

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



*Caracterización biofísica del dímero  
Erb1/Ytm1, esencial en la maduración del  
ribosoma, y evaluación de péptidos de  
interferencia*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

*En colaboración con:*



CURSO ACADÉMICO 2017 – 2018

**Autor:** M<sup>a</sup> del Valle Morales Cuenca

**Tutor:** Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

**Cotutor:** Dr. Jerónimo Bravo Sicilia



València, Julio 2018

### ***Caracterización biofísica del dímero Erb1/Ytm1, esencial en la maduración del ribosoma, y evaluación de péptidos de interferencia***

El ensamblaje y la maduración de los ribosomas es una de las rutas más importantes en la proliferación de las células eucariotas. La formación del ribosoma comprende numerosos pasos de procesamiento del ARN que implican la asociación y disociación de numerosos factores de ensamblaje que incluyen tanto proteínas ribosómicas como no ribosómicas, para el correcto procesamiento de los precursores de las subunidades 40S y 60S emergentes. Estudios en *Saccharomyces cerevisiae* han permitido la identificación de algunas correlaciones genéticas y funcionales entre factores prerribosomales como el heterotrímero formado por Nop7, Erb1 e Ytm1, denominado PeBoW en mamíferos. Se ha demostrado que PeBoW es imprescindible para la correcta formación de la subunidad 60S, pues la ausencia de alguna de las tres proteínas que lo componen impide su formación y, en consecuencia, afecta negativamente a la proliferación celular. Gracias a dicha evidencia, este complejo se ha convertido en una nueva diana para el diseño de tratamientos contra el cáncer, concretamente, se plantea el diseño de agentes de interferencia que impidan la formación del complejo y con ello, la detención del ciclo celular. En este trabajo se han diseñado péptidos de interferencia en base a la información conocida sobre las regiones de unión de las proteínas Erb1 e Ytm1 que impidan la formación de complejo. Para ello, se ha llevado a cabo la purificación de las proteínas Erb1 e Ytm1 procedentes del hongo *Chaetomium thermophilum* previamente inducidas en *Escherichia coli* y *Spodoptera frugiperda*, células Sf9, respectivamente. La purificación de ambas proteínas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad y de exclusión molecular. Posteriormente, han sido sometidas a un estudio biofísico de interacción entre las dos proteínas y péptidos sintéticos diseñados mediante la técnica óptica interferométría de bicapa (biolayer interferometry, BLI).

**Palabras clave:** Erb1, Ytm1, dímero, péptido, biosensor, interacción

### ***Biophysical characterization of the Erb1/Ytm1 dimer, essential in ribosome maturation, and interference peptides evaluation***

Eukaryotic ribosome assembly and maturation is one of the most important pathways in eukaryotic cells proliferation. Ribosome biogenesis encompasses numerous steps of rRNA processing that involve association and dissociation of numerous assembly factors, both ribosomic and no ribosomic proteins, for correct ribosomal proteins processing during maturation of nascent 40S and 60S subunits. Studies in *Saccharomyces cerevisiae* have allowed the identification of some genetic and functional correlations between pre-ribosomal factors such as the heterotrimer formed by Nop7, Erb1 and Ytm1, named PeBoW in mammals. It is shown that PeBoW is indispensable for the proper formation of the 60S subunit, since the absence of any of the three proteins of which it is composed, impedes its formation, and consequently cellular proliferation is negatively affected. Thanks to this evidence, the complex has turned into a new target for cancer treatments design, in particular, there is a aim to design interference agents that prevent complex formation, and thus cell cycle detention. In this work, interference peptides have been designed based on interaction regions known between the proteins Erb1 and Ytm1 in order to impede complex formation. Thus, we carry out the purification of Erb1 and Ytm1 proteins from the fungus *Chaetomium thermophilum* that have been previously induced in *Escherichia coli* and *Spodoptera frugiperda*, Sf9 cells, respectively. Both proteins purification is performed through His-tag affinity and size-exclusion chromatography. Subsequently, they are subjected to an interaction biophysical study between both proteins and designed synthetic peptides through biolayer interferometry optical technique, BLI.

**Key words:** Erb1, Ytm1, dimer, peptide, biosensor, interaction

**Autor:** María del Valle Morales Cuenca

**Tutor:** Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

**Cotutor:** Dr. Jerónimo Bravo Sicilia

València, Julio 2018

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería darle las gracias a Jero por darme la oportunidad de participar en su proyecto de investigación, formar parte de su equipo y brindarme su ayuda en todo momento.

A Lidia, por su dedicación, paciencia y confianza, y sobretodo, por poner a mi disposición todo cuanto fuera necesario. Gracias por hacer más amenas las duras tardes en el laboratorio, has sido un gran apoyo.

A Susana y Alba por su gran compañerismo, ayuda y disposición.

Y por supuesto, a Carlos y a Sara, por sus labores como técnicos en el laboratorio, han sido muy importantes para el desarrollo de este proyecto.

En definitiva, me gustaría agradecer a todo el equipo de UTS su grata acogida y los buenos ratos que hemos pasado.

Gracias también a mi tutor José Ramón Murguía, por prestarme su ayuda en todo momento.

También dar las gracias de manera especial a mis compañeros, por todos los momentos vividos durante estos cuatro años, no los voy a olvidar jamás.

Y finalmente, gracias a mi familia y compañeras de piso, por el apoyo incondicional y por el cariño que me habéis dado. Habéis estado ahí, siempre.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Estructura del ribosoma</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Biogénesis del ribosoma eucariota</b>	<b>1</b>
1.2.1. Transcripción del ADNr e iniciación del proceso	2
1.2.2. Papel del complejo PeBoW	3
1.2.3. Formación del ribosoma y cáncer	5
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i></b>	<b>8</b>
<b>3.2. Purificación de proteínas</b>	<b>9</b>
3.2.1. Lisis celular y obtención del extracto proteico	9
3.2.2. Cromatografía de afinidad de proteínas con etiqueta de histidinas (HisTrap FF)	9
3.2.3. Cromatografía de afinidad usando la columna HiTrap Heparina HD	10
3.2.4. Cromatografía de exclusión molecular (gel-filtración)	10
3.2.5. Digestión de la etiqueta de histidinas con proteasa de precisión	10
<b>3.3. Análisis de las proteínas</b>	<b>11</b>
<b>3.4. Cuantificación de proteínas</b>	<b>12</b>
<b>3.5. Experimentos de interacción <i>in vitro</i></b>	<b>12</b>
3.5.1. Ensayos de competencia por la presencia de péptidos de interferencia	13
3.5.2. Cuantificación de los péptidos	15
3.5.3. Limpieza de sensores Ni-NTA	15
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Expresión y purificación de CtErb1</b>	<b>16</b>
4.1.1. Purificación de CtErb1 sin 6xHis	18
<b>4.2. Purificación de CtYtm1</b>	<b>19</b>
4.2.1. Purificación de CtErb1 sin 6xHis	20
<b>4.3. Ensayos de interacción <i>in vitro</i></b>	<b>21</b>
4.3.1. Diseño de los péptidos	21
4.3.2. Ensayo de interacción entre CtErb1 y CtYtm1 incubados con péptidos de interferencia de CtErb1	23
4.3.3. Ensayo de interacción entre CtYtm1 y CtErb1 incubados con péptidos de interferencia de CtYtm1	28
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
<b>5.1. Ensayos de BLI entre CtErb1 y CtYtm1 incubada con péptidos de CtErb1</b>	<b>32</b>
<b>5.2. Ensayos de BLI entre CtYtm1 y CtErb1 incubada con péptidos de CtYtm1</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>35</b>

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura 1. Estructura del ADNr en <i>S. cerevisiae</i>	2
Figura 2. Ruta de procesamiento de pre-ARNr en <i>S. cerevisiae</i>	3
Figura 3. Liberación del complejo PeBoW del pre-60S por la AAA ATPasa Rea	4
Figura 4. Modelo del estrés celular de frenada del ciclo celular debido a perturbaciones en la formación del ribosoma	6
Figura 5. Interacción de la superficie del $\beta$ -propeller de ChYtm1 con ChErb1	6

## MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Tampones utilizados en la purificación de proteínas	9
Figura 6. Marcador de peso molecular BlueStar Prestained Protein Marker ( <i>Nippon Genetics</i> )	12
Figura 7. Etapas experimentales en un sensograma BLI	13
Tabla 2. Tabla resumen con la información de cada uno de los péptidos de interferencia	14
Tabla 3. Tabla con los coeficientes de extinción molar de las secuencias de cada uno de los péptidos	15

## RESULTADOS

Figura 8. Gel electroforesis autoinducción 6xHis-CtErb1	16
Figura 9. Cromatografía de afinidad de CtErb1 con resina de níquel (HisTrap FF)	17
Figura 10. Cromatografía de afinidad de CtErb1 con resina de heparina (HiTrap Heparina)	17
Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular de CtErb1	18
Figura 12. Gel electroforesis purificación CtErb1 sin 6xHis	19
Figura 13. Cromatografía de afinidad de CtYtm1 con resina de níquel (HisTrap FF)	19
Figura 14. Cromatografía de exclusión molecular de CtYtm1	20
Figura 15. Gel electroforesis purificación CtYtm1 sin 6xHis	21
Figura 16. Bucles de interacción de las proteínas ChErb1 y ChYtm1	22
Figura 17. Alineamiento de Erb1/Bop1 en <i>C. thermophilum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , humano y ratón	22
Figura 18. Alineamiento de Ytm1/WDR12 en <i>C. thermophilum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , humano y ratón	23
Figura 19. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1	24
Figura 20. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con péptidos de interferencia 1, 2 y 3	24
Figura 21. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con el péptido de interferencia 1	25
Figura 22. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con el péptido de interferencia 2	25
Figura 23. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con el péptido de interferencia 3	26
Figura 24. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con los péptidos de interferencia 1 y 2	26
Figura 25. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con los péptidos de interferencia 2 y 3	27
Figura 26. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con los péptidos de interferencia 1 y 3	27
Figura 27. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1	28
Figura 28. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con péptidos de interferencia 4, 5 y 6	29
Figura 29. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con el péptido de interferencia 4	29
Figura 30. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con el péptido de interferencia 5	30
Figura 31. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con el péptido de interferencia 6	30
Figura 32. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con los péptidos de interferencia 4 y 6	30

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
AFs	Factores de Ensamblaje
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN transferencia
ATPasa	Hidrolasa de ATP
ChErb1	Erb1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ChYtm1	Ytm1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cryo-EM	Criomicroscopía electrónica
CtErb1	Erb1 de <i>Chaetomium thermophilum</i>
<i>C. thermophilum</i>	<i>Chaetomium thermophilum</i>
CtYtm1	Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESs	Segmentos de expansión
ETS	Espaciador transcribible externo
FT	Volumen no retenido por la resina ( <i>flow throw</i> )
H <sub>2</sub> O Mili-Q	Agua ultrapura
IMAC	Cromatografía de Metales Inmovilizados
LSU	Subunidad mayor del ribosoma, 60S
MRP	RNAsa mitocondrial procesadora de ARN
MW	Marcador de pesos moleculares
NTS	Espaciador no transcribible
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
PBS	Tampón Fosfato Salino
pNKI	Vector pET28-NKI/LIC 6His/3C
Proteína-r	Proteína ribosomal
PTC	Centro Peptidil Transferasa
RNAsa	Ribonucleasa
RNP	Partícula de ribonucleoproteínas
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SnoARN	pequeño ARN del nucleolo
SSU	Subunidad menor del ribosoma, 60S

## 1. Introducción

Los ribosomas son ribonucleoproteínas (RNP) presentes en todos los organismos y se encargan de la biosíntesis de las proteínas en un proceso denominado traducción (Rabl *et al.*, 2011). Este sistema es uno de los procesos universales de la vida, por ello, la comprensión del mismo ha avanzado durante la última década gracias a la explosión de los datos de secuenciación y a la determinación de las estructuras tridimensionales mediante cristalografía de rayos X y criomicroscopía electrónica (cryo-EM), las cuales han proporcionado estructuras de resolución atómica (Petrov *et al.*, 2014).

### 1.1 Estructura del ribosoma

El ribosoma está conservado en todos sus dominios, se compone tanto de ácido ribonucleico (ARN) como de proteínas y se organiza en dos subunidades asimétricas: la subunidad mayor (LSU) que aloja el centro catalítico peptidil transferasa (PTC), y la subunidad menor (SSU) que se une a ARNm y lo decodifica mediante reconocimiento con ARNs de transferencia (ARNt) (Steitz *et al.*, 2008).

De células bacterianas a eucariotas, el ribosoma muestra un fuerte incremento en tamaño y complejidad debido a la aparición de nuevas proteínas ribosomales (proteínas-r), extensiones de proteínas ribosomales conservadas y segmentos de expansión del ARN ribosómico (ARNr) de gran tamaño (ESs) (Konikkat y Woolford, 2017). En procariontes las subunidades SSU y LSU son 30S y 50S respectivamente, donde 30S está formada por 21 proteínas-r y 16S ARNr, y 50S está formada por 5S ARNr y 31 proteínas-r (Ben-Shem *et al.*, 2011). Sin embargo, en eucariotas la subunidad menor, 40S, está formada por 18S ARNr y 33 proteínas-r y la mayor, 60S, se compone de los ARNr 5S, 5.8S y 25S (en levaduras, 28S en humanos) que se asocian a 46 proteínas-r (Jenner *et al.*, 2012).

### 1.2 Biogénesis del ribosoma eucariota

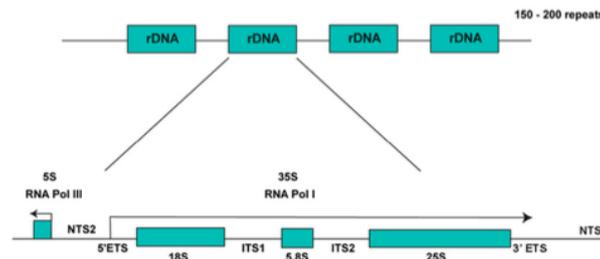
La formación del ribosoma eucariótico es una de las rutas celulares más complejas, pues implica procesos de plegamiento, modificación y procesamiento de los precursores del ARNr entrelazados (Tang *et al.*, 2008) para el ensamblaje de los ARNr y las proteínas en partículas de ribonucleoproteínas (Strezoska *et al.*, 2000). El proceso comienza en el núcleo, continúa en el nucleoplasma y no se completa hasta ser exportado al citoplasma (Konikkat y Woolford, 2017). La formación del ribosoma ha sido estudiada en varias células eucariotas entre las cuales, se han

estudiado las humanas. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ha sido el organismo modelo elegido durante años para el estudio del ensamblaje del ribosoma (Kressler *et al.*, 2012) y, por tanto, se ha obtenido la mejor caracterización con una resolución atómica de 3.0 Å (Ben-Shem, *et al.*, 2011).

En el proceso de biogénesis ribosomal se requiere la actividad coordinada de tres ARN polimerasas, de 200 factores de ensamblaje (AFs) y de 76 pequeños ARNs del nucleolo (snoARN) (Tang *et al.*, 2008). Estos factores se unen a los preribosomas en puntos específicos de la ruta de ensamblaje ayudando a la obtención del ribosoma competente, y finalmente, se disocian previamente a la formación de las subunidades ribosomales maduras (Sahasranaman, *et al.*, 2011).

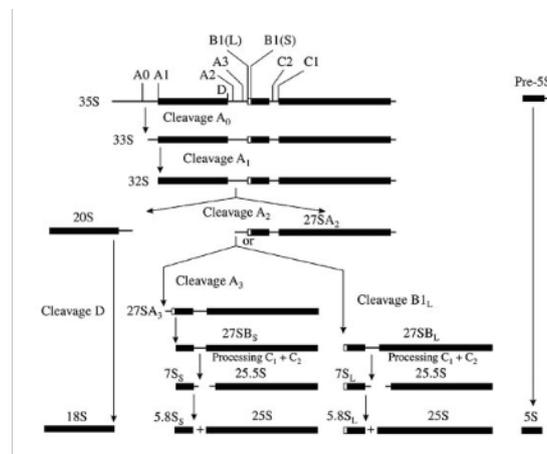
### 1.2.1 Transcripción del ADNr e iniciación del proceso

En *S. cerevisiae*, el proceso comienza en el nucleolo donde la ARN polimerasa I transcribe cada una de las repeticiones en tándem del ADN ribosomal (ADNr) localizadas en el cromosoma XII en un único ARN policistrónico (Wooldford y Baserga, 2013). Este transcrito es el primer precursor del ribosoma, se denomina 35S pre-ARNr y da lugar a tres de los cuatro ARNr (18S, 5.8S y 25S ARNr). El último, 5S ARNr, se transcribe por separado por la ARN polimerasa III y se asocia a las subunidades grandes formadas (Konikkat y Woolford, 2017). El 35S pre-ARNr se encuentra flanqueado por dos espaciadores externos, 5'-ETS y 3'-ETS, y por dos espaciadores internos, ITS1 e ITS2, que separan 18S de 5.8S y éste último, de 25S respectivamente (Fernández-Pevida *et al.*, 2015) (Fig 1).



**Figura 1. Estructura del ADNr en *S. cerevisiae*.** Las repeticiones de ADNr (150-200) se localizan en el cromosoma XII. La ARN polimerasa I sintetiza el precursor 35S a partir de la transcripción de una única unidad de repetición y contiene las secuencias que dan lugar a los ARNr maduros 18S, 5.8S y 25S. La ARN polimerasa III sintetiza el 5S ARNr. NTS, espaciador no transcribible; ETS, espaciador transcribible externo; ITS, espaciador transcribible interno (Wooldford y Baserga, 2013).

Al precursor 35S se asocian de manera cotranscripcional proteínas para formar la partícula 90S, la cual, debe procesarse y madurar para dar lugar a las subunidades 60S y 40S (Miles *et al.*, 2005). El 35S sufre escisiones en los sitios A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> para dar lugar al precursor en 27A<sub>2</sub> (Thoms *et al.*, 2016). La escisión en el sitio A<sub>0</sub>, genera 33S pre-ARNr, la escisión en el sitio A<sub>1</sub> produce 32S pre-ARNr y durante la escisión de ITS1 en el sitio A<sub>2</sub>, se divide el precursor en los fragmentos 20S y 27A<sub>2</sub>, que tras ser procesados darán lugar a las subunidades 40S y 60S respectivamente (Altvater *et al.*, 2014). A continuación, la RNAsa mitocondrial procesadora de ARN (MRP) es la encargada de escindir el precursor 27A<sub>2</sub> en el sitio A<sub>3</sub> que conlleva la eliminación completa de 5'-ETS, produciendo así 27A<sub>3</sub> pre-ARNr (Woolford *et al.*, 2013) (Fig. 2).

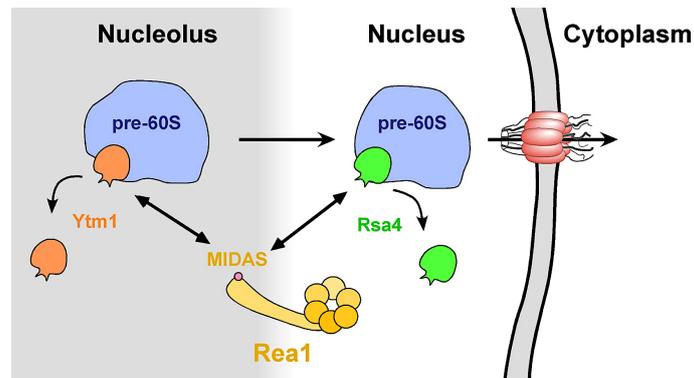


**Figura 2. Ruta de procesamiento de pre-ARNr en *S. cerevisiae*.** El 35S es rápidamente modificado y procesado para producir 33S pre-ARNr. La escisión de 33S pre-ARNr en el sitio A<sub>0</sub> genera 32S pre-ARNr. Los pre-ARNr 20S y 27A<sub>2</sub> son intermediarios generados mediante la escisión del 32S pre-ARNr en el sitio A<sub>2</sub>. El procesamiento de 20S y de 27A<sub>2</sub> pre-ARNr resulta en la producción de los ARNr maduros 18S, 25S y 5.8S (Miles *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Papel del complejo PeBoW

Durante las primeras etapas de formación de la subunidad 60S, el procesamiento de 27A<sub>3</sub> pre-ARNr es importante porque genera el extremo 5' del 5.8S ARNr maduro (Sahasranaman *et al.*, 2011). Esta etapa consiste en la eliminación de ITS1 del 27A<sub>3</sub> donde participan numerosas proteínas denominadas factores del grupo A<sub>3</sub>. Entre ellas, se encuentra el complejo formado por las proteínas Nop7, Erb1 e Ytm1 (ortólogos de Pes1, Bop1, WDR12 en mamíferos respectivamente) denominado complejo Nop7 en levaduras y PeBoW en células mamíferos, el cual se localiza en el nucleolo y posee actividad endonucleasa (Rohrmoser *et al.*, 2007). Además, este complejo también contribuye al reclutamiento del resto de factores y a mantener estable el precursor del ARNr (Thoms *et al.*, 2016). Sin embargo, debe ser liberado antes de que el

precursor pre-60S sea transportado fuera del nucleolo y así poder permitir la progresión de la ruta (Romes *et al.*, 2016). El enzima encargado de la liberación del complejo PeBoW del precursor es la AAA ATPasa Rea1, el cual utiliza un dominio MIDAS para unirse a un motivo conservado de Ytm1, dominio MIDO de su extremo N-terminal, en el momento en el momento de salida de la partícula pre-60S del nucleolo al nucleoplasma (Baßler *et al.*, 2010) (Fig. 3).



**Figura 3. Liberación del complejo PeBoW del pre-60S por la AAA ATPasa Rea1.** El dominio MIDAS Rea1 interactúa directamente con el dominio MIDO N-terminal de Ytm1. Rea1 libera Ytm1-Erb1-Nop7 de partículas pre-60S en una forma dependiente de ATP (Baßler *et al.*, 2010).

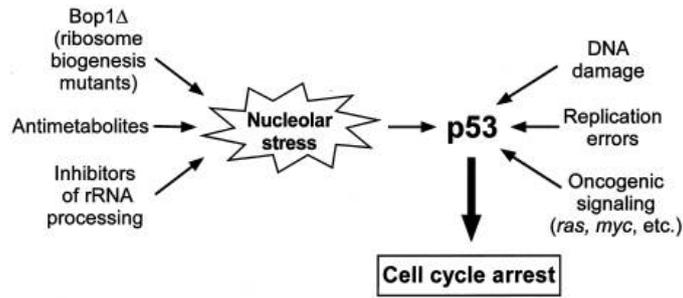
En cuanto a su estructura, Nop7, Ytm1 y Erb1 contienen dominios de interacción proteína – proteína muy conservados que les permite formar un pequeño andamio al unirse al pre-ARNr y permitir el procesamiento de 27SA<sub>3</sub> pre-ARNr (Tang *et al.*, 2008). Erb1 contiene un dominio BOP1NT en el extremo N-terminal seguido de siete repeticiones WD40 plegados formando una estructura β-propeller y cuya región amino terminal se ha visto implicada en la unión con Nop7 (Wegrecki *et al.*, 2015). Por otro lado, Ytm1 se une a Erb1 mediante su dominio WD40 en el extremo C-terminal (Tang *et al.*, 2008).

Se sabe que el PeBoW es esencial para la formación del ribosoma (Rohrmoser *et al.*, 2007), pues perturbaciones en cualquiera de las tres proteínas induce defectos en el procesamiento del pre-ARNr y con ello, en la maduración de la subunidad 60S (Wegrecki *et al.*, 2015). Algunos estudios realizados muestran que la expresión de Bop1 truncada en el extremo N-terminal, resulta en la inhibición de la formación 28S y 5.8 ARNr, y en consecuencia, deficiencias en las subunidades 60S que se están formando (Strezoska *et al.*, 2000).

### 1.2.3 Formación del ribosoma y cáncer

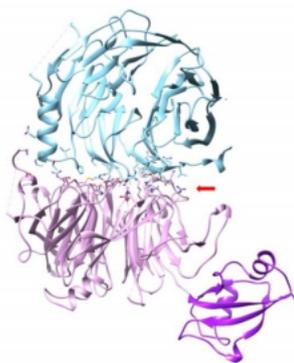
Se ha establecido una relación directa entre la formación del ribosoma y el cáncer, pues las células tumorales se dividen muy rápidamente de modo que requieren un crecimiento más rápido y, en consecuencia, deben formar más ribosomas para poder completar la síntesis proteica (van Sluis y McStay, 2014). De hecho, se ha visto que las células tumorales dependen de la formación del ribosoma ya que es capaz de frenar la progresión del ciclo celular mediante la monopolización de la capacidad translacional hasta que el crecimiento se haya completado. No obstante, la actividad de la ARN polimerasa I está bajo el control de genes supresores de tumores como el caso de p53, encargado de suprimir la formación del ribosoma (Montanaro *et al.*, 2008). Gracias a esta evidencia, se comenzó a considerar la formación del ribosoma una diana para la obtención de nuevos tratamientos contra el cáncer. En consecuencia, se han descrito fármacos inhibidores de la formación del ribosoma mediante la regulación de la transcripción de la ARN polimerasa I (Bywater *et al.*, 2012).

Sin embargo, no solo la interrupción de la síntesis de ARNr activa p53 sino también la alteración del procesamiento del ARNr, pues tanto mutaciones en la proteína Bop1 como la presencia de inhibidores químicos del procesamiento del ARNr inducen la parada del ciclo celular en células fibroblásticas 3T3 (Pestov *et al.*, 2001). De igual modo, la inactivación Pes1 mediante expresión de un mutante de la misma o mediante su delección, resulta en un déficit en la formación de la subunidad 60S, inhibición del ciclo celular y presencia de elevados niveles de p53 (Grimm *et al.*, 2006). Por tanto, se ha llegado a la conclusión de que deficiencias en la biogénesis del ribosoma, siendo uno de los procesos más importantes para el crecimiento celular, inducen estrés que implican la activación de p53 y, con ello, la frenada del ciclo celular (Ahn *et al.*, 2016) (Fig. 4). Estas observaciones amplían el campo de utilización de la biogénesis del ribosoma como una diana terapéutica contra células tumorales ya que su alteración induce la activación de p53 sin la necesidad de alterar el ADN tal y como actúan las terapias convencionales (Colis *et al.*, 2014).



**Figura 4. Modelo del estrés celular de frenada del ciclo celular debido a perturbaciones en la formación del ribosoma.** La expresión de proteínas mutantes como Bop1 y la exposición a inhibidores químicos del procesamiento del ARNr impiden la formación del ribosoma causando estrés nucleolar y en consecuencia, la detención del ciclo celular activando la ruta de p53 (Pestov *et al.*, 2001).

No obstante, se ha visto que Bop1 es capaz de traducir señales de estrés a p53 (Pestov *et al.*, 2001) y, de igual modo, alteraciones en WDR12 son capaces de promover una detención del ciclo celular reversible inducida por p53 (Hölzel *et al.*, 2005). Además, se ha observado gracias a la estructura resuelta del complejo ChErb1/ChYtm1 (Erb1/Ytm1 en *S. cerevisiae*) (Fig. 5), que la interrupción de la formación del complejo a través de la modificación del bucle de interacción tiene un efecto muy importante en la supervivencia de la levadura (Wegrecki *et al.*, 2015). En base a estas evidencias, se considera que la liquidación de la actividad funcional del complejo PeBoW puede reproducir una respuesta de estrés como las observadas para Bop1 y WDR12 (Deisenroth *et al.*, 2010). Por ello, se propone el diseño de agentes de interferencia que impidan la formación del complejo sin la necesidad de alterar el ADNr como un posible tratamiento de células tumorales no genotóxico.



**Figura 5. Interacción de los  $\beta$ -propeller de ChYtm1 y ChErb1.** ChYtm1 (Ytm1 en *S. cerevisiae*) (rosa) se une al dominio C-terminal de ChErb1 (Erb1 en *S. cerevisiae*) (azul) a través del propeller (flecha roja). Se muestran las cadenas laterales de los residuos que interaccionan (Wegrecki *et al.*, 2015).

## 2. Objetivos

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo el diseño de péptidos de interferencia a partir de la caracterización estructural de la superficie de interacción de las proteínas Erb1 e Ytm1 con el fin de estudiar las regiones mayormente implicadas en la unión y conseguir evitar la formación del complejo PeBoW. Para su abordaje, se han realizado técnicas de sobreexpresión, purificación y de interacción de proteínas *in vitro* planteando así los siguientes objetivos:

- Sobreexpresión *del* ortólogo de Erb1 del hongo *Chaetomium thermophilum* (*C. thermophilum*) (CtErb1) en *Escherichia coli* (*E. coli*) y purificación.
- Purificación del ortólogo de Ytm1 del hongo *C. thermophilum* (CtYtm1) a partir de precipitado de células Sf9 que contienen la proteína sobreexpresada.
- Estudio de la interacción *in vitro* entre las proteínas Erb1 e Ytm1 y la interferencia en la afinidad que se produce debido a la presencia de péptidos mediante la técnica interferometría de bicapa, BLI.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Expresión de proteínas en *Escherichia coli*

En el presente trabajo se ha inducido la sobreexpresión del ortólogo de Erb1 de *C. thermophilum* en células BL21 CodonPlus de *E. coli*, las cuales han sido transformadas con el vector pET28-NKI/LIC 6His/3C (pNKI) que contiene el gen clonado. El interés por realizar el estudio con el ortólogo de Erb1 de *C. thermophilum* se debe a que posee sus dominios de unión conservados y es un organismo termófilo capaz de resistir a temperaturas próximas a los 50-55°C, de modo que sus proteínas presentan una mayor termoestabilidad que ha demostrado ser beneficiosa para estudios de cristalografía de rayos X.

La sobreexpresión se realizó mediante autoinducción, protocolo de expresión a gran escala adaptado de Studier (2005), para lo cual se preparó el siguiente cultivo inicial: se inoculó una colonia procedente de un cultivo glicerinado en 10 mL de medio de autoinducción que contenía 9.3 mL de medio ZY [Triptona, Extracto de levadura y H<sub>2</sub>O milli-Q], 10 µL de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 200 µL de Glucosa 40% (p/v), 500 µL NPS 20X [0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] y 10 µL de cada uno de los antibióticos kanamicina y cloranfenicol (33 µg/µL). A continuación, se incubó a 37°C en agitación (180 rpm) durante toda la noche.

Al día siguiente, los 10 mL de cultivo inicial se añadieron a 1 L de medio de autoinducción fresco que contenía 925 mL de medio ZY, 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 20 mL de 5052 50X [0.5% Glicerol (v/v), 0.055% Glucosa (p/v), 0.2% Lactosa (p/v)], 50 mL NPS 20X y 1 mL de cada uno de los antibióticos kanamicina y cloranfenicol (33 µg/µL). El volumen se repartió en 2 matraces de 2L a partes iguales quedando en cada uno de ellos 500 mL junto con 5 mL de cultivo inicial. Se incubaron durante 2-4 h a 37°C en agitación (180 rpm) y una vez alcanzado un valor de OD<sub>600</sub> entre 0.8 y 1.2, se tomó una muestra de 1 mL para observarla en un gel SDS-PAGE (apartado 3.3) y los cultivos se incubaron a 20°C durante toda la noche con el fin de inducir la expresión de la proteína. De los cultivos resultantes, se tomaron de nuevo muestras de 1 mL para observarlas en un gel SDS-PAGE y fueron centrifugados a 4000g y a 4°C durante 20 min en la centrífuga Beckman Coulter J6-HC (Rotor JS 4.2). A continuación, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con 40 mL de PBS 1X antes de volver a centrifugarlas durante 30 min a la misma temperatura y velocidad en la centrífuga Sorvall ST16R (Rotor 75003629). Por último, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células se congeló a -80°C.

## 3.2. Purificación de proteínas

Para la purificación de las proteínas CtErb1 e CtYtm1 se requirieron distintos tampones en los diferentes pasos de purificación cuya composición se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Tampones utilizados en la purificación de proteínas.

Componentes	Lisis	A	B	SE	SE B	GST A	GST B
Hepes pH 7.5	50 mM	50 mM	50 mM	20 mM	20 mM	50 mM	50 mM
NaCl	500 mM	150 mM	150 mM	150 mM	1500 mM	150 mM	150 mM
Glicerol	10 %	5%	5%	5%	5%	5%	5%
$\beta$ - Mercaptoetanol	5 mM	2 mM	2mM	2mM	2 mM	2 mM	2mM
Imidazol	-	20 mM	500mM	-	-	-	-
Glutación reducido	-	-	-	-	-	-	20 mM
Tritón X-100	0.1 %	-	-	-	-	-	-

### 3.2.1. Lisis celular y obtención del extracto proteico

Se descongelaron los precipitados de células en hielo y fueron disueltos en 50 mL de tampón de lisis frío suplementado con una pastilla de inhibidores de proteasas Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (*Roche*). Las células fueron sonicadas durante 30 min (20 min en el caso de las células Sf9) con pulsos de 1 s ON y 1 s OFF utilizando el sonicador Vibra Cell W75042 (*Fisher Scientific*). A continuación, el lisado se centrifugó a 16500 rpm y a 4°C durante 35 min en la centrífuga Sorvall RC6 (Rotor SS34) (*Thermo Scientific*) y el sobrenadante resultante se hizo pasar a través de filtros de 0.45  $\mu$ m de diámetro (*VWR*).

### 3.2.2. Cromatografía de afinidad de proteínas con etiqueta de histidinas (HisTrap FF)

La cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), se llevó a cabo usando columnas de resina de níquel HisTrap FF (*GE Healthcare*) de 5 mL, las cuales son capaces de retener proteínas con etiqueta de histidinas. En primer lugar, las columnas fueron lavadas con 10 volúmenes de columna de agua mili-Q y equilibradas con 10 volúmenes de columna de tampón A para posteriormente pasar por ella el filtrado celular. El sistema utilizado para hacer pasar las disoluciones y las muestras por la columna fue la bomba peristáltica Gilson Miniplus 3. Para la elución de la proteína de interés de la columna, se utilizó el sistema de purificación FLPC ÄKTAPurifier (*GE Healthcare*), el cual había previamente sido equilibrado con 25 ml de H<sub>2</sub>O milli-Q y 25 ml de tampón A. El sistema de purificación trabaja de la siguiente manera: pasa por la columna tampón A con el fin de eliminar las proteínas no unidas a la columna, y a continuación, genera un gradiente ascendente de tampón B para inducir la elución de la proteína en fracciones

de 5 mL. Se tomaron muestras de 20  $\mu$ L de cada una de las fracciones para determinar las que contienen la proteína de interés mediante un gel SDS-PAGE (apartado 3.3).

### **3.2.3. Cromatografía de afinidad usando la columna HiTrap Heparina HD**

Esta etapa únicamente se realizó como paso intermedio en la purificación de CtErb1 para eliminar los ácidos nucleicos que eluyen junto a ella de la columna HiTrap, debido a que interactúan con la estructura  $\beta$ -propeller de CtErb1. La columna de 5 mL HiTrap Heparina (*GE healthcare*) fue lavada y equilibrada con 10 volúmenes de columna de H<sub>2</sub>O mili-Q y 10 volúmenes de tampón SE respectivamente. Siguiendo un protocolo similar al explicado en el apartado anterior, la muestra se pasó por la columna y mediante un gradiente ascendente de tampón SE B, aumentó progresivamente la concentración de NaCl consiguiendo así la elución de la proteína en fracciones de 5 mL que fueron analizadas en un gel SDS-PAGE (apartado 3.3).

### **3.2.4. Cromatografía de exclusión molecular (gel-filtración)**

Las fracciones de la cromatografía de afinidad que contenían la proteína, fueron mezcladas y concentradas hasta 2 y 5 mL en filtros Amicon Ultra (*Millipore*) con tamaños de filtro <50 KDa y <30 KDa para CtErb1 y CtYtm1 respectivamente. La muestra procedente de CtErb1 se inyectó en la columna Hiloal Superdex 200 26/60 (*Amersham Pharmacia Biotech*) y la procedente de CtYtm1 en la columna Hiloal Superdex 200 16/60 (*Amersham Pharmacia Biotech*) la cual había sido previamente lavada y equilibrada con 180 mL de H<sub>2</sub>O mili-Q y 180 mL de tampón SE. La elución de la proteína mediante el tampón SE fue monitorizada por su absorbancia a 280 nm. De la misma forma que en las cromatografías anteriores, las fracciones eluidas correspondientes con los picos del cromatograma fueron analizadas en un gel SDS-PAGE (apartado 3.3) y las de interés fueron concentradas de nuevo en un filtro de las mismas características hasta aproximadamente 250  $\mu$ L. A continuación, se midió la concentración de la proteína usando el ensayo Bradford Reagent (*Bio-Rad*) (apartado 3.4). Finalmente, el volumen de la muestra se dividió en partes alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

### **3.2.5. Digestión de la etiqueta de histidinas con proteasa de precisión**

Para los ensayos de interacción por interferometría de bicapa que se detallan en el apartado 3.5, fue requisito digerir la cola de histidinas de ambas proteínas. Se tomaron 100  $\mu$ L de CtErb1 concentrada tras gel filtración y 500  $\mu$ L de CtYtm1 concentrados tras la cromatografía de afinidad y previo a gel filtración. En el segundo caso, CtYtm1 se encontraba disuelta en

tampón B por lo que se debió cambiar el tampón haciendo pasar 40 mL de tampón SE por un filtro Amicon Ultra (*Millipore*) de tamaño de poro <30 KDa hasta dejar un volumen de 2 mL. A continuación, se diluyeron cada uno de los volúmenes de proteína en 20 mL de tampón SE y se añadieron 200  $\mu$ L de Proteasa de Precisión, llamada también PP o HRV3C (Proteasa 3C del Rinovirus Humano con una cola de GST) con una concentración de 2 mg/mL. Se incubó durante toda la noche a 4°C para que la proteasa realizara la digestión. Posteriormente, la muestra se pasó por las columnas HisTrap de 5 mL y GSTrap FF (*GE Healthcare*) previamente lavadas con 10 volúmenes de H<sub>2</sub>O mili-Q y equilibradas con 10 volúmenes de los tampones A y GST-A respectivamente. Al pasar la muestra por ambas columnas conectadas a la bomba peristáltica, se produjo la retención de la cola de histidinas en la columna HisTrap y la proteasa en la columna GSTrap. Finalmente, la proteína sin la cola se eluyó en cuatro fracciones de 5 mL al hacer pasar tampón SE. No obstante, para eliminar la cola de histidinas y la proteasa de las columnas se pasaron 10 volúmenes de columna de los tampones SE B y GST B por las columnas HisTrap y GSTrap respectivamente. La presencia de la proteína de interés fue comprobada en un gel SDS-PAGE (apartado 3.3).

### **3.3. Análisis de las proteínas**

Las muestras recogidas durante el proceso de autoinducción y durante todos los procesos de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% (electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato sódico).

El procesado de las muestras previo a la electroforesis difiere en función del proceso. En el caso de las muestras procedentes del proceso de autoinducción, se centrifugaron durante 5 min a 13000g en la centrífuga Sorvall Legend Micro 21R (*Thermo Scientific*), se eliminó el sobrenadante, se disolvieron en 100  $\mu$ L de tampón de carga de proteínas 6X [0.3 M Tris-HCl pH 6.8, 26% Glicerol (v/v), 2% SDS (p/v), 0.05% azul de bromofenol (p/v) (*Sigma*), 0.04%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v)] y se calentaron a 95°C durante 30 min. Para el análisis por electroforesis de las distintas purificaciones, se tomaron 20  $\mu$ L de cada una de las fracciones con la proteína eluída, se mezclaron con 20  $\mu$ L de tampón de carga y se calentaron a 95°C durante 10 min.

A continuación, se cargaron entre 4 y 10  $\mu$ L, dependiendo de la muestra y del tamaño del pocillo, en geles de poliacrilamida al 10% y se corrieron las electroforesis durante 30 min a 200 V utilizando como tampón el NuPAGE MOPS SDS 1X (*Life Technologies*). En todos los geles, el primer patrón de bandas corresponde con el marcador de peso molecular BlueStar Prestained

Protein Marker (*Nippon Genetics*) (Fig. 6). Para la visualización de las bandas, los geles procedentes de autoinducción se tiñeron con Azul Coomassie – Metanol [2.5 g Azul Coomassie (Blue brilliant), 40% Metanol (v/v), 10% Ácido acético (v/v), 50% H<sub>2</sub>O destilada (v/v)] durante 20 min en agitación, y a continuación, para la visualización de las proteínas, los geles se sumergieron en solución Destain [10% Ácido acético (v/v), 10% Metanol (v/v), 80% H<sub>2</sub>O destilada (v/v)]. En los procesos de purificación se requería un protocolo más rápido, por lo que se utilizó Quick Coomassie (*Generon*) que se calentó durante 15-20 s en microondas obteniéndose el patrón de bandas de forma casi instantánea. A continuación, se retiró la solución de Coomassie y el gel quedó sumergido en agua destilada para una mejor visualización de las bandas.

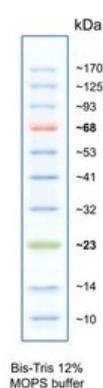


Figura 6. Marcador de peso molecular BlueStar Prestained Protein Marker (*Nippon Genetics*).

### 3.4. Cuantificación de proteínas

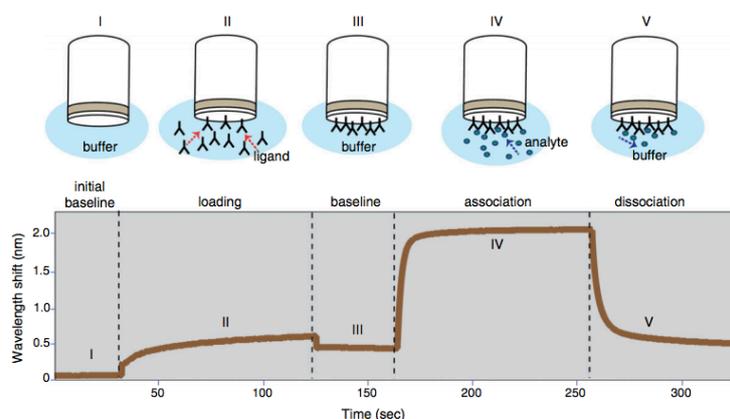
La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Kruger 1994). Para ello, se añadió 1  $\mu$ L en 999  $\mu$ L de solución de Bradford (*Bio-Rad*) en una cubeta de plástico y se midió la absorbancia  $A_{595}$  en el espectrofotómetro Ultrospec 10 Cell Density Meter (*Amersham Biosciences*). Los valores se interpolaron en una curva patrón de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

### 3.5. Experimentos de interacción *in vitro* por interferometría de bicapa

Para caracterizar la interacción entre CtErb1 e CtYtm1 y realizar ensayos de competencia con la presencia de péptidos de interferencia, se hizo uso del sistema de interferometría de bicapa, BLI (*Pall ForteBio*). Es un sistema óptico simple que mide en tiempo real las interacciones biomoleculares entre proteínas y otras biomoléculas. En BLI se inmoviliza la molécula ligando en la punta del biosensor de fibra óptica y posteriormente, el biosensor es sumergido en la solución analítica que contiene la molécula de unión. El sistema mide la luz que se refleja al incidir la 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 la interacción (Sultana y Lee, 2015).

Para los ensayos BLI realizados en este trabajo se siguió el siguiente protocolo: la proteína cebo se inmovilizó en sensores de Ni-NTA (*ForteBio*) que contienen níquel y son capaces de retener las proteínas etiquetadas con cola de histidinas durante 180 s (paso I). A continuación, se equilibró durante 60 s en tampón SE (paso II). En el paso III se incubó la proteína de unión sin cola de histidinas para evitar uniones inespecíficas al sensor durante 180 s y finalmente, se añadió tampón SE durante 180 s para completar la etapa de disociación (paso IV) (Fig. 7).



**Figura 7. Etapas experimentales en un biosensograma BLI.** (I) Línea base generada con tampón SE. (II) Unión de la proteína cebo al sensor. (III) Línea base con tampón SE. (IV) Unión del analito. (V) Disociación de la interacción (Sultana and Lee, 2015).

### 3.5.1. Ensayos de competencia por la presencia de péptidos de interferencia

El presente experimento consistió en la caracterización de la afinidad entre las proteínas que forman el dímero Erb1-Ytm1 y posterior ensayo de competencia por la presencia de péptidos de interferencia. El primer paso fue el diseño de los péptidos a partir de la caracterización estructural de la interacción entre Erb1 e Ytm1. A continuación, a partir de la base de datos Uniprot se obtuvo la secuencia de ambas proteínas y se seleccionaron los pequeños fragmentos de secuencia que estaban mayoritariamente implicados en la interacción de cada una de las proteínas. La obtención de los péptidos fue llevado a cabo de manera sintética por la empresa Syn High Quality Peptide. Cada uno de ellos se recibió en una cantidad de 15 mg liofilizados. En la Tabla 2 se recoge el nombre de cada uno de ellos, su secuencia, la proteína a la que pertenecen y la región concreta de la secuencia a la que corresponden, el peso molecular,

el punto isoeléctrico calculado con ProtParam tool *ExPASy* y, en base a él, el disolvente utilizado en volúmenes variables que determinan la concentración final de cada uno de ellos. Los volúmenes finales de cada uno los péptidos fueron divididos en partes alícuotas, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 2.** Tabla resumen con la información de cada uno de los péptidos de interferencia.

Nombre	Secuencia	Proteína y región	MW	pI	Disolvente	Volumen Disolvente (mL)	Concentración final (mg/mL)
1	VWELLTGRQVW	GOSCK6 Erb1 <sub>479-489</sub>	1386.62	5.97	SE y DMSO	2	7,5
2	QQTIFRGH	GOSCK6 Erb1 <sub>445-452</sub>	986.10	9.76	H <sub>2</sub> O	1	15
3	DWHPREPWCV	GOSCK6 Erb1 <sub>780-789</sub>	1324.49	5.32	DMSO y H <sub>2</sub> O	1.5	10
4	HDDWVSA	GOSFB5 Ytm1 <sub>110-116</sub>	828.84	4.20	DMSO y H <sub>2</sub> O	2	7,5
5	AGMDRTV	GOSFB5 Ytm1 <sub>194-200</sub>	784.86	5.88	H <sub>2</sub> O	1	15
6	RGHANKV	GOSFB5 Ytm1 <sub>385-391</sub>	780.89	11	H <sub>2</sub> O	1	15

Para caracterizar la afinidad de unión entre las proteínas, se inmovilizó CtErb1 a 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en sensores de Ni-NTA, los cuales fueron previamente hidratados durante 10 min en tampón SE. A continuación, se añadió CtYtm1 procedente de la purificación sin cola de histidinas para evitar uniones inespecíficas, en diferentes concentraciones (5, 2, 1 y 0.5  $\mu\text{M}$ ) y de este modo estimar la constante de afinidad mediante el software BLItz Pro 1.2. De igual forma, el ensayo se realizó de manera inversa, inmovilizando CtYtm1 a 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y añadiendo CtErb1 sin cola de histidinas en las concentraciones de 20, 15, 10, 5 y 2  $\mu\text{M}$ .

Una vez obtenidas la constantes de afinidad de referencia, para realizar el ensayo de competencia mediante péptidos sintéticos se realizaron dos experimentos principales:

En primer lugar, se inmovilizó CtErb1 a 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en sensores de Ni-NTA y se añadió CtYtm1 5  $\mu\text{M}$  incubada previamente durante 30 min con los péptidos derivados de CtErb1 (1, 2 y 3) en concentraciones decrecientes en proporción molar 1:20, 1:10, 1:2 y 1:1. A continuación, se incubaron los péptidos por separado en proporción 1:1 y finalmente, se incubaron combinaciones de péptidos en la misma proporción molar.

En segundo lugar, para estudiar la competencia en la unión que ejercían los péptidos derivados de CtYtm1 (4, 5 y 6), se inmovilizó CtYtm1 a 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en sensores de Ni-NTA y se añadió CtErb1 20  $\mu\text{M}$  incubada previamente durante 30 min con los péptidos de CtYtm1 en

concentraciones crecientes en proporción molar 1:1, 1:2, 1:4, 1:10 y 1:20. Posteriormente, se probaron cada uno de los péptidos por separado en proporción molar 1:4 y finalmente, la combinación de algunos de ellos en función de los resultados en la misma proporción.

### 3.5.2. Cuantificación de los péptidos

Para la cuantificación de los péptidos se debió tener en cuenta que son secuencias muy pequeñas con pocos aminoácidos de modo que no se pudieron medir por el método de Bradford. Por ello, tras descongelar las alícuotas en hielo, se midió la absorbancia  $A_{280}$  en el espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (*Amersham Biosciences*) de 1  $\mu$ L de muestra en 45  $\mu$ L de Cloruro de Guanidinio 6 M calentado durante 15 min a 95°C y enrasado hasta 1 mL con GndCl 6 M. A continuación, a partir de los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) calculados con ProtParam tool *Expasy* (Tabla 3), obtuvimos las concentraciones mediante la Ley de Lambert Beer ( $A = C \cdot \epsilon \cdot L$ ). En el caso de los péptidos que no contenían en su secuencia alguno de los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina o fenilalanina), no fueron capaces de absorber la luz a 280 nm y, por tanto, no se pudo medir su concentración por espectrofotometría UV asumiendo que, tras descongelarse, mantenían la concentración inicial.

**Tabla 3. Tabla con los coeficientes de extinción molar de las secuencias de cada uno de los péptidos.**

Nombre	Secuencia	Coefficiente Extinción ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
1	VWELLTGRQVW	11000
2	QQTIFRGH	-
3	DWHPREPWCV	11000
4	HDDWVSA	5500
5	AGMDRTV	-
6	RGHANKV	-

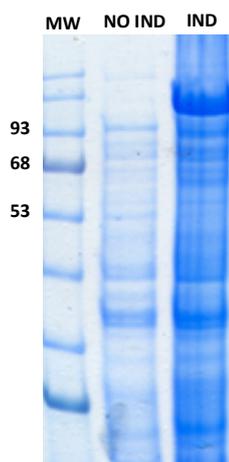
### 3.5.3. Limpieza se sensores Ni-NTA

Al finalizar los ensayos, se requiere eliminar los restos de proteína y/o tampón de cada uno de los sensores utilizados. Para ello, se llevó a cabo el siguiente protocolo: los sensores se sumergen 10 s en Glicina 10 mM a pH 1.9 seguido de un lavado de 10 s en PBS 1X. A continuación, se dejan durante 1 min en  $NiCl_2$  10 mM y de igual modo, se vuelven a lavar durante 10 s en PBS 1X. Finalmente, se sumergen durante 5 min en Sacarosa al 15% (p/v) en 85% PBS 1X y se dejan a temperatura ambiente durante 5 min.

## 4. Resultados

### 4.1. Expresión y purificación de CtErb1

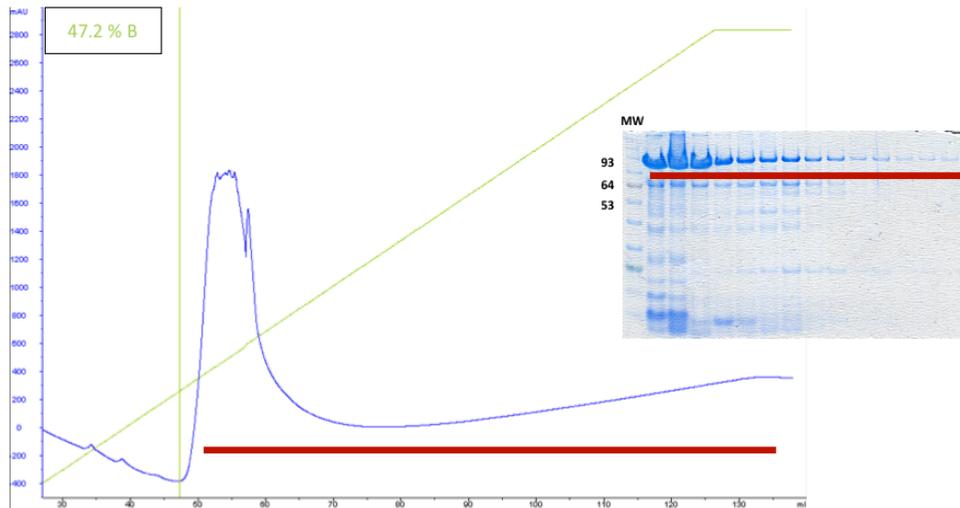
Se expresó 6xHis-CtErb1 (94 kDa) en cepas BL21 CodonPlus de *E. coli* siguiendo el protocolo de autoinducción. En un gel SDS-PAGE se analizaron las muestras recogidas antes (No inducida) y después de la incubación (Inducida) a 20°C durante ~18 h (Fig. 8).



**Figura 8. Gel electroforesis autoinducción 6xHis-CtErb1.** Gel SDS-PAGE 10% acrilamida. MW, marcador de pesos moleculares; NO IND, no inducido; IND, inducido.

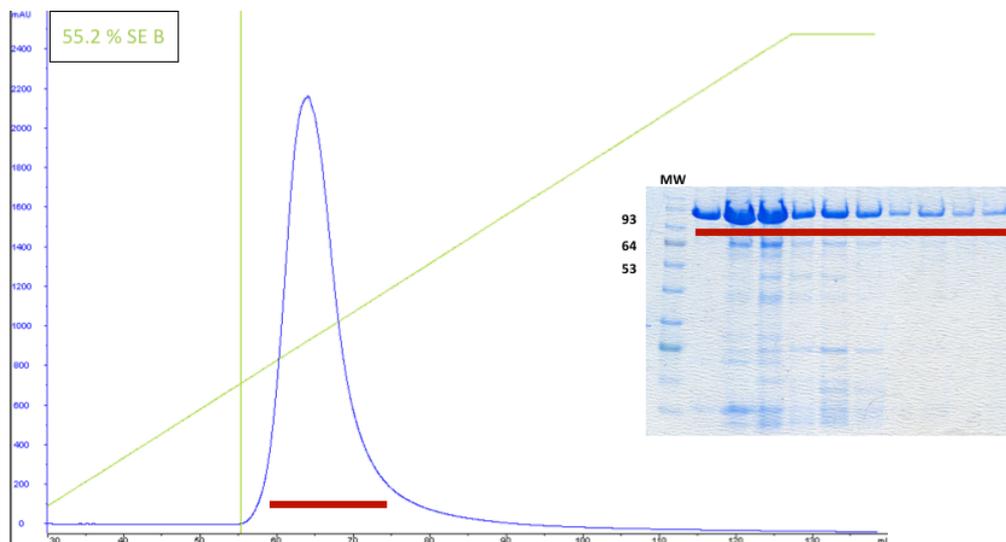
Una vez obtenido el extracto total proteico se llevó a cabo la purificación de la proteína mediante dos cromatografías de afinidad con las columnas HisTrap y HiTrap Heparina, en este orden, seguidas de una cromatografía de exclusión molecular.

Al pasar la solución celular por la columna HisTrap se obtuvo una elevada cantidad de CtErb1 junto con numerosos ácidos nucleicos que copurifican debido a su interacción con el  $\beta$ -propeller, lo cual quedó reflejado en el cromatograma de la Figura 9 con un pico muy ancho que comenzó su elución a un 47.2% de Imidazol. Para mayor evidencia, cada una de las fracciones corridas en el gel de electroforesis mostraron gran cantidad de impurezas.



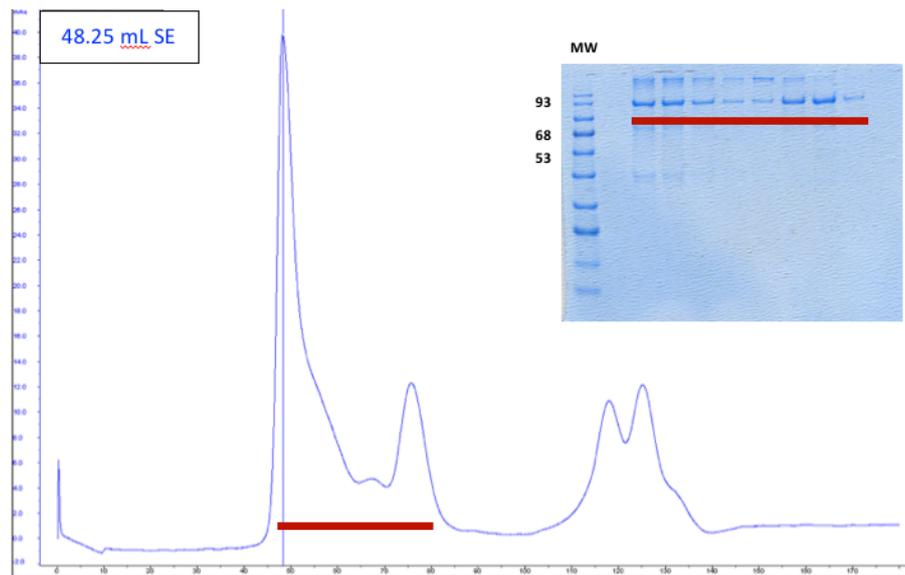
**Figura 9. Cromatografía de afinidad con resina de níquel de CtErb1 (HisTrap FF).** Perfil de elución de CtErb1 generado por Äkta Purifier. La línea transversal verde representa el gradiente de concentración de tampón de elución B. El punto de intersección entre las líneas verdes corresponde con el porcentaje de Imidazol al que comienza la elución. En azul se representa la absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes se visualizan en el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% acrilamida. MW, marcador de pesos moleculares. La barra roja refleja que la proteína aparece en su tamaño correcto.

La proteína debió someterse a una segunda cromatografía de afinidad como paso extra, haciendo uso de una columna de heparina con el fin de eliminar los ácidos nucleicos. De este modo, se obtuvo un pico mucho más limpio de nuestra proteína y cuya elución se produjo 55.2 % de NaCl. En el gel SDS-PAGE podemos observar que las fracciones están más limpias (Fig. 10).



**Figura 10. Cromatografía de afinidad de CtErb1 con resina de heparina (HiTrap Heparina).** Perfil de elución de CtErb1 generado por Äkta Purifier. La línea transversal verde representa el gradiente de concentración de tampón de elución SE B. El punto de intersección entre las líneas verdes corresponde con el porcentaje de NaCl al que comienza la elución. En azul se representa la absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes se visualizan en el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% acrilamida. MW, marcador de pesos moleculares. La barra roja refleja que la proteína aparece en su tamaño correcto.

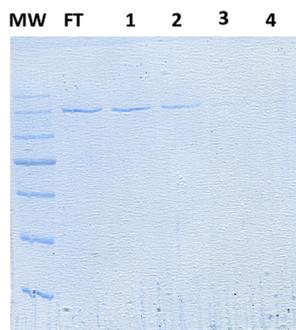
Sin embargo, el gel de electroforesis de la cromatografía con columna de heparina muestra todavía cantidad de impurezas que debieron eliminarse, por lo que se requirió realizar una última cromatografía de exclusión molecular para obtener el grado de pureza deseado. Para ello, las fracciones eluidas en la segunda cromatografía fueron concentradas hasta un volumen de 5 mL e inyectadas en la columna de exclusión molecular cuyo cromatograma se muestra en la Figura 11. En él observamos un pico único correspondiente a nuestra proteína que eluyó a los 48.25 mL. Las fracciones del gel que corresponden con la misma fueron concentradas y se obtuvo una cantidad final de proteína de 48 mg.



**Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular de CtErb1.** Perfil de elución de CtErb1 generado por Äkta Purifier. La línea azul vertical representa los mL de tampón a los que comienza la elución. En azul se representa la absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes se visualizan en el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% acrilamida. MW, marcador de pesos moleculares. La barra roja refleja que la proteína aparece en su tamaño correcto.

#### 4.1.2. Purificación de Erb1 sin 6xHis

Para la obtención de la proteína Erb1 sin la cola de histidinas se tomaron 100  $\mu$ L procedentes de la purificación realizada anteriormente con una concentración de 12 mg/mL. La proteína concentrada se dejó incubar durante  $\sim$ 18 h con la proteasa. Tras la incubación, la proteína se hizo pasar a través de la bomba peristáltica por las columnas HisTrap y GStrap y se eluyó en cuatro fracciones de 5 mL en tampón SE A. Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE y, a continuación, las fracciones en las que apareció la banda con la proteína (FT, 1 y 2) fueron concentradas hasta 250  $\mu$ L obteniéndose una cantidad final de 0.235 mg de proteína (Fig. 12).

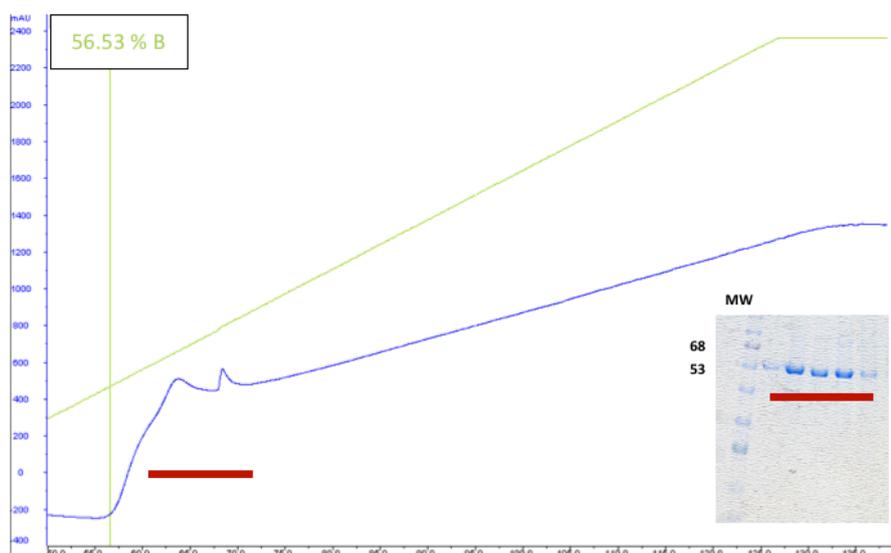


**Figura 12. Gel electroforesis purificación CtErb1 sin 6xHis.** MW, marcador de pesos moleculares; FT (*flow throw*) volumen no retenido en la resina; 1, 2, 3 y 4, eluciones de CtErb1 sin 6xHis en tampón SE A.

## 4.2. Purificación de CtYtm1

6xHis-CtYtm1 (54 kDa) no puede expresarse en *E. coli* de manera soluble, de modo que su expresión se realizó en células Sf9 mediante la transfección de un báculo para producir la proteína soluble y que no forme agregados. Debido a la dificultad del proceso, en este trabajo se partió de precipitados de células Sf9 donde se encontraba la proteína expresada y se llevó a cabo su purificación.

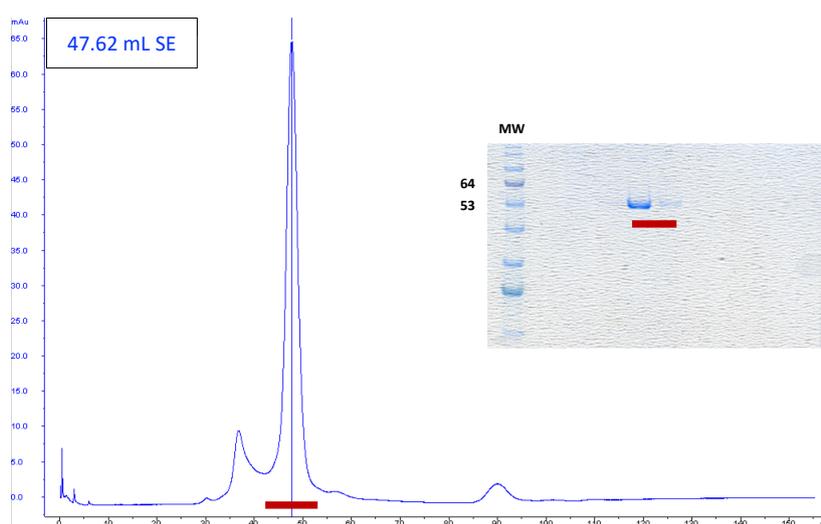
El extracto total proteico se sometió a cromatografía IMAC, la cual nos permitió extraer un elevado porcentaje de la proteína objeto de estudio. Así lo demuestra el cromatograma correspondiente con la Figura 13 donde proteína comenzó a eluir al 56.53 % de Imidazol. En este caso, no co-purifican otras moléculas junto con la proteína por lo que las fracciones analizadas en el gel no presentaron gran cantidad de impurezas.



**Figura 13. Cromatografía de afinidad de CtYtm1 con resina de níquel (HisTrap FF).** Perfil de elución de CtYtm1 generado por Äkta Purifier. La línea transversal verde representa el gradiente de concentración de tampón de elución

B. El punto de intersección entre las líneas verdes corresponde con el porcentaje de Imidazol al que comienza la elución. En azul se representa la absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes se visualizan en el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% acrilamida. MW, marcador de pesos moleculares. La barra roja refleja que la proteína aparece en su tamaño correcto.

Las fracciones correspondientes con la proteína que se reflejan en el gel de la Figura 13, fueron concentradas hasta 1.5 mL de los cuales, se tomaron 500  $\mu$ L para la purificación sin cola de histidinas (apartado 4.2.1) y el mililitro restante se inyectó en la columna de gel filtración obteniéndose la proteína purificada tal y como se demuestra el cromatograma donde la proteína eluyó a un volumen de 47.6 mL correspondiente con 54 kDa. A continuación, se analizaron muestras de cada una de las fracciones en un gel SDS-PAGE (Fig. 14). Las fracciones en las que puede observarse la banda fueron concentradas, obteniéndose una cantidad final de proteína de 2.06 mg. Esta baja concentración se debe a su expresión en células de insecto, donde no es posible inducir grandes cantidades de proteína como ocurre en *E. coli* por autoinducción.

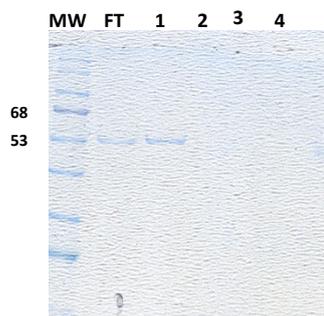


**Figura 14. Cromatografía de exclusión molecular de CtYtm1.** Perfil de elución de CtYtm1 generado por Äkta Purifier. La línea azul vertical representa los mL de tampón a los que comienza la elución. En azul se representa la absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes se visualizan en el gel de electroforesis SDS-PAGE 10% acrilamida. MW, marcador de pesos moleculares. La barra roja refleja que la proteína aparece en su tamaño correcto.

#### 4.2.1. Purificación de CtYtm1 sin 6xHis

Del volumen de 1.5 mL concentrado tras la cromatografía de afinidad, 500  $\mu$ L se incubaron con la proteasa durante  $\sim$ 18 h. Siguiendo el mismo protocolo que para la eliminación de la cola de histidinas en CtErb1, obtuvimos del igual modo cuatro fracciones de 5 mL en tampón SE A. Las muestras recogidas durante el proceso se analizaron en un gel SDS-PAGE (Fig. 15). En él se puede observar una banda de pequeña intensidad en el pocillo FT correspondiente con una pequeña concentración que no fue capaz de quedar retenida en la resina. Las muestras

que contienen la banda (FT y 1) se concentraron hasta 250  $\mu$ L obteniéndose una cantidad final de proteína 1.3736 mg.



**Figura 15. Gel electroforesis purificación CtYtm1 sin 6xHis.** MW, marcador de pesos moleculares; FT (*flow throw*) volumen no retenido; 1, 2, 3 y 4, eluciones de CtYtm1 sin 6xHis en tampón SE A.

### 4.3. Ensayos de interacción *in vitro*

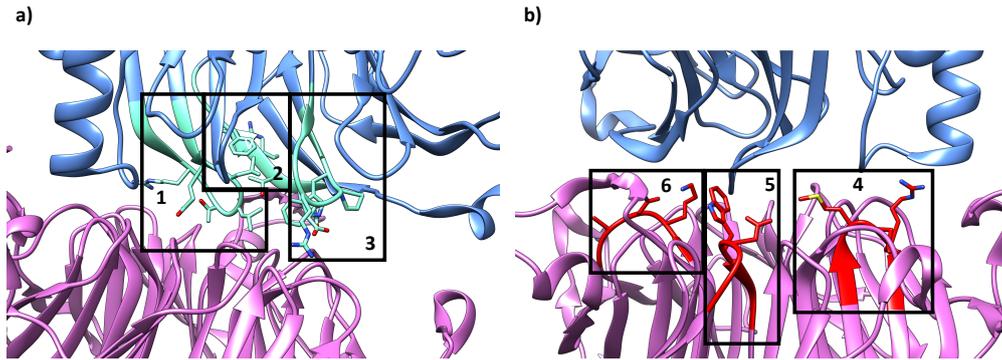
En este trabajo se realizó un ensayo de competencia para observar cambios en la afinidad de unión entre las proteínas CtErb1 y CtYtm1 en presencia de péptidos de interferencia mediante experimentos de interferometría de bicapa por medio del sistema BLI. El diseño del ensayo consistió en dos experimentos principales:

En primer lugar, se obtuvo la constante de afinidad de la unión entre ambas proteínas inmovilizando CtErb1 al sensor y añadiendo CtYtm1 y se tomó como referencia. A continuación, manteniendo CtErb1 fijado al sensor, se incubó CtYtm1 con distintas combinaciones péptidos de interferencia correspondientes con los dominios de la superficie de interacción de CtErb1 (péptidos 1, 2 y 3) en distintas concentraciones. De este modo, se calcularon nuevas constantes de afinidad para compararlas con las de referencia.

El segundo experimento, consistió en realizar el ensayo inverso, es decir, inmovilizando CtYtm1 al sensor, calcular la constante de afinidad con CtErb1 y, a continuación, incubar CtErb1 con péptidos de interferencia correspondientes con los dominios de interacción de CtYtm1 (péptidos 4, 5 y 6) para obtener las constantes de afinidad correspondientes.

#### 4.3.1. Diseño de los péptidos

Para el diseño de los péptidos partió de la caracterización estructural de la superficie de unión entre ChErb1 e ChYtm1 que permitió observar los bucles de cada uno de los  $\beta$ -propeller involucrados en la interacción. De este modo, se localizaron las secuencias concretas por las que se unen para formar el dímero (Fig. 16).



**Figura 16. Bucles de interacción de las proteínas ChErb1 y ChYtm1.** Se representa ChErb1 en azul y ChYtm1 en rosa **a)** Áreas de interacción de ChErb1 (azul) donde se localizan los péptidos 1, 2 y 3. **b)** Áreas de interacción de ChYtm1 (rojo) donde se localizan los péptidos 4, 5 y 6.

Además, se realizó el alineamiento entre Erb1/Bop1 y entre Ytm1/WDR12 comprobando así que los dominios de interacción de *S. cerevisiae* se mantenían conservados en *C. thermophilum* y en especies de mamífero con las que realizar futuros ensayos (humanos y ratones) (Fig. 17 y 18).

```

Alineamiento MAFFT Erb1/Bop1
Chatd/Yeast/Human/Mouse

sp|G05CK6|ERB1_ MG-----SKIVEKRRSRSDSESD-NE---LGDGLFDGVLQSOSEDEEYIP5
sp|Q04660|ERB1_ MH---AKNNKTEAKMSKRAASESDVEED-EDKLLSVDGLIDAEASESDDDDEYEF5
sp|Q14137|BOP1_ MAGCGRAGRT--AASVVRPEKRRSEPELEPEPEPEPRL-----CT
sp|P97452|BOP1_ MAGACGKPH--MSPASLPGKRRLEPQDELIQI-EPPLL-----
          * : : : : :
          * : : : :

sp|G05CK6|ERB1_ SEVDEDDDDADEASESDS---DDSDSEDDVEEEDDEALLSDEIPSEGESEKDDDLAESH
sp|Q04660|ERB1_ AV---EKEESDKEADDSS---DDSDDELNKK-----LLAEF---EGDGEEDYDSEEF5
sp|Q14137|BOP1_ SPLSHSTGSDSVDSESEVFSGLESDGSDSEDDDEG---DE---EGEDGALDEFGHSG
sp|P97452|BOP1_ -----SDPSSLSDSSEESVFSLEDLSDSSE---DT---EGVAGSGDEDNRH
          . : . : : * . . * . : . :
          . : . : : * . . * . : . :

sp|G05CK6|ERB1_ ESKDQDQKPESEPELEPFVDPKREDEELEDNRVRIEKDANGGIYVYDEIDPVDSDD
sp|Q04660|ERB1_ DDTTSLTRLSGVK-LQTVDP-----NITYSKYADGSDRIKPEINPVYDSD
sp|Q14137|BOP1_ LKKTTEEQVQASTPCPRTEMASARTGDQ-----NITYSKYADGSDRIKPEINPVYDSD
sp|P97452|BOP1_ AETSEELAAQAPLCSRTTEAGALAQDE-----YEDS
          * : : : :
          * : : : :

sp|G05CK6|ERB1_ TDYNVPTININPLSFVDSYPHIGYINGKRIKMRP-ATGDALQNLDSIEVPEGTGLT
sp|Q04660|ERB1_ SDAET-ONTIGNIPLSAYDEMPHIGYINGKRIKMRP-AKGSALDQLDLSIELPEGTGLL
sp|Q14137|BOP1_ SDEEDINTVGNVPLEWYDDFPFHVGYDLGRRVYKPLRTRDELQDLKMDPDPVWRTVQ
sp|P97452|BOP1_ SDEEDINTVGNVPLAWYDEFPHVGYDLGRRVYKPLRTRDELQDLKMDPDPVWRTVQ
          : * : * : * * * * : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * :
          : * : * : * * * * : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * :

sp|G05CK6|ERB1_ DPMTGKPLNLRDELELIRKVOQGLIPDVEDVPYDVEWFTSVEEKMPLSAEPKRRF
sp|Q04660|ERB1_ DKMSGSLNLTKEEELLSKIQNEQDSDINMPYELDWFTRHEEYMPMTAVPEKRRF
sp|Q14137|BOP1_ DPMTGRDLRLTDEQVALVRRLQSGQFVDFGPNYPYPAVDFSGDIMIHPVTNRPADKRSF
sp|P97452|BOP1_ DKMTGRDLRLTDEQVALVRRLQSGQFVDFGPNYPYPAVDFSGDIMIHPVTNRPADKRSF
          * : * * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

sp|G05CK6|ERB1_ IFSKNEAKQIMKLVRAIREGRIIPYKPEEREERELEKEEEF-YDLNQNEEPPQ---PNP
sp|Q04660|ERB1_ VPSKNEAKRMVIRVIREGRIIP---PKLLEKMEKEKEIENYQYDLWGDSTETN---DHW
sp|Q14137|BOP1_ IPSLVEKEKVRMVAIKMGWIKPRRP-----RDPTPSF-YDLWAQEDPNAVLGRHK
sp|P97452|BOP1_ IPSLVEKEKVRMVAIKMGWIKPRRP-----HDPTPSF-YDLWAQEDPNAVLGRHK
          : * * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          : * * : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

sp|G05CK6|ERB1_ MHTPAPKLPAPPYDLSYNNPPEVLPKTEEREWEKMDPEDEKVDLPTKYDLSLKVPAWG
sp|Q04660|ERB1_ MHLRAPKLPPTNEESYNNPPEVLLSPEEKEAWENTYSEERNEFIQKYSALRKPVGYG
sp|Q14137|BOP1_ MHPVAPKALPAGHAESYNNPPEVLLSEERLAWEQEGERKLSFLPRKFPSLRAVPAYS
sp|P97452|BOP1_ MHPVAPKALPAGHAESYNNPPEVLPTEEERSAWMQEPPERKLSFLPRKFPSLRAVPAYS
          * : * * * * * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          * : * * * * * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

sp|G05CK6|ERB1_ NFKVERFERCMDLVLAPRVKRNRLNIDPNSLPLKPSDELKPFPTIQQTIIFRCHGRVR
sp|Q04660|ERB1_ ESIRERFERSLDYLAPRVKRNRLNIDPNSLPELPSPKDLRPFPIICSTIYAGHGGKVR
sp|Q14137|BOP1_ RFIQERFERCLDYLCPQRKMRVNDPEDLIPKLPDRDLQPFPIICQALVYRGHSDLVR
sp|P97452|BOP1_ RFIQERFERCLDYLCPQRKMRVNDPEDLIPKLPDRDLQPFPIICQALVYRGHSDLVR
          . : * * * * * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          . : * * * * * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
  
```

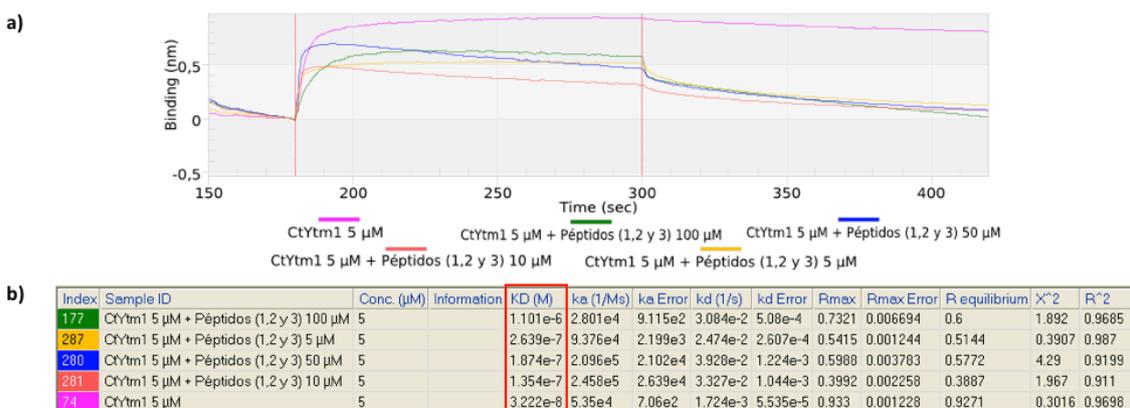
**Figura 17. Alineamiento de Erb1/Bop1 en *C. thermophilum*, *S. cerevisiae*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*.** Secuencias obtenidas de UniProt: G05CK6, Erb1 en *C. thermophilum*; Q04660, Erb1 en *S. cerevisiae*; Q14137, Bop1 en *Homo sapiens*; P97452, Bop1 en *Mus musculus*. Los cuadros rojo señalados reflejan la secuencia conservada de los péptidos 1, 2 y 3.





**Figura 19. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1. a)** Cinética de asociación entre CtErb1 (80 μg/ml) y CtYtm1 (5, 2, 1 y 0,5 μM). **b)** Tabla resumen con las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada ensayo tomando como referencia la unión específica al sensor de CtYtm1 5 μM.

Para llevar a cabo el ensayo de competencia, se incubó CtYtm1 a 5 μM junto con los péptidos de interferencia 1, 2 y 3 en proporción molar 1:20, 1:10, 1:2 y 1:1. Se observó una disminución de la afinidad de unión que se reflejó en la cinética que sigue la reacción en la gráfica y en el aumento de las  $K_D$  hasta dos órdenes de magnitud (Fig. 20).

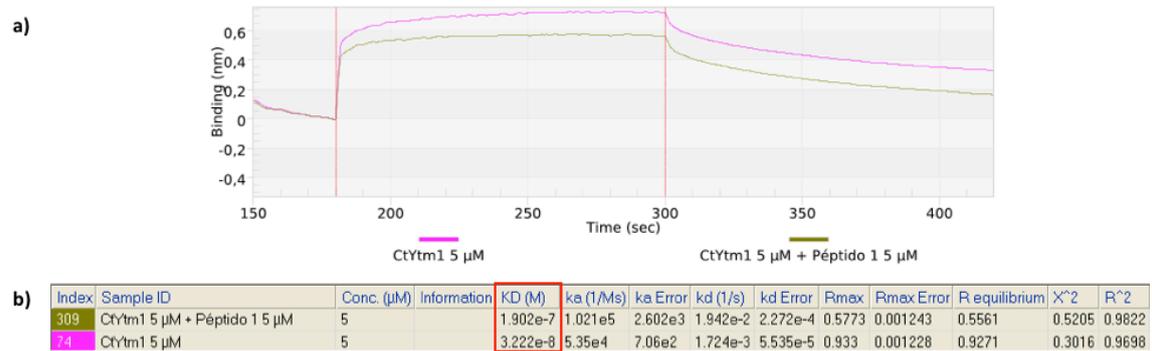


**Figura 20. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con péptidos de interferencia 1, 2 y 3. a)** Cinética de asociación entre CtErb1 (80 μg/ml) y CtYtm1 (5 μM) (rosa) y en solución con los péptidos 1, 2 y 3 (100, 50, 10 y 5 μM). **b)** Tabla resumen con las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

Tras el análisis de los datos, el efecto de interferencia debido a la presencia de los péptidos 1, 2 y 3 resultó ser positivo, por ello, se decidió probar el efecto individual de cada uno de ellos para lo cual se fijó una concentración determinada de péptidos a la que incubar cada uno de ellos por separado con CtYtm1 5 μM. En base a los parámetros estadísticos de los resultados anteriores, el ensayo que presentó valores de los parámetros  $\chi^2 \approx 0$  y  $R^2 \approx 1$  y más similares a los de referencia, fue el de los tres péptidos a 5 μM (Fig. 20b). Por lo tanto, se realizaron experimentos en los que se mantuvo CtErb1 inmovilizada en la misma concentración

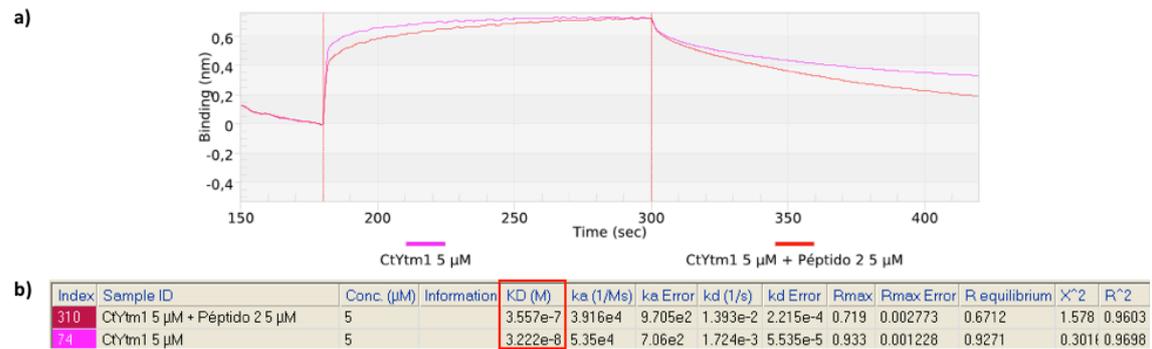
y se añadió CtYtm1 5  $\mu\text{M}$  previamente incubada con cada uno de los péptidos en proporción molar 1:1.

Haciendo un análisis de los resultados, se observó que el péptido 1 disminuyó la afinidad de unión entre las proteínas, pues así lo refleja la gráfica de la reacción. Sin embargo, el efecto en el valor de  $K_D$  es muy pequeño (Fig. 21).



**Figura 21. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con el péptido de interferencia 1.** a) Cinética de asociación entre CtErb1 (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y CtYtm1 (5 $\mu\text{M}$ ) (rosa) y en solución con el péptido 1 en proporción molar 1:1 (verde). b) Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

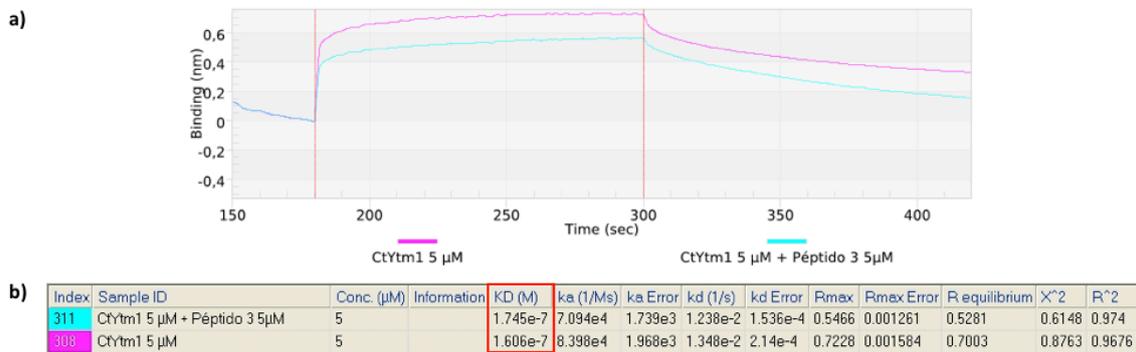
De igual forma, se realizó el ensayo incubando CtYtm1 5  $\mu\text{M}$  con el péptido 2. La cinética de la reacción es similar a la de referencia mostrando que no interfiere en la afinidad unión entre las proteínas. El pequeño cambio que experimenta  $K_D$  puede deberse a la elevada sensibilidad del sistema (Fig. 22).



**Figura 22. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con el péptido de interferencia 2.** a) Cinética de asociación entre CtErb1 (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y CtYtm1 (5 $\mu\text{M}$ ) (rosa) y en solución con el péptido 2 en proporción molar 1:1 (rojo). b) Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

Por último, se ensayó el efecto de interferencia resultado de incubar CtYtm1 5  $\mu\text{M}$  con el péptido 3 mostrando una gráfica similar a la que presentaba el péptido 1, es decir, ejerce

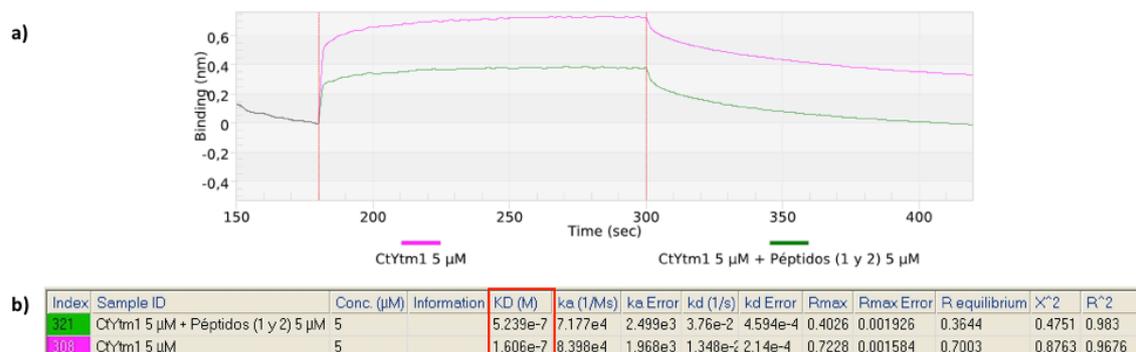
interferencia en la unión entre ambas proteínas y por tanto, existe un pequeño aumento en el valor e  $K_D$  (Fig. 23).



**Figura 23. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con el péptido de interferencia 3.** a) Cinética de asociación entre CtErb1 (80 µg/ml) y CtYtm1 (5µM) (rosa) y en solución con el péptido 3 en proporción molar 1:1 (azul). b) Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

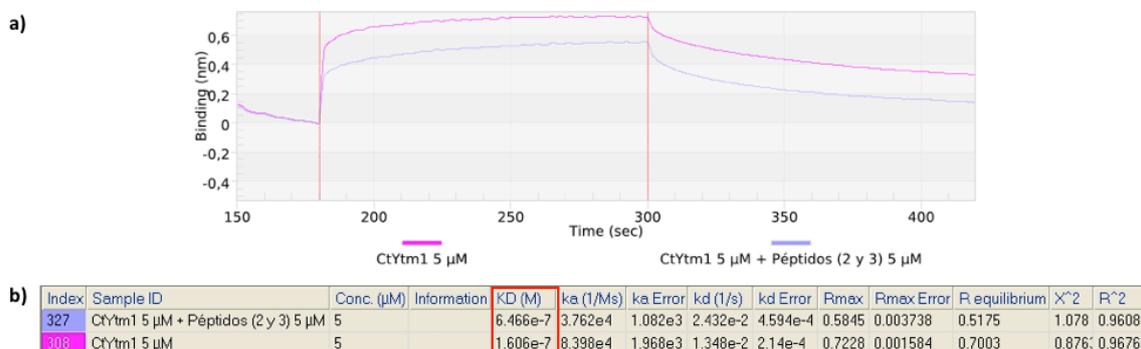
Estos resultados demuestran que la presencia de los tres péptidos tiene un efecto sinérgico sobre el efecto de cada uno de ellos por separado. En consecuencia, se decidió realizar ensayos por combinaciones de pares de péptidos para finalizar el experimento. Para ello, se mantuvieron constantes las concentraciones establecidas para el ensayo de los péptidos por separado.

La combinación del péptido 1 con el péptido 2 causó interferencia en la unión de CtErb1 con CtYtm1 tal y como se puede observar en la gráfica de la Figura 24. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podemos afirmar que el efecto es superior al de los péptidos por separado y menor al efecto que ejercen los tres péptidos en conjunto.



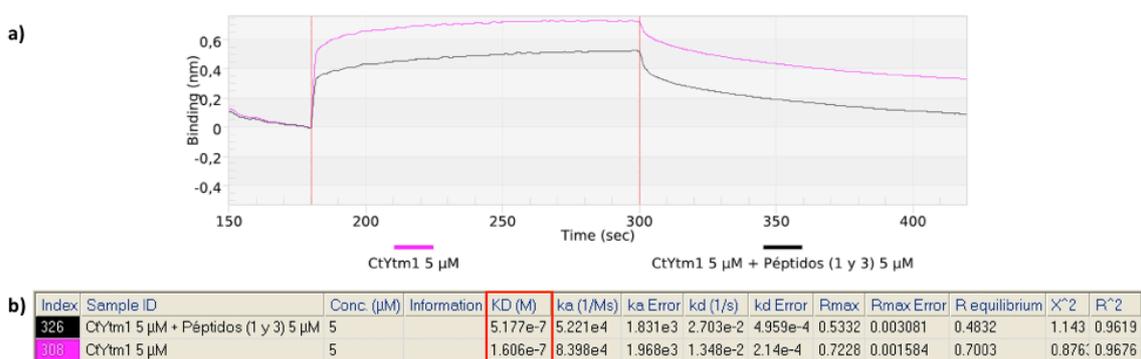
**Figura 24. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con los péptidos de interferencia 1 y 2.** a) Cinética de asociación entre CtErb1 (80 µg/ml) y CtYtm1 (5µM) (rosa) y en solución con los péptidos 1 y 2 en proporción molar 1:1 (verde). b) Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

De la combinación de los péptidos 2 y 3 puede deducirse que existe también una disminución en la afinidad de las proteínas en base a la forma de la gráfica y al aumento que experimenta el valor de  $K_D$  (Fig. 25).



**Figura 25. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con los péptidos de interferencia 2 y 3. a)** Cinética de asociación entre CtErb1 (80 µg/ml) y CtYtm1 (5µM) (curva 308) y en solución con los péptidos 2 y 3 en proporción molar 1:1 (curva 327) **b)** Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

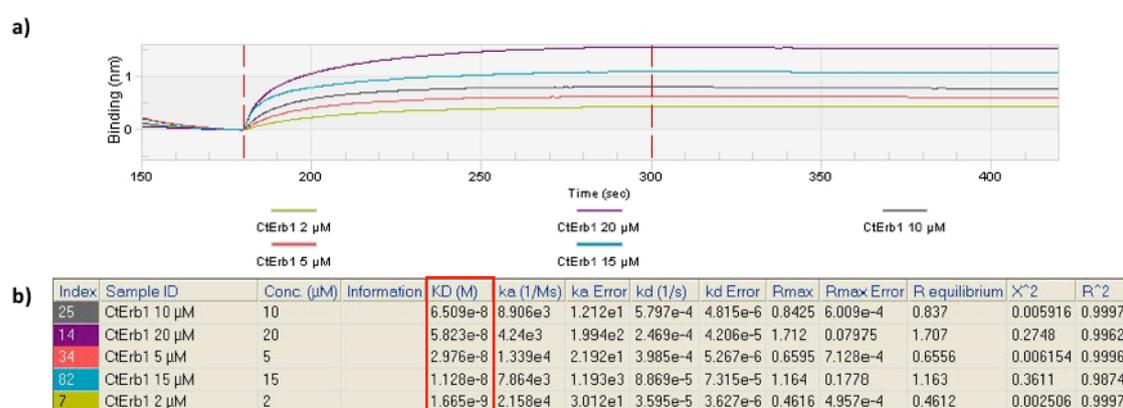
En el caso de los péptidos 1 y 3, cabe destacar que sus ensayos de manera individual indicaban que eran los causantes principales de la interferencia en la afinidad, por ello, la combinación de ambos podría suponer un efecto superior al de cualquier otra combinación de pares de péptidos. Sin embargo, el resultado no fue el esperado, ya que se obtuvo un resultado muy similar al de las combinaciones anteriores (Fig. 26).



**Figura 26. Ensayo de interacción entre CtErb1 (6xHis) y CtYtm1 incubado con los péptidos de interferencia 1 y 3. a)** Cinética de asociación entre CtErb1 (80 µg/ml) y CtYtm1 (5µM) (rosa) y en solución con los péptidos 1 y 3 en proporción molar 1:1 (negro). **b)** Tabla resumen de las constantes de disociación reflejadas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

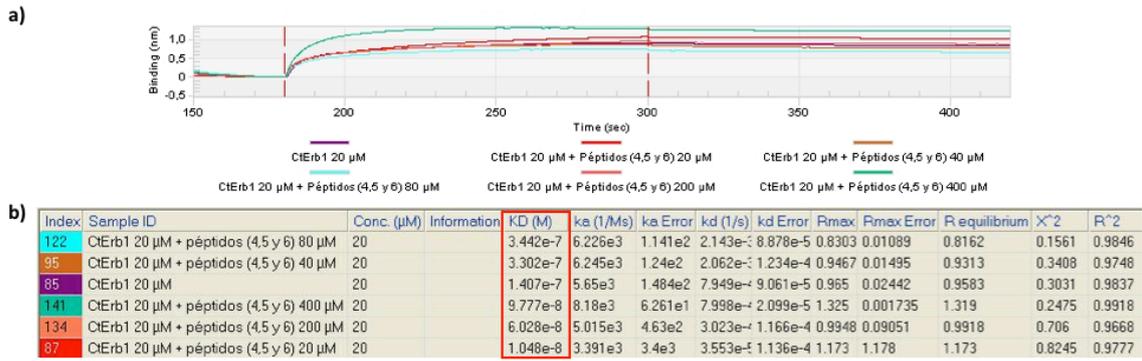
### 4.3.3. Ensayo de interacción entre CtYtm1 y CtErb1 incubados con péptidos de interferencia de CtYtm1

En la segunda parte del experimento, se inmovilizó CtYtm1 a 80 µg/ml en sensores de Ni-NTA y se añadieron diferentes concentraciones de CtErb1 (20, 15, 10, 5 y 2 µM). De este modo, se obtuvo la constante de afinidad entre ambas proteínas tomando la unión inespecífica al sensor de CtErb1 como valor de referencia. De nuevo, el análisis reflejó la fuerte asociación que existe entre ambas con unos valores de  $K_D$  de un orden  $\geq 10^{-8}$  que sirvieron como constante de afinidad de referencia frente a los resultados de inmovilizar CtYtm1 a 80 µg/ml en sensores de Ni-NTA y añadir CtErb1 5 µM junto con distintas combinaciones péptidos a diferentes concentraciones (Fig. 27).



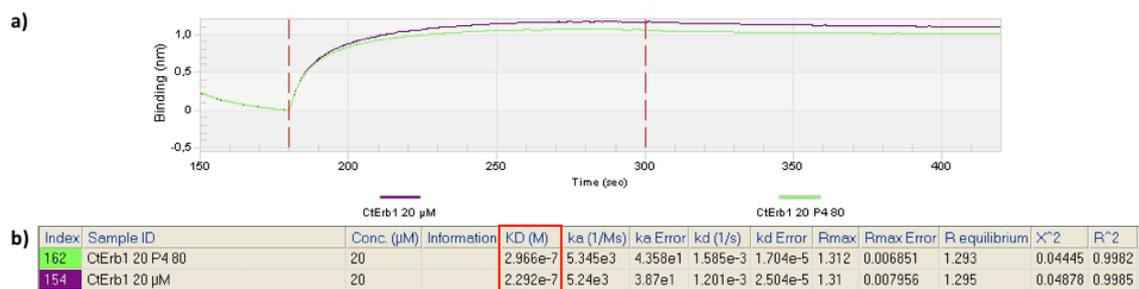
**Figura 27. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1. a)** Cinética de asociación entre CtYtm1 (80 µg/ml) y CtErb1 (10, 15, 10, 5 y 2 µM). **b)** Tabla resumen con las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada ensayo tomando como referencia la unión específica al sensor de CtErb1 5 µM.

Para el ensayo de competencia de los péptidos 4, 5 y 6, se incubó CtErb1 20 µM junto con los tres péptidos en proporción molar 1:1, 1:2, 1:4, 1:10 y 1:20. Los resultados mostraron que, por un lado, no se evidenciaron efectos de interferencia en la afinidad de las proteínas por parte de los péptidos en las proporciones molares 1:1, 1:2 y 1:20. Por otro lado, la curva de la gráfica correspondiente con el ensayo de los péptidos en la proporción 1:50, supera a la curva de referencia, lo cual indica que la elevada concentración de péptidos (400 µM) ha saturado al sensor. Sin embargo, en el ensayo en presencia de los tres péptidos en la proporción 1:4, sí se observó interferencia en la unión entre ambas proteínas que quedó reflejada tanto en la gráfica como en el aumento que experimenta el valor de  $K_D$  (Fig. 28).

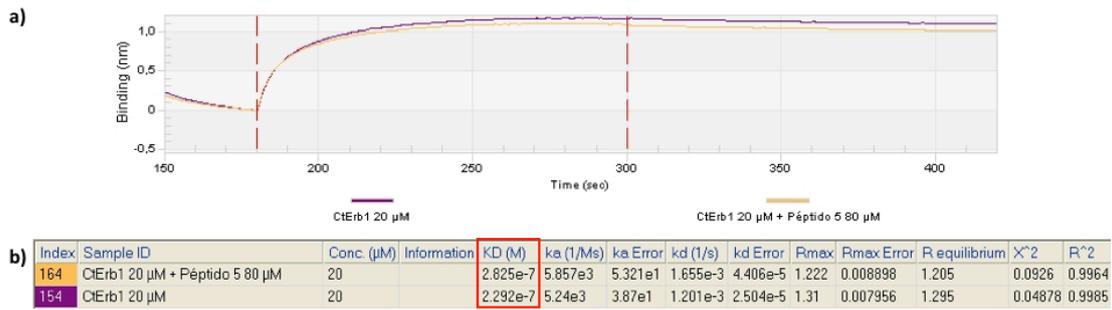


**Figura 28. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con péptidos de interferencia 4, 5 y 6. a)** Cinética de asociación entre CtYtm1 (80 µg/ml) y CtErb1 (20 µM) (morado) y en solución con los péptidos 4, 5 y 6 (20, 40, 80, 200 y 400 µM). **b)** Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

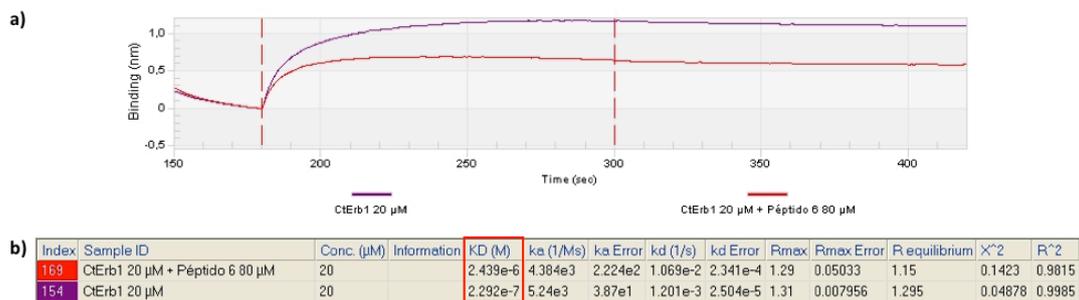
De nuevo, podemos afirmar que existe un efecto de interferencia debido a la presencia de los péptidos, en este caso, los correspondientes con la superficie de CtYtm1 (4, 5 y 6). Por ello, se decidió realizar ensayos de interferometría de los péptidos 4, 5 y 6 a 80 µM individualmente incubados con CtErb1 a 20 µM, cuyos resultados se muestran en las Figuras 29, 30 y 31. Analizando cada una de las gráficas, se determinó que el péptido 6 fue el único que consiguió competir en la interacción por CtYtm1 inmovilizado. Además, haciendo una comparativa de los valores de  $K_D$ , el péptido 6 consiguió aumentar su valor hasta un orden de magnitud, mientras que para los péptidos 4 y 5 únicamente experimentaron un pequeño aumento de su valor, de lo que podemos decir que se debe a la elevada sensibilidad de los sensores.



**Figura 29. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con el péptido de interferencia 4. a)** Cinética de asociación entre CtYtm1 (80 µg/ml) y CtErb1 (20 µM) (morado) y en solución con el péptido 4 en proporción molar 1:1 (verde). **b)** Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

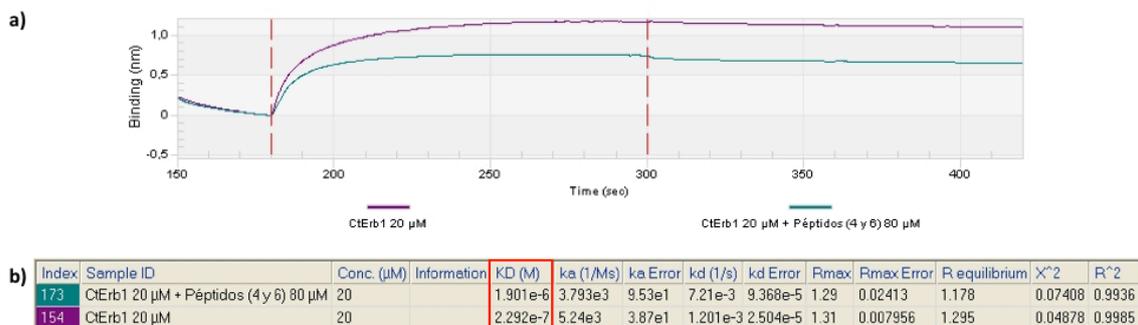


**Figura 30. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con el péptido de interferencia 5. a)** Cinética de asociación entre CtYtm1 (80 µg/ml) y CtErb1 (20 µM) (morado) y en solución con el péptido 5 en proporción molar 1:1 (amarillo). **b)** Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.



**Figura 31. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado con el péptido de interferencia 6. a)** Cinética de asociación entre CtYtm1 (80 µg/ml) y CtErb1 (20 µM) (morado) y en solución con el péptido 6 en proporción molar 1:1 (rojo). **b)** Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

No obstante, se comprobó el efecto de interferencia de la combinación de pares de péptidos. Por ello se decidió probar el péptido 6, cuyo resultado fue positivo en el análisis individual, con otro de los péptidos cuyo resultado fue negativo, péptido 4. La cinética de asociación es muy similar a la que experimentó el péptido 6 por separado. Además, el cambio en el valor de  $K_D$  continua siendo de un orden de magnitud. Por tanto, no pudimos afirmar el efecto sinérgico del péptido 6 por la presencia del 4 (Fig. 32).



**Figura 32. Ensayo de interacción entre CtYtm1 (6xHis) y CtErb1 incubado en combinación con los péptidos de interferencia 4 y 6. a)** Cinética de asociación entre CtYtm1 (80 µg/ml) y CtErb1 (20 µM) (morado) y en solución con los péptidos 4 y 6 en proporción molar 1:1 (verde). **b)** Tabla resumen de las constantes de afinidad señaladas en rojo y parámetros estadísticos calculados para cada uno de los ensayos.

## 5. Discusión

Tanto en levaduras como en mamíferos, el complejo nucleolar PeBoW (Nop7 en levaduras) es esencial tanto para la formación del ribosoma como para la proliferación celular. Además, son varias las evidencias que demuestran la activación del gen supresor de tumores p53 como consecuencia de defectos en la biogénesis del ribosoma, lo cual lo ha convertido en diana terapéutica contra células cancerígenas. Concretamente, este proyecto está interesado en desarrollar un tratamiento no genotóxico contra este tipo de células y se ha establecido la formación del complejo PeBoW como diana para interferir en la vía de procesamiento del ARNr de la biogénesis del ribosoma y promover la activación de p53.

Gracias a la realización de estructuras tridimensionales de este complejo, a la reciente identificación estructural de la interacción de alta afinidad que se da entre las proteínas Erb1/Ytm1 y a la identificación de las regiones cruciales concretas de esta interacción, se ha despertado el interés por evitar la generación del complejo PeBoW impidiendo la formación de este dímero mediante el diseño de agentes dirigidos.

El presente trabajo consistió en ensayos de interacción *in vitro* mediante interferometría de bicapa, BLI, que permitieron observar la disminución en la afinidad de unión de las proteínas CtErb1 y CtYtm1 debido a la presencia de péptidos de interferencia. Para ello, se obtuvieron péptidos sintéticos correspondientes con secuencias de los bucles de los  $\beta$ -propeller implicados en la interacción entre ChErb1 y ChYtm1. El motivo por el cual se diseñaron péptidos como agentes de interferencia en vez de otro tipo de molécula orgánica, fue debido a que la superficie de interacción entre ChErb1 y ChYtm1 es muy extensa y, por tanto, cualquier fármaco diana no sería efectivo. No obstante, se debió comprobar que las regiones implicadas en la interacción estaban conservadas entre las especies *S. cerevisiae*, *C. thermophilum* y especies de mamífero, ya que la caracterización estructural se ha realizado en la primera especie, el presente estudio se ha realizado con los ortólogos correspondientes con la segunda debido a su termoestabilidad, y es requisito que estén conservadas en especies de mamífero como fin último para la obtención de una terapia.

Tras obtener unos resultados satisfactorios procedentes de la expresión y purificación de CtErb1 y CtYtm1, se realizaron ensayos de competencia mediante BLI. En primer lugar, se corroboró la fuerte afinidad de unión entre las proteínas CtErb1 y CtYtm1, pues se obtuvieron constantes de afinidad del rango de micromolar y se tomaron como referencia.

## **5.1. Ensayos de BLI entre CtErb1 y CtYtm1 incubada con péptidos de CtErb1**

En base a la afinidad de unión entre CtErb1 y CtYtm1, se pretendió interferir en la interacción por la presencia de los péptidos 1, 2 y 3 mediante ensayos de BLI en los que se inmovilizó CtErb1 al sensor y se añadió CtYtm1 previamente incubado con distintas combinaciones de péptidos. Los resultados mostraron que únicamente los péptidos 1 y 3 provocaron, de manera individual, una disminución de la afinidad entre las proteínas. Sin embargo, el efecto de interferencia debido a combinaciones de pares de péptidos era superior al de los péptidos por separado e inferior al efecto debido a los tres péptidos en conjunto. Estos resultados quedaron reflejados con un aumento en el valor de las  $K_D$  debido principalmente a un cambio en el valor de  $K_d$ , ( $KD = \frac{Kd}{Ka}$ ). Por tanto, podemos afirmar que los tres péptidos son capaces de unirse a la proteína con la que se incubaron, CtYtm1, y en consecuencia, aumentar la disociación de la unión de CtYtm1 a la proteína inmovilizada CtErb1. Los resultados indican que los tres péptidos en conjunto, son capaces de interferir en la afinidad de unión entre las proteínas. Además, se demuestra que las tres regiones de CtErb1 correspondientes con los péptidos 1, 2 y 3 permiten la interacción entre las proteínas, siendo las secuencias derivadas de los péptidos 1 y 3 las mayoritariamente implicadas.

## **5.2. Ensayos de BLI entre CtYtm1 y CtErb1 incubada con péptidos de CtYtm1**

En el ensayo de competencia inverso, se estudió la disminución en la constante de afinidad del dímero debido a la interferencia que ejercían los péptidos 4, 5 y 6, los cuales, fueron previamente incubados con CtErb1 y añadidos a CtYtm1 inmovilizado. Los resultados mostraron que únicamente el péptido 6 fue capaz de interferir en la unión entre las proteínas del dímero de manera individual ya que se produjo un aumento en el valor de la  $K_D$ . Además, no se observó un efecto superior por la presencia de alguno de los otros dos péptidos. Cabe destacar que, de manera similar al ensayo anterior, el cambio en la constante de afinidad es debida a un cambio en el valor de  $K_d$  de modo que podemos afirmar de nuevo que el péptido 6 es capaz de unirse con la proteína incubada CtErb1 y aumentar la disociación de esta unida a la proteína inmovilizada CtYtm1. Por tanto, los resultados apuntan a que la región de CtYtm1 correspondiente con la secuencia del péptido 6 posee gran implicación en la interacción entre las proteínas.

Sin embargo, en los presentes resultados existe cierto error experimental debido a varios motivos. Por un lado, la cuantificación no es la ideal, pues el método de Bradford proporciona una cuantificación aproximada de las proteínas y, además, los péptidos 2, 5 y 6 no pudieron cuantificarse por espectrofotometría UV ya que no absorben a 280 nm, por lo que se asumió que mantenían su concentración inicial durante todo el proceso experimental. Por otro lado, durante la realización del experimento han existido problemas de estabilidad de las proteínas a pesar de proceder del hongo termófilo *C. thermophilum*. Por tanto, la fiabilidad de estos resultados se adoptaría realizando un número mayor de réplicas para cada uno de los ensayos o a través de nuevos estudios de interacción *in vitro*: por BLI mediante la inmovilización de los péptidos biotinilados sensores de estreptavidina o mediante ITC. Si los ensayos *in vitro* resultaran positivos, se llegaría a realizar ensayos de interacción *in vivo* en células de mamífero.

## 6. Conclusiones

De este trabajo se han podido obtener las siguientes conclusiones:

- El protocolo de sobreexpresión por autoinducción de 6xHis-CtErb1 en *E. coli* BL21 CodonPlus y de purificación de la misma, han resultado satisfactorios para la realización de ensayos biofísicos por BLI.
- El protocolo de purificación de 6xHis-CtYtm1 de células Sf9 ha permitido obtener suficiente cantidad de proteína para realizar ensayos biofísicos mediante BLI.
- El péptido 2 derivado de Erb1 y que participa en la interacción con Ytm1, no tiene efecto sobre la formación de dímero.
- Los péptidos 4 y 5 derivados de Ytm1 y que participan en la interacción con Erb1, no tienen efecto sobre la formación del dímero.
- Los péptidos 1 y 3 derivados de la secuencia de Erb1 son capaces de provocar una disminución en la constante de afinidad del dímero.
- El péptido 6 derivado de la secuencia de Ytm1 es capaz de provocar una disminución de un orden de magnitud en la constante de afinidad del dímero.
- Los resultados parecen indicar que la interferencia en la estabilidad de interacción provocada por los péptidos, no parece afectar a la formación del dímero, sino a la disociación entre ambas proteínas.
- Se han obtenido las regiones mayoritariamente implicadas en la unión entre las proteínas Erb1 e Ytm1 a partir de las zonas de interacción descritas de cada uno de los bucles de los  $\beta$ -propeller.
- Los resultados demuestran que la interacción entre Erb1 e Ytm1 es una buena diana para impedir la formación del complejo PeBoW y que el uso de péptidos como agentes dirigidos podrían ser la clave de una nueva terapia no genotóxica con la que inhibir el crecimiento celular y la proliferación de las células tumorales.

## 7. Bibliografía

AHN, C.; CHO, H.; LEE, D.; SIM, H.; KIM, S. AND PAI, HS. (2016). Functional characterization of the ribosome biogenesis factors PES, BOP1, and WDR12 (PeBoW), and mechanisms of defective cell growth and proliferation caused by PeBoW deficiency in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 67(17): 5217-5232.

ALTVATER, M.; SCHÜTZ, S.; CHANG, Y. AND PANSE, V. (2014). Dissecting Ribosome Assembly and Transport in Budding Yeast. *Methods in cell biology*, 122: 437-461.

BAßLER, J.; KALLAS, M.; PERTSCHY, B.; ULBRICH, C.; THOMS, M. AND HURT, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 Drives Removal of Biogenesis Factors during Multiple Stages of 60S Ribosome Assembly. *Molecular Cell*, 38 (5) 712-721.

BEN-SHEM, A.; GARREAU DE LOUBRESSE, N.; MELNIKOV, S.; JENNER, L.; YUSUPOVA, G. AND YUSUPOV, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334: 1524–1529.

BYWATER, M.; POORTINGA, G.; SANIJ, E.; HEIN, N.; PECK, A.; CULLINANE, C.; MWALL, M.; CLUSE, L.; DRYGIN, D.; ANDERES, K.; HUSER, N.; PROFFITT, C.; BLIESATH, J.; HADDACH, M.; SCHWAEBE, MK.; RYCKMAN, DM.; ARROZ, WG.; SCHMITT, C.; LOWE, SW.; JOHNSTONE, RW.; PEARSON, RB.; MCARTHUR, GA. AND HANNAN, RD. (2012). Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer cell*, 22(1): 51-65.

DEISENROTH, C.; THORNER, A.; ENOMOTO, T.; PEROU, C. AND ZHANG, Y. (2010). Mitochondrial HEP27 is a c-Myb Target Gene That Inhibits Mdm2 and Stabilizes p53. *Molecular and Cellular Biology*, 30(16): 3981-3993.

FERNÁNDEZ-PEVIDA, A.; KRESSLER, D. AND DE LA CRUZ, J. (2015). Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 6(2): 191-209.

GRIMM, T.; HÖLZEL, M.; ROHRMOSER, M.; HARASIM, T.; MALAMOUCSI, A.; GRUBER-EBER, A.; KREMMER, E. AND EICK, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic acids research*, 34(10): 3030-3043.

HÖLZEL, M.; ROHRMOSER, M.; SCHLEE, M.; GRIMM, T.; HARASIM, T.; MALAMOUCSI, A.; GRUBER-EBER, A.; KREMMER, E.; HIDDEMANN, W.; BORNKAMM, GW. AND EICK D. (2005). 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*, 170(3): 367-378.

JENNER, L.; MELNIKOV, S.; GARREAU DE LOUBRESSE, N.; BEN-SHEM, A.; ISKAKOVA, M.; URZHUMTSEV, A.; MESKAUSKAS, A.; DINMAN, J.; YUSUPOVA, G. AND YUSUPOV, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(6): 759-767.

KONIKKAT, S. AND WOOLFORD, J. (2017). Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *The Biochemical journal*, 474(2): 195-214.

KRESSLER, D.; BANGE, G.; OGAWA, Y.; STJEPANOVIC, G.; BRADATSCH, B.; PRATTE, D.; AMLACHER, S.; STRAUß, D.; YONEDA, Y.; KATAHIRA, J.; SINNING, I. AND HURT, E. (2012). Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science*, 338(6107): 666-671.

KRUGER, N. (1994). The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols*, 9-16.

- MILES, T.; JAKOVLJEVIC, J.; HORSEY, E.; HARNPICHARNCHAI, P.; TANG, L. AND WOOLFORD, JL. JR. (2005). *Molecular and cellular biology*, 2(23): 419-432.
- MONTANARO, L.; TRERÉ, D. AND DERENZINI, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *The American Journal of Pathology*. 173(2): 301–310.
- PELTONEN, K.; COLIS, L.; LIU, H.; TRIVEDI, R.; MOUBAREK, M.; MOORE, HM.; BAI, B.; RUDEK, MA.; BIEBERICH, CJ. AND LAIHO, M. (2014). A Targeting Modality for Destruction of RNA Polymerase I that Possesses Anticancer Activity. *Cancer Cell*, 25(1): 77-90.
- PESTOV, D. G.; STREZOSKA, Z. AND LAU, L. F. (2001). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: Effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Molecular Cell Biology*, 21(13): 4246-4255.
- PETROV, AS.; BERNIER, CR.; HSIAO, C.; NORRIS, AM.; KOVACS, NA.; WATERBURY, CC.; STEPANOV, VG.; HARVEY, SC.; FOX, GE.; WARTELL, RM.; HUD, NV. AND WILLIAMS, LD. (2014). Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 111(28): 10251-10256.
- RABL, J.; LEIBUNDGUT, M.; ATAIDE, SF.; HAAG, A. AND BANG, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science.*, 331(6018): 730-736.
- ROHRMOSER, M.; HÖLZEL, M.; GRIMM, T.; MALAMOUCSI, A.; HARASIM, T.; ORBAN, M.; PFISTERER, I.; GRUBER-EBER, A.; KREMMER E. AND EICK, D. (2007). 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*, 27(10): 3682-3694.
- ROMES, E.; SOBHANY, M. AND STANLEY, R. (2016). The Crystal Structure of the Ubiquitin-like Domain of Ribosome Assembly Factor Ytm1 and Characterization of Its Interaction with the AAA-ATPase Midasin. *The Journal of biological chemistry*, 291(2): 882-893.
- SAHASRANAMAN, A.; DEMBOWSKI, J.; STRAHLER, J.; ANDREWS, P.; MADDOCK, J. AND WOOLFORD, JL. JR. (2011). Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *The EMBO journal*, 30(19): 4020-4032.
- STEITZ T. (2008). A structural understanding of dynamic ribosome machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3): 242-253.
- STREZOSKA, Z.; PESTOV, D. AND LAU, L. (2000). Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5. 8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 20(15): 5516-5528.
- STUDIER, F. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1): 207-234.
- SULTANA, A. AND LEE, J. (2015). Measuring protein-protein and protein-nucleic Acid interactions by biolayer interferometry. *Current protocols in protein science*, 79: 19.25.1-26.
- TANG, L.; SAHASRANAMAN, A.; JAKOVLJEVIC, J.; SCHLEIFMAN, E. AND WOOLFORD, J. (2008). Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-subcomplex in yeast preribosomes. *Molecular Biology of the cell*, 19(7): 2844-2856.

THOMS, M.; AHMED, Y.; MADDI, K.; HURT, E. AND SINNING, I. (2016). Concerted removal of the Erb1-Ytm1 complex in ribosome biogenesis relies on an elaborate interface. *Nucleic acids research*, 44 (2): 926-939.

VAN SLUIS, M. AND MCSTAY, B. (2014). Ribosome biogenesis: Achilles heel of cancer?. *Genes & Cancer*, 5(5-6): 152.

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 Research*, 43(22): 11017-11030.

WOOLFORD, J.L. AND BASERGA, S.J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3): 643–681.