacción con el complejo, se realizaron ensayos de precipitación de GST-ScHas1, retenida en resina de glutatión, incubándose con concentraciones equimolares de ScErb1 y ScPeBoW (**Figura 44A**). Sin embargo, los resultados sugieren que Has1 interacciona con Erb1 de forma débil o transitoria ya que en la etapa final de elución aparece una tenue banda de Erb1. Posteriormente, para apoyar dicha interacción, se realizó una electroforesis en condiciones nativas incubando el complejo PeBoW con concentraciones crecientes de Has1 (**Figura 44B**). La proteína Has1, con un  $pI$  teórico de 9,38, no es capaz de penetrar en el gel en condiciones nativas a diferencia del complejo PeBoW aislado. Sin embargo, en presencia de Has1, disminuye la movilidad del complejo impidiendo su entrada en el gel cuando la concentración de Has1 aumenta progresivamente. Estos resultados apoyan la existencia de una interacción entre Has1 y Erb1. No obstante, no se ha podido establecer una constante de afinidad entre estas proteínas mediante BLI (datos no mostrados). Este hecho puede sugerir que Has1 requiera la presencia de ATP o ARN para establecer su unión con Erb1.

Respecto a la helicasa Drs1, tras su clonación y posterior expresión y purificación, se realizaron ensayos de precipitación con el complejo PeBoW y con Nop7 e Ytm1 aisladas (**Figura 44C**). Los ensayos se realizaron con la construcción GST-ScDrs1 y se siguió el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Nuestros resultados sugieren que Drs1 no interacciona ni con Nop7 ni Ytm1 al no coeluir en la etapa final en los ensayos de precipitación. Este resultado es contrario a lo que sugiere la literatura donde se ha descrito que su ortólogo en mamíferos (Ddx27) puede interactuar con Pes1 (Nop7 en mamíferos) [141]. Sin embargo, la aparición de Nop7 e Ytm1 en el paso final de elución, se debería a la interacción de Drs1 a través de Erb1 cuando se incubaba con el complejo completo (**Figura 44C**).



**Figura 44. Identificación de proteínas que interaccionan con el complejo PeBoW.** (A) Ensayo de precipitación de ScErb1, ScNop7 y ScYtm1 con ScHas1. En el gel SDS-PAGE se muestra que GST-ScHas1 copurifica con 6xHis-ScErb1, pero no con 6xHis-ScNop7 ni 6xHis-ScYtm1. (B) Electroforesis en condiciones nativas (arriba) y SDS-PAGE (abajo) de ScHas1 y el complejo ScPeBoW. 15  $\mu$ g de complejo incubado con concentraciones crecientes de ScHas1. 1-4: ScHas1; 5: ScPeBoW; 6-9: ScPeBoW + ScHas1 (ratio molar 1:1; 1:2; 1:3 y 1:4, respectivamente). (C) Ensayos de precipitación de ScErb1, ScNop7 y ScYtm1 con ScDrs1. El ensayo muestra que GST-ScDrs1 copurifica con 6xHis-ScErb1. (D) Cristal de CtDrs1 usado en la difracción. M: Marcador de pesos moleculares; N: no retenido; L1: 1<sup>o</sup> lavado; L3: 3<sup>er</sup> lavado; R: resina; E: elución; (\*) Proteína con etiqueta GST que interacciona específicamente con resina de glutatión.

Por otra parte, se conoce que Ddx27 es indispensable para la maduración del extremo 3' del pre-ARNr 27S [141]. En colaboración con el Dr. John Woolford (Carnegie Mellon University, Pittsburgh) quisimos estudiar la estructura y bioquímica de este factor de ensamblaje con el fin de comprender mejor su papel en las etapas iniciales del proceso de maduración ribosomal ya que se desconoce de forma detallada su función y conformación. Por todo ello, decidimos intentar cristalizarla. Los primeros cristales de Drs1 de *C. thermophilum* se obtuvieron en la condición 12% PEG 4.000, 100 mM Hepes pH 7,5 y 100 mM de acetato de sodio (**Figura 44D**). Los cristales fueron difractados en el sincrotrón ALBA (Barcelona) recogiendo datos a una resolución de 1,58 Å y con grupo espacial I2. Sin embargo, debido a la falta de modelo estructural no se pudo realizar el reemplazo molecular de forma satisfactoria. De modo que planeamos en el futuro purificar la proteína derivatizada con selenio-metionina y cristalizarla con las condiciones optimizadas de modo que obtengamos las fases para su resolución estructural.



Respecto a la proteína Noc2, no se ha conseguido observar interacción entre Noc2 con Erb1 ni Noc2 con Nop7 por BLI (datos no mostrados). Por otra parte, se continúa en la mejora de la expresión de Nog1 de levadura.

### **3.1. Identificación de posibles interacciones de las proteínas Nop7 e Ytm1 mediante purificación por afinidad en tándem (TAP)**

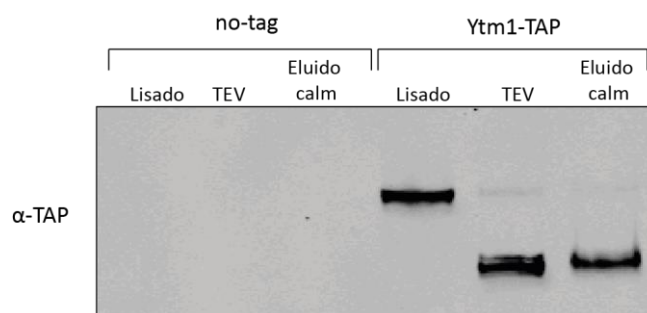
Para confirmar las interacciones descritas en el apartado anterior y determinar otras nuevas que pudieran estar ocurriendo de forma independiente a la biogénesis ribosomal, decidimos realizar ensayos de purificación por afinidad en tándem (TAP) de Ytm1 y Nop7.

En este sentido, para entender mejor las interacciones de las proteínas Nop7 e Ytm1 usamos la técnica TAP TAG para purificar los complejos/proteínas que interaccionan con nuestra proteína de interés sometiendo a las muestras a una ultracentrifugación a 180.000 x g para precipitar los grandes complejos ribosomales (60S y 40S) y analizar los posibles interacciones mediante LC-MS/MS. Además, mediante este análisis peptídico se podrían inferir otras funciones que pudieran ejercer estas proteínas. Para ello, hemos trabajado con tres cepas de *S. cerevisiae* transformadas con Nop7-TAP, Ytm1-TAP y una cepa no-tag o cepa silvestre con las proteínas Nop7 e Ytm1 sin etiquetar.

#### **3.1.1. Interacciones de Ytm1 identificados por TAP TAG**

Como hemos comentado previamente, Ytm1 es una proteína de localización nucleolar que forma el complejo estable PeBoW. La función mejor caracterizada de Ytm1 es su participación en la biogénesis de la subunidad mayor ribosomal a través de la unión de su dominio  $\beta$ -*propeller* con Erb1. Sin embargo, también se han descrito otras funciones celulares que podría tener Ytm1 independientes del contexto prerribosomal. De hecho, Ytm1 fue descrita por primera vez como una proteína de unión a microtúbulos [159]. Según la información encontrada en la base de datos BioGRID (<https://thebiogrid.org/>), Ytm1 presenta 82 interacciones físicas y 150 interacciones genéticas, la mayoría de ellas relacionadas con biogénesis ribosomal.

Los cultivos de levaduras con Ytm1-TAP, se purificaron mediante TAP TAG y se confirmó la presencia de Ytm1 por WB (**Figura 45**). Las proteínas que co-purificaron con Ytm1 se identificaron por análisis LS-MS/MS y se recogen en las **Tablas 21 y 22**.



**Figura 45. Purificación de cepas Ytm1-TAP y silvestre.** La presencia de Ytm1 fue confirmada mediante WB con anticuerpos anti-TAP durante los tres pasos de purificación: lisado (antes de la purificación), eluido TEV (después de la primera purificación) y eluido calmodulina (segundo paso de purificación). no-tag: cepa silvestre.

**Tabla 21. Análisis de las posibles interacciones relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Ytm1-TAP por LC-MS/MS.** La tabla contiene el nombre de las proteínas, estadio de participación de la biogénesis LSU, función y el número de cobertura (95%) de cada péptido que refleja el porcentaje de aminoácidos coincidentes de los péptidos identificados con una confianza mayor o igual a 95% dividido entre el número total de aminoácidos en la muestra.

Proteína – Estadio de biogénesis LSU	% Cobertura (95)	Función
Ytm1 - F. nucleolares intermedios	51,96	Estructural
Has1 - F. nucleolares intermedios	55,84	Dead-box helicasa
Nsa2 - F. nucleolares tardíos y nucleares	46,7	Estructural
Nug1 - F. nucleolares tardíos y nucleares	43,65	GTPasa
Loc1 - F. nucleolares tempranos	41,67	Estructural
Nog1 - F. nucleolares tardíos y nucleares	41,26	GTPasa
Erb1 - F. nucleolares intermedios	40,19	Estructural
Cic1 - F. nucleolares intermedios	39,89	Estructural
Drs1 - F. nucleolares tempranos	38,02	Dead-box helicasa
Nop2 - F. nucleolares intermedios	37,86	Metilasa ARNr
Mrt4 - F. nucleolares tardíos y nucleares	37,29	Estructural
Brx1 - F. nucleolares intermedios	35,74	Estructural
Nip7 - F. nucleolares intermedios	35,35	Estructural
Nsa1 - F. nucleolares intermedios	32,17	Estructural
Spb4 - F. nucleolares intermedios	31,8	Dead-box helicasa
Mak16 - F. nucleolares intermedios	29,7	Estructural
Spb1 - F. nucleolares intermedios	29,01	Metilasa ARNr
Nop16 - F. nucleolares intermedios	26,41	Estructural
Nop7 - F. nucleolares intermedios	25,79	Estructural
Dbp10 - F. nucleolares tempranos	25,63	Dead-box helicasa

A pesar de la ultracentrifugación, es frecuente la aparición de algunas proteínas ribosomales debido a su capacidad de interacción inespecífica con la resina (datos no mostrados). Las proteínas relacionadas con ribosomas que aparecen con una frecuencia mayor

en el TAP TAG de Ytm1, realizado por duplicado, se muestran en la **Tabla 21**. Además, todas ellas aparecen también en el análisis de BioGRID excepto Mak16 y Spb1. Sin embargo, se han identificado otras proteínas que participan en otros estadios de la biogénesis ribosomal diferentes de los estadios intermedios donde participa Ytm1. Los resultados confirman que Ytm1 co-purifica con factores de ensamblaje tempranos, intermedios, tardíos e incluso nucleares con funciones diversas: función estructural, helicasas, metilasas de ARNr y GTPasas (**Tabla 21**). Además, como se esperaba, los componentes del complejo PeBoW, Erb1 y Nop7, aparecían en alta proporción en el análisis peptídico.

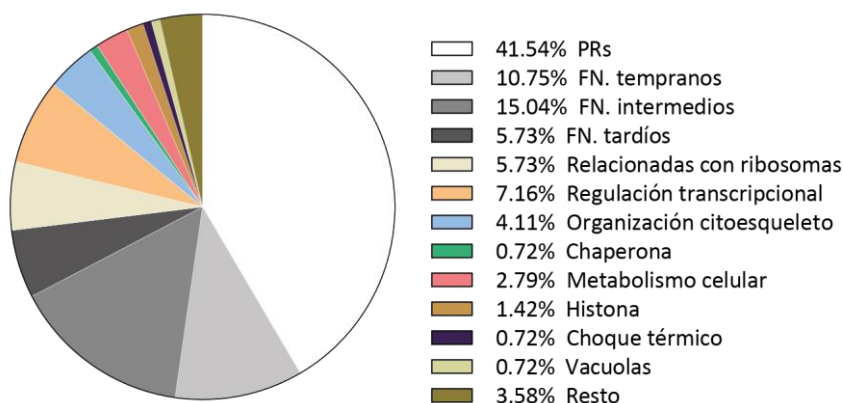
También se identificaron otras proteínas no relacionadas con biogénesis ribosomal que podrían asociar a Ytm1 con otras funciones celulares (**Figura 46, Tabla 22**). De hecho, en el análisis de la mezcla de péptidos de la purificación aparecen proteínas relacionadas con la regulación transcripcional y transporte del ARNm y ARNr. Por ejemplo el factor de iniciación I4, Ded1, Hmo1, Gar1 y snoRNP Nop1 (fibrilarina en vertebrados). También se ha identificado un componente del complejo TREX (Yra1p) y la proteína de unión a poliadenilato (Pab1p). Además, se han determinado varios componentes del complejo SAGA, involucrado en la regulación transcripcional dependiente de la ARN pol II, como Taf5, Taf6 y Taf9. De hecho, la interacción de Ytm1 con Taf6 también se recoge en la base de datos de BioGRID.

Además, nuestros resultados muestran que Ytm1 co-purifica con componentes del complejo de remodelación de la estructura de la cromatina (RSC) como Sfh1p, Sth1p y Rsc8p, estando ésta última también descrita en la base de datos de BioGRID. Estas proteínas están involucradas en la regulación de la transcripción y posición del nucleosoma y son importantes para la correcta función del cinetocoro en la segregación cromosómica y la organización del citoesqueleto. Asimismo, se han identificado péptidos de las proteínas Slm1 que participa en la organización del citoesqueleto y regulación del ciclo celular y péptidos de la cadena  $\beta$  de tubulina que es el mayor componente de los microtúbulos. Estos resultados indican que Ytm1 podría participar en la remodelación de la cromatina, organización del citoesqueleto y proliferación celular, coincidiendo con la primera función descrita de Ytm1 como proteína de unión a microtúbulos [159].

También han aparecido otras proteínas con funciones diversas: proteínas de choque térmico (Ssa1p), chaperonas (FKBP), histonas (H3, H4), metabolismo celular (Och1p, ADH1), acidificación de vacuolas (ATPsa vacuolar tipo V), biosíntesis de nucleótidos (Ura2) y ciclo de Krebs (IDH2).

**Tabla 22. Análisis de las posibles interacciones no relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Ytm1-TAP por LC-MS/MS.** La tabla contiene el nombre de las proteínas, función y el número de cobertura (95%) de cada péptido que refleja el porcentaje de aminoácidos coincidentes de los péptidos identificados con una confianza mayor o igual a 95% dividido entre el número total de aminoácidos en la muestra.

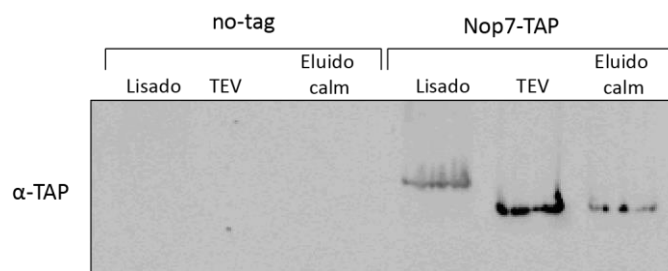
Proteína	% Cobertura (95)	Proteína	% Cobertura (95)
eIF4A	6,58	Ura2	1,53
Ded1	4,30	H3	5,14
Hmo1	4,88	H4	33,09
Taf5	1,5	V-ATPasa	2,9
Gar1	6,34	IDH2	2,98
Taf6	1,94	ADH1	12,07
Taf9	6,37	Och1p	22,9
Nop1	18,35	FKBP	27,55
Yra1p	22,57	Rsc8p	1,98
Pabp	3,64	Ssa1p	16,36
SLM1	4,66	STH1/NPS1	0,81
Sfh1p	3,05	Cadena β tubulina	9,41
Hms2p	3,35		



**Figura 46. Representación en círculo de las funciones de las proteínas identificadas en el TAP TAG de Ytm1.** PRs: proteínas ribosomales; FN: factores nucleolares.

### 3.1.2. Interacciones de Nop7 identificados por TAP TAG

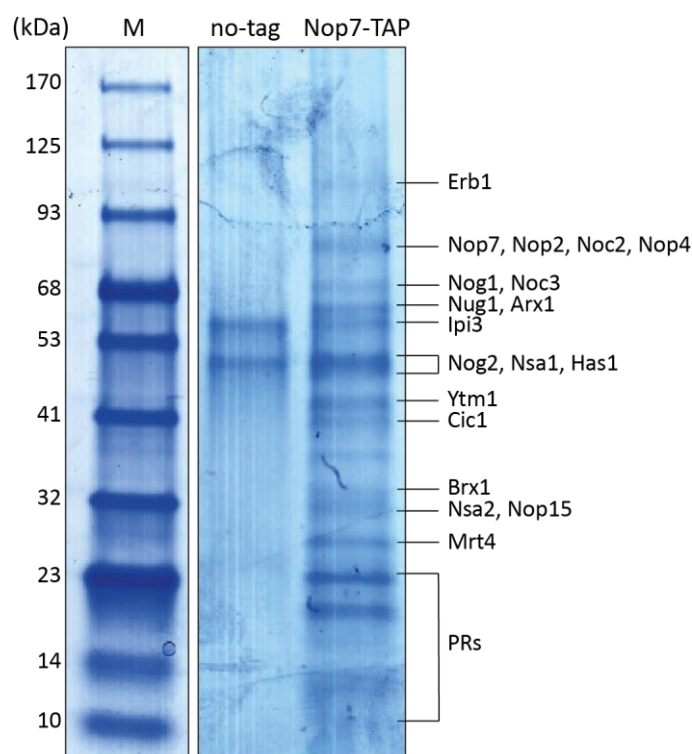
Nop7 se caracterizó por primera vez como una proteína esencial para la embriogénesis. Para poder clarificar otras funciones que tendría Nop7 fuera del contexto prerribosomal, se realizó una purificación TAP TAG. La presencia de Nop7, identificada por WB en los tres pasos de la purificación, confirma el éxito de la técnica TAP TAG (**Figura 47**).



**Figura 47. Purificación de cepas Nop7-TAP y silvestre.** La presencia de Nop7 fue confirmada por WB frente anticuerpos anti-TAP durante los tres pasos de purificación: lisado (antes de la purificación), eluido TEV (después de la primera purificación) y eluido calmodulina (segundo paso de purificación). no tag: cepa silvestre.

**Tabla 23. Análisis de las posibles interacciones relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Nop7-TAP por LC-MS/MS.** La tabla contiene el nombre de las proteínas, estadio de participación de la biogénesis LSU, función y el número de cobertura (95%) de cada péptido que refleja el porcentaje de aminoácidos coincidentes de los péptidos identificados con una confianza mayor o igual a 95% dividido entre el número total de aminoácidos en la muestra.

Proteína – Estadio de biogénesis LSU	% Cobertura (95)	Función
Ytm1 - F. nucleolares intermedios	80	Estructural
Nsa1 - F. nucleolares intermedios	72,14	Estructural
Cic1 - F. nucleolares intermedios	72,07	Estructural
Bud20 - F. nucleolares tardíos y nucleares	71,7	Estructural
Brx1 - F. nucleolares intermedios	68,04	Estructural
Nug1 - F. nucleolares tardíos y nucleares	63,85	GTPasa
Nog2 - F. nucleolares tardíos y nucleares	62,96	GTPasa
Nip7 - F. nucleolares intermedios	62,43	Estructural
Has1 - F. nucleolares intermedios	60,40	Dead-box helicasa
Mrt4 - F. nucleolares tardíos y nucleares	58,90	Estructural
Nop7 - F. nucleolares intermedios	58,35	Estructural
Nsa2 - F. nucleolares tardíos y nucleares	54,41	Estructural
Nog1 - F. nucleolares tardíos y nucleares	53,48	GTPasa
Erb1 - F. nucleolares intermedios	52,91	Estructural
Nop2 - F. nucleolares intermedios	52,1	Metilasa ARNr
Arx1 - F. nucleolares tardíos y nucleares	50,25	Estructural
Ipi3 - F. nucleolares tardíos y nucleares	43,95	Estructural
Rsa4 - F. nucleolares tardíos y nucleares	42,91	Estructural
Noc3 - F. nucleolares intermedios	42,37	Estructural
Nop15 - F. nucleolares intermedios	40,45	Estructural



**Figura 48. Identificación de las bandas de proteínas del eluido de calmodulina de la purificación de Nop7-TAP.** Los eluidos de calmodulina de las purificaciones TAP (cepas Nop7-TAP y no-tag) se resolvieron en un gel de poliacrilamida en gradiente (4-15%) teñido con coomassie coloidal.

Una parte de la elución final, se precipitó con TCA y se analizaron las proteínas identificadas por LC-MS/MS (**Tablas 23 y 24**). Además, se sometió al resto del eluido a una electroforesis en un gel de acrilamida en gradiente (4-15%). En el gel se observa el patrón de bandas correspondiente a la muestra Nop7-TAP comparada con la cepa silvestre (**Figura 48**), identificándose proteínas que concuerdan con el primer análisis por LC-MS/MS (**Tabla 23**). A pesar de que Nop7 es un factor de ensamblaje temprano, se han identificado factores intermedios y tardíos de la biogénesis ribosomal. Además, al igual que en el TAP TAG de Ytm1, los péptidos de las proteínas del complejo PeBoW han sido identificados en alta proporción.

Los resultados por espectrometría de masas también confirman que Nop7 co-purifica con otras proteínas no relacionadas con la biogénesis ribosomal, aparecidas en menor abundancia en el análisis por LC-MS/MS (**Tabla 24**). Se han identificado proteínas relacionadas con regulación meiótica, plegamiento de proteínas y crecimiento como ciclofilina A, Wtm1p, BMH2p, caseína quinasa II. Esto podría explicar la relación de Nop7 con la función ya descrita de su participación en el desarrollo embriogénico [143].

Además, se han identificado proteínas relacionadas con regulación transcripcional: chaperonas (La), FKBP3 y FKBP4, Rcm1 y Bmt5. Al igual que Ytm1, también co-purifica con snoRNP Nop1.

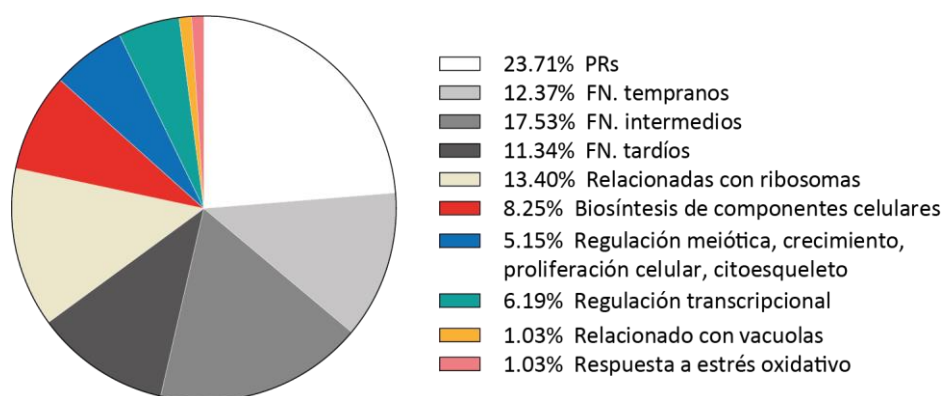
Asimismo, han aparecido otras en menor abundancia relacionadas con acidificación de vacuolas (ATPasa vacuolar tipo V), estrés oxidativo (tioredoxina reductasa 1) y ciclo del ácido cítrico (isocitrato deshidrogenasa).

Otras proteínas identificadas participan en biosíntesis de componentes celulares y metabolismo celular como IMD3, AICA, acetil-CoA acetiltransferasa, adenosina quinasa, glutamato deshidrogenasa 1 específica de NADP, Cbf5p, DAHP sintasa y Bat1p. Ésta última también está implicada en la regulación de la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, relacionando a Nop7 con proliferación celular, función que también ha sido descrita anteriormente [149].

**Tabla 24. Análisis de las posibles interacciones no relacionadas con biogénesis ribosomal de la purificación de Nop7-TAP por LC-MS/MS.** La tabla contiene el nombre de las proteínas, función y el número de cobertura (95%) de cada péptido que refleja el porcentaje de aminoácidos coincidentes de los péptidos identificados con una confianza mayor o igual a 95% dividido entre el número total de aminoácidos en la muestra.

Proteína	% Cobertura (95)	Proteína	% Cobertura (95)
AICAR	17,57	BMH2	12,09
IMD3	22,37	Subunidad Beta caseína quinasa II	3,60
Adenosin quinasa	8,53	Proteína La	28
Cbf5p	7,039	Nop1	26,61
Bat1p	6,11	V-ATPasa	22,81
DAHP sintasa	7,57	FKBP4	22,45
Glutamato deshidrogenasa 1 específica de NADP	8,15	FKBP3	18,49
Acetil-CoA acetiltransferasa	16,25	Tioredoxina reductasa 1	16,61
Ciclofilina A	35,19	Rcm1	13,27
Wtm1p	18,31	Bmt5	12,20

En la **Figura 49** se han agrupado las funciones celulares de todas las proteínas identificadas por LC-MS/MS. Aproximadamente un 8% están relacionadas con biosíntesis de componentes celulares, un 6% con regulación transcripcional y un 5% con regulación meiótica, organización del citoesqueleto y proliferación celular.



**Figura 49.** Representación en círculo de las funciones de las proteínas identificadas en el TAP TAG de Nop7. PRs: proteínas ribosomales; FN: factores nucleolares.

En la purificación de Nop7-TAP aparecieron enriquecidas las proteínas del subcomplejo Rix1 (Rix1, Ipi1 e Ipi3) y la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1 (**Tabla 25**). Estas proteínas de ensamblaje ribosomal no han sido relacionadas con el complejo PeBoW anteriormente ya que actúan en la fase tardía del desarrollo de la subunidad 60S. A pesar de la abundancia de estas proteínas en el TAP de Nop7 (**Tabla 25**), en las bases de datos consultadas aparecen pocos experimentos que describan la interacción de Nop7 con Ipi1 e Ipi3.

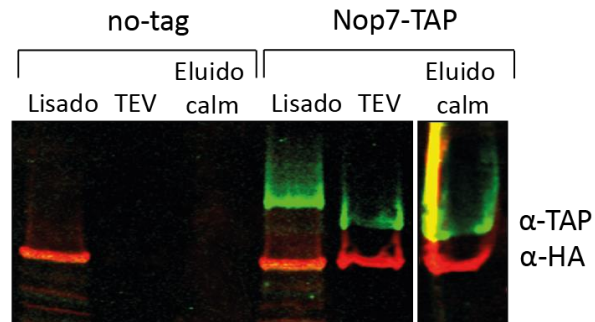
**Tabla 25.** % Cobertura (95) de la aparición de los componentes del subcomplejo Rix1 (Rix, Ipi3, Ipi1) y la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1 en el TAP TAG de Nop7.

Proteína	% Cobertura (95)
Rix1	27,92
Rea1	10,81
Ipi3	43,96
Ipi1	31,74

Para confirmar la interacción de Nop7 con algunos componentes del subcomplejo Rix1, se decidió transformar la cepa de levadura que expresaba Nop7-TAP con una construcción de la secuencia 3HA- Ipi3, dado que Ipi3 es la más abundante en nuestros análisis por LC-MS/MS. Tras purificar Nop7-TAP, se incubó con anticuerpos anti-HA para la proteína Ipi3 y con anticuerpos anti-TAP para Nop7-TAP (**Figura 50**). La cepa silvestre de *S. cerevisiae* se usó como control negativo. La aparición de la doble banda en el eluido de la purificación TAP muestra la copurificación de Nop7-TAP con Ipi3-HA, sugiriendo que existe una interacción entre ambas



proteínas en la célula. Dicha interacción no ha sido descrita anteriormente y sería necesario corroborarlo con otros ensayos complementarios.



**Figura 50. Co-purificación de Nop7-TAP e Ipi3-HA.** La presencia de Ipi3 fue confirmada por WB con anticuerpos anti-HA (color rojo) y la presencia de Nop7 con anticuerpos anti-TAP (color verde) durante los tres pasos de purificación: lisado (antes de la purificación), eluido TEV (después de la primera purificación) y eluido calmodulina (segundo paso de purificación).



## **IV. RESULTADOS**

### **PARTE II**

Péptidos sintéticos dirigidos a la interacción entre Erb1 e Ytm1 y caracterización del efecto de péptidos penetrantes incubados con células humanas de carcinoma de colon



## 1. Análisis de la superficie de interacción del complejo Erb1/Ytm1

### 1.1 Escaneo de alaninas *in silico*

La estructura cristalográfica de Erb1/Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* resuelta por nuestro grupo [130] muestra que la cara superior del dominio  $\beta$ -propeller de CtYtm1 establece un gran número de contactos con la cara lateral del  $\beta$ -propeller del C-terminal de CtErb1 con un predominante papel del motivo estructural número 7 (**Figura 14**). La parte central del  $\beta$ -propeller de CtYtm1 proporciona una gran superficie de acoplamiento para la cara inferior de los motivos número 1, 2 y 7 de CtErb1 que es adicionalmente mantenida por dos extensiones laterales de CtYtm1 (**Figura 14**). El dominio tipo ubiquitina del extremo N-terminal de CtYtm1 no participa en la interacción. El heterodímero CtErb1/CtYtm1 está principalmente mantenido por fuerzas electrostáticas con la participación de algunas interacciones hidrofóbicas (**Figura 51**). Realizamos un análisis con el servidor PISA (Instituto de Bioinformática Europeo; Krissinel and Henrick, 2007) que mostró la existencia de 18 puentes de hidrógeno y 11 puentes salinos en la interfaz entre ambas proteínas.

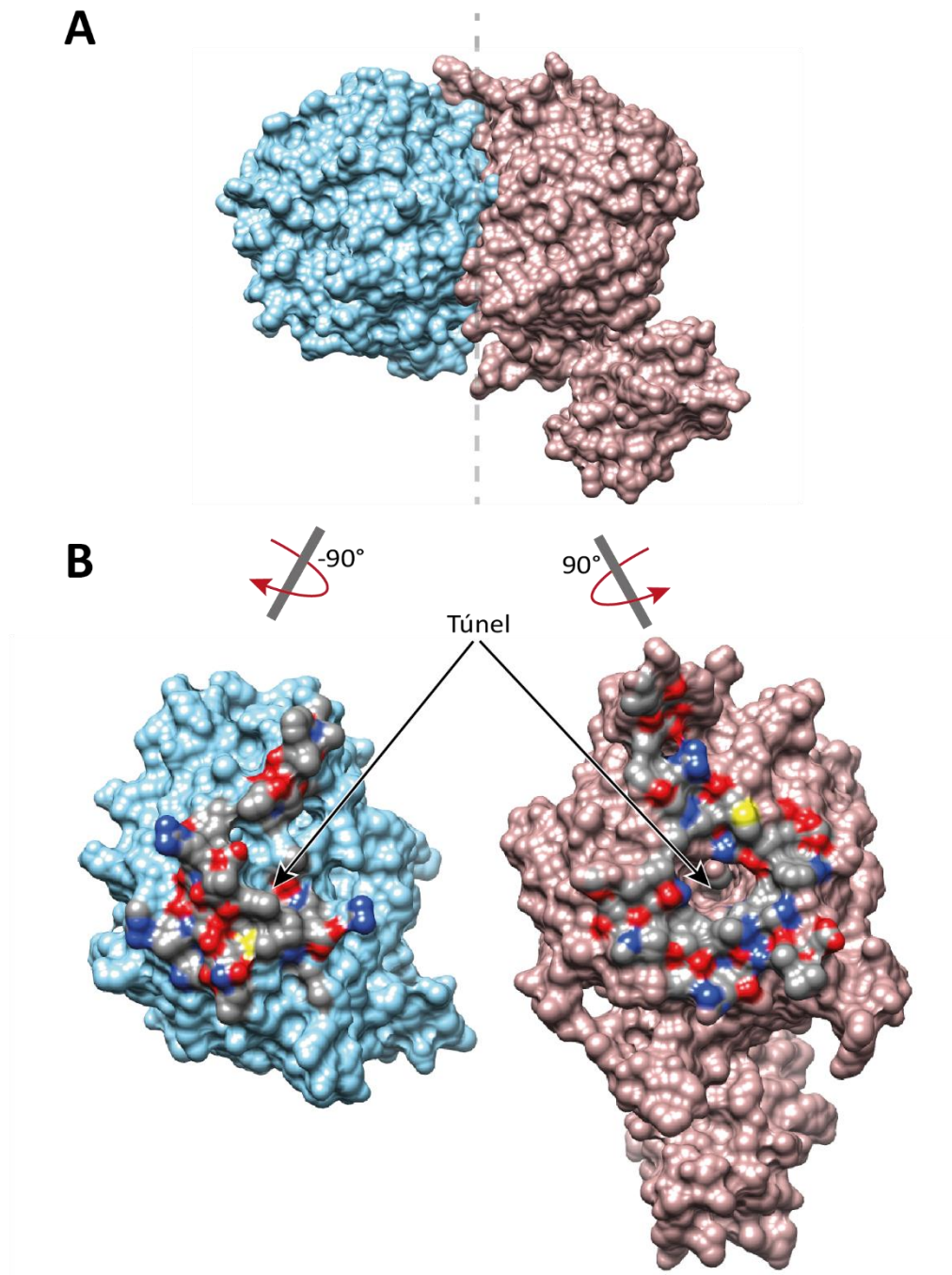
Por otro lado, se llevó a cabo un escaneo de alaninas *in silico* (apartado 6.6 en mat. y met.) de los residuos localizados en la superficie de interacción de ambas proteínas para así detectar residuos clave (*hotspots*) en la formación del heterodímero mediante el servidor DrugScore<sup>PPI</sup> [255]. Los valores de  $\Delta G$  y de profundidad de los residuos involucrados en la interacción de CtErb1 y CtYtm1 tras el cambio por alaninas *in silico* se muestran en la **Tabla 26**.

Los residuos de CtErb1 con una  $\Delta G > 0,5$  kcal/mol en el análisis de escaneo de alaninas *in silico* (**Tabla 26**, asterisco), se encuentran en las áreas de interacción de CtErb1/CtYtm1. Los residuos E481, L483 y R486 de CtErb1 se encuentran en el lazo situado entre las hebras 1c-2d, segunda área de interacción. Los residuos I448 y R450 en la lámina 1d del motivo 7, primera área, y los residuos R784 y E785 también formando parte del motivo estructural 7 (**Figuras 52A y 53, Tabla 26**).

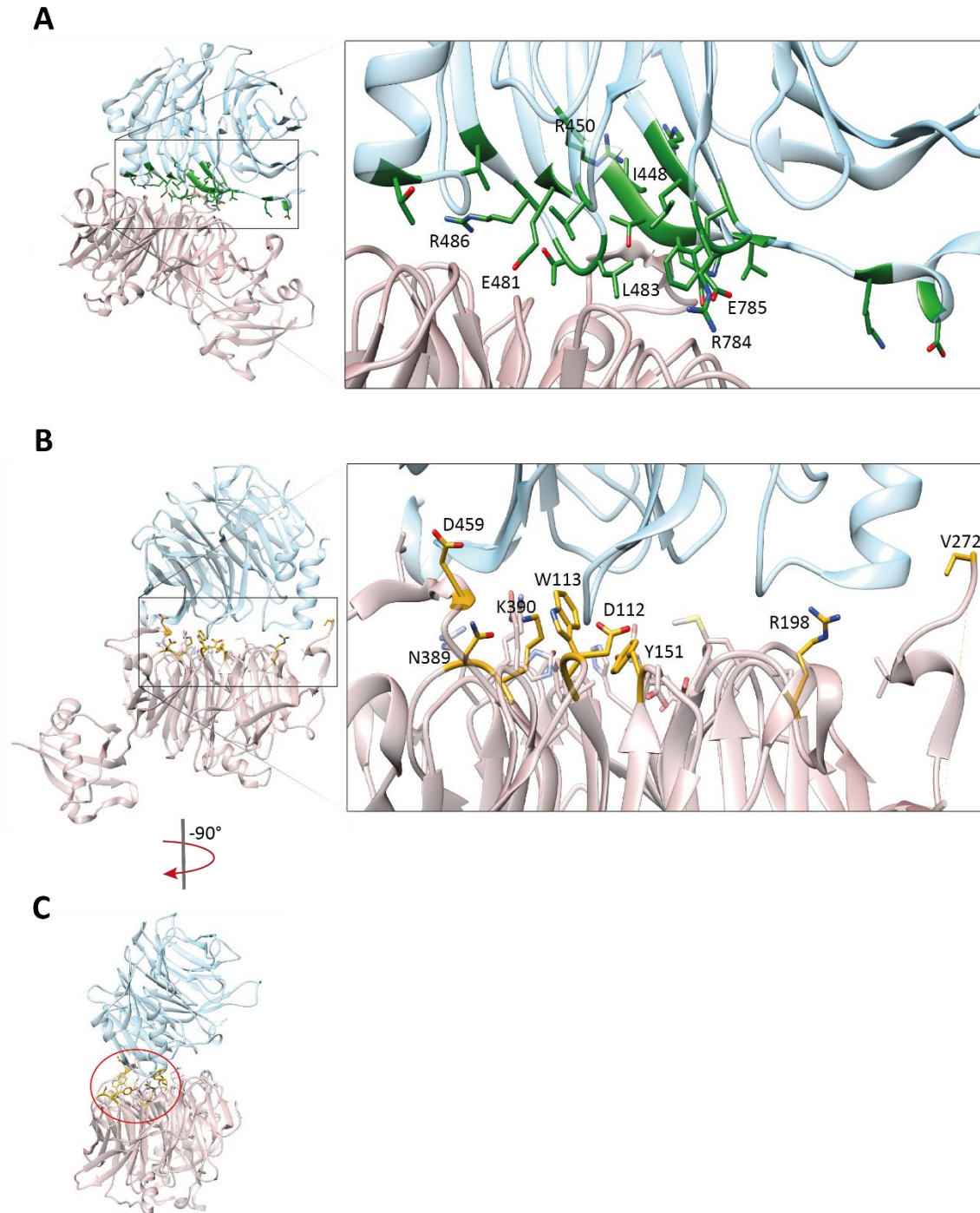
Por otra parte, la mayoría de los residuos de CtYtm1 que contribuyen a la interacción con CtErb1 se encuentran dentro de lazos (**Figura 52B**). Los residuos de CtYtm1 con una  $\Delta G > 1,0$  kcal/mol según el escáner de alaninas son D112 y W113 situados en el lazo entre 1d-1a, Y151 entre las hebras 1d-1c, R198 entre 2b-2c, V272 entre las hebras 3c-4d, N389 y K390 entre 6d-6a y D459 entre 7d-7a (**Figuras 52B y 54, Tabla 26**, doble asterisco). Además, los residuos de CtYtm1 que interaccionan con CtErb1 se encuentran localizados principalmente a un lado del túnel central del  $\beta$ -propeller (**Figura 52C**).

Tabla 26. Valores de variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) y profundidad de cada residuo de CtErb1 y CtYtm1 de la superficie de interacción del complejo CtErb1/CtYtm1 calculados mediante un escáner de alaninas *in silico* con el programa DrugScorePPI ( $\Delta\Delta G_{cal} = \Delta G_{complejo}^{ALA} - \Delta G_{complejo}^{WT}$ ). (\*) Residuos seleccionados de CtErb1 con una  $\Delta\Delta G > 0,5$  kcal/mol. (\*\*) Residuos seleccionados de CtYtm1 con una  $\Delta\Delta G > 1,0$  kcal/mol.

Residuo CtErb1	$\Delta\Delta G_{cal}$ (kcal/mol)	Profundidad	Residuo CtYtm1	$\Delta\Delta G_{cal}$ (kcal/mol)	Profundidad
D436	0,11	3,78	D112**	1,69	8,78
K439	0,08	2,5	W113**	1,19	5,54
T443	0,18	4,82	Y151**	2,11	7,23
V444	0,47	6,43	D152	0,26	8,78
Q445	0,12	3,08	S179	0,2	5,62
Q446	0,48	10,55	K181	0,46	6,59
T447	0,42	8,52	M196	0,37	3,61
I448*	1,02	5,45	D197	0,29	10,06
R450*	0,53	3,03	R198**	1,07	6,1
T464	0,14	4,89	H224	0,22	7,59
V466	0,42	4,27	T225	0,13	3,63
E481*	0,55	5,18	S227	0,16	4,62
L482	0,08	2,72	D229	0,4	7,49
L483*	0,65	1,89	S265	0,13	4,62
T484	0,36	6,08	L266	0,21	3,67
R486*	2,39	5,26	L267	0,08	2,72
Q487	0,14	4,96	H271	0,05	0,99
V488	0,4	6,43	V272**	1,23	2,16
H528	0,09	3,85	T297	0,17	3,7
S530	0,09	3,21	Q318	0,27	1,99
V531	0,2	5,38	D319	0,35	12,56
T532	0,43	7,4	H320	0,42	9,52
Q537	0,08	3,93	H340	0,08	2,86
H782	0,19	5,78	L343	0,23	3,67
R784*	0,54	3,77	S363	0,22	4,72
E785*	0,63	6,38	R365	0,59	5,31
W787	0,49	3,47	N389**	1,63	12,99
R798	0,25	8,42	K390**	1,34	6,36
L799	0,26	5,98	H409	0,28	6,71
M801	0	2,72	K426	0,07	2,5
			E427	0,09	3,22
			V456	0,65	2,23
			D459**	1,94	5,07
			K462	0,74	5,82
			F464	0,3	5,87
			E478	0,31	8,46

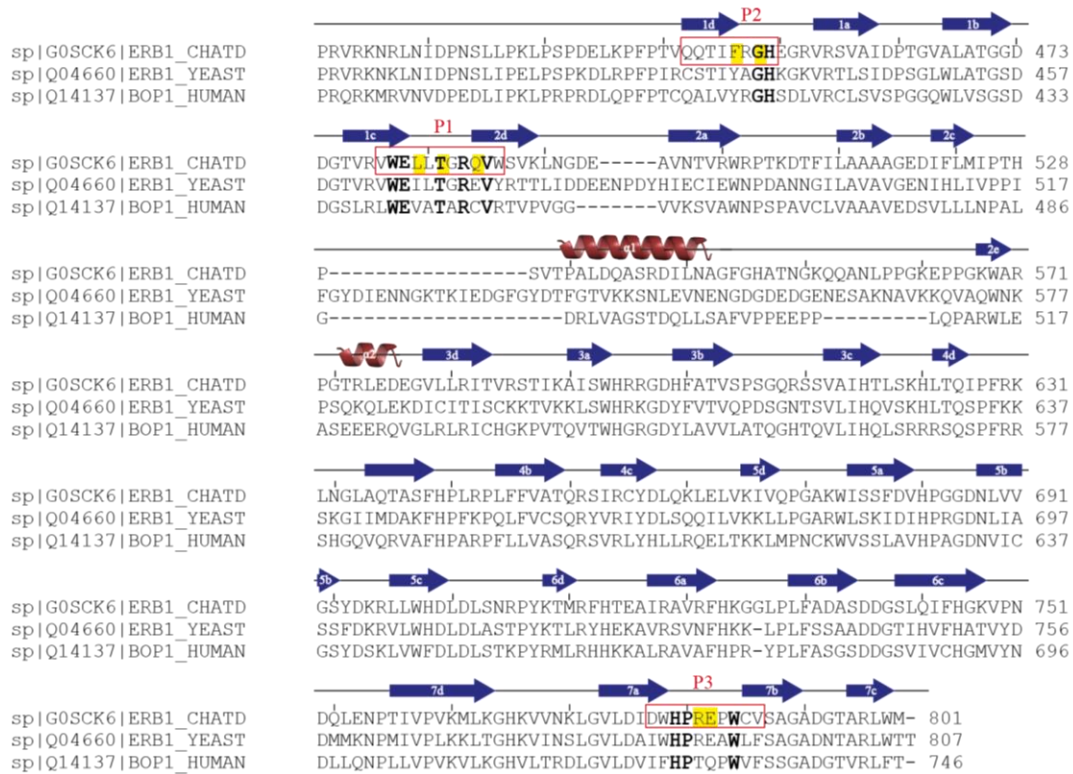


**Figura 51. Superficie de interacción CtErb1/CtYtm1.** (A) Representación en superficie del heterodímero CtErb1 (celeste) y CtYtm1 (rosa pálido) (PDB ID: 5CXB). (B) Representación de los residuos que forman parte de la interfaz de dimerización de CtErb1 y CtYtm1. En gris se han coloreado los residuos hidrofóbicos y en azul y rojo los residuos con carga neta positiva y negativa, respectivamente. Los residuos de CtYtm1 que interactúan con CtErb1 se encuentran alrededor del túnel central del  $\beta$ -propeller y los residuos de CtErb1 que interactúan con CtYtm1 se encuentran situados en la cara lateral del  $\beta$ -propeller.



**Figura 52. Residuos seleccionados del escáner de alaninas *in silico* localizados en la superficie de interacción de CtErb1/CtYtm1.** (A) Residuos seleccionados de CtErb1 con una  $\Delta G > 0,5$  kcal/mol (color verde). (B) Residuos seleccionados de CtYtm1 con una  $\Delta G > 1,0$  kcal/mol (color amarillo). Las cadenas laterales de los residuos que establecen interacciones electrostáticas se muestran en cada figura. Los átomos de los residuos involucrados en la interacción están coloreados por átomo, oxígenos en rojo y nitrógenos en azul. (C) Localización de los residuos de CtYtm1 seleccionados del escáner de alaninas agrupados principalmente a un lado del túnel central del  $\beta$ -propeller. PDB ID: 5CXB.





**Figura 53. Alineamiento de secuencia de Erb1 de *Chaetomium thermophilum* (CHATD), *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST) y humano (HUMAN).** Los péptidos sintéticos seleccionados derivados de CtErb1 (P1, P2 y P3) se encuentran indicados en rojo. Los residuos conservados dentro de la secuencia de los péptidos sintéticos están en negrita. Los elementos de estructura secundaria se representan esquemáticamente por encima del alineamiento. Las flechas azules indican láminas u hojas β y las espirales rojas son α-hélices. Los residuos de interacción con una ΔG>0,5 kcal/mol calculados por DrugScore<sup>PP1</sup> están marcados en amarillo.

### 1.2. Diseño de péptidos sintéticos que interfieren en la interacción entre Erb1 e Ytm1

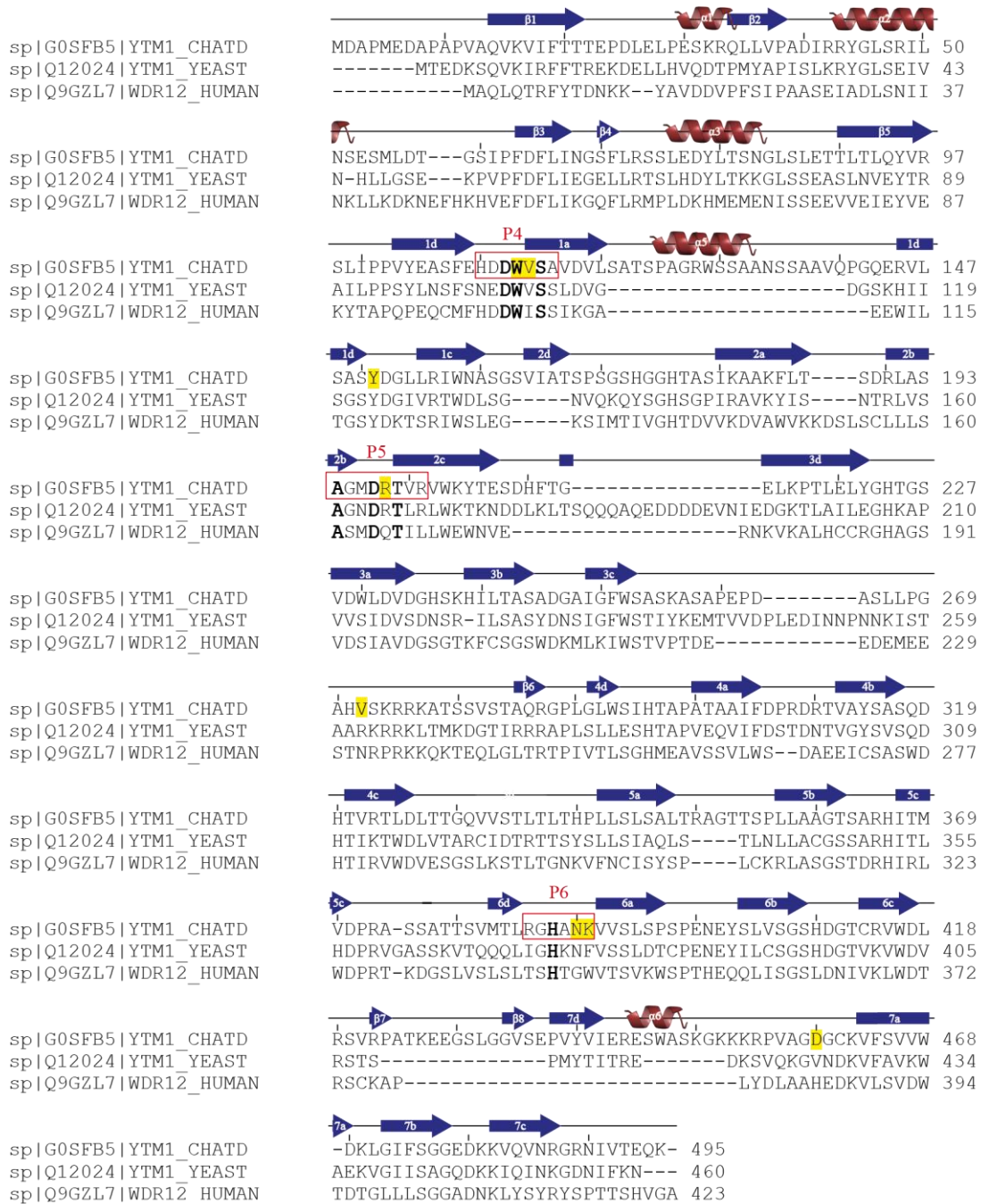
A partir del análisis estructural previo de las regiones de interacción y teniendo en cuenta la información obtenida del escáner de alaninas, se diseñaron una serie de péptidos sintéticos con el objetivo de interferir en la formación del complejo CtErb1/CtYtm1 (Tabla 27). Se seleccionaron seis péptidos, de los cuales tres fueron derivados de la secuencia de CtErb1 (P1-P3) y los otros tres de CtYtm1 (P4-P6). Las secuencias de dichos péptidos se encuentran conservadas como se puede comprobar en el alineamiento multiseuencia de las Figuras 53 y 54.

**Tabla 27. Péptidos sintéticos diseñados para ensayos de interacción *in vitro* proteína-proteína y ensayos celulares.** (Biot: biotina; aa: aminoácidos).

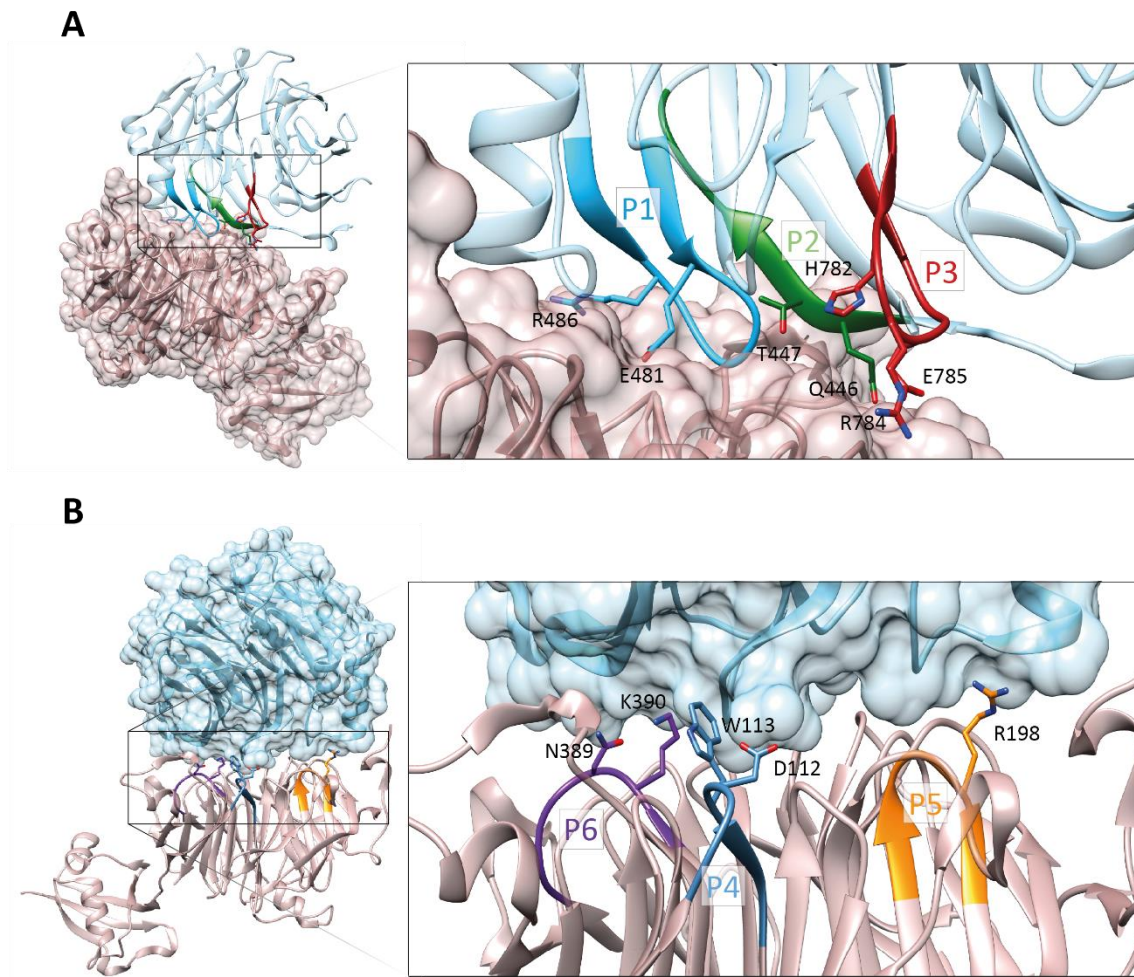
Nombre péptido	Secuencia	Proteína/Organismo	Límites (aa)
<b>P1</b>	VWELLTGRQVW	Erb1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	479-489
<b>P2</b>	QQTIFRGH	Erb1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	445-452
<b>P3</b>	DWHPREPWCV	Erb1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	780-789
<b>P4</b>	HDDWVSA	Ytm1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	110-116
<b>P5</b>	AGMDRTV	Ytm1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	194-200
<b>P6</b>	RGHANKV	Ytm1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	385-391
<b>Biot-P1</b>	Biotina-VWELLTGRQVW	Erb1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	479-489
<b>Biot-P3</b>	Biotina- DWHPREPWCV	Erb1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	780-789
<b>Biot-P6</b>	Biotina- RGHANKV	Ytm1/ <i>Chaetomium thermophilum</i>	385-391
<b>P10hs</b>	GRKKRRQRRRPQLWEVATARCVR	Bop1/human	439-449
<b>P11hs</b>	GRKKRRQRRRPQIFHPTQPWVF	Bop1/human	725-734
<b>PTAT</b>	GRKKRRQRRRPQ	TAT	-
<b>FITC-P10hs</b>	FITC-GRKKRRQRRRPQLWEVATARCVR	Bop1/human	-

Los residuos seleccionados de CtErb1 tras el escáner de alaninas (**Tabla 26**, asterisco), que son los que más contribuyen a la interacción del complejo CtErb1/CtYtm1, se encuentran formando parte de la secuencia de los péptidos P1, P2 y P3 (**Figuras 53 y 55A**).

Por otra parte, los residuos seleccionados del escáner de alaninas de CtYtm1 están más deslocalizados (**Tabla 26**, doble asterisco). La mayoría de ellos se encuentran formando parte de la secuencia de los péptidos P4, P5 y P6 (**Figuras 54 y 55B**) a excepción de los residuos Y151, V272 y D459. La región donde se encuentran estos residuos está pobremente conservada, salvo la Y151. Sin embargo, no se ha considerado el diseño de un péptido de esta región debido a que es un residuo aislado en una zona que no participa en la interacción, insuficiente para interferir en el complejo CtErb1/CtYtm1.



**Figura 54. Alineamiento de secuencia de Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* (CHATD), *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST) y humano (HUMAN).** Los péptidos sintéticos seleccionados derivados de CtYtm1 (P4, P5 y P6) se encuentran indicados en rojo. Los residuos conservados dentro de la secuencia de los péptidos sintéticos están en negrita. Los elementos de estructura secundaria se representan esquemáticamente por encima del alineamiento. Las flechas azules indican láminas u hojas  $\beta$  y las espirales rojas son  $\alpha$ -hélices. Los residuos de interacción con una  $\Delta G > 1,0$  kcal/mol calculados por DrugScore<sup>PPI</sup> están marcados en amarillo.



**Figura 55. Péptidos sintéticos diseñados en base a la estructura del complejo CtErb1/CtYtm1.** (A) Péptidos sintéticos seleccionados derivados de CtErb1. Los 3 péptidos seleccionados se han coloreado de celeste, verde y rojo para P1, P2 y P3, respectivamente. (B) Péptidos sintéticos seleccionados derivados de CtYtm1. Se han coloreado de azul, naranja y morado para P4, P5 y P6, respectivamente. Se muestran en cada figura las cadenas laterales de los residuos que establecen interacciones electrostáticas. Los átomos de los residuos involucrados en la interacción están coloreados por átomo, oxígenos en rojo y nitrógenos en azul. El resto de la superficie está coloreada en celeste para CtErb1 y en rosa pálido para CtYtm1. PDB ID: 5CXB.

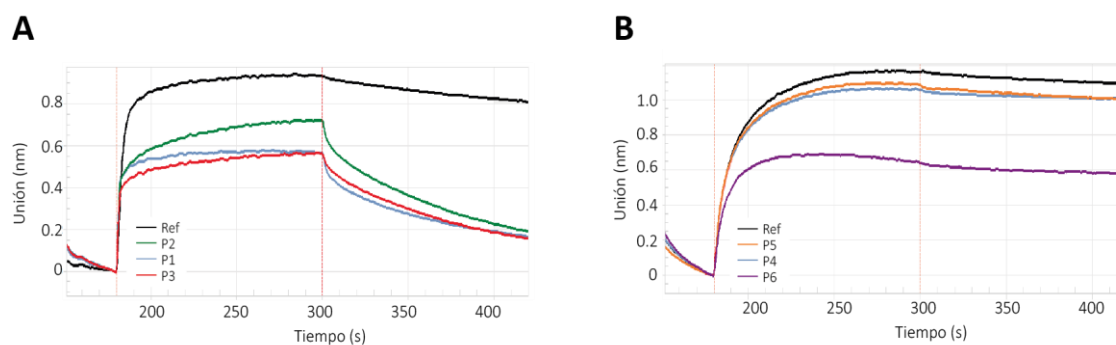
## 2. Ensayos de competición de péptidos sintéticos

La evaluación de la capacidad de los péptidos sintéticos para interferir en la formación *in vitro* del complejo Erb1/Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* se realizó a través de ensayos de competición usando interferometría de bicapa (BLI). En primer lugar, analizamos la afinidad entre His-CtErb1 y CtYtm1 obteniendo una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $3,2 \times 10^{-8}$  M, similar a los valores publicados por Węgrecki *et al.*, 2015 (**Tabla 28**). A continuación, se evaluó la habilidad que tenían los péptidos en disminuir la afinidad entre CtErb1 y CtYtm1. Para ello se

llevaron a cabo una serie de ensayos de interacción en BLI en los que previamente se incuban los péptidos, derivados de la proteína a inmovilizar en el biosensor, con la proteína analito y se analizan los cambios en la afinidad de la formación del heterodímero.

En la **Figura 56A** se muestra cómo los péptidos P1, P2 y P3 producen un aumento de la  $K_D$  de alrededor de un orden de magnitud (**Tabla 28**) con respecto a la curva de unión de *CtErb1/CtYtm1* en ausencia de péptido (**Figura 56A**, línea negra).

De forma similar, se realizó un ensayo inmovilizando, en este caso, *His-CtYtm1* en biosensores de Ni-NTA y *CtErb1* se usó como analito, el cual fue preincubado con los péptidos derivados de *CtYtm1* (P4-P6) en proporciones equimolares. Sólo se obtuvieron diferencias significativas, respecto a la  $K_D$  en ausencia de péptidos, cuando incubamos *CtErb1* con el péptido P6 (**Figura 56B**, **Tabla 29**).



**Figura 56. Ensayos de competición por BLI en presencia de péptidos sintéticos.** (A) Curvas de interferometría de bicapa de péptidos P1-P3 preincubados con cantidades equimolares de *CtYtm1* (5  $\mu$ M). La habilidad para interferir en la formación del complejo *CtErb1/CtYtm1* (línea negra) es evaluada usando *CtErb1* inmovilizado al biosensor Ni-NTA y *CtYtm1* como analito. (B) Ensayo de competición de BLI preincubando 20  $\mu$ M de *CtErb1* con concentraciones equimolares de los péptidos P4-P6 usando como diana *CtYtm1* inmovilizado. La curva de referencia *CtYtm1/CtErb1* se muestra en color negro.

**Tabla 28. Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de *CtYtm1-CtErb1* (+ P1/P2/P3). Ref: referencia.**

Proteína-Péptido	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_a$ Error	$k_d$ (1/s)	$k_d$ Error	$\chi^2$	$R^2$
Ref <i>CtYtm1</i>	$3,222 \times 10^{-8}$	$5,35 \times 10^4$	$7,06 \times 10^2$	$1,724 \times 10^{-3}$	$5,535 \times 10^{-5}$	0,3016	0,9698
<i>CtYtm1</i> -P2	$3,557 \times 10^{-7}$	$3,916 \times 10^4$	$9,705 \times 10^2$	$1,393 \times 10^{-2}$	$2,215 \times 10^{-4}$	1,578	0,9603
<i>CtYtm1</i> -P1	$1,902 \times 10^{-7}$	$1,021 \times 10^5$	$2,602 \times 10^3$	$1,942 \times 10^{-2}$	$2,272 \times 10^{-4}$	0,5205	0,9822
<i>CtYtm1</i> -P3	$1,745 \times 10^{-7}$	$7,094 \times 10^4$	$1,739 \times 10^3$	$1,238 \times 10^{-2}$	$1,536 \times 10^{-4}$	0,6148	0,974

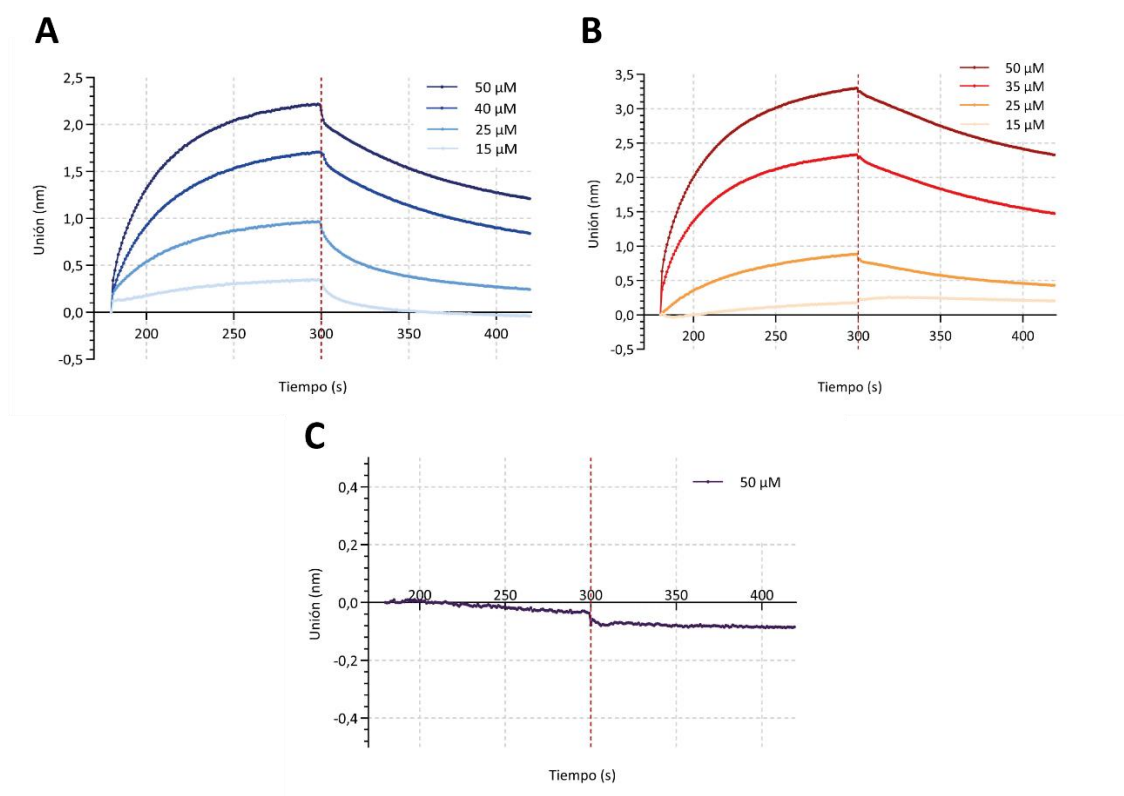


**Tabla 29.** Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de CtErb1-CtYtm1 (+ P4/P5/P6). Ref: referencia.

Proteína-Péptido	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_a$ Error	$k_d$ (1/s)	$k_d$ Error	$\chi^2$	$R^2$
Ref CtErb1	$2,292 \times 10^{-7}$	$5,24 \times 10^3$	$3,87 \times 10^1$	$1,201 \times 10^{-3}$	$2,504 \times 10^{-5}$	0,04878	0,9985
CtErb1-P5	$2,825 \times 10^{-7}$	$5,857 \times 10^3$	$5,321 \times 10^1$	$1,655 \times 10^{-3}$	$4,406 \times 10^{-5}$	0,0926	0,9964
CtErb1-P4	$2,966 \times 10^{-7}$	$5,345 \times 10^3$	$4,358 \times 10^1$	$1,585 \times 10^{-3}$	$1,704 \times 10^{-5}$	0,04445	0,9982
CtErb1-P6	$2,439 \times 10^{-6}$	$4,384 \times 10^3$	$2,224 \times 10^2$	$1,069 \times 10^{-2}$	$2,341 \times 10^{-4}$	0,1423	0,9815

## 2.1. Análisis de la interacción directa entre las proteínas CtErb1 y CtYtm1 y los péptidos diseñados

Los péptidos que disminuyeron más la afinidad entre CtErb1/CtYtm1 fueron seleccionados para analizar su interacción directa con las correspondientes proteínas mediante BLI. Para ello, se biotinilaron aquellos péptidos que mejor resultado nos habían dado interfiriendo en la formación del heterodímero: P1, P3 y P6 (**Tabla 30**). Los péptidos biotinilados Biot-P1 y Biot-P3 fueron inmovilizados en biosensores de estreptavidina y se midió la afinidad por CtYtm1 (**Figuras 57A y 57B**). Biot-P6 fue inmovilizado en biosensores de estreptavidina y se midió la afinidad por CtErb1 (**Figuras 57C**).



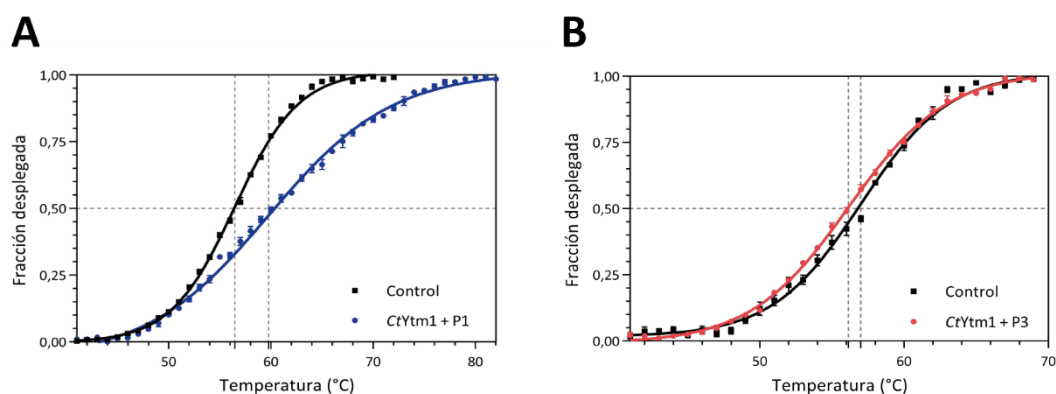
**Figura 57.** Curvas de interferometría de bicapa usando péptidos sintéticos biotinilados. (A, B y C) Curvas de unión de Biot-P1 (A) y Biot-P3 (B) inmovilizados en sensores de estreptavidina frente a CtYtm1 y Biot-P6 (C) frente a CtErb1.

De forma similar, Biot-P6 fue inmovilizado en biosensores de estreptavidina analizándose su interacción con CtErb1. Los péptidos Biot-P1 y Biot-P3 mostraron una afinidad por CtYtm1 en el rango de  $\mu\text{M}$  (Figuras 57A y 57B, Tabla 30). En cambio, no se pudo detectar unión de Biot-P6 con CtErb1 (Figura 57C).

**Tabla 30. Valores de la constante de afinidad, asociación y disociación y errores estadísticos de ensayos BLI CtYtm1 con Biot-P1 y Biot-P3.**

Biot-Péptido-CtYtm1	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_a$ Error	$k_d$ (1/s)	$k_d$ Error	$\chi^2$	$R^2$
Biot-P1	$3,342 \times 10^{-5}$	$3,865 \times 10^2$	$6,967 \times 10$	$1,292 \times 10^{-2}$	$5,954 \times 10^{-4}$	16,02	0,9852
Biot-P3	$6,287 \times 10^{-6}$	$8,294 \times 10^2$	$2,496 \times 10$	$5,215 \times 10^{-3}$	$1,941 \times 10^{-4}$	9,07	0,9962

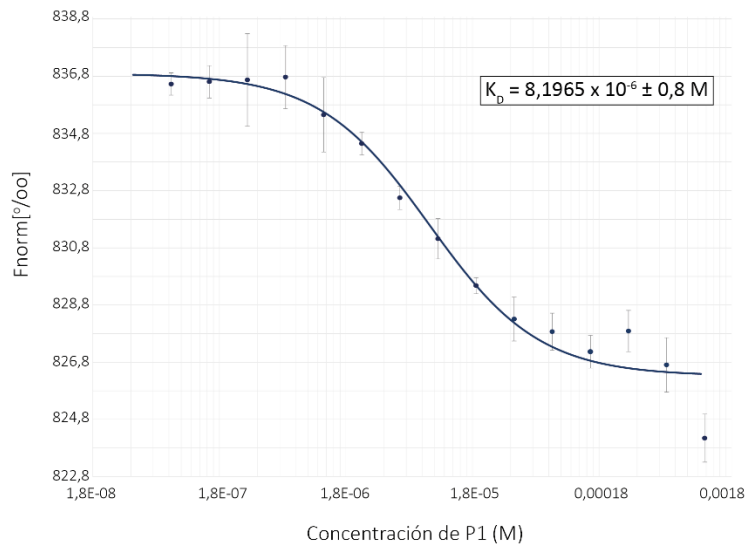
También se analizaron cambios en la estabilidad térmica de la proteína CtYtm1 en presencia de P1 y P3 llevando a cabo ensayos de termofluór. Para ello, se incubó la proteína CtYtm1 con distintas concentraciones de P1 y P3. Con el péptido P1, se observó un incremento de varios grados centígrados en la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) indicando interacción con CtYtm1 (Figura 58A). Sin embargo, no se observó un cambio térmico significativo de CtYtm1 en presencia de 1 mM P3 (Figura 58B). Por otro lado, no se consiguió evaluar el desplazamiento térmico con el péptido P6 debido a que no se pudieron estimar valores adecuados de  $T_d$  de termofluór con CtErb1 aislado.



**Figura 58. Curvas de termofluór de CtYtm1 aislado y en presencia de los péptidos sintéticos P1 y P3. (A y B) Curva de termofluór de CtYtm1 aislado en color negro y CtYtm1 con 1 mM de P1 en azul (A) y con 1 mM de P3 en rojo (B).**

Quisimos confirmar la capacidad del péptido P1 de interactuar con CtYtm1 y para ello monitorizamos la unión usando la técnica termoforesis a microescala (MST). Se incubó la proteína CtYtm1 (5 nM), previamente marcada fluorescentemente con concentraciones

crecientes de ligando P1. La afinidad determinada por MST mostró una  $K_D$  en el rango de  $\mu\text{M}$  ( $8,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) acorde con las afinidades observadas usando interferometría confirmando así de manera directa la interacción entre el P1 y CtYtm1 (**Figura 59**). La curva experimental fue resultado del ajuste de experimentos por triplicado. Las limitaciones experimentales con la concentración máxima de ligando no permitieron el cálculo de la estequiometría de unión.



**Figura 59. Curva de unión de CtYtm1 y péptido P1 mediante termoforesis a microescala (MST).** Se monitorizó la unión de 5 nM de CtYtm1 marcada con el fluoróforo Red-NHS 2nd Generation (Nanotemper Technologies) frente a 16 diluciones seriadas del ligando P1 (1.230  $\mu\text{M}$  a 0,0751  $\mu\text{M}$ ).  $K_D = 8,2 \times 10^{-6} \pm 0,8 \text{ M}$ . Barras de error = desviación estándar; n=3. Fnom: fluorescencia normalizada.

La interacción del péptido P3 con CtYtm1 también fue monitorizada por MST. Se detectó una tendencia a la unión de CtYtm1 con el péptido P3 a la concentración máxima de 1.580  $\mu\text{M}$ , pero la calidad de los datos experimentales no permitió un ajuste adecuado para obtener valores de  $K_D$  (datos no mostrados). Sin embargo, la evaluación inicial usando MST a la máxima concentración testada mostró que P3 interactuaba con CtYtm1, por lo que no descartamos al péptido P3 en posteriores ensayos.

El péptido de interferencia P1 ha sido el único péptido que ha cumplido todos los criterios de selección de interacción *in vitro* con CtYtm1. Nuestros resultados sugieren que el péptido P1 debería recibir mayor prioridad para los ensayos en células de mamífero.



A partir de los resultados de los ensayos *in vitro* descritos arriba, se diseñaron nuevos péptidos sintéticos, P10hs y P11hs (derivados de los péptidos P1 y P3, respectivamente) con la secuencia del ortólogo en humanos de Erb1 (Bop1) (**Tabla 27**). A estos nuevos péptidos se añadió una secuencia lineal denominada TAT en su extremo N-terminal capacitándolos para atravesar las membranas hasta el nucléolo de cultivos de células de mamífero [271]. El péptido TAT es un conocido péptido penetrante derivado del activador transcripcional del virus VIH [212,213] utilizado comúnmente en el diseño de agentes de interferencia. Con el objetivo de interferir en la formación del complejo Erb1/Ytm1 e inhibir la biogénesis ribosomal, se realizaron ensayos preliminares de caracterización de los efectos en la fisiología celular producidos en células de carcinoma de colon humanas HCT-116 en presencia de estos péptidos.

### **3. Ensayos de caracterización de los efectos en la fisiología celular producidos tras la exposición a péptidos penetrantes**

#### **3.1. Ensayos de viabilidad celular y activación de caspasas**

En primer lugar, se evaluó la capacidad citotóxica de los péptidos sintéticos mediante ensayos de cuantificación de viabilidad celular usando el agente colorimétrico WST-1 (Roche). Este agente es procesado por las deshidrogenasas mitocondriales produciendo formazán que tiene un máximo de absorbancia de 450 nm.

Para determinar la supervivencia celular, se trataron cultivos de células humanas de carcinoma de colon HCT-116 con diferentes concentraciones de péptidos sintéticos P10hs y P11hs a diferentes tiempos de incubación en placas de 96 pocillos (**Figuras 60A y 60C**). También se realizaron los ensayos incluyendo el péptido PTAT para diferenciar el posible efecto en la viabilidad celular que podía producir la secuencia penetrante TAT en sí misma. Los experimentos con ambos péptidos sintéticos se realizaron por triplicado con tres réplicas por ensayo.

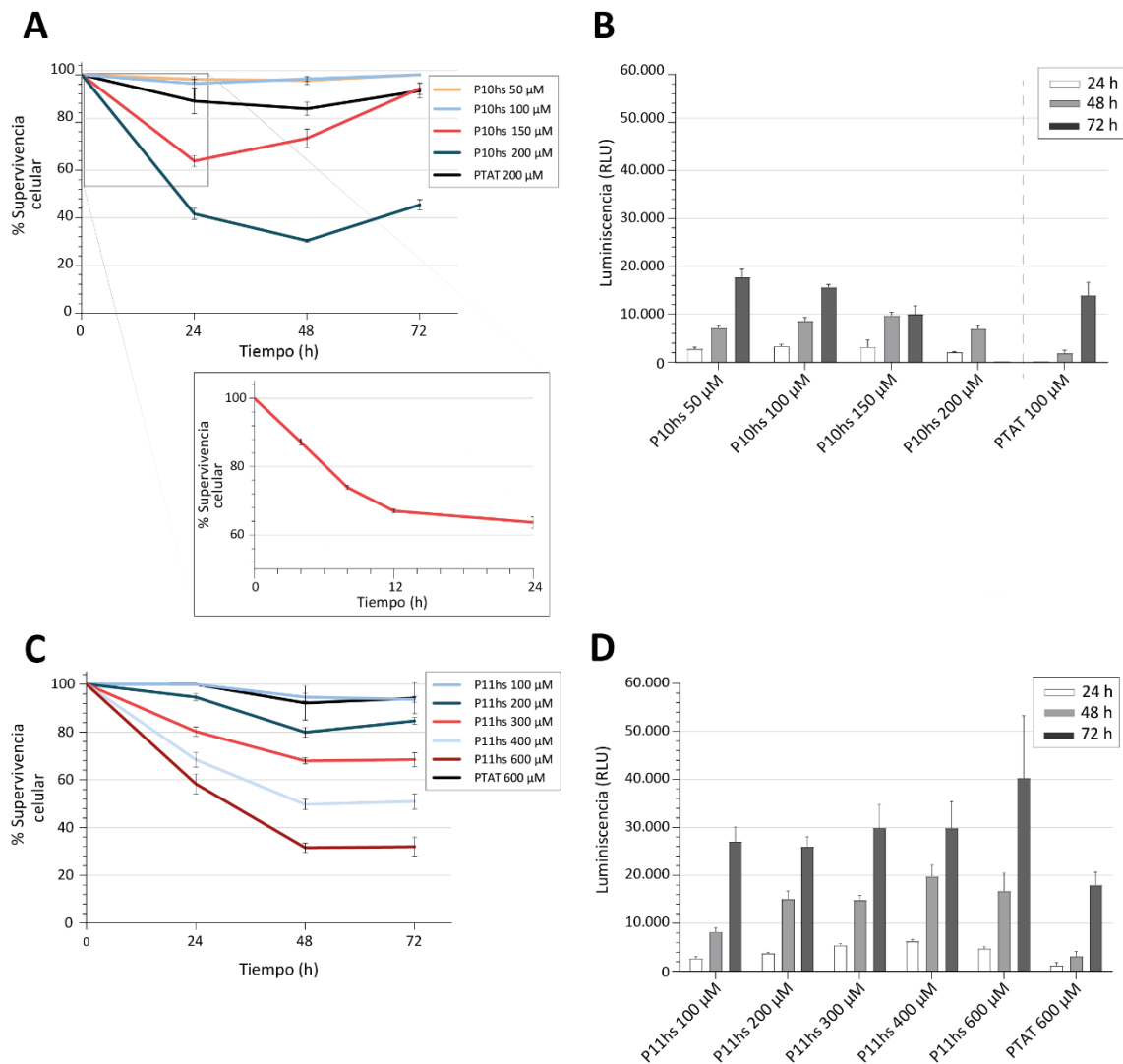
- Los resultados de los ensayos con P10hs indican que la viabilidad celular no se vió afectada con tratamientos de P10hs a bajas concentraciones (50 y 100  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, se detectó un descenso de la supervivencia celular de casi un 40% a 150  $\mu\text{M}$  y de un 60% a 200  $\mu\text{M}$  a las 24 h de exposición. No obstante, la viabilidad celular pareció aumentar a las 72 h de tratamiento con cada una de las concentraciones (**Figura 60A**).

- El efecto en la supervivencia celular que ocasiona la exposición al péptido P11hs es diferente al ocasionado por el P10hs. La supervivencia celular se reduce a concentraciones mayores de 100  $\mu\text{M}$ , sin presentar recuperación en el tiempo (**Figura 60C**).

Además, calculamos los valores aproximados de IC50 para el P10hs y P11hs. La IC50 es la concentración a la que la supervivencia celular se reduce en un 50%. La IC50 aproximada para el P10hs es de 150-200  $\mu\text{M}$  y para el péptido P11hs de 400  $\mu\text{M}$  a las 24 h de tratamiento. Por tanto, el péptido P10hs produce un mayor efecto en la viabilidad celular a menor concentración que el péptido P11hs.

De forma paralela, se cuantificó la activación de las caspasas 3/7 para detectar apoptosis tras el tratamiento con los péptidos sintéticos usando el kit comercial Caspasa-Glo<sup>®</sup>3/7 (Promega). Se determinó la activación de las caspasas en presencia de diferentes concentraciones de péptidos P10hs y P11hs a las 24, 48 y 72 h monitorizando la luminiscencia producida en placas de 96 pocillos (**Figuras 60B y 60D**). La representación esquemática de la actividad caspasa fue relativizada respecto a la supervivencia celular tras cada tratamiento. Los experimentos se realizaron por triplicado con tres réplicas por ensayo excepto para las concentraciones de 150 y 200  $\mu\text{M}$  de P10hs y PTAT 100  $\mu\text{M}$  que se realizaron por duplicado.

- En los ensayos de activación de caspasas con P10hs se observó un incremento significativo en la activación de las caspasas 3/7 con tratamientos de P10hs de 50 a 200  $\mu\text{M}$  a 24 y 48 h de tratamiento. Sin embargo, dicha actividad pareció disminuir progresivamente a las 72 h de exposición (**Figura 60B**). Además, se detectaron bajos niveles de activación de caspasas con tratamientos con PTAT a 100  $\mu\text{M}$  a 24 y 48 h descartando así que los efectos observados en la activación de caspasas eran debidos al propio péptido y no a la secuencia penetrante. Sin embargo, dicho efecto pareció aumentar a las 72 h de exposición.
- En los ensayos con P11hs se detectó una mayor activación de caspasas que con P10hs (**Figura 60D**). La mayor activación se alcanzó a las 72 h de tratamiento con todas las concentraciones de P11hs. El péptido PTAT a la máxima concentración ensayada (600  $\mu\text{M}$ ) produjo una activación de las caspasas 3/7 aproximadamente dos veces menor que P11hs a las 72 h.



**Figura 60. Cuantificación de la viabilidad celular y la activación de caspasas 3/7 de células de carcinoma de colon HCT-116 en presencia de los péptidos penetrantes P10hs, P11hs y PTAT.** (A y B) Cuantificación de la viabilidad celular (A) y cuantificación de la actividad caspasa (B) relativizada al número de células viables tras tratamientos con 50, 100, 150 y 200  $\mu$ M de P10hs y 100 y 200  $\mu$ M de PTAT. (C y D) Cuantificación de la viabilidad celular (C) y activación de caspasas (D) en presencia de P11hs a 100, 200, 300, 400 y 600  $\mu$ M y 600  $\mu$ M de PTAT. Todos los tratamientos se realizaron durante 24, 48 y 72 h. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes excepto el ensayo de la activación de caspasas para el P10hs 150 y 200  $\mu$ M y PTAT a 100  $\mu$ M. RLU: unidades de luz relativas.

Como se ha comentado anteriormente, el porcentaje de células vivas tras el tratamiento con P10hs a 150 y 200  $\mu$ M parece recuperarse en el tiempo a diferencia del P11hs. Para excluir la posibilidad que la recuperación en la viabilidad celular sea debida a la degradación o inactivación de los péptidos, se recogieron los sobrenadantes de los diferentes tratamientos y se añadieron a una nueva placa de células para testar la viabilidad celular con WST-1. Para ello,

se añadieron a células nuevas cultivadas y se cuantificó el porcentaje de células vivas a las 24 y 48 h de exposición.

- Los resultados, mostrados en la **Figura 61A**, parecen indicar que el P10hs se inactiva o sufre una degradación proteolítica debido a que no se obtienen valores de muerte celular similar a un tratamiento con péptido nuevo (**Figura 61A**, línea negra).
- En cambio, parece que el péptido P11hs sufre una inactivación menos predominante que el P10hs al presentar valores semejantes de muerte celular que un tratamiento con péptido nuevo (**Figuras 61B y 61C**).

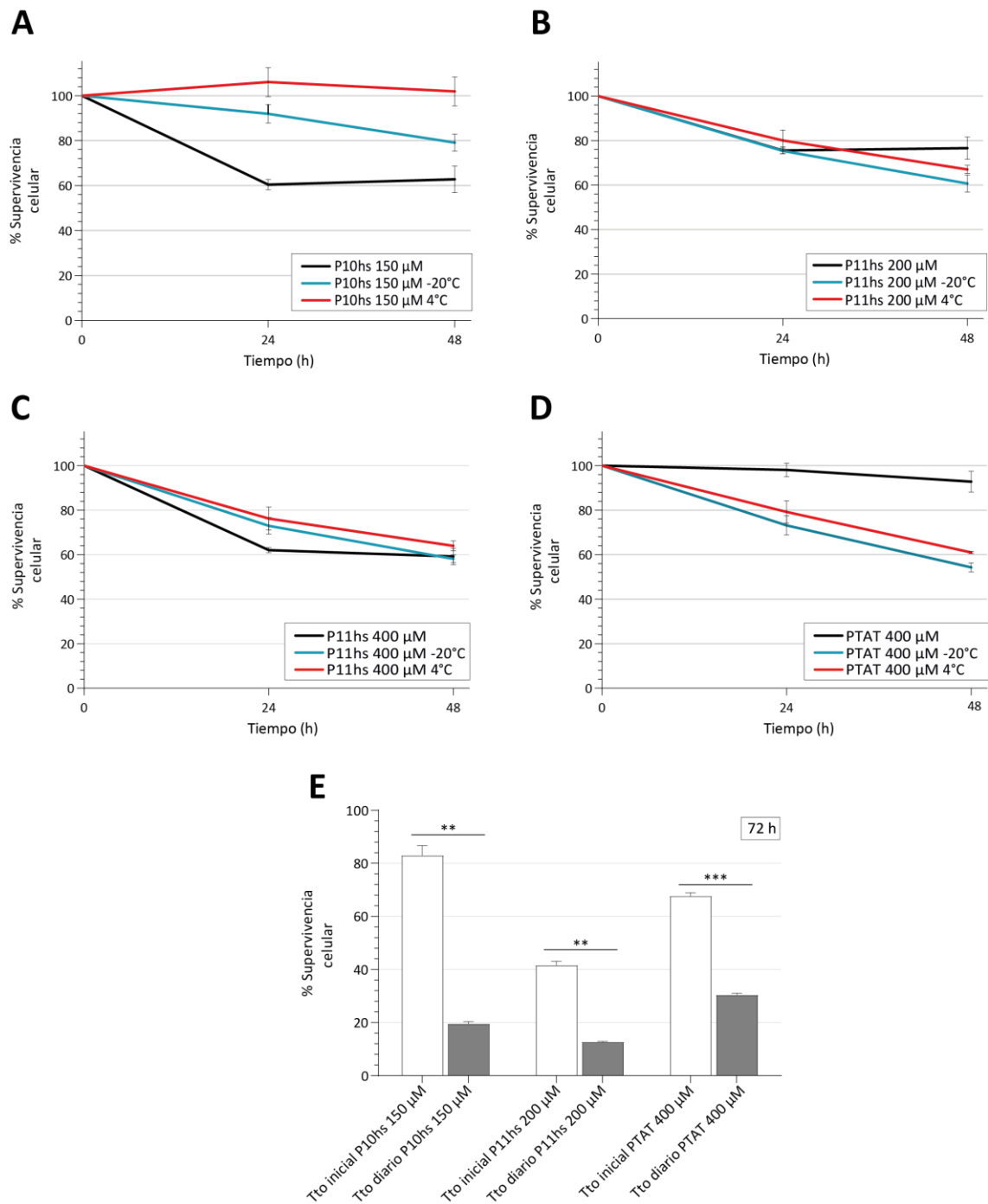
En todos los casos, los sobrenadantes de los tratamientos con los péptidos P10hs y P11hs conservados a -20°C parecen afectar más a la supervivencia celular que los conservados a 4°C. Este hecho apoya la idea que los péptidos sufren inactivación o degradación proteolítica.

Por otra parte, el péptido PTAT a la máxima concentración ensayada no produjo efectos significativos en la viabilidad, sin embargo, si parecen tener más efecto los péptidos PTAT reutilizados (**Figura 61D**).

También se realizó otro ensayo con el objetivo de comprobar la estabilidad del péptido en el medio. Para ello, se trataron células con P10hs a 150  $\mu$ M y 200  $\mu$ M y P11hs a 400  $\mu$ M, ya que son las mínimas concentraciones de péptido con las que se observa un efecto significativo en viabilidad, y la supervivencia celular fue monitorizada con WST-1 durante 72 h. Por una parte, se cuantificó la supervivencia celular con cada tratamiento a las 72 h y, por otra parte, se añadió péptido nuevo cada 24 h midiéndose la supervivencia final a las 72 h (**Figura 61E**).

- El tratamiento con P10hs a 150  $\mu$ M a las 72 h mostró una supervivencia del 80%, en cambio, el tratamiento continuado con péptido nuevo produjo una supervivencia de un 20% (**Figura 61E**).
- Por otro lado, el tratamiento con P11hs a 200  $\mu$ M produjo una muerte del 60% a las 72 h, pero el tratamiento continuado de péptido nuevo redujo la supervivencia celular a un 15% (**Figura 61E**).

Los resultados de ambos ensayos sugieren que el péptido P11hs no sufre una degradación proteolítica o inactivación tan acusada como el P10hs. Este hecho podría ser debido a la propia conformación o estabilidad que presenta el péptido.



**Figura 61. Cuantificación de la supervivencia celular de células HCT-116 en presencia de los péptidos de interferencia P10hs, P11hs y PTAT nuevos y conservados a 4 y -20°C.** (A-D) Supervivencia celular tras el tratamiento con P10hs a 150 μM (A), P11hs a 200 μM (B) y 400 μM (C) y PTAT a 400 μM (D) nuevos y conservados a 4 y -20°C. (E) Supervivencia celular tras el tratamiento (tto) continuado y diario durante 72 h de 150 μM P10hs, 200 μM de P11hs y 400 μM de PTAT. Los datos representan la media ± SEM. \*,  $p < 0,0332$ ; \*\*,  $p < 0,0021$ ; \*\*\*,  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

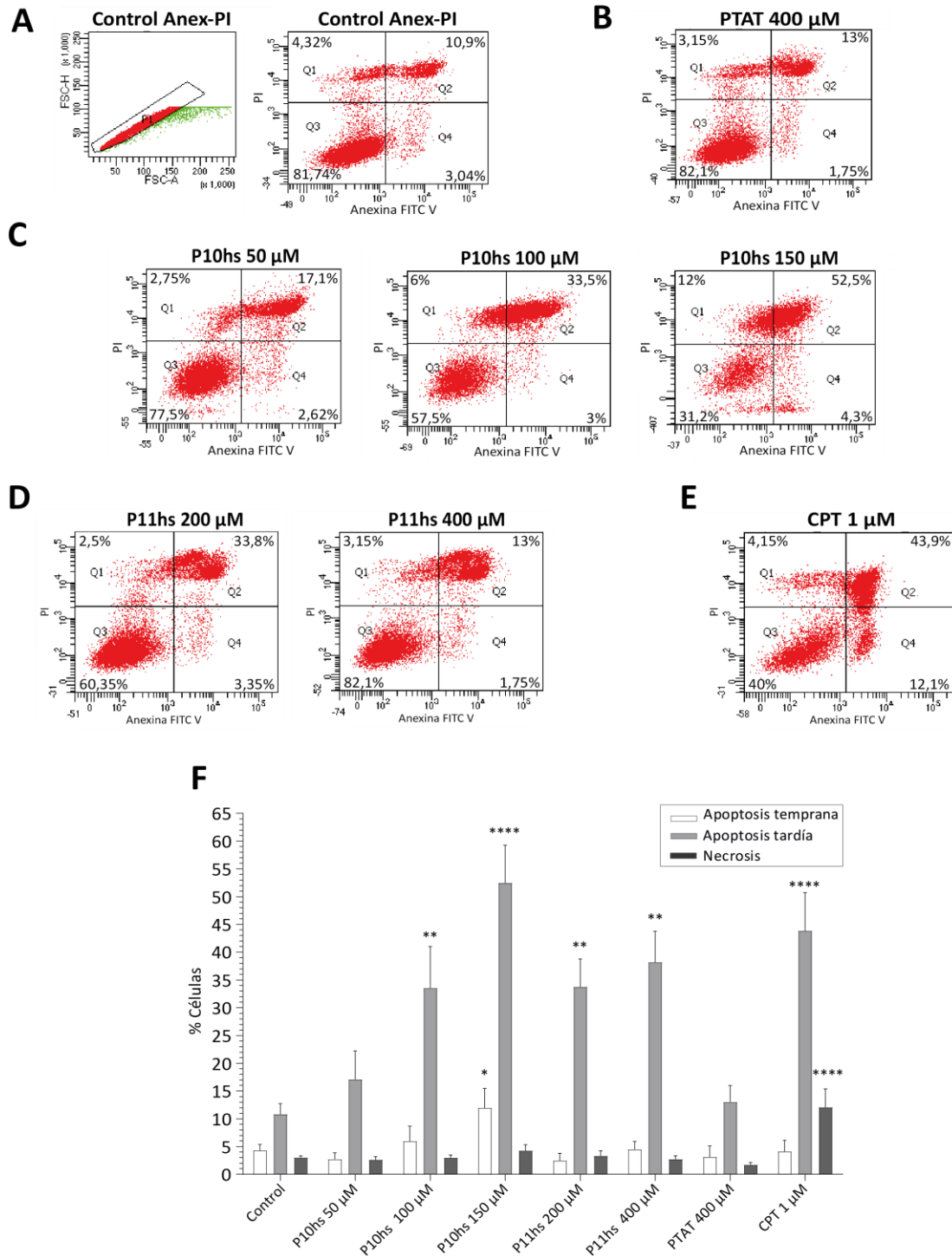
### 3.2. Incremento de apoptosis celular en presencia de péptidos penetrantes

Junto con los estudios de viabilidad celular y activación de caspasas, se cuantificaron las poblaciones de células necróticas y apoptóticas tras el tratamiento durante 24 h con diferentes concentraciones de péptidos penetrantes P10hs, P11hs y PTAT mediante citometría de flujo usando la doble tinción Anexina FITC V/yoduro de propidio (PI). La anexina se une a la fosfatidilserina expuesta al medio al entrar la célula en apoptosis y el PI penetra las membranas de las células deterioradas para intercalarse en el ADN cuando las células sufren necrosis [265]. La fluorescencia producida por la doble tinción Anexina/PI permitió distinguir la población de células vivas (cuadrante Q3), apoptóticas tempranas (Q4), apoptóticas tardías (Q2) o necróticas (Q1) tras el tratamiento con los péptidos sintéticos. En la **Figura 62**, se observan los gráficos de fluorescencia producidos por la doble tinción de Anexina-FITC V/PI de cada tratamiento celular y el porcentaje medio de células contabilizadas.

- Las células tratadas con el péptido de interferencia P10hs mostraron valores similares de necrosis y apoptosis temprana que las células control salvo el tratamiento con 150  $\mu\text{M}$  donde se obtuvieron valores de apoptosis temprana dos veces más que el control. Además, se alcanzaron niveles de apoptosis tardía ocho veces superior en las células tratadas con 100 y 150  $\mu\text{M}$  de P10hs respecto a las células sin tratar.
- Por otra parte, los tratamientos con el P11hs también presentaron valores similares de apoptosis temprana y necrosis que las células control. En cambio, los valores de apoptosis tardía se triplicaron para las concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$ .

Las células tratadas con el péptido PTAT a 400  $\mu\text{M}$  muestran valores de apoptosis temprana, tardía y necrosis parecidos a las células sin tratar sugiriendo que los cambios observados con los tratamientos de P10hs y P11hs son específicos de cada péptido y no de la secuencia penetrante TAT.

Es interesante destacar que el comportamiento que presenta el péptido P10hs es diferente al P11hs tanto en los ensayos de viabilidad celular, activación de caspasas e incluso en la degradación o inactivación del propio péptido. Estos datos podrían sugerir que los mecanismos de actuación de los péptidos de interferencia son diferentes entre sí.



**Figura 62. Detección de las distintas poblaciones celulares tras el tratamiento de 24 h con péptidos penetrantes mediante la tinción Anexina FITC V/PI por citometría de flujo.** (A-D) Gráficos representativos de la doble tinción con Anexina-FITC V/ PI de células HCT-116 sin tratar (A) y cultivadas en presencia de 400 µM PTAT (B); 50, 100 y 150 µM de P10hs (C); 200 y 400 µM de P11hs (D). Control positivo de apoptosis: 1 µM camptotecina (CPT) (E). En cada cuadrante se muestra el porcentaje medio de células vivas (Q3: anexina FITC V-/PI-); células apoptóticas tempranas (Q4: anexina FITC V+/PI-); células apoptóticas tardías (Q2: anexina FITC V+/PI+) y células necróticas (Q1: anexina FITC V-/PI+). (F) Diagrama de barras con los valores de apoptosis temprana, tardía y necrosis determinados por citometría de flujo de cada tratamiento. Los datos representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes. \*, p < 0,0332; \*\*, p < 0,0021; \*\*\*, p < 0,0002; \*\*\*\*, p < 0,0001.

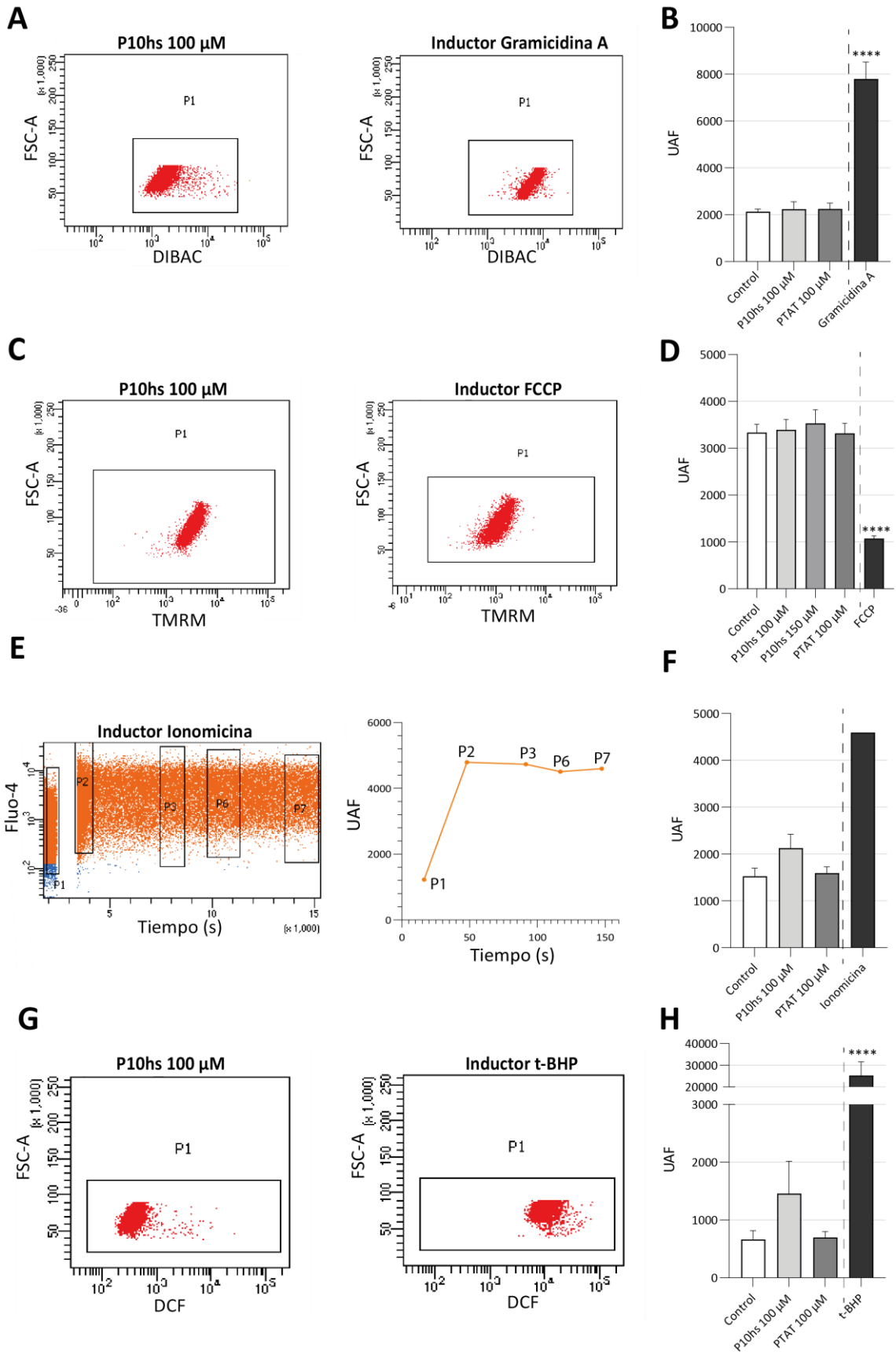
### 3.3. Cambios fisiológicos celulares inducidos por péptidos de interferencia

Para completar el análisis de los efectos producidos por los péptidos penetrantes en células de mamífero, se han analizado los posibles cambios fisiológicos producidos en la célula tras la exposición a dichos péptidos. Los parámetros estudiados han sido el potencial de membrana plasmático, potencial de membrana mitocondrial, niveles de calcio intracelulares y aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), específicamente de peróxido de hidrógeno.

Por una parte, se ha descrito que los péptidos penetrantes pueden entrar de forma endocítica en la célula, directamente por difusión o mediante macropinocitosis dependiente de energía [272]. Por tanto, es interesante determinar si se producen cambios en el potencial de membrana plasmático tras el tratamiento con los CPPs. Por otra parte, la exposición a CPPs podría producir cambios en el potencial de membrana mitocondrial ya que la integridad de la membrana está relacionada con procesos apoptóticos [273]. De igual modo, con el objetivo de utilizar el tratamiento con péptidos para fines terapéuticos, es necesario caracterizar la producción de ROS. Además, un aumento de estrés oxidativo, traducido como un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno, provocaría una entrada de calcio desde el medio extracelular y desde el retículo endoplasmático. Ese aumento de calcio en el citoplasma conduce a una entrada de calcio a las mitocondrias y al núcleo relacionando así el estrés oxidativo, el aumento de calcio intracelular y cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Asimismo, el calcio en la mitocondria y en el núcleo interrumpiría el metabolismo basal celular desarrollando mecanismos de apoptosis [274].

Para estudiar los cambios fisiológicos producidos en las células tras la exposición a los péptidos de interferencia se han usado diferentes sondas fluorescentes específicas de cada parámetro y se han cuantificado mediante citometría de flujo. La caracterización de dichos parámetros se realizó con células HCT-116 tratadas durante 24 h con P10hs y PTAT a 100  $\mu$ M, excepto para el potencial de membrana mitocondrial que se utilizó también P10hs a 150  $\mu$ M. En la **Figura 63** se representan los gráficos obtenidos por citometría de flujo de cada parámetro fisiológico donde se observa el desplazamiento de fluorescencia entre las células tratadas con P10hs y con inductor (**Figura 63**, izquierda). Además, se presentan los valores de fluorescencia de cada parámetro con cada tratamiento y con inductor, utilizado como control positivo, en un diagrama de barras (**Figura 63**, derecha).





**Figura 63. Caracterización de los cambios fisiológicos celulares producidos en células HCT-116 tras el tratamiento con péptidos penetrantes mediante citometría de flujo.** (A) Gráficos de fluorescencia con la sonda DIBAC para determinar el cambio en el potencial de membrana plasmático mediante citometría de flujo comparando el tratamiento con P10hs 100  $\mu$ M y el inductor gramicidina A. (B) Representación de los valores de fluorescencia de células sin tratar, tratadas con P10hs y PTAT a 100  $\mu$ M y con inductor. (C) Gráficos de fluorescencia con la sonda TMRM para determinar cambios en el potencial de membrana mitocondrial comparando el tratamiento con P10hs 100  $\mu$ M y el inductor FCCP. (D) Representación de los valores de fluorescencia de células sin tratar, tratadas con P10hs y PTAT a 100  $\mu$ M, P10hs a 150  $\mu$ M y con inductor. (E) Monitorización del aumento de los niveles de calcio con el inductor Ionomicina determinados por la sonda Fluo-4. (F) Representación de los valores de fluorescencia de los niveles calcio intracelulares de la población P1 de células sin tratar, tratadas con P10hs y PTAT a 100  $\mu$ M y con inductor. (G) Gráfico de fluorescencia de la sonda DCF para la cuantificación de los niveles de peróxido hidrógeno intracelulares comparando el tratamiento con P10hs 100  $\mu$ M y el inductor t-BHP. (H) Representación de los valores de fluorescencia de células sin tratar, tratadas con P10hs y PTAT a 100  $\mu$ M y con inductor. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia; FSC-A: forward scatter area. \*,  $p < 0,0332$ ; \*\*,  $p < 0,0021$ ; \*\*\*,  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

El potencial de membrana plasmático fue analizado usando el reactivo aniónico DIBAC, una sonda fluorescente que entra en las células despolarizadas uniéndose a proteínas intracelulares emitiendo fluorescencia. Si la membrana está hiperpolarizada, el fluoróforo no penetra en la célula y la fluorescencia disminuye. En el gráfico de la **Figura 63A**, se observa el cambio de fluorescencia entre las poblaciones celulares tratadas con el péptido P10hs y con el control positivo gramicidina A [266]. En este caso, no se han observado cambios significativos de este parámetro celular tras el tratamiento con los péptidos (**Figuras 63A y 63B**). No obstante, parece que provoca cierta hiperpolarización en la membrana plasmática.

Respecto al potencial de membrana mitocondrial, se utilizó el reactivo TMRM que se acumula en las mitocondrias de forma proporcional a su potencial de membrana. Como control positivo se usó el desacoplador de la fosforilación oxidativa mitocondrial FCCP [267]. En nuestros ensayos, no se observó un cambio significativo de este parámetro celular con el tratamiento de P10hs y PTAT (**Figuras 63C y 63D**).

Por otra parte, el cambio en los niveles intracelulares de calcio fueron medidos usando la sonda Fluo-4. En la **Figura 63E**, izquierda, se observa la monitorización de los niveles de calcio tras el tratamiento con el inductor Ionomicina [268]. El gráfico representa el aumento en los niveles de calcio respecto al tiempo producido por este iónoforo usado como control positivo. Con el tratamiento de P10hs, se observó un incremento de aproximadamente un 10% de los niveles de calcio respecto al nivel basal y el tratamiento con PTAT (**Figura 63F**).

Para completar el estudio de los cambios fisiológicos, se determinó el aumento en la generación de ROS, concretamente de peróxido de hidrógeno. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con P10hs a 100  $\mu$ M produjo un aumento, aunque no significativo, en la generación de ROS comparado con células sin tratar y tratadas con 100  $\mu$ M de PTAT (**Figuras 63G y 63H**).

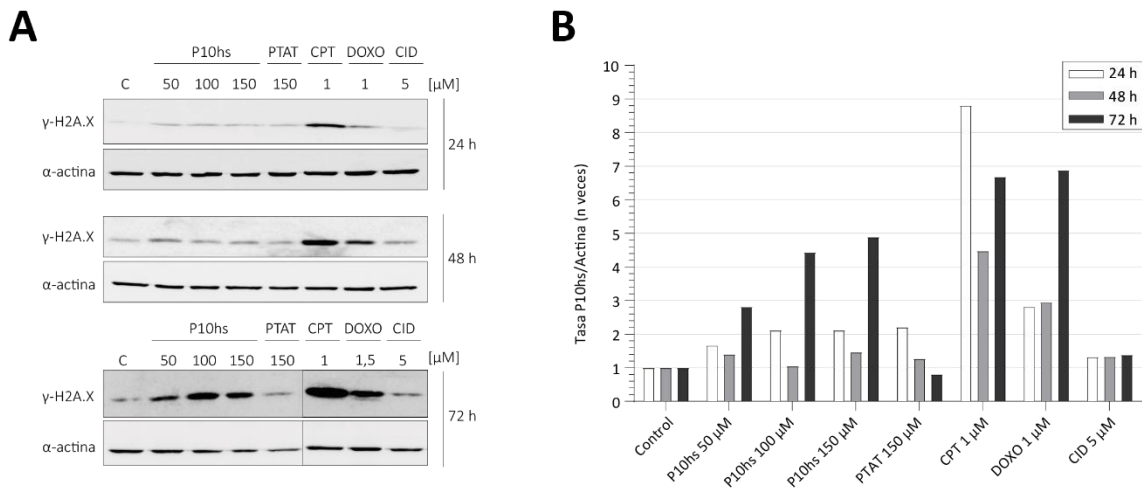
### **3.4. Estudio de la integridad del ADN de células HCT-116 en presencia de péptidos de interferencia**

Los tratamientos convencionales de quimioterapia aplicados en la actualidad que afectan a la transcripción de la ARN pol I tienen efectos genotóxicos en la célula. El daño al ADN que provoca el tratamiento con estos inhibidores sugiere que es una lesión específica que provoca el compuesto y que afecta a la biogénesis ribosomal [186]. La capacidad de obtener péptidos sintéticos que interfieran específicamente en otro punto de la vía de biogénesis sin causar efectos genotóxicos es una alternativa terapéutica en el tratamiento contra el cáncer. En este sentido, estudiamos la integridad del ADN tras el tratamiento con diferentes concentraciones de péptidos de interferencia P10hs y P11hs.

El objetivo de este ensayo preliminar es la comparación del posible daño al ADN tras el tratamiento con péptidos de interferencia respecto a células sin tratar (células control). Para realizar este ensayo se extrajo proteína de cultivos celulares tratados con diferentes concentraciones de péptido P10hs, P11hs y PTAT realizándose un WB con anticuerpos específicos contra la Ser139 fosforilada de la histona H2A.X. Esta histona de 14 kDa es una proteína nuclear que es fosforilada cuando se degrada el ADN. Esta forma modificada se denomina  $\gamma$ -H2A.X y es un indicador sensible de daño al ADN. La fosforilación de esta histona promueve la reparación del ADN y mantiene la estabilidad genómica [275]. La cuantificación de las bandas de WB de tratamientos a 24, 48 y 72 h se muestran en la **Figura 64** para el P10hs y la **Figura 65** para el P11hs. En este estudio también se ha incluido el tratamiento con el compuesto derivado de acridina CID-765471 (CID), identificado por el grupo del Dr. Manuel Serrano (IRB, Barcelona). Este compuesto produce disrupción nucleolar de una manera independiente de p53 a través de la degradación selectiva de una subunidad de la ARN pol I sin producir daño al ADN [276]. Por otra parte, se usaron como control de daño al ADN tratamientos con camptotecina (CPT) y doxorubicina (DOXO).

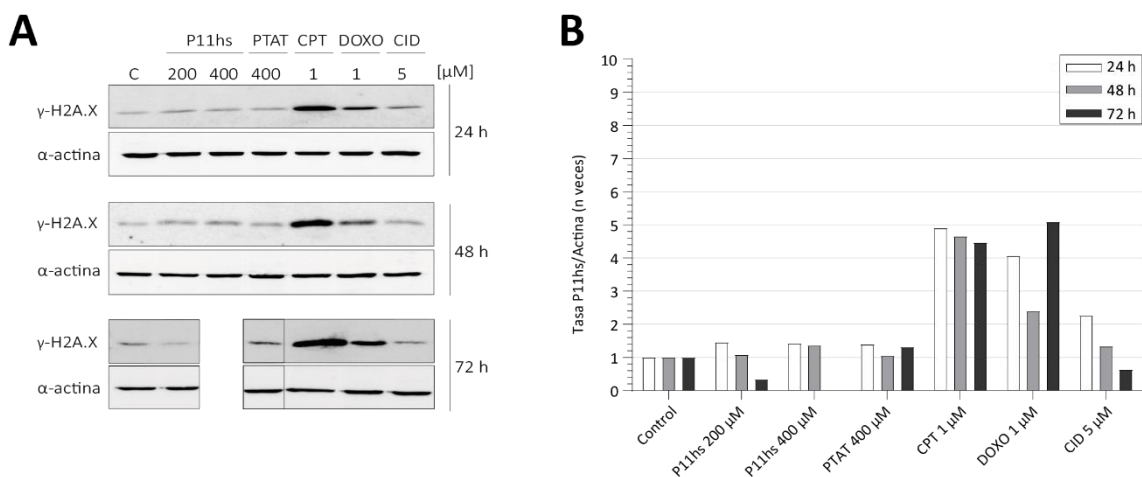
- En los tratamientos con P10hs a las 24 y 48 h, los valores de daño al ADN son similares a los obtenidos en presencia del péptido PTAT sugiriendo que la sola presencia de la

secuencia penetrante TAT genera un daño basal al ADN y no es específico de la secuencia del péptido. Sin embargo, se han cuantificado hasta 4 veces más de daño a las 72 h de tratamiento con el P10hs respecto a las células control.



**Figura 64. Estudio de la integridad del ADN tras el tratamiento con los péptidos penetrantes P10hs y PTAT.** (A) Western Blot de extractos de proteínas incubados con el marcador de daño al ADN anti- $\gamma$ -H2A.X y anti- $\alpha$ -actina (control de carga). (B) Cuantificación de los niveles de  $\gamma$ -H2A.X y  $\alpha$ -actina normalizadas respecto al control. C: células sin tratar; CPT: camptotecina; DOXO: doxorubicina; CID: CID-765471.

- Por otra parte, los tratamientos con el péptido P11hs no producen efectos significativos de daño al ADN comparados con las células sin tratar y con el péptidos PTAT a 400  $\mu$ M en los diferentes tiempos ensayados.

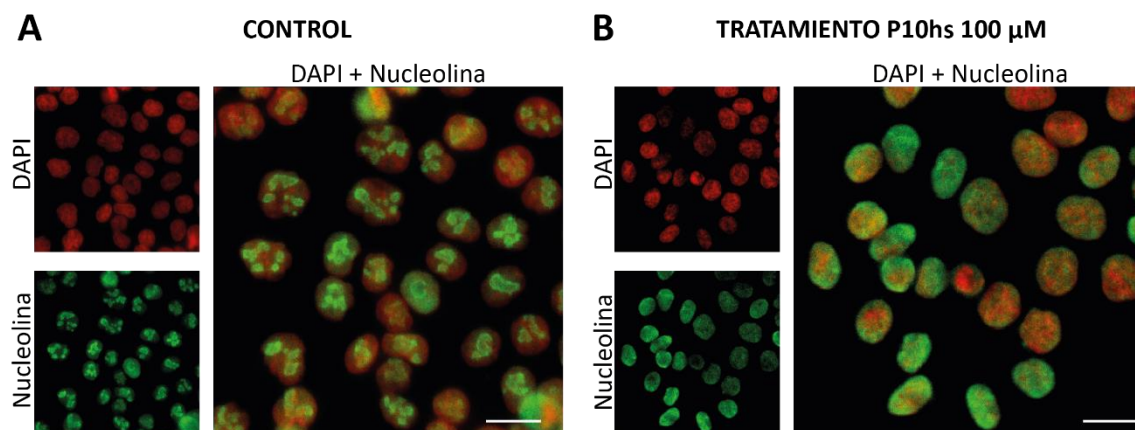


**Figura 65. Estudio de la integridad del ADN tras el tratamiento con péptidos penetrantes P11hs y PTAT.** (A) Western Blot de extractos de proteínas incubados con el marcador de daño al ADN anti- $\gamma$ -H2A.X y anti-actina (control de carga). (B) Cuantificación de los niveles de  $\gamma$ -H2A.X y  $\alpha$ -actina normalizadas respecto al control. C: células sin tratar; CPT: camptotecina; DOXO: doxorubicina; CID: CID-765471.

Como se recoge en la bibliografía, el compuesto CID-765471 no produce daño al ADN [276] comparado con las células sin tratar. Los resultados sugieren que la integridad del ADN tras el tratamiento con los péptidos P10hs y P11hs es similar que los del CID.

### 3.5. Deslocalización de la nucleolina tras el tratamiento con péptidos penetrantes

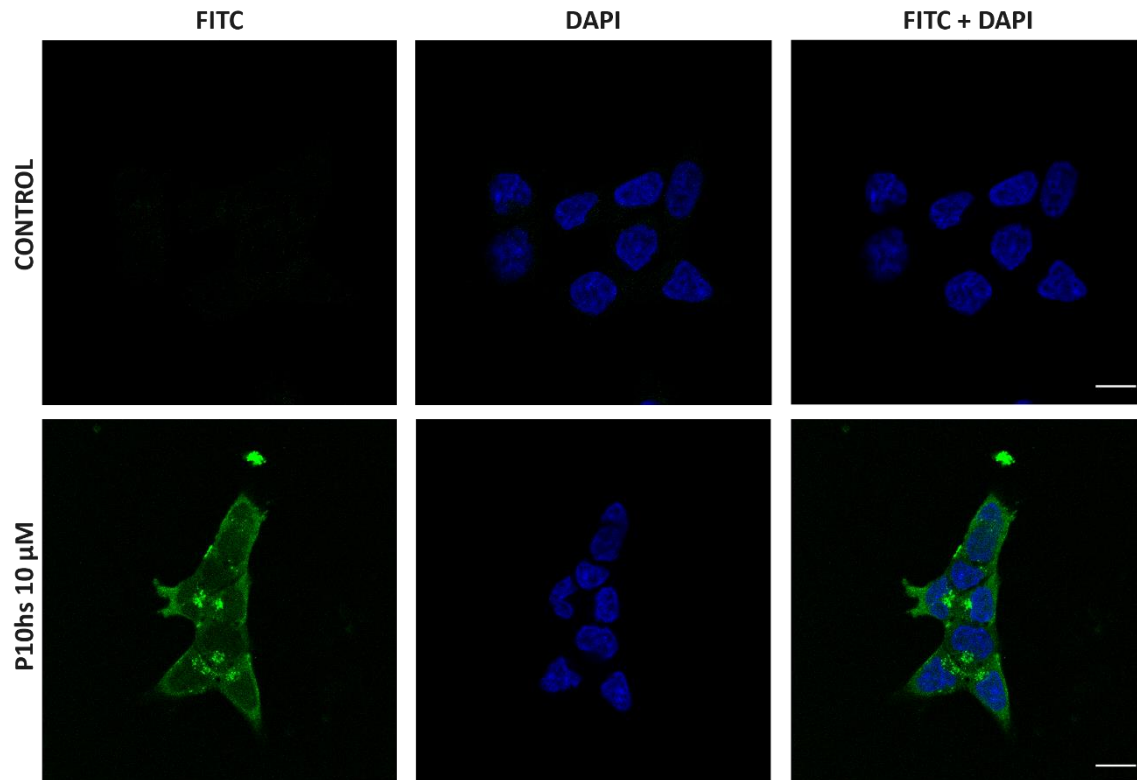
Las combinaciones de tratamiento de células que afectan a la viabilidad y al aumento de caspasas con respecto a células control, se continuaron con la monitorización de la integridad del nucléolo, indicación de estrés por alteraciones de la biogénesis ribosomal [178,179], utilizando anticuerpos contra la nucleolina humana. La nucleolina se muestra en color verde y claramente se localiza en los nucleosomas granulares en células no tratadas (**Figura 66A**). Mientras que tras un tratamiento de 24 h con el P10hs a 100  $\mu$ M, se observó una deslocalización de nucleolina extendida desde el nucléolo hasta el nucleoplasma indicando estrés nucleolar y subsecuente alteración de la biogénesis ribosomal (**Figura 66B**).



**Figura 66. Deslocalización de nucleolina tras el tratamiento con 100  $\mu$ M de P10hs durante 24 h.** (A y B) Imágenes de confocal de células HCT-116 sin tratar (A) y tratadas con 100  $\mu$ M de P10hs durante 24 h (B). La nucleolina se localiza claramente en los nucleosomas granulares cuando las células no están tratadas (color verde). En cambio, se encuentra extendida por todo el núcleo en las células tratadas. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (color rojo). Escala: 10  $\mu$ m.

A pesar de que se conoce que la secuencia TAT es usada como vehículo para la entrada de péptidos en la célula [212,213,271], decidimos examinar la localización celular del péptido P10hs marcado con FITC (*fluorescein isothiocyanate*) en células HCT-116. De esta manera, comprobamos que los efectos que observamos en la deslocalización de la nucleolina es debido a la presencia del péptido. El experimento mostró que el péptido FITC-P10hs se localizaba por

toda la célula, incluido el nucléolo, observándose algunos acúmulos mayoritariamente localizados en la región perinuclear (**Figura 67, Tabla 27**).



**Figura 67. Localización celular del péptido FITC-P10hs en células HCT-116.** Fotografías de microscopía confocal de células HCT-116 tratadas durante 24 h con péptido P10hs marcado con FITC a 10 μM (verde). DAPI fue usado como marcador de núcleos (azul). Escala: 10 μm.

## **V. DISCUSIÓN**





## 1. Estabilidad y conformación del subcomplejo Nop7 en solución

En levaduras, los factores de ensamblaje Nop7, Erb1 e Ytm1 se asocian en un complejo estable denominado complejo Nop7, al igual que sus ortólogos en mamíferos Pes1, Bop1 y WDR12, forman el complejo PeBoW [122,130,181]. La formación de este heterotrímero es esencial para la biogénesis ribosomal [47,126], pero se desconoce el papel específico que ejerce en el proceso de maduración ribosomal o la conformación del complejo en solución.

Diferentes estudios han descrito al complejo PeBoW como heterotrímero en la célula, siendo necesaria esta heteroligomerización para acoplarse a la prepartícula ribosomal [105,132,181]. Nuestros resultados confirman que el complejo PeBoW se encuentra como complejo ternario en la célula (**Figura 24**), tal y como también sugiere el artículo de Miles *et al.*, 2005. Además, la constante de afinidad de la interacción entre Erb1/Ytm1 y Erb1/Nop7, del orden de nM, sugiere que el complejo está sostenido por fuertes interacciones que permiten una alta estabilidad en solución (**Tabla 15**).

Gracias al avance de la criomicroscopía electrónica se han obtenido estructuras de la subunidad 60S en varios estadios de desarrollo que permiten diferenciar la disposición cronológica de las proteínas y los factores de ensamblaje ribosomal implicados en los diferentes estadios de desarrollo. En el primer estadio de maduración descrito, conocido como partícula Nsa-1 o state-A, se muestran las estructuras de Erb1 y Nop7 [22]. Sin embargo, en las últimas revisiones publicadas se sugiere que el acoplamiento a la partícula prerribosomal requiere la disociación previa del complejo PeBoW; de tal modo que se unirían al prerribosoma, por un lado el heterodímero Erb1/Ytm1 y por el otro Nop7, de manera independiente (**Figura 7**) [25,26]. No obstante, no hay evidencia experimental para este fenómeno. En base a esto, es posible que estas proteínas se encuentren como heterotrímero en la célula para aumentar la estabilidad de sus componentes, y posiblemente, ejercer otras funciones celulares, de modo que cuando intervienen en la formación del ribosoma, algún elemento no descrito facilitaría su incorporación a la partícula prerribosomal naciente por separado. Dicho de otro modo, si ocurriese el reclutamiento de Erb1/Ytm1 y Nop7 por separado y teniendo en cuenta que las afinidades de Erb1/Ytm1 y Erb1/Nop7 son del mismo orden, podría participar algún factor que medie la disociación del complejo Erb1/Ytm1 y Nop7, y su incorporación al prerribosoma en los estados iniciales. De igual forma, otro factor podría estar implicado en el desacoplamiento de Erb1/Ytm1 facilitando la salida del serpenteante N-terminal de Erb1 y la disociación de Nop7.

La publicación de la estructura de Ytm1 unida al segmento C-terminal de Erb1 de *C. thermophilum* (**Figura 14**) [179] redefinió las interacciones macromoleculares que mantienen al complejo PeBoW unido. Al principio se pensaba que el dominio  $\beta$ -*propeller* de Erb1 no era esencial para la interacción con Ytm1, ni tampoco para el crecimiento ni el ensamblaje del ribosoma [105], de hecho, en este modelo se proponía que Ytm1 fuera el núcleo del complejo PeBoW sugiriendo que el dominio  $\beta$ -*propeller* de Ytm1 interaccionase con Nop7 y con el N-terminal de Erb1. Posteriormente, se demostró que Erb1 era el núcleo del complejo interaccionando a través de sus dominios  $\beta$ -*propellers* con Ytm1 y a través de su N-terminal con Nop7, en la primera estructura publicada del heterotrímero completo formando parte de la partícula prerribosomal (**Figura 12**) [22] (PDB ID: 6ELZ). En dicha estructura, el extremo N-terminal de Erb1 se extiende de forma serpenteada a lo largo de toda la prepartícula interaccionando con multitud de proteínas ribosomales y factores de ensamblaje (**Figura 9**). Sin embargo, tenemos evidencias de que la conformación del extremo N-terminal de Erb1 cambia cuando forma parte del ribosoma. La conformación del N-terminal de Erb1 se encuentra cerca de la MBP y próxima al dominio  $\beta$ -*propeller* de Erb1, como indican los modelos atómicos obtenidos por NS-TEM (**Figura 39**) (**Figura 72, ANEXO I**). Por otro lado, los resultados obtenidos por SEC-MALS de ScPeBoW muestran un pico de refracción homogéneo (**Figura 24A**) al igual que los experimentos de SAXS que indican un complejo con forma globular (**Figura 26**), apoyan que el N-terminal sufre un reajuste conformacional encontrándose un complejo con forma globular en la célula. De hecho, nuestros resultados sugieren que el extremo N-terminal de Erb1 está plegado en torno a Nop7 terminando próximo al  $\beta$ -*propeller* de Erb1. Asimismo, si se encontrase el segmento amino-terminal de Erb1 de forma extendida, sin estar formando parte del ribosoma, sería una diana fácilmente digerible por proteasas. Por ello, nuestros resultados señalan que la conformación que adoptaría el complejo PeBoW en solución difícilmente sería como la que se ha descrito en el contexto prerribosomal.

Se intentó la resolución estructural del complejo apareciendo cristales del heterodímero Erb1/Nop7 y del complejo PeBoW (**Figura 24D**). El resultado de los reemplazos moleculares fueron el dominio  $\beta$ -*propeller* de Erb1 y el heterodímero Ytm1/Erb1 $_{\beta$ -*propeller*}, respectivamente, estructuras ya resueltas por nuestro grupos. Se conoce que Erb1, producida *in vitro*, es inestable y sufre una degradación proteolítica incluso en presencia de Nop7 e Ytm1 [130,131]. Este hecho posiblemente sea debido a la presencia de la secuencia PEST, situada entre el extremo N-terminal y el inicio del  $\beta$ -*propeller*. Esta secuencia es altamente flexible y desordenada lo que la convierte en una diana fácilmente digerible por proteasas en *E.coli* [132]. De hecho, tenemos

indicios de que la conformación que presenta el extremo N-terminal de Erb1 es intrínsecamente desordenada.

El estudio estructural del complejo PeBoW mediante NS-TEM permitió generar un modelo estructural del complejo PeBoW. Nuestro modelo sugiere que Erb1 sería el núcleo del complejo interaccionando a través de su dominio  $\beta$ -*propeller* con Ytm1 y el extremo N-terminal se situaría alrededor de Nop7 terminando próximo a un lateral del dominio  $\beta$ -*propeller*. Nop7, a su vez, se encontraría más plegada en torno al segmento de Erb1 (**Figura 39**) (**Figura 72, ANEXO I**). De hecho, si comparamos los modelos atómicos obtenidos por tinción negativa con la estructura del complejo PeBoW en el prerribosoma 60S, se observan reajustes conformacionales de la unión del complejo al ribosoma naciente que afectan especialmente a Nop7 y el extremo N-terminal de Erb1. Por tanto, la estructura del heterotrímero en solución difiere de la conformación presentada en la partícula prerribosomal.

Además, para validar nuestro modelo atómico establecimos una colaboración con el Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid) para realizar NS-TEM del complejo PeBoW de ambas especies con otro protocolo de tinción y recogida de muestras. Se obtuvieron dos volúmenes tridimensionales donde se consiguieron superponer las tres proteínas de forma satisfactoria (**Figuras 75, 76, 77 y 78, ANEXO I**). La disposición de Erb1 $_{\beta$ -*propeller*}/Ytm1/Nop7 en dichos volúmenes concuerda con la conformación de nuestro modelo atómico.

La calidad de los resultados obtenidos por NS-TEM, nos llevó a hacer crio-microscopía electrónica a pesar de no ser una partícula de gran tamaño. Inesperadamente, en los intentos iniciales mediante un barrido por cryo-EM, aparecieron partículas muy pequeñas cuyo tamaño no correspondía con las dimensiones del complejo. En las micrografías obtenidas parecía que el complejo estaba disociado evitando así obtener una estructura a mayor resolución (**Figura 74, ANEXO I**). Experimentos futuros usando diferentes condiciones podrían ayudar a mejorar la estabilidad del complejo en las gradillas de cryo-EM.

En este trabajo, también nos centramos en el estudio de las posibles interacciones que pudieran tener Nop7/Erb1/Ytm1 con otros factores de ensamblaje que actúan en estadios diferentes de maduración ribosomal. Entre estos factores se encuentran las proteínas Drs1, Has1, Noc2 y Nog1 (**Figura 44**).

Respecto a la ARN helicasa dependiente de ATP Drs1, se ha descrito que participa en la biogénesis de la subunidad 60S y también de la 40S [25], pero se desconoce tanto su estructura como su función en ambas subunidades. Su ortólogo en mamíferos, Ddx27, es indispensable

para la maduración del extremo 3' del pre-ARNr 27S y además interacciona con Pes1 y Bop1 (Nop7 y Erb1 en levaduras, respectivamente) [141]. El estudio también sugiere que esta interacción es dependiente de ARN y podría suceder previamente a su interacción con el prerribosoma [141]. En esta tesis, hemos analizado las interacciones de Drs1 con las proteínas del complejo PeBoW empleando proteínas recombinantes y ensayos de interacción directa *in vitro*. Nuestros resultados sugieren que Drs1 no interaccionaría con Nop7 ni con Ytm1, pero sí con Erb1 (**Figura 44C**). Para ello, se llevaron a cabo series de cristalización apareciendo cristales de CtDrs1 (**Figura 44D**). Sin embargo, debido a la falta de modelo estructural adecuado no se pudo realizar el reemplazo molecular de forma satisfactoria. Un futuro planteamiento para intentar resolver la estructura de CtDrs1 y obtener fases cristalográficas sería con cualquier método de átomos pesados (MAD, SAD, SIRAS, etc.). Por ejemplo, para MAD se podría purificar la proteína expresada con selenio-metionina y cristalizarla en las condiciones optimizadas en esta tesis. En futuros experimentos podríamos llevar a cabo otros ensayos biofísicos para estudiar su interacción directa con un mayor rango de sensibilidad en presencia de ARNr que podría mediar la interacción entre Drs1/Nop7 y Drs1/Erb1. Además, para estudiar las funciones moleculares de Drs1, planeamos colaborar con uno de los grupos líderes en biogénesis ribosomal, el Dr. John Woolford (Carnegie Mellon, Pittsburg, EEUU).

En nuestra búsqueda de proteínas que interaccionan con el complejo PeBoW, hemos considerado otros factores de ensamblaje ribosomal, como las proteínas Has1 y Noc2, ambas involucradas en la biogénesis de las subunidades ribosomales 40S y 60S [277,278]. Respecto a Has1, aunque conocemos su estructura cuando forma parte de la prepartícula 60S, decidimos estudiar la interacción con las proteínas del complejo PeBoW fuera del contexto prerribosomal. Nuestros resultados indican que la interacción *in vitro* entre Has1 y Erb1 ocurre de forma débil o transitoria (**Figuras 44A y 44B**). Posiblemente, al igual que sucede con Drs1, el ARNr esté mediando las interacciones entre ambas proteínas. En relación con Noc2, no se ha conseguido observar interacción con los componentes del PeBoW a través de ensayos de precipitación y BLI debido a la unión inespecífica de Noc2 a la resina y al biosensor. Los esfuerzos futuros estarán encaminados al uso de otras tecnologías para establecer la interacción entre estas proteínas y obtener la estructura de Noc2 aislada o con el complejo PeBoW.

El complejo PeBoW fue un complejo inicialmente descrito por Du and Stillman en 2002. Mediante experimentos de inmunoprecipitación identificaron a Nop7, denominada originariamente como Yph1p, y la relacionaron con biogénesis de la subunidad 60S. En este trabajo además demostraron que la falta de expresión de Nop7 detenía el ciclo celular en las fase G1 o G2 lo que la relaciona también con proliferación celular [120]. Asimismo, en nuestros

experimentos de TAP TAG con Nop7 identificamos proteínas que participan en proliferación celular como Bat1p o caseína quinasa II, entre otras. Estas proteínas también están implicadas en otros procesos celulares relacionados directamente o indirectamente con proliferación celular como biosíntesis de aminoácidos y organización del citoesqueleto (**Figura 49, Tabla 24**). Por tanto, el análisis de las funciones de las proteínas identificadas en el TAP de Nop7 correlaciona con otras funciones ya descritas de Nop7 independientes de su función en el prerribosoma.

Por otra parte, comparamos las proteínas que habían aparecido en nuestro análisis con otras interacciones descritas en la red virtual Proper V.1.0. Este servidor se basa en la tecnología PROPER-seq que permite mapear interacciones proteína-proteína en masa mediante secuenciación a escala transcriptómica originando mapas de interacciones con una alta tasa de validación [279]. En esta comparación encontramos coincidencias que relacionan a Nop7 con formación y regulación del citoesqueleto (fibronectina, moesina, miosina-10 y miosina-9) y en regulación transcripcional y reparación del ADN (HMGB2 (high mobility group B box 2)).

En el caso de Ytm1, también existe correspondencia entre los resultados de TAP TAG, BioGRID y Proper V.1.0. Originariamente, Ytm1 se describió como proteína de unión a microtúbulos [159] y en todos los análisis han aparecido proteínas relacionadas con microtúbulos, citoesqueleto y morfología celular. Por otro lado, también han aparecido otras proteínas implicadas en regulación transcripcional y control del ciclo celular (**Figura 46, Tabla 22**).

Otro aspecto que apoyaría las funciones de organización del citoesqueleto y crecimiento celular de Nop7 e Ytm1 sería la forma alargada que presentan las células HCT-116 tratadas con el péptido penetrante P10hs. El cambio de morfología tras la exposición a los péptidos podría deberse a la inhibición del complejo Erb1/Ytm1. La interacción del péptido P10hs con Ytm1 competiría por la unión de Erb1 lo que impediría la formación del heterodímero, lo que produciría una acumulación de Ytm1 y, por tanto, una desregulación de sus funciones celulares. Por otra parte, algunas de las proteínas identificadas en el TAP TAG de Nop7 también estaban implicadas en el crecimiento y organización del citoesqueleto (**Figura 49, Tabla 24**). De hecho, Nop7 también se había relacionado previamente con los microtúbulos y la organización del huso mitótico [124,151]. Tomando en consideración todas estas observaciones, la exposición al P10hs también debería producir una acumulación de Nop7, ya que no se originaría el complejo PeBoW, lo que podría provocar una desregulación de la formación del citoesqueleto.

Se identificaron proteínas comunes tanto en el análisis de TAP TAG de Nop7 como en el de Ytm1. De esta forma, podríamos suponer que ambas proteínas están involucradas en ciertos procesos celulares formando parte del complejo PeBoW y no de manera individual. Entre algunas de estas proteínas se encuentran chaperonas y proteínas implicadas en regulación y remodelamiento de cromatina. Además, en el servidor Proper V.1.0, aparecían proteínas que interactúan con Nop7 e Ytm1 también implicadas en las funciones anteriormente descritas y en otras como la participación en transcripción y traducción.

Durante la purificación de Nop7-TAP aparecieron los componentes del subcomplejo Rix1 (Ipi3, Ipi1 y Rix1) y la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1 en alta proporción (**Tabla 25**). Se ha descrito la participación del subcomplejo Rix1/Rea1 en los estadios tardíos de maduración de la pre-60S, concretamente, en los eventos de remodelación y estabilización de la rotación de la ribonucleoproteína 5S, que, sin embargo, no involucran a ninguno de los componentes del PeBoW [33]. Teniendo en cuenta que la disociación de Nop7 y Erb1/Ytm1 ocurre en el nucléolo y que la acción del subcomplejo Rix1 ocurre en el nucleoplasma, no se comparte ninguna proteína entre el estadio final en el nucléolo con los acontecimientos de remodelación en el nucleoplasma, por lo que, *a priori* no parece existir una relación entre estas proteínas. No obstante, la presencia de Rix1, Ipi1, Ipi3 y Rea1 en el TAP de Nop7 no es la única evidencia de su posible interacción con Nop7 ya que en la base de datos de BioGRID también se relaciona a Nop7 con Rix1 y Rea1 aunque no con las demás proteínas del complejo (Ipi1 e Ipi3). Por tanto, una posible explicación podría ser que, tras su disociación de la prepartícula ribosomal, Nop7 estableciese contactos con el subcomplejo Rix1 y Rea1. La posible interacción entre Nop7 y el subcomplejo Rix1 y Rea1 podría sugerir que Nop7, cuando se disocia del prerribosoma, podría interactuar con estas proteínas interviniendo en los estadios tardíos de la biogénesis ribosomal que ocurren en el nucleoplasma, ayudando a estabilizar la maduración de la prepartícula 60S. Esta hipótesis no ha sido descrita anteriormente y sería una nueva vía de investigación.

Es interesante remarcar la alta abundancia de Ipi3 en el análisis peptídico de Nop7-TAP (**Figura 50, Tabla 25**). La proteína Ipi3, no relacionada anteriormente con Nop7 en los experimentos de BioGRID, podría interactuar con Nop7 en otras funciones fuera del contexto prerribosomal. Se conoce que Ipi3 se requiere para el inicio de la replicación del ADN en células humanas ya que un estudio con su homólogo en humanos, WDR18, indica que la falta de esta proteína altera la asociación de la cromatina con el complejo de inicio de la replicación [280]. Otros estudios identificaron no sólo a Ipi3 sino a todo el subcomplejo Rix1 como componentes esenciales para la formación de la maquinaria de replicación [281]. Estas funciones,

independientes de la biogénesis ribosomal, correlacionan también con las identificadas en el TAP de Nop7. Estos hallazgos sugieren que Nop7 podría ejercer junto con Ipi3 y el resto del subcomplejo Rix1 otras funciones celulares fuera del ribosoma interviniendo en los mecanismos de replicación del ADN.

Por otra parte, la AAA<sup>+</sup>-ATPasa Rea1, no sólo participa junto con el subcomplejo Rix1 en las etapas finales de remodelamiento de la 60S, sino que también media la disociación del heterodímero Erb1/Ytm1 durante de la maduración de la prepartícula desde el nucléolo al nucleoplasma (**Figuras 7 y 11**) [33,121]. Sin embargo, se desconoce en detalle la interacción entre estos dos componentes debido a su interacción dinámica [102,282]. El desacoplamiento de Erb1/Ytm1 conlleva una cascada de eventos de remodelación asociados con la salida del N-terminal serpenteante de Erb1. Una posible explicación de la aparición de Rea1 en el TAP de Nop7 podría ser por la interacción entre Rea1/Ytm1 durante la maduración ribosomal. Por otra parte, los experimentos de BioGRID y el análisis de TAP TAG también relacionan a Ytm1 con Rix1 (datos no mostrados). Sin embargo, no hay que destacar la aparición de Rix1 como ligando de Ytm1 ya que puede deberse a la capacidad de Rix1 de unirse a Rea1.

Para validar la relevancia de las interacciones descritas por esta técnica, se precisan experimentos adicionales usando ensayos de doble o triple híbrido en levaduras así como ensayos de interacción *in vitro* con las proteínas purificadas que podrían ayudar a clarificar la funcionalidad de las interacciones propuestas.

## **2. Búsqueda de nuevos puntos de intervención contra la biogénesis ribosomal**

La biogénesis ribosomal ha ido acumulando atención recientemente como una nueva diana terapéutica para el cáncer, ya que se ha observado que la proliferación celular puede bloquearse mediante la inhibición de la producción de nuevos ribosomas [186]. Las células cancerígenas se dividen rápidamente necesitando una alta tasa de síntesis de ribosomas y, por tanto, son particularmente dependientes de los niveles de transcripción de la ARN pol I [176,177]. A pesar de la complejidad del proceso de maduración ribosomal por el gran repertorio de dianas potenciales que presenta, solamente se conocen unos cuantos inhibidores químicos de la biogénesis ribosomal [373]. Los intentos iniciales de inhibición de la biogénesis ribosomal se han centrado en la inhibición de la ARN pol I. Hasta la fecha, se han descrito varios inhibidores de la ARN pol I que están actualmente bajo investigación para el tratamiento del cáncer

[204,283,284]. Aunque estos compuestos que se dirigen a la ARN pol I son extremadamente prometedores, presentan efectos adversos, como daño al ADN, que posiblemente contribuyen al perfil de toxicidad y mecanismos de resistencia disminuyendo su eficacia [186]. De todos los inhibidores de la ARN pol I en desarrollo, solamente el compuesto CX-5461 ha llegado a ensayos clínicos en cánceres hematológicos y sólidos en Australia y Canadá, sin embargo, los resultados han mostrado daño al ADN [186]. Estas observaciones sugieren que puede ser necesario buscar otros puntos de intervención durante la maduración ribosomal. De hecho, esta fue una de las razones que nos llevaron a adentrarnos en el desarrollo de péptidos sintéticos que tienen como diana la biogénesis ribosomal como alternativa terapéutica al tratamiento contra el cáncer.

En este trabajo, hemos abordado un enfoque diferente diseñando péptidos dirigidos a inhibir la interacción entre Erb1 e Ytm1, que como ya se ha comentado son dos factores esenciales de la biogénesis ribosomal. En primer lugar, detectamos residuos clave (*hotspots*) en la superficie de interacción del complejo a partir la estructura cristalográfica de Erb1/Ytm1 (PDB ID: 5CXB) junto con el análisis de escaneo de alaninas *in silico*. Los residuos de CtErb1 y de CtYtm1 que mostraron los mayores valores de  $\Delta G$  en el escaneo de alaninas, se encuentran precisamente en las áreas de interacción descritas del complejo Erb1/Ytm1 (**Figura 52, Tabla 26**). Nuestros resultados sugirieron que la superficie de Erb1 parece ser más adecuada para la selección de péptidos dirigidos al complejo Erb1/Ytm1 en comparación con Ytm1, que a pesar de mostrar cierto grado de agrupamiento, revela residuos de interacción dispersos y regiones fragmentadas (**Figuras 52 y 54**). Por tanto, la combinación del análisis de los *hotspots in silico* con el análisis de contacto en la interfaz del complejo y la conservación evolutiva de residuos nos llevaron a diseñar un conjunto inicial de seis péptidos, tres derivados de CtErb1 y tres de CtYtm1 (**Figura 55, Tabla 27**), que se esperaban que interfirieran con la formación del complejo (**Figuras 52 y 55, Tabla 27**). La interacción de los péptidos con sus proteínas diana se investigó mediante ensayos biofísicos que dieron resultados prometedores para algunos péptidos derivados de Erb1. En cambio, no obtuvimos unos resultados experimentales claros de unión para péptidos derivados de Ytm1 (**Figuras 56 y 57**).

Para realizar el cribado de los mejores péptidos sintéticos que afectasen en mayor medida al complejo Erb1/Ytm1, se llevaron a cabo ensayos de competición mediante interferometría de bicapa con los seis péptidos inicialmente diseñados mostrando tres de ellos cierto grado de interferencia en la formación del complejo (**Figura 56**). Los mejores candidatos (P1, P3 y P6) se ensayaron adicionalmente inmovilizando el péptido con biotina al biosensor (**Figura 57**), lo que nos llevó a detectar algunas diferencias para el P6 en los ensayos de competición con respecto al péptido biotinilado en los ensayos de interferometría de bicapa. La



biotina en sí misma podría estar afectando la unión a Erb1, pero es poco probable que esto ocurra ya que el N-terminal del P6 no está involucrado en la interacción según la estructura del complejo Erb1/Ytm1 [130]. Una diferencia obvia es que la inmovilización del péptido podría estar impidiendo la adopción de una conformación del P6 requerida para que la interacción con Erb1 pudiera tener lugar.

Por otro lado, la inmovilización del péptido P1 biotinilado también podría explicar la ligera diferencia que se observa en la  $K_D$  obtenida por BLI y MST. La  $K_D$  obtenida de P1 biotinilado/CtYtm1 mediante BLI era  $3,342 \times 10^{-5}$  M y de P1/CtYtm1 por MST  $8,1965 \times 10^{-6}$  M (**Figuras 57 y 59, Tabla 30**). La diferencia es menos de un orden de magnitud y puede deberse a que en el experimento BLI, el P1 biotinilado está inmovilizado al sensor mientras que en MST la interacción tiene lugar con el P1 en solución.

Los ensayos de termofluor permitieron determinar cambios de estabilidad térmica de CtYtm1 en presencia de los péptidos. Los resultados no fueron reproducibles para CtErb1 aislado, lo que impidió determinar el desplazamiento térmico en los ensayos de CtErb1-P6. No obstante, sí se pudo determinar de manera precisa los cambios en la  $T_d$  para CtYtm1-P1 (**Figura 58**). Sin embargo, en los ensayos de termofluor de CtYtm1, en presencia de P3, no se observó un cambio en la  $T_d$  significativo. Este resultado lo único que nos indica es que la presencia de P3 no aumenta la estabilidad de CtYtm1 con lo que no podemos descartar que el P3 no interaccione con CtYtm1.

MST también representó una buena alternativa para evaluar la interacción de CtErb1 con los péptidos de interferencia. Por una parte, se determinó la afinidad de CtYtm1-P1 (**Figura 59**) y, por otra parte, se consiguió detectar una interacción inicial para CtYtm1-P3. Sin embargo, no pudimos realizar MST con P6 ya que CtErb1 presentaba problemas de estabilidad o poseía residuos hidrofóbicos expuestos. De hecho, no sólo la disposición del extremo N-terminal de Erb1 en el prerribosoma, sino también las evidencias experimentales que presentamos indican que la parte N-terminal de Erb1 está intrínsecamente desordenada y quizás esto podría ser una explicación para no poder realizar fructíferamente este ensayo y los ensayos de estabilidad de termofluor de CtErb1-P6.

Por otra parte, las limitaciones experimentales con la concentración máxima de ligando no permitieron el cálculo de la estequiometría de unión del complejo CtYtm1-P1 ya que no pudimos obtener una curva de saturación. El cálculo de la estequiometría por MST requiere una curva de saturación que se obtiene a concentraciones muy por encima de la  $K_D$ , típicamente entre 20-50 veces mayor. Esto significa que los cálculos de estequiometría sólo son posibles con

$K_D$  elevadas, normalmente en el rango de nM. En nuestro ensayo, existe una limitación experimental para la concentración máxima del *stock* de P1 debido a problemas de solubilidad y no podemos alcanzar una concentración mucho más alta de 2-3 mM en el experimento MST. Esta limitación condiciona las concentraciones máximas de la diana para detectar la interacción.

Además, varios de los péptidos seleccionados no mostraron ningún efecto sobre la interacción entre Erb1/Ytm1 en los ensayos de BLI. Por ello, podría considerarse la utilización de una metodología alternativa para la detección de interacciones de baja afinidad en BLI o proteínas con áreas expuestas de potencial hidrofóbico en termofluor. No obstante, sí se ha detectado interacción directa *in vitro* de P1 y Biot-P1 con CtYtm1 en un rango de mM bajo indicando que al menos, en estas condiciones, BLI es un enfoque metodológico adecuado.

Respecto al diseño de los péptidos, la mayoría de los residuos que contribuyen a la interacción del complejo se encuentran dentro de bucles o lazos. La estructura del heterodímero Erb1/Ytm1 indica que el área de interacción de Ytm1 se incluye la cara superior del dominio  $\beta$ -*propeller* que actúa como plataforma de acoplamiento para el lateral del  $\beta$ -*propeller* de Erb1 [130]. En esta región, los lazos de Ytm1 que interaccionan con Erb1 tienden a ser más pequeños que los lazos de Erb1 que interaccionan con Ytm1 (**Figura 55**), por lo que existe una limitación en Ytm1 a la hora de diseñar los péptidos de interferencia.

Vale la pena mencionar que el único péptido derivado de Ytm1 que proporciona algún indicio de unión es, curiosamente, el más corto (péptido P6). Sin embargo, todos los péptidos seleccionados incluyen varios residuos adicionales a los directamente implicados en la interacción. De hecho, los péptidos P1 y P3 derivados de Erb1, incluyen algunos residuos de las cadenas  $\beta$  “vecinas” (**Figuras 53 y 55**) que podrían ayudar a estabilizar una conformación más adecuada para la interacción con Ytm1.

Podemos confirmar que el péptido de interferencia P1 ha sido el único péptido que ha cumplido todos los criterios de selección de interacción con CtYtm1. Los ensayos con cultivos celulares se realizaron otorgándole una mayor prioridad a P1 y es además en el que se ha centrado nuestra investigación. Por supuesto, también habría que evaluar la acción *in vivo* de los péptidos P3 y P6, aunque P1 es el que tiene la mayor prioridad.

El hecho de que podamos interferir con péptidos sintéticos en una interacción proteína-proteína en un proceso tan complejo como la biogénesis ribosomal, abre las posibilidades de diseñar péptidos contra otros complejos celulares. Además, el estudio de las interacciones del complejo PeBoW con otros factores de ensamblaje como Nog1, Noc2, Drs1 y Has1 también podría utilizarse para diseñar péptidos de interferencia y bloquear el procesamiento del ARNr.

De hecho, existe una estructura de crio-microscopía reciente que involucra a Nog1 con Tif6 que podría ser usada para el diseño de dichos agentes de interferencia [285].

Anteriormente habíamos demostrado que alterar la superficie de interacción entre los factores de ensamblaje Erb1 e Ytm1 dificulta la proliferación celular en levaduras [130]. Ahora hemos desarrollado un péptido derivado de la secuencia de Erb1 capaz de interactuar con Ytm1 en un rango de mM bajo e interferir en la formación del complejo Erb1/Ytm1 afectando negativamente a esta extensa y altamente conservada interacción proteína-proteína. Este resultado abre la posibilidad de investigar la acción *in vivo* de dianas aguas abajo de la ARN pol I en el proceso de biogénesis ribosomal. Sería interesante saber si los efectos que se producen al bloquear la biogénesis ribosomal aguas abajo son diferentes de los que se ocasionan al bloquear el proceso mediante la inhibición de la ARN pol I.

Existen diferentes aproximaciones experimentales para la administración e internalización de péptidos en células en cultivo. Una de ellas es mediante el diseño de péptidos penetrantes (CPP) o también la inclusión del péptido en nanopartículas con el fin de probar futuras estrategias inhibitoras *in vivo*. En este trabajo hemos desarrollado CPPs con una lanzadera de internalización localizada en el extremo N-terminal para la entrada en la célula. Los CPPs se han diseñado con el péptido TAT, codificado por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), para penetrar la membrana celular en concentraciones micromolares sin causar daño significativo a la membrana [212,271]. En nuestro estudio, el péptido FITC-(TAT)-P10hs se extendía por toda la célula observándose también algunos agregados o acúmulos alrededor del núcleo indicando que el péptido P10hs ocupa todos los compartimentos celulares (**Figura 67**).

Con el objetivo último de utilizar el tratamiento de péptidos como terapia anticancerígena, decidimos valorar el efecto que producía en la supervivencia celular estimando una IC50 aproximada para cada péptido. El péptido P10hs comienza a comprometer la viabilidad celular a partir de 100  $\mu$ M teniendo una IC50 aproximada de 150-200  $\mu$ M. En cambio, el P11hs presenta una IC50 aproximada de 400  $\mu$ M (**Figura 60**). Este hecho sugiere que el P10hs sería un mejor candidato para el tratamiento de células cancerígenas al ocasionar un mayor efecto en la supervivencia celular a una menor concentración.

Además, nuestros resultados sugieren un comportamiento distinto entre los péptidos P10hs y P11hs. Por una parte, los valores de activación de caspasas son consistentes con los valores de apoptosis tardía monitorizada por citometría de flujo a las 24 h de tratamiento con P10hs siendo ambos parámetros proporcionales a la concentración de péptido (**Figuras 60 y 62**). Sin embargo, con tratamientos de P11hs los valores de activación de caspasas no correlacionan

con los de apoptosis tardía mediante citometría (**Figuras 60 y 62**). El análisis integrado de las acciones de los péptidos P10hs y P11hs en viabilidad celular, activación de caspasas e inducción de apoptosis sugiere que cada péptido podría actuar por distintos mecanismos y provocar diferentes efectos en la célula. Es interesante señalar los bajos niveles de apoptosis temprana determinados por citometría de flujo a las concentraciones ensayadas de P10hs y P11hs (**Figura 62**). Posiblemente, la realización de tratamientos a tiempos menores de 24 h o la utilización de menores concentraciones de péptido podría posibilitar la detección de este parámetro. Por otra parte, la recuperación en la viabilidad celular y la disminución de activación de caspasas observadas a las 48 h de tratamiento con P10hs, sugiere que el péptido P10hs no estaba ejerciendo el mismo efecto que al principio del tratamiento. Estos resultados parecen indicar que el P10hs se inactiva o sufre una degradación proteolítica. Para comprobar esta suposición, sometimos a las células a un tratamiento continuado con P10hs nuevo y P10hs conservados a 4 y -20°C. Observamos que la viabilidad celular disminuía en presencia de péptido nuevo al contrario de lo que sucedía con péptido reciclado (**Figura 61A**), lo que confirma que la actividad del péptido P10hs en la célula disminuye con el tiempo. De forma contraria, los efectos que produce el péptido P11hs nuevo son parecidos a los que hacen los péptidos P11hs reciclados (**Figuras 61B y 61C**). Por tanto, los resultados de dichos ensayos parecen sugerir que la actividad del péptido P11hs no disminuye en el tiempo. Esta deducción también se relaciona con el aumento de actividad caspasa conforme aumenta el tiempo de tratamiento con P11hs. Teniendo en cuenta estos datos, parece que el P11hs continua ejerciendo su función y no sufre una degradación proteolítica o inactivación tan acusada como el P10hs. En otro ensayo, analizamos el efecto en el tiempo con tratamientos con P10hs y P11hs, comparando la viabilidad celular tras una exposición continua durante 72 h con ambos péptidos y una renovación de los péptidos cada 24 h, midiendo la supervivencia final a las 72 h. Este experimento muestra que la viabilidad celular no decae tras 72 h de exposición con P10hs al contrario que P11hs, el efecto que produce el péptido 10hs se ve reducido en el tiempo en mayor medida que el P11hs, sugiriendo que el P11hs es más estable que el P10hs (**Figura 60**).

A partir de todos estos datos, se podrían desarrollar estrategias sintéticas para aumentar la estabilidad de los péptidos en solución. Una de ellas es a través del uso de las formas estereoquímicas D de los aminoácidos [286]. El cambio de quiralidad de los L-aminoácidos a los isómeros D cambia la conformación del péptido haciéndolo invisible a la degradación enzimática por proteasas ya que los aminoácidos que forman las proteínas, en prácticamente todos los seres vivos, son casi exclusivamente la forma estereoquímica L. De esta manera, se consigue aumentar la vida media del péptido en el medio [286,287]. Sin embargo, para evitar posibles

efectos en la actividad del péptido producido por la conversión de las formas L a D, se sintetizaron los péptidos con la forma D pero con la secuencia invertida manteniendo así la estereoquímica del péptido y recientemente se han realizado algunos ensayos preliminares de supervivencia celular cuyos resultados parecen indicar que los péptidos D presentan una mayor estabilidad que los péptidos L.

Por otra parte, los efectos observados en todos los ensayos por los péptidos P10hs y P11hs parecen ser específicos del propio péptido y no de la secuencia penetrante TAT en sí misma ya que no ocasiona efecto significativo ni en viabilidad celular ni en activación de caspasas con tratamientos de 24 y 48 h (**Figura 60**). No obstante, a las 72 h de exposición con el PTAT, se observa un aumento de cinco veces en la activación de caspasas y una disminución en la viabilidad celular con los péptidos PTAT reutilizados (**Figuras 60 y 61**). Este hecho podría explicarse por las altas concentraciones que utilizamos de péptido PTAT (100-600  $\mu\text{M}$ ) ya que estudios anteriores sugieren que la secuencia TAT produce baja toxicidad celular [288].

Para un análisis completo de los efectos producidos por los CPPs, decidimos estudiar los posibles cambios en el potencial de membrana plasmático, potencial de membrana mitocondrial, niveles intracelulares de calcio y producción de estrés oxidativo. En nuestros ensayos, el tratamiento con P10hs no parece inducir despolarización en el potencial de membrana plasmático (**Figura 63B**). Estos datos son consistentes con estudios anteriores que describen que los CPPs son capaces de penetrar las membranas celulares sin apenas perjudicar la integridad de la bicapa lipídica [288].

Por otra parte, con tratamientos con el péptido P10hs no hemos observado cambios en el potencial de membrana mitocondrial (**Figura 63D**). Este resultado se contrapone con la activación de las caspasas 3/7 y apoptosis observada por citometría de flujo con cada tratamiento. Han sido descritos dos mecanismos principales de activación: la vía intrínseca y extrínseca [289]. El mecanismo extrínseco se produce por señales mediadas por receptor desencadenando una permeabilización de la membrana mitocondrial a través la formación de poros que permiten la liberación de proteínas proapoptóticas de la mitocondria al citoplasma [273]. En principio, el péptido penetrante entraría por difusión en la célula y no se desencadenaría primeramente dicho mecanismo. Por tanto, una pregunta que podríamos plantearnos es si sería incompatible observar apoptosis sin detectar efectos en el potencial de membrana mitocondrial. Aunque la formación de poros de la membrana mitocondrial se considera como un punto de no retorno, existen estudios que indican que puede existir un lapso de tiempo, entre 4-20 h, desde que se desencadena el estímulo apoptótico hasta la formación

de los poros [290,291]. Además, también otros trabajos han mostrado que la variabilidad en los niveles de proteínas y en el número de mitocondrias en la célula, condicionan el desencadenamiento de la respuesta apoptótica [292]. Todos estos indicios podrían explicar que no hayamos observado cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, en apoptosis también se desencadena una cascada de eventos producidos tras la salida del citocromo c y de la proteína Smac de la mitocondria, produciendo la activación de caspasas [290] y el consecuente cambio en el potencial de membrana mitocondrial. No obstante, teniendo en cuenta dicha información, no observamos cambio en el potencial de membrana mitocondrial.

Por otra parte, la activación de la vía intrínseca de la apoptosis se puede correlacionar con el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) [293]. El aumento de ROS desencadena una entrada de calcio desde el medio extracelular y desde el retículo endoplasmático hacia el citoplasma aumentando la concentración de calcio intracelular [274]. Este hecho se refleja en el aumento de peróxido de hidrógeno (**Figura 63H**) y en el ligero aumento en los niveles de calcio determinado en nuestros ensayos (**Figura 63F**). Otro aspecto a considerar es que el aumento de estrés oxidativo en la célula perjudica tanto al ARNr como a las proteínas ribosomales y esto podría alterar la función ribosomal [294]. Por tanto, mediante el tratamiento con los péptidos penetrantes no sólo podríamos alterar la biogénesis ribosomal interfiriendo en el complejo Erb1/Ytm1 sino que también podríamos producir un ligero aumento de ROS que perjudicaría, a su vez, a las proteínas ribosomales y ARNr dificultando la formación de nuevos ribosomas. Esta respuesta podría amplificar el efecto de la inhibición de la interacción de Erb1/Ytm1 en la biogénesis ribosomal.

Con el objetivo de desarrollar alternativas terapéuticas al uso de los inhibidores de la ARN pol I sin causar daño al ADN, realizamos un estudio preliminar de la integridad del ADN tras tratamientos con P10hs y P11hs (**Figuras 64 y 65**). A tiempos cortos, nuestros resultados no mostraron daño significativo en el ADN y, de hecho, también indican que la integridad del ADN es similar que en tratamientos usando el compuesto CID-755471 que inhibe la ARN pol I [276]. Sorprendentemente, se observa un incremento de daño a ADN con P10hs a las 72 h, cuando la viabilidad celular aumenta y la activación de caspasas decae .

La nucleolina, la proteína nucleolar más abundante, está involucrada en procesos de organización y estabilidad de cromatina, proliferación celular y respuesta a estrés, entre otros [295]. En nuestro experimento, la nucleolina se encuentra deslocalizada tras tratamientos con P10hs (**Figura 66**). Una deslocalización de nucleolina indica estrés nucleolar y subsecuente

alteración de la biogénesis ribosomal [178,179]. Es una prueba preliminar de que el tratamiento con péptidos de interferencia está afectando a la biogénesis ribosomal.

Todos estos resultados prometedores son pruebas de que es posible intervenir con péptidos de interferencia en la biogénesis ribosomal mediante interacciones proteína-proteína. Es interesante remarcar que el estrés ribosómico inducido por péptidos de interferencia se podría producir en diferentes etapas del proceso de maduración como una alternativa al uso de moléculas pequeñas contra la ARN polimerasa I, que por el momento, han mostrado algunos inconvenientes [186].

Como se ha descrito anteriormente, el subcomplejo Nop7 requiere el ensamblaje de sus tres componentes para la correcta maduración de la subunidad 60S [106,111,168]. Una vez que el complejo ha ejercido su función molecular se elimina secuencialmente de la subunidad pre-60S [26]. Posteriormente, Nop7, Erb1 e Ytm1 individuales se volverían a ensamblar para repetir el proceso en un nuevo ciclo de maduración de un ribosoma. Creemos que es en esta etapa cuando el péptido es dirigido a la interacción Erb1/Ytm1 y podría jugar su papel de interferencia ya que la afinidad que muestra el P1 (P10hs humano) por Ytm1 es más baja que la observada para el complejo Erb1/Ytm1. Considerando nuestros resultados, es posible que se encuentre como complejo Erb1/Nop7/Ytm1 en la célula para aumentar la estabilidad de sus componentes y se incorpore a la partícula prerribosomal naciente, posiblemente con la ayuda de otras proteínas, y el complejo PeBoW permanezca estable incluso después de la disociación de los ribosomas.

### 3. Perspectivas futuras

Podría ser útil realizar ensayos de interferencia *in vitro* con las versiones humanas de las proteínas Erb1 e Ytm1 para demostrar que los péptidos también podrían funcionar en el complejo humano. Sin embargo, la sobreexpresión de proteínas y la purificación de las versiones humanas del subcomplejo Nop7 no parece una tarea fácil, evidenciada por la falta de informes en la literatura. Basándonos en nuestra experiencia, estamos tratando de diseñar versiones solubles de la proteínas humanas, para testar nuestros péptidos en ellas.

Otro aspecto que nos gustaría analizar sería el cambio en el perfil de polisomas tras el tratamiento de células con los péptidos de interferencia humanos. El ensayo nos serviría para comparar los efectos en la formación de las subunidades ribosomales 40S y 60S entre células sin tratar y expuestas a los agentes penetrantes.

Dada la alta afinidad del complejo entre Erb1 e Ytm1, no buscamos un compuesto que aumente la afinidad entre estas proteínas sino una molécula de interferencia. Por lo tanto, nos gustaría adquirir algunos conocimientos sobre las superficies de contacto de Bop1/WDR12 humanas o de ratón. La idea es tratar de obtener detalles más precisos de la interacción que podrían ayudarnos a modificar nuestros actuales péptidos con el objetivo de aumentar su efectividad. Por tanto, sería interesante averiguar si la superficie de interacción permite una aproximación mediante péptidos de interferencia contra las versiones de mamíferos del complejo. Además, la búsqueda y caracterización de interacciones proteína-proteína tanto de ligandos del complejo PeBoW como otras proteínas participantes en distintas fases de la biogénesis ribosomal, abre las posibilidades para el diseño de péptidos de interferencia que se podrían utilizar como alternativa terapéutica contra el cáncer. Asimismo, sería interesante estudiar si los efectos producidos por esos nuevos péptidos dirigidos contra otras etapas de la biogénesis ribosomal son similares o distintos a los que observamos en nuestros ensayos de celulares utilizando péptidos de la etapa intermedia en la que interviene PeBoW.

Con el fin de desarrollar alternativas terapéuticas contra el cáncer, el diseño de péptidos capaces de alterar las interacciones proteína-proteína de complejos aguas abajo de la ARN pol I, abre una nueva vía de estudio en el tratamiento de esta enfermedad, ya que nos permite inhibir la proliferación celular bloqueando la formación de nuevos ribosomas. Actualmente, existe ya un sistema nano farmacéutico que utiliza la estrategia de los péptidos de interferencia, con la secuencia TAT, conjugados con plata para tratamientos antitumorales [296]. Nuestro objetivo final sería la administración de péptidos de interferencia que podrían usarse en tratamientos anticancerígenos en combinación con otros fármacos.



## **VI. CONCLUSIONES**

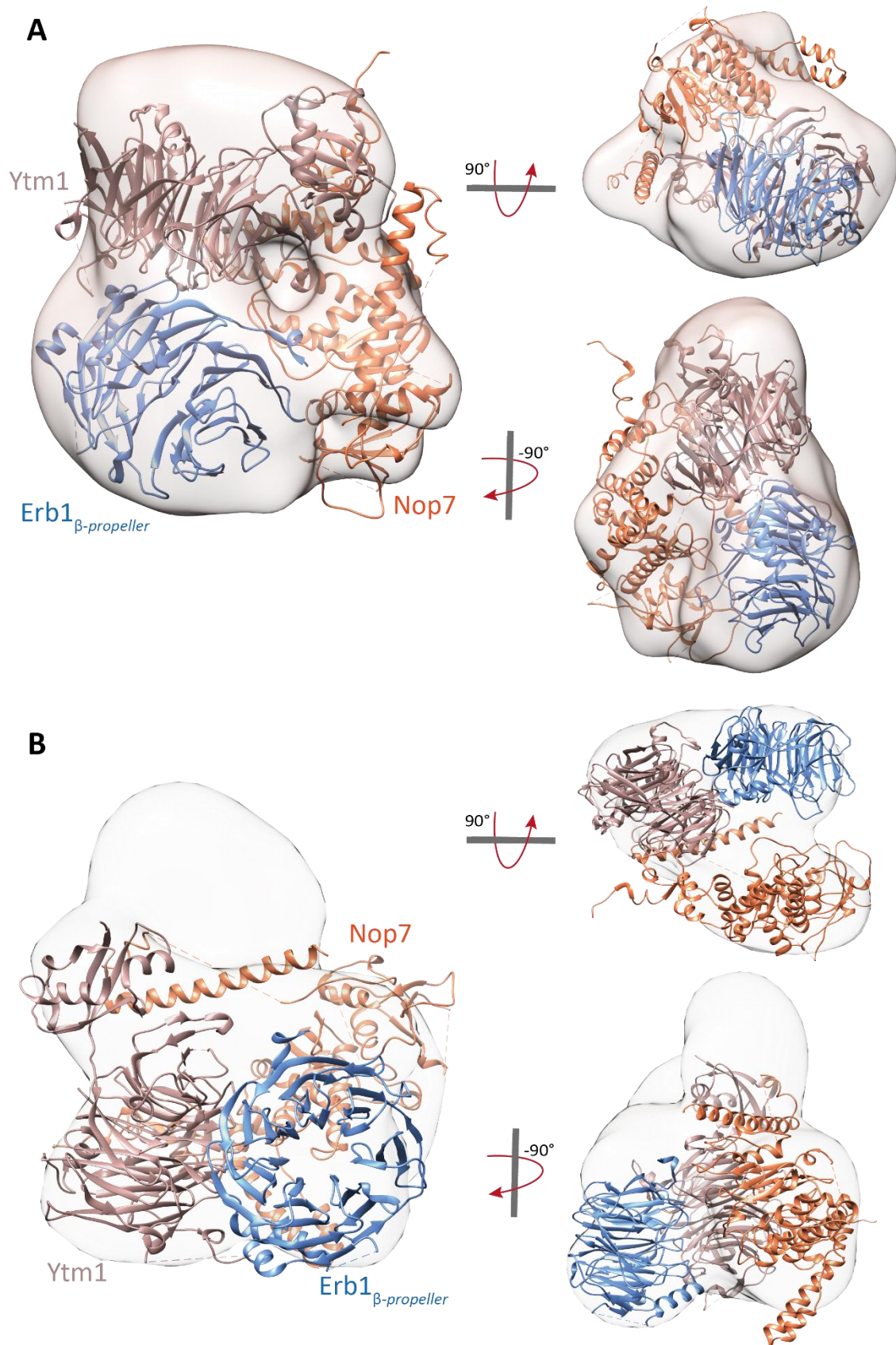


1. Se han sobreexpresado, usando sistemas de expresión heterólogos, y purificado los complejos PeBoW de los organismos *Saccharomyces cerevisiae* y *Chaetomium thermophilum*.
2. Hemos confirmado la existencia del complejo PeBoW en solución, formado por las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1 en relación 1:1:1, de forma independiente al contexto prerribosomal.
3. Hemos generado un modelo estructural del complejo PeBoW identificando a Erb1 como responsable de establecer las interacciones con Ytm1 y Nop7 dentro del complejo ternario con una estequiometría 1:1:1. El complejo presenta una conformación diferente a la estructura en el prerribosoma 60S, revelando reajustes conformacionales, especialmente el extremo amino-terminal de Erb1 y Nop7. La parte media y final de la región N-terminal de Erb1 interactúa con Nop7 mientras que el extremo inicial vuelve a situarse por encima de un lateral del dominio  $\beta$ -propeller de Erb1.
4. El análisis de los ligandos celulares sugiere que Nop7 e Ytm1 participan en otras funciones celulares aparte del contexto prerribosomal, y, posiblemente también, el complejo PeBoW, en funciones de proliferación celular, regulación de la transcripción y organización del citoesqueleto. Asimismo, hemos descrito una nueva interacción de Nop7 con la proteína Ipi3 del subcomplejo Rix1.
5. Hemos desarrollado un péptido sintético derivado de la secuencia de Erb1 capaz de interactuar con Ytm1 en un rango de mM bajo. Este péptido interfiere negativamente en la formación del complejo Erb1/Ytm1 afectando a esta extensa y altamente conservada interacción proteína-proteína.
6. Las células de carcinoma de colon HCT-116 tratadas con péptidos de interferencia mostraron deslocalización de nucleolina indicando estrés nucleolar y subsecuente alteración de la biogénesis ribosomal. Estos péptidos no perjudican a la viabilidad celular y promueven la vía de activación de caspasas 3/7 y apoptosis.

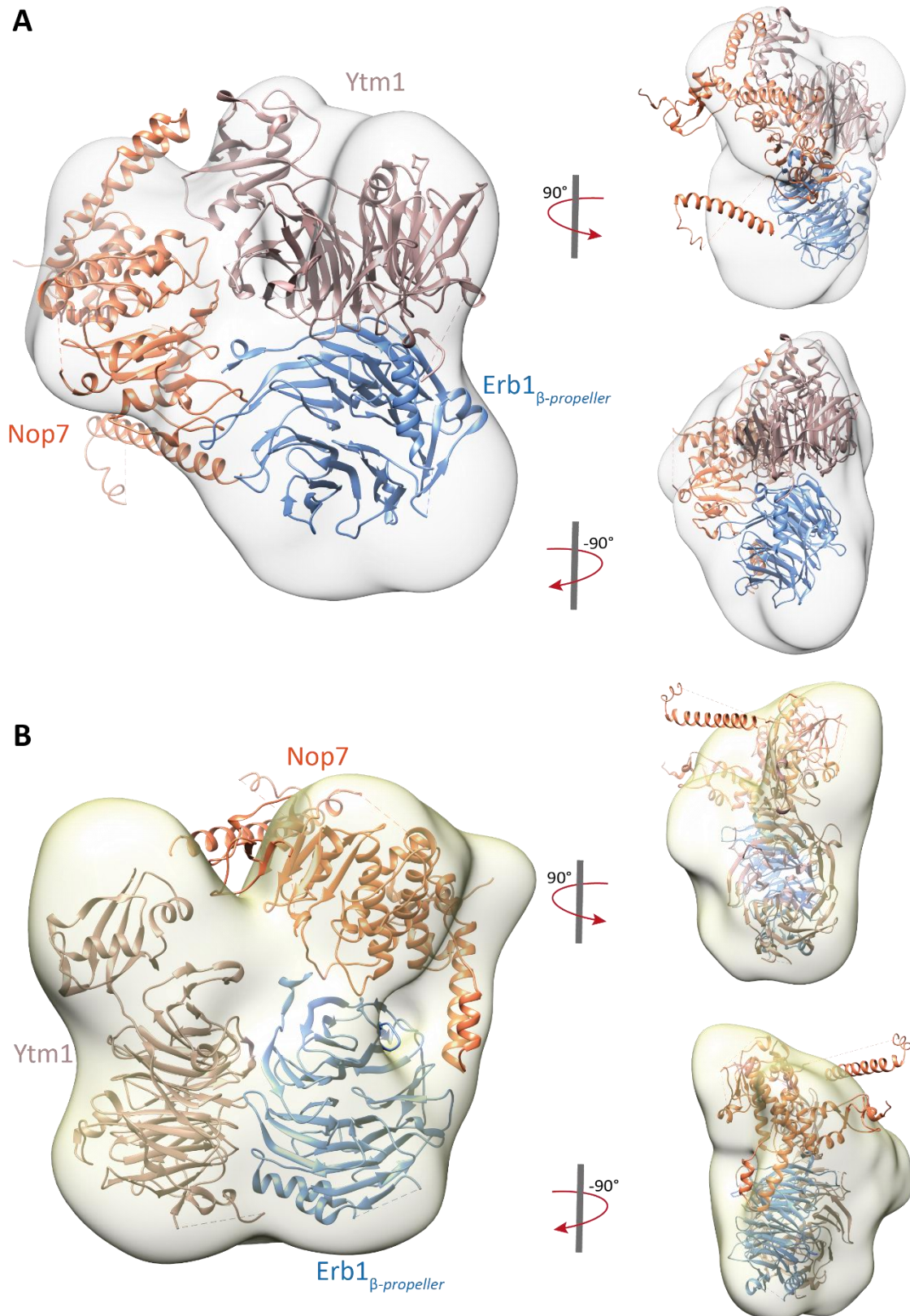
7. Es posible intervenir mediante péptidos de interferencia sobre interacciones proteína-proteína en la biogénesis ribosomal. Esta observación abre las posibilidades de intervención en distintas etapas de la síntesis de ribosomas aguas abajo de la transcripción del ARNr incrementando las alternativas de utilizar esta vía como diana terapéutica.

## **VII. ANEXO I**





**Figura 68.** Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de ScPeBoW por tinción negativa. (A y B) Vistas de los mapas tridimensionales de la clase 1 (A) y de la clase 3 del complejo ScPeBoW (B). CtEbr1 <sub>$\beta$ -propeller</sub> /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6ELZ).



**Figura 69. Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de CtPeBoW por tinción negativa. (A y B) Vistas de los mapas tridimensionales de la clase 2 (A) y de la clase 3 del complejo CtPeBoW (B). CtEbr1<sub>β-propeller</sub> /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6ELZ).**



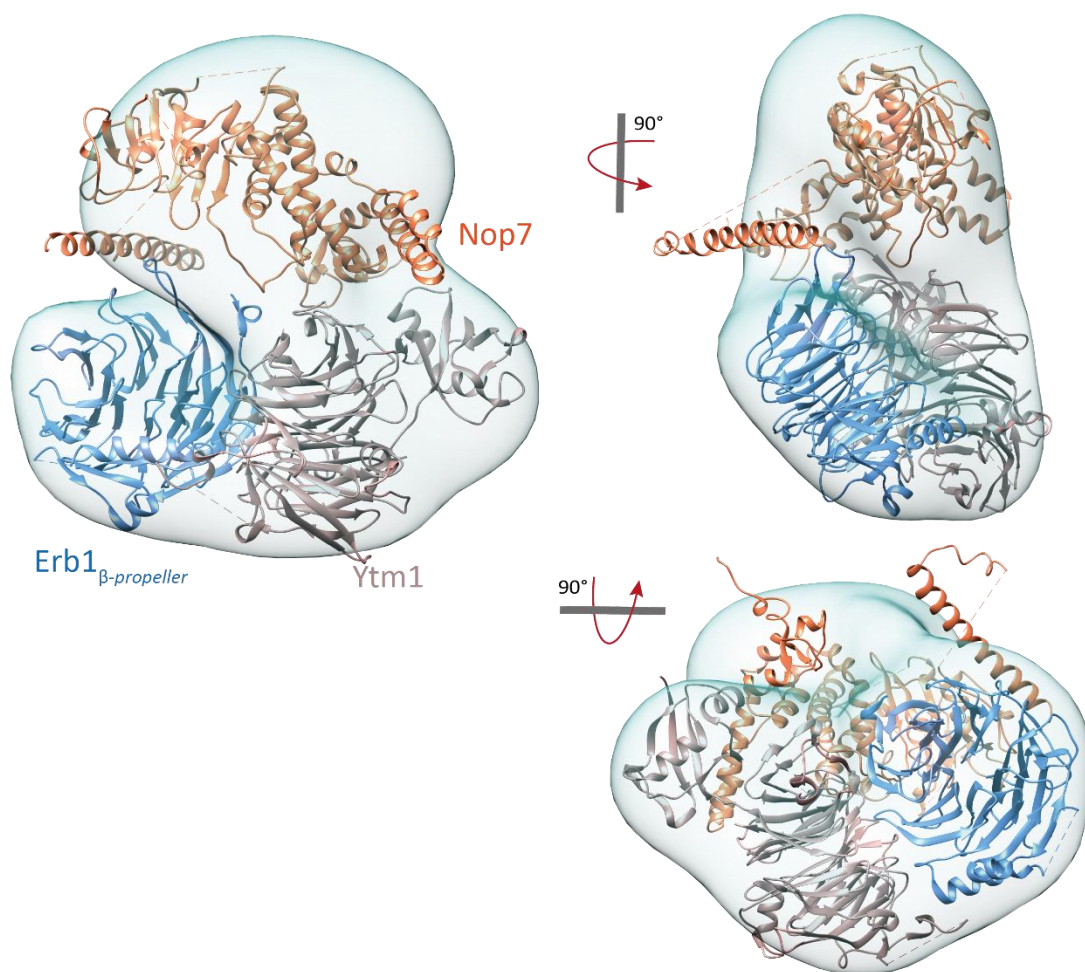
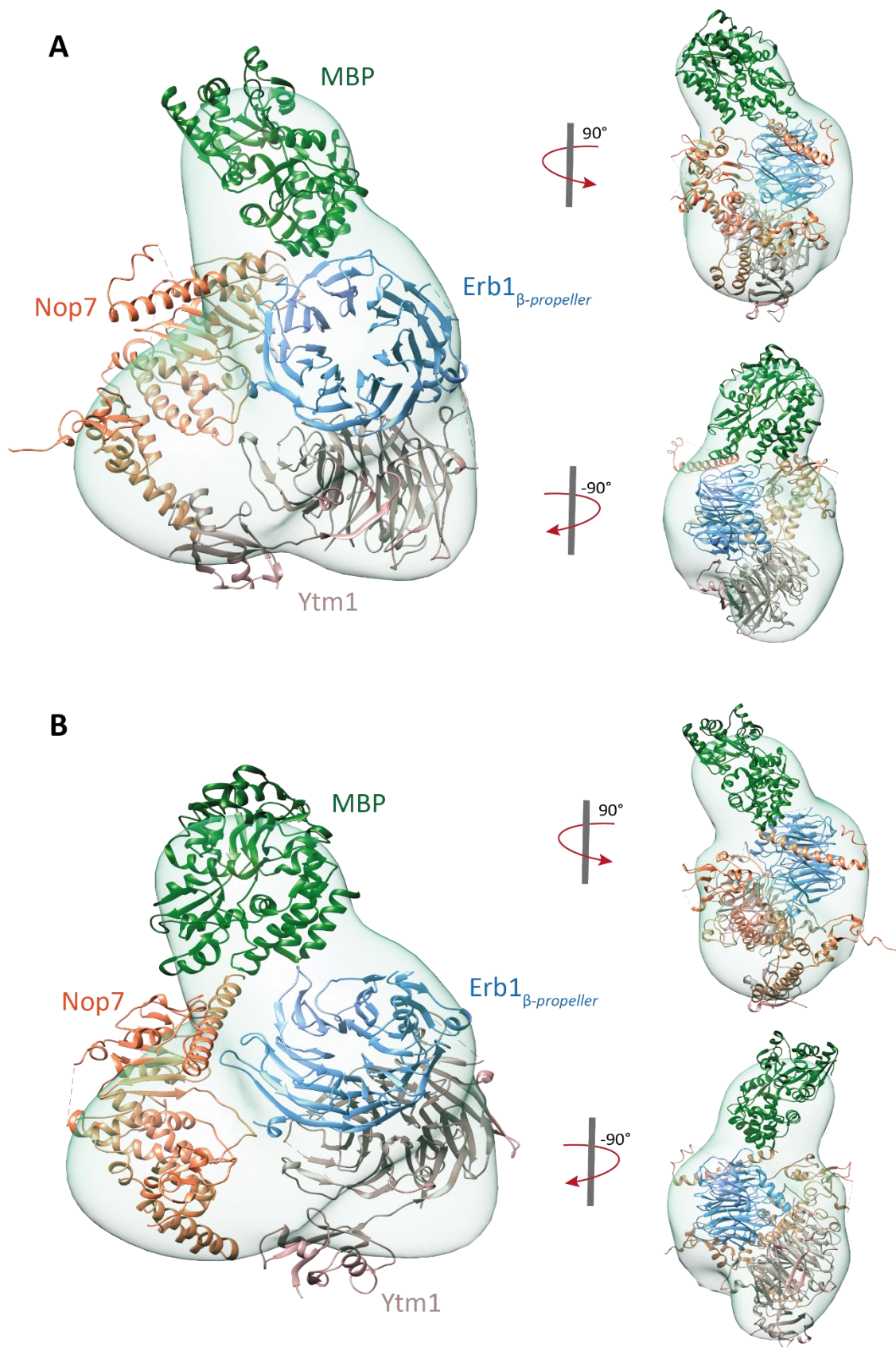


Figura 70. Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en la envoltura promedio de CtPeBoW. CtEbr1 <sub>$\beta$ -propeller</sub>/CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6ELZ).



**Figura 71.** Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de ScPeBoW (A) y clase 1 de CtPeBoW (B) en el volumen 3D de la clase 1 de CtPeBoW-MBP. CtEbr1 <sub>$\beta$ -propeller</sub> /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB), ScNop7 (PDB ID: 6ELZ), MBP (PDB ID: 1N3W).

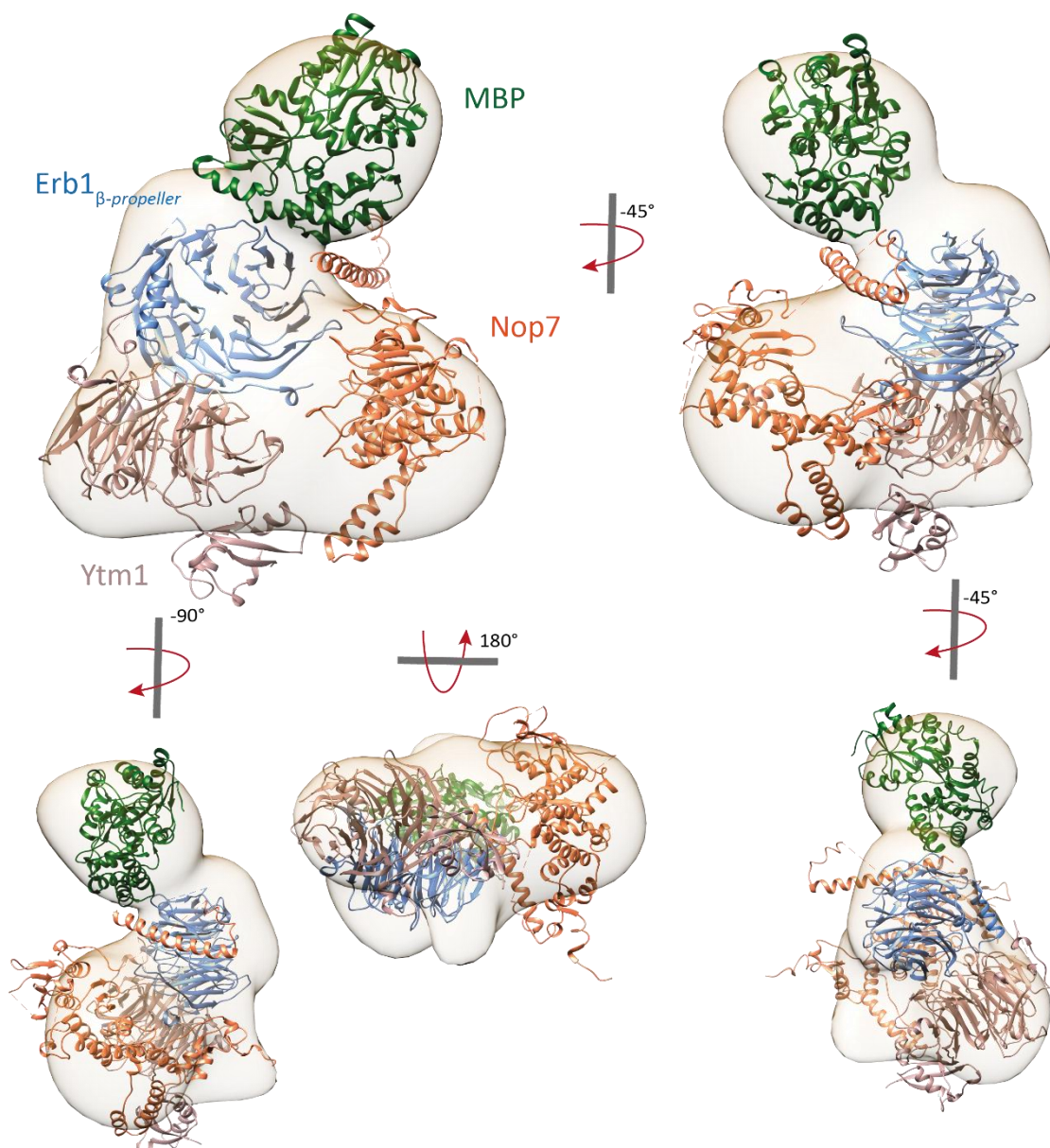
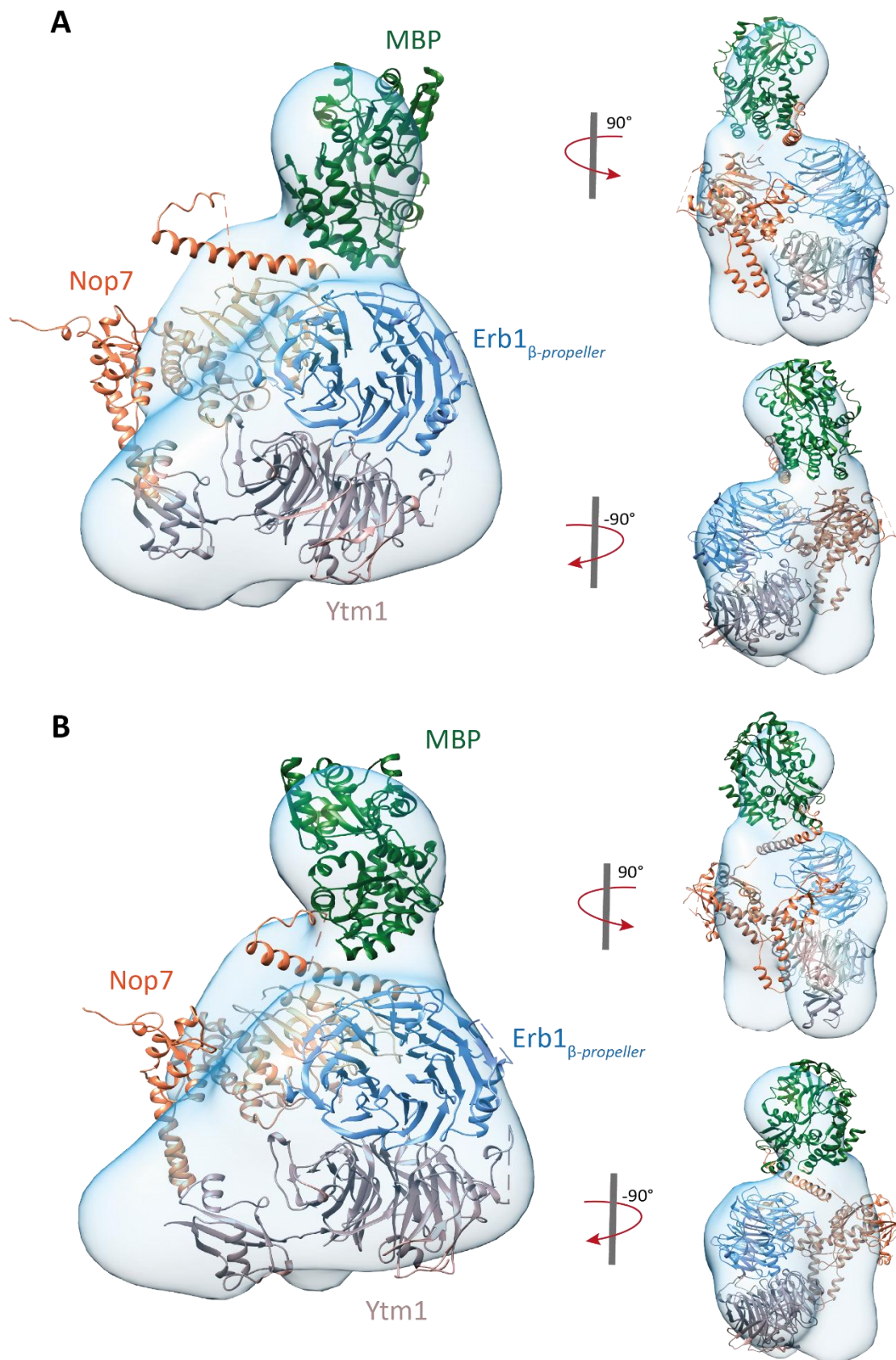
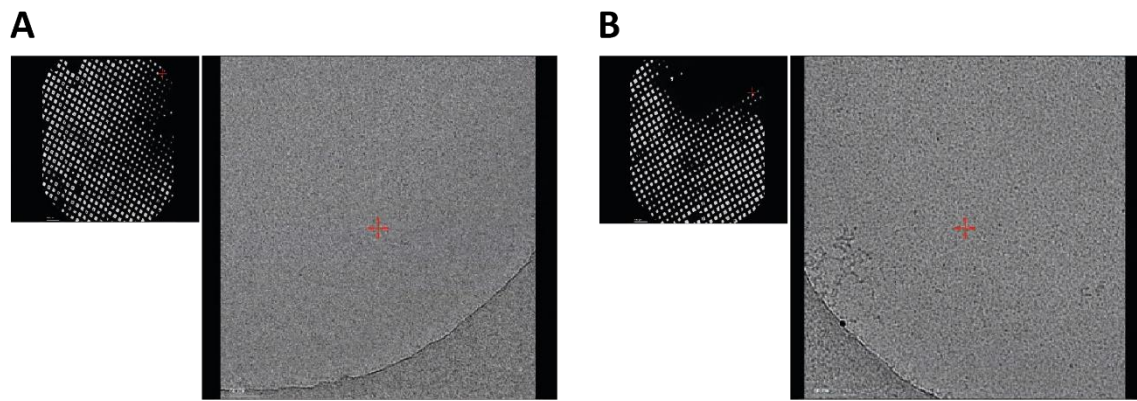


Figura 72. Superposición del modelo tridimensional de la clase 1 de CtPeBoW en el volumen 3D de la clase 2 de CtPeBoW-MBP. *CtEbr1 $\beta$ -propeller* / *CtYtm1* (PDB ID: 5CXB) y *ScNop7* (PDB ID: 6ELZ).

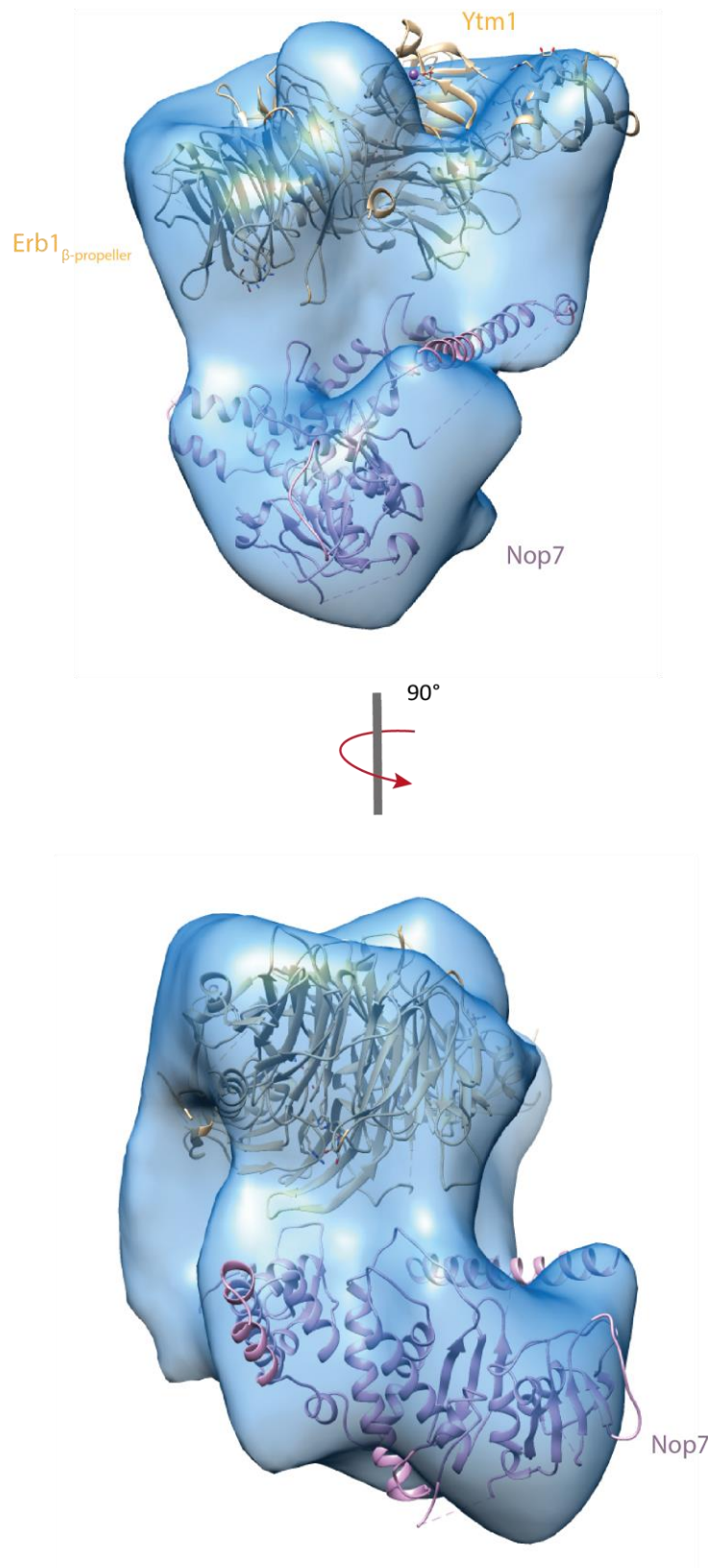




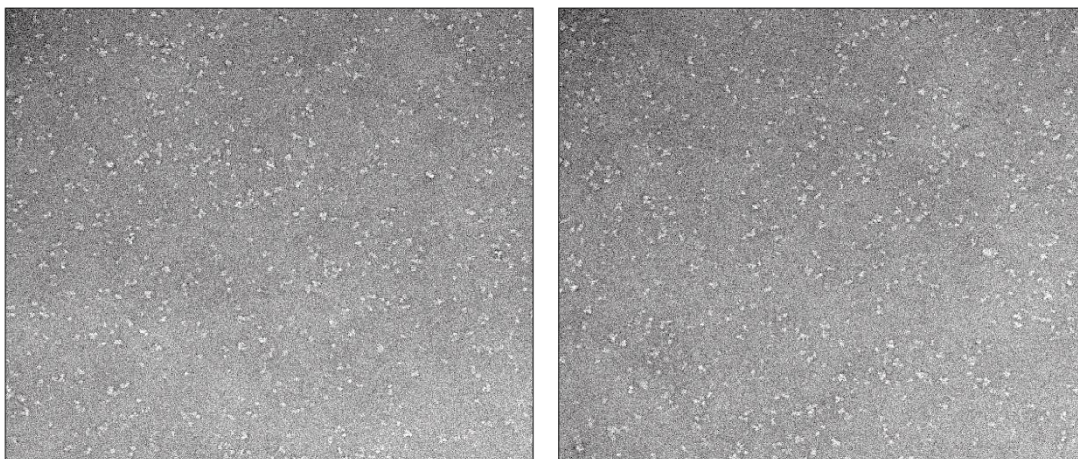
**Figura 73.** Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de *ScPeBoW* (A) y clase 1 de *CtPeBoW* (B) en el volumen 3D de la clase 3 de *CtPeBoW-MBP*. *CtEbr1 $\beta$ -propeller* /*CtYtm1* (PDB ID: 5CXB), *ScNop7* (PDB ID: 6ELZ), *MBP* (PDB ID: 1N3W).



**Figura 74. Fotografía de las gradillas (izquierda) y micrografías de crio-microscopía electrónica (derecha) de los complejos CtPeBoW (A) y CtPeBoW-MBP (B).** Se observan partículas muy pequeñas cuyo tamaño no coincide con las dimensiones del complejo. Aparentemente, parece que el complejo está disociado.

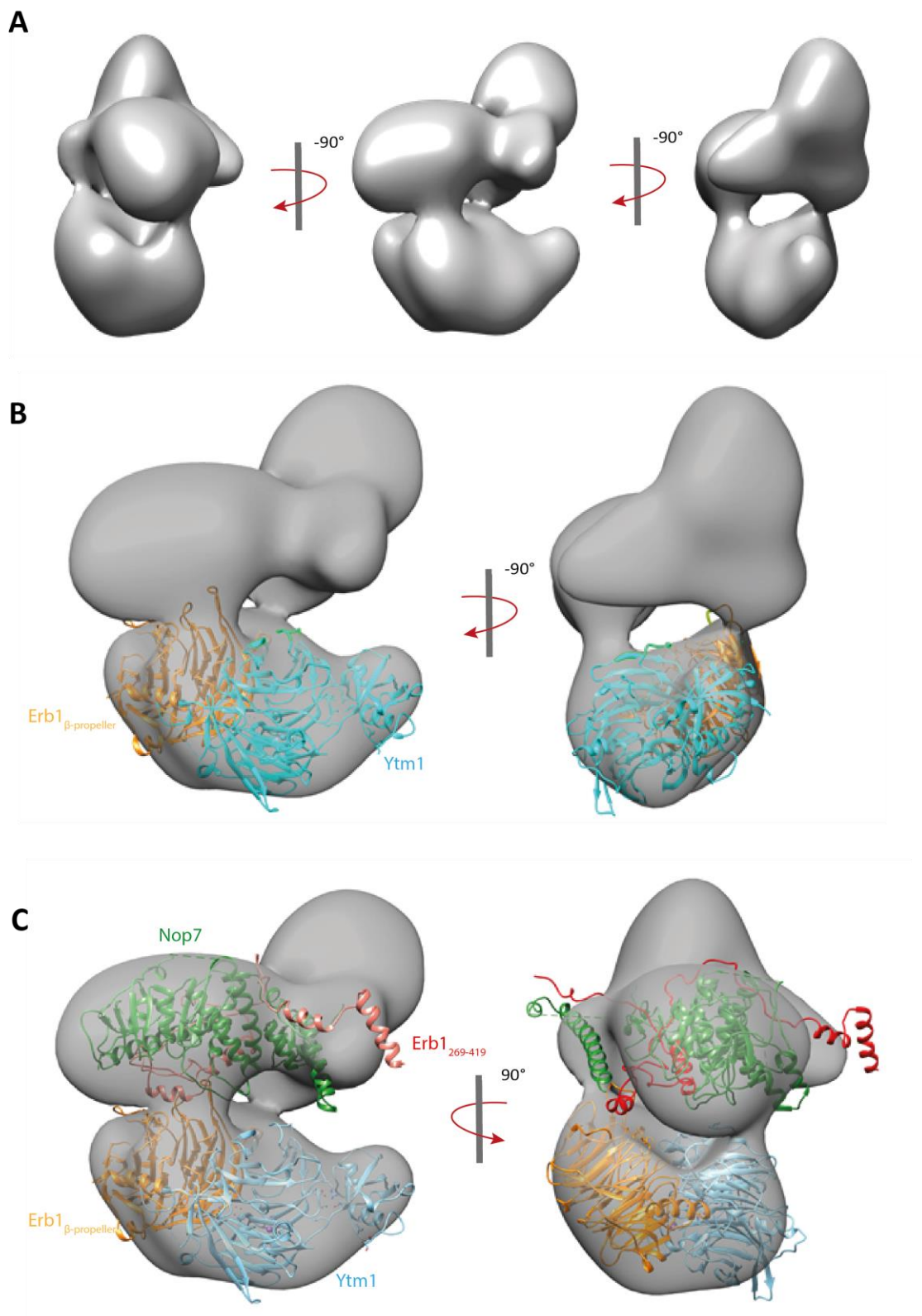


**Figura 75. Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de ScPeBoW por tinción negativa en colaboración con Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid). Superposición de CtEbr1 $\beta$ -propeller /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) y ScNop7 (PDB ID: 6EM5). La densidad del mapa que queda sin modelo correspondería al extremo amino terminal de Erb1. Figura cedida por el laboratorio del Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid).**



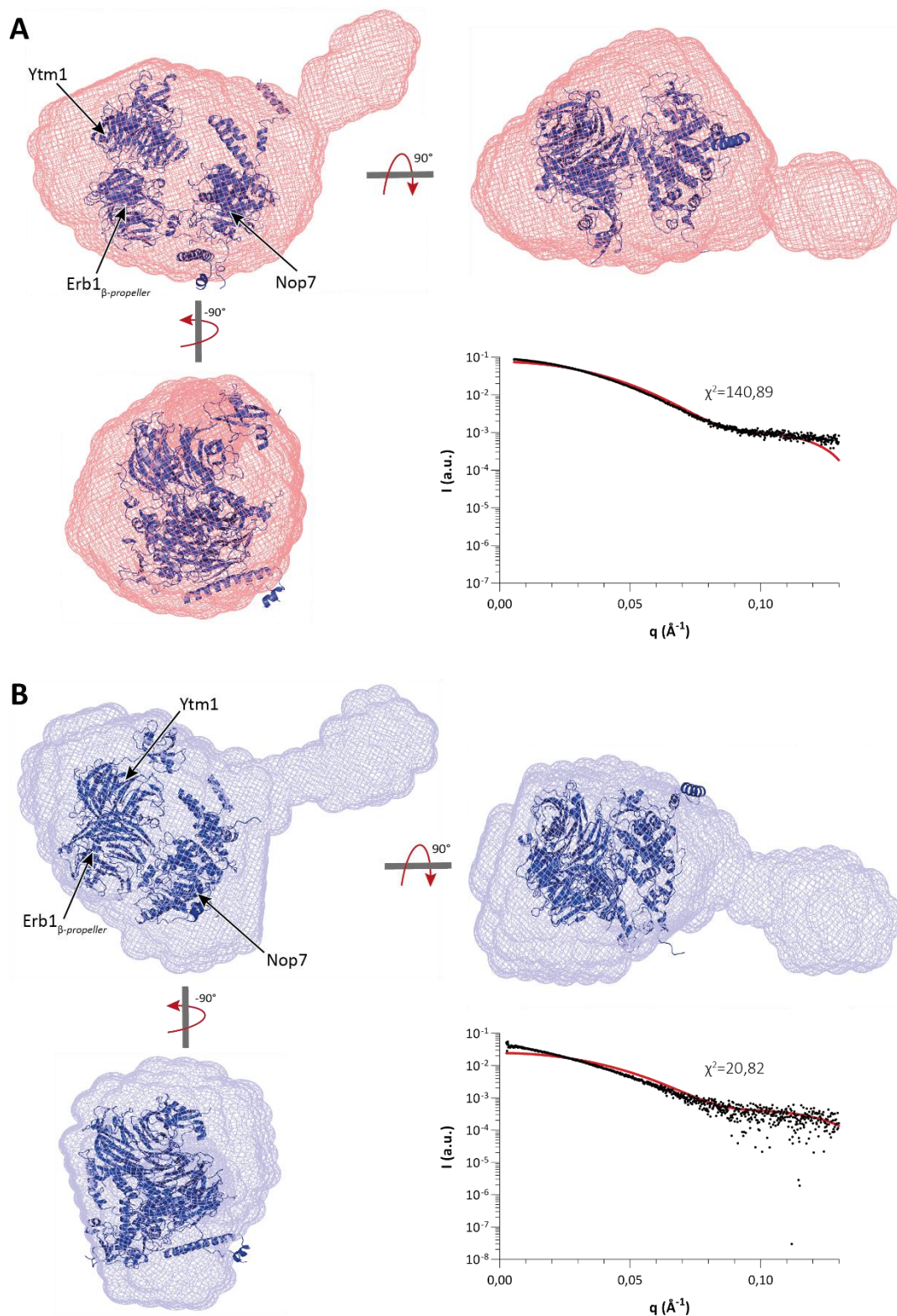
**Figura 76. Micrografías del complejo CtPeBoW obtenidas por NS-TEM en colaboración con Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid).** En las micrografías obtenidas del complejo CtPeBoW no se percibe heterogeneidad en la preparación.





**Figura 77. Superposición de la estructura cristalina de Nop7, Erb1 e Ytm1 en los volúmenes obtenidos de CtPeBoW por tinción negativa en colaboración con Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid). La densidad del mapa que queda sin modelo correspondería al extremo amino terminal de Erb1. (A) Vistas de los mapas tridimensionales del complejo CtPeBoW. (B y C) Superposición de CtErb1 $_{\beta}$ -propeller /CtYtm1 (PDB ID: 5CXB) (B) y con ScNop7 (PDB ID: 6EM5) y ScErb1 $_{269-419}$  (PDB ID: 6ELZ) (C). Figura cedida por el laboratorio del Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid).**





**Figura 78. Superposición del modelo atómico de CtPeBoW originado en colaboración con el Dr. Carlos Fernández Tornero (CIB, Madrid) en las envolturas de SAXS de ScPeBoW y CtPeBoW. (A y B) Se muestran tres perspectivas de la superposición en la envuelta de ScPeBoW (A) y CtPeBoW (B). Cada gráfica muestra la superposición de la curva de los datos crudos de SAXS (negro) con el perfil teórico calculado para el modelo (rojo). El modelo de tinción negativa de ScPeBoW y CtPeBoW desarrollado en colaboración con el Dr. Fernández Tornero (CIB, Madrid) mostraron una buena superposición en la envuelta del complejo de ScPeBoW y de CtPeBoW de SAXS sugiriendo que también era un buen modelo para ambas especies.**



## **VIII. ANEXO II**





# Peptides Targeting the Interaction Between Erb1 and Ytm1 Ribosome Assembly Factors

Lidia Orea-Ordóñez, Susana Masiá and Jerónimo Bravo\*

Department Genomics and Proteomics, Instituto de Biomedicina de Valencia, Spanish National Research Council (CSIC), Valencia, Spain

Ribosome biogenesis is an emerging therapeutic target. It has been proposed that cancer cells are addicted to ribosome production which is therefore considered a druggable pathway in cancer therapy. Cancer cells have been shown to be more sensitive to inhibition of the ribosome production than healthy cells. Initial attempts of inhibiting ribosome biogenesis have been focused on the inhibition of transcription by targeting RNA Pol I. Despite being a promising field of research, several limitations have been identified during the development of RNA Pol I inhibitors, like the lack of specificity or acquired resistance. Ribosome biogenesis is a multistep process and additional points of intervention, downstream the very initial stage, could be investigated. Eukaryotic ribosome maturation involves the participation of more than 200 essential assembly factors that will not be part of the final mature ribosome and frequently require protein–protein interactions to exert their biological action. Using mutagenesis, we have previously shown that alteration of the complex interface between assembly factors impairs proper ribosome maturation in yeast. As a first step toward the developing of ribosome biogenesis inhibitory tools, we have used our previously solved crystal structure of the *Chaetomium thermophilum* complex between the assembly factors Erb1 and Ytm1 to perform a structure-guided selection of interference peptides. The peptides have been assayed *in vitro* for their ability to bind their cellular partner using biophysical techniques.

**Keywords:** structural-guided peptide selection, interference peptides, targeting ribosome biogenesis, protein–protein interactions, Erb1/Ytm1 complex

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Luca Domenico D'Andrea,  
National Research Council (CNR), Italy

### Reviewed by:

Helmut Bergler,  
University of Graz, Austria  
Xiyuan Yao,  
The Scripps Research Institute,  
United States

### \*Correspondence:

Jerónimo Bravo  
jbravo@ibv.csic.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Recognition,  
a section of the journal  
Frontiers in Molecular Biosciences

**Received:** 01 June 2021

**Accepted:** 20 July 2021

**Published:** 01 September 2021

### Citation:

Orea-Ordóñez L, Masiá S and Bravo J  
(2021) Peptides Targeting the  
Interaction Between Erb1 and Ytm1  
Ribosome Assembly Factors.  
Front. Mol. Biosci. 8:718941.  
doi: 10.3389/fmolb.2021.718941

## INTRODUCTION

The synthesis of ribosomes in eukaryotes is a sophisticated and energy-demanding process requiring the participation of more than 200 assembly factors that will not be part of the final mature ribosome although are required for a correct ribosome biogenesis. The initial steps of ribosome assembly take place in the nucleolus where rRNA is transcribed by RNA polymerase I (RNA pol I) [reviewed in (Baßler and Hurt, 2019)] under the regulation of both tumor suppressor genes (including p53, Rb, and Arf) and oncogenes (including MYC, MAPK/ERK, PI3K, and AKT) (Montanaro et al., 2008; Morcelle et al., 2019). Increased ribosome biogenesis is important for cell transformation or tumorigenesis and it is assumed as a general trend in cancer cells that need to make extra ribosomes in order to produce more proteins to sustain uncontrolled cell division (Orsolich et al., 2016) (Truitt and Ruggero, 2016). Interestingly, it has been shown that cell proliferation can be

blocked by inhibiting the production of new ribosomes since impaired ribosome biogenesis induces a checkpoint control that prevents cell cycle progression (Volarević et al., 2000). It is therefore not surprising that biogenesis of the ribosomes has been accumulating growing attention as a potential new therapeutic target.

Initial attempts to specifically target ribosome biogenesis have been focused on the downregulation of RNA pol I. Several recently described small molecules like CX-5461, CX-3543, BMH-21, or CID-765471 are now providing evidence that inhibition of ribosome biogenesis by targeting transcription of ribosomal DNA has a promising therapeutic potential (Bywater et al., 2012; Colis et al., 2014). However, lack of specificity and acquired resistance suggest that a new generation of Pol I inhibitors should be developed. Moreover, the only inhibitor that reached clinical trials has shown additional activities contributing to its toxicity profile and resistance, and therefore, additional points of intervention during the ribosome maturation process should be explored apart from the inhibition of transcription (Catez et al., 2019; Ferreira et al., 2020). Despite the fact that the complexity of the process yields a large repertoire of potential targets, only very few chemical inhibitors of ribosome biogenesis are known so far (Awad et al., 2019). Apart from the lack of molecular details in the process, the main reason for this limited number of inhibitors is that the complex ribosome biogenesis pathway is orchestrated by a wide range of macromolecular interactions sequentially coordinated to promote the correct ribosome maturation. Ribosome assembly factors frequently require protein-protein interactions in order to exert their biological actions (Li et al., 2017) and these have been traditionally hard to target by small molecule drugs given the absence of grooves or binding pockets in the interaction surface.

Nop7, Erb1, and Ytm1 are assembly factors that form a discrete heterotrimer that can be detected in isolation from the pre-ribosomal particles (Tang et al., 2008). The so-called Nop7 complex (PeBoW in mammals) is essential for a correct maturation of the ribosomal 60S subunit. The three components guarantee the correct maturation of 5' end of 5.8S rRNA, thus facilitating its association with 25S rRNA in the mature ribosome (Granneman et al., 2011). We have previously reported the structural resolution of the *Chaetomium thermophilum* Erb1/Ytm1 complex (Marcin et al., 2015; Wegrecki et al., 2015). The crystal structure shows Ytm1 bound to the carboxy-terminal portion of Erb1. Integrity of the heterotrimer assembly is essential for exerting its biological action. In fact, we previously showed that compromising the stability of the Erb1/Ytm1 interaction has an effect on proliferation in yeast (Wegrecki et al., 2015).

Using our previous Erb1/Ytm1 structure, we have performed a structure-guided selection of a set of peptides derived from their sequences and test their ability to bind to their respective cellular partners, Erb1 or Ytm1. Our results open the possibility to obtain peptides with the ability to interfere in the ribosome biogenesis pathway. To our knowledge, this is the first report of peptides designed to target ribosome biogenesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Cloning, Expression, and Purification of Ytm1 and Erb1

Protein expression and purification was carried out following the protocol described in a study by Wegrecki et al. (2015). The *YTM1* gene from *Chaetomium thermophilum* was obtained by total cDNA amplification and cloning in pOPIN-F using an In-Fusion cloning system commercial kit (Clontech). Sf9 insect cells were grown in the Sf900 II SFM medium (Gibco) and were transfected with Ytm1-pOPINF and linearized Ian Jones bacmid (Zhao et al., 2003). Baculovirus generated were amplified and used to induce protein expression for 72 h at 27°C. Erb1 was cloned in a pET28-NKI/LIC 6His/3C vector (from NKI Protein Facility, Amsterdam) by the ligase independent cloning (LIC) method and expressed in *Escherichia coli* (DE3) BL21 CodonPlus (RIPL) using an auto-induction system (Studier, 2005). The 6xHis tagged Ytm1 and Erb1 proteins were purified using a Histrap-HP Ni charged column (GE Healthcare) eluting with a 20–500 mM imidazole gradient. An additional step of a HiTrap Heparin HD column (GE Healthcare) eluting with 0.2–1.5 M NaCl gradient was included for Erb1. A final polish step of size exclusion chromatography (HiLoad 16/60 Superdex 200 column, GE Healthcare) was performed for both proteins that were flash cooled under liquid nitrogen and stored at –80°C until use.

### Biolayer Interferometry Assays

Peptides were commercially obtained from Synpeptide Co., Ltd., Shanghai, China. All experiments have been made in triplicates and include control curves for bait and analyte only.

### Peptide Interference Experiments

Potential interference peptide samples were evaluated by their ability to interfere the kinetics and affinity of the complex between Erb1 and Ytm1 as measured by Biolayer Interferometry (BLItz, Pall FortéBio Corp.) using Ni-NTA biosensors (FortéBio) and 50 mM HEPES, pH 7.5; 150 mM NaCl; 5% (v/v) glycerol; and 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (BME) buffer. To set the reference  $K_D$ , an 80  $\mu$ g/ml solution of Erb1 was immobilized to the biosensor in order to obtain binding curves for increasing concentrations of Ytm1. According to this, an evaluation of Erb1-derived peptides (P1–P3) was performed using 5  $\mu$ M Ytm1 previously incubated during 30 min at equimolar concentrations of each peptide. New  $K_D$  values were determined. Similarly, an 80  $\mu$ g/ml solution of Ytm1 was immobilized to the biosensor in order to obtain binding curves for increasing concentrations of Erb1. 20  $\mu$ M Erb1 concentration was selected for the analyte. Each Ytm1-derived peptide (P4–P6) was evaluated by preincubation of equimolar concentrations with 20  $\mu$ M Erb1 assayed against immobilized Ytm1 of 80  $\mu$ g/ml.

### Peptide Affinity Experiments

BLI was used to determine the affinity between Ytm1 and biotinylated peptides using streptavidin biosensors (FortéBio). The biosensors were hydrated 10 min in the same buffer used on the interference assay, with 0.05% (w/v) bovine serum albumin



(BSA). 50 µg/ml of biotinylated peptide was immobilized at the streptavidin biosensor. Increasing concentrations of Ytm1 were used to calculate the  $K_D$  values using the Blitz Pro 1.2 software using the implemented equations for association and dissociation:

Association phase:

$$y = R_{\max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a [Analyte]}} \left(1 - e^{-(k_a [Analyte] + k_d)x}\right).$$

Dissociation phase:

$$y = y_0 e^{-k_d(x-x_0)}.$$

$$y_0 = R_{\max} \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a [Analyte]}} \left(1 - e^{-(k_a [Analyte] + k_d)x_0}\right).$$

### Differential Scanning Fluorimetry

Thermofluor assays (Pantoliano et al., 2001) were performed on a 7,500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) measuring the gradual fluorescence generated by a 1:1,000 dilution of SYPRO Orange Protein Stain Gel (Supelco, Merck-Sigma) along with 1°C/min temperature increase from 20°C until 85°C.

The samples were mixed containing the protein Ytm1 at 5 µM in 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl and peptides P1-P3 at 1 mM concentration. Previously, lyophilized P2 and P3 were resuspended in the same Ytm1 buffer and P1 was solubilized in 10 mM Tris (hydroxymethyl)-methylamine (Tris-HCl), pH 8.8 for P1. Data of triplicated experiments were analyzed using GraphPad Prism 5.01 software.

### MicroScale Thermophoresis

Microscale thermophoresis (MST) was used to determine the binding affinity between Ytm1 and P1. Ytm1 was labeled with a Red-NHS second-generation dye kit (100 µl at 10 µM of protein +300 µM dye solution) for 30 min at room temperature in the dark. 5 nM of labeled Ytm1 in 50 mM HEPES pH 7.5, NaCl 150 mM supplemented with 0.1% (v/v) Pluronic F-127 was used for the assay. P1 stock is diluted in 10 mM Tris (hydroxymethyl)-methylamine (Tris-HCl), pH 8.8. Ytm1 and P1 were mixed at 1:1 molar ratio in sixteen serial dilutions (1,230 µM–0.0751 µM) using the same buffer. Measurements were taken on a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies). Similarly binding between Ytm1 and P3 using MST was tested using the same Ytm1 buffer also for P3. Curve fitting and  $K_D$  calculations every 10 min were analyzed from three independent experiments with MO. Maximum binding was observed at 50 min. Curves were analyzed using Affinity Analysis Software (NanoTemper Technologies).

### Bioinformatics

Buried surface calculations were performed using the protein interfaces, surfaces, and assemblies service PISA at the European Bioinformatics Institute ([http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html)) (Krissinel and Henrick 2007)

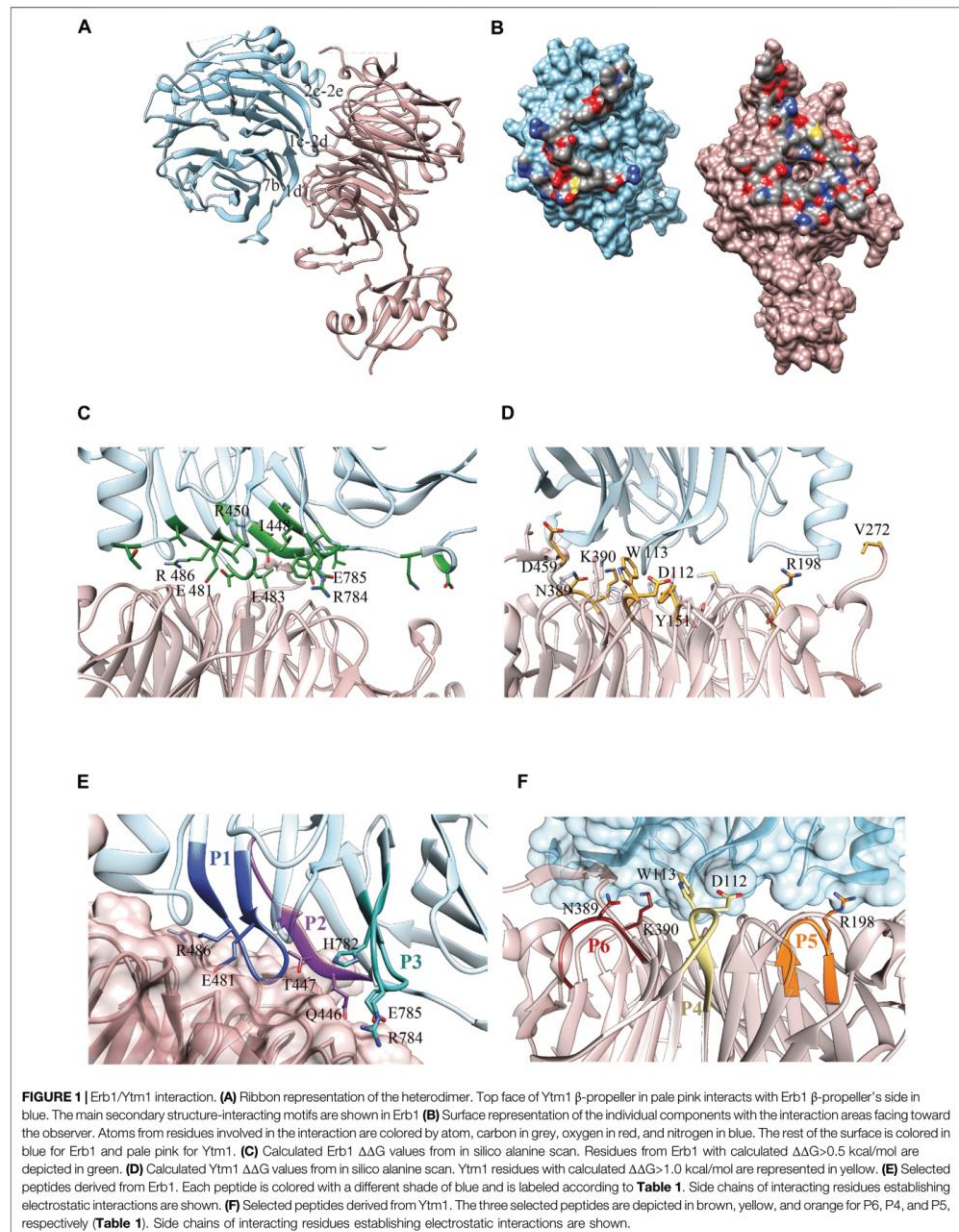
using PDB ID 5xcb and in silico alanine scanning of the interaction surface was performed using the DrugScorePPI Web Interface (<https://cpclab.uni-duesseldorf.de/dsppi/>) (Krüger and Gohlke, 2010) only considering polypeptide atoms.  $\Delta G$  computed for alanine mutants for each 5xcb polypeptide chain is compared to  $\Delta G$  computed from the wild type complex. Resulting  $\Delta\Delta G$  predicts the contribution of a given side chain to the wild type complex stability ( $\Delta\Delta G = \Delta G_{ALACOMPLEX} - \Delta G_{WTCOMPLEX}$ ). Interacting atoms between Erb1 and Ytm1 were also analyzed using the 5xcb coordinates program contact in the CCP4 suite (Winn et al., 2011). Molecular graphics in **Figure 1** were performed with UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

## RESULTS

### Interaction Surface Analysis and Peptide Selection

Our Erb1/Ytm1 heterodimer crystal structure (PDB ID 5CXB) (Wegrecki et al., 2015) shows that the central part of the  $\beta$ -propeller of Ytm1 provides a large docking surface for the bottom face of blades 1, 2, and 7 from Erb1 that is additionally held in place by two lateral extensions from Ytm1. The Ytm1  $\beta$ -propeller top face, away from the N-terminal Ubiquitin-like domain, establishes extensive contacts with the side face of Erb1 C-terminal  $\beta$ -propeller (**Figure 1A**) with a predominant role of blade 7. The Erb1/Ytm1 heterodimer is mainly maintained by electrostatic forces with some hydrophobic regions also involved in the interaction (**Figure 1B**). No clear grooves have been detected in the heterodimer interaction surface.

Manual inspection of the interaction surface between Erb1 and Ytm1 combined with buried surface area upon binding calculations using PISA (Krissinel and Henrick, 2007), together with an analysis of the interactions and an alanine scanning of the interacting residues to locate hotspots using DrugScore<sup>PPI</sup> (Krüger and Gohlke, 2010), revealed several areas of interaction (**Figure 1C**, **Supplementary Table S1**, **S2**). The last  $\beta$ -strand ("1d") of blade 7 in Erb1 contacts loop "6d-6a" and a long extension that appears between strands "7d" and "7a" of Ytm1 (the knob formed by residues 444–460). A second interaction area involves the entrance of the central tunnel of Ytm1 as a docking site for a loop between strands "1c-2d" from the first blade of Erb1 (481–486) (**Figure 1C**). The loop contains three well conserved residues: E481, T484, and R486 that establish a network of electrostatic interactions with also conserved amino acids from blades 1, 2, 3, and 7 of Ytm1. We have previously reported the relevance of the second area of interaction since the R486E point mutation decreased the affinity of the interaction by two orders of magnitude without affecting structural integrity. The equivalent mutation in yeast impaired growth in yeast and affected 60S subunit biogenesis (Wegrecki et al., 2015). As indicated by the in silico alanine scanning analysis, this interacting region also suggests a hot spot between Erb1 and Ytm1 (**Figure 1C**, **Supplementary Table S1**). Erb1 a-b





**TABLE 1** | Peptides used in this study. Residue numbering is referred to the *Chaetomium thermophilum* sequences.

Peptide	Sequence	Protein	Residues
P1	VWELLTGRQWW	Erb1	479–489
P2	QQTIFRFGH	Erb1	445–452
P3	DWHPREPWCV	Erb1	780–789
P4	HDDWWSA	Ytm1	110–116
P5	AGMDRTV	Ytm1	194–200
P6	RGHANKV	Ytm1	385–391
Biot-P1	Biotin-VWELLTGRQWW	Erb1	479–489
Biot-P3	Biotin-DWHPREPWCV	Erb1	780–789
Biot-P6	Biotin-RGHANKV	Ytm1	385–391

loop from blade 7 participates in another interaction area with Ytm1 loops from blade 3. Finally an insertion in blade 2 of the  $\beta$ -propeller of Erb1 between 2c and 2e (**Supplementary Figure S1**) interacts with loops from blades 2 and 3 and an extension between strands 3c and 4d from Ytm1 (**Supplementary Figure S2**). This Erb1 insertion area shows poor sequence conservation (**Supplementary Figure S1**) and will not be taken into further consideration. Ytm1 residues interacting with Erb1 appear to cluster mostly on one side of the interaction surface (**Figure 1D**) although they do not show sequence continuity of interacting residues (**Figure 1D**, **Supplementary Figure S2** and **Supplementary Table S2**).

According to the previous observations, a set of six peptides, summarized in **Table 1**, were selected derived from Erb1 sequence and Ytm1 (**Figures 1E,F** and **Supplementary Figures S1, S2**).

### Peptide Competition Assay

Biolayer interferometry interference assays were used to evaluate the ability of each peptide to interfere in the *in vitro* formation of the Erb1/Ytm1 complex. Erb1 was immobilized to a Ni-NTA biosensor and Ytm1 was used as analyte for testing direct interaction. The binding affinity is 3.2e-8M (**Supplementary Table S3**), similar to the previously reported values using microcalorimetry (Wegrecki et al., 2015). Peptides were evaluated for their ability to decrease in the Erb1/Ytm1 complex formation by preincubating the analyte with each peptide derived from the immobilized partner. **Figures 2A,B** show typical curves from the interference assay using biolayer interferometry. The black line depicts the reference curve obtained in the absence of peptide preincubation. Erb1-derived peptides were evaluated by their ability to decrease Erb1/Ytm1 complex affinity. Each P1-3 peptide was preincubated for half an hour at 4°C with an equimolar concentration of Ytm1 used as an analyte for binding with Erb1, previously immobilized to the Ni-NTA biosensor (**Figure 2A**). Peptides P1 and P3 showed a decrease of more than one order of magnitude (1.9 and 1.7e-7M respectively) with respect to the Erb1/Ytm1 binding curve, in the absence of peptide. Similarly, an assay immobilizing Ytm1 to the Ni-NTA biosensor was used with Erb1 as analyte preincubated at equimolar concentrations with P4-6 Ytm1-derived peptides. Only peptide P6 showed a significant

decrease (2.4e-6M) with respect to the reference Ytm1/Erb1 binding curve (**Figure 2B**).

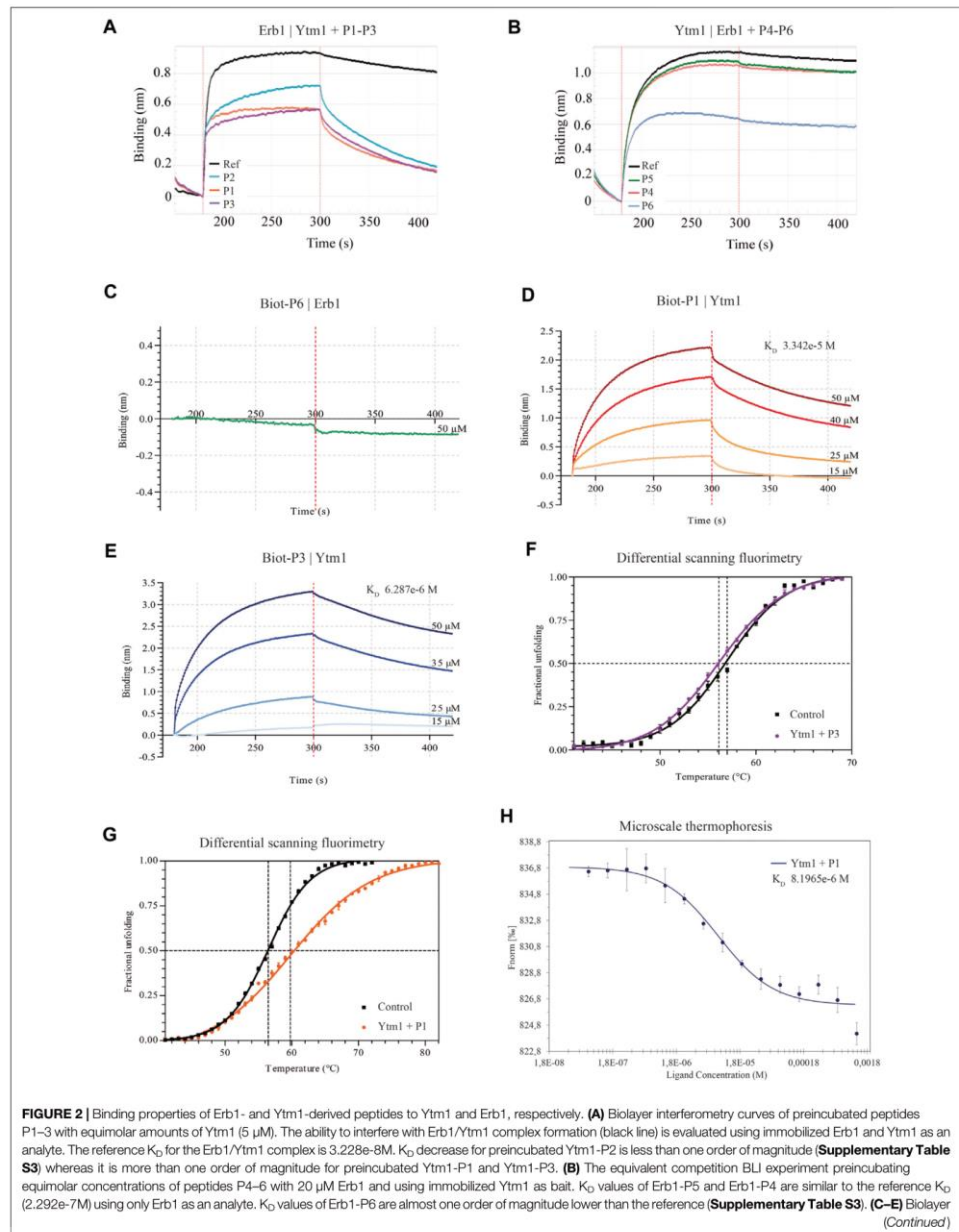
### Direct Peptide Binding Assays

According to P1, P3, and P6 results, a new N-terminal biotinylated peptide synthesis was ordered using the same sequences (Biot-P1, Biot-P3, and Biot-P6, **Table 1**). Biotinylated peptides Biot-P1 and Biot-P3 were immobilized to the streptavidin biosensor and Ytm1 binding was measured. Similarly, Biot-P6 was immobilized to the streptavidin biosensor followed by Erb1 binding. As indicated in **Figure 2C**, we could not detect binding for Biot-P6/Erb1. Peptides Biot-P1 and Biot-P3 showed an affinity for Ytm1 in the mM range (**Figures 2D,E**). To further confirm the interaction a differential scanning fluorimetry assay was performed. A thermofluor assay of Ytm1 on its own and in the presence of 1 mM P3 did not show any significant thermal shift (**Figure 2F**). Similarly, no significant thermal shift in Ytm1 was observed in the presence of 1 mM P2 (**Supplementary Figure S3**). A shift of several degrees in the  $T_m$  was observed in the presence of 1 mM P1 indicating binding with Ytm1 (**Figure 2G**). Inconsistent results were obtained in DSF using Erb1 and a proper  $T_m$  could not be obtained so thermal shift could not be evaluated for P6. To further demonstrate the ability of P1 to interact with Ytm1, the binding was also monitored in free solution by the change in the thermophoresis of Ytm1 upon interaction with P1. Binding affinity determined using microscale thermophoresis showed a  $K_D$  in the mM range (8.2e-6M, **Supplementary Table S3**) consistent with affinities observed using interferometry and further confirming a direct interaction between P1 and Ytm1 (**Figure 2H**). Experimental limitations with maximum ligand concentration did not allow the calculation of binding stoichiometry. A tendency toward binding was also detected using MST with the P3 peptide at a maximum concentration of 1,580  $\mu$ M but data quality would not allow a proper fitting for obtaining the  $K_D$  values (**Supplementary Figure S4**).

## DISCUSSION

Erb1 surface appears to be more suitable for the selection of peptides targeting the complex, as compared to Ytm1 that, despite showing some degree of clustering (**Figure 1D**) reveals scattered interacting residues and fragmented regions (**Supplementary Figure S2**). In fact, we did not obtain clear experimental binding results for Ytm1-derived peptides. Apart from the peptides derived from Ytm1 selected in this study, additional regions that might have been considered are 224–229 that shows a rather continuous interaction with Erb1. It has, however, been initially discarded given the small differences in calculated  $\Delta\Delta G$  upon *in vitro* alanine substitution with respect to WT Ytm1 in the complex (**Supplementary Table S2**). An additional region includes V272 that shows reasonable  $\Delta\Delta G$  values and continuity (S265–V272) of neighboring residues in *Chaetomium*. However, it is located in an evolutionary poorly conserved region (**Supplementary Figure S2**). Sequence elongation of the selected Ytm1-derived peptides might also provide better interaction results.

The combination of *in silico* hot spot analysis with contact analysis in the interface and residue conservation suggested an



**FIGURE 2** | Interferometry curves using immobilized biotinylated peptides. **(C)** Immobilized biot-P6 did not show binding when using Erb1 as analyte. **(D)** BLI Ytm1 binding curves obtained using immobilized biot-P1. **(E)** BLI Ytm1 binding curves using biot-P3 as bait. **(F)** Thermal shift curves obtained by differential scanning fluorimetry (DSF) of Ytm1 isolated (black line) and in the presence of 1 mM P3 peptide. **(G)** Similarly, DSF thermal shift curves of Ytm1 isolated (black line) and in the presence of 1 mM P1 peptide (orange). **(H)** Microscale thermoforesis binding curve for Ytm1 with peptide P1. Ytm1 was labeled using the Red-NHS second-generation dye for the binding affinity with the peptide P1 (NanoTemper Technologies). Fnorm indicates normalized fluorescence.

initial set of six peptides in the Erb1/Ytm1 interface. Three of them showed some degree of interference in the complex formation on a competition assay. Best candidates (P1, P3, and P6) were further tested immobilizing the peptide to the biosensor. We have observed some differences for peptide P6 in the competition assays with respect to biotinylated peptide assay using biolayer interferometry. Biotin itself could be affecting the binding to Erb1; however, this is unlikely to be the case since the N-terminus of P6 is not involved in the interaction according to the structure of the Erb1/Ytm1 complex (Figure 1). An obvious difference is the immobilization of the peptide that might be impairing a proper conformation of P6 for the interaction with Erb1 to take place. Immobilized peptide in the biotinylated P1 experiment can also explain the slight difference observed in the Kds obtained by BLI and MST. Tm values for Erb1 using DSF could not be obtained. Moreover, several of the selected peptides did not show any effect on the interference biolayer interferometry assay. Alternative methodological approaches should be considered for the detection of low affinity interactions in BLI or proteins with potential hydrophobic exposed areas in DSF. We have been able to detect direct *in vitro* interactions of P1 and Biot-P1 with Ytm1 at a low mM affinity range indicating that at least for these conditions biolayer interferometry is a suitable methodological approach. MST also represented a good alternative for evaluating the interaction with initial binding detected for Ytm1-P3 and proper affinity determination for Ytm1-P1. Erb1 and Ytm1 form a part of the Nop7 complex which is a heterotrimeric complex. Assembly of the three subunits is required for the correct maturation of 60S ribosomal subunit. Once the Nop7 complex has exerted its molecular function it is sequentially removed from the pre60S subunit (Tang et al., 2008; Baßler and Hurt, 2019). Individual Nop7, Erb1, and Ytm1 will then reassemble to repeat the process with a new preribosome. It is at this stage when a peptide targeting the Erb1/Ytm1 interaction could play its interference role since the P1 peptide affinity shown for Ytm1 is lower than the one observed for the Erb1/Ytm1 complex.

Ribosome biogenesis has recently been accumulating growing attention as a potential new therapeutic target, since the observation that cell proliferation can be blocked by inhibition of new ribosomes production. Several RNA pol I inhibitors have been reported to date (Ferreira et al., 2020) and molecules like CX-3543, CX-5461, and BMH-21 are currently under investigation for treating cancer, as rapidly dividing cancer cells are particularly dependent on high levels of RNA pol I transcription. CX-5461 is phase I clinical trial in patients with advanced hematological cancers and breast cancer (Hilton et al., 2018; Khot et al., 2019). CX-3543 reached phase II clinical trial but was withdrawn due to bioavailability issues (Balasubramanian et al., 2011). While extremely promising, these compounds targeting RNA pol I are associated with additional activities, like DNA damage, which possibly contributes to its efficacy, toxicity profile, and resistance mechanisms. These observations suggest that it may be necessary to look for other points of intervention during this multistep process of ribosome

maturation. One relevant question in this new field of targeting ribosome biogenesis is whether downstream specific targets would behave the same or differ to those RNA pol I transcription inhibitors currently developed. We had previously shown that altering the interaction surface between the ribosome assembly factors Erb1 and Ytm1 hinders cell proliferation in yeast. We have now developed a peptide derived from the Erb1 sequence capable of interacting with Ytm1 at a low mM range and interfere in the Erb1/Ytm1 complex formation negatively affecting this extensive and highly conserved protein-protein interaction. This result opens the possibility to investigate the *in vivo* action of RNA pol I downstream targets in the ribosome biogenesis process. Delivery methods like cell penetrating peptides or nanoparticles should be considered for internalization of the peptide into the cell in order to test future inhibitory strategies *in vivo*.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LO-O performed the interaction assays, interaction surface analysis, elaborated tables, and figures, contributed to scientific discussion, and manuscript writing. SM contributed in the peptide selection, interaction surface analysis, provided technical assistance for binding experiments and critical discussion. JB contributed to the peptide selection, methodological approach, graphical imaging, and manuscript writing.

## FUNDING

Funding was obtained from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness SAF2017-89901-R and Generalitat Valenciana PROMETEO/2018/055. Open access publication fees have been partially funded by URICI from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Molecular graphics and analyses were performed with UCSF Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ma del Valle Morales Cuenca, Clara Arenas, and Guilherme Dim for technical support. Molecular



graphics and analyses were performed with UCSF Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/credits.html>).

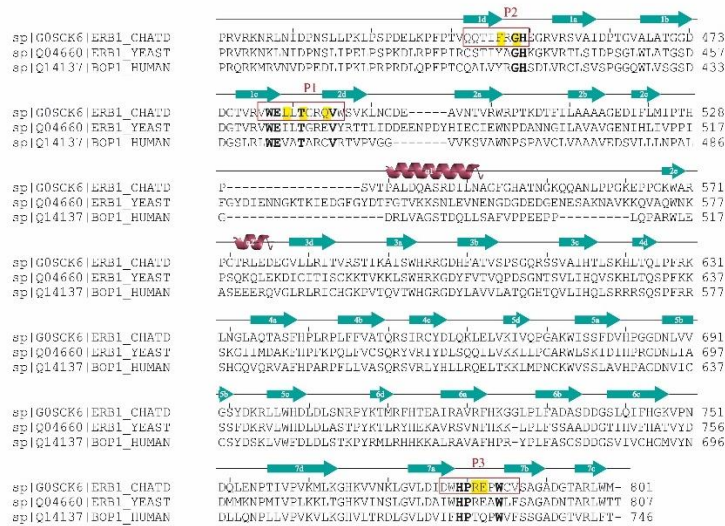
## REFERENCES

- Awad, D., Prattes, M., Kofler, L., Rössler, L., Loibl, M., Pertl, M., et al. (2019). Inhibiting Eukaryotic Ribosome Biogenesis. *BMC Biol.* 17 (1), 1–16. doi:10.1186/s12915-019-0664-2
- Balasubramanian, S., Hurley, L. H., and Neidle, S. (2011). Targeting G-Quadruplexes in Gene Promoters: A Novel Anticancer Strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (4), 261–275. doi:10.1038/nrd3428
- Bafler, J., and Hurt, E. (2019). Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 88 (1), 281–306. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-110817
- Bywater, M. J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., et al. (2012). Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-specific Activation of P53. *Cancer Cell* 22 (1), 51–65. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.019
- Catez, F., Dalla Venezia, N., Marcel, V., Zorbas, C., Lafontaine, D. L. J., Diaz, J.-J., et al. (2019). Ribosome Biogenesis: An Emerging Druggable Pathway for Cancer Therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* 159, 74–81. doi:10.1016/j.bcp.2018.11.014
- Colis, L., Peltonen, K., Sirajuddin, P., Liu, H., Sanders, S., Ernst, G., et al. (2014). DNA Intercalator BMH-21 Inhibits RNA Polymerase I Independent of DNA Damage Response. *Oncotarget* 5 (12), 4361–4369. doi:10.18632/oncotarget.2020
- Ferreira, R., Schneekloth, J. S., Panov, K. L., Hannan, K. M., and Hannan, R. D. (2020). Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age. *Cells* 9, 266. doi:10.3390/cells9020266
- Granneman, S., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2011). A Cluster of Ribosome Synthesis Factors Regulate Pre-RRNA Folding and 5.8S RRNA Maturation by the Rat1 Exonuclease. *EMBO J.* 30 (19), 4006–4019. doi:10.1038/emboj.2011.256
- Hilton, J., Cescon, D. W., Bedard, P., Ritter, H., Tu, D., Soong, J., et al. (2018). CCTG IND.231: A Phase I Trial Evaluating CX-5461 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Ann. Oncol.* 29, iii8. doi:10.1093/annonc/mdy048.003
- Khot, A., Brajanovski, N., Cameron, D. P., Hein, N., Maclachlan, K. H., Sanij, E., et al. (2019). First-in-Human RNA Polymerase I Transcription Inhibitor CX-5461 in Patients with Advanced Hematologic Cancers: Results of a Phase I Dose-Escalation Study. *Cancer Discov.* 9 (8), 1036–1049. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1455
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* 372 (3), 774–797. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.022
- Krüger, D. M., and Gohlke, H. (2010). DrugScorePPI Webserver: Fast and Accurate In Silico Alanine Scanning for Scoring Protein-Protein Interactions. *Nucleic Acids Res.* 38 (Suppl. 2), W480–W486. doi:10.1093/nar/gkq471
- Li, Z., Ivanov, A. A., Su, R., Gonzalez-Pecchi, V., Qi, Q., Liu, S., et al. (2017). The OncoPPI Network of Cancer-Focused Protein-Protein Interactions to Inform Biological Insights and Therapeutic Strategies. *Nat. Commun.* 8, 14356. doi:10.1038/ncomms14356
- Marcin, W., Neira, J. L., and Bravo, J. (2015). The Carboxy-Terminal Domain of Erb1 Is a Seven-Bladed SS-Propeller that Binds RNA. *PLoS ONE* 10 (4), e0123463. doi:10.1371/journal.pone.0123463
- Montanaro, L., Treré, D., and Derenzini, M. (2008). Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *Am. J. Pathol.* 173, 301–310. doi:10.2353/ajpath.2008.070752
- Morcelle, C., Menoyo, S., Morón-Duran, F. D., Tauler, A., Kozma, S. C., Thomas, G., et al. (2019). Oncogenic MYC Induces the Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint and Stabilizes P53 Independent of Increased Ribosome Content. *Cancer Res.* 79 (17), 4348–4359. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2718
- Orsolio, L., Jurada, D., Pullen, N., Oren, M., Eliopoulos, A. G., and Volarevic, S. (2016). The Relationship between the Nucleolus and Cancer: Current Evidence and Emerging Paradigms. *Semin. Cancer Biol.* 37–38, 36–50. doi:10.1016/j.semcancer.2015.12.004
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., et al. (2001). High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* 6 (6), 429–440. doi:10.1177/108705710100600609
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Elaine, C. M., et al. (2004). UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* 25 (13), 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Studier, F. W. (2005). Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *Protein Expr. Purif.* 41 (1), 207–234. doi:10.1016/j.pep.2005.01.016
- Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E., and Woolford, J. L. (2008). Interactions Among Ytm1, Erb1, and Nop7 Required for Assembly of the Nop7-Subcomplex in Yeast Preribosomes. *Mol. Biol. Cell* 19 (7), 2844–2856. doi:10.1091/mbc.E07-12-1281
- Truitt, M. L., and Ruggero, D. (2016). New Frontiers in Translational Control of the Cancer Genome. *Nat. Rev. Cancer* 16, 288–304. doi:10.1038/nrc.2016.27
- Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., et al. (2000). Proliferation, but Not Growth, Blocked by Conditional Deletion of 40S Ribosomal Protein S6. *Science* 288 (5473), 2045–2047. doi:10.1126/science.288.5473.2045
- Wegrecki, M., Rodríguez-Galán, O., de la Cruz, J., and Bravo, J. (2015). The Structure of Erb1-Ytm1 Complex Reveals the Functional Importance of a High-Affinity Binding between Two  $\beta$ -Propellers During the Assembly of Large Ribosomal Subunits in Eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 43 (22), 11017–11030. doi:10.1093/nar/gkv1043
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Eleanor, J. D., Paul, E., Dodson, E. J., et al. (2011). Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Cryst.* 67, 235–242. doi:10.1107/S0907444910045749
- Zhao, Y., Chapman, D. A. G., and Jones, I. M. (2003). Improving Baculovirus Recombination. *Nucleic Acids Res.* 31 (2), E6. doi:10.1093/nar/gng006

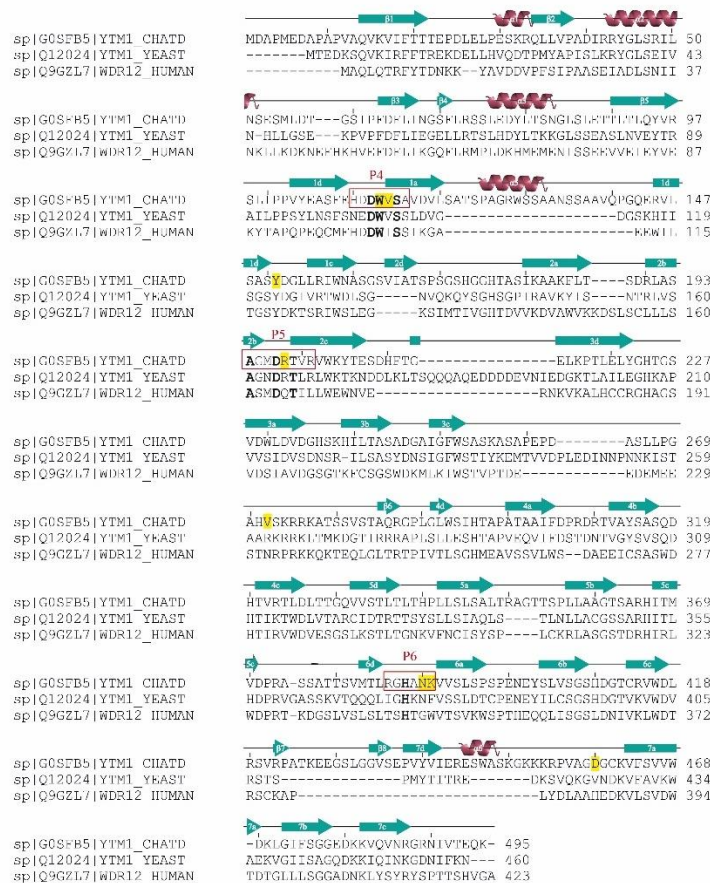
**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

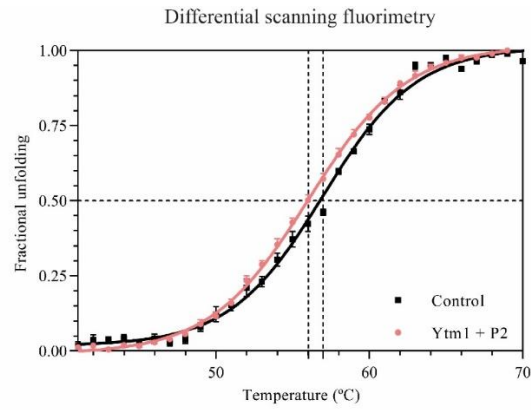
Copyright © 2021 Orea-Ordóñez, Masía and Bravo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



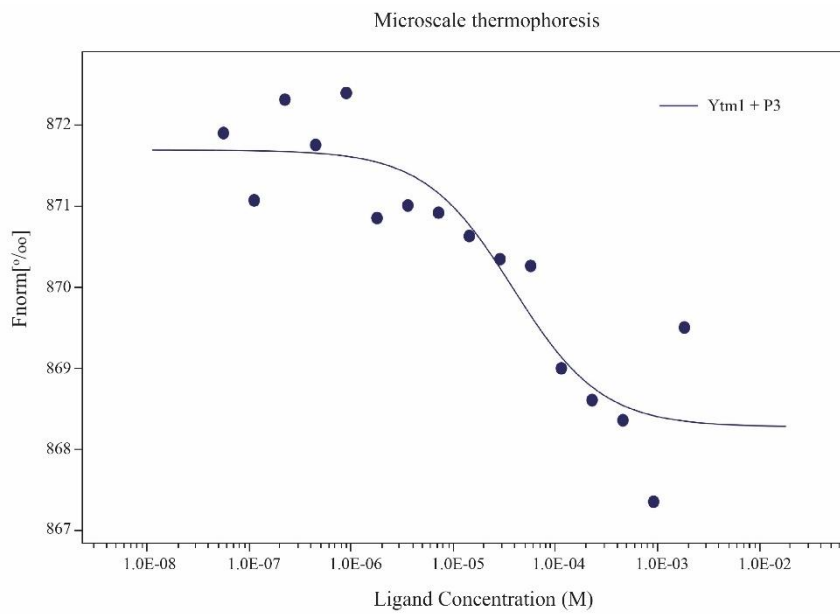
**Supplementary figure 1:** Sequence alignment of Erb1 from *Chaetomium thermophilum* (CHATD), *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST) and human (BOPI\_HUMAN). Selected peptides are indicated within boxes. Secondary structure elements are shown over the alignment. Interaction residues with calculated  $\Delta\Delta G > 0.5$  kcal/mol are highlighted in yellow.



**Supplementary figure 2:** Sequence alignment of Ytm1 from *Chaetomium thermophilum* (CHATD), *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST) and human (WDR12\_HUMAN). Selected peptides are indicated within boxes. Secondary structure elements are shown over the alignment. Interaction residues with calculated  $\Delta\Delta G > 1.0$  kcal/mol are highlighted in yellow.



**Supplementary figure 3.** Thermal shift curves of Ytm1 isolated (black line) and in the presence of P2 (pink line) derived from Erb1.



**Supplementary figure 4.** Microscale thermophoresis binding curve for Ytm1 with peptide 3. Fnorm indicated normalized fluorescence.

Residue	ddGcal (kcal/mol)	Buriedness
D436	0.11	3.78
K439	0.08	2.5
T443	0.18	4.82
V444	0.47	6.43
Q445	0.12	3.08
Q446	0.48	10.55
T447	0.42	8.52
*I448	1.02	5.45
*R450	0.53	3.03
T464	0.14	4.89
V466	0.42	4.27
*E481	0.55	5.18
L482	0.08	2.72
*L483	0.65	1.89
T484	0.36	6.08
*R486	2.39	5.26
Q487	0.14	4.96
V488	0.4	6.43
H528	0.09	3.85
S530	0.09	3.21
V531	0.2	5.38
T532	0.43	7.4
Q537	0.08	3.93
H782	0.19	5.78
*R784	0.54	3.77
*E785	0.63	6.38
W787	0.49	3.47
R798	0.25	8.42
L799	0.26	5.98
M801	0	2.72

Supplementary table 1: In silico Erb1/Ytm1 complex alanine scanning on Erb1 as performed using DrugScore<sup>PP1</sup>. Calculated  $\Delta\Delta G$  obtained for each Erb1 residue in the complex interface are indicated ( $\Delta\Delta G_{cal} = \Delta G^{AL-A}complex - \Delta G^{WT}complex$ ). Asterisks indicates residues with calculated  $\Delta\Delta G > 0.5$  kcal/mol.

Residue	$\Delta\Delta G_{cal}$ (kcal/mol)	Buriedness
*D112	1.69	8.78
*W113	1.19	5.54
*Y151	2.11	7.23
D152	0.26	8.78
S179	0.2	5.62
K181	0.46	6.59
M196	0.37	3.61
D197	0.29	10.06
*R198	1.07	6.1
H224	0.22	7.59
T225	0.13	3.63
S227	0.16	4.62
D229	0.4	7.49
S265	0.13	4.62
L266	0.21	3.67
L267	0.08	2.72
H271	0.05	0.99
*V272	1.23	2.16
T297	0.17	3.7
Q318	0.27	1.99
D319	0.35	12.56
H320	0.42	9.52
H340	0.08	2.86
L343	0.23	3.67
S363	0.22	4.72
R365	0.59	5.31
*N389	1.63	12.99
*K390	1.34	6.36
H409	0.28	6.71
K426	0.07	2.5
E427	0.09	3.22
V456	0.65	2.23
*D459	1.94	5.07
K462	0.74	5.82
F464	0.3	5.87
E478	0.31	8.46

Supplementary table 2: In silico Erb1/Ytm1 complex alanine scanning on Ytm1 as performed using DrugScore<sup>PP1</sup>. Calculated  $\Delta\Delta G$  obtained for each Ytm1 residue in the complex interface are indicated ( $\Delta\Delta G_{cal} = \Delta G^{AL-A}complex - \Delta G^{WT}complex$ ). Asterisks indicates residues with calculated  $\Delta\Delta G > 1.0$  kcal/mol.

## BLI Erb1 | Ytm1 + P1-P3 - Affinity values

Protein-Peptide	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>a</sub> Error	k <sub>d</sub> (1/s)	k <sub>d</sub> Error	X <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
Ref Ytm1-Erb1	3.222e-8	5.35e4	7.06e2	1.724e-3	5.535e-5	0.3016	0.9698
Ytm1-P2	3.557e-7	3.916e4	9.705e2	1.393e-2	2.215e-4	1.578	0.9603
Ytm1-P1	1.902e-7	1.021e5	2.602e3	1.942e-2	2.272e-4	0.5205	0.9822
Ytm1-P3	1.745e-7	7.094e4	1.739e3	1.238e-2	1.536e-4	0.6148	0.974

## BLI Ytm1 | Erb1 + P4-P6 – Affinity values

Protein-Peptide	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>a</sub> Error	k <sub>d</sub> (1/s)	k <sub>d</sub> Error	X <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
Ref Erb1-Ytm1	2.292e-7	5.24e3	3.87e1	1.201e-3	2.504E-5	0.04878	0.9985
Erb1-P5	2.825e-7	5.857e3	5.321e1	1.655e-3	4.406E-5	0.0926	0.9964
Erb1-P4	2.966e-7	5.345e3	4.358e1	1.585e-3	1.704e-5	0.04445	0.9982
Erb1-P6	2.439e-6	4.384e3	2.224e2	1.069e-2e	2.341e-4	0.1423	0.9815

## BLI Biotin-peptide - Affinity values

Peptide-protein	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>a</sub> Error	k <sub>d</sub> (1/s)	k <sub>d</sub> Error	X <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
Biot-P1	3.342e-5	3.865e2	6.967e1	1.292e-2	5.954e-4	16.02	0.9852
Biot-P3	6.287e-6	8.294e2	2.496e1	5.215e-3	1.941e-4	9.07	0.9962

## Microscale Thermoforesis Ytm1 + P1 - Dataset overview

Target name	Ytm1 (labelled Lys)
Target concentration	5 nM
Ligand name	P1
Ligand Concentration	1.23E+3 µM to 0.0751 µM
n	3
Excitation Power	100%
MST Power	60%
KD	8.1965E-6
KD confidence	[5.1079E-06 – 1.3152E-05]
Response Amplitude	10.582501
Std. Error of Regression	0.80869066
Reduced X <sup>2</sup>	1.1260899
Signal to Noise	14.134462



## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



- [1] Crick, F.H.C. On Protein Synthesis. In Proceedings of the Symp Soc Exp Biol; 1958; Vol. 12, p. 8.
- [2] Palade, G.E. A Small Particulate Component of the Cytoplasm. *The Journal of Cell Biology*. 1955, **1**: 59–68.
- [3] Roberts, R.B. Microsomal Particles and Protein Synthesis. 1958.
- [4] Geiduschek, E.P.; Haselkorn, R. Messenger RNA. *Annual review of biochemistry*. 1969, **38**: 647–676.
- [5] Genuth, N.R.; Barna, M. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Molecular Cell*. 2018, **71**: 364–374.
- [6] Dinman, J.D. Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture. *Journal of Molecular Biology*. 2016, **428**: 2186–2194.
- [7] Ramagopal, S. Induction of Cell-Specific Ribosomal Proteins in Aggregation-Competent Nonmorphogenetic Dictyostelium discoideum. *Biochemistry and Cell Biology*. 1990, **68**: 1281–1287.
- [8] Williams, M.E.; Sussex, I.M. Developmental Regulation of Ribosomal Protein L16 Genes in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*. 1995, **8**: 65–76.
- [9] Martinez-Seidel, F.; Beine-Golovchuk, O.; Hsieh, Y.C.; Kopka, J. Systematic Review of Plant Ribosome Heterogeneity and Specialization. *Frontiers in Plant Science*. 2020, **11**: 1–23.
- [10] Melnikov, S.; Ben-Shem, A.; Garreau De Loubresse, N.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. One Core, Two Shells: Bacterial and Eukaryotic Ribosomes. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2012, **19**: 560–567.
- [11] Klinge, S.; Voigts-Hoffmann, F.; Leibundgut, M.; Ban, N. Atomic Structures of the Eukaryotic Ribosome. *Trends in Biochemical Sciences*. 2012, **37**: 189–198.
- [12] De La Cruz, J.; Karbstein, K.; Woolford, J.L. Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes in vivo. *Annual Review of Biochemistry*. 2015, **84**: 93–129.
- [13] Sharma, M.R.; Koc, E.C.; Datta, P.P.; Booth, T.M.; Spremulli, L.L.; Agrawal, R.K. Structure of the Mammalian Mitochondrial Ribosome Reveals an Expanded Functional Role for Its Component Proteins. *Cell*. 2003, **115**: 97–108.
- [14] Koripella, R.K.; Sharma, M.R.; Bhargava, K.; Datta, P.P.; Kaushal, P.S.; Keshavan, P.; Spremulli, L.L.; Banavali, N.K.; Agrawal, R.K. Structures of the Human Mitochondrial Ribosome Bound to EF-G1 Reveal Distinct Features of Mitochondrial Translation Elongation. *Nature Communications*. 2020, **11**: 3830.
- [15] Woolford, J.L.; Baserga, S.J. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2013, **195**: 643–681.
- [16] Ben-Shem, A.; de Loubresse, N.G.; Melnikov, S.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*. 2011, **334**: 1524–1529.
- [17] Steitz, T.A. A Structural Understanding of the Dynamic Ribosome Machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008, **9**: 242–253.
- [18] Brandt, F.; Etchells, S.A.; Ortiz, J.O.; Elcock, A.H.; Hartl, F.U.; Baumeister, W. The Native 3D Organization of Bacterial Polysomes. *Cell*. 2009, **136**: 261–271.

- [19] Brandt, F.; Carlson, L.A.; Hartl, F.U.; Baumeister, W.; Grünewald, K. The Three-Dimensional Organization of Polyribosomes in Intact Human Cells. *Molecular Cell*. 2010, **39**: 560–569.
- [20] Tschochner, H.; Hurt, E. Pre-Ribosomes on the Road from the Nucleolus to the Cytoplasm. *Trends in Cell Biology*. 2003, **13**: 255–263.
- [21] Fatica, A.; Tollervey, D. Making Ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002, **14**: 313–318.
- [22] Kater, L.; Thoms, M.; Barrio-Garcia, C.; Cheng, J.; Ismail, S.; Ahmed, Y.L.; Bange, G.; Kressler, D.; Berninghausen, O.; Sinning, I.; *et al.* Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell*. 2017, **171**: 1599–1610.
- [23] Mccann, K.L.; Charette, J.M.; Vincent, N.G.; Baserga, S.J. A Protein Interaction Map of the LSU Processome. 2015, **29**: 862–875.
- [24] Granneman, S.; Petfalski, E.; Swiatkowska, A.; Tollervey, D. Cracking Pre-40S Ribosomal Subunit Structure by Systematic Analyses of RNA-Protein Cross-Linking. *The EMBO Journal*. 2010, **29**: 2026–2036.
- [25] Klinge, S.; Woolford, J.L. Ribosome Assembly Coming into Focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019, **20**: 116–131.
- [26] Baßler, J.; Hurt, E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annual Review of Biochemistry*. 2019, **88**: 281–306.
- [27] Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science*. 2000, **289**: 905–920.
- [28] Harms, J.; Schluenzen, F.; Zarivach, R.; Bashan, A.; Gat, S.; Agmon, I.; Bartels, H.; Franceschi, F.; Yonath, A. High Resolution Structure of the Large Ribosomal Subunit from a Mesophilic Eubacterium. *Cell*. 2001, **107**: 679–688.
- [29] Schluenzen, F.; Tocilj, A.; Zarivach, R.; Harms, J.; Gluehmann, M.; Janell, D.; Bashan, A.; Bartels, H.; Agmon, I.; Franceschi, F.; *et al.* Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell*. 2000, **102**: 615–623.
- [30] Schuwirth, B.S.; Borovinskaya, M.A.; Hau, C.W.; Zhang, W.; Vila-Sanjurjo, A.; Holton, J.M.; Cate, J.H.D. Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science*. 2005, **310**: 827–834.
- [31] Rabl, J.; Leibundgut, M.; Ataide, S.F.; Haag, A.; Ban, N. Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science*. 2011, **331**: 730–736.
- [32] Bradatsch, B.; Leidig, C.; Granneman, S.; Gnädig, M.; Tollervey, D.; Böttcher, B.; Beckmann, R.; Hurt, E. Structure of the Pre-60S Ribosomal Subunit with Nuclear Export Factor Arx1 Bound at the Exit Tunnel. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2012, **19**: 1234–1241.
- [33] Barrio-Garcia, C.; Thoms, M.; Flemming, D.; Kater, L.; Berninghausen, O.; Baßler, J.; Beckmann, R.; Hurt, E. Architecture of the Rix1-Rea1 Checkpoint Machinery during Pre-60S-Ribosome Remodeling. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2016, **23**: 37–44.
- [34] Wu, S.; Tutuncuoglu, B.; Yan, K.; Brown, H.; Zhang, Y.; Tan, D.; Gamalinda, M.; Yuan, Y.; Li, Z.; Jakovljevic, J.; *et al.* Diverse Roles of Assembly Factors Revealed by Structures of Late Nuclear Pre-60S Ribosomes. *Nature*. 2016, **534**: 133–137.

- [35] Ma, C.; Wu, S.; Li, N.; Chen, Y.; Yan, K.; Li, Z.; Zheng, L.; Lei, J.; Woolford, J.L.; Gao, N. Structural Snapshot of Cytoplasmic Pre-60S Ribosomal Particles Bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2017, **24**: 214–220.
- [36] Amunts, A.; Brown, A.; Toots, J.; Scheres, S.H.W.; Ramakrishnan, V. The Structure of the Human Mitochondrial Ribosome. *Science*. 2015, **348**: 95–98.
- [37] Khatter, H.; Myasnikov, A.G.; Natchiar, S.K.; Klaholz, B.P. Structure of the Human 80S Ribosome. *Nature*. 2015, **520**: 640–645.
- [38] Trapman, J.; Retèl, J.; Planta, R.J. Ribosomal Precursor Particles from Yeast. *Experimental Cell Research*. 1975, **90**: 95–104.
- [39] Udem, S.A.; Warner, J.R. Ribosomal RNA Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*. 1972, **65**: 227–242.
- [40] Warner, J.R. The Economics of Ribosome Biosynthesis in Yeast. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999, **4**: 437–440.
- [41] Tafforeau, L.; Zorbas, C.; Langhendries, J.L.; Mullineux, S.T.; Stamatopoulou, V.; Mullier, R.; Wacheul, L.; Lafontaine, D.L.J. The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors. *Molecular Cell*. 2013, **51**: 539–551.
- [42] Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. Driving Ribosome Assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2010, **1803**: 673–683.
- [43] Konikkat, S.; Woolford, J.L. Principles of 60S Ribosomal Subunit Assembly Emerging from Recent Studies in Yeast. *Biochemical Journal*. 2017, **474**: 195–214.
- [44] Lafontaine, D.L.J. Noncoding RNAs in Eukaryotic Ribosome Biogenesis and Function. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2015, **22**: 11–19.
- [45] Watkins, N.J.; Bohnsack, M.T. The Box C/D and H/ACA SnoRNPs: Key Players in the Modification, Processing and the Dynamic Folding of Ribosomal RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2012, **3**: 397–414.
- [46] Dutca, L.M.; Gallagher, J.E.G.; Baserga, S.J. The Initial U3 SnoRNA:Pre-rRNA Base Pairing Interaction Required for Pre-18S rRNA Folding Revealed by in vivo Chemical Probing. *Nucleic Acids Research*. 2011, **39**: 5164–5180.
- [47] Motorin, Y.; Helm, M. RNA Nucleotide Methylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2011, **2**: 611–631.
- [48] Charette, M.; Gray, M.W. Pseudouridine in RNA: What, Where, How, and Why. *IUBMB Life*. 2000, **49**: 341–351.
- [49] Rout, M.P.; Blobel, G.; Aitchison, J.D. A Distinct Nuclear Import Pathway Used by Ribosomal Proteins. *Cell*. 1997, **89**: 715–725.
- [50] Bange, G.; Murat, G.; Sinning, I.; Hurt, E.; Kressler, D. New Twist to Nuclear Import: When Two Travel Together. *Communicative and Integrative Biology*. 2013, **6**: e24792.
- [51] Kressler, D.; Bange, G.; Ogawa, Y.; Stjepanovic, G.; Bradatsch, B.; Pratte, D.; Amlacher, S.; Strauß, D.; Yoneda, Y.; Katahira, J.; *et al.* Synchronizing Nuclear Import of Ribosomal Proteins with Ribosome Assembly. *Science*. 2012, **338**: 666–671.
- [52] Iouk, T.L.; Aitchison, J.D.; Maguire, S.; Wozniak, R.W. Rrb1p, a Yeast Nuclear WD-Repeat Protein Involved in the Regulation of Ribosome Biosynthesis. *Molecular and Cellular*

- Biology*. 2001, **21**: 1260–1271.
- [53] Schaper, S.; Fromont-Racine, M.; Linder, P.; De la Cruz, J.; Namane, A.; Yaniv, M. A Yeast Homolog of Chromatin Assembly Factor 1 Is Involved in Early Ribosome Assembly. *Current Biology*. 2001, **11**: 1885–1890.
- [54] Koch, B.; Mitterer, V.; Niederhauser, J.; Stanborough, T.; Murat, G.; Rechberger, G.; Bergler, H.; Kressler, D.; Pertschy, B. Yar1 Protects the Ribosomal Protein Rps3 from Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, **287**: 21806–21815.
- [55] Fernández-Pevida, A.; Kressler, D.; de la Cruz, J. Processing of Preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley interdisciplinary Reviews RNA*. 2015, **6**: 191–209.
- [56] Sorensen, P.D.; Frederiksen, S. Characterization of Human 5S rRNA Genes. *Nucleic Acids Research*. 1991, **19**: 4147–4151.
- [57] Ciganda, M.; Williams, N. Eukaryotic 5S rRNA Biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2011, **2**: 523–533.
- [58] Richard, P.; Manley, J.L. Transcription Termination by Nuclear RNA Polymerases. *Genes and Development*. 2009, **23**: 1247–1269.
- [59] Leidig, C.; Thoms, M.; Holdermann, I.; Bradatsch, B.; Berninghausen, O.; Bange, G.; Sinning, I.; Hurt, E.; Beckmann, R. 60S Ribosome Biogenesis Requires Rotation of the 5S Ribonucleoprotein Particle. *Nature Communications*. 2014, **5**: 1173–1178.
- [60] Fernández-Tornero, C.; Moreno-Morcillo, M.; Rashid, U.J.; Taylor, N.M.I.; Ruiz, F.M.; Gruene, T.; Legrand, P.; Steuerwald, U.; Müller, C.W. Crystal Structure of the 14-Subunit RNA Polymerase I. *Nature*. 2013, **502**: 644–649.
- [61] Nogi, Y.; Yano, R.; Nomura, M. Synthesis of Large rRNAs by RNA Polymerase II in Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Defective in RNA Polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991, **88**: 3962–3966.
- [62] Osheim, Y.N.; French, S.L.; Keck, K.M.; Champion, E.A.; Spasov, K.; Dragon, F.; Baserga, S.J.; Beyer, A.L. Pre-18S Ribosomal RNA Is Structurally Compacted into the SSU Processome Prior to Being Cleaved from Nascent Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*. 2004, **16**: 943–954.
- [63] Phipps, K.R.; Charette, J.M.; Baserga, S.J. The Small Subunit Processome in Ribosome Biogenesis—Progress and Prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2011, **2**: 1–21.
- [64] Kornprobst, M.; Turk, M.; Kellner, N.; Cheng, J.; Flemming, D.; Koš-Braun, I.; Koš, M.; Thoms, M.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; *et al.* Architecture of the 90S Pre-Ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell*. 2016, **166**: 380–393.
- [65] Chaker-Margot, M.; Barandun, J.; Hunziker, M.; Klinge, S. Architecture of the Yeast Small Subunit Processome. *Science*. 2017, **355**: eaal1880.
- [66] Henras, A.K.; Plisson-Chastang, C.; O’Donohue, M.F.; Chakraborty, A.; Gleizes, P.E. An Overview of Pre-Ribosomal RNA Processing in Eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2015, **6**: 225–242.
- [67] Strunk, B.S.; Karbstein, K. Powering through Ribosome Assembly. *RNA*. 2009, **15**: 2083–2104, **15**: 2083–104.
- [68] Bleichert, F.; Baserga, S.J. The Long Unwinding Road of RNA Helicases. *Molecular Cell*.

- 2007, **27**: 339–352.
- [69] Karbstein, K.; Jonas, S.; Doudna, J.A. An Essential GTPase Promotes Assembly of Preribosomal RNA Processing Complexes. *Molecular Cell*. 2005, **20**: 633–643.
- [70] Barandun, J.; Hunziker, M.; Klinge, S. Assembly and Structure of the SSU Processome—a Nucleolar Precursor of the Small Ribosomal Subunit. *Current Opinion in Structural Biology*. 2018, **49**: 85–93.
- [71] Krogan, N.J.; Peng, W.T.; Cagney, G.; Robinson, M.D.; Haw, R.; Zhong, G.; Guo, X.; Zhang, X.; Canadien, V.; Richards, D.P.; *et al.* High-Definition Macromolecular Composition of Yeast RNA-Processing Complexes. *Molecular Cell*. 2004, **13**: 225–239.
- [72] Turowski, T.W.; Tollervey, D. Cotranscriptional Events in Eukaryotic Ribosome Synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2015, **6**: 129–139.
- [73] Horn, D.M.; Mason, S.L.; Karbstein, K. Rcl1 Protein, a Novel Nuclease for 18 S Ribosomal RNA Production. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**: 34082–34087.
- [74] Tomecki, R.; Labno, A.; Drazkowska, K.; Cysewski, D.; Dziembowski, A. HUTP24 Is Essential for Processing of the Human rRNA Precursor at Site A1but Not at Site A0. *RNA Biology*. 2015, **12**: 1010–1029.
- [75] Wells, G.R.; Weichmann, F.; Colvin, D.; Sloan, K.E.; Kudla, G.; Tollervey, D.; Watkins, N.J.; Schneider, C. The PIN Domain Endonuclease Utp24 Cleaves Pre-Ribosomal RNA at Two Coupled Sites in Yeast and Humans. *Nucleic Acids Research*. 2016, **44**: 5399–5409.
- [76] Fatica, A.; Oeffinger, M.; Dlakić, M.; Tollervey, D. Nob1p Is Required for Cleavage of the 3' End of 18S rRNA. *Molecular and Cellular Biology*. 2003, **23**: 1798–1807.
- [77] Granneman, S.; Nandineni, M.R.; Baserga, S.J. The Putative NTPase Fap7 Mediates Cytoplasmic 20S Pre-rRNA Processing through a Direct Interaction with Rps14. *Molecular and Cellular Biology*. 2005, **25**: 10352–10364.
- [78] Vanrobays, E.; Gelugne, J.-P.; Gleizes, P.-E.; Caizergues-Ferrer, M. Late Cytoplasmic Maturation of the Small Ribosomal Subunit Requires RIO Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 2003, **23**: 2083–2095.
- [79] Gelperin, D.; Horton, L.; Beckman, J.; Hensold, J.; Lemmon, S.K. Bms1p, a Novel GTP-Binding Protein, and the Related Tsr1p Are Required for Distinct Steps of 40S Ribosome Biogenesis in Yeast. *RNA*. 2001, **7**: 1268–1283.
- [80] Dosil, M.; Bustelo, X.M. Functional Characterization of Pwp2, a WD Family Protein Essential for the Assembly of the 90 S Pre-Ribosomal Particle. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**: 37385–37397.
- [81] Pöll, G.; Li, S.; Ohmayer, U.; Hierlmeier, T.; Milkereit, P.; Perez-Fernez, J. In vitro Reconstitution of Yeast TUTP/UTP a and UTP B Subcomplexes Provides New Insights into Their Modular Architecture. *PLoS ONE*. 2014, **9**: 1–18.
- [82] Pérez-Fernández, J.; Martín-Marcos, P.; Dosil, M. Elucidation of the Assembly Events Required for the Recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto Nascent Pre-Ribosomes. *Nucleic Acids Research*. 2011, **39**: 8105–8121.
- [83] Woolford, J.L.; Baserga, S.J. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2013, **195**: 643–681.
- [84] Kufel, J.; Dichtl, B.; Tollervey, D. Yeast Rnt1p Is Required for Cleavage of the Pre-

- Ribosomal RNA in the 3' ETS but Not the 5' ETS. *RNA*. 1999, **5**: 909–917.
- [85] Gamalinda, M.; Ohmayer, U.; Jakovljevic, J.; Kumcuoglu, B.; Woolford, J.; Mbom, B.; Lin, L.; Woolford, J.L. A Hierarchical Model for Assembly of Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit Domains. *Genes and Development*. 2014, **28**: 198–210.
- [86] Rodríguez-Galán, O.; García-Gómez, J.J.; De la Cruz, J. Yeast and Human RNA Helicases Involved in Ribosome Biogenesis: Current Status and Perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2013, **1829**: 775–790.
- [87] Henry, Y.; Wood, H.; Morrissey, J.P.; Petfalski, E.; Kearsley, S.; Tollervey, D. The 5' End of Yeast 5.8S rRNA Is Generated by Exonucleases from an Upstream Cleavage Site. *The EMBO Journal*. 1994, **13**: 2452–2463.
- [88] Chu, S.; Archer, R.H.; Zengel, J.M.; Lindahl, L. The RNA of RNase MRP is Required for Normal Processing of Ribosomal RNA. *Genetics*. 1994, **91**: 659–663.
- [89] Perederina, A.; Li, D.; Lee, H.; Bator, C.; Berezin, I.; Hafenstein, S.L.; Krasilnikov, A.S. Cryo-EM Structure of Catalytic Ribonucleoprotein Complex RNase MRP. *Nature Communications*. 2020, **11**: 1–10.
- [90] Oeffinger, M.; Zenklusen, D.; Ferguson, A.; Wei, K.E.; El Hage, A.; Tollervey, D.; Chait, B.T.; Singer, R.H.; Rout, M.P. Rrp17p Is a Eukaryotic Exonuclease Required for 5' End Processing of Pre-60S Ribosomal RNA. *Molecular Cell*. 2009, **36**: 768–781.
- [91] El Hage, A.; Koper, M.; Kufel, J.; Tollervey, D. Efficient Termination of Transcription by RNA Polymerase I Requires the 5' Exonuclease Rat1 in Yeast. *Genes and Development*. 2008, **22**: 1069–1081.
- [92] Fatica, A.; Oeffinger, M.; Tollervey, D.; Bozzoni, I. Cic1p/Nsa3p Is Required for Synthesis and Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits. *RNA*. 2003, **9**: 1431–1436.
- [93] Miles, T.D.; Jakovljevic, J.; Horsey, E.W.; Harnpicharnchai, P.; Tang, L.; Woolford, J.L. Ytm1, Nop7, and Erb1 Form a Complex Necessary for Maturation of Yeast 66S Preribosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 2005, **25**: 10419–32.
- [94] Tang, L.; Sahasranaman, A.; Jakovljevic, J.; Schleifman, E.; Woolford, J.L. Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 Required for Assembly of the Nop7-Subcomplex in Yeast Preribosomes. *Molecular Biology of the Cell*. 2008, **19**: 2844–2856.
- [95] Dembowski, J.A.; Kuo, B.; Woolford, J.L. Has1 Regulates Consecutive Maturation and Processing Steps for Assembly of 60S Ribosomal Subunits. *Nucleic Acids Research*. 2013, **41**: 7889–7904.
- [96] Talkish, J.; Biedka, S.; Jakovljevic, J.; Zhang, J.; Tang, L.; Strahler, J.R.; Andrews, P.C.; Maddock, J.R.; Woolford, J.L. Disruption of Ribosome Assembly in Yeast Blocks Cotranscriptional Pre-rRNA Processing and Affects the Global Hierarchy of Ribosome Biogenesis. *RNA*. 2016, **22**: 852–866.
- [97] Konikkat, S.; Woolford Jr, J.L. Principles of 60S Ribosomal Subunit Assembly Emerging from Recent Studies in Yeast. *Biochemical Journal*. 2017, **474**: 195–214.
- [98] Dembowski, J.A.; Ramesh, M.; Mcmanus, C.J.; Jr, J.L.W. Identification of the Binding Site of Rlp7 on Assembling 60S Ribosomal Subunits in *Saccharomyces cerevisiae* Identification of the Binding Site of Rlp7 on Assembling 60S Ribosomal Subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 2013, **19**: 1639–1647.
- [99] Gasse, L.; Flemming, D.; Hurt, E. Coordinated Ribosomal ITS2 RNA Processing by the Las1



- Complex Integrating Endonuclease, Polynucleotide Kinase, and Exonuclease Activities. *Molecular Cell*. 2015, **60**: 808–815.
- [100] Saveanu, C.; Bienvenu, D.; Namane, A.; Gleizes, P.E.; Gas, N.; Jacquier, A.; Fromont-Racine, M. Nog2p, a Putative GTPase Associated with Pre-60S Subunits and Required for Late 60S Maturation Steps. *The EMBO Journal*. 2001, **20**: 6475–6484.
- [101] Lebreton, A.; Saveanu, C.; Decourty, L.; Jacquier, A.; Fromont-Racine, M. Nsa2 Is an Unstable, Conserved Factor Required for the Maturation of 27 SB Pre-rRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, **281**: 27099–27108.
- [102] Baßler, J.; Kallas, M.; Pertschy, B.; Ulbrich, C.; Thoms, M.; Hurt, E. The AAA-ATPase Rea1 Drives Removal of Biogenesis Factors during Multiple Stages of 60S Ribosome Assembly. *Molecular Cell*. 2010, **38**: 712–721.
- [103] Gadai, O.; Strauß, D.; Braspenning, J.; Hoepfner, D.; Petfalski, E.; Philippsen, P.; Tollervey, D.; Hurt, E. A Nuclear AAA-Type ATPase (Rix7p) Is Required for Biogenesis and Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits. *The EMBO Journal*. 2001, **20**: 3695–3704.
- [104] Matsuo, Y.; Granneman, S.; Thoms, M.; Manikas, R.-G.; Tollervey, D.; Hurt, E. Coupled GTPase and Remodelling ATPase Activities Form a Checkpoint for Ribosome Export. *Nature*. 2014, **505**: 112–116.
- [105] Nerurkar, P.; Altvater, M.; Gerhardy, S.; Schütz, S.; Fischer, U.; Weirich, C.; Panse, V.G. Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2015, **319**: 107–140.
- [106] Harnpicharnchai, P.; Jakovljevic, J.; Horsey, E.; Miles, T.; Roman, J.; Rout, M.; Meagher, D.; Imai, B.; Guo, Y.; Brame, C.J.; *et al.* Composition and Functional Characterization of Yeast 66S Ribosome Assembly Intermediates. *Molecular Cell*. 2001, **8**: 505–515.
- [107] Wehner, K.A.; Baserga, S.J. The  $\Sigma 70$ -like Motif: A Eukaryotic RNA Binding Domain Unique to a Superfamily of Proteins Required for Ribosome Biogenesis. *Molecular Cell*. 2002, **9**: 329–339.
- [108] Baßler, J.; Grandi, P.; Gadai, O.; Leßmann, T.; Petfalski, E.; Tollervey, D.; Lechner, J.; Hurt, E. Identification of a 60S Preribosomal Particle That Is Closely Linked to Nuclear Export. *Molecular Cell*. 2001, **8**: 517–529.
- [109] Sanghai, Z.A.; Miller, L.; Molloy, K.R.; Barandun, J.; Hunziker, M.; Chaker-Margot, M.; Wang, J.; Chait, B.T.; Klinge, S. Modular Assembly of the Nucleolar Pre-60S Ribosomal Subunit. *Nature*. 2018, **556**: 126–129.
- [110] Harnpicharnchai, P.; Jakovljevic, J.; Horsey, E.; Miles, T.; Roman, J.; Rout, M.; Meagher, D.; Imai, B.; Guo, Y.; Brame, C.J.; *et al.* Composition and Functional Characterization of Yeast 66S Ribosome Assembly Intermediates. *Molecular Cell*. 2001, **8**: 505–515.
- [111] Rohrmoser, M.; Hölzel, M.; Grimm, T.; Malamoussi, A.; Harasim, T.; Orban, M.; Pfisterer, I.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Eick, D. Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 Controls Nucleolar Localization and Assembly of the PeBoW Complex Required for Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. *Molecular and Cellular Biology*. 2007, **27**: 3682–3694.
- [112] Granneman, S.; Petfalski, E.; Tollervey, D. A Cluster of Ribosome Synthesis Factors Regulate Pre-rRNA Folding and 5.8S rRNA Maturation by the Rat1 Exonuclease. *The EMBO Journal*. 2011, **30**: 4006–4019.

- [113] Sahasranaman, A.; Dembowski, J.; Strahler, J.; Andrews, P.; Maddock, J.; Woolford Jr, J.L. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S Ribosomal Subunits: Role of Factors Required for 27S Pre-rRNA Processing. *The EMBO Journal*. 2011, **30**: 4020–4032.
- [114] Granneman, S.; Petfalski, E.; Tollervey, D. A Cluster of Ribosome Synthesis Factors Regulate Pre-rRNA Folding and 5.8S rRNA Maturation by the Rat1 Exonuclease. *The EMBO Journal*. 2011, **30**: 4006–4019.
- [115] Sahasranaman, A.; Dembowski, J.; Strahler, J.; Andrews, P.; Maddock, J.; Woolford, J.L. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S Ribosomal Subunits: Role of Factors Required for 27S Pre-rRNA Processing. *The EMBO Journal*. 2011, **30**: 4020–4032.
- [116] Pestov, D.G.; Stockelman, M.G.; Strezoska, Z.; Lau, L.F. ERB1, the Yeast Homolog of Mammalian Bop1, Is an Essential Gene Required for Maturation of the 25S and 5.8S Ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2001, **29**: 3621–3630.
- [117] Adams, C.C.; Jakovljevic, J.; Roman, J.; Harnpicharnchai, P.; Woolford, J.L. *Saccharomyces cerevisiae* Nucleolar Protein Nop7p Is Necessary for Biogenesis of 60S Ribosomal Subunits. *RNA*. 2002, **8**: 150–165.
- [118] Holzel, M. Mammalian WDR12 Is a Novel Member of the Pes1-Bop1 Complex and Is Required for Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation. *The Journal of Cell Biology*. 2005, **170**: 367–378.
- [119] Grimm, T.; Hölzel, M.; Rohrmoser, M.; Harasim, T.; Malamoussi, A.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Eick, D. Dominant-Negative Pes1 Mutants Inhibit Ribosomal RNA Processing and Cell Proliferation via Incorporation into the PeBoW-Complex. *Nucleic Acids Research*. 2006, **34**: 3030–3043.
- [120] Du, Y.-C.N.; Stillman, B. Yph1p, an ORC-Interacting Protein: Potential Links between Cell Proliferation Control, DNA Replication, and Ribosome Biogenesis. *Cell*. 2002, **109**: 835–848.
- [121] Thoms, M.; Ahmed, Y.L.; Maddi, K.; Hurt, E.; Sinning, I. Concerted Removal of the Erb1-Ytm1 Complex in Ribosome Biogenesis Relies on an Elaborate Interface. *Nucleic Acids Research*. 2016, **44**: 926–939.
- [122] Pestov, D.G.; Strezoska, Ž.; Lau, L.F. Evidence of P53-Dependent Cross-Talk between Ribosome Biogenesis and the Cell Cycle: Effects of Nucleolar Protein Bop1 on G<sub>1</sub>/S Transition. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, **21**: 4246–4255.
- [123] Strezoska, Z.; Pestov, D.G.; Lau, L.F. Functional Inactivation of the Mouse Nucleolar Protein Bop1 Inhibits Multiple Steps in Pre-rRNA Processing and Blocks Cell Cycle Progression. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**: 29617–29625.
- [124] Killian, A.; Le Meur, N.; Sesboué, R.; Bourguignon, J.; Bougeard, G.; Gautherot, J.; Bastard, C.; Frébourg, T.; Flaman, J.M. Inactivation of the RRB1-Pescadillo Pathway Involved in Ribosome Biogenesis Induces Chromosomal Instability. *Oncogene*. 2004, **23**: 8597–8602.
- [125] Killian, A.; Sarafan-Vasseur, N.; Sesboué, R.; Le Pessot, F.; Blanchard, F.; Lamy, A.; Laurent, M.; Flaman, J.; Frébourg, T. Contribution of the BOP1 Gene, Located on 8q24, to Colorectal Tumorigenesis. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006, **45**: 874–881.
- [126] Pestov, D.G.; Stockelman, M.G.; Strezoska, Z.; Lau, L.F. ERB1, the Yeast Homolog of Mammalian Bop1, Is an Essential Gene Required for Maturation of the 25S and 5.8S Ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2001, **29**: 3621–3630.

- [127] Strezoska, Ž.; Pestov, D.G.; Lau, L.F. Bop1 Is a Mouse WD40 Repeat Nucleolar Protein Involved in 28S and 5.8S rRNA Processing and 60S Ribosome Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2000, **20**: 5516–5528.
- [128] Chung, K.Y.; Cheng, I.K.C.; Ching, A.K.K.; Chu, J.H.; Lai, P.B.S.; Wong, N. Block of Proliferation 1 (BOP1) Plays an Oncogenic Role in Hepatocellular Carcinoma by Promoting Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Hepatology*. 2011, **54**: 307–318.
- [129] Konikkat, S.; Biedka, S.; Woolford, J.L. The Assembly Factor Erb1 Functions in Multiple Remodeling Events during 60S Ribosomal Subunit Assembly in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 2017, **45**: 4853–4865.
- [130] Węgrecki, M.; Rodríguez-Galán, O.; de la Cruz, J.; Bravo, J. The Structure of Erb1-Ytm1 Complex Reveals the Functional Importance of a High-Affinity Binding between Two  $\beta$ -Propellers during the Assembly of Large Ribosomal Subunits in Eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 2015, **43**: 11017–11030.
- [131] Węgrecki, M.; Neira, J.L.; Bravo, J. The Carboxy-Terminal Domain of Erb1 Is a Seven-Bladed  $\beta$ -Propeller That Binds RNA. *PLoS ONE*. 2015, **10**: 1–22.
- [132] Chevaillier, P. Pest Sequences in Nuclear Proteins. *International Journal of Biochemistry*. 1993, **25**: 479–482.
- [133] Chaudhuri, I.; Söding, J.; Lupas, A.N. Evolution of the  $\beta$ -Propeller Fold. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2008, **71**: 795–803.
- [134] Chen, C.K.M.; Chan, N.L.; Wang, A.H.J. The Many Blades of the  $\beta$ -Propeller Proteins: Conserved but Versatile. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011, **36**: 553–561.
- [135] Smith, T.F.; Gaitatzes, C.; Saxena, K.; Neer, E.J. The WD Repeat: A Common Architecture for Diverse Functions. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999, **24**: 181–185.
- [136] Xu, C.; Min, J. Structure and Function of WD40 Domain Proteins. *Protein and Cell*. 2011, **2**: 202–214.
- [137] Garcia-Higuera, I.; Fenoglio, J.; Li, Y.; Lewis, C.; Panchenko, M.P.; Reiner, O.; Smith, T.F.; Neer, E.J. Folding of Proteins with WD-Repeats: Comparison of Six Members of the WD-Repeat Superfamily to the G Protein  $\beta$  Subunit. *Biochemistry*. 1996, **35**: 13985–13994.
- [138] Falk, S.; Tants, J.N.; Basquin, J.; Thoms, M.; Hurt, E.; Sattler, M.; Conti, E. Structural Insights into the Interaction of the Nuclear Exosome Helicase Mtr4 with the Preribosomal Protein Nop53. *RNA*. 2017, **23**: 1780–1787.
- [139] McCann, K.L.; Charette, J.M.; Vincent, N.G.; Baserga, S.J. A Protein Interaction Map of the LSU Processome. *Genes and Development*. 2015, **29**: 862–875.
- [140] Krogan, N.J.; Cagney, G.; Yu, H.; Zhong, G.; Guo, X.; Ignatchenko, A.; Li, J.; Pu, S.; Datta, N.; Tikuisis, A.P.; *et al.* Global Landscape of Protein Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2006, **440**: 637–643.
- [141] Kellner, M.; Rohmoser, M.; Forné, I.; Voss, K.; Burger, K.; Mühl, B.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Imhof, A.; Eick, D. DEAD-Box Helicase DDX27 Regulates 3' End Formation of Ribosomal 47S RNA and Stably Associates with the PeBoW-Complex. *Experimental Cell Research*. 2015, **334**: 146–159.
- [142] Kinoshita, Y.; Jarell, A.D.; Flaman, J.M.; Foltz, G.; Schuster, J.; Sopher, B.L.; Irvin, D.K.; Kanning, K.; Kornblum, H.I.; Nelson, P.S.; *et al.* Pescadillo, a Novel Cell Cycle Regulatory Protein Abnormally Expressed in Malignant Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001,

- 276:** 6656–6665.
- [143] Allende, M.L.; Amsterdam, A.; Becker, T.; Kawakami, K.; Gaiano, N.; Hopkins, N. Insertional Mutagenesis in Zebrafish Identifies Two Novel Genes, Pescadillo and Dead Eye, Essential for Embryonic Development. *Genes and Development*. 1996, **10**: 3141–3155.
- [144] Haque, J.; Boger, S.; Li, J.; Duncan, S.A. The Murine Pes1 Gene Encodes a Nuclear Protein Containing a BRCT Domain. *Genomics*. 2000, **70**: 201–210.
- [145] Zografidis, A.; Kapolas, G.; Podia, V.; Beri, D.; Papadopoulou, K.; Milioni, D.; Haralampidis, K. Transcriptional Regulation and Functional Involvement of the Arabidopsis Pescadillo Ortholog AtPES in Root Development. *Plant Science*. 2014, **229**: 53–65.
- [146] Tecza, A.; Bugner, V.; Kühl, M.; Kühl, S.J. Pescadillo Homologue 1 and Peter Pan Function during *Xenopus laevis* Pronephros Development. *Biology of the Cell*. 2011, **103**: 483–498.
- [147] Sakumoto, N.; Yamashita, H.; Mukai, Y.; Kaneko, Y.; Harashima, S. Dual-Specificity Protein Phosphatase Yvh1p, Which Is Required for Vegetative Growth and Sporulation, Interacts with Yeast Pescadillo Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001, **289**: 608–615.
- [148] Sikorski, E.M.; Uo, T.; Morrison, R.S.; Agarwal, A. Pescadillo Interacts with the Cadmium Response Element of the Human Heme Oxygenase-1 Promoter in Renal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, **281**: 24423–24430.
- [149] Lerch-Gaggl, A.; Haque, J.; Li, J.; Ning, G.; Traktman, P.; Duncan, S.A. Pescadillo Is Essential for Nucleolar Assembly, Ribosome Biogenesis, and Mammalian Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**: 45347–45355.
- [150] Oeffinger, M.; Lueng, A.; Lamond, A.; Tollervey, D. Yeast Pescadillo Is Required for Multiple Activities during 60s Ribosomal Subunit Synthesis. *RNA*. 2002, **8**: 626–636.
- [151] Lerch-Gaggl, A.F.; Sun, K.; Duncan, S.A. Light Chain 1 of Microtubule-Associated Protein 1B Can Negatively Regulate the Action of Pes1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**: 11308–11316.
- [152] Xie, W.; Qu, L.; Meng, L.; Liu, C.; Wu, J.; Shou, C. PES1 Regulates Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to Anticancer Drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, **431**: 460–465.
- [153] Hölzel, M.; Grimm, T.; Rohrmoser, M.; Malamoussi, A.; Harasim, T.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Eick, D. The BRCT Domain of Mammalian Pes1 Is Crucial for Nucleolar Localization and rRNA Processing. *Nucleic Acids Research*. 2007, **35**: 789–800.
- [154] Li, S.; Wang, M.; Qu, X.; Xu, Z.; Yang, Y.; Su, Q.; Wu, H. SUMOylation of PES1 Upregulates Its Stability and Function via Inhibiting Its Ubiquitination. *Oncotarget*. 2016, **7**: 50522–50534.
- [155] Kote-Jarai, Z.; Eeles, R.A. BRCA1, BRCA2 and Their Possible Function in DNA Damage Response. *British Journal of Cancer*. 1999, **81**: 1099–1102.
- [156] Callebaut, I.; Morion, J.P. From BRCA1 to RAP1: A Widespread BRCT Module Closely Associated with DNA Repair. *FEBS Letters*. 1997, **400**: 25–30.
- [157] Zhang, X.; Moréra, S.; Bates, P.A.; Whitehead, P.C.; Coffey, A.I.; Hainbucher, K.; Nash, R.A.; Sternberg, M.J.E.; Lindahl, T.; Freemont, P.S. Structure of an XRCC1 BRCT Domain: A New Protein-Protein Interaction Module. *The EMBO Journal*. 1998, **17**: 6404–6411.

- [158] Leung, C.C.Y.; Glover, J.N.M. BRCT Domains: Easy as One, Two, Three. *Cell Cycle*. 2011, **10**: 2461–2470.
- [159] Ouspenski, I.I.; Elledge, S.J.; Brinkley, B.R. New Yeast Genes Important for Chromosome Integrity and Segregation Identified by Dosage Effects on Genome Stability. *Nucleic Acids Research*. 1999, **27**: 3001–3008.
- [160] Huh, K. W.; Falvo, V., J.; Gerke, C., L.; Carroll, S., A.; Howson, W., R.; *et al.* Global Analysis of Protein Localization in Budding Yeast. *Nature*. 2003, **425**: 686–691.
- [161] Yin, Y.; Zhou, L.; Zhan, R.; Zhang, Q.; Li, M. Identification of WDR12 as a Novel Oncogene Involved in Hepatocellular Carcinoma Propagation. *Cancer Management and Research*. 2018, **10**: 3985–3993.
- [162] Li, J.L.; Chen, C.; Chen, W.; Zhao, L.F.; Xu, X.K.; Li, Y.; Yuan, H.Y.; Lin, J.R.; Pan, J.P.; Jin, B.L.; *et al.* Integrative Genomic Analyses Identify WDR12 as a Novel Oncogene Involved in Glioblastoma. *Journal of Cellular Physiology*. 2020, **235**: 7344–7355.
- [163] Moilanen, A.M.; Rysä, J.; Kaikkonen, L.; Karvonen, T.; Mustonen, E.; Serpi, R.; Szabó, Z.; Tenhunen, O.; Bagyura, Z.; Näpänkangas, J.; *et al.* WDR12, a Member of Nucleolar PeBoW-Complex, Is up-Regulated in Failing Hearts and Causes Deterioration of Cardiac Function. *PLoS ONE*. 2015, **10**: 1–32.
- [164] Nal, B.; Mohr, E.; Silva, M.I. Da; Tagett, R.; Navarro, C.; Carroll, P.; Depetris, D.; Verthuy, C.; Jordan, B.R.; Ferrier, P. Wdr12, a Mouse Gene Encoding a Novel WD-Repeat Protein with a Notchless-like Amino-Terminal Domain. *Genomics*. 2002, **79**: 77–86.
- [165] Hölzel, M.; Rohrmoser, M.; Schlee, M.; Grimm, T.; Harasim, T.; Malamoussi, A.; Gruber-Eber, A.; Kremmer, E.; Hiddemann, W.; Bornkamm, G.W.; *et al.* Mammalian WDR12 Is a Novel Member of the Pes1-Bop1 Complex and Is Required for Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation. *Journal of Cell Biology*. 2005, **170**: 367–378.
- [166] Ulbrich, C.; Diepholz, M.; Baßler, J.; Kressler, D.; Pertschy, B.; Galani, K.; Böttcher, B.; Hurt, E. Mechanochemical Removal of Ribosome Biogenesis Factors from Nascent 60S Ribosomal Subunits. *Cell*. 2009, **138**: 911–922.
- [167] Ahmed, Y.L.; Thoms, M.; Mitterer, V.; Sinning, I.; Hurt, E. Crystal Structures of Rea1-MIDAS Bound to Its Ribosome Assembly Factor Ligands Resembling Integrin–Ligand-Type Complexes. *Nature Communications*. 2019, **10**: 3050.
- [168] Miles, T.D.; Jakovljevic, J.; Horsey, E.W.; Harnpicharnchai, P.; Tang, L.; Woolford, J.L. Ytm1, Nop7, and Erb1 Form a Complex Necessary for Maturation of Yeast 66S Preribosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 2005, **25**: 10419–10432.
- [169] Wu, S.; Tutuncuoglu, B.; Yan, K.; Brown, H.; Zhang, Y.; Tan, D.; Gamalinda, M.; Yuan, Y.; Li, Z.; Jakovljevic, J.; *et al.* Diverse Roles of Assembly Factors Revealed by Structures of Late Nuclear Pre-60S Ribosomes. *Nature*. 2016, **534**: 133–137.
- [170] Schmidt, E. V. The Role of C-Myc in Cellular Growth Control. *Oncogene*. 1999, **18**: 2988–2996.
- [171] Fujii, K.; Kitabatake, M.; Sakata, T.; Miyata, A.; Ohno, M. A Role for Ubiquitin in the Clearance of Nonfunctional rRNAs. *Genes and Development*. 2009, **23**: 963–974.
- [172] Houseley, J.; Tollervey, D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*. 2009, **136**: 763–776.
- [173] Ganapathi, K.A.; Shimamura, A. Ribosomal Dysfunction and Inherited Marrow Failure.

- British Journal of Haematology*. 2008, **141**: 376–387.
- [174] Armistead, J.; Triggs-Raine, B. Diverse Diseases from a Ubiquitous Process: The Ribosomopathy Paradox. *FEBS Letters*. 2014, **588**: 1491–1500.
- [175] Ruggero, D.; Pandolfi, P.P. Does the Ribosome Translate Cancer? *Nature Reviews Cancer*. 2003, **3**: 179–192.
- [176] Orsolich, I.; Jurada, D.; Pullen, N.; Oren, M.; Eliopoulos, A.G.; Volarevic, S. The Relationship between the Nucleolus and Cancer: Current Evidence and Emerging Paradigms. *Seminars in Cancer Biology*. 2016, **37–38**: 36–50.
- [177] Truitt, M.L.; Ruggero, D. New Frontiers in Translational Control of the Cancer Genome. *Nature Reviews Cancer*. 2016, **16**: 288–304.
- [178] Montanaro, L.; Treré, D.; Derenzini, M. Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *American Journal of Pathology*. 2008, **173**: 301–310.
- [179] Zink, D.; Fischer, A.H.; Nickerson, J.A. Nuclear Structure in Cancer Cells. *Nature Reviews Cancer*. 2004, **4**: 677–687.
- [180] Volarević, S.; Stewart, M.J.; Ledermann, B.; Zilberman, F.; Terracciano, L.; Montini, E.; Grompe, M.; Kozma, S.C.; Thomas, G. Proliferation, but Not Growth, Blocked by Conditional Deletion of 40S Ribosomal Protein S6. *Science*. 2000, **288**: 2045–2047.
- [181] Danilova, N.; Gazda, H.T. Ribosomopathies: How a Common Root Can Cause a Tree of Pathologies. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2015, **8**: 1013–1026.
- [182] Brighenti, E.; Treré, D.; Derenzini, M. Targeted Cancer Therapy with Ribosome Biogenesis Inhibitors: A Real Possibility? *Oncotarget*. 2015, **6**: 38617–38627.
- [183] Golomb, L.; Volarevic, S.; Oren, M. P53 and Ribosome Biogenesis Stress: The Essentials. *FEBS Letters*. 2014, **588**: 2571–2579.
- [184] McGowan, K.A.; Li, J.Z.; Park, C.Y.; Beaudry, V.; Tabor, H.K.; Sabnis, A.J.; Zhang, W.; Fuchs, H.; De Angelis, M.H.; Myers, R.M.; *et al.* Ribosomal Mutations Cause P53-Mediated Dark Skin and Pleiotropic Effects. *Nature Genetics*. 2008, **40**: 963–970.
- [185] Rubbi, C.P.; Milner, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The EMBO Journal*. 2003, **22**: 6068–6077.
- [186] Ferreira, R.; Schneekloth, J.S.; Panov, K.I.; Hannan, K.M.; Hannan, R.D. Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age. *Cells*. 2020, **9**: 1–23.
- [187] Haupt, Y.; Mayat, R.; Kazantz, A.; Orent, M. Letters to Nature Mdm2 Promotes the Rapid Degradation of P53. *Nature*. 1997, **387**: 296–299.
- [188] Kubbutat, M.H.G.; Jones, S.N.; Vousden, K.H. Regulation of P53 Stability by Mdm2. *Nature*. 1997, **387**: 299–303.
- [189] Candeias, M.M.; Malbert-Colas, L.; Powell, D.J.; Daskalogianni, C.; Maslon, M.M.; Naski, N.; Bourougaa, K.; Calvo, F.; Fåhræus, R. P53 mRNA Controls P53 Activity by Managing Mdm2 Functions. *Nature Cell Biology*. 2008, **10**: 1098–1105.
- [190] Gajjar, M.; Candeias, M.M.; Malbert-Colas, L.; Mazars, A.; Fujita, J.; Olivares-Illana, V.; Fåhræus, R. The P53 mRNA-Mdm2 Interaction Controls Mdm2 Nuclear Trafficking and Is Required for P53 Activation Following Dna Damage. *Cancer Cell*. 2012, **21**: 25–35.
- [191] Liu, Y.; Deisenroth, C.; Zhang, Y. RP–MDM2–P53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis

- and Tumor Surveillance. *Trends in cancer*. 2016, **2**: 191–204.
- [192] Reed, S.M.; Hagen, J.; Tompkins, V.S.; Thies, K.; Quelle, F.W.; Quelle, D.E. Nuclear Interactor of ARF and Mdm2 Regulates Multiple Pathways to Activate P53. *Cell Cycle*. 2014, **13**: 1288–1298.
- [193] Argentini, M.; Barboule, N.; Wasylyk, B. The Contribution of the Acidic Domain of MDM2 to P53 and MDM2 Stability. *Oncogene*. 2001, **20**: 1267–1275.
- [194] Colombo, E.; Alcalay, M.; Pelicci, P.G. Nucleophosmin and Its Complex Network: A Possible Therapeutic Target in Hematological Diseases. *Oncogene*. 2011, **30**: 2595–2609.
- [195] Brady, S.N.; Yu, Y.; Maggi, L.B.; Weber, J.D. ARF Impedes NPM/B23 Shuttling in an Mdm2-Sensitive Tumor Suppressor Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2004, **24**: 9327–9338.
- [196] Dai, M.-S.; Sun, X.-X.; Lu, H. Aberrant Expression of Nucleostemin Activates P53 and Induces Cell Cycle Arrest via Inhibition of MDM2. *Molecular and Cellular Biology*. 2008, **28**: 4365–4376.
- [197] Saxena, A.; Rorie, C.J.; Dimitrova, D.; Daniely, Y.; Borowiec, J.A. Nucleolin Inhibits Hdm2 by Multiple Pathways Leading to P53 Stabilization. *Oncogene*. 2006, **25**: 7274–7288.
- [198] Challagundla, K.B.; Sun, X.-X.; Zhang, X.; DeVine, T.; Zhang, Q.; Sears, R.C.; Dai, M.-S. Ribosomal Protein L11 Recruits MiR-24/MiRISC To Repress c-Myc Expression in Response to Ribosomal Stress. *Molecular and Cellular Biology*. 2011, **31**: 4007–4021.
- [199] Donati, G.; Brighenti, E.; Vici, M.; Mazzini, G.; Treré, D.; Montanaro, L.; Derenzini, M. Selective Inhibition of rRNA Transcription Downregulates E2F-1: A New P53-Independent Mechanism Linking Cell Growth to Cell Proliferation. *Journal of Cell Science*. 2011, **124**: 3017–3028.
- [200] Wang, S.; Huang, J.; He, J.; Wang, A.; Xu, S.; Huang, S.F.; Xiao, S. RPL41, a Small Ribosomal Peptide Deregulated in Tumors, Is Essential for Mitosis and Centrosome Integrity. *Neoplasia*. 2010, **12**: 284–293.
- [201] Xu, X.; Xiong, X.; Sun, Y. The Role of Ribosomal Proteins in the Regulation of Cell Proliferation, Tumorigenesis, and Genomic Integrity. *Science China Life Sciences*. 2016, **59**: 656–672.
- [202] Nurgali, K.; Jagoe, R.T.; Abalo, R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in Pharmacology*. 2018, **9**: 1–3.
- [203] Morcelle, C.; Menoyo, S.; Morón-Duran, F.D.; Tauler, A.; Kozma, S.C.; Thomas, G.; Gentilella, A. Oncogenic MYC Induces the Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint and Stabilizes P53 Independent of Increased Ribosome Content. *Cancer Research*. 2019, **79**: 4348–4359.
- [204] Bywater, M.J.; Poortinga, G.; Sanij, E.; Hein, N.; Peck, A.; Cullinane, C.; Wall, M.; Cluse, L.; Drygin, D.; Anderes, K.; *et al.* Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of P53. *Cancer Cell*. 2012, **22**: 51–65.
- [205] Colis, L.; Ernst, G.; Sanders, S.; Liu, H.; Sirajuddin, P.; Peltonen, K.; Depasquale, M.; Barrow, J.C.; Laiho, M. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Pyridoquinazolinecarboxamides as RNA Polymerase I Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, **57**: 4950–4961.

- [206] Catez, F.; Dalla Venezia, N.; Marcel, V.; Zorbas, C.; Lafontaine, D.L.J.; Diaz, J.J. Ribosome Biogenesis: An Emerging Druggable Pathway for Cancer Therapeutics. *Biochemical Pharmacology*. 2019, **159**: 74–81.
- [207] Kofler, L.; Prattes, M.; Bergler, H. Inhibiting Eukaryotic Ribosome Biogenesis: Mining New Tools for Basic Research and Medical Applications. *Microbial Cell*. 2019, **6**: 491–493.
- [208] Li, Z.; Ivanov, A.A.; Su, R.; Gonzalez-Pecchi, V.; Qi, Q.; Liu, S.; Webber, P.; McMillan, E.; Rusnak, L.; Pham, C.; *et al.* The OncoPPI Network of Cancer-Focused Protein-Protein Interactions to Inform Biological Insights and Therapeutic Strategies. *Nature Communications*. 2017, **8**: 1–14.
- [209] Sorolla, A.; Wang, E.; Golden, E.; Duffy, C.; Henriques, S.T.; Redfern, A.D.; Blancafort, P. Precision Medicine by Designer Interference Peptides: Applications in Oncology and Molecular Therapeutics. *Oncogene*. 2020, **39**: 1167–1184.
- [210] Patel, S.G.; Sayers, E.J.; He, L.; Narayan, R.; Williams, T.L.; Mills, E.M.; Allemann, R.K.; Luk, L.Y.P.; Jones, A.T.; Tsai, Y.H. Cell-Penetrating Peptide Sequence and Modification Dependent Uptake and Subcellular Distribution of Green Florescent Protein in Different Cell Lines. *Scientific Reports*. 2019, **9**: 1–9.
- [211] Thundimadathil, J. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *Journal of Amino Acids*. 2012, **2012**: 1–13.
- [212] Frankel, A.D.; Pabo, C.O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell*. 1988, **55**: 1189–1193.
- [213] Mann, D.A.; Frankel, A.D. Endocytosis and Targeting of Exogenous HIV-1 Tat Protein. *The EMBO Journal*. 1991, **10**: 1733–1739.
- [214] Yang, Y. peng; Qin, R. huan; Zhao, J. jie; Qin, X. yu. BOP1 Silencing Suppresses Gastric Cancer Proliferation through P53 Modulation. *Current Medical Science*. 2021, **41**: 287–296.
- [215] Deisenroth, C.; Zhang, Y. Ribosome Biogenesis Surveillance: Probing the Ribosomal Protein-Mdm2-P53 Pathway. *Oncogene*. 2010, **29**: 4253–4260.
- [216] Aslanidis, C.; de Jong, P.J. Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*. 1990, **18**: 6069–6074.
- [217] Studier, F.W. Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures. *Protein expression and purification*. 2005, **41**: 207–234.
- [218] Blommel, P.G.; Becker, K.J.; Duvnjak, P.; Fox, B.G. Enhanced Bacterial Protein Expression during Auto-Induction Obtained by Alteration of Lac Repressor Dosage and Medium Composition. *Biotechnology Progress*. 2007, **23**: 585–598.
- [219] Hogema, B.M.; Arents, J.C.; Bader, R.; Eijkemans, K.; Inada, T.; Aiba, H.; Postma, P.W. Inducer Exclusion by Glucose 6-Phosphate in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*. 1998, **28**: 755–765.
- [220] Zhao, Y.; Chapman, D.A.G.; Jones, I.M. Improving Baculovirus Recombination. *Nucleic Acids Research*. 2003, **31**: E6-6.
- [221] Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, **72**: 248–254.



- [222] Wilkins, M.R. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server BT-2-D Proteome Analysis Protocols. in (Ed. Link, AJ), 1999, 531–552.
- [223] Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, **227**: 680–685.
- [224] Jullian, M.; Hernandez, A.; Maurras, A.; Puget, K.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G. N-Terminus FITC Labeling of Peptides on Solid Support: The Truth behind the Spacer. *Tetrahedron Letters*. 2009, **50**: 260–263.
- [225] Müller-Esparza, H.; Osorio-Valeriano, M.; Steube, N.; Thanbichler, M.; Randau, L. Bio-Layer Interferometry Analysis of the Target Binding Activity of CRISPR-Cas Effector Complexes. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020, **7**: 1–10.
- [226] Pantoliano, M.W.; Petrella, E.C.; Kwasnoski, J.D.; Lobanov, V.S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B.A.; Lane, P. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*. 2001, **6**: 429–440.
- [227] Wienken, C.J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S. Protein-Binding Assays in Biological Liquids Using Microscale Thermophoresis. *Nature Communications*. 2010, **1**: 1–7.
- [228] Brosey, C.A.; Tainer, J.A. Evolving SAXS Versatility: Solution X-Ray Scattering for Macromolecular Architecture, Functional Landscapes, and Integrative Structural Biology. *Current Opinion in Structural Biology*. 2019, **58**: 197–213.
- [229] Hura, G.L.; Menon, A.L.; Hammel, M.; Rambo, R.P.; Poole li, F.L.; Tsutakawa, S.E.; Jenney Jr, F.E.; Classen, S.; Frankel, K.A.; Hopkins, R.C. Robust, High-Throughput Solution Structural Analyses by Small Angle X-Ray Scattering (SAXS). *Nature methods*. 2009, **6**: 606–612.
- [230] Schnablegger, H.; Singh, Y. SAXS Analysis. *The SAXS Guide*. 201350–90.
- [231] Cowieson, N.P.; Edwards-Gayle, C.J.C.; Inoue, K.; Khunti, N.S.; Douth, J.; Williams, E.; Daniels, S.; Preece, G.; Krumpa, N.A.; Sutter, J.P.; *et al.* Beamline B21: High-Throughput Small-Angle X-Ray Scattering at Diamond Light Source. *Journal of Synchrotron Radiation*. 2020, **27**: 1438–1446.
- [232] Rambo, R.P.; Tainer, J.A. Characterizing Flexible and Intrinsically Unstructured Biological Macromolecules by SAS Using the Porod-Debye Law. *Biopolymers*. 2011, **95**: 559–571.
- [233] Petoukhov, M. V.; Franke, D.; Shkumatov, A. V.; Tria, G.; Kikhney, A.G.; Gajda, M.; Gorba, C.; Mertens, H.D.T.; Konarev, P. V.; Svergun, D.I. New Developments in the ATSAS Program Package for Small-Angle Scattering Data Analysis. *Journal of Applied Crystallography*. 2012, **45**: 342–350.
- [234] Schneidman-Duhovny, D.; Hammel, M.; Tainer, J.A.; Sali, A. Accurate SAXS Profile Computation and Its Assessment by Contrast Variation Experiments. *Biophysical journal*. 2013, **105**: 962–974.
- [235] Schneidman-Duhovny, D.; Hammel, M.; Tainer, J.A.; Sali, A. FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-State and Multi-State Structural Modeling of Proteins and Their Complexes Based on SAXS Profiles. *Nucleic Acids Research*. 2016, **44**: W424–W429.
- [236] Piiadov, V.; Ares de Araújo, E.; Oliveira Neto, M.; Craievich, A.F.; Polikarpov, I. SAXSMoW 2.0: Online Calculator of the Molecular Weight of Proteins in Dilute Solution from

- Experimental SAXS Data Measured on a Relative Scale. *Protein Science*. 2019, **28**: 454–463.
- [237] Grant, T.D. Ab initio Electron Density Determination Directly from Solution Scattering Data. *Nature Methods*. 2018, **15**: 191–193.
- [238] Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004, **25**: 1605–1612.
- [239] Battye, T.G.G.; Kontogiannis, L.; Johnson, O.; Powell, H.R.; Leslie, A.G.W. IMOSFLM: A New Graphical Interface for Diffraction-Image Processing with MOSFLM. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2011, **67**: 271–281.
- [240] Winn, M.D.; Ballard, C.C.; Cowtan, K.D.; Dodson, E.J.; Emsley, P.; Evans, P.R.; Keegan, R.M.; Krissinel, E.B.; Leslie, A.G.W.; McCoy, A.; *et al.* Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2011, **67**: 235–242.
- [241] Kabsch, W. Research Papers XDS Research Papers. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2010, **66**: 125–132.
- [242] Powell, H.R.; Battye, T.G.G.; Kontogiannis, L.; Johnson, O.; Leslie, A.G.W. Integrating Macromolecular X-Ray Diffraction Data with the Graphical User Interface IMosflm. *Nature Protocols*. 2017, **12**: 1310–1325.
- [243] Kantardjieff, K.A.; Rupp, B. Matthews Coefficient Probabilities: Improved Estimates for Unit Cell Contents of Proteins, DNA, and Protein-Nucleic Acid Complex Crystals. *Protein Science*. 2003, **12**: 1865–1871.
- [244] Matthews, B.W. Solvent Content of Protein Crystals. *Journal of Molecular Biology*. 1968, **33**: 491–497.
- [245] Evans, P.R. An Introduction to Data Reduction: Space-Group Determination, Scaling and Intensity Statistics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2011, **67**: 282–292.
- [246] Evans, P.R.; Murshudov, G.N. How Good Are My Data and What Is the Resolution? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2013, **69**: 1204–1214.
- [247] Karplus, P.A.; Diederichs, K. Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science*. 2012, **336**: 1030–1033.
- [248] McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; Read, R.J. Phaser Crystallographic Software. *Journal of Applied Crystallography*. 2007, **40**: 658–674.
- [249] Long, F.; Vagin, A.A.; Young, P.; Murshudov, G.N. BALBES: A Molecular-Replacement Pipeline. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2007, **64**: 125–132.
- [250] Erdős, G.; Dosztányi, Z. Analyzing Protein Disorder with IUPred2A. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2020, **70**: 1–15.
- [251] Sigrist, C.J.A.; Cerutti, L.; Hulo, N.; Gattiker, A.; Falquet, L.; Pagni, M.; Bairoch, A.; Bucher, P. PROSITE: A Documented Database Using Patterns and Profiles as Motif Descriptors. *Briefings in bioinformatics*. 2002, **3**: 265–274.
- [252] Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; Mcgettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; *et al.* Clustal W and Clustal X Version 2.0.

- Bioinformatics*. 2007, **23**: 2947–2948.
- [253] Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-bonded and Geometrical Features. *Biopolymers*. 1983, **22**: 2577–2637.
- [254] Krissinel, E.; Henrick, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *Journal of Molecular Biology*. 2007, **372**: 774–797.
- [255] Krüger, D.M.; Gohlke, H. DrugScorePPI Webserver: Fast and Accurate in Silico Alanine Scanning for Scoring Protein-Protein Interactions. *Nucleic Acids Research*. 2010, **38**: 480–486.
- [256] Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2010, **66**: 486–501.
- [257] Brachmann, C.B.; Davies, A.; Cost, G.J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke, J.D. Designer Deletion Strains Derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A Useful Set of Strains and Plasmids for PCR-Mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast*. 1998, **14**: 115–132.
- [258] Longtine, M.S.; McKenzie, A.; Demarini, D.J.; Shah, N.G.; Wach, A.; Brachat, A.; Philippsen, P.; Pringle, J.R. Additional Modules for Versatile and Economical PCR-Based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998, **14**: 953–961.
- [259] Baudin, A.; Ozier-kalogeropoulos, O.; Denouel, A.; Lacroute, F.; Cullin, C. A Simple and Efficient Method for Direct Gene Deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 1993, **21**: 3329–3330.
- [260] Kushnirov, V. V. Rapid and Reliable Protein Extraction from Yeast. *Yeast*. 2000, **16**: 857–860.
- [261] Puig, O.; Caspary, F.; Rigaut, G.; Rutz, B.; Bouveret, E.; Bragado-Nilsson, E.; Wilm, M.; Séraphin, B. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods*. 2001, **24**: 218–229.
- [262] Huber, L.A. Is Proteomics Heading in the Wrong Direction? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003, **4**: 74–80.
- [263] Marshall, N.J.; Goodwin, C.J.; Holt, S.J. A Critical Assessment of the Use of Microculture Tetrazolium Assays to Measure Cell Growth and Function. *Growth regulation*. 1995, **5**: 69–84.
- [264] Wall, M.E. Camptothecin and Taxol: Discovery to Clinic. *Medicinal Research Reviews*. 1998, **18**: 299–314.
- [265] Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutellingsperger, C. A Novel Assay for Apoptosis Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*. 1995, **184**: 39–51.
- [266] David, J.M.; Rajasekaran, A.K. Gramicidin A: A New Mission for an Old Antibiotic. *Journal of Kidney Cancer and VHL*. 2015, **2**: 15–24.
- [267] Benz, R.; McLaughlin, S. The Molecular Mechanism of Action of the Proton Ionophore FCCP (Carbonylcyanide p-Trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophysical Journal*. 1983, **41**: 381–398.
- [268] Dedkova, E.N.; Sigova, A.A.; Zinchenko, V.P. Mechanism of Action of Calcium Ionophores

- on Intact Cells: Ionophore-Resistant Cells. *Membrane and Cell Biology*. 2000, **13**: 357–368.
- [269] Zhao, W.; Feng, H.; Sun, W.; Liu, K.; Lu, J.J.; Chen, X. Tert-Butyl Hydroperoxide (t-BHP) Induced Apoptosis and Necroptosis in Endothelial Cells: Roles of NOX4 and Mitochondrion. *Redox Biology*. 2017, **11**: 524–534.
- [270] Carvalho, C.; Santos, R.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P.; Santos, M.; Moreira, P. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, **16**: 3267–3285.
- [271] Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. Recent Progress of Cell-Penetrating Peptides as New Carriers for Intracellular Cargo Delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014, **174**: 126–136.
- [272] Xu, J.; Khan, A.R.; Fu, M.; Wang, R.; Ji, J.; Zhai, G. Cell-Penetrating Peptide: A Means of Breaking through the Physiological Barriers of Different Tissues and Organs. *Journal of Controlled Release*. 2019, **309**: 106–124.
- [273] Fulda, S.; Debatin, K.M. Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. *Oncogene*. 2006, **25**: 4798–4811.
- [274] Ermak, G.; Davies, K.J.A. Calcium and Oxidative Stress: From Cell Signaling to Cell Death. *Molecular Immunology*. 2002, **38**: 713–721.
- [275] Dickey, J.S.; Redon, C.E.; Nakamura, A.J.; Baird, B.J.; Sedelnikova, O.A.; Bonner, W.M. H2AX: Functional Roles and Potential Applications. *Chromosoma*. 2009, **118**: 683–692.
- [276] Morgado-Palacin, L.; Llanos, S.; Urbano-Cuadrado, M.; Blanco-Aparicio, C.; Megias, D.; Pastor, J.; Serrano, M. Non-Genotoxic Activation of P53 through the RPL11-Dependent Ribosomal Stress Pathway. *Carcinogenesis*. 2014, **35**: 2820–2830.
- [277] Dembowski, J.A.; Kuo, B.; Woolford, J.L. Has1 Regulates Consecutive Maturation and Processing Steps for Assembly of 60S Ribosomal Subunits. *Nucleic Acids Research*. 2013, **41**: 7889–904.
- [278] Hierlmeier, T.; Merl, J.; Sauert, M.; Perez-Fernandez, J.; Schultz, P.; Bruckmann, A.; Hamperl, S.; Ohmayer, U.; Rachel, R.; Jacob, A.; *et al.* Rrp5p, Noc1p and Noc2p Form a Protein Module Which Is Part of Early Large Ribosomal Subunit Precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 2013, **41**: 1191–1210.
- [279] Johnson, K.L.; Qi, Z.; Yan, Z.; Wen, X.; Nguyen, T.C.; Zaleta-Rivera, K.; Chen, C.-J.; Fan, X.; Sriram, K.; Wan, X.; *et al.* Revealing Protein-Protein Interactions at the Transcriptome Scale by Sequencing. *Molecular Cell*. 2021, **81**: 4091–4103.
- [280] Huang, Y.; Amin, A.; Qin, Y.; Wang, Z.; Jiang, H.; Liang, L.; Shi, L.; Liang, C. A Role of HIPI3 in DNA Replication Licensing in Human Cells. *PLoS ONE*. 2016, **11**: 1–18.
- [281] Huo, L.; Wu, R.; Yu, Z.; Zhai, Y.; Yang, X.; Chan, T.C.; Yeung, J.T.F.; Kan, J.; Liang, C. The Rix1 (Ipi1p-2p-3p) Complex Is a Critical Determinant of DNA Replication Licensing Independent of Their Roles in Ribosome Biogenesis. *Cell Cycle*. 2012, **11**: 1325–1339.
- [282] Kater, L.; Mitterer, V.; Thoms, M.; Cheng, J.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; Hurt, E. Construction of the Central Protuberance and L1 Stalk during 60S Subunit Biogenesis. *Molecular Cell*. 2020, **79**: 615–628.
- [283] Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C.B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J.P. Anticancer Activity of CX-3543: A Direct Inhibitor of

- rRNA Biogenesis. *Cancer research*. 2009, **69**: 7653–7661.
- [284] Peltonen, K.; Colis, L.; Liu, H.; Jäämaa, S.; Moore, H.M.; Enbäck, J.; Laakkonen, P.; Vaahtokari, A.; Jones, R.J.; af Hällström, T.M. Identification of Novel P53 Pathway Activating Small-Molecule Compounds Reveals Unexpected Similarities with Known Therapeutic Agents. *PloS one*. 2010, **5**: e12996.
- [285] Klingauf-Nerurkar, P.; Gillet, L.C.; Portugal-Calisto, D.; Oborská-Oplová, M.; Jäger, M.; Schubert, O.T.; Pisano, A.; Peña, C.; Rao, S.; Altvater, M.; *et al.* The Gtpase Nog1 Coordinates the Assembly, Maturation and Quality Control of Distant Ribosomal Functional Centers. *eLife*. 2020, **9**: 1–25.
- [286] Fominaya, J.; Bravo, J.; Rebollo, A. Strategies to Stabilize Cell Penetrating Peptides for in Vivo Applications. *Therapeutic Delivery*. 2015, **6**: 1171–1194.
- [287] Aliashkevich, A.; Alvarez, L.; Cava, F. New Insights into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. *Frontiers in Microbiology*. 2018, **9**: 1–11.
- [288] Jones, S.W.; Christison, R.; Bundell, K.; Voyce, C.J.; Brockbank, S.M.V.; Newham, P.; Lindsay, M.A. Characterisation of Cell-Penetrating Peptide-Mediated Peptide Delivery. *British Journal of Pharmacology*. 2005, **145**: 1093–1102.
- [289] Arcy, M.S.D. Cell Death : A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*. 2019, **43**: 582–592.
- [290] Rehm, M.; Huber, H.J.; Hellwig, C.T.; Anguissola, S.; Dussmann, H.; Prehn, J.H.M. Dynamics of Outer Mitochondrial Membrane Permeabilization during Apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2009, **16**: 613–623.
- [291] Bholá, P.D.; Simon, S.M. Determinism and Divergence of Apoptosis Susceptibility in Mammalian Cells. *Journal of Cell Science*. 2009, **122**: 4296–4302.
- [292] Márquez-Jurado, S.; Díaz-Colunga, J.; Das Neves, R.P.; Martínez-Lorente, A.; Almazán, F.; Guantes, R.; Iborra, F.J. Mitochondrial Levels Determine Variability in Cell Death by Modulating Apoptotic Gene Expression. *Nature Communications*. 2018, **9**: 389.
- [293] Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; *et al.* Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*. 2018, **25**: 486–541.
- [294] Shcherbik, N.; Pestov, D.G. The Impact of Oxidative Stress on Ribosomes: From Injury to Regulation. *Cells*. 2019, **8**: 1379.
- [295] Durut, N.; Sáez-Vásquez, J. Nucleolin: Dual Roles in rDNA Chromatin Transcription. *Gene*. 2015, **556**: 7–12.
- [296] Liu, J.; Zhao, Y.; Guo, Q.; Wang, Z.; Wang, H.; Yang, Y.; Huang, Y. TAT-Modified Nanosilver for Combating Multidrug-Resistant Cancer. *Biomaterials*. 2012, **33**: 6155–6161.