

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

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

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

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

8. Ensayos realizados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
8.1. Plásmidos, oligonucleótidos y cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
8.2. Transformación para integración de producto de PCR en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108
8.3. Extracción de ADN genómico de levaduras y comprobación por PCR	109
8.4. Extracción de proteínas de levaduras.....	109
8.5. Purificación por afinidad en tándem (TAP).....	110
9. Experimentación en células de mamífero	112
9.1 Cultivos de células de mamífero	112
9.2. Ensayo de viabilidad celular	112
9.3. Estudios de apoptosis celular	113
9.3.1. Ensayos de activación de caspasas.....	113
9.3.2. Ensayos por citometría de flujo.....	114
9.4. Caracterización del estado celular	114
9.5. Estudios de la integridad del ADN celular.....	116
9.6. Ensayos de fluorescencia.....	117
10. Identificación de proteínas por Western Blot.....	118
10.1. Anticuerpos utilizados	118
10.2. Transferencia a membrana, bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado	119
 IV. RESULTADOS - PARTE I	 121
1. Reconstitución del complejo PeBoW de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	123
1.1. Expresión y purificación de las proteínas Erb1, Ytm1 y Nop7 de <i>Chaetomium</i> <i>thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	123
1.2. Caracterización de la interacción de Nop7/Erb1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> requeridas para la formación del complejo PeBoW ..	125

1.3. Reconstitución <i>in vitro</i> del heterotrímero Nop7/Erb1/Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130
2. Resolución estructural del complejo Nop7/Erb1/Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	133
2.1. Envoltura del complejo PeBoW por SEC-SAXS.....	134
2.2. Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (NS-TEM).....	140
2.3. Estudio de las interacciones del complejo PeBoW mediante entrecruzamiento y análisis por cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas (LC-MS/MS)	154
3. Identificación de proteínas que interaccionan con las proteínas del complejo PeBoW	158
3.1. Identificación de posibles interacciones de las proteínas Nop7 e Ytm1 mediante purificación por afinidad en tándem (TAP).....	161
3.1.1. Interacciones de Ytm1 identificados por TAP TAG.....	161
3.1.2. Interacciones de Nop7 identificados por TAP TAG	164
IV. RESULTADOS - PARTE II	171
1. Análisis de la superficie de interacción del complejo Erb1/Ytm1	173
1.1. Escaneo de alaninas <i>in silico</i>	173
1.2. Diseño de péptidos sintéticos que interfieren en la interacción entre Erb1 e Ytm1	177
2. Ensayos de competición de péptidos sintéticos	180
2.1. Análisis de la interacción directa entre las proteínas CtErb1 y CtYtm1 y los péptidos diseñados	182
3. Ensayos de caracterización de los efectos en la fisiología celular producidos tras la exposición a péptidos penetrantes	185
3.1. Ensayos de viabilidad celular y activación de caspasas.....	185
3.2. Incremento de apoptosis celular en presencia de péptidos penetrantes.....	190

3.3. Cambios fisiológicos celulares inducidos por péptidos de interferencia	192
3.4. Estudio de la integridad del ADN de células HCT-116 en presencia de péptidos de interferencia	195
3.5. Deslocalización de la nucleolina tras el tratamiento con péptidos penetrantes....	197
V. DISCUSIÓN	199
1. Estabilidad y conformación del subcomplejo Nop7 en solución	201
2. Búsqueda de nuevos puntos de intervención contra la biogénesis ribosomal	207
3. Perspectivas futuras	215
VI. CONCLUSIONES	217
VII. ANEXO I	221
VIII. ANEXO II	235
IX. BIBLIOGRAFÍA	249

Índice de Figuras

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

Figura 27. Mapa de densidad electrónica <i>ab initio</i> originado a partir de los datos procesados de SEC-SAXS mediante la herramienta DENSSWeb	138
Figura 28. Envolturas obtenidas por SEC-SAXS de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i>	139
Figura 29. Superposición del complejo <i>PeBoW</i> prerribosomal en la envoltura SAXS de <i>ScPeBoW</i>	140
Figura 30. Purificación de muestras de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i>	141
Figura 31. Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de <i>ScPeBoW</i>	143
Figura 32. Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de <i>CtPeBoW</i>	144
Figura 33. Superposición de la estructura cristalina de <i>CtEbr1_{β-propeller} /CtYtm1</i> en los volúmenes obtenidos de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> obtenidos por microscopía de tinción negativa.....	145
Figura 34. Superposición de la estructura cristalina de <i>Nop7, Erb1</i> e <i>Ytm1</i> en la envoltura promedio de <i>ScPeBoW</i> y la envoltura de la clase 1 de <i>CtPeBoW</i>	147
Figura 35. Superposición del modelo atómico de la clase promedio de <i>ScPeBoW</i> y la clase 1 de <i>CtPeBoW</i> en las envolturas de SAXS de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i>	148
Figura 36. Reconstrucción del complejo <i>CtPeBoW-MBP</i>	150
Figura 37. Flujo de trabajo para la generación de modelos tridimensionales por NS-TEM de <i>CtPeBoW-MBP</i>	151
Figura 38. Superposición de los modelos tridimensionales y los modelos atómicos de la clase promedio de <i>ScPeBoW</i> (A) y la clase 1 de <i>CtPeBoW</i> (B) en el volumen tridimensional de la clase 2 de <i>CtPeBoW-MBP</i>	152
Figura 39. Superposición del modelo tridimensional de la clase promedio de <i>ScPeBoW</i> en el volumen 3D de la clase 2 de <i>CtPeBoW-MBP</i>	153
Figura 40. Ensayo químico de entrecruzamiento de los heterotrimeros <i>CtNop7/CtErb1/CtYtm1</i> en presencia de concentraciones crecientes de agente entrecruzante sulfo-SMPB, BS ³ y AMAS	155
Figura 41. Representación de los péptidos entrecruzados en el modelo originado por tinción negativa de la clase 1 de <i>CtPeBoW</i>	156
Figura 42. Representación de los péptidos entrecruzados del heterotrimerico <i>ScErb1/ ScNop7/ ScYtm1</i> en la estructura con PDB ID: 6ELZ	157
Figura 43. Proteínas que interactúan con <i>Erb1</i> descritas en la base de datos Uniprot	158
Figura 44. Identificación de proteínas que interactúan con el complejo <i>PeBoW</i>	160
Figura 45. Purificación de cepas <i>Ytm1-TAP</i> y silvestre.....	162

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

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

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de cebadores empleados en este trabajo para preparar las diferentes construcciones	75
Tabla 2. Reacciones de PCR para la amplificación del inserto de interés con ADN polimerasas de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart y tiHybrid.....	76
Tabla 3. Protocolo de amplificación por PCR con la ADN polimerasa KAPA HiFi HotStart y tiHybrid.....	77
Tabla 4. Construcciones de las proteínas de interés utilizadas en este trabajo	80
Tabla 5. Tampones utilizados en las purificaciones de las proteínas en este trabajo	88
Tabla 6. Proteínas expresadas y purificadas a gran escala y el tipo de cromatografía usada en este estudio	89
Tabla 7. Ensayos de BLI realizados en este trabajo.....	95
Tabla 8. Características de los entrecruzadores utilizados en este trabajo.....	97
Tabla 9. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio.....	107
Tabla 10. Descripción de los plásmidos empleados para etiquetar genes en levaduras.	107
Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para la transformación de proteínas en levaduras.....	108
Tabla 12. Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia	117
Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot durante este estudio.....	118
Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot durante este estudio	118
Tabla 15. Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de <i>CtNop7/ CtErb1</i> ; <i>ScNop7/ ScErb1</i> y <i>CtErb1/ CtYtm1</i>	128
Tabla 16. Valores de la constante de afinidad, asociación, disociación y errores estadísticos calculados por BLI de <i>CtErb1₁₋₄₃₅/CtNop7</i>	129
Tabla 17. Radio de giro (Rg), distancia máxima intramolecular (Dmax) y pesos moleculares (PM) de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> teórico y experimental calculados mediante el paquete ATSAS y el servidor SAXSMoW.....	137
Tabla 18. Análisis de la superposición de las envolturas originadas tras el procesado de SAXS de <i>ScPeBoW</i> y <i>CtPeBoW</i> con los distintos modelos atómicos originados por tinción negativa....	146
Tabla 19. Mejores condiciones de entrecruzamiento de <i>CtPeBoW</i> con los entrecruzadores sulfo-SMPB, BS ³ y AMAS	154
Tabla 20. Péptidos identificados por LC-MS/MS del entrecruzamiento de <i>CtPeBoW</i> con BS ³ , AMAS y sulfo-SMPB.....	156

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