



Alteraciones en el proceso de biogénesis de la subunidad 60S ribosómica como terapia contra el cáncer

Programa de Doctorado en Biomedicina
y Biotecnología

Tesis Doctoral presentada por
Alba Iglesias Ceacero

Dirigida por **Dr. Jerónimo Bravo Sicilia**

Valencia, febrero de 2023

Durante el periodo de realización de esta tesis la autora, Alba Iglesias Ceacero, ha sido beneficiaria de una subvención para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral denominada “Ayudas Predoctorales en Oncología” (APRO), otorgada por la Junta Asociada Provincial en Valencia de la Asociación Española contra el Cáncer, correspondiente a la convocatoria de 2017. Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), bajo la dirección del Dr. Jerónimo Bravo Sicilia.

Dr. **Jerónimo Bravo Sicilia**, director de la tesis doctoral desarrollada por Dña. Alba Iglesias Ceacero y que lleva por título **Alteraciones en el proceso de biogénesis de la subunidad 60S ribosómica como terapia contra el cáncer**, desarrollada en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), dentro del programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Valencia

Apoya la solicitud de la estudiante para obtener autorización para el depósito de dicha tesis doctoral en la Universidad de Valencia.

Valencia, 8 de noviembre de 2022.

Fdo.: Jerónimo Bravo Sicilia

A mi madre
A Carlos, mi padre

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director Dr. Jerónimo Bravo por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. Mi paso por este grupo ha supuesto una gran ocasión de ampliar mis conocimientos científicos y crecer profesionalmente. Gracias Jero por tu apoyo, y muchas veces paciencia, durante todo este tiempo.

También me gustaría agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por la ayuda recibida durante mi estancia en el IBV. Mención especial a Susana por su apoyo en diversos momentos durante estos años, especialmente en la etapa final. Gracias por acercarme al mundo de los cultivos celulares que tan desconocido me resultaba al principio. A Lidia, por todo su compromiso y sus ánimos durante estos cuatro años y medio de aventura científica que hemos compartido. Muchas gracias por infundir alegría y buen humor en el día a día y especialmente en los momentos difíciles. Te deseo también mucha suerte en tu nueva etapa postdoctoral.

A Rafa, gracias por tu ayuda y tus consejos durante la última etapa de mi tesis. A Guille, gracias por los buenos momentos pasados y por sacarme una sonrisa cuando lo necesitaba.

Gracias a Mari Luz Pinci por la ayuda prestada en cuestiones burocráticas. A Malu, por sus ánimos durante la última etapa de mi andadura predoctoral. Al personal de limpieza, seguridad, mantenimiento, administración, biblioteca e informática por estar siempre dispuestos a ayudar en lo que me hacía falta. A todas las personas del centro que habéis contribuido de una u otra manera al progreso de este trabajo. Mención especial a los estructurólogos de la 3º planta por acercarme al mundo de la estructura de proteínas y ayudarme cuando lo he necesitado.

A mi madre, que me ha acompañado en este camino. Muchas gracias por tu apoyo moral durante mi estancia en Valencia, y en especial durante la etapa final de la tesis. Gracias por tus visitas a Valencia y por toda la ayuda y atención que me has prestado. Esta tesis ha sido posible gracias a ti.

Me gustaría recordar especialmente a mi padre en este momento tan importante para mí. Quisiera agradecerle los buenos tiempos pasados con él y sus continuos ánimos para que iniciara una carrera investigadora.

Este trabajo ha sido posible gracias a todos vosotros.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	1
Índice de Tablas	5
Listado de abreviaturas	7
Resumen	11
1. Introducción	13
1.1 Biogénesis ribosómica.....	15
1.1.1 Primeras etapas en el procesamiento del ARNr.....	17
1.1.2 Maduración de la subunidad 40S en eucariotas.	19
1.1.3 Maduración de la subunidad 60S en eucariotas.....	19
1.1.4 Papel de las proteínas en el ensamblaje del ribosoma eucariota.....	22
1.1.4.1 Papel de las proteínas ribosómicas en la biogénesis del ribosoma.....	22
1.1.4.2 Papel de los factores de ensamblaje en la biogénesis ribosómica.....	23
1.1.4.2.1 Factores de ensamblaje con actividad enzimática.....	24
1.1.4.2.2 Factores de ensamblaje sin actividad enzimática.....	26
1.1.4.2.3 Factores de ensamblaje de interés para este estudio.....	31
1.2. La biogénesis ribosómica como diana terapéutica contra el cáncer.....	36
1.2.1 La biogénesis ribosómica y su relación con el desarrollo tumoral.....	36
1.2.1.1 Las ribosomopatías.	37
1.2.2 La disrupción de la biogénesis ribosómica y su implicación en la activación no genotóxica de los mecanismos de apoptosis celular.....	39
1.2.2.1 Mecanismos moleculares de la respuesta de estrés ribosómico y su relación con p53.....	40
1.2.2.2 Mecanismos moleculares de respuesta al estrés ribosómico independientes de p53.....	41
1.2.3 La biogénesis ribosómica como diana terapéutica	42
1.2.4 Necesidad de diseñar nuevas estrategias quimioterapéuticas basadas en el bloqueo de la biogénesis ribosómica	46
1.3 Conclusiones.....	47

2. Objetivos	49
3. Materiales y métodos	53
3.1 Clonación de los genes de interés.....	55
3.1.1 Vectores utilizados.....	55
3.1.2 Amplificación de los genes de interés.....	55
3.1.3 Protocolo de clonación independiente de ligación.....	57
3.1.4 Transformación de la mezcla vector lineal/inserto en <i>Escherichia coli</i>	58
3.2 Expresión de las distintas construcciones de interés.....	59
3.2.1 Protocolo de expresión y purificación a pequeña escala.....	59
3.2.2 Protocolo de expresión a gran escala.....	61
3.2.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	63
3.3 Purificación a gran escala de las proteínas de interés.....	64
3.3.1 Lisis celular y preparación de extractos de proteínas.....	64
3.3.2 Cromatografía de afinidad para proteínas etiquetadas con 6xHis (IMAC).....	64
3.3.3 Cromatografía de afinidad para proteínas etiquetadas con GST.....	65
3.3.4 Cromatografía de afinidad para proteínas etiquetadas con MBP.....	65
3.3.5 Cromatografía de intercambio iónico.....	65
3.3.6 Cromatografía de exclusión molecular (EM).....	67
3.3.7 Digestión de las construcciones de interés con la proteasa PreScission.....	68
3.3.8 Concentración de proteínas purificadas.....	68
3.3.9 Cuantificación de proteínas purificadas.....	69
3.4 Ensayos funcionales y de estabilidad.....	69
3.4.1 Ensayos de fluorimetría de barrido diferencial o termofluor.....	69
3.4.2 Extracción de ARN total procedente de <i>Escherichia coli</i>	70
3.4.3 Ensayos EMSA (electrophoresis mobility shift assay).....	71
3.4.4 Ensayos enzimáticos.....	72
3.4.5 Ensayos de precipitación.....	73
3.4.6 Ensayos de interacción con ácido poliuridílico (PolyU).....	73
3.4.7 Ensayos de interferometría de biocapas (BLI).....	74
3.4.8 Western blott para identificación de proteínas.....	76
3.4.9 Cribados de cristalización.....	76

3.5	Experimentos con líneas celulares <i>in vitro</i>	80
3.5.1	Líneas celulares empleadas.....	80
3.5.2	Péptidos de interferencia y fármacos de quimioterapia.....	80
3.5.3	Ensayos de viabilidad celular.....	81
3.5.4	Ensayos de activación de caspasas.....	81
3.5.5	Ensayos de expresión de proteínas (western blot).....	82
3.5.5.1	Cultivo celular y obtención de extractos de proteína.....	82
3.5.5.2	Western blot a partir de extractos de proteína.....	82
3.6	Herramientas bioinformáticas y análisis de datos.....	83
4.	Resultados	85
4.1.	Clonación, expresión y purificación de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5.....	87
4.1.1	Clonación, expresión y purificación de ctNOC2	87
4.1.2	Generación de formas truncadas de ctNOC2	88
4.1.3	Clonación, expresión y purificación de ctNOG1	90
4.1.4	Clonación, expresión y purificación de ctMAK5 en forma truncada.....	91
4.2	Caracterización funcional y biofísica de las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis/MBP-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa).....	93
4.2.1	Determinación de la actividad enzimática de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa)	94
4.2.2	Actividad enzimática de ctNOG1.....	97
4.2.3	Determinación de la temperatura de fusión de las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa).....	97
4.2.4	Cribados de cristalización de las construcciones 6xHis-NOC2, 6xHis-NOC2 (1-771 aa), MBP/6XHis-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa).....	101
4.3	Análisis de las posibles interacciones establecidas entre los factores de ensamblaje ctNOC2, ctMAK5 y ctNOG1.....	102
4.4	Búsqueda de interacciones entre factores de ensamblaje ribosómicos que constituyan dianas relevantes para el desarrollo de péptidos de interferencia.....	103
4.5	Diseño y evaluación <i>in vitro</i> de un péptido de interferencia dirigido contra la interacción entre los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 de <i>Homo sapiens</i>	107
4.5.1	Diseño y producción del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa).....	107

4.5.2 Evaluación <i>in vitro</i> del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) empleando células tumorales humanas.....	109
4.6 Evaluación <i>in vitro</i> de las interacciones entre ctNOG1 y cteIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1.....	110
4.6.1 Clonación, sobre-expresión y purificación de ctCIC1, cteIF6 y ctHAS1	110
4.6.1.1 Clonación, sobre-expresión y purificación de ctHAS1 y su forma truncada ctHAS1 (1-320 aa).....	110
4.6.1.2 Clonación, sobre-expresión y purificación de ctCIC1.....	112
4.6.1.3 Clonación, sobre-expresión y purificación de cteIF6	113
4.6.2 Evaluación funcional de los factores de ensamblaje ctCIC1, cteIF6, ctHAS1 y ctHAS1 (1-320 aa).....	114
4.6.2.1 Evaluación de la actividad ATPasa de las construcciones MBP-HAS1 y 6xHis-HAS1 (1-320 aa).....	114
4.6.2.2 Análisis de la capacidad de ctCIC1 de interactuar con ácido ribonucleico (ARN).....	116
4.6.2.3 Evaluación de la estabilidad térmica de las construcciones 6xHis-CIC1 y 6xHis-eIF6.....	117
4.6.3 Análisis <i>in vitro</i> de las posibles interacciones establecidas entre ctNOG1 y cteIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1.....	119
4.6.3.1 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre ctNOG1 y cteIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1 mediante ensayos de precipitación.....	120
4.6.3.2 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre ctNOG1 y cteIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1 mediante ensayos de interferometría de biocapas.....	121
4.7 Diseño y evaluación <i>in vitro</i> de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre las proteínas Bop1 y WDR12 de <i>Homo sapiens</i>	122
4.7.1 Diseño de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre las proteínas Bop1 y WDR12 de <i>Homo sapiens</i>	122
4.7.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de disminuir la viabilidad de células humanas tumorales.....	126
4.7.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de promover la apoptosis celular	128
4.7.4 Estudio de los mecanismos moleculares de actuación de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs.....	130
4.7.5 Estudio del efecto combinado de los péptidos P10hsD y P11hs sobre la línea celular HCT116 p53 +/-.....	132

4.8 Combinación de los péptidos P10hsD y P11hs con fármacos de quimioterapia usados en la actualidad.....	134
4.8.1 Combinación de los péptidos P10hsD y P11hs con oxaliplatino en células tumorales humanas.....	136
4.8.2 Combinación del péptido P10hsD con ciclofosfamida en células tumorales humanas.....	140
5. Discusión.....	143
5.1 Evaluación de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 como potenciales dianas para el desarrollo de péptidos de interferencia.....	145
5.1.1 Producción y caracterización <i>in vitro</i> de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5.....	145
5.1.2 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 de <i>Chaetomium thermophilum</i>	149
5.2 Selección y evaluación de otras interacciones binarias entre factores de ensamblaje ribosómicos que constituyan potenciales dianas terapéuticas.....	152
5.3 Diseño y evaluación de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Bop1 y WDR12 en células humanas.....	158
5.3.1 Los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs causan citotoxicidad y muerte celular en células tumorales humanas	159
5.3.2 Posibles mecanismos alternativos de actuación de los péptidos P10hs y P10hsD.....	162
5.3.3 Los péptidos P10hsD y P11hs pueden actuar de modo combinado.....	164
5.3.4 Los péptidos P10hsD y P11hs pueden actuar <i>in vitro</i> en combinación con oxaliplatino.....	164
5.3.5 El péptido P10hsD es eficaz en el tratamiento <i>in vitro</i> de líneas celulares resistentes a la acción de la ciclofosfamida.....	167
5.4 Perspectivas futuras.....	169
6. Conclusiones.....	171
7. Anexo.....	175
8. Bibliografía.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura general del ADNr de levaduras.....	15
Figura 1.2: Esquema-resumen en el que se muestra el procesamiento del ARNr de levaduras desde su transcripción hasta la generación de los distintos ARNr maduros.	16
Figura 1.3: Esquema general que muestra el proceso de maduración del ribosoma eucariota.....	18
Figura 1.4: Resumen esquemático en el que se muestra el orden de asociación de los distintos factores de ensamblaje requeridos para el procesamiento de los pre-ARNr 27SA ₃ y 27SBS _s	20
Figura 1.5: Representación esquemática del proceso de maduración de la subunidad 60S.....	21
Figura 1.6: Estructura tridimensional del complejo PeBoW en el contexto del pre-ribosoma y fuera de él.....	29
Figura 1.7: Interacciones establecidas entre el complejo PeBoW y distintos factores de ensamblaje ribosómicos en el contexto de la partícula pre-60S.	30
Figura 1.8: Resumen esquemático del proceso de maduración de la subunidad pre-60S en el citoplasma.....	32
Figura 1.9: Esquema-resumen que muestra las distintas etapas del desarrollo de las ribosomopatías.....	38
Figura 1.10. Esquema-resumen que muestra las funciones extra-ribosómicas de las proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5: estabilización de p53, inhibición de las funciones de E2F1 y cMYC.....	41
Figura 1.11: Representación esquemática que muestra el mecanismo de acción de los distintos inhibidores específicos de la ARN Polimerasa I desarrollados hasta la fecha.....	44
Figura 3.1: Resumen esquemático del protocolo utilizado en los experimentos de interferometría de biocapas empleando el equipo BLItz™.....	75
Figura 4.1: Cromatografía de exclusión molecular correspondiente al proceso de purificación de la construcción 6xHis-NOC2 mediante una columna Superdex 200 Hiload 16/60.....	88
Figura 4.2: Estudio de regiones desordenadas en la proteína NOC2 de <i>Chaetomium thermophilum</i> y diseño de formas truncadas de esta proteína.....	89

Figura 4.3: Resumen del proceso de purificación de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa).....	90
Figura 4.4: Cromatografía de exclusión molecular correspondiente al proceso de purificación de las construcciones 6xHis-NOG1 y MBP-NOG1 en una columna Superdex 200 Hiload 16/60 (6xHis-NOG1) y Superdex 200 10/300 GL (MBP-NOG1).....	91
Figura 4.5: Caracterización estructural de la proteína ctMAK5 mediante herramientas bioinformáticas.....	92
Figura 4.6: Cromatografía de exclusión molecular mostrando el proceso de purificación de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) mediante una columna Superdex 200 Hiload 16/60.....	93
Figura 4.7: Evaluación de la actividad enzimática de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa).....	94
Figura 4.8: Análisis de secuencia de la proteína MAK5 (192-616 aa) de <i>Chaetomium thermophilum</i> en relación a otros miembros de la familia DEAD-box.....	96
Figura 4.9: Evaluación de la actividad enzimática de la construcción MBP-NOG1.....	97
Figura 4.10: Análisis de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) de <i>Chaetomium thermophilum</i> mediante termofluór.....	98
Figura 4.11: Análisis de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) de <i>Chaetomium thermophilum</i> mediante termofluór.....	99
Figura 4.12: Análisis de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-NOG1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> mediante termofluór.....	100
Figura 4.13: Ensayos de interacción entre ctMAK5, 6xHi-NOC2 y 6xHis-NOG1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> mediante interferometría de biocapas (BLI).....	102
Figura 4.14: Las interacciones NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1 se establecen en el pre-ribosoma de células eucariotas	106
Figura 4.15: Diseño de un péptido dirigido contra la interacción entre NOG1 y eIF6 en <i>Homo sapiens</i>	107
Figura 4.16: Proceso de purificación de la construcción GST-TAT-NOG1 (351-412 aa) mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL.....	108
Figura 4.17: Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) de alterar la viabilidad de células tumorales humanas.....	109

Figura 4.18: Proceso de purificación de la construcción MBP-HAS1 mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL.....	111
Figura 4.19: Proceso de purificación de la construcción 6xHis-HAS1 (1-320 aa) mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL.....	112
Figura 4.20: Proceso de purificación de la construcción 6xHis-CIC1 mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL.....	113
Figura 4.21: Proceso de purificación de la construcción 6xHis-eIF6 mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 Hiload 16/60.....	113
Figura 4.22: Evaluación de la actividad ATPasa de las construcciones MBP-HAS1 y 6xHis-HAS1 (1-320 aa).....	115
Figura 4.23: Análisis de la capacidad de la construcción 6xHis-CIC1 de interactuar con ácido ribonucleico.....	117
Figura 4.24: Estudio de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-eIF6 de <i>Chaetomium thermophilum</i> mediante termofluor.....	118
Figura 4.25: Estudio de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-CIC1 de <i>Chaetomium thermophilum</i> mediante termofluor.....	119
Figura 4.26: Análisis <i>in vitro</i> de las posibles interacciones establecidas entre MBP-NOG1 y 6xHis-eIF6 y entre MBP-HAS1 y 6xHis-CIC1.....	120
Figura 4.27: Análisis <i>in vitro</i> de las posibles interacciones establecidas entre 6xHis-NOG1 y cteIF6, entre 6xHis-CIC1 y MBP-HAS1 y entre 6xHis-CIC1 y ctHAS1 (1-320 aa) mediante interferometría de biocapas.....	121
Figura 4.28: Diseño de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Erb1 y Ytm1 de <i>Chaetomium thermophilum</i>	123
Figura 4.29: Alineamiento de la secuencia de Erb1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y de <i>Chaetomium thermophilum</i> y la secuencia de Bop1 de <i>Homo sapiens</i>	125
Figura 4.30: Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de disminuir la viabilidad de células humanas tumorales.....	127
Figura 4.31: Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los péptidos P10hs y P10hsD de activar la señalización mediada por caspasas en células Saos2 p53-/-.....	129
Figura 4.32: Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de activar la señalización mediada por caspasas en células HCT116 p53+/+ y p53-/-.....	130

Figura 4.33: Estudio de los mecanismos moleculares de acción del péptido P10hsD en la línea celular HCT116 p53+/+.....	131
Figura 4.34: Estudio de los mecanismos moleculares de acción de los péptidos P10hsD y P10hs en células <i>knock out</i> para p53.....	132
Figura 4.35: Evaluación del efecto combinado de los péptidos P10hsD y P11hs sobre la línea celular HCT116 p53 +/+.....	133
Figura 4.36: Evaluación del efecto citotóxico de los fármacos de quimioterapia oxaliplatino y ciclofosfamida.....	135
Figura 4.37: Evaluación del efecto combinado del oxaliplatino y los péptidos P10hsD y P11hs sobre la viabilidad celular.....	137
Figura 4.38: Evaluación del efecto combinado del péptido P10hsD y el oxaliplatino en la línea celular Saos2 p53 -/-.....	138
Figura 4.39: Evaluación de la capacidad del péptido P10hsD de disminuir la concentración de oxaliplatino necesaria para provocar citotoxicidad.....	139
Figura 4.40: Evaluación del efecto combinado del péptido P10hsD y la ciclofosfamida sobre la viabilidad de células tumorales.....	140
Figura 5.1: Mutaciones de diverso tipo afectan a la funcionalidad de p53 en el contexto de distintos tipos de tumores.....	161
Anexo 1	177
Anexo 2	178
Anexo 3	179
Anexo 4	179
Anexo 5	180
Anexo 6	181
Anexo 7	181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Tabla-resumen mostrando la composición proteica de las diferentes clases de snoRNPs.....	25
Tabla 1.2: Funcionalidad de los distintos snoRNPs en el procesamiento/modificación post-transcripcional del pre-ARNr.....	26
Tabla 3.1: Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los genes de interés.....	56
Tabla 3.2: Protocolo de PCR para la amplificación de los genes de interés.....	56
Tabla 3.3: Listado de cebadores empleados en el proceso de clonación.....	57
Tabla 3.4 Proteínas empleadas en este estudio para las distintas construcciones de interés.....	61
Tabla 3.5: Condiciones de expresión y purificación de las distintas construcciones empleadas en este estudio.....	62
Tabla 3.6: Composición de los tampones empleados en el proceso de purificación.....	66
Tabla 3.7: Composición de los tampones empleados en el cribado de termofluór.....	70
Tabla 3.8: Condiciones empleadas para los ensayos de interferometría de biocapas.....	75
Tabla 3.9: Protocolo general de ensayo de interferometría de biocapas.....	75
Tabla 3.10: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-NOC2.....	77
Tabla 3.11: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa).....	78
Tabla 3.12: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-NOG1.....	79
Tabla 3.13: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa).....	79
Tabla 3.14: Anticuerpos utilizados en los experimentos de western Blot.....	83
Tabla 4.1: Resumen de las interacciones establecidas entre factores de ensamblaje en la subunidad pre-60S.....	103
Tabla 4.2: Secuencia de los péptidos de interferencia empleados en este trabajo.....	124
Tabla 5.1: Análisis de las interacciones establecidas entre los factores de ensamblaje NOG1/GTPBP4, eIF6, HAS1 y CIC1 y diferentes especies de ARNr.....	156

LISTADO DE ABREVIATURAS**A**

Å: ángstrom (unidad de medida correspondiente a 10^{-10} metros).

Aa(s): aminoácidos(s).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNasa: enzima degradadoras de ADN.

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico.

AE: actividad enzimática.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNasa: enzima degradadora de ARN.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico.

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.

ATM: proteína Ataxia-Telangiectasia mutada (ataxia-telangiectasia mutated).

ATP: adenosín trifosfato (adenosine triphosphate).

ATPasa: enzima con capacidad de hidrólisis de ATP.

AAA ATPasa: ATPasas asociadas con actividades celulares diversas (ATPases Associated with diverse cellular Activities).

ATR: proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3 (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein).

B

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

BLI: interferometría de biocapas (Bio-layer interferometry).

BSA: albúmina de suero bovino (bovine serum albumin).

C

cADN: ADN complementario.

CHK1/2: proteína kinasa de control del ciclo celular 1/2 (Checkpoint kinase 1/2).

CPM: ciclofosfamida.

CPP: péptido de penetración celular (Cell Penetrating Peptide).

ct: *Chaetomium thermophilum*.

D

dATP: 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (2'-desoxiadenosine 5'-triphosphate).

DEPC: dietil pirocarbonato.

dNTPs: desoxi-nucleótidos triposfato (mezcla equimolar de dATP, dGTP, dCTP y dTTP).

DSF: fluorimetría de escaneo diferencial (differential scanning fluorimetry).

dTTP: 2'- desoxitimidina 5'-trifosfato (2'- desoxitimidine 5'-triphosphate).

E

EC50: concentración necesaria de un fármaco para alcanzar un 50% de efectividad (half maximal effective concentration).

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

EGTA: ácido 3,12-bis(carboximetil)-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecano-1,14-dioico, también conocido como ácido egtázico.

eIF6: factor de iniciación eucariota 6 (eukaryotic initiation factor 6).

EM: cromatografía de exclusión molecular.

EMSA: ensayo de cambio en la movilidad electroforética (Electrophoretic mobility shift assay).

ETS 1/2: espaciador transcrito externo 1/2 (external transcribed spacer 1/2).

F

FPLC: Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad (Fast Protein Liquid Chromatography).

G

GDSC: Genomics of Drug Sensitivity in Cancer.

GST: glutatión-S-transferasa.

GTP: guanosín trifosfato (guanosine triphosphate).

GTPasa: enzima con actividad de hidrólisis de GTP.

GTPBP4: proteína de unión a GTP 4 (GTP Binding Protein 4).

H

HAS1: helicase asociada a proteína SET1 (helicase associated with SET protein 1).

His: residuo de histidina.

hs: *Homo sapiens*.

HP: columna de alta eficiencia (High Performance).

I

IEX: cromatografía de intercambio iónico (Ion Exchange Chromatography).

IMAC: Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados. (Immobilized Metal Affinity Chromatography).

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.

IRBC: respuesta de estrés de biogénesis ribosomal (Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint).

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site).

ITS 1/2: espaciador transcrito interno 1/2 (Internal Transcribed Spacer 1/2).

K

kb: kilo base (1000 pares de bases en un ácido nucleico).

kDa: unidad de peso molecular en Kilo Dalton.

L

LB: medio Luria Broth.

LIC: clonación independiente de ligación (ligation-independent cloning).

LSU: subunidad grande ribosómica (Large subunit).

M

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.

MAK5: Maintenance of killer protein 5.

MBP: proteína de unión a maltosa (maltose binding protein).

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.

mg: miligramos (unidad de masa).

MMT: tampón ácido málico, MES y Tris en proporción 1:2:2.

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.

N

ngr: nanogramos (unidad de masa).

NOC1,2,3,4: proteína del complejo nucleolar 1,2,3,4 (Nucleolar complex protein 1,2,3,4).

NOG1: proteína nucleolar de unión a GTP 1 (Nucleolar GTP-binding protein 1).

NP-40: Nonoxynol-40 (detergente para la solubilización de membranas).

NPS: solución de nitrógeno, azufre y fósforo (nitrogen, sulfur and phosphorous solution).

O

OD₆₀₀: densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.

OXA: oxaliplatino.

P

pb: pares de bases (nucleótidos) en un fragmento de ácido nucleico (ADN o ARN).

PBS: solución de fosfato salina (phosphate buffer solution).

PET: túnel de salida polipeptídico (Peptidyl Exit Tunnel).

PDB: Protein Data Bank.

Pi: fosfato inorgánico.

PolyU: ácido poliuridílico.

R

RIPA: tampón de ensayo de radio inmunoprecipitación (Radioimmunoprecipitation assay).

ROS: especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species).

RPL: proteína ribosómica de la subunidad mayor (Ribosomal protein of the large subunit).

rpm: revoluciones por minuto.

RPS: proteína ribosómica de la subunidad menor (Ribosomal protein of the small subunit).

S

S: unidad de medida del coeficiente de sedimentación de una partícula (Svedberg).

SD: desviación estándar (Standard Deviation).

SDS: dodecil sulfato sódico (sodium dodecyl sulphate).

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico).

snoARN: ácido ribonucleico pequeño nucleolar (small nucleolar Ribonucleic Acid).

snoRNP: ribonucleoproteína pequeña nucleolar (small nucleolar Ribonucleoprotein).

SP: sefarosa (Seph \bar{a} rose).

SPG: tampón succinato, fosfato, glicina (Succinate, phosphate, glycine).

SSU: subunidad ribosómica pequeña (small subunit).

T

TAP TAG: técnica de purificación en tándem por afinidad de complejos multiproteicos (tándem affinity purification).

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine.

T \bar{m} : temperatura de fusión (temperatura de melting).

Tris: 2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol. Este compuesto también se conoce con el nombre de tris(hidroximetil)aminometano. De esta última denominación se deriva la abreviatura Tris.

U

U: unidades internacionales de actividad enzimática. Se define 1U como la actividad catalítica necesaria para transformar 1 μ mol de sustrato por minuto.

Z

ZY: medio N-Z-amina suplementado con extracto de levadura (yeast extract).

Resumen

Los ribosomas son las estructuras subcelulares encargadas de llevar a cabo la síntesis proteica. La biogénesis ribosómica es un proceso muy complejo que comienza con la transcripción del ARN ribosómico por la ARN polimerasa I en el nucléolo. Este transcrito inicial sufre un largo procesamiento que implica su plegamiento y asociación con las distintas proteínas ribosómicas. Además, el proceso de biogénesis requiere de la participación de un grupo heterogéneo de proteínas denominadas factores de ensamblaje ribosómicos. Se trata de proteínas que ejercen un papel esencial en el proceso de biogénesis ribosómica pero no forman parte del ribosoma maduro. Muchas de estas proteínas establecen interacciones binarias que son esenciales para su correcto funcionamiento. Las células cancerosas deben mantener una elevada tasa de biogénesis ribosómica a fin de proliferar con mayor rapidez que las células sanas. Por esta razón la biogénesis ribosómica constituye una importante diana terapéutica para el desarrollo de fármacos antitumorales. Ya han sido desarrollados fármacos basados en la inhibición específica de la ARN polimerasa I. Sin embargo, el uso de estos fármacos presenta inconvenientes tales como el desarrollo de resistencias o su carácter genotóxico.

Una estrategia novedosa en este campo es el uso de péptidos de interferencia dirigidos contra interacciones específicas entre factores de ensamblaje. El grupo dirigido por el Dr. Bravo ha desarrollado un conjunto de péptidos capaces de bloquear la interacción entre los factores de ensamblaje Erb1 y Ytm1. Estos péptidos se derivan de la secuencia de Erb1 en su zona de interacción con Ytm1. En este trabajo hemos ampliado estos resultados preliminares mediante experimentos *in vitro* empleando células tumorales humanas. Hemos empleado formas equivalentes de los péptidos de interés derivadas de la secuencia de Bop1, la proteína homóloga de Erb1 en humanos.

Estos péptidos actúan *in vitro* provocando citotoxicidad y apoptosis en células tumorales humanas. Estos efectos son independientes a la expresión de p53. Se sugiere así que los péptidos desarrollados podrían ser utilizados en el tratamiento de tumores en los que p53 se encuentre mutado, lo cual es un fenómeno frecuente en oncología. Los péptidos desarrollados pueden ser combinados *in vitro* con oxaliplatino, un fármaco quimioterapéutico. Esta estrategia permite disminuir la concentración de oxaliplatino necesaria para alcanzar un efecto citotóxico sobre las células tumorales, lo cual contribuiría a disminuir los efectos secundarios asociados al uso de oxaliplatino en la clínica. Además, estos péptidos podrían resultar eficaces en contextos de quimio resistencia.

Por último, en este trabajo hemos evaluado otras interacciones entre diferentes factores de ensamblaje como posibles dianas para el desarrollo de péptidos de interferencia. En concreto, hemos estudiado la interacción entre los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5; así como la interacción entre NOG1 y eIF6. En conjunto, nuestros resultados muestran el potencial de la biogénesis ribosómica como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos tratamientos antitumorales.

1. Introducción.

1.1 Biogénesis ribosómica.

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos encargados de llevar a cabo la síntesis de proteínas a partir del ARN mensajero (Woolford y Baserga 2013) (Fernández-Pevida, Kressler, y de la Cruz 2015). Los ribosomas son estructuras presentes tanto en células procariotas como eucariotas y están compuestos por diversas proteínas (denominadas proteínas ribosómicas o r-proteínas) y diversas especies de ácido ribonucleico ribosómico (ARNr).

Los ribosomas de células eucariotas se denominan 80S (nombre derivado de su coeficiente de sedimentación en Svedberg) y están constituidos por una subunidad mayor denominada 60S o LSU (siglas de Large Ribosomal Subunit) y otra subunidad menor denominada 40S o SSU (siglas de Small Ribosomal Subunit). Históricamente, el organismo modelo para el estudio de la biogénesis ribosómica ha sido *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan), por lo que la mayor parte de la información de que se dispone en relación a la estructura y biogénesis de los ribosomas se refiere a este organismo. En levaduras, la subunidad 60S se compone de tres especies de ARNr (25S; 5.8S y 5S) y 46 proteínas ribosómicas (denominadas RPLs por Ribosomal Proteins of the Large subunit), mientras que la subunidad 40S se compone del ARNr 18S y 33 proteínas ribosómicas (denominadas RPS, por Ribosomal Proteins of the Small subunit) (Woolford y Baserga 2013). En el resto de organismo eucariotas la estructura del ribosoma es la misma con la salvedad de que la subunidad 60S posee 47 proteínas ribosómicas en lugar de 46 (Kressler, Hurt, y Baßler 2017).

La biogénesis de los ribosomas es un proceso esencial para asegurar la viabilidad celular y supone un enorme gasto energético para la célula. Defectos cuantitativos o cualitativos en este proceso se relacionan con el proceso de transformación oncogénica, así como con el desarrollo de un conjunto de enfermedades denominadas ribosomopatías (Bustelo y Dosil 2018) (Catez et al. 2019).

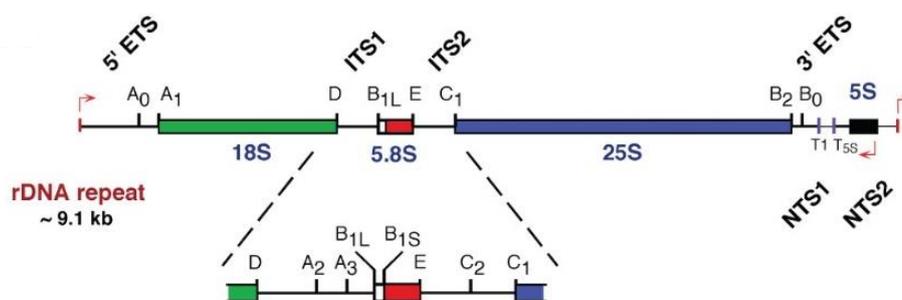


Figura 1.1: Estructura general del ADNr de levaduras. Se muestran los distintos puntos de corte endo y exonucleolíticos necesarios para su posterior procesamiento. Tomado de Fernández-Pevida et al. 2015.

El proceso de biogénesis ribosómica es muy complejo y en el intervienen tres compartimentos celulares distintos (nucléolo, nucleoplasma y citoplasma) e implica la participación de las tres ARN polimerasas presentes en las células eucariotas (ARN polimerasas I, II y III) (Woolford y Baserga 2013). Además de las proteínas ribosómicas ya mencionadas, en el proceso de biogénesis ribosómica interviene un conjunto de más de 200 proteínas denominadas factores de ensamblaje ribosómicos. Se trata de proteínas que no forman parte de la estructura final de los ribosomas, pero intervienen en su proceso de maduración (Woolford y Baserga 2013) (Kressler et al. 2017). La mayoría de estas proteínas son esenciales para garantizar la viabilidad celular. Sin embargo, se trata de un conjunto muy heterogéneo de proteínas en cuanto a su estructura y funcionalidad. Algunas poseen actividad enzimática (ATPasas, GTPasas, kinasas, etc), mientras que otras ejercen su papel favoreciendo la

remodelación estructural del pre-ARNr, de modo que éste pueda ser correctamente procesado por otros factores de ensamblaje o se permita la unión de proteínas ribosómicas (Woolford y Baserga 2013) (Kressler, Hurt, y Baßler 2010).

Como ya se ha mencionado, la biogénesis del ribosoma eucariota es un proceso que ha sido ampliamente estudiado en las últimas décadas usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo. Estos estudios han permitido obtener abundante información acerca del proceso de biogénesis ribosómica y de las estructuras intermedias (pre-ribosomas) que se generan durante su desarrollo (Woolford y Baserga 2013) (Kressler et al. 2017) (Baßler y Hurt 2019).

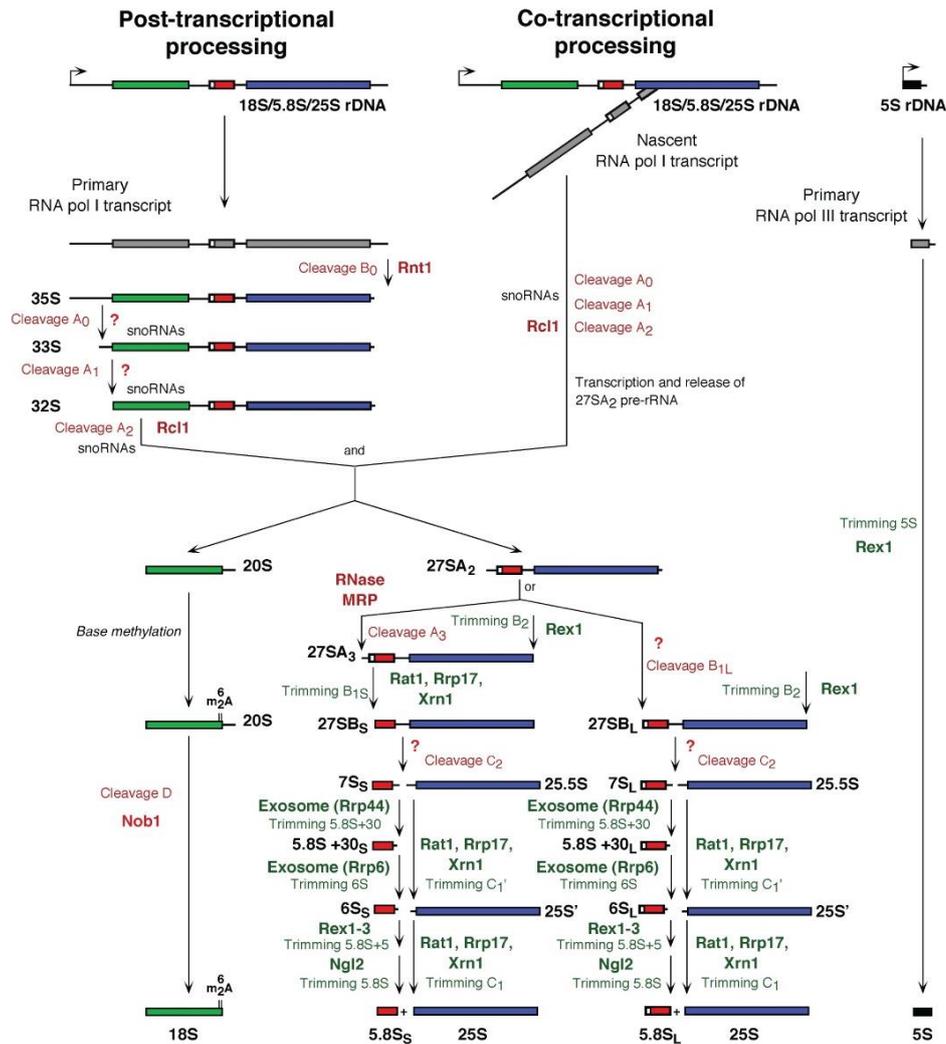


Figura 1.2: Esquema-resumen en el que se muestra el procesamiento del ARNr de levaduras desde su transcripción hasta la generación de los distintos ARNr maduros. Las primeras etapas de este procesamiento pueden producirse de modo co-transcripcional o post-transcripcional. Tomado de Fernández-Pevida et al. 2015.

El ADN que codifica para las distintas especies de ARN ribosómico (denominado ADN ribosómico o ADNr) se localiza en el nucléolo. Este ADNr es transcrito por la ARN polimerasa I, generando un largo fragmento de ARN que contiene las especies de ARNr 18S; 5,8S y 25S. Como se muestra en la Figura 1.1, este ARNr es un precursor (denominado en adelante pre-ARNr) que debe ser sometido a un complejo procesamiento para generar las formas maduras de los distintos ARNr (resumido en

la Figura 1.2). Este procesamiento incluye una serie de digestiones endo y exonucleolíticas a fin de eliminar las regiones situadas entre los distintos ARNr maduros (regiones ITS1 e ITS2, por InTernal Transcribed Spacer), así como las regiones que los flanquean (5`ETS y 3`ETS, por External Transcribed Spacer) (Woolford y Baserga 2013) (Fernández-Pevida et al. 2015).

Por otro lado, en el nucléolo actúa también la ARN polimerasa III transcribiendo el ARNr 5S a partir de la misma región del ADN (Figura 1.1). Por último, la ARN polimerasa II es la encargada de transcribir los genes correspondientes a las distintas proteínas ribosómicas y factores de ensamblaje implicados en la biogénesis ribosómica. Los ARN mensajeros producidos son transportados al citoplasma para su traducción. Las proteínas así generadas son importadas de nuevo al núcleo donde cumplen la función que les corresponde en el proceso de biogénesis ribosómica. La ARN polimerasa II también es la encargada de transcribir los genes que codifican para los snoARNs implicados en el proceso de biogénesis ribosómica (Baßler y Hurt 2019).

1.1.1 Primeras etapas en el procesamiento del ARNr.

Como se muestra en la Figura 1.2, los pre-ARNr generados a partir de las polimerasas I y III se procesan de forma paralela e independiente (Fernández-Pevida et al. 2015). El pre-ARNr derivado de la polimerasa I (18S/5,8S/25S) es el que requiere un procesamiento más largo y complejo. Este procesamiento implica cortes endo y exonucleolíticos, modificación post-traduccional del ARNr (2'-O-metilación y pseudouridilación), plegamiento del ARNr y asociación con las proteínas ribosómicas. Las primeras etapas de este procesamiento se producen co-transcripcionalmente en la mayoría de los casos, aunque también se pueden dar de manera post-transcripcional (Woolford y Baserga 2013) (Fernández-Pevida et al. 2015) (Kressler et al. 2017).

Este proceso comienza con el corte endonucleolítico en el sitio B₀ catalizado por la endonucleasa Rnt1 (Kufel, Dichtl, y Tollervey 1999). Esta digestión se produce de modo co-transcripcional (Fernández-Pevida et al. 2015). Con esta digestión se genera el pre-ARNr 35S (Figura 1.2). Los siguientes pasos incluyen los cortes endonucleolíticos en los sitios A₀ y A₁ para generar los pre-ARNr 33S y 32S respectivamente. Con estas dos digestiones se elimina el segmento 5`ETS que precede al ARNr 18S (Figura 1.2). Estos cortes pueden producirse de modo co o post-transcripcional, aunque lo más frecuente es que se produzcan de modo co-transcripcional (Veinot-Drebot, Singer, y Johnston 1988). Ambas digestiones se producen casi simultáneamente, aunque se ha determinado que el corte en A₀ es dispensable. El sitio A₁ constituye el extremo 5` definitivo del ARNr 18S (Fernández-Pevida et al. 2015).

Una vez eliminado el segmento 5`ETS, el siguiente paso es el corte en el punto A₂, situado en la región ITS1 que separa los ARNr 18S y 5,8S. Se trata de un momento clave en el proceso de biogénesis ribosómica, puesto que a partir de este punto las subunidades pre-60S y pre-40S madurarán de modo independiente. Al igual que sucede con la región 5`ETS, esta digestión endonucleolítica se produce de modo co-transcripcional en la mayoría de los casos (Koř y Tollervey 2010). Tras el corte en A₂ se generan las especies de pre-ARNr 20S y 27SA₂, que son procesadas de manera independiente (Figura 1.2). Hasta la fecha no se conocen con exactitud las nucleasas encargadas de escindir el pre-ARNr en los sitios A₀, A₁ y A₂. Se ha sugerido que la proteína Utp24 podría ser responsable de los cortes en A₁ y/o A₂ (Bleichert et al. 2006). Por otro lado se ha postulado que la proteína Rcl1 podría ser la responsable del corte en A₂ (Horn, Mason, y Karbstein 2011).

A nivel macromolecular, la biogénesis del ribosoma implica la formación de una serie de estructuras intermedias denominadas pre-ribosomas, compuestas por diversas proteínas (factores de ensamblaje y proteínas ribosómicas) y especies distintas de pre-ARNr en distintos estadios de maduración. Se trata de formas transitorias que van cambiando su estructura y composición a medida que avanza el proceso de maduración. La primera estructura pre-ribosómica que se forma es la partícula 90S (Figura 1.3). Tras producirse la escisión endonucleolítica en el sitio A₂, la partícula 90S queda dividida en las partículas 66S y 43S, precursoras de las subunidades 60S y 40S, respectivamente. Estos dos precursores maduran de modo independiente en el núcleo y son posteriormente translocados al citoplasma (Woolford y Baserga 2013). Puesto que el corte endonucleolítico en A₂ se produce de modo mayoritariamente co-transcripcional, la partícula 90S está mayoritariamente constituida por la región 5' del pre-ARNr 35S (regiones 5'ETS y 18S) a la que se asocian diversas proteínas ribosómicas y factores de ensamblaje implicados en la maduración de la subunidad 40S (Kressler et al. 2017).

Tras su exportación a través del poro nuclear, las subunidades pre-40S y pre-60S terminan su proceso de maduración en el citoplasma. Esta última etapa madurativa implica la finalización del procesamiento de las distintas especies de pre-ARNr (procesamiento de 5,8S_S/S_L y de 18S, descrito más adelante), la liberación de los últimos factores de ensamblaje y la asociación de las últimas proteínas ribosómicas. En el citoplasma, la subunidad 60S se somete a un proceso de control de calidad que asegura su correcto ensamblaje (integridad del sitio P de unión de los ARNt) antes de unirse a la subunidad pre-40S (Woolford y Baserga 2013). Para completar su maduración, la subunidad pre-40S forma un complejo con la subunidad 60S ya madura. Como se menciona más adelante, este complejo es esencial para catalizar el paso del pre-ARNr 20S a su forma madura 18S (Turowski et al. 2014). La formación de este complejo también podría servir para testar el correcto ensamblaje de la subunidad 40S (Woolford y Baserga 2013).

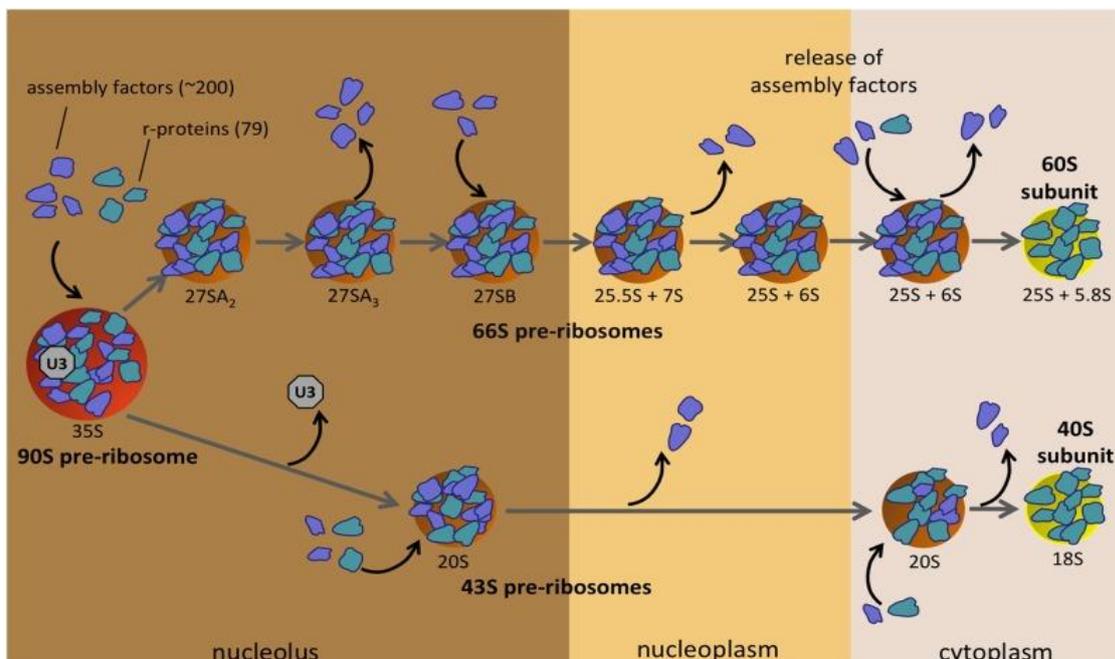


Figura 1.3: Esquema general que muestra el proceso de maduración del ribosoma eucariota. Tras la escisión endonucleolítica en A₂, las subunidades pre-60S (66S) y pre-40S (43S) maduran de manera paralela e independiente. Tomado de Woolford y Baserga, 2013.

1.1.2 Maduración de la subunidad 40S en eucariotas.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, tras el corte endonucleolítico en el sitio A₂, se genera el pre-ARNr 20S. Este pre-ARNr viaja al citoplasma asociado a las partículas pre-40S. La última etapa de maduración consiste en el corte endonucleolítico en el sitio D, catalizado por la endonucleasa Nob1, que supone la conversión del pre-ARNr 20S en el ARNr 18S definitivo (Fatica et al. 2003) (Fernández-Pevida et al. 2015). Para que se produzca este último corte es necesaria la asociación de la subunidad pre-40S con la subunidad 60S ya madura, así como la participación del factor de ensamblaje Rio1 (Turowski et al. 2014).

1.1.3 Maduración de la subunidad 60S en eucariotas.

Tras el corte endonucleolítico en A₂, el proceso de maduración de la subunidad 60S se subdivide en dos vías que transcurren de modo paralelo e independiente (Figura 1.2). Ambas vías finalizan con la formación del ARNr 25S, mientras que el ARNr 5,8S presenta dos variantes distintas denominadas 5,8S_S (vía de procesamiento principal) y 5,8S_L (vía de procesamiento minoritaria). Estas dos especies de ARNr difieren respectivamente en la ausencia o presencia en su extremo 5' de una secuencia de 6 nucleótidos (Fernández-Pevida et al. 2015) (Woolford y Baserga 2013). Ambas formas del ARNr 5,8S son funcionales y se encuentran en la estructura final de los ribosomas. La significación de estas dos vías alternativas es desconocida hasta la fecha. A medida que se producen las distintas etapas del procesamiento, la partícula pre-60S transita del nucléolo al nucleoplasma, y del nucleoplasma, a través del poro nuclear, al citoplasma, donde tienen lugar las últimas etapas de su maduración y su asociación final con la subunidad 40S (consúltese Figura 1.3) (Woolford y Baserga 2013).

La vía principal de procesamiento se produce en el 85% de los transcritos y comienza con el corte endonucleolítico en el sitio A₃, catalizado por la ribonucleasa MRP de manera post-transcripcional (Fernández-Pevida et al. 2015). Dos factores de ensamblaje, Rrp5 y Dbp3 han sido también relacionados con la escisión del sitio A₃ (Weaver, Sun, y Chang 1997) (Lebaron et al. 2013) (Fernández-Pevida et al. 2015). Posteriormente se produce la transformación del pre-ARNr 27SA₃ en 27SB_S, gracias a la acción de las exonucleasas Rat1, Rrp17 y Xrn1, que catalizan la degradación exonucleolítica 5'-3' entre los sitios A₃ y B_S, generando así el extremo 5' definitivo del ARNr 5,8S_S (Fernández-Pevida et al. 2015).

Adicionalmente, esta digestión exonucleolítica requiere de la participación de una serie de factores de ensamblaje que se unen al pre-ARNr de forma jerárquica y en muchos casos interdependiente (Sahasranaman et al. 2011) (Dembowski, Kuo, y Woolford 2013) (Woolford y Baserga 2013).

En primer lugar se unen los factores del subcomplejo Pwp1, que posibilitan la unión de un conjunto de factores de ensamblaje denominados `factores A₃'. Este grupo de 6 factores está formado por las proteínas Nop7, Ytm1, Erb1, Rlp7, Nop15 y Cic1/Nsa3, cuya unión al pre-ARNr es interdependiente (Sahasranaman et al. 2011). La proteína Rrp1 también se considera parte de este subconjunto de proteínas, pero a diferencia del resto se asocia al pre-ARNr de forma independiente. Este conjunto de proteínas se une al pre-ARNr mucho antes de que su acción tenga lugar (ya están presentes en el pre-ARNr 27SA₂) (Sahasranaman et al. 2011), y presentan sitios de interacción situados en la región ITS2, el extremo 3' de 5,8S y el extremo 5' de 25S (Granneman, Petfalski, y Tollervey 2011).

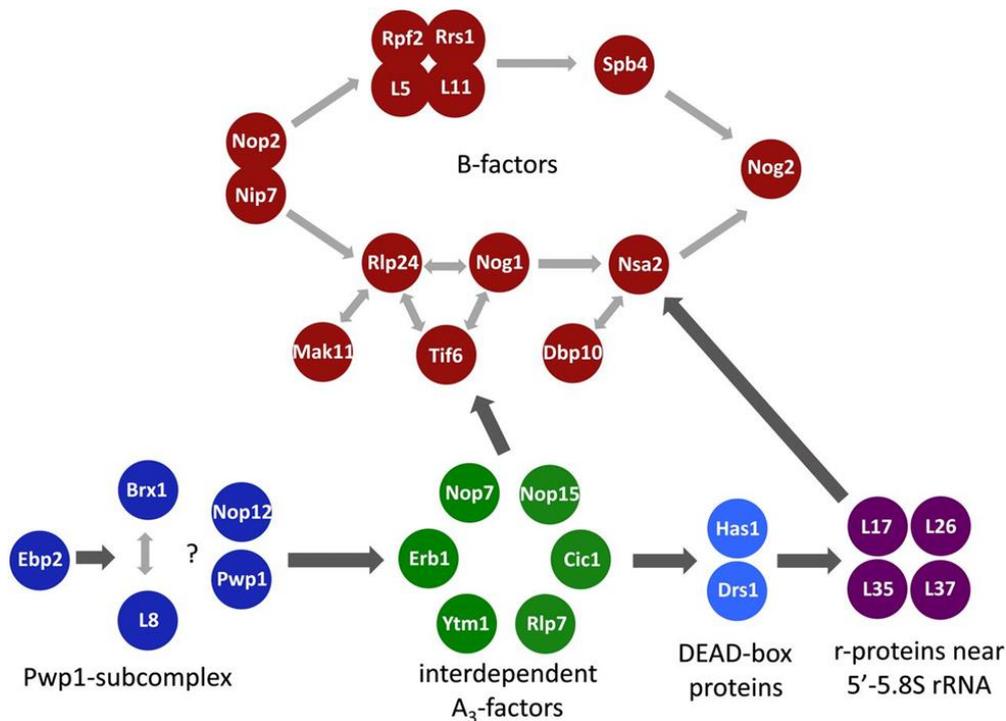


Figura 1.4: Resumen esquemático en el que se muestra el orden de asociación de los distintos factores de ensamblaje requeridos para el procesamiento de los pre-ARNr 27SA₃ y 27SB₅. Tomado de Woolford y Baserga 2013.

Algunas de estas proteínas se organizan en subcomplejos, como es el caso del subcomplejo formado por Nop7, Erb1 y Ytm1, denominado complejo PeBoW (Miles et al. 2005). La unión de los factores A₃ al pre-ARNr permite a su vez la asociación de HAS1 y DRS1 (Woolford y Baserga 2013) (Dembowski et al. 2013). HAS1 y DRS1 son helicasas con actividad ATPasa pertenecientes a la familia 'DEAD-box'. Como se verá más adelante, HAS1 participa también en el procesamiento de la subunidad pre-40S (Dembowski et al. 2013). La asociación de HAS1 y DRS1 al pre-ARNr posibilita por último la asociación de las proteínas ribosómicas L17, L26, L35 y L37 (Woolford y Baserga 2013). Según la última nomenclatura disponible (Ban et al. 2014), estas proteínas ribosómicas se corresponden con uL22, uL24, uL29 y eL37 respectivamente. Evidencias experimentales sugieren que la proteína L17/uL22 actuaría bloqueando el avance del proceso de degradación exonucleolítica catalizado por Rat1, Xrn1 y Rrp17 más allá del punto B_s. En ausencia de los factores A₃, L17/uL22 no puede unirse al pre-ARNr 27SA₃ y ello se traduce en la degradación exonucleolítica del pre-ARNr completo a cargo de Rat1, Xrn1 y Rrp17. Estas tres enzimas, por tanto, pueden jugar un papel bien en el procesamiento del pre-ARNr o bien en su degradación, según las circunstancias (Sahasranaman et al. 2011). La Figura 1.4 muestra un esquema-resumen de los distintos factores de ensamblaje necesarios para el paso del pre-ARNr 27SA₃ a 27SB₅, así como el paso de 27SB₅ a 25,5S y 7S. Esta última transición requiere de la participación de los llamados 'factores B'.

Los factores A₃, junto con las proteínas ribosómicas L17/uL22, L26/uL24, L35/uL29 y L37/eL37 podrían jugar un papel en la maduración del pre-ARNr en etapas posteriores al procesamiento de 27SA₃, concretamente favoreciendo el procesamiento de 27SB₅ para formar las especies 25,5S y 7S. Éste conjunto de proteínas contribuyen al correcto plegamiento de las secuencias 5,8S_s y 25S del ARNr, junto con la región ITS2 situada entre ambas. Tras la disociación de los factores A₃ coincidiendo con la salida de la subunidad pre-60S del nucléolo (véase Figura 1.5), las proteínas

ribosómicas L17/uL22, L26/uL24, L35/uL29 y L37/eL37 se encargarían de mantener el correcto plegamiento de los ARNr 5,8S_S y 25S, favoreciendo así la posterior maduración del pre-ARNr (Sahasranaman et al. 2011) (Granneman et al. 2011).

La vía de procesamiento minoritaria se produce en un 15% de los transcritos (Woolford y Baserga 2013) (Fernández-Pevida et al. 2015) e implica la transformación directa del pre-ARNr 27SA₂ en 27SB_L gracias a un corte endonucleolítico en el sitio B_{IL}, generándose así el extremo 5' maduro del ARNr 5,8S_L. A partir de este punto, ambas vías de procesamiento transcurren de manera idéntica (Figura 1.2). Al igual que sucede con el corte en el sitio A₃, el corte en el sitio B_{IL} se produce de manera post-transcripcional (Fernández-Pevida et al. 2015).

Casi de manera simultánea al procesamiento en el sitio B_{IL} o B_{IS}, se produce la degradación exonucleolítica de la región 3'ETS entre los sitios B₀ y B₂, con lo que se completa el procesamiento del extremo 3' de ARN 25S. Se ha postulado que este proceso de degradación es producido por la exonucleasa Rex1, aunque esta hipótesis aún no ha sido confirmada experimentalmente mediante el uso de mutantes delecionados para el gen REX1 (Fernández-Pevida et al. 2015).

El procesamiento de la región ITS2 es el último paso para la separación completa de los tres ARNr codificados por la secuencia 35S (18S; 5,8S y 25/28S). El primer paso para ello es el corte endonucleolítico en el sitio C₂. Para ello se requiere la unión de un conjunto de factores de ensamblaje denominados `factores B´. Se trata de un conjunto de 14 proteínas con funciones variadas (proteínas de unión a ARN, helicasas, GTPasas, proteínas estructurales, metiltransferasas), pero ninguna de ellas tiene actividad nucleasa. La endonucleasa encargada de producir el corte en C₂ es actualmente desconocida (Fernández-Pevida et al. 2015). Al igual que sucede con el procesamiento de 27SA₃, los factores B se unen de manera jerárquica a través de dos rutas de reclutamiento paralelas que convergen en la incorporación de NOG2, una GTPasa que juega un papel esencial en el corte en el sitio C₂ y el procesamiento posterior del fragmento 7S generado. Cuatro de los factores B presentan actividad NTPasa, lo que sugiere que este conjunto de proteínas estarían implicadas en la remodelación estructural del pre-ARNr 27SB (Talkish et al. 2012). Muchos de estos factores se unen a la partícula pre-60S en etapas tempranas, mientras que NSA2 y NOG2 son los últimos en unirse, y lo hacen cuando el pre-ARNr 27SB ya está formado (Talkish et al. 2012) (Gamalinda et al. 2013). La unión de NSA2 y NOG2 a la partícula pre-60S es dependiente de la asociación previa de las proteínas ribosómicas L17/uL22, L35/uL29 y L37/eL37. De este modo, se postula que estas tres proteínas ribosómicas están implicadas en el procesamiento de ambas regiones intergénicas (ITS1 e ITS2). Su papel en estos procesos sería el de promover cambios estructurales en el pre-ARNr que faciliten su procesamiento (Fernández-Pevida et al. 2015) (Gamalinda et al. 2013).

Una vez separados los pre-ARNr 25,5S y 7S_S/S_L tras el corte endonucleolítico en C₂, se produce su maduración hasta formar las especies definitivas de ARNr 25S y 5,8S_S/S_L. Las enzimas exonucleolíticas Rat1, Xrn1 y Rrp17 son las encargadas de degradar el extremo 5' del ARNr 25,5S hasta producir el ARNr 25S definitivo (Woolford y Baserga 2013) (Fernández-Pevida et al. 2015). Por otro lado, el pre-ARNr 7S_S/S_L es procesado en su extremo 3' hasta formar el ARNr 5,8S_S/S_L. Este procesamiento sigue un camino complejo que consta de cuatro etapas sucesivas. Las dos primeras se producen en el nucleoplasma e implican la participación del exosoma, un complejo multiproteico formado por nueve proteínas distintas. La acción exonucleolítica, sin embargo, no depende del exosoma sino de las exonucleasas Rrp44 y Rrp6 (Fernández-Pevida et al. 2015). Las dos últimas etapas se producen en el citoplasma y están catalizadas por las exonucleasas Rex1, 2 y 3; y por la nucleasa Ngl2, respectivamente. Se desconoce si Ngl2 actúa como endo o exonucleasa (Fernández-Pevida et al. 2015).

El ARNr 5S es transcrito a partir del ADNr nucleolar por la ARN polimerasa III. Su proceso de maduración es mucho más sencillo que el del resto de especies de ARNr e implica únicamente una etapa de procesamiento exonucleolítico en su extremo 3'. Esta reacción es catalizada por la enzima Rex1 y constituye una etapa no esencial en el procesamiento ribosómico. En ausencia de Rex1, el ARNr 5S con una extensión en su extremo 3' es capaz de incorporarse a la subunidad 60S (van Hoof 2000) (Fernández-Pevida et al. 2015). El ARNr 5S maduro se asocia con las proteínas ribosómicas L5/uL18 y L11/uL5 para formar un complejo ribonucleoproteico. Este complejo se asocia con la subunidad pre-60S durante su etapa de maduración nucleolar (Kressler et al. 2012) (Kressler et al. 2017).

1.1.4 Papel de las proteínas en el ensamblaje del ribosoma eucariota.

Las proteínas que participan en el ensamblaje de los ribosomas se pueden dividir en dos grupos. Las proteínas ribosómicas son aquellas que forman parte de la estructura madura de los ribosomas. Por otro lado, los factores de ensamblaje o factores de biogénesis ribosómica constituyen un conjunto de proteínas que intervienen en la biogénesis del ribosoma (y en consecuencia aparecen unidas a las partículas pre-ribosómicas), pero no forman parte de la estructura final de los ribosomas. Ambos grupos de proteínas tienen importantes funciones en la biogénesis y posterior funcionamiento de los ribosomas (de la Cruz, Karbstein, y Woolford 2015) (Kressler et al. 2017).

1.1.4.1 Papel de las proteínas ribosómicas en la biogénesis del ribosoma.

Los ribosomas eucariotas contienen 80 proteínas ribosómicas (79 en el caso de levaduras) (Kressler et al. 2017). Se ha determinado que 64 de las 79 proteínas ribosómicas de levaduras son esenciales para la supervivencia celular (Woolford y Baserga 2013). Diversas mutaciones en estas proteínas se relacionan con el desarrollo de un conjunto de enfermedades denominadas ribosomopatías, caracterizadas por diversos defectos en el ensamblaje y función de los ribosomas (véase apartado 1.2.1.1). Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy variadas, y en muchos casos implican una mayor susceptibilidad al desarrollo de distintos tipos de cáncer (Venturi y Montanaro 2020).

Las proteínas ribosómicas, junto con los factores de ensamblaje, juegan un importante papel en la biogénesis de los ribosomas, concretamente actúan promoviendo el correcto plegamiento del ARNr al que se unen. La unión de las proteínas ribosómicas al pre-ARNr se produce de manera jerárquica y cooperativa (la unión de ciertas proteínas ribosómicas 'tempranas' facilita la unión de otras proteínas ribosómicas 'tardías') (de la Cruz et al. 2015). Las proteínas ribosómicas de unión más temprana están implicadas en las primeras etapas de maduración de la subunidad correspondiente, mientras que las que se unen tardíamente están implicadas en las etapas tardías. Esta unión jerárquica viene determinada por la región del ribosoma maduro que ocupe cada proteína ribosómica. Por ejemplo, las proteínas ribosómicas que se unen a la región 5' ETS del pre-ARNr 35S están implicadas en la maduración temprana de la subunidad 40S, mientras que las que se unen al extremo 3' del pre-ARNr 20S están implicadas en la maduración tardía de esta subunidad (Woolford y Baserga 2013) (de la Cruz et al. 2015).

1.1.4.2 Papel de los factores de ensamblaje en la biogénesis ribosómica.

Como ya se ha mencionado, los factores de ensamblaje son un grupo muy heterogéneo de proteínas a nivel funcional y estructural (Kressler, Hurt, y Baßler 2010) (Woolford y Baserga 2013). Algunas de estas proteínas poseen una actividad enzimática reconocida (ATPasas, GTPasas, kinasas, fosfatasa, helicasas) mientras que otras carecen de actividad enzimática. Cada factor de ensamblaje ejerce su función en una etapa específica del proceso de biogénesis ribosómica. La inmensa mayoría restringen su actividad a una de las dos subunidades del ribosoma eucariota (40S o 60S). Por lo tanto, cada subunidad requiere de la participación de un conjunto específico de factores de ensamblaje para su maduración (Woolford y Baserga 2013) (Klinge y Woolford 2019). Sin embargo, existen tres factores de ensamblaje (HAS1, Rrp5 y Prp43) que están implicados en la biogénesis de ambas subunidades (Dembowski et al. 2013). Puesto que este trabajo está enfocado sobre el proceso de biogénesis de la subunidad 60S, en los siguientes apartados nos centraremos en los factores de ensamblaje implicados en la biogénesis de esta subunidad. La Figura 1.5 resume de manera esquemática el orden de entrada y salida de los distintos factores de ensamblaje implicados en el proceso de maduración de la subunidad 60S.

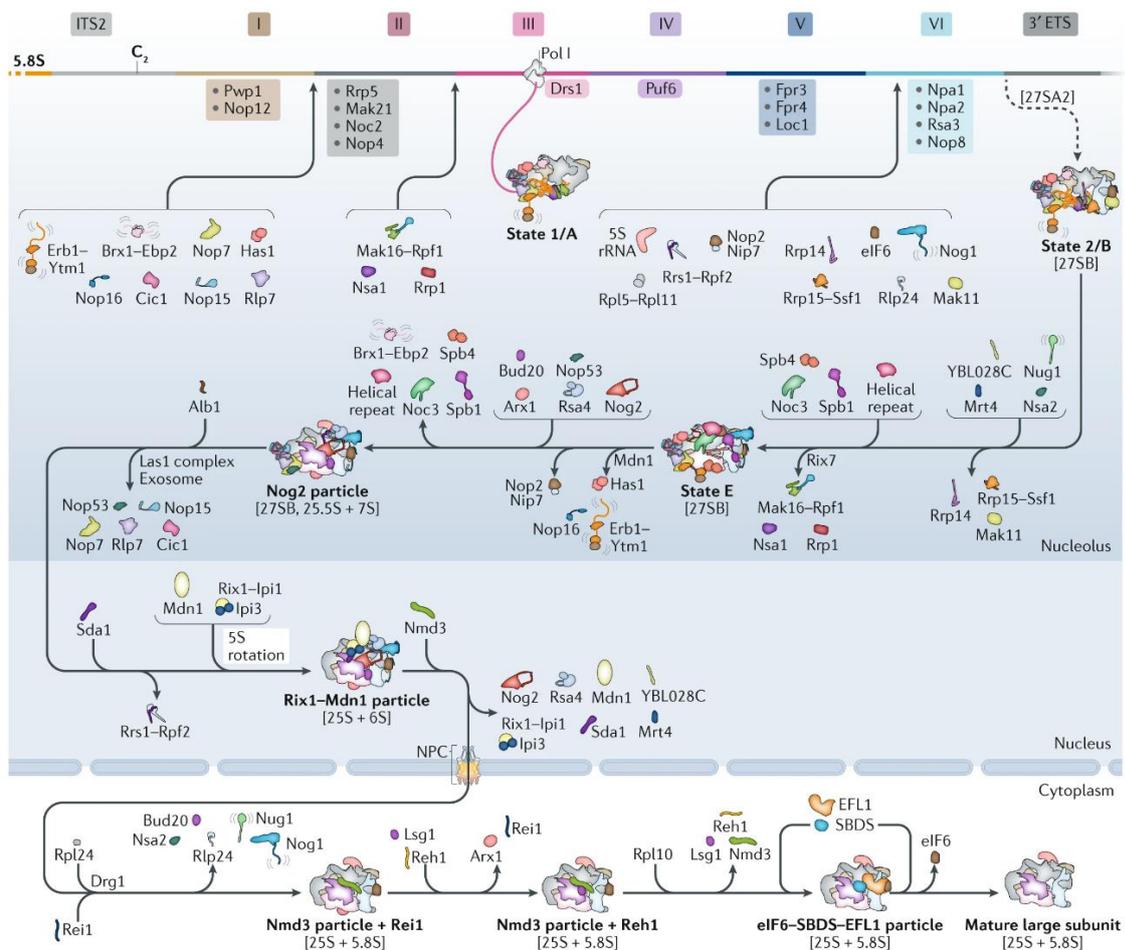


Figura 1.5. Representación esquemática del proceso de maduración de la subunidad 60S. Se indican los momentos de entrada y salida de los distintos factores de ensamblaje que se unen a distintas regiones del pre-ARNr (representado en la parte superior). A medida que progresa su maduración, la subunidad pre-60S va transitando entre el nucleólo, el nucleoplasma y el citoplasma. Tomado de Klinge y Woolford, 2019.

1.1.4.2.1 Factores de ensamblaje con actividad enzimática.

- **Endonucleasas y exonucleasas.** Estas enzimas son las encargadas de catalizar los distintos cortes endo y exonucleolíticos necesarios para el procesamiento del pre-ARNr hasta formar los distintos ARNr maduros. Las más destacadas dentro de este grupo son las enzimas Rat1, Xrn1 y Rrp17, exonucleasas encargadas de catalizar el paso de 27SA₃ a 27SB_S (Sahasranaman et al. 2011). Estas tres enzimas también están implicadas en el procesamiento del pre-ARNr 25,5S para dar lugar al ARNr 25S (Woolford y Baserga 2013) (Fernández-Pevida et al. 2015).
- **Familia de las DExD/H-box ATPasas.** Dentro de esta denominación se engloban las familias DEAD-box, DEAH-box, DExD-box y DExH-box, pertenecientes a la superfamilia SF2 de helicasas (Cordin et al. 2006). Estas enzimas se caracterizan por la presencia de 8 motivos de secuencia entre los que destaca el motivo Walker B (o motivo DEAD/DEAH/DExD/DExH según la familia específica) del que se deriva su nomenclatura. En el contexto de la biogénesis ribosómica, son enzimas que utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para catalizar la remodelación de la estructura del pre-ARNr, lo cual implica cambios en las interacciones ARN:ARN o ARN: proteína. Estos cambios a menudo implican la escisión o incorporación de distintos factores de ensamblaje. Se han descrito hasta la fecha siete DExD/H-box ATPasas implicadas en el procesamiento de la subunidad 40S, diez DExD/H-box ATPasas implicadas en el procesamiento de la subunidad 60S, y dos DExD/H-box ATPasas implicadas en la maduración de ambas subunidades (Kressler et al. 2010). Dentro de esta familia cabe destacar las enzimas HAS1 (implicada en la biogénesis de ambas subunidades 40S y 60S) y MAK5 (implicada en la maduración de la subunidad 60S) de las que se hablará más adelante.
- **Enzimas pertenecientes a la familia de las AAA-ATPasas.** Se trata de un grupo de enzimas perteneciente a la familia de las P-loop NTPasas (Prattes et al. 2019). Estas enzimas se caracterizan por la presencia de un dominio AAA (siglas de ATPases asociated with diverse cellular activities) en el que reside la actividad catalítica y que les permite actuar como 'máquinas moleculares' catalizando la remodelación de diversos complejos macromoleculares, incluyendo el pre-ribosoma (Erzberger y Berger 2006) (Prattes et al. 2019). Tres enzimas pertenecientes a esta familia, Rix7, Rea1/Mdn1 y Drg1 están implicadas en la biogénesis de la subunidad 60S (Prattes et al. 2019). Cada una de estas enzimas utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para catalizar la escisión de factores de ensamblaje específicos. Concretamente, la enzima Rea1, actúa en dos etapas diferentes de la maduración de la subunidad 60S. En el nucléolo cataliza la escisión de los ya mencionados factores de ensamblaje Erb1 y Ytm1, implicados en el procesamiento del pre-ARNr 27SA₃ (apartado 1.1.3). Este paso se considera un prerrequisito para que la partícula pre-60S pueda pasar del nucléolo al nucleoplasma. En el nucleoplasma, Rea1 cataliza la escisión del factor de ensamblaje Rsa4. Por su parte, la enzima Rix7 cataliza en el nucléolo la escisión de la proteína Nsa1, implicada en la maduración temprana de la subunidad pre-60S. Por último, la enzima Drg1 actúa en las últimas etapas de maduración de la subunidad pre-60S, catalizando en el citoplasma la escisión de la proteína Rlp24 (Prattes et al. 2019).
- **Enzimas con actividad GTPasa.** Las GTPasas son una superfamilia de proteínas caracterizada por la presencia de un dominio G, constituido por 5 motivos de secuencia denominados G1-G5 (Kressler et al. 2010). Esta superfamilia se subdivide en diversas familias cuyos miembros están implicados en una gran variedad de procesos celulares (Leipe et al. 2002). Se han descrito 6 GTPasas implicadas en la maduración ribosómica, 5 de ellas implicadas en la maduración de la subunidad

60S: NOG1, NOG2, NUG1, Efl1 y Lsg1; mientras que una está implicada en la maduración de la subunidad 40S (Bms1) (Kressler et al. 2010). Como ya se ha mencionado (véase apartado 1.1.3), NOG1 y NOG2 forman parte del grupo de los factores B, implicados en el procesamiento del pre-ARNr 27SB (Woolford y Baserga 2013) (Talkish et al. 2012). NUG1 está implicada en el reclutamiento de la helicasa Dbp10 durante las etapas tempranas de maduración de la subunidad 60S (Manikas et al. 2016). Las GTPasas Efl1 y Lsg1 participan en las últimas etapas de maduración citoplasmática de la subunidad 60S (Kressler et al. 2010). Por último, la GTPasa Bms1 está implicada en el reclutamiento de Rcl1 a la partícula 90S, lo cual constituye un prerrequisito para la incorporación del snoARN U3 (Kressler et al. 2010).

- **Enzimas modificadoras del ARNr:** se trata de complejos ribonucleoproteicos pequeños del nucléolo (snoRNPs, por small nucleolar Ribonucleoproteins) formados por un fragmento de ARN, denominado snoARN (small nucleolar Ribonucleic Acid) y varias proteínas. Estos complejos son los encargados de catalizar las reacciones de modificación post-transcripcional del pre-ARNr (Watkins y Bohnsack 2012). Se ha estipulado que estas reacciones tienen lugar durante las etapas iniciales de la maduración ribosómica, a medida que el pre-ARNr es transcrito (Baßler y Hurt 2019). Por esta razón, los snoRNPs se relacionan fundamentalmente con el procesamiento de la subunidad 40S.

Existen dos tipos de snoRNPs en levaduras, nombrados en función de las secuencias conservadas de los snoARNs que los componen (Woolford y Baserga 2013) (Watkins y Bohnsack 2012). Los pertenecientes a la clase `box C/D` están implicados en catalizar la metilación (2'-O-ribosa metilación) del pre-ARNr, mientras que los pertenecientes a la clase `box H/ACA` están implicados en catalizar la pseudouridilación del pre-ARNr. Cada uno de estos dos tipos de snoRNPs se compone de distintas proteínas, una de las cuales es responsable de la actividad enzimática, mientras que el resto intervienen en la unión del complejo al ARN. El snoARN actúa hibridando con la secuencia del pre-ARNr que va a ser modificada por la correspondiente enzima. La composición proteica de las dos clases de snoRNPs se resume en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Tabla-resumen mostrando la composición proteica de las diferentes clases de snoRNPs.*

Función de la proteína	Box C/D	Box H/ACA
Enzima de modificación	Fibrilarina/Nop1	Cbf5
Unión al ARN	Snu13	Nhp2
	Nop56	Nop10
	Nop58	Gar1

*Tabla adaptada de Woolford y Baserga, 2013.

Hasta la fecha se han descrito más de 80 snoRNPs implicados en la biogénesis del ribosoma eucariota (Baßler y Hurt 2019). Algunos de estos snoRNPs están implicados en el procesamiento del pre-ARNr pero no en la modificación de nucleótidos, mientras que otros están implicados en ambos procesos (Tabla 1.2). Los snoRNPs U3, U14, snR10 y snR30 intervienen en la maduración de la subunidad

40S. Por otro lado, el complejo MRP actúa catalizando el corte en el sitio A₃, como parte del procesamiento de la subunidad 60S (Woolford y Baserga 2013).

Tabla 1.2: Funcionalidad de los distintos snoRNPs en el procesamiento/modificación post-transcripcional del pre-ARNr.*

snoARN	Clase	¿Esencial?	Función
U3	Box C/D	Sí	Procesamiento
U14	Box C/D	Sí	Procesamiento y 2'-O-metilación
snR30	Box H/ACA	Sí	Procesamiento
snR10	Box H/ACA	No	Procesamiento y pseudouridilación
ARNasa MRP	Única	Sí, pero no para procesamiento	Procesamiento

*Tabla adaptada de Woolford y Baserga, 2013.

1.1.4.2.2 Factores de ensamblaje sin actividad enzimática.

Muchos factores de ensamblaje carecen de una actividad enzimática reconocida. Estos factores actúan promoviendo la remodelación estructural de la partícula pre-ribosómica. Muchos de estos factores se organizan en sub-complejos que se unen al pre-ribosoma de manera jerárquica y cooperativa. Su unión provoca los cambios estructurales necesarios para la unión/escisión de otros factores de ensamblaje o la unión de proteínas ribosómicas. A continuación se detallan algunos de los subcomplejos que participan en la biogénesis de la subunidad 60S del ribosoma y que son de interés en este trabajo:

- **Complejo PeBoW:** se trata de un complejo heterotrimérico formado por las proteínas Nop7, Erb1 y Ytm1 en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan) (Miles et al. 2005) y sus homólogos Pes1, Bop1 y WDR12 respectivamente en células de mamífero (Hölzel et al. 2005:12). En levaduras recibe el nombre de subcomplejo Nop7, mientras que en humanos se denomina complejo PeBoW. En adelante se hará referencia a este complejo como complejo PeBoW. Las tres proteínas que componen este complejo están altamente conservadas desde levaduras a humanos (Hölzel et al. 2005:12) (Tang et al. 2008).

El complejo PeBoW ejerce un papel esencial en la biogénesis de la subunidad 60S tanto en levaduras como en células de mamífero (Miles et al. 2005) (Rohrmoser et al. 2007). Como ya se ha mencionado (véase apartado 1.1.3), estas tres proteínas forman parte del grupo de los factores A₃, implicados en el procesamiento del pre-ARNr 27SA₃ para dar lugar al pre-ARNr 27SB₅ (Woolford y Baserga 2013) (Granneman et al. 2011). La incorporación de estas tres proteínas a la partícula pre-60S es

interdependiente, tal y como sucede con el resto de los factores A₃ (Tang et al. 2008) (Sahasranaman et al. 2011).

Una particularidad del complejo PeBoW es que se presenta como heterotrímero tanto en el contexto del pre-ribosoma como fuera de él (Miles et al. 2005). Es posible reconstruir *in vitro* el complejo a partir de sus componentes individuales Nop7, Erb1 y Ytm1 procedentes de levaduras o de *Chaetomium thermophilum* (Wegrecki, M (2015). Structural, biophysical and functional characterization of Nop7-Erb1-Ytm1 complex and its implications in eukaryotic ribosome biogenesis [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia) (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia).

Las proteínas Erb1 y Ytm1 se caracterizan por la presencia de un dominio β-propeller en su extremo carboxi-terminal. En ambos casos, este dominio está compuesto por siete aspas organizadas en torno a un eje central (Figura 1.6C). Cada una de estas aspas está constituida por un motivo WD40 formado por 4 láminas β antiparalelas (Marcin, Neira, y Bravo 2015) (Wegrecki et al. 2015). El dominio β-propeller, cuya unidad básica estructural es el motivo WD40, está ampliamente representado en células eucariotas. El motivo WD40 se denomina así por la presencia de un dipéptido conservado Trp-Asp en su secuencia. Se considera que este dominio actúa como plataforma facilitando interacciones entre proteínas implicadas en una gran variedad de procesos celulares (Stirnemann et al. 2010) (Chen, Chan, y Wang 2011).

Los primeros estudios del complejo PeBoW en levaduras revelaron que Erb1 ocupa una posición central en el mismo, estableciendo interacciones con Ytm1 y Nop7 (Tang et al. 2008). El grupo dirigido por el Dr. Bravo ha logrado la resolución estructural mediante difracción de rayos X del heterodímero formado por Ytm1 y el dominio β-propeller de Erb1 usando el hongo termófilo *Chaetomium thermophilum* como modelo experimental (Figura 1.6B).

En esta estructura se muestra que ambas proteínas interactúan entre sí a través de sus respectivos dominios β-propeller. El establecimiento de esta interacción fue confirmado mediante distintas técnicas experimentales *in vitro* (Wegrecki et al. 2015). Actualmente se dispone de la estructura tridimensional del complejo PeBoW en el contexto de la subunidad pre-60S de levaduras (Kater et al. 2017).

Esta información estructural ha permitido confirmar el modo de interacción de Erb1 y Ytm1 a través de sus dominios β-propeller. Por otro lado, Erb1 presenta un largo dominio amino-terminal desplegado a través del cual interactúa con Nop7 en el contexto del pre-ribosoma (Figura 1.6A). Esta región amino-terminal comprende en levaduras los aminoácidos 1-426, mientras que la región carboxi-terminal que contiene el dominio β-propeller comprende los aminoácidos 427-807 (Marcin et al. 2015). En *Chaetomium thermophilum*, la región amino-terminal comprende los aminoácidos 1-431, y el dominio β-propeller comprende los aminoácidos 432-801 (véase PDB ID: 5CXB).

Mediante experimentos *in vitro* usando las proteínas de *Chaetomium thermophilum* se ha establecido a su vez que el dominio β-propeller de Erb1 es capaz de interactuar con ARN, lo cual podría contribuir a la unión del complejo PeBoW al pre-ARNr (Marcin, Neira, y Bravo 2015). La región amino-terminal extendida de Erb1 le permite establecer interacciones con diversos factores de ensamblaje pre-ribosómicos (Nop16, HAS1, Spb1, Brx1, Ebp2, NOC3) (Figura 1.7) (Kater et al. 2017). En este trabajo, sin embargo, nos centraremos en la interacción establecida entre Ytm1 y Erb1.

En su extremo amino-terminal Ytm1 presenta un dominio tipo ubiquitina (Ubiquitin-like domain o UBL) que no participa en su interacción con Erb1 (Figura 1.6B). En *Chaetomium thermophilum*, dicho dominio ocupa los primeros 97 residuos de la secuencia, mientras que los aminoácidos 98-495 forman el dominio β -propeller (véase PDB ID: 5CXB).

Los componentes del complejo PeBoW aparecen ya asociados al pre-ribosoma en sus primeras etapas de maduración (Sahasranaman et al. 2011). Este complejo es escindido de la subunidad pre-60S por la AAA-ATPasa Rea1 al final de la etapa de maduración nucleolar (Baßler et al. 2010) (Prattes et al. 2019). Sin embargo, las últimas revisiones sobre el proceso de maduración ribosómica apuntan la posibilidad de que el heterodímero Erb1/Ytm1 se una a la partícula pre-60S de manera independiente de Nop7 (Figura 1.5). Esta hipótesis supondría la incorporación y escisión por separado del heterodímero Erb1/Ytm1 y de Nop7 a la partícula pre-60S (Klinge y Woolford 2019).

Los dominios β -propeller de ambas proteínas Erb1 y Ytm1 interactúan entre sí con gran afinidad en *Chaetomium thermophilum*, y esta interacción puede ser debilitada mediante la introducción de una mutación puntual en Erb1 (Wegrecki et al. 2015). Estudios previos en levaduras han establecido la importancia de la interacción entre Erb1 y Ytm1 para la incorporación del complejo PeBoW al pre-ribosoma, la correcta maduración de la subunidad 60S y su exportación al citoplasma. La introducción de mutaciones puntuales en Erb1 o Ytm1 que debiliten la interacción entre ambos factores de ensamblaje se traduce en defectos en la incorporación del complejo PeBoW al pre-ribosoma que a su vez dan lugar a un defecto global en la maduración de la subunidad 60S (Miles et al. 2005) (Wegrecki et al. 2015).

El grupo dirigido por el Dr. Jerónimo Bravo ha diseñado recientemente una serie de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Erb1 y Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* (Orea-Ordóñez, Masiá, y Bravo 2021). El diseño de estos péptidos se basa en la información estructural relativa a la interacción entre Erb1 y Ytm1 a través de sus dominios β -propeller en este organismo (Wegrecki et al. 2015). Estos péptidos se corresponden con distintas secuencias de Erb1 o Ytm1 que se encuentran en la zona de interacción entre ambas proteínas.

El uso de péptidos de interferencia ha ganado una creciente importancia en los últimos años como estrategia para disrupir interacciones proteína-proteína que sean relevantes para el desarrollo de distintas patologías (Wójcik y Berlicki 2016), razón por la que esta estrategia fue seleccionada en el caso de la interacción Erb1/Ytm1. El objetivo final es provocar el bloqueo selectivo de la biogénesis ribosómica y la consecuente activación de los mecanismos celulares de apoptosis celular (ver apartado 1.2.2 de la Introducción).

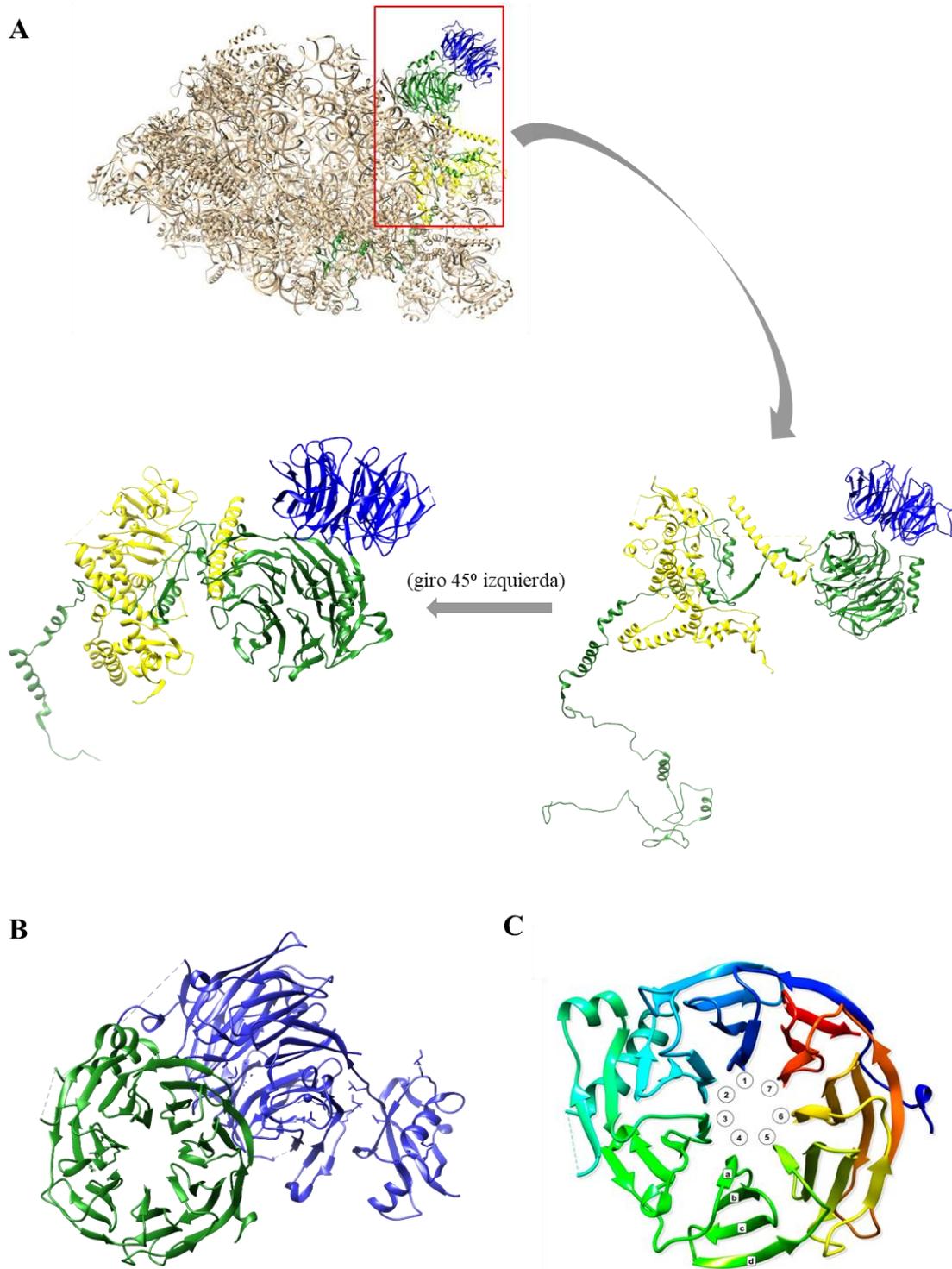


Figura 1.6: Estructura tridimensional del complejo PeBoW en el contexto del pre-ribosoma y fuera de él. A. Estructura del complejo PeBoW formado por las proteínas Nop7 (amarillo), Erb1 (verde) y Ytm1 (azul) en el contexto del pre-ribosoma de levaduras. (PDB ID: 6ELZ). El resto de proteínas ribosómicas y factores de ensamblaje presentes en la estructura, así como el pre-ARNr se muestran en gris. Se muestra en detalle la interacción entre Ytm1 y la región carboxi-terminal de Erb1. **B.** Estructura del heterodímero formado por Ytm1 (azul) y la región carboxi-terminal de Erb1 (verde, aminoácidos 432-801) en *Chaetomium thermophilum* (PDB ID: 5CXB). **C.** Estructura del dominio β -propeller de Erb1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestran los motivos WD40 numerados del 1 al 7 en sentido antihorario. Tomado de Marcin, Neira, y Bravo 2015.

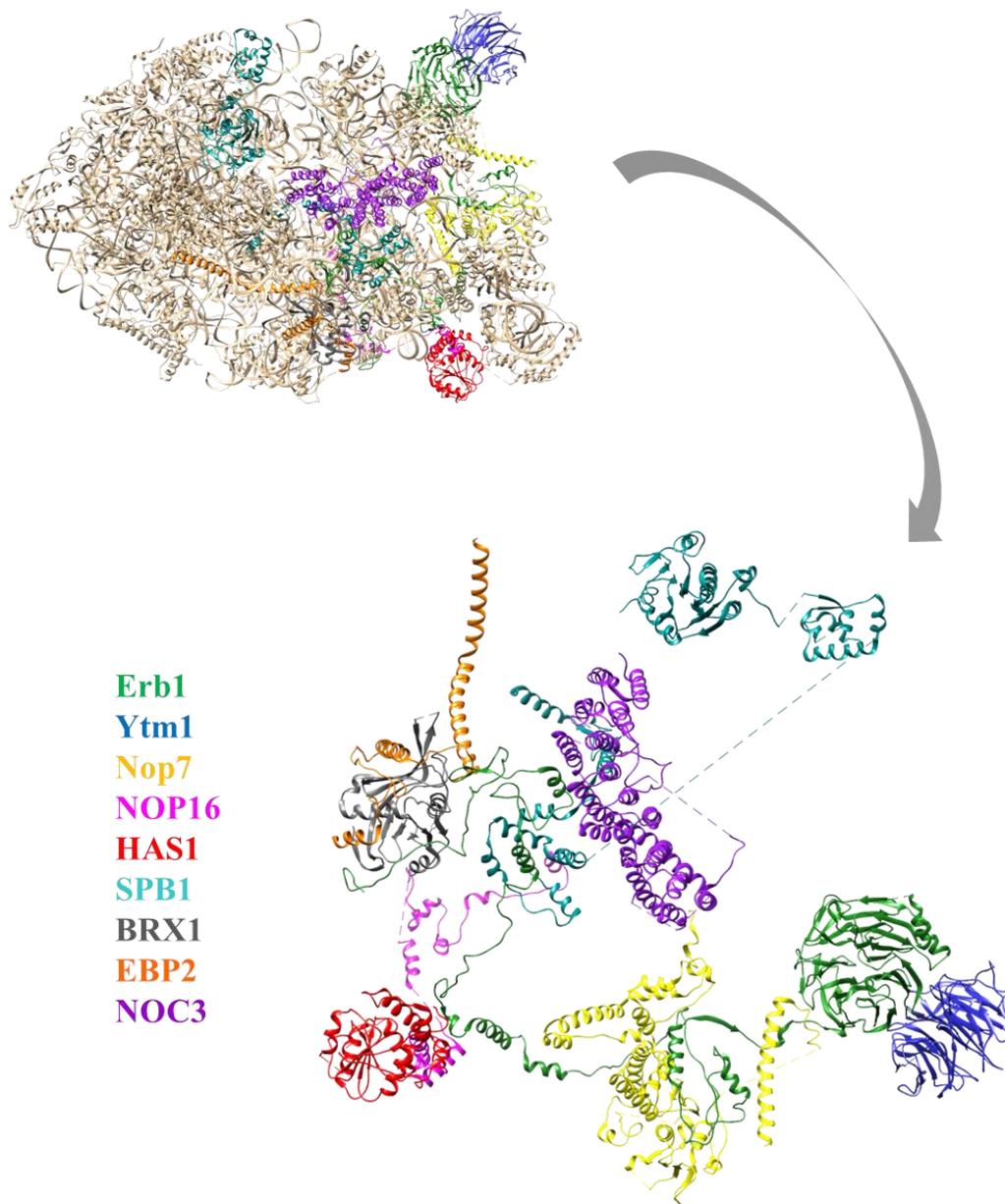


Figura 1.7: Interacciones establecidas entre el complejo PeBoW y distintos factores de ensamblaje ribosómicos en el contexto de la partícula pre-60S. Estructura del complejo PeBoW (Ytm1 en azul, Erb1 en verde, Nop7 en amarillo) en el contexto del pre-ribosoma de levaduras (PDB ID: 6ELZ) (arriba). Se muestra la red de interacciones que establece Erb1 en el contexto de la biogénesis ribosómica (abajo).

- **Complejos formados por las proteínas NOC:** se trata de un grupo de cuatro proteínas denominadas NOC1-4p (siglas de Nucleolar Organizing Complex associated protein). Las proteínas NOC1, NOC3 y NOC4 comparten un dominio conservado de 45 aminoácidos ausente en NOC2, denominado dominio NOC (Milkereit et al. 2001). Mediante herramientas de predicción bioinformática, se ha postulado que todos los miembros de esta familia presentarían similitud estructural con las proteínas que contienen motivos HEAT/Armadillo. Este motivo estructural es

característico de proteínas implicadas en procesos de transporte intracelular, lo que subraya la posible implicación de los factores de ensamblaje NOC1-4 en estos procesos (Dlakić y Tollervey 2004).

Las proteínas NOC1, NOC2 y NOC3 fueron descritas por primera vez por Milkereit y colaboradores en el año 2001 como un grupo de proteínas implicadas en el transporte de la subunidad pre-60S entre el nucléolo, el nucleoplasma y el citoplasma (Milkereit et al. 2001). En este primer estudio se postuló la organización de estas proteínas en dos complejos. El complejo NOC1-NOC2 está enriquecido en los pre-ribosomas 90S y 66S, mientras que el complejo NOC2-NOC3 aparece enriquecido exclusivamente en los pre-ribosomas 66S. En este primer estudio se postuló que el complejo NOC1-NOC2 estaría implicado en el transporte de la subunidad pre-60S entre el nucléolo y el nucleoplasma, mientras que el complejo NOC2-NOC3 estaría implicado en el transporte entre el nucleoplasma y el citoplasma (Milkereit et al. 2001).

Recientemente se ha establecido que el complejo NOC1-NOC2 juega un importante papel en la regulación del corte endonucleolítico en el sitio A₂. Estas dos proteínas se unen al dominio I del ARNr 25S de modo co-transcripcional. El complejo NOC1-NOC2 interacciona a su vez con el factor de ensamblaje Rrp5. La unión de estas tres proteínas provoca un cambio de conformación en la proteína Rrp5, permitiéndose el corte en A₂ y la consiguiente separación de las subunidades pre-40S y pre-60S (Khoshnevis et al. 2019). Ambos factores de ensamblaje, por tanto, se unen a la subunidad pre-60S en las etapas más tempranas de su maduración, mientras que la incorporación de NOC3 es más tardía (Figura 1.5).

Por otro lado, la proteína NOC4, formando un subcomplejo con NOP14, está implicada en la maduración de la subunidad pre-40S y su exportación al citoplasma (Milkereit et al. 2003) (Kühn et al. 2009).

1.1.4.2.3 Factores de ensamblaje de interés para este estudio.

En este apartado se describen las características de una serie de factores de ensamblaje relevantes para el presente estudio.

- **NOG1:** esta proteína pertenece a la familia Obg de GTPasas (Leipe et al. 2002). Esta proteína fue descrita por primera vez en el año 2000 en un escaneo para identificar proteínas que interaccionasen con la proteína nucleolar NOPP44/46 de *Trypanosoma brucei* (Park et al. 2001). Se determinó que NOG1 de *Trypanosoma brucei* posee homólogos en una gran variedad de organismos eucariotas, incluyendo *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. La estructura de este factor de ensamblaje incluye un dominio G compuesto de los 5 motivos G1-G5 que caracterizan a todas las GTPasas (Leipe et al. 2002). Cuenta además con una larga extensión carboxi-terminal desestructurada.

Los primeros estudios demostraron que la proteína NOG1 de *Saccharomyces cerevisiae* interacciona con la subunidad pre-60S y es esencial para su correcta maduración. Sin embargo, la unión de GTP/GDP al dominio G no afecta a la capacidad de NOG1 de unirse al pre-60S, aunque sí afecta a su función en la maduración de la subunidad 60S (Fuentes et al. 2007). Aunque en un principio se consideró a NOG1 una proteína exclusivamente nucleolar (Park et al. 2001) (Saveanu et al. 2003) (Fuentes et al. 2007), más adelante se determinó que NOG1 se asocia a la partícula pre-60S en el

nucléolo y viaja unida a ella hasta el citoplasma, donde se disocia y es transportada de vuelta al núcleo para participar en la maduración de otras subunidades pre-60S (Pertschy et al. 2007) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020) (Figura 1.5). Como se ha mencionado en el apartado 1.1.3, NOG1 forma parte de los llamados `factores B`, implicados en promover el corte endonucleolítico en C₂ (Talkish et al. 2012) (Woolford y Baserga 2013).

NOG1 forma un complejo con la proteína Rlp24. Se ha postulado que su disociación en el citoplasma de la subunidad 60S inmadura depende de la actividad de la AAA-ATPasa Drg1 (que provoca la disociación de Rlp24) así como de la integridad de su propio dominio G (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). Una vez asociado a la subunidad pre-60S, NOG1 interacciona con numerosos factores de ensamblaje, entre los que se encuentran Rlp24, eIF6, Arx1, Mtr4 y Nsa2. NOG1 participa en la maduración del túnel de salida polipeptídico introduciendo en el mismo su largo extremo carboxi-terminal (Wilson et al. 2020) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020).

La disociación de NOG1 del pre-ribosoma está implicada directamente en la maduración de la región `stalk` (implicada en la iniciación de la traducción) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). En la Figura 1.8 se muestra un resumen esquemático del proceso de maduración de la subunidad 60S en el citoplasma y el papel que NOG1 ejerce en dicho proceso.

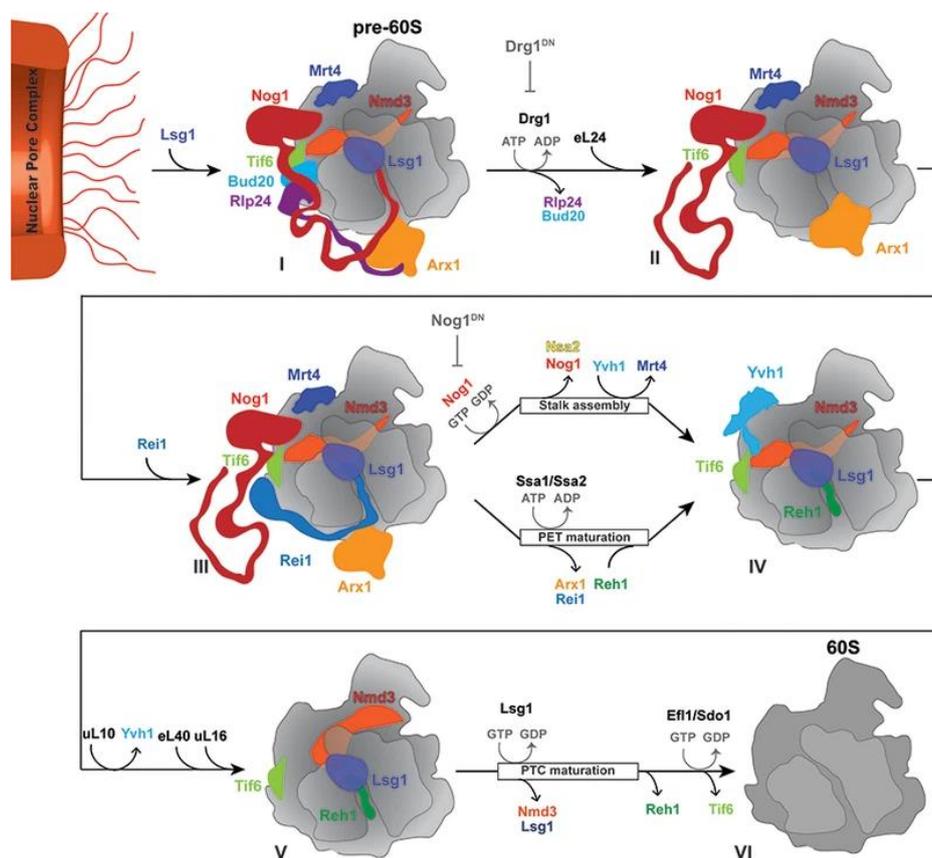


Figura 1.8: Resumen esquemático del proceso de maduración de la subunidad pre-60S en el citoplasma. La escisión de NOG1 está directamente implicada en la maduración de la región `stalk`, pero no es esencial para la maduración del túnel de salida polipeptídico (PET). Tomado de Klingauf-Nerurkar et al. 2020.

- **MAK5:** al igual que HAS1, se trata de una proteína perteneciente a la familia DEAD-box de helicasas. Esta proteína fue descrita por primera vez en 2003 (Zagulski et al. 2003). En este primer estudio se la describe como una proteína nucleolar con un papel esencial para la biogénesis de la subunidad 60S del ribosoma, concretamente implicada en la biogénesis de los ARNr 25S y 5,8S. Estudios posteriores realizados en levaduras determinan que este factor de ensamblaje presenta actividad ATPasa dependiente de ARN y que su actividad catalítica resulta esencial para que ejerza su papel en la maduración del ribosoma, concretamente promoviendo el paso del pre-ARNr 27SA a 27SB (Brüning et al. 2018). En este mismo estudio determinan mediante experimentos *in vivo* que MAK5 interacciona con las hélices H36, 37 y 39 situadas en el dominio II del ARNr 25S. La unión de MAK5 a esta región es esencial para garantizar la posterior unión de la proteína ribosómica Rpl10 a la misma región durante las etapas tardías de la maduración ribosómica en el citoplasma (Brüning et al. 2018).

Se ha relacionado a MAK5 con la maduración nucleolar de la partícula pre-60S y se han establecido una serie de interacciones funcionales entre MAK5 y los factores de ensamblaje Ebp2, Nop16, Rpf1 y con las proteínas ribosómicas Rpl14/eL14, Rpl6/eL6 y Rpl16/uL13 (Pratte et al. 2013). Un estudio publicado recientemente estudia el papel ejercido por MAK5 en la escisión de la partícula 90S para formar las partículas pre-60S y pre-40S (Ismail et al. 2022). En este trabajo se determina que MAK5 ya está presente en la forma más temprana de la partícula pre-60S y constituye, por tanto, uno de los primeros factores de ensamblaje en unirse a esta partícula. Sorprendentemente, la expresión de un mutante de MAK5 catalíticamente inactivo (MAK5 D333A) tiene un efecto dominante negativo inhibiendo la escisión de la partícula 90S para formar las partículas pre-ribosómicas 40S y 60S. Estos resultados avalan la participación de MAK5 en las primeras etapas de maduración de la subunidad 60S.

- **HAS1:** se trata de una helicasa de tipo 'DEAD-box'. Como ya se ha explicado (apartado 1.1.4.2.1), estas proteínas utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para catalizar una gran variedad de procesos relacionados con el metabolismo del ARN. En el contexto del pre-ribosoma, estas enzimas actúan favoreciendo la correcta remodelación de la estructura pre-ribosómica facilitando con ello la unión/escisión de factores de ensamblaje, proteínas ribosómicas o snoRNPs (Martin et al. 2013). Estudios efectuados con HAS1 de *Saccharomyces cerevisiae* demuestran que este factor de ensamblaje posee actividad ATPasa dependiente de la presencia de ARN ribosómico. Asimismo, HAS1 de levaduras posee *in vitro* actividad helicasa dependiente de su actividad ATPasa (Rocak et al. 2005).

HAS1 es uno de los pocos factores de ensamblaje implicados en el procesamiento de ambas subunidades 40S y 60S (Dembowski et al. 2013) (Emery et al. 2004). HAS1 presenta localización nucleolar y aparece asociado a diversas especies de pre-ARNr: 35S, 27SA₂, 27SA₃, 27SB, 20S y 7S, lo cual evidencia su implicación en la maduración de ambas subunidades (Dembowski et al. 2013) (Gnanasundram, Kos-Braun, y Koš 2019). HAS1 se asocia al pre-ribosoma 90S y tras la escisión en el sitio de corte A₂, este factor de ensamblaje viaja unido a la partícula 43S durante las primeras etapas de su maduración. Asimismo, HAS1 viaja unido a la partícula 66S y se escinde de esta antes de la unión de NOG2 (Dembowski et al. 2013) (Figura 1.5). Se ha estipulado que dos unidades de la proteína HAS1 podrían estar unidas simultáneamente al pre-ribosoma 90S. Tras la escisión en el sitio de corte A₂, estas dos proteínas quedarían unidas a las partículas pre-60S y pre-40S respectivamente (Gnanasundram et al. 2019).

Este factor de ensamblaje está implicado tanto en las etapas iniciales del procesamiento del pre-ARNr (cortes endonucleolíticos en A₀, A₁ y A₂) como en las etapas más tardías de este proceso (procesamiento de los pre-ARNr 27SA₃ y 27SB_S) (Emery et al. 2004) (Brüning et al. 2018). Asimismo, HAS1 es esencial para la síntesis del ARNr 18S y por tanto para la formación de la subunidad 40S (Emery et al. 2004) (Dembowski et al. 2013).

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la unión de HAS1 a la partícula pre-60S es dependiente de los factores A₃ (Dembowski et al. 2013) (Woolford y Baserga 2013), y a su vez es responsable de la unión de una serie de proteínas ribosómicas (L17/uL22, L26/uL24, L35/uL29 y L37/eL37). Estas proteínas ribosómicas serán importantes para el procesamiento del pre-ARNr 27SB (corte en el sitio C₂). La unión de éstas proteínas a la partícula pre-ribosómica promueve la remodelación del pre-ribosoma permitiendo la interacción entre las regiones 25S y 5,8S del ARNr entre sí (Dembowski et al. 2013). Estudios realizados con mutantes de HAS1 en *Saccharomyces cerevisiae* demuestran que su actividad ATPasa/helicasa no es necesaria para la unión y escisión de HAS1 de la partícula pre-60S. Sin embargo, dicha actividad es necesaria para la unión de las proteínas ribosómicas L26/uL24, L35/uL29 y L37/eL37, así como para el eficiente procesamiento del pre-ARNr 27SB_S. Asimismo, la actividad ATPasa/helicasa de HAS1 es esencial para la formación del ARNr 18S. En ausencia de HAS1, el pre-ARNr 27SA₂ es sometido a degradación exonucleolítica (Dembowski et al. 2013).

- **CIC1:** A diferencia de otros factores de ensamblaje como HAS1, NOG1 o MAK5, CIC1 carece de una actividad enzimática reconocible. Esta proteína fue inicialmente relacionada con el funcionamiento del proteasoma 26S encargado de la degradación de las proteínas intracelulares poli-ubiquitinadas (Jager 2001). En estudios posteriores se relacionó a CIC1 con la biogénesis de la subunidad 60S del ribosoma. Estudios iniciales le asignaban un papel en la formación de los ARNr 5,8S y 25S, así como en el transporte de la partícula pre-60S entre el nucléolo y el nucleoplasma (Fatica A et al, 2003). Este factor de ensamblaje presenta una localización predominantemente nucleolar y se une a la partícula pre-60S en las etapas más tempranas de su maduración. CIC1 copurifica con las especies de pre-ARNr 27SA₂ y 27SB (Nissan 2002). Estudios posteriores identificaron a esta proteína como parte de los `factores A₃´, encargados de catalizar la maduración del pre-ARNr 27SA₃ (Dembowski et al. 2013). Mediante experimentos realizados en levaduras se ha determinado que CIC1 interacciona con la región ITS2 del pre-ARNr, donde podría interaccionar con los factores de ensamblaje Nop15 y Rlp7 (Graneman et al, 2011) (Wu S et al, 2016). Se ha estipulado que las proteínas CIC1 y Nop15 estarían implicadas en la regulación de los cambios conformacionales que sufre la región ITS2 durante la maduración del pre-ribosoma, y que implican el establecimiento de interacciones entre los ARNr 5,8S y 25S (Graneman et al, 2011).

En el contexto del pre-ribosoma, CIC1 interacciona con HAS1. Esta interacción se detecta en las etapas de maduración nucleolar de la subunidad 60S (Sanghai et al. 2018), mientras que en las etapas tardías de maduración en el nucleoplasma HAS1 ya se ha escindido del pre-ribosoma, que contiene únicamente a CIC1 en esta etapa de maduración (Wu et al. 2016).

- **eIF6:** este factor de ensamblaje fue inicialmente identificado por su capacidad de impedir la asociación de ambas subunidades, 40S y 60S del ribosoma tanto en mamíferos (Valenzuela, Chaudhuri, y Maitra 1982) como en plantas (Russell y Spremulli 1980). Debido a esta propiedad, esta proteína fue inicialmente clasificada como factor de iniciación de la traducción, y como tal fue designada con el nombre de eIF6 (ekaryotic initiation factor 6). Se trata de una proteína de pequeño

tamaño (245 aminoácidos) y un elevado nivel de conservación entre levaduras y humanos que supera el 70% de su secuencia (Brina et al. 2015) (Basu et al. 2001). Estructuralmente, eIF6 presenta un peculiar plegamiento en forma de pentaína, constituido por 5 repeticiones de un subdominio α/β organizadas en torno a un eje central (Groft et al. 2000). Una característica sobresaliente de este factor de ensamblaje es su presencia en dos compartimentos celulares distintos, citoplasma y núcleo, en cada uno de los cuales está implicada en etapas diferentes del proceso de maduración ribosómica.

En el núcleo, eIF6 juega un papel esencial en la maduración de la subunidad 60S. Esta proteína es esencial para el procesamiento de los pre-ARNr 35S y 27S para formar los ARNr 25S y 5,8S que forman la subunidad 60S. La depleción de eIF6 en levaduras provoca un déficit en la formación de la subunidad 60S, causando una desproporción entre subunidades 40S y 60S, lo cual provoca el bloqueo del crecimiento celular y la producción de proteínas (Basu et al. 2001).

En el citoplasma, eIF6 asociado a la subunidad 60S madura actúa como factor de 'anti asociación', evitando su interacción con la subunidad 40S. Se evita así que ambas subunidades interactúen de forma prematura (Brina et al. 2015). La disociación de eIF6 de la subunidad 60S es un requisito esencial para la formación del ribosoma maduro (80S) y la consecuente iniciación de la traducción (Menne et al. 2007) (Ceci et al. 2003).

Al igual que sucede con NOG1, eIF6 está en continua translocación entre el núcleo y el citoplasma. Según el modelo establecido (Brina et al. 2015), eIF6 se asocia a las subunidades pre-60S inmaduras en el núcleo. Esta proteína es exportada al citoplasma conjuntamente con la subunidad 60S. Una vez completada la maduración de dicha subunidad en el citoplasma, eIF6 se disocia de la misma permitiendo la asociación de ambas subunidades 40S y 60S. Tras su disociación, eIF6 se recicla al núcleo para comenzar un nuevo ciclo de biogénesis.

En *Saccharomyces cerevisiae* NOG1 y eIF6 establecen una estrecha interacción durante el proceso de maduración de la subunidad 60S. Esta interacción ya se detecta en estructuras de crio-microscopía electrónica correspondientes a las etapas iniciales del proceso de maduración de la subunidad 60S en el nucléolo (Sanghai et al. 2018), así como en las etapas finales de maduración en el nucleoplasma (Wu et al. 2016). Tras la exportación nuclear de la subunidad pre-60S, NOG1 se disocia de la misma durante las primeras etapas de su maduración citoplasmática (Klingauf-Nerurkar et al. 2020a) (Figura 1.5). Por el contrario, eIF6 continúa unida a la subunidad 60S durante sucesivas etapas de maduración, siendo uno de los últimos factores de ensamblaje que se disocian de la misma (Klingauf-Nerurkar et al. 2020a) (Figura 1.5). Se desconoce la funcionalidad exacta de la interacción entre NOG1 y eIF6. Esta interacción también ha sido documentada en células humanas mediante experimentos de crio-microscopía electrónica (Liang et al. 2020).

- **NOC2:** las características de este factor de ensamblaje se detallan en el apartado 1.1.4.2.2. Aparte de lo ya mencionado en este apartado cabe destacar que hasta la fecha no se dispone de ninguna estructura tridimensional de este factor de ensamblaje, lo que hace que constituya un candidato interesante para el desarrollo de estudios estructurales.

1.2 La biogénesis ribosómica como diana terapéutica contra el cáncer.

1.2.1 La biogénesis ribosómica y su relación con el desarrollo tumoral.

Existe una estrecha relación entre la biogénesis ribosómica y el desarrollo de cáncer. La correcta síntesis y funcionamiento de los ribosomas es indispensable para que las células tumorales puedan mantener su elevada tasa de proliferación. En este sentido, se ha descrito que las células cancerosas se hacen `adictas` a la biogénesis ribosómica pues la elevada síntesis de proteínas constituye un proceso esencial para el desarrollo tumoral (Catez et al. 2019). Por otro lado, muchos fármacos anticancerígenos utilizados actualmente en la clínica actúan bloqueando la biogénesis ribosómica a diferentes niveles (Burger et al. 2010). Por todo ello la biogénesis ribosómica ha ganado un creciente interés en los últimos años como diana terapéutica en la lucha contra el cáncer.

La importancia de los ribosomas en el desarrollo tumoral es tanto cuantitativa como cualitativa. A nivel cuantitativo, la hiperactivación de la biogénesis ribosómica es un signo característico en los procesos tumorales (Pelletier, Thomas, y Volarević 2018). Se ha demostrado que el desarrollo tumoral depende del nivel de expresión o actividad de proteínas asociadas a la promoción de la biogénesis ribosómica, como es el caso de cMYC o la Polimerasa I (encargada de la transcripción del ADNr) para sustentar el elevado grado de proliferación de las células tumorales (Barna et al. 2008) (Bywater et al. 2012).

Recientemente se ha demostrado que los ribosomas no son idénticos entre sí, sino que se dividen en sub-poblaciones de `ribosomas especializados` que presentan variaciones tanto en su composición de proteínas y ARNr como en el patrón de modificaciones post-traduccionales/transcripcionales que presentan unas y otras en el ribosoma maduro (Xue y Barna 2012). Se trata de un cambio de paradigma en relación al papel que ejercen los ribosomas en la biología celular. Las distintas sub-poblaciones de ribosomas especializados permitirían a la célula adaptar la producción de proteínas según las distintas condiciones fisiológicas. Este nuevo paradigma también es relevante en relación al desarrollo de distintas patologías, y en concreto, en relación al desarrollo de tumores. Se ha postulado la existencia de `oncorribosomas` que favorecen el desarrollo de los procesos tumorales mediante la traducción de ARNm específicos (Catez et al. 2019) (Bustelo y Dosil 2018) (Kampen et al. 2020). En este contexto, las variaciones en el patrón de modificación post-transcripcional del ARNr podrían ejercer un papel importante en el desarrollo tumoral. Un ejemplo de ello es el hecho de que p53 actúa inhibiendo la expresión del gen que codifica para la fibrilarina, la enzima encargada de modificar el ARNr mediante metilación. La inactivación de p53 tiene como consecuencia la sobre-expresión de la fibrilarina y con ello la introducción de cambios en el patrón de metilación del ARNr que tienen como consecuencia una pérdida en la fidelidad de la traducción y un aumento proporcional en la traducción de ARNm que codifican para proteínas con un papel oncogénico (Marcel et al. 2013) (Kampen et al. 2020). Otro ejemplo es la diskerosis congénita asociada al cromosoma X, una enfermedad provocada por mutaciones en el enzima diskarina (DKC1) encargada de llevar a cabo la pseudouridilación del ARNr. Los defectos en esta enzima implican la aparición de ribosomas que llevan a cabo una traducción `especializada` (Kampen et al. 2020) (Rocchi et al. 2013). Estos ribosomas `especializados` muestran diferente afinidad por distintos ARNm que contienen la secuencia IRES (Internal Ribosome Entry Site), favoreciendo la producción de proteínas pro-oncogénicas (como VEGF) y disminuyendo la producción de otras proteínas anti-oncogénicas (como p53, Bcl-xL, XIAP o p27).

1.2.1.1 Las ribosomopatías.

Las ribosomopatías constituyen un ejemplo de la relación existente entre biogénesis ribosómica y desarrollo tumoral. Las ribosomopatías se definen tradicionalmente como un conjunto de enfermedades causadas por alteraciones genéticas que afectan a las distintas etapas de la biogénesis ribosómica (Narla y Ebert 2010). Estas alteraciones genéticas pueden afectar bien a una proteína ribosómica, bien a un factor de ensamblaje o bien a la transcripción/procesamiento del ARNr (Kampen et al. 2020). El resultado común son alteraciones en el proceso de biogénesis ribosómica. La inmensa mayoría de las ribosomopatías son enfermedades congénitas, con algunas excepciones de ribosomopatías que son adquiridas como es el caso del síndrome 5q, causado por una delección específica en el brazo largo del cromosoma 5, que afecta a una serie de genes, entre los cuales se encuentra el gen que codifica para la RPS14/uS11 (Teng, Thomas, y Mercer 2013). Aunque las distintas ribosomopatías presentan distintas manifestaciones clínicas, el fenotipo común de estas enfermedades es una primera etapa caracterizada por hipo-proliferación celular (que afecta especialmente a la hematopoyesis, al desarrollo esquelético y de los tejidos epiteliales) seguida de otra etapa de hiper-proliferación que implica un mayor riesgo de los pacientes de desarrollar distintos tipos de cáncer (Figura 1.9) (Kampen et al. 2020). Surge así la cuestión de cómo estas enfermedades, caracterizadas por defectos en la biogénesis ribosómica, pueden relacionarse con una mayor incidencia de cáncer.

El modelo actualmente aceptado para el desarrollo de estas enfermedades (Kampen et al. 2020) incluye una etapa inicial en la que los defectos en la biogénesis ribosómica provocarían un descenso en la proliferación celular (etapa de hipo-proliferación). Durante esta etapa se produce la activación de p53 con la consecuente activación de los procesos de apoptosis y parada del ciclo celular (Narla y Ebert 2010) (Teng et al. 2013) (Penzo et al. 2019). Por otro lado, los defectos en la biogénesis ribosómica se relacionan con el aumento del estrés oxidativo con elevada producción de ROS (Reactive Oxygen Species) con la consecuente aparición de mutaciones secundarias en el ADN celular y la inhibición del crecimiento celular (Kampen et al. 2020). Para escapar de esta situación de hipo-proliferación, las células necesitan adquirir ciertas mutaciones secundarias (como mutaciones/delecciones del gen TP53 o mutaciones que reduzcan el estrés oxidativo). Tras adquirir estas mutaciones, las células entran en una segunda etapa de hiper-proliferación que puede culminar en el desarrollo de cáncer. En esta segunda etapa entran en juego una serie de cambios cualitativos en el funcionamiento de los ribosomas que serían responsables del carácter oncogénico de las ribosomopatías.

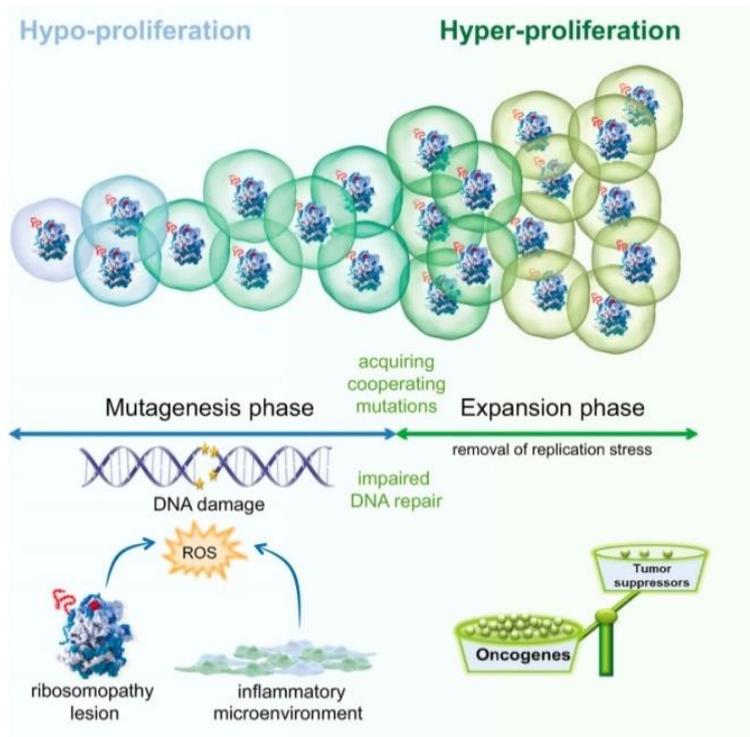


Figura 1.9: Esquema-resumen que muestra las distintas etapas del desarrollo de las ribosomopatías. Tomado de Kampen et al. 2020.

Estos cambios cualitativos pueden dividirse en tres categorías. En primer lugar, los ribosomas que sintetizan las células hiper-proliferativas son funcionales pero presentan ciertos cambios cualitativos en su capacidad de síntesis de proteínas (Teng et al. 2013) (Penzo et al. 2019) (Kampen et al. 2020). Se observa un descenso global en la fidelidad de la traducción. Asimismo, se ha postulado que estos ribosomas actuarían como 'oncorribosomas', es decir, ribosomas especializados en la producción de proteínas pro-oncogénicas a expensas del descenso en la producción de proteínas anti-oncogénicas. Entre sus alteraciones más frecuentes, estos oncorribosomas presentan alteraciones en la traducción mediada por la secuencia IRES favoreciendo la traducción de ARNm que codifican para diversas oncoproteínas (Catez et al. 2019) (Kampen et al. 2020).

El segundo cambio se relaciona con el hecho de que diversas proteínas ribosómicas presentan funciones extra-ribosómicas principalmente relacionadas con el control del ciclo celular y la apoptosis (Turi et al. 2019) (Bursac et al. 2014). Un ejemplo de ello son las proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5. Como se detalla más adelante, estas dos proteínas ribosómicas están implicadas en la estabilización de p53 evitando su degradación proteolítica. RPL11/uL5 y RPL5/uL18 además están implicadas en la inactivación de la oncoproteína cMYC (promotora de la biogénesis ribosómica) y el factor de transcripción E2F1 (promotor del ciclo celular). Se postula que la alteración de las funciones extra-ribosómicas de ciertas proteínas ribosómicas ejerce un papel decisivo en el desarrollo tumoral en el contexto de las ribosomopatías (Kampen et al. 2020).

En tercer lugar, la inactivación de p53 u otras proteínas implicadas en su vía de señalización juega un papel importante en el desarrollo tumoral asociado a las ribosomopatías. Como se ha mencionado, dicha inactivación es un requisito frecuente para el paso de la etapa de hipo-proliferación a una etapa de hiper-proliferación celular (Teng et al. 2013) (Penzo et al. 2019).

Estos tres mecanismos son un ejemplo de la estrecha relación existente entre la biogénesis ribosómica y el desarrollo tumoral. Concretamente, demuestran que ciertos cambios cualitativos en la biogénesis y funcionamiento de los ribosomas están relacionados con el desarrollo de tumores.

Esta conclusión se ve reforzada por la reciente observación que relaciona la presencia de alteraciones somáticas en genes correspondientes a distintas proteínas ribosómicas (mutaciones o deleciones hemicigólicas) con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Kampen et al. 2020). Concretamente, se ha determinado que la deleción hemicigólica de distintas proteínas ribosómicas es un evento frecuente en células tumorales en las que p53 se encuentra inactivado. Se sugiere así que la haploinsuficiencia de una o varias proteínas ribosómicas constituye un factor de vulnerabilidad para el desarrollo de cáncer (Ajore et al. 2017). El gen codificante para la proteína ribosómica RPL5/uL18 presenta deleciones hemicigólicas en un 8,4-34% de los casos de glioblastoma, melanoma y cáncer de mama. Además, el gen codificante para RPL5/uL18 junto con otros 5 genes codificantes para proteínas ribosómicas (RPL11/uL5, RPL23A/uL23, RPS5/uS7, RPS20/uS10 y RPSA/uS2) presentan mutaciones que se asocian de modo significativo con el desarrollo diversos tumores humanos (Fancellò et al. 2017). Surge así un nuevo tipo de ribosomopatías de carácter somático que, al igual que las ribosomopatías congénitas, están estrechamente relacionadas con el proceso de transformación oncogénica (Kampen et al. 2020).

1.2.2 La disrupción de la biogénesis ribosómica y su implicación en la activación no genotóxica de los mecanismos de apoptosis celular.

La mayor parte de los fármacos quimioterapéuticos usados en el tratamiento del cáncer actúan provocando daño en el ADN celular (genotoxicidad), impidiendo así la multiplicación de las células tumorales. A pesar de la utilidad que han demostrado estos fármacos quimioterapéuticos tradicionales para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, su uso presenta importantes efectos secundarios derivados del daño que provocan en el ADN de las células sanas del organismo (Partridge, Burstein, y Winer 2001) (van den Boogaard, Komninos, y Vermeij 2022). Surge así la necesidad de desarrollar fármacos antitumorales alternativos que no afecten al ADN celular.

En este contexto, el proceso de biogénesis ribosómica representa una prometedora diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales no genotóxicos. Dada la elevada complejidad del mecanismo de biogénesis ribosómica, este es susceptible de ser interrumpido farmacológicamente en diversas etapas provocando la activación de una respuesta biológica denominada respuesta de estrés ribosómica. Esta respuesta implica la activación de una serie de rutas de señalización que culminan con el bloqueo del ciclo celular y la activación de los mecanismos moleculares de apoptosis en ausencia de daño al ADN. El principal mediador de estos procesos es el supresor tumoral p53 (Turi et al. 2019) (Bursac et al. 2014). La respuesta de estrés ribosómico a menudo va acompañada de una serie de alteraciones en la estructura nucleolar, dando lugar a la llamada respuesta de estrés nucleolar. Ambos conceptos suelen usarse de manera equivalente, sin embargo, no siempre van acompañados. En este sentido, se ha determinado que la expresión de la mayoría de las proteínas ribosómicas humanas puede ser inhibida *in vitro* sin que se produzcan alteraciones significativas en la estructura del nucléolo, mientras que la mayoría de ellas son esenciales para el correcto procesamiento del ARNr y hasta 24 proteínas ribosómicas se relacionan con la activación de p53 al inhibirse su expresión (Nicolas et al. 2016).

p53, conocido como el 'guardián del genoma', está implicado en la activación transcripcional de los mecanismos de apoptosis y bloqueo del ciclo celular en respuesta a diversos estímulos, entre los cuales se encuentra el daño al ADN celular y la alteración no genotóxica de la biogénesis ribosómica. Estas funciones ejercen un papel decisivo en el bloqueo del desarrollo tumoral, lo cual convierte a p53 en uno de los supresores tumorales más conocidos (Chen 2016). Consecuentemente, este factor transcripcional se encuentra frecuentemente mutado o deleccionado en diversos cánceres humanos (Joerger y Fersht 2016). Estas mutaciones no solo abrogan las funciones oncosupresoras de p53, sino que pueden actuar promoviendo el desarrollo tumoral (Mantovani, Collavin, y Del Sal 2019).

1.2.2.1 Mecanismos moleculares de la respuesta de estrés ribosómico y su relación con p53.

La inducción de estrés ribosómico provoca la activación de una ruta de señalización denominada 'Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint' (IRBC por sus siglas en inglés). La figura 1.10 muestra una representación esquemática de dicha vía de señalización que incluye mecanismos dependientes e independientes de p53.

En condiciones de homeostasis celular, la expresión de p53 se encuentra negativamente regulada mediante su interacción en el nucleoplasma con la E3-ubiquitín ligasa HDM2 (denominada MDM2 en ratones). En adelante se utilizará este último nombre para referirse de manera genérica a esta proteína. MDM2 forma un dímero con la proteína MdmX. Ambas proteínas actúan tanto inhibiendo la actividad transcripcional de p53 como promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación proteasomal. En este contexto, la unión del ARNr 5S al complejo MDM2-MdmX protege a MdmX de la degradación promovida por MDM2. Tras la inducción de estrés ribosómico el complejo trimérico formado por las proteínas RPL5/uL18, RPL11/uL5 junto con el ARNr 5S en vez de incorporarse a la subunidad 60S es redirigido al nucleoplasma donde interacciona con MDM2 inhibiendo su actividad ubiquitín ligasa sobre p53. Adicionalmente, la unión de RPL11/uL5 a MDM2 potencia su actividad degradativa sobre MdmX (Bursac et al. 2014). De ésta manera p53 queda estabilizado y puede actuar poniendo en marcha diversos programas transcripcionales que culminan en el bloqueo del ciclo celular y la apoptosis (Bursac et al. 2014) (Turi et al. 2019) (Donati et al. 2013). Entre los genes diana de p53 se encuentran la proteína p21, mediadora del bloqueo en el ciclo celular (Karimian, Ahmadi, y Yousefi 2016), y las proteínas PUMA y Bax, mediadores de la apoptosis intrínseca (Xu y Shi 2007).

RPL5/uL18 y RPL11/uL5 no son los únicos mediadores de la respuesta de estrés ribosómico. En condiciones de sobre-expresión, diversas proteínas ribosómicas pertenecientes tanto a la subunidad mayor como a la subunidad menor del ribosoma son capaces de interaccionar con MDM2 e inhibir su actividad ubiquitín ligasa sobre p53. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con el resto de proteínas ribosómicas, se estipula que RPL5/uL18 y RPL11/uL5 juegan un papel esencial en dicho proceso (Bursac et al. 2014). Prueba de ello es que la inhibición de la expresión de ambas proteínas impide la activación de p53 en un contexto de estrés ribosómico, cosa que no sucede al inhibir la expresión de otras proteínas ribosómicas como RPS7/eS7, RPS6/eS6, RPL23/uL14 o RPL7/uL30 (Fumagalli et al. 2012). Estudios *in vitro* demuestran que en un contexto de estrés ribosómico, las proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5 se protegen mutuamente de la degradación proteasomal, lo cual podría ser clave para su función de activación de p53 (Bursac et al. 2012).

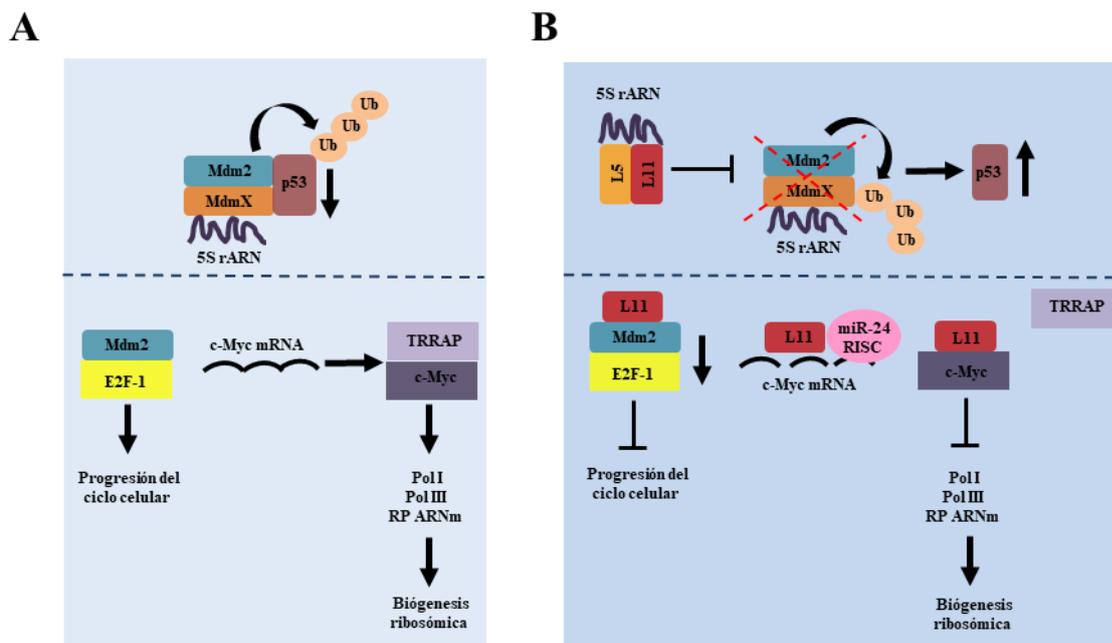


Figura 1.10: Esquema-resumen que muestra las funciones extra-ribosómicas de las proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5: estabilización de p53, inhibición de las funciones de E2F1 y cMYC. Se muestra la situación de p53, cMYC y E2F1 en condiciones de homeostasis celular (panel A) y en condiciones de estrés ribosómico (panel B). Tomado de Bursac et al. 2014.

1.2.2.2 Mecanismos moleculares de respuesta al estrés ribosómico independientes de p53.

Aunque p53 se presenta como el principal mediador en la respuesta de estrés ribosómico mediada por MDM2, otros mecanismos independientes de p53 están implicados en esta respuesta. En ausencia de estrés ribosómico, MDM2 interacciona con el factor de transcripción E2F1. Esta interacción estabiliza a E2F1 evitando su degradación mediada por proteasas, y le permite llevar a cabo sus funciones basadas en la promoción del ciclo celular. Sin embargo, en condiciones de estrés ribosómico, la proteína RPL11/uL5 liberada del ribosoma interacciona con MDM2 provocando su escisión de E2F1, que sufre entonces un proceso de degradación con la consecuente inhibición de sus funciones (Donati et al. 2011) (Bursac et al. 2014).

Ambas proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5 están también implicadas en la inhibición de la expresión de la oncoproteína cMYC en respuesta al estrés ribosómico. cMYC es un importante activador de la biogénesis ribosómica que estimula la actividad de las tres ARN Polimerasas (I, II y III) implicadas en este proceso (van Riggelen, Yetil, y Felscher 2010). En condiciones de estrés ribosómico RPL5/uL18 y RPL11/uL5 interaccionan con el ARNm codificante para cMYC y promueven su degradación por el complejo RISC (Liao et al. 2014). Adicionalmente, RPL11/uL5 inhibe funcionalmente a cMYC mediante su interacción con el dominio de activación transcripcional de cMYC con el consecuente bloqueo de sus funciones en la promoción de la actividad de las polimerasas I, II y III (Dai, Sun, y Lu 2010) (Bursac et al. 2014). Las funciones de RPL11/uL5 independientes de p53 en el contexto del estrés ribosómico se esquematizan en la Figura 1.10.

La respuesta de estrés ribosómica también puede estar mediada por otras proteínas diferentes de p53. Un ejemplo es el regulador transcripcional p73. Esta proteína pertenece a la misma familia que p53, con la que comparte muchas de sus dianas transcripcionales. Ambos factores transcripcionales están implicados en la regulación de la respuesta antitumoral ante estímulos oncogénicos. Sin embargo, en condiciones de homeostasis, p73 ejerce funciones específicas en la regulación de la diferenciación celular y el desarrollo de distintos tejidos (Dötsch et al. 2010) (Ramos, Raimundo, y Saraiva 2020).

p73 presenta diversas isoformas generadas mediante *splicing* alternativo en el extremo carboxi-terminal, y mediante el uso de dos promotores alternativos en el extremo amino-terminal (Dötsch et al. 2010) (Ramos et al. 2020). Este último mecanismo determina la presencia o ausencia en su extremo amino-terminal de un dominio de transactivación. Este dominio juega un papel esencial en las funciones de las distintas isoformas de p73. Las isoformas que contienen este dominio (denominadas isoformas TAp73) actúan como supresores tumorales, mientras que las isoformas que no contienen este dominio (isoformas Δ Np73) tienen funciones pro-oncogénicas. Concretamente, estas isoformas actúan inactivando las funciones tanto de p53 como de las isoformas TAp73 mediante la formación de heterodímeros o mediante la competencia por su unión a los mismos promotores (Ramos et al. 2020).

De manera análoga a p53, la actividad transcripcional de las isoformas TAp73 es inhibida mediante su interacción con MDM2, aunque en este caso MDM2 no promueve su degradación proteolítica, sino sólo su inactivación transcripcional (Zhou et al. 2015) (Ramos et al. 2020). En un contexto de estrés ribosómico, las proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5 actúan liberando a TAp73 de su interacción con MDM2 y por consiguiente activando sus funciones transcripcionales. A diferencia de p53, en este caso las proteínas RPL5/uL18 y RPL11/uL5 actúan interaccionando directamente con el dominio TA de p73 y provocando con ello la escisión de MDM2 que se une al mismo dominio. De esta manera TAp73 queda libre para activar la transcripción de diversos genes relacionados con la apoptosis y la regulación del ciclo celular como son PUMA, Bax y p21 (Zhou et al. 2015).

1.2.3 La biogénesis ribosómica como diana terapéutica.

Como se explica en apartados anteriores, existe una estrecha relación entre la biogénesis ribosómica y la activación de los mecanismos moleculares de apoptosis dependientes e independientes de p53. Esto convierte al ribosoma en una diana estratégica para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

Muchos de los fármacos quimioterapéuticos utilizados en la actualidad actúan inhibiendo la transcripción/procesamiento del ARNr (Burger et al. 2010) (Zisi, Bartek, y Lindström 2022). El problema que presentan estos fármacos, sin embargo, es que no actúan específicamente sobre este proceso, sino que presentan diversas dianas moleculares, entre las cuales el ADN celular es una de las más frecuentes. Esto hace difícil discernir hasta qué punto su eficacia depende de su actividad inhibidora de la biogénesis ribosómica (Ferreira et al. 2020). Se hace necesario, por tanto, el desarrollo de nuevos fármacos que actúen como inhibidores específicos de la biogénesis ribosómica en sus distintas etapas.

La inhibición de la transcripción del ARNr mediada por la ARN Polimerasa I ha ganado un creciente interés en los últimos 15 años como potencial diana terapéutica para el tratamiento del cáncer

(Ferreira et al. 2020) (Zisi et al. 2022). El resultado ha sido el desarrollo de distintos inhibidores específicos de este proceso. En los siguientes párrafos se describen los principales compuestos quimioterapéuticos desarrollados hasta la fecha cuya diana específica es la ARN Pol I. En la Figura 1.11 se ofrece un resumen esquemático de los distintos mecanismos de acción de estos fármacos antitumorales.

- **CX-3543:** es un derivado de la fluoroquinolona que provoca la disociación de la nucleolina de las estructuras G4 del ADNr. Esto tiene como consecuencia la inhibición de su transcripción con la consecuente estabilización de p53 e inducción de apoptosis (Drygin et al. 2009) (Ferreira et al. 2020). Este compuesto muestra eficacia en una gran variedad de líneas celulares tumorales así como en modelos *in vivo* (Drygin et al. 2009).
- **CX-5461:** se trata de un inhibidor específico de la actividad de la ARN Polimerasa I que actúa bloqueando la incorporación del complejo SL-1 al ADNr impidiendo así la formación del complejo de iniciación de la transcripción. SL-1 es un complejo multiproteico responsable de regular la incorporación de la ARN Polimerasa I al lugar de iniciación de la transcripción del ADNr. Los primeros estudios estipularon que CX-5461 actúa específicamente sobre la ARN Polimerasa I sin afectar a la ARN Polimerasa II ni provocar genotoxicidad. Se determinó que este compuesto inhibe eficazmente la proliferación de diversos tipos de células tumorales, mientras que no afecta a células sanas (Drygin et al. 2011) (Bywater et al. 2012). En un primer estudio (Bywater et al. 2012) se estableció la eficacia de este compuesto en el tratamiento de linfomas de células B y otros tumores hematológicos en los que actúa induciendo la respuesta de estrés ribosómica mediada por p53. Por tanto, según este primer estudio la eficacia de CX-5461 para el tratamiento de los tumores de origen hematológico dependería de la expresión de p53. Sin embargo, estudios posteriores realizados *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos han validado la eficacia de CX-5461 en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica aguda de manera independiente al estatus de p53 (Negi y Brown 2015)(Hein et al. 2017). Se descubrió así que CX-5461 puede actuar por vías independientes de p53, concretamente mediante la activación de la señalización mediada por las kinasas ATM/ATR/CHK1-2. Esta vía de señalización provoca a su vez el bloqueo del ciclo celular en las fases G2 y G1 (Quin et al. 2016).

En el caso de los tumores sólidos, CX-5461 actúa induciendo muerte celular mediada por los mecanismos de autofagia y senescencia (Drygin et al. 2011). En este sentido, estudios recientes establecen una estrecha relación entre el estrés ribosómico y la activación de los mecanismos moleculares de autofagia mediante la activación transcripcional de genes específicos (Dannheisig et al. 2021). Se ha estudiado la eficacia de CX-5461 en diversos modelos preclínicos de tumores sólidos (Ferreira et al. 2020) tales como el osteosarcoma (Li et al. 2016), cáncer de pulmón (Kim et al. 2016), neuroblastoma (Taylor et al. 2019), cáncer de ovarios (Sanij et al. 2020), cáncer de próstata (Lawrence et al. 2021) y cáncer de mama triple negativo (Makhale et al. 2021).

CX-5461 ha sido utilizado en un estudio clínico en fase I en pacientes con tumores hematológicos avanzados (Khot et al. 2019) así como en pacientes con tumores sólidos (Hilton et al. 2022).

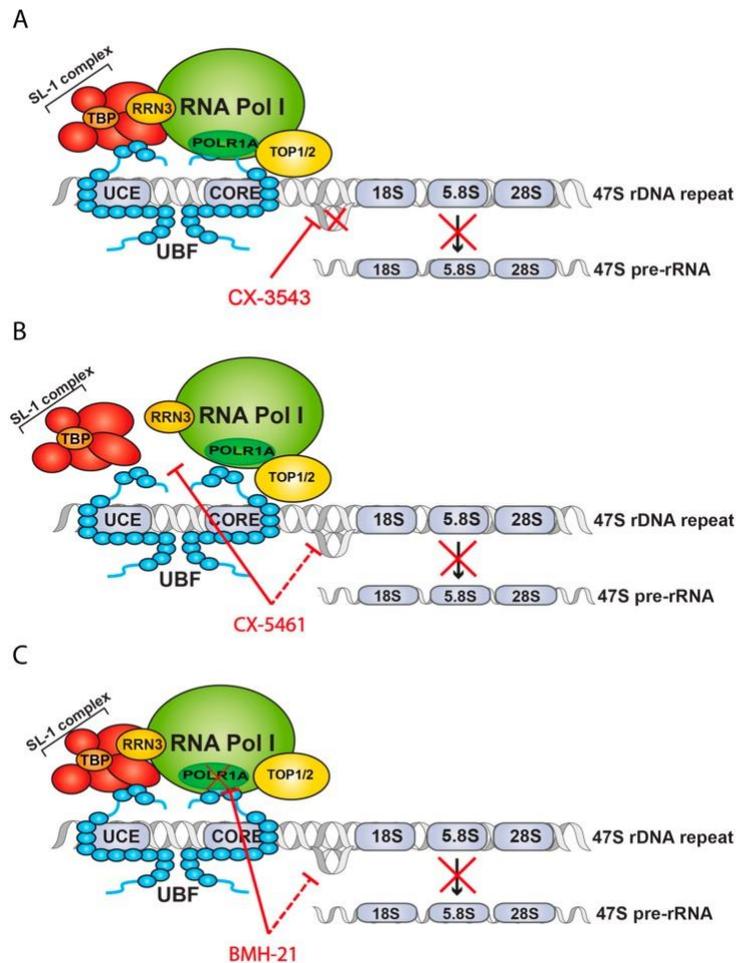


Figura 1.11: Representación esquemática que muestra el mecanismo de acción de los distintos inhibidores específicos de la ARN Polimerasa I desarrollados hasta la fecha. Tomado de Ferreira et al. 2020.

Sin embargo, estudios recientes han generado dudas acerca del mecanismo primario por el que actúa CX-5461. Por un lado, se ha establecido que CX-5461 actúa inhibiendo la topoisomerasa II. Este mecanismo de acción implicaría además la producción de daño en el ADN, en contra de lo establecido en los primeros estudios realizados con este fármaco (Bruno et al. 2020) (Pan et al. 2021). Otro estudio ha establecido que CX-5461, en contra de lo inicialmente descrito, no inhibe la interacción del complejo SL-1 con el ADNr, pero bloquea el complejo de la ARN Polimerasa I en la fase de iniciación de la transcripción. Concretamente, actuaría inhibiendo la liberación del complejo formado por la ARN Polimerasa I y Rrn3 del promotor del ADNr. Este bloqueo induciría a su vez una cascada de eventos celulares entre los que se encuentra el daño en el ADN celular (Mars et al. 2020). También se ha establecido que CX-5461 altera la estructura del ADN mediante la formación de estructuras cuádruple-G (Xu et al. 2017). En la actualidad se considera que CX-5461 actúa a través de múltiples mecanismos tanto dependientes como independientes de p53. Estos mecanismos implicarían la inhibición directa de la actividad transcripcional de la ARN polimerasa I, el bloqueo de la acción de la topoisomerasa II, la inducción de estructuras aberrantes en el ADNr como los cuádruples G y la activación de la respuesta de daño al ADN mediante la activación de las proteínas ATM y ATR así como sus efectores CHK1 y 2 (Xuan et al. 2021).

- **BMH-21:** este compuesto pertenece a la familia de los derivados de acridina, junto con BMH-22, aminacrina y etacridina. BMH-21 fue inicialmente descrito en un análisis masivo en busca de moléculas que fuesen capaces de provocar la activación transcripcional de p53 (Peltonen et al. 2010). En este mismo estudio se identificaron los compuestos BMH-7,9,15,22 y 23 como moléculas con capacidad de intercalarse en el ADN y provocar la activación transcripcional de p53. Aunque BMH-21 se definió inicialmente como una molécula capaz de provocar la activación transcripcional de p53, este compuesto también actúa sobre células tumorales en las que p53 se encuentra ausente o mutado (Peltonen et al. 2010) (Peltonen et al. 2014). Se ha descrito la capacidad de BMH-21 de intercalarse en las regiones ricas en GC presentes en el ADNr, lo cual se ha relacionado con su capacidad para inhibir su transcripción. BMH-21 también actúa promoviendo la degradación de la subunidad catalítica RPA194 (POLR1A), integrante del complejo de la ARN Polimerasa I. Sin embargo, este último proceso podría ser un evento secundario en el mecanismo de inhibición transcripcional mediado por BMH-21 (Peltonen et al. 2014). Por último, se comprobó que este compuesto afecta preferentemente a las células cancerosas frente a las células sanas. La eficacia de BMH-21 como agente anticancerígeno ha sido validada en experimentos *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de modelos murinos (Peltonen et al. 2010) (Peltonen et al. 2014).

Estudios recientes han establecido que BMH-21, a diferencia de CX-5461, actúa sobre diversas etapas del proceso de transcripción mediado por la ARN Polimerasa I. Concretamente, actúa tanto sobre la etapa de iniciación como sobre la etapa de elongación, aunque esta última etapa es especialmente sensible a la acción de BMH-21 (Jacobs et al. 2022). Otra diferencia importante con respecto a CX-5461 es que este compuesto no provoca daño en el ADN y no requiere la activación de la respuesta de daño al ADN para su actuación (Peltonen et al. 2010) (Colis et al. 2014). Por otro lado, se ha apuntado la posibilidad de que BMH-21, al igual que CX-5461 actúe como estabilizador de estructuras cuádruple-G, aunque los resultados experimentales a este respecto son contradictorios (Ferreira et al. 2020). Aunque BMH-21 aún no ha entrado en fase de ensayos clínicos, su eficacia ha sido probada en modelos preclínicos de cáncer de próstata (Low et al. 2019) y cáncer ovárico (Fu et al. 2017).

- **BMH-22:** se trata de una molécula identificada por separado en dos cribados masivos, uno de ellos en busca de compuestos capaces de activar la transcripción de p53 (Peltonen et al. 2010) y otro en busca de compuestos capaces de provocar disrupción nucleolar (Morgado-Palacin et al. 2014). Junto con BMH-21, aminacrina y etacridina, pertenece a la familia de los derivados de acridina que actúan inhibiendo la transcripción mediada por la ARN Polimerasa I y provocan la degradación de la subunidad catalítica RPA194 (POLR1A). Este compuesto activa la respuesta de estrés ribosómico provocando la estabilización de p53 de manera dependiente de MDM2, RPL5/uL18 y RPL11/uL5. Al igual que BMH-21, se ha definido como una molécula con capacidad de intercalarse en el ADN celular pero que, sin embargo, no provoca genotoxicidad. Junto con BMH-21 y BMH-22 se han identificado otros derivados de acridina (aminacrina y etacridina) que actúan de manera análoga provocando la activación de p53 y la disrupción nucleolar sin provocar daño en el ADN celular (Morgado-Palacin et al. 2014).

Aparte de estos compuestos, recientemente se han descubierto otras moléculas quimioterapéuticas que actúan interfiriendo en la actividad de la ARN Polimerasa I. Una de ellas es la metarrestina (Frankowski et al. 2018) que actúa bloqueando la transcripción mediada por la ARN Polimerasa I a través de su interacción con el factor de elongación eEF1A2. Este compuesto se describió inicialmente como supresor de metástasis. Por otro lado, la molécula P1-B1 es un derivado del cisplatino y BMH-21 que inhibe selectivamente la ARN Polimerasa I (Zhang et al. 2018).

1.2.4 Necesidad de diseñar nuevas estrategias quimioterapéuticas basadas en el bloqueo de la biogénesis ribosómica.

A pesar del innegable avance que ha supuesto el desarrollo de fármacos dirigidos específicamente contra al ARN Polimerasa I, se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra el proceso de biogénesis ribosómica. De entre todos los fármacos descritos en el apartado anterior solamente CX-5461 ha entrado en fase de ensayos clínicos (Khot et al. 2019) (Hilton et al. 2022). Sin embargo, en relación a este fármaco han surgido una serie de inconvenientes, como son el hecho de que provoque daño en el ADN celular (Bruno et al. 2020) (Mars et al. 2020) (Pan et al. 2021), o el hecho de que pueda presentar otras dianas aparte de la ARN Polimerasa I, como puede ser la topoisomerasa II (Bruno et al. 2020) (Pan et al. 2021). También se ha reportado la aparición de resistencias al tratamiento combinado con CX-5461 y everolimus (inhibidor de la traducción mediada por mTOR) en un modelo murino de linfoma de células B. La aparición de esta resistencia se ha relacionado con la capacidad de las células tumorales de activar la traducción de genes relacionados con el metabolismo energético (Kusnadi et al. 2020).

Cabe destacar que la transcripción del ARNr por parte de la ARN Polimerasa I constituye sólo el primer paso en el proceso de biogénesis ribosómica. Como se ha descrito en la primera parte de esta introducción, la biogénesis ribosómica es un proceso extremadamente complejo que incluye el procesamiento del pre-ARN ribosómico hasta formar los distintos ARNr maduros, el acoplamiento de estos ARNr con las diversas proteínas ribosómicas, la exportación de ambas subunidades 40S y 60S al citoplasma y finalmente su ensamblaje para formar el ribosoma maduro 80S. Cada una de estas etapas es potencialmente susceptible de ser bloqueada farmacológicamente. En este sentido, un reciente estudio ha permitido identificar diversas sustancias capaces de bloquear *in vitro* el procesamiento del ARNr en sus diversas etapas, afectando a la formación de la subunidad 60S, 40S o ambas a la vez. Estos resultados demuestran que es posible bloquear la biogénesis ribosómica actuando en etapas posteriores a la transcripción del ARNr y que el proceso de ensamblaje de los ribosomas tiene un gran potencial como diana terapéutica (Awad et al. 2019).

Por otro lado, como ya se ha mencionado, en el proceso de biogénesis del ribosoma interviene un conjunto de más de 200 proteínas denominadas colectivamente factores de ensamblaje ribosómicos (Woolford y Baserga 2013) (Kressler et al. 2010). Cada una de estas proteínas ejerce un papel esencial en un punto específico del proceso de ensamblaje ribosómico y por tanto constituye una potencial diana terapéutica para el desarrollo de futuros fármacos antitumorales. Hasta la fecha han sido desarrollados algunos compuestos que actúan contra factores de ensamblaje específicos. Un ejemplo es la diazaborina, compuesto que actúa inhibiendo la acción de la AAA-ATPasa Drg1 implicada en la maduración de la subunidad 60S (Zisser et al. 2018).

Otra posible estrategia terapéutica consiste en bloquear la funcionalidad de los ribosomas, es decir, inhibir la capacidad de los ribosomas de sintetizar nuevas proteínas. Este es el mecanismo de actuación de la homoharringtonina y la haemantamina, dos compuestos usados en la medicina tradicional. Investigaciones recientes han permitido determinar que ambos compuestos actúan provocando la inhibición de la actividad de los ribosomas (Pellegrino et al. 2018) (Gilles et al. 2020). En el caso de la haemantamina, ésta actúa además inhibiendo el procesamiento del ARNr (Pellegrino et al. 2018). La homoharringtonina fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) en 2012 para su uso clínico en pacientes con leucemia mieloide crónica (Gilles et al. 2020).

En conclusión, la biogénesis y funcionamiento de los ribosomas juegan un papel importante en el desarrollo tumoral, razón por la que han ganado un creciente interés en las últimas décadas como dianas para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. Estos fármacos pueden dirigirse hacia diferentes procesos y proteínas implicadas en la biogénesis o funcionamiento de los ribosomas.

1.3 Conclusiones.

La biogénesis y funcionamiento de los ribosomas ha ganado una creciente importancia en los últimos años como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos (Pellegrino et al. 2018) (Awad et al. 2019) (Gilles et al. 2020). La investigación desarrollada en éste área durante las últimas décadas ha conducido al desarrollo de diversos fármacos antitumorales que interfieren en la biogénesis ribosómica mediante el bloqueo de la actividad transcripcional de la ARN Polimerasa I (Drygin et al. 2009) (Bywater et al. 2012) (Morgado-Palacin et al. 2014) (Peltonen et al. 2014). Uno de estos compuestos, CX-5461 ha sido seleccionado para realizar ensayos clínicos de fase I en pacientes con tumores hematológicos (Khot et al. 2019) y en pacientes con tumores sólidos avanzados (Hilton et al. 2022). Sin embargo, posteriores investigaciones han puesto de manifiesto importantes desventajas asociadas al uso de este compuesto, como su carácter genotóxico (Xu et al. 2017) (Bruno et al. 2020) (Mars et al. 2020) (Pan et al. 2021) y el desarrollo de resistencias en modelos murinos (Kusnadi et al. 2020).

Se hace necesario, por tanto, buscar estrategias alternativas de intervención terapéutica sobre el proceso de biogénesis ribosómica. Una posibilidad es la intervención dirigida sobre interacciones proteína:proteína entre factores de ensamblaje ribosómicos. Hasta la fecha se han descrito más de 200 factores de ensamblaje implicados en la síntesis de la subunidad 60S, que establecen entre sí diversas interacciones que son esenciales para la correcta maduración de dicha subunidad. Cada una de estas interacciones constituye una potencial diana terapéutica que puede ser explotada mediante el diseño de herramientas específicas. Gracias al uso de la microscopía electrónica disponemos de abundante información acerca de la estructura tridimensional de los diversos factores de ensamblaje de la célula eucariota y el modo en que interaccionan entre sí (Kressler et al. 2010) (Woolford y Baserga 2013) (Kressler et al. 2017). Esta información tiene un valor clave en el diseño de estrategias terapéuticas destinadas al interferir sobre alguna de estas interacciones. En este sentido, el grupo dirigido por el Dr. Bravo ha diseñado recientemente una serie de péptidos de interferencia capaces de bloquear la interacción entre los factores de ensamblaje ribosómicos Erb1 y Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* (Orea-Ordóñez, Masiá, y Bravo 2021).

2. Objetivos.

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de péptidos de interferencia dirigidos contra interacciones específicas entre factores de ensamblaje ribosómicos que muestren potencial como futuros fármacos antitumorales. Asimismo, se evaluará la relevancia de los péptidos desarrollados en relación con los tratamientos de quimioterapia vigentes en la actualidad.

Para alcanzar este objetivo nos hemos centrado en una serie de interacciones entre distintos factores de ensamblaje. Concretamente, hemos seleccionado las interacciones NOG1-MAK5, NOC2-MAK5, NOG1-eIF6, HAS1-CIC1 y Bop1-WDR12 para su caracterización. En el caso de la interacción Bop1-WDR12, los resultados de este trabajo suponen una ampliación de los resultados previamente obtenidos en el grupo del Dr. Jerónimo Bravo (Orea-Ordóñez et al. 2021).

Los tres objetivos de esta tesis son por tanto los siguientes:

1. Clonación, sobre-expresión y purificación de los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 procedentes de *Chaetomium thermophilum*. Caracterización funcional y biofísica de las proteínas purificadas y análisis de sus posibles interacciones con vistas al diseño de péptidos de interferencia.
2. Búsqueda de interacciones entre factores de ensamblaje ribosómicos que constituyan dianas relevantes para el desarrollo de péptidos de interferencia. Diseño, producción y evaluación *in vitro* de un péptido de interferencia contra la interacción entre los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 de *Homo sapiens*.
3. Evaluación *in vitro* de los péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Bop1 y WDR12 empleando células tumorales humanas.

3. Materiales y métodos.

3.1 Clonación de los genes de interés.

3.1.1 Vectores utilizados.

Los genes de interés para este trabajo fueron clonados en el vector pET28-NKI/LIC 6His/3C, procedente del grupo dirigido por el Dr. A. Perrakis (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), en adelante denominado vector pNKI. Se trata de un vector que incorpora una etiqueta de 6 residuos de Histidina (6xHis) en el extremo amino-terminal de la proteína clonada. Esta etiqueta puede ser eliminada gracias a la presencia de un sitio de corte reconocido por la proteasa 3C de rinovirus humano. Además, este vector incorpora un gen de resistencia a kanamicina para la selección de colonias transformadas. Alternativamente se utilizaron dos variantes del vector pNKI, en las que la etiqueta de 6xHis fue sustituida por glutatión-S-transferasa (GST) (vector pGKI) o proteína de unión a maltosa (MBP) (vector pMBKI). Estos vectores se obtuvieron mediante técnicas de ingeniería genética gracias al trabajo previo realizado por el Dr. Marcin Węgrecki (Węgrecki, M (2015). Structural, biophysical and functional characterization of Nop7-Erb1-Ytm1 complex and its implications in eukaryotic ribosome biogenesis [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). Se utilizó la técnica de clonación independiente de ligación (LIC), descrita en el apartado 3.1.3, para la clonación de los distintos genes de interés.

3.1.2 Amplificación de los genes de interés.

Los genes de interés para este trabajo fueron amplificados a partir del ADN complementario (cADN) de *Chaetomium thermophilum*, a fin de evitar la presencia de intrones. Para ello, se realizó una extracción de ARN total a partir de un cultivo de *Chaetomium thermophilum* empleando el kit 'SV total ARN isolation system' (Promega, ref. Z3100) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este extracto de ARN total se transformó en cADN mediante una reacción de PCR asociada a retrotranscriptasa (RT-PCR). Se utilizó para ello el kit 'High-capacity cDNA Reverse Transcription' (Applied Biosystems™, ref. 4368814).

Alternativamente, la PCR se realizó a partir de un fragmento de ADN previamente amplificado en el laboratorio. En este caso se amplificaron los genes de interés mediante PCR convencional empleando el kit HiFi HotStart PCR (KAPA Biosystems, ref. KR0369). La Tabla 3.1 refleja la composición de la reacción de PCR. El protocolo de la reacción de PCR se indica en la Tabla 3.2. En este último caso, el tiempo de amplificación (30 seg/Kb) fue distinto según la variable extensión de las construcciones generadas en este trabajo. Se utilizó una temperatura de fusión (T_m) distinta en función de cada pareja de cebadores (véase Anexo 6). En el caso de la construcción NOG1 (351-412 aa) de *Homo sapiens*, dada su menor extensión, se emplearon 15 ciclos de amplificación en vez de los 35 que aparecen reflejados en la Tabla 3.2.

El resultado de la reacción de PCR fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) que fue teñida con RedSafe (INtRON Biotechnology, ref. 21141). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE (40 mM Tris (hidroximetil)-metilamina (Tris-HCl) pH 8,3; 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) a 100 V durante 30 min empleando una fuente PowerPac™ Basic (Bio-Rad). Se utilizó un patrón de ADN comercial (GeneDireX, ref. DM001-R500) como marcador de pesos moleculares. El resultado de la electroforesis fue visualizado en un transiluminador de radiación ultravioleta Ultima 16si Plus (Isogen Life Science). El producto de la reacción PCR fue purificado empleando el kit NZYGelpure (NZYTech, ref. MB011) siguiendo las instrucciones del fabricante, y

se midió su concentración y pureza (ratio de Absorbancia 260/280 nm) mediante espectrometría UV-Visible empleando un aparato NanoDrop® 2000 (Fischer Scientific™).

Los distintos cebadores fueron diseñados empleando la secuencia de ADN sin intrones de cada gen de interés y adicionando en el extremo 5' de cada cebador la secuencia específica necesaria para clonar el gen correspondiente en el vector pNKI y sus variantes (pGKI, pMBKI) mediante la técnica de clonación independiente de ligación (LIC). Las secuencias correspondientes a los distintos cebadores empleados en este trabajo se muestran en la Tabla 3.3. La parte de la secuencia que se muestra en negrita se corresponde con la secuencia específica (*overhang*) necesaria para la clonación mediante el método LIC (apartado 3.1.3).

Tabla 3.1: Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los genes de interés.

Componente de la reacción	Volumen	Concentración final
Tampón KAPA HiFi 5x	5µl	1x
10 mM Mezcla dNTPs	0,75µl	0,3 mM
10 µM cebador directo	0,75µl	0,3 µM
10 µM cebador reverso	0,75µl	0,3 µM
cADN	1-2µl	70 ng
1U/µl ADN Polimerasa HiFi HotStart	0,5 µl	0,5 U
H ₂ O miliQ	Hasta 25 µl	-

Tabla 3.2: Protocolo de PCR para la amplificación de los genes de interés.

Etapa	Temperatura	Duración	Ciclos de amplificación
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	98°C	20 seg.	
Hibridación de cebadores	58-64°C*	20 seg.	35
Extensión	72°C	30 seg/Kb	
Extensión final	72°C	10 min	1

* Se utilizó una temperatura de fusión (T_m) distinta en función de la pareja de cebadores empleada en cada caso (véase Anexo 6).

En el caso de la construcción NOG1 (351-412 aa) de *Homo sapiens*, el gen correspondiente fue sintetizado por encargo por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA), utilizando codones optimizados para su expresión en *Escherichia coli*. Usando cebadores específicos (Tabla 3.3), el gen sintetizado se amplificó mediante una reacción de PCR (Tablas 3.1 y 3.2) como paso previo a su clonación en el vector correspondiente. Las demás etapas del procedimiento de clonación, sobre-expresión y purificación (apartados 3.1.3, 3.1.4, 3.2 y 3.3) se realizó de igual manera que con el resto de construcciones empleadas en este trabajo.

Tabla 3.3: Listado de cebadores empleados en el proceso de clonación.

Nombre	Secuencia
NOC2 Ct Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGGGCACAGCAAAAAAGAACCT CAAAGCGACAAAAAAGTTC-3'
NOC2 Ct Rw	5'- GAGGAGAAGCCCGGT TACTCTCCTCCTCCT TTTTCATCCTCATCCTCATCC-3'
NOC2 (771 aa) Ct Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TATGCGTCCTCCATCTCCTCA TCTTCTCCTC-3'
NOG1 Ct Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGACTGGGTGGAAAGACAT CCCTCCTGTGC-3'
NOG1 Ct Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAAACGACGGTCTGTCTTGCCA ATCGTCCGC-3'
HAS1 Ct Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGGCGTCCGAATCCAGCAAAAAG- 3'
HAS1 Ct Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAGCCAAATGTGTTGGGC- 3'
HAS1 Ct (320 aa) Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAGACATTGATGTAGAGG GGCCC-3'
CIC1 Ct Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGGCCCCCTCCACGGCAGTC-3'
CIC1 Ct Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAGATATCAGCAGCGACCTT-3'
eIF6 Ct Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGGCCGTCAGAGCCCAGTTC-3'
eIF6 Ct Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAGTAAAAAGACTCGACGAT-3'
MAK5 Ct Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGGGTTTCGACAAGAAACG- 3'
MAK5 Ct Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAAATCCCCAAACCCTCCACAA CACCC- 3'
MAK5 Ct (192 aa) Fw	5'- CAGGGACCCGGT TATGGACGATGTTCGACCTTTC CGAATGGGTT -3'
MAK5 Ct (616 aa) Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAGACCTTGTTGAT AAGACGCTG -3'
TAT-NOG1 Hs (351-412 aa) Fw	5'- CAGGGACCCGGT TGGCCGCAAGAAGCGCCGC-3'
TAT-NOG1 Hs (351-412 aa) Rw	5'- CGAGGAGAAGCCCGGT TAAATCCAGGATGTAGTCATC-3'

Aclaraciones: la secuencia que se muestra en negrita se corresponde con el *overhang* necesario para la clonación del inserto correspondiente mediante el método de clonación independiente de ligación (LIC).

Abreviaturas: **Ct:** *Chaetomium thermophilum*, **Hs:** *Homo sapiens*, **Fw:** cebador directo, **Rw:** cebador reverso.

3.1.3 Protocolo de clonación independiente de ligación.

Una vez amplificados los genes de interés, estos fueron clonados en los distintos vectores (pNKI, pGKI o pMBKI) empleando la técnica de clonación independiente de ligación (LIC) (Aslanidis y de Jong, 1990). Esta técnica se basa en el uso la enzima T4 ADN polimerasa, que gracias a su actividad exonucleolítica en sentido 3'-5' es capaz de crear extremos cohesivos y complementarios en el plásmido y el inserto empleados. El inserto (gen de interés) debe ser previamente amplificado empleando cebadores dotados de una secuencia específica (*overhang*) en su extremo 5' que sea compatible con el vector en el que va a ser clonado (apartado 3.1.2 y Tabla 3.3). Por su parte, el vector debe ser digerido previamente con el enzima de restricción KpnI según el siguiente protocolo:

- 2,5 Unidades de KpnI (New England Biolabs, ref. R3142S).
- 5µl de tampón NEB I de reacción 10x (New England Biolabs, ref. B7001S).
- 1µg de plásmido circularizado.

La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 3 horas en un volumen final de 50 µl (completado con H₂O miliQ). Transcurrido este tiempo se verificó la linealidad del vector mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1.2. El producto de la reacción fue purificado usando el kit NZYGelpure (NZYTech, ref. MB011) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, el vector lineal y el inserto fueron sometidos por separado a una reacción de digestión con la enzima T4 ADN polimerasa (Thermo Scientific™, ref. EP0061). Para ello se empleó un volumen final de 20 µl constituido por 4 µl de tampón de reacción 5x específico para T4 ADN polimerasa (Thermo Scientific™, ref. EP0061); 0,5 µl de dTTP (vector lineal) o dATP (inserto) a 100 mM; 15,3 µl de ADN (correspondiente a 0,1-0,2 pmol de inserto/vector lineal) y 1 Unidad de T4 ADN polimerasa. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min, a continuación, la enzima fue inactivada mediante un choque térmico de 10 minutos a 70°C.

Por último, el vector lineal y el inserto fueron mezclados en proporción de masa 1:3 o 1:4, y esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron entonces 2µl de 50 mM EDTA y la mezcla fue transformada en la cepa de interés de *Escherichia coli*. Para la sobre-expresión y purificación de las distintas construcciones de interés se empleó la cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL, mientras que para la amplificación de los distintos plásmidos se empleó la cepa DH5α. Ambas cepas bacterianas de *Escherichia coli* proceden de la empresa Stratagene® (San Diego, California, USA).

3.1.4 Transformación de la mezcla vector lineal/inserto en *Escherichia coli*.

La mezcla vector lineal/inserto fue transformada por choque térmico en 50 µl de células de *Escherichia coli* químicamente competentes (cepa DH5α). Una vez añadida la mezcla, las células fueron mantenidas en hielo durante 30 minutos. A continuación, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y 30 segundos, seguido de otra incubación de 5 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo las células fueron diluidas en 200 µl de medio Luria Broth (LB) (Condalab, ref. 1551) y fueron incubadas a 37°C durante 1 hora con agitación constante de 500 rpm. Por último, las células transformadas fueron plaqueadas en una placa de LB-Agar suplementada con kanamicina a una concentración final de 33 µg/ml. Las placas fueron incubadas durante un mínimo de 12 horas a 37°C antes de comprobar la formación de colonias.

Se llevó a cabo una PCR de colonias a fin de verificar la presencia del plásmido de interés en las colonias crecidas en la placa. Esta PCR fue llevada a cabo empleando el enzima FirePol® (Solis Biodyne, ref. 01-01-00500) y los cebadores específicos para cada gen de interés (Tabla 3.3). Cada PCR se llevó a cabo a partir de 6 colonias diferentes obtenidas en una misma transformación que se suspendieron por separado en la mezcla de reacción. La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 2 µl de tampón BD 10x; 2,5 mM de MgCl₂; 0,3 µM de cada cebador (directo y reverso); la mezcla de dNTPs (200 µM de cada tipo) y 1U de enzima FirePol®. El protocolo de PCR fue el siguiente: 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de amplificación (95°C durante 45 segundos, 45 segundos a la T_m deseada (ver Anexo 6), 72°C durante 1 minuto/Kb). Por último, la muestra se calentó a 72°C durante 10 minutos. Se visualizó el resultado de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) según las indicaciones del apartado 3.1.2. Se identificaron las colonias positivas como aquellas en las que aparece amplificado el gen de interés.

Las colonias aisladas positivas de cada transformación se inocularon por separado en 10 ml de medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 33 µg/ml. Tras una incubación a 37°C durante un mínimo de 12 horas a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™), se recogieron las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada (4°C) y los plásmidos fueron extraídos empleando el kit NZYMiniprep (NZYTech, ref. MB010) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una secuenciación rutinaria de cada gen de interés a cargo de la empresa Humanizing Genomics MacroGen (MacroGen Inc, Madrid), a fin de descartar la presencia de mutaciones. Para cada construcción se seleccionó un plásmido sin mutaciones que fue empleado en lo sucesivo. Los distintos plásmidos fueron conservados a -20°C.

Adicionalmente, cada plásmido de interés fue transformado en la cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL de *Escherichia coli*. Para la transformación en esta cepa bacteriana se siguió el mismo protocolo ya descrito para la cepa DH5α, con las salvedades de que el choque térmico a 42°C se mantuvo durante 45 segundos y se emplearon 50 ng de cada plásmido de interés que fueron mezclados con 50 µl de células. Con esta cepa bacteriana se emplearon placas de LB-Agar y medio LB líquido suplementado con kanamicina y cloranfenicol ambos a una concentración final de 33 µg/ml.

Se prepararon glicerizados a partir de ambas cepas de *Escherichia coli* DH5α y BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL transformadas por separado con cada plásmido de interés. Para ello se mezclaron 750 µl de cultivo bacteriano transformado y crecido en medio LB suplementado con los antibióticos apropiados (kanamicina 33 µg/ml para la cepa DH5α de *E.coli*; y kanamicina y cloranfenicol a 33 µg/ml para la cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL de *E.coli*) y 250 µl de glicerol estéril al 87% (v/v) (concentración final de 21,75% (v/v)). Los distintos glicerizados fueron mantenidos a -80°C hasta su uso.

3.2 Expresión de las distintas construcciones de interés.

Todas las construcciones de interés fueron expresadas empleando la cepa BL21 (DE3) CodonPlus RIPL de *Escherichia coli* como organismo de expresión heteróloga.

A fin de determinar las condiciones óptimas de expresión de cada construcción, se llevaron a cabo ensayos de expresión a pequeña escala empleando diferentes condiciones. En cada caso se seleccionaron las condiciones de expresión en las que se observó la producción de proteína soluble. Estas condiciones fueron empleadas para la expresión a gran escala de las distintas construcciones. Los protocolos de expresión y purificación a pequeña y gran escala se llevaron a cabo suplementando el medio de cultivo correspondiente con kanamicina 33 µg/ml (resistencia propia del plásmido de expresión pET28-NKI/LIC 6His/3C y sus variantes pGKI y pMBKI) y cloranfenicol 33 µg/ml (resistencia de la cepa bacteriana BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL de *E.coli*).

3.2.1 Protocolo de expresión y purificación a pequeña escala.

Se llevaron a cabo paralelamente dos protocolos de expresión:

- **Expresión mediante isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).** Se realizó un inóculo a partir del glicerizado correspondiente en 10 ml de medio Luria Broth (LB) suplementado con kanamicina y cloranfenicol a una concentración final de 33 µg/ml para cada antibiótico. Este

pre-cultivo fue incubado durante un mínimo de 12 horas a 37°C con agitación constante de 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™) hasta llegar a la fase de saturación. 50µl de este pre-cultivo fueron inoculados en un nuevo cultivo de 10 ml de LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol a 33 µg/ml. Este nuevo cultivo fue incubado a 37°C en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD₆₀₀ comprendida entre 0,6 y 0,8. La expresión de la proteína fue entonces inducida añadiendo la concentración final deseada de IPTG (0,1-0,2 mM). El cultivo fue incubado a 20°C durante 12 h con agitación constante a 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™). Alternativamente, se añadió una concentración final de IPTG de entre 1 y 0,6 mM y el cultivo se incubó durante 3-5 horas a 37°C con agitación constante (180 rpm) en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™).

- **Expresión mediante protocolo de autoinducción.** Se siguió el método descrito por Studier en 2005 (Studier 2005). Se realizó un inóculo a partir del glicerinado correspondiente en 9,3 ml de medio ZY suplementado con 10 µl de 1M MgCl₂ (concentración final 1 mM), 500 µl de NPS 20x; 0,8% (p/v) de glucosa y los antibióticos correspondientes (kanamicina y cloranfenicol a 33 µg/ml). Se dejó crecer el cultivo a 37°C durante 12 horas en agitación constante de 180 rpm empleando un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™). Se emplearon 50 µl de este pre-cultivo para inocular otro cultivo preparado siguiendo la misma receta, con la salvedad de que la glucosa fue sustituida por 200 µl de reactivo 5052 50x. Este segundo cultivo fue incubado a 37°C con agitación constante de 180 rpm en un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™) hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8-1,2. Entonces se disminuyó la temperatura a 20°C y se continuó incubando durante 12 horas.

Composición de reactivos: ZY (1% (p/v) de triptona; 0,5% (p/v) de extracto de levadura), NPS 20x (0,5 M (NH₄)₂SO₄, 1M KH₂PO₄, 1M Na₂HPO₄), 5052 50x (25% (v/v) glicerol; 2,5% (p/v) glucosa, 10% (p/v) α-lactosa).

Al finalizar ambos protocolos de expresión, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min a 4°C. Las células fueron resuspendidas en 1ml de PBS y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Los precipitados celulares así obtenidos fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

A fin de comprobar la producción de proteína soluble en las distintas condiciones de expresión, se llevó a cabo un protocolo de purificación a pequeña escala con los distintos precipitados celulares obtenidos. Para ello cada precipitado celular fue resuspendido en 500 µl de tampón de lisis preparado en HEPES pH 7,5 según la receta descrita en la Tabla 3.6. Se añadieron 500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (Scientific Industries, SI™, ref. SI-BG05), y la mezcla fue lisada en 10 ciclos intermitentes de 30 segundos a 7500 rpm empleando un equipo Precellys® Evolution (Bertin Instruments). Esta mezcla lisada se centrifugó a 21000 x g durante 20 minutos a 4°C. Se recogió la fracción soluble (aproximadamente 500 µl), que fue incubada con 100 µl de resina de Níquel (Agarose Bead Technologies, ref. 6BCL-NTANi-X) en el caso de proteínas marcadas con una etiqueta de 6xHis, de resina de glutatión (Glutathione Sepharose® 4B Cytiva, ref. GE17-0756-01) en el caso de proteínas marcadas con una etiqueta de GST o de resina de amilosa (New England Biolabs, ref. E8021S) en el caso de proteínas marcadas con una etiqueta de MBP. Previamente a su uso, la resina fue equilibrada con H₂O miliQ seguido de tampón EM (véase Tabla 3.6).

La incubación de la resina con la proteína de interés se llevó a cabo durante 1 hora a 4°C con rotación constante. Transcurrido ese tiempo se llevaron a cabo tres lavados de la resina empleando tampón

EM (véase Tabla 3.6), y ésta fue disuelta en 30 µl de tampón de Laemmli 5x (312 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,02 % (p/v) azul de bromofenol) y calentada a 95°C durante 10 minutos a fin de provocar la disociación de las proteínas unidas a ella. Las muestras de interés correspondientes a las distintas etapas de este proceso de purificación fueron visualizadas mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) empleando geles al 10% (v/v) de acrilamida. Para cada una de las construcciones empleadas en este estudio se seleccionaron las condiciones óptimas para su expresión en base a los resultados de este experimento (Tabla 3.5). Todas las centrifugaciones a las que se sometió la resina durante su equilibrado y los lavados posteriores se llevaron a cabo a una velocidad máxima de 6000 x g durante 1 minuto a 4°C.

3.2.2 Protocolo de expresión a gran escala.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión de cada construcción (resumidas en la Tabla 3.5), se llevó a cabo su expresión a gran escala. Para ello se emplearon las mismas condiciones descritas en el apartado 3.2.1 empleando un volumen final de 1 litro de cultivo. En la Tabla 3.4 se enumeran las distintas proteínas empleadas en este estudio, así como las construcciones generadas con cada de ellas.

- **Protocolo de autoinducción:** se empleó el método descrito por Studier en 2005 (Studier 2005) . Para ello se llevó a cabo un pre-cultivo en 9,3 ml de medio ZY suplementado con 10 µl de 1M MgCl₂ (1 mM de concentración final), 500 µl de NPS 20x; 0,8% (p/v) de glucosa y los antibióticos kanamicina y cloranfenicol a una concentración final de 33 µg/ml cada uno. Este pre-cultivo se inoculó con un glicerinado de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL transformada con el plásmido de interés. Se incubó el pre-cultivo durante 12 horas a 37°C en agitación constante. A continuación, se inocularon 5 ml de este pre-cultivo en 1L de medio ZY suplementado con 1ml de 1M MgCl₂ (1mM de concentración final), 50 ml de NPS 20x, 20 ml de 5052 50x y los antibióticos kanamicina y cloranfenicol a una concentración final de 33 µgr/ml cada uno. Este nuevo cultivo se dividió en dos matraces Erlenmeyer con 500 ml de cultivo cada uno.

Tabla 3.4 Proteínas empleadas en este estudio para las distintas construcciones de interés.

Proteína	aas	Código UniProt	Origen	Construcciones
ctNOC2	788	G0SD05	<i>Chaetomium thermophilum</i>	6xHis-NOC2, 6xHis-NOC2 (1-771 aa)
ctNOG1	661	G0S8F1	<i>Chaetomium thermophilum</i>	6xHis-NOG1, MBP-NOG1
hsNOG1	634	Q9BZE4	<i>Homo sapiens</i>	GST-TAT-NOG1 (351-412 aa)
ctMAK5	767	G0SA42	<i>Chaetomium thermophilum</i>	GST-MAK5, 6xHis-MAK5 (192-616 aa)
ctHAS1	556	G0RYU9	<i>Chaetomium thermophilum</i>	MBP-HAS1, 6xHis-HAS1 (1-320 aa)
ctCIC1	391	G0S7X0	<i>Chaetomium thermophilum</i>	6xHis-CIC1
cteIF6	246	G0S683	<i>Chaetomium thermophilum</i>	6xHis-eIF6

Abreviaturas: ct: *Chaetomium thermophilum*. hs: *Homo sapiens*. aas: aminoácidos

Ambos matraces fueron incubados a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8-1,2. Entonces se bajó la temperatura hasta los 20°C y se incubaron los cultivos durante 12 horas en agitación constante. Todas las incubaciones mencionadas fueron realizadas empleando un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™) manteniendo una agitación constante de 180 rpm. Los reactivos NPS 20x y 5052 50x se prepararon según las recetas descritas en el apartado 3.2.1.

Tabla 3.5: Condiciones de expresión y purificación de las distintas construcciones empleadas en este estudio.

Construcción	aas	kDa	Organismo de expresión	Método de expresión	Método de purificación
6xHis-NOC2	1-788	91,8	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	HisTrap-EM
6xHis-NOC2 (1-771 aa)	1-771	90	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	HisTrap-IEX
6xHis-NOG1	1-661	77,7	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	HisTrap-EM
MBP-NOG1	1-661	117,4	<i>E. coli</i> (BL21C+)	0,6 mM IPTG (5h a 37°C)	MBPTrap-EM
MBP-HAS1	1-556	103,8	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	MBPTrap-EM
6xHis-HAS1 (1-320 aa)	1-320	37,3	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	HisTrap-EM
GST-MAK5	1-767	112	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	GSTrap-IEX
6xHis-MAK5 (192-616 aa)	192-616	49,2	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	HisTrap-EM
6xHis-CIC1	1-391	45,8	<i>E. coli</i> (BL21C+)	Autoinducción	HisTrap-EM
6xHis-eIF6	1-246	28,6	<i>E. coli</i> (BL21C+)	0,2 mM IPTG (12h a 20°C)	HisTrap-EM
GST-TAT-NOG1 (351-412 aa)	351-412	36	<i>E. coli</i> (BL21C+)	1 mM IPTG (3h a 37°C)	GSTrap-EM

Abreviaturas: **EM:** cromatografía de exclusión molecular. **IEX:** cromatografía de intercambio iónico (Ion Exchange Chromatography). **BL21 C+:** cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL de *Escherichia coli*. **aas:** aminoácidos. **6xHis:** etiqueta de 6 residuos de His. **MBP:** etiqueta de proteína de unión a maltosa (Maltose Binding Protein). **GST:** etiqueta de Glutación-S-transferasa. **HisTrap, MBPTrap, GSTrap:** cromatografía de afinidad para proteínas marcadas con 6xHis, MBP y GST respectivamente. **kDa:** peso molecular en Kilo Dalton.

- **Expresión mediante isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).** Se emplearon 10 ml de medio LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol a una concentración final de 33 µg/ml cada uno. Este medio de cultivo fue inoculado con un glicerinado de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL transformada con el plásmido de interés. Este pre-cultivo se incubó durante 12 horas a 37°C en agitación constante. Se inocularon 5 ml de este pre-cultivo en 1 litro de medio LB suplementado con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol a una concentración final de 33 µgr/ml

cada uno. Este segundo cultivo se dividió en 2 matraces Erlenmeyer conteniendo 500 ml de cultivo cada uno, que fueron incubados a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-0,8. Entonces se indujo la expresión de la proteína correspondiente mediante la adición de la concentración apropiada de IPTG (véase Tabla 3.5). Se mantuvo el cultivo a 20°C durante 12 horas en agitación constante. Alternativamente, el cultivo fue incubado durante 3-5 horas a 37°C en agitación constante antes de su procesamiento. Todas las incubaciones mencionadas fueron realizadas empleando un incubador Innova® 43 Incubator Shaker (New Brunswick™) manteniendo una agitación constante de 180 rpm.

En ambos protocolos, tras el período de incubación correspondiente las células fueron recogidas mediante centrifugación a 4000 x g durante 35 minutos empleando una centrífuga refrigerada (4°C). Se llevó a cabo un lavado con 35 ml de PBS seguido de otra centrifugación en las mismas condiciones. El precipitado celular resultante se almacenó a -80°C hasta su procesamiento en alícuotas correspondientes a 500 ml de cultivo cada una.

3.2.3 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Todas las electroforesis llevadas a cabo en este trabajo se realizaron en condiciones desnaturizantes mediante el empleo de SDS (dodecil sulfato sódico). Se emplearon geles constituidos por una parte superior/concentradora al 5% (v/v) de acrilamida y una parte inferior/separadora al 10% (v/v) de acrilamida. Excepcionalmente se emplearon geles al 15% (v/v) de acrilamida en la parte inferior/separadora al trabajar con la construcción GST-TAT-NOG1 (351-412 aa) y su forma digerida TAT-NOG1 (351-412 aa). Los geles utilizados en procesos de purificación de proteínas se prepararon con un grosor de 0,75 milímetros. En los experimentos de western blot a partir de extractos celulares (apartado 3.5.5.2) se utilizaron geles con un grosor final de 1 mm. Para la preparación de los geles se empleó una solución comercial de acrilamida al 40% (v/v) (Acrylamide-4K Solution, Mix 37,5:1, PanReac AppliChem, ref. A1672).

Para la parte inferior/separadora de un gel al 10% (v/v) de 0,75 mm de espesor se necesita un volumen total de 4,2 ml con la siguiente mezcla: 1,05 ml de 1M Tris-HCl pH 8,8; 1,05 ml de acrilamida 40% (v/v); 42 µl de persulfato de amonio (APS) al 10% (p/v); 42 µl de SDS al 10% (p/v), 5 µl N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 2,1 ml de H₂O miliQ. Para prevenir el contacto con el oxígeno que inhibe la polimerización y alinear el frente, se añadieron unos microlitros de 2-propanol sobre la parte separadora. La parte superior/concentradora del gel al 5% (v/v) de acrilamida fue una mezcla de 117 µl de 1M Tris-HCl pH 6,8; 174 µl de acrilamida al 40% (v/v); 14 µl de APS al 10% (p/v); 14 µl de SDS al 10% (p/v); 1,4 µl de TEMED y 1,02 ml de H₂O miliQ. En el caso de geles preparados con un espesor de 1 mm se siguieron las mismas recetas doblando las cantidades de los distintos reactivos y manteniendo la misma proporción entre los mismos. Para la preparación de geles al 15% (v/v) se siguió la siguiente receta (correspondiente a la parte inferior/separadora): 1,05 ml de 1M Tris-HCl pH 8,8; 1,575 ml de acrilamida 40% (v/v); 42 µl de persulfato de amonio (APS) al 10% (p/v); 42 µl de SDS al 10% (p/v), 5 µl N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 1,575 ml de H₂O miliQ. La parte superior/concentradora se preparó al 5% (v/v) de acrilamida siguiendo la receta ya mencionada.

Las electroforesis se realizaron en cubetas Mini PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) conectadas a una fuente PowerPac™ Basic (Bio-Rad).

Las muestras de interés fueron preparadas con tampón de Laemmli 5x (312 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 0,02 % (p/v) azul de bromofenol) y fueron calentadas a 95°C durante 10 minutos antes de cargarse en el gel. En el caso de muestras procedentes de un proceso de purificación a pequeña (apartado 3.2.1) o gran escala (apartado 3.3) o para ensayos de precipitación (apartado 3.4.5) o ensayos de interacción con ácido poliuridílico (apartado 3.4.6), se empleó una corriente de 150V durante 45 minutos y se empleó 25 mM Tris-HCl, 190 mM Glicina y 0,1% (p/v) SDS como tampón de electroforesis. En el caso de geles realizados en el contexto de un experimento de western blot (apartados 3.4.8 y 3.5.5.2) se empleó una corriente de 90V durante 90 minutos y MOPS-SDS (Alfa Aesar, ref. J62847) como tampón de electroforesis (1M MOPS, 1M Tris, 2% (p/v) SDS, 20 mM EDTA a pH 7,7). En ambos casos tras la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie Blue Brilliant G (Sigma-Aldrich, ref. B0770) (2,5 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue G, 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético, 50% (v/v) H₂O destilada) y se destiñeron con una solución 10% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético y 80% (v/v) de H₂O destilada.

3.3 Purificación a gran escala de las proteínas de interés.

En todos los casos se empleó un protocolo de purificación análogo que se describe a continuación. Los tampones empleados en los distintos pasos se describen en la Tabla 3.6, con las excepciones mencionadas.

3.3.1 Lisis celular y preparación de extractos de proteínas.

El precipitado celular de interés (correspondiente a 500 ml de cultivo) fue descongelado y disuelto en 50 ml de tampón de lisis suplementado con una pastilla de inhibidor de proteasas libre de EDTA (cCOMPLETE Protease cocktail EDTA-free, Roche, ref. 5056489001). La mezcla fue sonicada durante 30 minutos mediante un sonicador Vibra-Cell™ W75042 (Bioblock Scientific) empleando pulsos intermitentes de 1 segundo de duración. La muestra sonicada fue centrifugada a 16500 x g durante 35 minutos a 4°C empleando una centrífuga Sorvall™ RC6 Plus con un rotor SS-34 (Thermo Scientific™). Tras la centrifugación, el precipitado obtenido fue descartado y el sobrenadante se filtró manualmente empleando un filtro de 0,45 μ m (VWR®, ref. 514-1262) a fin de eliminar posibles restos celulares. Se tomaron muestras del precipitado y el sobrenadante para su visualización en un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El objetivo es comprobar la eficacia de la sonicación y la posible presencia de proteína insoluble en el precipitado.

3.3.2 Cromatografía de afinidad para proteínas etiquetadas con 6xHis (IMAC).

Las proteínas clonadas en el vector pNKI (marcadas con una etiqueta de 6xHis en su extremo amino-terminal) fueron purificadas mediante cromatografía de iones inmovilizados (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC) empleando una columna HisTrap HP (Cytiva) de 1 ml (ref. 17524701) ó 5 ml (ref. 17524802). La columna fue equilibrada con 10 volúmenes de columna de H₂O miliQ seguido de 10 volúmenes de columna de tampón A (His). El lisado celular previamente filtrado se cargó en la columna mediante una bomba peristáltica (Minipuls®3, Gilson) y se recogió la fracción no unida para su posterior visualización en un gel de electroforesis SDS-PAGE. Una vez cargada con el lisado celular, la columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de tampón A (His) a fin de eliminar proteínas contaminantes unidas inespecíficamente.

La elución de la proteína de interés se llevó a cabo mediante cromatografía FPLC empleando un equipo ÄKTAPurifier (GE Healthcare). Se generó un gradiente de concentración de imidazol mediante la combinación del tampón A (His) con una proporción creciente del tampón B (His). Se recogieron fracciones de 1 ó 5 ml según el tamaño de la columna empleada. Se empleó el programa Unicorn 4.0 para la visualización de los cromatogramas correspondientes en base a la absorbancia a 280 nm de las distintas fracciones. A fin de detectar la presencia de la proteína de interés en las fracciones obtenidas, se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según las indicaciones del apartado 3.2.3. Las fracciones con mayor presencia de la proteína de interés y menor cantidad de proteínas contaminantes fueron seleccionadas para la siguiente etapa de purificación.

3.3.3 Cromatografía de afinidad para proteínas etiquetadas con GST.

Las proteínas clonadas en el vector pGKI (marcadas con una etiqueta de GST en su extremo amino-terminal) fueron purificadas mediante una columna GSTrap HP (Cytiva) de 1 ml (ref. 17528101) ó 5 ml (ref. 17528202). La columna fue previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna de H₂O miliQ seguido de 10 volúmenes de columna de tampón A (GST). Se cargó el lisado celular mediante una bomba peristáltica (Minipuls[®] 3, Gilson) y a continuación se pasaron otros 5 volúmenes de columna de tampón A (GST) a fin de eliminar proteínas contaminantes unidas inespecíficamente. La proteína de interés fue eluida mediante una cromatografía FPLC empleando un equipo ÄKTAPurifier (GE Healthcare). Para ello se generó un gradiente de glutatión empleando los tampones A (GST) y B (GST) en proporción variable. Se recogieron fracciones de 1 ó 5 ml en función del volumen de la columna utilizada. Se visualizaron los cromatogramas correspondientes mediante el programa Unicorn 4.0 en base a la absorbancia a 280 nm. La presencia de la proteína de interés en las fracciones obtenidas fue detectada mediante electroforesis SDS-PAGE (apartado 3.2.3). Las fracciones con mayor concentración de la proteína de interés y menor cantidad de proteínas contaminantes fueron seleccionadas para la siguiente etapa de purificación.

3.3.4 Cromatografía de afinidad para proteínas etiquetadas con MBP.

En el caso de las proteínas clonadas en el vector pMBKI (y por tanto marcadas con una etiqueta de MBP en su extremo amino-terminal), se empleó una columna MBPTrap HP (Cytiva) de 1 ml (ref. 28918778) ó 5 ml (ref. 28918780) para su purificación mediante cromatografía de afinidad. Se siguió el mismo protocolo que en los casos anteriores (apartados 3.3.2 y 3.3.3) empleando los tampones A y B (MBP). En el caso particular de la proteína MBP-HAS1, debido a la baja unión que presenta esta construcción a la resina de la columna se realizaron tres pases sucesivos del lisado celular por la columna antes de proceder a la elución de la proteína.

3.3.5 Cromatografía de intercambio iónico (IEX).

Esta técnica de cromatografía se utilizó para la segunda etapa de purificación de las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa) y GST-MAK5 (Tabla 3.5). Para este tipo de cromatografía se emplearon las columnas HiTrap SP HP (Cytiva, ref. 17115101) y HiTrap Q HP (Cytiva, ref. 17115301), ambas de 1ml. La primera es una columna de intercambio catiónico, utilizada para la eliminación de ácidos nucleicos contaminantes y proteínas cuya carga neta sea negativa. Para utilizar esta columna el pH

de los tampones empleados debe ser al menos 1 unidad inferior al punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés, a fin de garantizar que ésta presente una carga neta positiva y sea por tanto capaz de unirse a la resina cargada negativamente de la columna. Por otro lado, la columna HiTrap Q HP se emplea para hacer cromatografía de intercambio aniónico, a fin de eliminar proteínas contaminantes cuya carga neta sea positiva.

Tabla 3.6: Composición de los tampones empleados en el proceso de purificación.

Tampón de lisis	Tampón A (His)	Tampón B (His)
50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5
500 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
10% (v/v) Glicerol	5% (v/v) Glicerol	5% (v/v) Glicerol
5 mM β -mercaptoetanol	2 mM β -mercaptoetanol	2 mM β -mercaptoetanol
0,1% (v/v) Tritón X-100	20 mM Imidazol	500 mM Imidazol

Tampón A (IEX)/EM*	Tampón B (IEX)
50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5
150 mM NaCl	1M NaCl
5% (v/v) Glicerol	5% (v/v) Glicerol
2 mM β -mercaptoetanol	2 mM β -mercaptoetanol

Tampón A (GST)	Tampón B (GST)
50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5
150 mM NaCl	150 mM NaCl
5% (v/v) Glicerol	5% (v/v) Glicerol
2 mM β -mercaptoetanol	2 mM β -mercaptoetanol
	20 mM L-glutación reducido

Tampón A (MBP)	Tampón B (MBP)
50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5
150 mM NaCl	150 mM NaCl
5% (v/v) Glicerol	5% (v/v) Glicerol
2 mM β -mercaptoetanol	2 mM β -mercaptoetanol
	10 mM Maltosa

*Los tampones A (IEX) y EM tienen la misma composición.

Abreviaturas: **EM:** cromatografía de exclusión molecular. **IEX:** cromatografía de intercambio iónico (Ion Exchange Chromatography). **Excepciones:** la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) fue purificada empleando tampón A (His), B (His) y tampón de lisis para la cromatografía de afinidad, así como tampones A (IEX) y B (IEX) preparados en 50 mM MES pH 6,5. La construcción 6xHis-NOG1 fue purificada empleando tampón A (His), B (His) y tampón de lisis, así como tampón EM preparados en 50 mM Tris pH 8.

En este caso el pH de los tampones debe ser al menos 1 unidad superior a pI de la proteína de interés, a fin de garantizar que ésta presente carga neta negativa y se una a la resina cargada positivamente de la columna. La columna de elección fue previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna de H₂O miliQ seguido de otros 10 volúmenes de columna de tampón A (IEX) (con baja concentración de NaCl). Las fracciones seleccionadas en el anterior proceso de purificación (cromatografía de afinidad) se juntaron y se cargaron en la columna pre-equilibrada mediante una bomba peristáltica (Minipuls[®]3, Gilson). Se recogió la fracción no unida a fin de descartar la posible presencia de la proteína de interés. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de tampón A (IEX) a fin de eliminar proteínas contaminantes unidas inespecíficamente.

La elución de la columna se llevó a cabo mediante cromatografía FPLC empleando el mismo sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare) empleado para realizar cromatografías de afinidad (apartados 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4). Se generó un gradiente de concentración salina empleando los tampones A y B (IEX) con una creciente proporción de tampón B (IEX). Se utilizó el programa Unicorn 4.0 para la visualización de los correspondientes cromatogramas en base a la absorbancia a 280 nm. La presencia de la proteína de interés en las distintas fracciones obtenidas fue detectada mediante electroforesis SDS-PAGE (apartado 3.2.3). Las fracciones con mayor presencia de la proteína de interés fueron seleccionadas para su concentración (apartado 3.3.8).

3.3.6 Cromatografía de exclusión molecular (EM).

Todas las construcciones de interés, con la excepción de 6xHis-NOC2 (1-771 aa) y GST-MAK5, se terminaron de purificar mediante una cromatografía de exclusión molecular, a fin de eliminar posibles proteínas contaminantes presentes en la anterior etapa de purificación y posibles agregados de la proteína de interés. Para ello se utilizó una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, ref. GE17-5175-01) de 24 ml de volumen de columna, o bien una columna Superdex 200 Hiload 16/60 (GE Healthcare, ref. GE28-9893-35) de 120 ml de volumen de columna. La elección de la columna dependió de la cantidad de proteína disponible al llegar a este paso de purificación. En el caso de disponer de poca cantidad de proteína (menos de 4 mg) se eligió la columna Superdex 200 10/300 GL, a fin de minimizar la pérdida de proteína durante esta etapa de purificación. Las fracciones de interés procedentes de la etapa anterior de purificación (cromatografía de afinidad) fueron concentradas empleando filtros Amicon[™] Ultra con la amplitud de poro adecuada para cada proteína (Amicon[™] Ultra Centrifugal Filter Units, Merck, ref. UFC801). La columna de elección fue equilibrada con 2 volúmenes de columna de H₂O miliQ seguidos de 2 volúmenes de columna de tampón EM (Tabla 3.6). Según las especificaciones de la columna, la proteína de interés fue concentrada hasta un volumen final de 200-500 µl en el caso de la columna Superdex 200 10/300 GL o hasta un volumen final de 2-4 ml en el caso de la columna Superdex 200 Hiload 16/60. La proteína concentrada fue cargada manualmente en la columna mediante jeringa. En el caso de la columna Superdex 200 10/300 GL, la cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente empleando el equipo ÄKTA Purifier (GE Healthcare), mientras que en el caso de la columna Superdex 200 Hiload 16/60 se utilizó el equipo ÄKTA Prime (GE Healthcare) manteniendo la temperatura a 4°C. En ambos casos se utilizó el programa Unicorn 4.0 para visualizar los correspondientes cromatogramas en base a la absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas. Se recogieron fracciones de 300 µl en el caso de la columna Superdex 200 10/300 GL, y de 5 ml al utilizar la columna Superdex 200 Hiload 16/60.

Se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE (apartado 3.2.3) a fin de detectar la presencia de la proteína de interés en las fracciones obtenidas. Por último, las fracciones con la proteína de interés

fueron concentradas mediante un filtro Amicon™ Ultra con el tamaño de poro adecuado hasta alcanzar un volumen final de 50-500 µl y una concentración de 1-20 mg/ml (en función del rendimiento de cada purificación) (apartado 3.3.8). Se prepararon alícuotas de 50 µl que fueron cuantificadas (apartado 3.3.9) e inmediatamente congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso.

3.3.7 Digestión de las construcciones de interés con la proteasa PreScission.

En algunos experimentos se hizo necesario eliminar la etiqueta (6xHis, GST o MBP) asociada al extremo amino-terminal de las distintas construcciones. Para ello se utilizó la enzima proteasa 14 3C de rinovirus humano asociada a una etiqueta de GST (PreScission Protease, en adelante denominada GST-PP). Esta proteasa escinde específicamente entre los residuos glutamina (Gln) y glicina (Gly) de la secuencia de reconocimiento LeuGluValLeuPheGln/GlyPro.

La proteína de interés purificada según se describe en los apartados anteriores fue disuelta en 5-7 ml de tampón EM (Tabla 3.6) al que se añadieron 20 µg/ml de GST-PP. La digestión se mantuvo durante un mínimo de 12 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla digerida fue cargada manualmente en una columna GSTrap HP de 1 ml, a fin de eliminar la enzima GST-PP presente en el medio, que queda retenida en la columna. En el caso de proteínas marcadas con 6xHis, la mezcla se pasó a continuación por una columna HisTrap HP de 1 ml, mientras que para las proteínas marcadas con MBP se usó una columna MBPTrap HP de 1 ml. En este segundo paso se eliminaron las correspondientes etiquetas digeridas (6xHis y MBP respectivamente) así como la posible presencia de proteína no digerida. En el caso de las proteínas etiquetadas con GST, esta etiqueta junto con la proteína no digerida queda retenidas en la columna GSTrap HP, no siendo necesario el uso de una segunda columna. La fracción no retenida por las distintas columnas se concentró usando un filtro Amicon™ Ultra (Merck, ref. UFC801) con el tamaño de poro adecuado hasta alcanzar la concentración final deseada. La proteína digerida fue cuantificada (apartado 3.3.9) y usada inmediatamente o bien congelada mediante N₂ líquido y almacenada a -80°C hasta su uso. Las distintas columnas utilizadas (HisTrap HP, GSTrap HP y MBPTrap HP) fueron eluidas mediante tampón His (B), GST (B) y MBP (B) respectivamente, a fin de eliminar las distintas proteínas o etiquetas unidas a ellas antes de volver a utilizarlas.

En el caso de proteínas marcadas inicialmente con GST o MBP se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en la que se visualizó una muestra de la fracción no retenida por las distintas columnas, junto con una muestra de proteína no digerida. El objetivo es comprobar la desaparición de la correspondiente etiqueta en función del cambio en el peso molecular de la proteína digerida con respecto a la no digerida. Este último paso no se realizó con las proteínas marcadas inicialmente con 6xHis, ya que en este caso no es posible observar un cambio en la movilidad electroforética tras la digestión.

3.3.8 Concentración de proteínas purificadas.

Las distintas proteínas de interés fueron concentradas antes de ser cargadas en una cromatografía de exclusión molecular (apartado 3.3.6), antes de ser congeladas a -80°C tras la segunda etapa de purificación (exclusión molecular o intercambio iónico) o tras un proceso de digestión mediante la proteasa GST-PP (apartado 3.3.7). Para ello se emplearon filtros Amicon™ Ultra con la amplitud de

poro adecuada para cada proteína (Amicon™ Ultra Centrifugal Filter Units, Merck, ref. UFC801). Los filtros cargados con la proteína fueron centrifugados a 4000 x g en intervalos de 15-20 minutos en una centrífuga refrigerada (4°C). Al final de cada intervalo de centrifugación la proteína concentrada fue resuspendida mediante inversión a fin de evitar la formación de precipitados.

3.3.9 Cuantificación de proteínas purificadas.

Al final del proceso de purificación o digestión enzimática las proteínas de interés fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se diluyó 1 µl de la proteína concentrada en 1ml de reactivo Bradford (Bio-Rad, ref. 5000006) y se determinó la absorbancia de la mezcla a 595 nm mediante espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Para determinar la concentración de proteína se empleó una recta de calibrado realizada con distintas diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) (ThermoScientific™, ref. 23209). Alternativamente, la cuantificación se realizó mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop® (ThermoScientific™) empleando los correspondientes coeficientes de extinción molar teóricos calculados para cada construcción mediante el programa informático ProtParam (Expasy) (Walker 2005).

3.4 Ensayos funcionales y de estabilidad.

3.4.1 Ensayos de fluorimetría de barrido diferencial o termofluor.

A fin de comprobar la estabilidad térmica de las distintas construcciones se llevaron a cabo ensayos de termofluor (Pantoliano et al. 2001). Este ensayo se basa en el uso del reactivo SYPRO® Orange Protein Gel Stain (Supelco, Merck-Sigma, ref. S5692). Se trata de un reactivo que interacciona con las regiones hidrofóbicas de una proteína produciendo emisión de fluorescencia que puede ser cuantificada. De esta manera es posible monitorizar el proceso de desnaturalización de una proteína a medida que su porción hidrofóbica queda expuesta al medio e interacciona con SYPRO® Orange produciendo un aumento en la señal de fluorescencia. Para la realización de este ensayo, las construcciones 6xHis-eIF6, 6xHis-CIC1, GST-MAK5 y 6xHis-NOG1 se emplearon a una concentración final de 5 µM, mientras que 6xHis-NOC2 (1-771 aa) se empleó a 3 µM, y 6xHis-MAK5 (192-616 aa) se empleó a 2 µM de concentración final. Se preparó la proteína de interés a una concentración 10x (50, 30 o 20 µM según la concentración final requerida) disuelta en tampón EM al que se adicionó SYPRO® Orange a una concentración 50x (el reactivo comercial está a una concentración inicial de 5000x). El tampón EM fue preparado según la composición reflejada en la Tabla 3.6. En el caso de la construcción 6xHis-NOG1 el tampón EM fue preparado en Tris pH 8, mientras que para la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) se empleó tampón EM preparado en MES pH 6,5 (ver aclaraciones de la Tabla 3.6).

Para cada proteína de interés se empleó el mismo cribado de 48 condiciones (Tabla 3.7) preparado en una placa de 96 pocillos apta para qPCR (Applied Biosystems by Life Technologies). Cada condición se ensayó por duplicado en la misma placa. Para ello se mezclaron 4 µl de la mezcla proteína/SYPRO® Orange 10x/50x y 36 µl de cada condición de cribado (filas A-D de la placa). 20 µl de esta mezcla fueron transferidos al correspondiente pocillo en la segunda mitad de la placa (filas E-H). De esta manera se alcanza la concentración final de proteína deseada, mientras que la concentración final de Sypro™ Orange es de 5x, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La

placa fue entonces sellada y centrifugada 1 min a 4000 rpm antes de iniciar el ensayo. Se utilizó el sistema Fast 7500 PCR (Applied Biosystems). El ensayo se inició a 20°C y se realizaron 65 ciclos de 1 minuto en los que la temperatura aumentó sucesivamente 1°C hasta alcanzar los 85°C. Los datos fueron analizados mediante el *software* GraphPad Prism para calcular la temperatura de fusión (T_m) correspondiente a cada condición experimental. El valor de T_m se corresponde con la temperatura a la que se alcanza el 50% de la emisión máxima de fluorescencia para cada condición experimental. Este valor es un reflejo de la estabilidad térmica de la proteína en cada condición del ensayo (Ericsson et al. 2006).

Tabla 3.7: Composición de los tampones empleados en el cribado de termofluór.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
	100 mM AcNa pH 4,5	100 mM Bis Tris pH 5,5	100 mM citrato pH 5,6	100 mM cacodilato pH 6,5	100 mM MES pH 6,5	100 mM Hepes pH 7	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Fosfato pH 7,5	100 mM Tris pH 8	100 mM Tris pH 8,5	100 mM Bicina pH 9	100 mM CHES pH 9,5
B	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
	100 mM SPG 4,5	100 mM SPG 5,5	100 mM SPG 6,5	100 mM SPG 7,5	100 mM SPG 8	100 mM SPG 9	100 mM MMT 4,5	100 mM MMT 5,5	100 mM MMT 6,5	100 mM MMT 7,5	100 mM MMT 8	100 mM MMT 9
C	Hepes pH 7,5	100 mM NaCl	250 mM NaCl	500 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
		Hepes pH 7,5	Hepes pH 7,5	Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5
					5% Glicerol	10% Glicerol	15% Glicerol	1 mM MgCl ₂	1 mM CaCl ₂	0,1 mM ZnCl ₂ 0,1 mM CoCl ₂	1 mM CdCl ₂ 1 mM MnCl ₂	1 mM DTT
D	150 mM NaCl	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
	100 mM Hepes pH 7,5	150 mM LiCl ₂	150 mM KCl	150 mM NaF	150 mM SO ₄ NH ₄	150 mM NO ₃ NH ₄	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 7,5
	1 mM EDTA						100 mM Sacarosa	300 mM Sacarosa	0,5 M Urea	50 mM L-Arg	100 mM Betaina	0,1% Triton X-100
										50 mM L-Glu		

3.4.2 Extracción de ARN total procedente de *Escherichia coli*.

Este ARN fue utilizado para llevar a cabo experimentos mediante la técnica EMSA, descrita en el apartado 3.4.3. Para la extracción de ARN se crecieron 10 ml de un cultivo de *Escherichia coli* (cepa DH5α) no transformado con plásmido hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6 y se recogieron las células mediante centrifugación a 4000 x g a temperatura ambiente. Estas células se resuspenden en 600 μl

de tampón de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7,4; 60 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 0,6% (v/v) Brij35; 0,2% (p/v) deoxicolato sódico y 0,02% (p/v) SDS) al que se añaden 600 µl de fenol pH 4,5 frío. Esta mezcla se agita vigorosamente durante 1 minuto y a continuación se centrifuga a 16000 x g durante 5 minutos manteniendo la centrifuga a temperatura ambiente. Se recupera la fase acuosa (superior) de la mezcla obtenida y se lleva a un tubo limpio. Se añaden 600 µl de cloroformo, se agita la mezcla durante 1 minuto y se centrifuga a 16000 x g durante 5 minutos. Se recupera la fase acuosa (superior) y se añade ADNasa I (Promega, ref. M6101) a una concentración de 2 U/100 µl de extracto de ARN. Se suplementa la mezcla con CaCl₂ a una concentración final de 10 mM. Esta mezcla se incuba durante 45-60 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Por último, se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y se deja precipitando a -20°C durante 12 horas.

El ARN total precipitado se recupera mediante centrifugación a 14800 x g durante 30 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se lava el precipitado obtenido con 500 µl de etanol al 70% frío. Se realiza otra centrifugación a 14800 x g durante 15 minutos a 4°C. Este segundo precipitado se deja secar a temperatura ambiente hasta eliminar completamente el líquido. Por último, se resuspende en tampón 50 mM HEPES pH 7,5; 135 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5% (v/v) glicerol, 5 mM β-mercaptoetanol. Tras la completa disolución del ARN en el tampón, el ARN extraído se cuantifica en un equipo Nanodrop® (ThermoScientific™) mediante medición de absorbancia a 260 nm. Se preparan alícuotas de 50 µl que se congelan a -80°C hasta su uso. Tanto el tampón de lisis como el tampón para la disolución final del ARN extraído se prepararon empleando H₂O miliQ tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) a fin de proteger el ARN extraído de la degradación mediada por ARNasas.

A modo de control de calidad en cada extracción de ARN se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) empleando tampón Tris-Acetato-EDTA (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) teñido con RedSafe (INtRON Biotechnology, ref. 21141). La electroforesis fue llevada a cabo a 100V durante 30 minutos empleando una fuente PowerPac™ Basic (Bio-Rad) (Figura 4.23 A).

3.4.3 Ensayos EMSA (electrophoretic mobility shift assay).

A fin de comprobar la capacidad de las distintas proteínas de interés de interaccionar con ácidos nucleicos se llevaron a cabo ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) (Hellman y Fried 2007). La proteína de interés fue incubada en presencia de una muestra de ácido ribonucleico total (ARN) extraído de *Escherichia coli* (apartado 3.4.2). Ambos componentes del experimento (proteína y ARN) se diluyeron en tampón 50 mM HEPES pH 7,5; 135 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5% (v/v) glicerol, 5 mM β-mercaptoetanol. Se utilizó H₂O miliQ tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) para la preparación del tampón. Se utilizaron distintas proporciones de proteína: ARN en relación de masa según las necesidades de cada experimento. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 minutos a 25°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla fue mantenida en frío. Se adicionó el volumen adecuado de tampón de carga 6x (30% (v/v) glicerol; 0,25% (p/v) azul de bromofenol) hasta alcanzar una concentración final 1x de este tampón y las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% (p/v). Se llevó a cabo la electroforesis a 4°C y un voltaje constante de 40V durante 2 horas aproximadamente hasta ver salir el frente por la parte inferior del gel. El resultado del experimento fue visualizado mediante tinción con RedSafe (INtRON Biotechnology, ref. 21141). Para la preparación del gel y la realización de la electroforesis se empleó el mismo protocolo descrito en el

apartado 3.1.2, con las modificaciones mencionadas en este apartado relativas al voltaje, temperatura y tiempo de electroforesis.

3.4.4 Ensayos enzimáticos.

A fin de cuantificar la actividad de las enzimas empleadas en este trabajo (ATPasas o GTPasas), se llevaron a cabo ensayos de determinación de la concentración de fosfato inorgánico libre (Pi) en solución. El fosfato inorgánico (Pi) es uno de los productos finales de la reacción catalizada por las enzimas con actividad ATPasa/GTPasa (Shutes y Der 2005) (Rule, Patrick, y Sandkvist 2016). Para llevar a cabo este ensayo se siguió el método colorimétrico desarrollado por Baykov en 1988 (Baykov, Evtushenko, y Avaeva 1988). Este método se basa en el uso de verde malaquita, un reactivo que en medio ácido forma complejos con el fosfato inorgánico en presencia de molibdato de amonio. Este complejo presenta absorbancia a 630 nm, lo cual permite su cuantificación mediante espectrofotometría.

El reactivo verde malaquita se preparó disolviendo 44 mg de verde malaquita en 30 ml de H₂O ultrapura (calidad miliQ). A esta mezcla se adicionaron 6 ml de H₂SO₄ 6N; 2,5 ml de molibdato de amonio al 7,5% (p/v) y 200 µl de Tween 20% (v/v). Estas cantidades fueron modificadas en función de las necesidades de cada experimento, manteniendo las mismas proporciones. Antes de su uso, la mezcla fue incubada a 30°C durante 15 min. El día del ensayo, la proteína de interés (ATPasa o GTPasa) fue incubada en presencia de diferentes concentraciones de ATP, GTP o ambos en tampón 50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 5% (v/v) glicerol. En el caso de la construcción 6xHis-NOG1 se utilizó 50 mM Tris pH 8 para preparar el tampón. Se construyó una recta patrón de Pi empleando diluciones seriadas de KH₂PO₄. Las diferentes reacciones se llevaron a cabo por triplicado en un volumen de reacción de 50 µl, empleando placas P-96 con fondo plano (Sarstedt, ref. SAR82.1581). Tras mantener la reacción durante 45 minutos a 37°C, se adicionaron 200 µl de reactivo verde malaquita a cada pocillo. La mezcla fue incubada durante 5 minutos adicionales a 37°C para permitir el desarrollo de la reacción colorimétrica. Finalmente se determinó la absorbancia a 630 nm mediante un lector de placas (Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el *software* GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.). La actividad enzimática se calculó según la siguiente formula:

$$\text{Actividad enzimática (Unidades} \times \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Concentración Pi } (\mu\text{M}) \times \text{Volumen de reacción } (\mu\text{l})}{\text{Volumen de muestra } (\mu\text{l}) \times \text{Tiempo de reacción (min)}}$$

Donde el volumen de muestra es 50 µl, el volumen de reacción son 250 µl (50 µl de volumen de muestra y 200 µl de reactivo verde malaquita) y el tiempo de reacción son 45 minutos. La concentración de Pi correspondiente a cada reacción se obtuvo mediante intrapolación a partir de la recta de calibrado realizada con KH₂PO₄. Se emplearon los valores de absorbancia obtenidos en cada condición experimental.

La actividad enzimática se expresa en Unidades /Litro. Una Unidad es la cantidad de enzima (ATPasa o GTPasa) necesaria para la producción de 1µmol de Pi por minuto en las condiciones de reacción empleadas.

3.4.5 Ensayos de precipitación.

El objetivo de este ensayo es determinar la capacidad de interacción física entre una pareja de proteínas previamente purificadas. En cada experimento se emplearon 100 μ l de resina y 200 μ g de la proteína de interés que actúa como cebo (marcada con una etiqueta que le permita unirse a la resina utilizada). Puesto que en este ensayo se emplean proteínas-cebo marcadas con MBP, se empleó una resina de amilosa (New England Biolabs, ref. E8021S). Esta resina fue previamente equilibrada con H₂O miliQ seguida de tampón EM (Tabla 3.6) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,001% (p/v). Este tampón fue utilizado durante todo el proceso descrito en este apartado. Se añadieron 200 μ g de proteína-cebo a la resina equilibrada empleando un volumen final de tampón de 500 μ l. La mezcla se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación constante mediante rotación. Se hicieron tres lavados con tampón y la resina fue mezclada con una cantidad equimolar de la proteína candidata de unión contenida en 500 μ l de tampón.

Esta segunda proteína debe estar marcada con una etiqueta distinta de la que presenta la proteína-cebo. Esta mezcla de las dos proteínas con resina volvió a incubarse durante 1 hora a 4°C en agitación constante mediante rotación. Tras esta segunda incubación, se repitieron los tres lavados con tampón, a fin de eliminar el exceso de proteína no unida. Se adicionaron entonces 30 μ l de tampón de Laemmli 5x (312 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 0,02 % (p/v) azul de bromofenol), y la resina fue calentada a 95°C durante 10 minutos, a fin de provocar la separación de las proteínas adheridas a ella. Por último, la resina se centrifugó y se recogió el tampón de Laemmli conteniendo las proteínas separadas (fracción de elución de la resina). Además de esta fracción, se prepararon muestras correspondientes a las dos proteínas empleadas en cada experimento (MBP-HAS1/6xHis-CIC1 o MBP-NOG1/6xHis-eIF6) por separado. Estas tres fracciones fueron visualizadas en un gel SDS-PAGE al 10% (v/v) de acrilamida siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3. Se verificó la capacidad de unión de cada pareja de proteínas en función de la presencia o ausencia de la segunda proteína (6xHis-CIC1/6xHis-eIF6) en la fracción de elución conteniendo la proteína-cebo (MBP-HAS1/MBP-NOG1). Todas las centrifugaciones mencionadas se realizaron a una velocidad máxima de 6000 x g durante 1 minuto en centrífuga refrigerada (4°C). Durante todo el proceso la resina y las proteínas de interés fueron mantenidas en hielo.

3.4.6 Ensayos de interacción con ácido poliuridílico (PolyU).

Para cada condición experimental se emplearon 10 mg de resina de agarosa cargada con ácido poliuridílico (Sigma Aldrich, ref. P8563) que fue hidratada en H₂O miliQ tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) durante 10 minutos. A continuación, la resina se equilibró 4 veces con 500 μ l de tampón 50 mM HEPES pH 7,5; 135 mM NaCl; 0,1 mg/ml de BSA y 5 mM MgCl₂. Tras cada equilibrado la resina se centrifugó a 100 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. La resina así equilibrada se incubó con 200 μ g de la proteína de interés (6xHis-CIC1) diluida en 500 μ l del mismo tampón. La incubación se mantuvo durante 30 minutos a 25°C en agitación constante (300 rpm). Transcurrido este tiempo se centrifugó la resina a 4°C y una velocidad máxima de 100 x g durante 2 minutos. A partir de este momento la resina fue mantenida en frío. Se eliminó la fracción líquida conteniendo la proteína no unida, y se realizaron 4 lavados empleando el mismo tampón en ausencia de BSA (tampón de lavado). Entonces se añadieron 30 μ l de tampón Laemmli 5x (312 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol; 0,02 % (p/v) azul de bromofenol) y se calentó la muestra durante 10 minutos a 95°C a fin de provocar la separación del

ácido poliuridílico de la resina. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad (13000 x g) durante 1 minuto y se recogió la fracción del sobrenadante (conteniendo el ácido poliuridílico unido a proteínas) para su visualización en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) de acrilamida según el protocolo descrito en el apartado 3.2.3. Cuando el diseño experimental lo requiere, se preincubaron las muestras de proteína con distintas concentraciones de ácido poliuridílico libre (0,4 – 0,8 mg/ml) durante 30 minutos a 25°C en agitación (300 rpm) antes de su adición a la resina de agarosa cargada con PolyU. Ambos tampones utilizados en este protocolo fueron preparados empleando H₂O miliQ tratada con DEPC.

3.4.7 Ensayos de interferometría de bicapas (BLI).

La técnica de interferometría de bicapas o BLI (*bio-layer interferometry*) (Petersen 2017) fue empleada para determinar la capacidad de unión entre distintas parejas de proteínas (Tabla 3.8). Se empleó para ello un equipo comercial de interferometría de bicapa (BLItz™, PALL Forté Bio Corp, ref. 45-5000) provisto de su correspondiente *software* de análisis. El protocolo consiste en fijar una primera proteína (marcada con la etiqueta adecuada) a un sensor capaz de unir proteínas provistas de la etiqueta correspondiente. Entonces se añade la segunda proteína (sin etiquetar o marcada con una etiqueta diferente de la que une el sensor) y se evalúa su capacidad de fijarse al sensor mediante su interacción específica con la primera proteína. La cantidad de proteína unida al sensor es cuantificada midiendo las variaciones en la longitud de onda de un haz de luz blanca reflejado desde el sensor. En la Figura 3.1 se muestra un resumen esquemático del protocolo seguido en esta técnica experimental y el tipo de gráficos obtenidos al utilizarla. Esta técnica permite calcular la constante de afinidad (K_D) que define la capacidad de unión entre dos proteínas como el producto de la división entre la constante de disociación (k_{off}) y la constante de asociación (k_{on}), es decir:



Siendo por tanto el valor de K_D inversamente proporcional a la afinidad de unión entre las dos proteínas de interés. En este estudio se empleó un sensor Ni-NTA (FortéBio, ref. 18-5101) cargado de Níquel, capaz de fijar proteínas marcadas con una etiqueta de 6xHis. En todos los ensayos se empleó tampón EM (Tabla 3.6) para diluir las correspondientes proteínas. En caso necesario se usó una concentración baja de BSA para eliminar uniones inespecíficas de la segunda proteína al sensor. En la Tabla 3.8 se muestra un resumen de las concentraciones de proteína empleadas para cada ensayo y se indica el uso de BSA como agente de bloqueo de interacciones inespecíficas. En todos los casos se empleó el mismo protocolo de ensayo, que se resume en la Tabla 3.9. En las etapas de línea base (primera y tercera etapa) el sensor fue sumergido en una solución de tampón EM (200 μ l) en ausencia de proteína, mientras que en las etapas correspondiente a la unión de la primera y segunda proteínas el sensor fue sumergido en una solución de tampón EM (4 μ l) conteniendo la proteína correspondiente a la concentración deseada. La unión de la segunda proteína al sensor previamente cargado con la primera proteína permite el cálculo de la constante de asociación (k_{on}) entre ambas proteínas, mientras que en la etapa final se produce la disociación del complejo y se calcula la constante de disociación (k_{off}). El análisis de los datos experimentales se realizó mediante el *software* BLItz Pro 1.2.

Después de cada medición el sensor fue regenerado mediante su inmersión en una solución conteniendo PBS durante 10 segundos, seguida de una solución de 10 mM Gly a pH 2 durante 10 segundos, PBS durante 10 segundos, 10 mM NiCl₂ durante 1 minuto y PBS durante 10 segundos.

Por último, el sensor fue hidratado en tampón EM durante 10 minutos antes de ser utilizado de nuevo. Cada sensor se empleó durante un máximo de 10 mediciones siguiendo este sistema de regeneración.

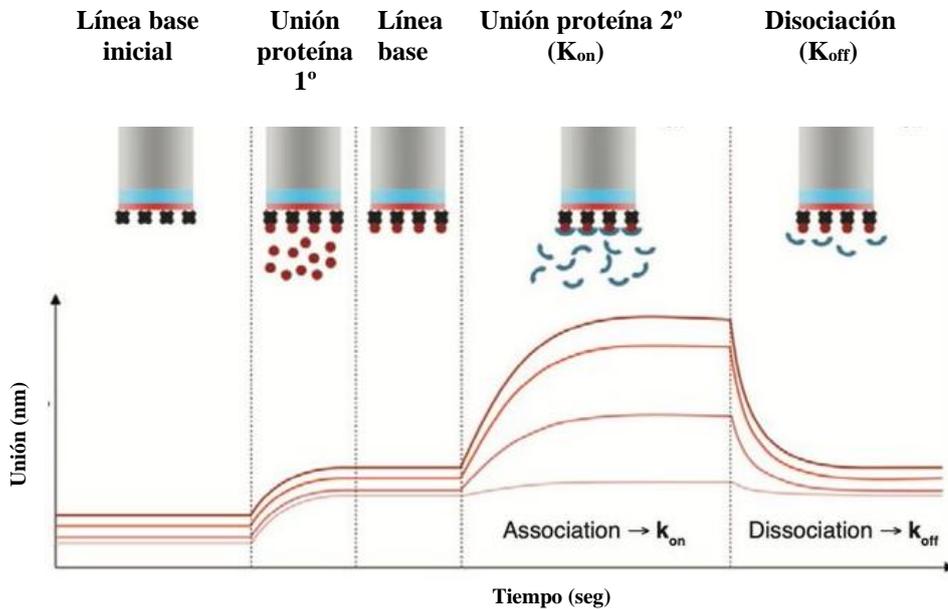


Figura 3.1: Resumen esquemático del protocolo utilizado en los experimentos de interferometría de biocapas empleando el equipo BLItz™.

Tabla 3.8: Condiciones empleadas para los ensayos de interferometría de biocapas.

Proteína 1°	Concentración	Proteína 2°	Concentración	% BSA (p/v)
6xHis-NOG1	30 µg/ml	cteIF6	2 – 10 µM	0,005%
6xHis-CIC1	50 µg/ml	MBP-HAS1	1 – 5 µM	-
6xHis-NOG1	100 µg/ml	ctMAK5	20 – 75 µM	2%
6xHis-NOC2	30 µg/ml	ctMAK5	20 – 75 µM	2%
6xHis-CIC1	50 µg/ml	ctHAS1 (1-320 aa)	1 – 5 µM	-

Tabla 3.9: Protocolo general de ensayo de interferometría de biocapas.

Etapas	Duración (seg)
Línea base inicial	30
Unión proteína 1°	120
Línea base	30
Asociación (k_{on}) / Unión proteína 2°	120
Disociación (k_{off})	120

3.4.8 Western blot para identificación de proteínas.

A fin de comprobar la identidad de las proteínas purificadas con la etiqueta de 6xHis se utilizó la técnica de western blot. Para ello se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% (v/v) a 90 V durante 90 minutos. Las proteínas del gel de electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran®, GE Healthcare, ref. GE10600002) durante 90 minutos a 100V manteniendo la temperatura a 4°C. Para la transferencia se empleó una cubeta Mini PROTEAN®3 Cell (Bio-Rad) conectada a una fuente PowerPac™ Basic (Bio-Rad). Se utilizó como tampón de transferencia 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 20% (v/v) de metanol.

Una vez completada la transferencia, se comprobó la presencia de las proteínas transferidas en la membrana mediante tinción reversible con rojo Ponceau S 0,2% (p/v) (Serva, ref. 33427). La membrana fue bloqueada con un 5% (p/v) de leche desnatada diluida en PBS-Tween 0,1% (v/v) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación, la membrana fue hibridada con un anticuerpo anti-Histidina conjugado con HRP (Horse Radish Peroxidase) (Roche) diluido en el medio de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Por último, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,1% (v/v) y se reveló la membrana mediante el reactivo Pierce ECL (Thermo Scientific™, ref. 32106) en un transiluminador ImageQuant™ LAS 4000 Mini (GE Healthcare). La información relativa al uso del anticuerpo anti-Histidina se indica en la Tabla 3.14.

3.4.9 Cribados de cristalización.

Los ensayos de cristalización se realizaron utilizando la técnica de difusión de vapor en gota sentada en placas de 96 pocillos tipo MRC2. En cada pocillo se dispuso 1 gota de proteína purificada junto con 1 gota de tampón de cristalización (reservorio). La concentración de agente precipitante en el reservorio es mayor que la de la gota permitiendo que se realice un equilibrio a través de la difusión de vapor hasta que ambas concentraciones se igualen por la evaporación de agua o de otros precipitantes más volátiles, como el isopropanol. Se realizaron distintos cribados comerciales empleando distintos tampones a distintos pH y distintos precipitantes. Concretamente, se emplearon los cribados JBScreen Classic HTS I y HTS II (denominados JBS I y II en este trabajo) (Jena Bioscience, refs. CS-201L y CS-202L respectivamente); Wizard I y II (Emerald BioSystems, ref. EBS-WIZ-1/2); MIDAS y PACT (Molecular Dimensions, refs. MD1-59 y MD1-29 respectivamente), Cs I y II (Hampton Research, ref. HR2-130), JCSG+™ (Molecular Dimensions, ref. MD1-37) e Index (Hampton Research, ref. HR2-144). En cada gota se dispensaron 0,3 µl de proteína purificada junto con 0,3 µl de solución de cristalización por un equipo de nano dispersión (HoneyBee X8, Genomic Solutions) por el servicio de Cristalogénesis del IBV. Las placas se incubaron durante 6 meses a 21°C o 4°C según las necesidades de cada experimento. Se comprobó periódicamente la aparición de cristales en los distintos cribados realizados. En las Tablas 3.10 – 3.13 se resumen las condiciones de cristalización empleadas con las distintas construcciones de interés en este estudio.

Tabla 3.10: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-NOC2.

Concentración	Cribado	Temperatura
2 mg/ml	JBS I	21°C
11,3 mg/ml	JBS I	21°C
23,7 mg/ml	JBS I	21°C
27,3 mg/ml	JBS I	21°C
20 mg/ml	JBS II	21°C
22,65 mg/ml	JBS II	21°C
24 mg/ml	JBS II	21°C
27,3 mg/ml	JBS II	21°C
34,18 mg/ml	JBS II	21°C
22,65 mg/ml	MIDAS	21°C
27,9 mg/ml	MIDAS	21°C
22,4 mg/ml	Cs I y II	21°C
9,17 mg/ml	Index	21°C
13,32 mg/ml	Index	21°C
19,9 mg/ml	Index	21°C
22,65 mg/ml	PACT	21°C
26,65 mg/ml	Wizard I y II	21°C
6,09 mg/ml	JCSG+	21°C
11,5 mg/ml	JCSG+	21°C
13,32 mg/ml	JCSG+	21°C
23 mg/ml	JCSG+	21°C

Tabla 3.11: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa).

Concentración	Cribado	Temperatura
19,5 mg/ml	JBS I	21°C
22,9 mg/ml	JBS I	21°C
25 mg/ml	JBS I	21°C
31,9 mg/ml	JBS I	4°C
25 mg/ml	JBS II	21°C
20,9 mg/ml	JBS II	4°C
19,5 mg/ml	MIDAS	21°C
24 mg/ml	MIDAS	21°C
25 mg/ml	MIDAS	21°C
25,5 mg/ml	MIDAS	21°C
17,38 mg/ml	MIDAS	4°C
10 mg/ml	CS I y II	21°C
19,5 mg/ml	CS I y II	21°C
20 mg/ml	CS I y II	21°C
25 mg/ml	CS I y II	21°C
31,9 mg/ml	CS I y II	4°C
14,4 mg/ml	Index	21°C
24 mg/ml	Index	21°C
25 mg/ml	Index	21°C
25 mg/ml	PACT	21°C
25,5 mg/ml	PACT	21°C
28,3 mg/ml	PACT	21°C
10 mg/ml	Wizard I y II	21°C
17,36 mg/ml	Wizard I y II	21°C
20 mg/ml	Wizard I y II	21°C
22,9 mg/ml	Wizard I y II	21°C
23,3 mg/ml	Wizard I y II	21°C
25 mg/ml	Wizard I y II	21°C
20,9 mg/ml	Wizard I y II	4°C
17,36 mg/ml	JCSG+	21°C
25 mg/ml	JCSG+	21°C
28,3 mg/ml	JCSG+	21°C

Tabla 3.12: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-NOG1.

Concentración	Cribado	Temperatura
19,3 mg/ml	JBS I	21°C
8,3 mg/ml	JBS I	4°C
9,8 mg/ml	JBS II	21°C
17 mg/ml	JBS II	21°C
15,7 mg/ml	JBS II	4°C
19,3 mg/ml	MIDAS	21°C
15,7 mg/ml	MIDAS	4°C
17 mg/ml	Cs I y II	21°C
4,7 mg/ml	Cs I y II	4°C
8,9 mg/ml	Index	21°C
15,3 mg/ml	Index	21°C
8,9 mg/ml	PACT	21°C
15,3 mg/ml	PACT	21°C
20 mg/ml	PACT	21°C
15,7 mg/ml	Wizard I y II	4°C

Tabla 3.13: Resumen de cribados de cristalización llevados a cabo con la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa).

Concentración	Cribado	Temperatura
3,26 mg/ml	JBSI	21°C
3,1 mg/ml	JBS II	21°C
3,1 mg/ml	MIDAS	21°C
7,5 mg/ml	Cs I y II	21°C
7,5 mg/ml	PACT	21°C
4 mg/ml	Wizard I y II	21°C
5,88 mg/ml	JCSG+	21°C

3.5 Experimentos con líneas celulares *in vitro*.

3.5.1 Líneas celulares empleadas.

Se empleó la línea celular HCT116 de carcinoma de colon (Brattain et al. 1981). Además de la variante silvestre (células HCT116 p53 +/+), se empleó una versión *knock out* para p53 de esta línea celular (células HCT116 p53-/-). Se empleó asimismo la línea celular Saos2 de osteosarcoma (Rodan et al. 1987) en su versión *knock out* para p53 (Saos2 p53-/-). Estas tres líneas celulares fueron mantenidas en medio DMEM con alta glucosa (Biowest, ref. L0102) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin en unas condiciones constantes de 37°C de temperatura y 5% (v/v) de dióxido de carbono en una atmósfera humidificada.

3.5.2 Péptidos de interferencia y fármacos de quimioterapia.

Se emplearon péptidos de interferencia diseñados para bloquear la interacción entre los factores de ensamblaje Bop1 y WDR12 humanos. La secuencia completa de estos péptidos se muestra en la Tabla 4.2 del apartado de Resultados. Estos péptidos fueron obtenidos mediante síntesis química por la empresa Synpeptide (China) y fueron disueltos en PBS estéril. Los péptidos se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Los péptidos P10hs y P11hs se corresponden con distintas secuencias de la proteína Bop1 en la región en la que esta proteína interacciona con WDR12 (véase apartado 4.7.1 de Resultados). El péptido P10hsD es una variante del péptido P10hs obtenida mediante el método de retro-inversión, en la que los aminoácidos de la secuencia de interferencia han sido sustituidos por sus D-isómeros correspondientes, y se ha invertido la orientación de la secuencia. De esta manera, el aminoácido que en el péptido P10hs ocupa la posición amino-terminal, en el péptido P10hsD aparece ocupando la posición carboxilo-terminal, y viceversa.

Utilizamos esta estrategia a fin de minimizar la degradación proteolítica observada al emplear el péptido P10hs (véase Figura 4.30D). Los péptidos retro-inversos solamente resultan eficaces en caso de que la interacción con la proteína diana se realice a través de las cadenas laterales de los aminoácidos implicados, sin participación del esqueleto hidrocarbonado del péptido (Doti et al. 2021). Según la información estructural disponible en *Chaetomium thermophilum*, el péptido P10hs interacciona con WDR12 a través de interacciones electrostáticas mediadas por la cadena lateral de un aminoácido de Glu y otro de Arg, sin participación directa del esqueleto hidrocarbonado (véase apartado 4.7.1). Por lo tanto, resulta factible el uso de una versión retro-inversa del péptido P10hs en este estudio.

Por otro lado, en este trabajo empleamos el péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) (véase Figura 4.15) dirigido contra la interacción entre los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 de *Homo sapiens*. Dicho péptido fue producido utilizando *Escherichia coli* como organismo de expresión recombinante. Se siguió un protocolo de clonación, expresión y purificación análogo al del resto de proteínas producidas en este trabajo (véase apartados 3.1, 3.2, 3.3). El péptido, a una concentración final de 2 mg/ml, fue mantenido a -80°C disuelto en tampón EM (Tabla 3.6) hasta su uso. Por último, en este trabajo empleamos oxaliplatino y ciclofosfamida (Sigma Aldrich, refs. O9512 y BP1094 respectivamente). El oxaliplatino se disolvió en H₂O estéril libre de ADNasa y ARNasa a 5 mM de

concentración. La ciclofosfamida se disolvió en PBS estéril a 20 mM de concentración. Se prepararon alícuotas de ambos reactivos, que fueron mantenidas a 4°C en oscuridad hasta su uso.

3.5.3 Ensayos de viabilidad celular.

El objetivo de estos ensayos es determinar la capacidad de los distintos péptidos de interferencia y fármacos de quimioterapia de disminuir la viabilidad de un cultivo celular *in vitro*. Se empleó para ello el reactivo WST-1 (Roche, ref. 11644807001) que permite detectar la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron placas de cultivo multipocillo P-96 estériles de fondo plano (VWR®, ref. 734-2327). Se sembraron 2500 células por pocillo en un volumen de 100 µl de medio de cultivo (apartado 3.5.1) que se incubaron durante 24 horas antes de adicionar los péptidos y/o fármacos de quimioterapia disueltos en medio de cultivo a las concentraciones finales requeridas. Transcurrido el tiempo deseado de tratamiento (24, 48 o 72 horas), se adicionó el reactivo WST-1 siguiendo las instrucciones del fabricante. Concretamente, se adicionaron 10 µl de reactivo en cada pocillo y se dejó incubar la placa durante 3 horas a 37°C antes de medir la absorbancia a 440 nm mediante un lector de placas multipocillo (Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter). Se realizaron triplicados de cada condición experimental. Los resultados obtenidos fueron relativizados con respecto a un control no tratado con péptidos ni quimioterapia. El análisis de los resultados se realizó empleando el *software* GraphPad Prism4 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

3.5.4 Ensayos de activación de caspasas.

Se empleó el kit Caspase-Glo® 3/7 (Promega, ref. G8090) que permite detectar la actividad de las caspasas 3 y 7 a partir de cultivos celulares *in vitro*. Se utilizaron placas multipocillo P-96 estériles de fondo plano y opacas (SPL Life Sciences, ref. 30196) en las que se sembraron 2500 células por pocillo en un volumen final de 100 µl de medio. 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas con los péptidos de interés disueltos en medio de cultivo en las concentraciones finales adecuadas. Tras mantener el tratamiento durante otras 24 horas, se determinó la actividad caspasa empleando el kit Caspase-Glo® 3/7 siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se añadió el reactivo en proporción 1:1 con respecto al volumen de células en cultivo. Tras incubar durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad, se midió la luminiscencia de cada pocillo mediante un lector de placas multipocillo (Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter). Cada condición experimental se ensayó por triplicado.

Todos los ensayos de activación de caspasas fueron realizados corrigiendo los correspondientes valores de luminiscencia obtenidos respecto a la supervivencia celular observada en cada condición de tratamiento. Para ello se realizaron dos experimentos en paralelo en los que se determinó el estado de activación de las caspasas 3/7 mediante el reactivo Caspase-Glo® 3/7, y el nivel de viabilidad celular empleando el reactivo WST-1 en las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos fueron relativizados con respecto a un control no tratado con péptidos. El análisis de los resultados se realizó empleando el *software* GraphPad Prism4 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

3.5.5 Ensayos de expresión de proteínas (western blot).

A fin de determinar el nivel de expresión de las proteínas de interés en este estudio a partir de cultivos de células *in vitro*, se llevaron a cabo experimentos de western blot siguiendo el siguiente protocolo.

3.5.5.1 Cultivo celular y obtención de extractos de proteína.

Se emplearon placas multipocillo P-6 de fondo plano (VWR®, ref. 734-2323) en las que se sembraron 250.000 células por pocillo empleando la línea celular deseada en cada caso. Tras incubar a 37°C durante 24 horas, las células fueron tratadas con los péptidos de interés disueltos en medio de cultivo en la concentración final adecuada. Se mantuvo el tratamiento con los péptidos durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la lisis celular y la preparación de extractos celulares. Para ello se retiró el medio de los pocillos, y las células fueron resuspendidas en 1ml de PBS frío. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4°C y 200 x g durante 8 minutos. El precipitado celular obtenido fue resuspendido en 75 µl de tampón RIPA (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 1mM EGTA; 0,5% (v/v) NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas (cCOMPLETE EDTA-free, Roche, ref. 5056489001) y fosfatasa (PhosSTOP™ EASYpack, Roche, ref. PHOSS-RO). Tras agitar vigorosamente, el lisado se mantuvo en hielo durante 30 minutos agitando cada 10-15 minutos. Transcurrido este tiempo, los lisados fueron centrifugados a 14300 x g durante 14 minutos en centrífuga refrigerada (4°C) a fin de eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante de cada muestra y se congeló a -20°C hasta su posterior procesamiento.

3.5.5.2 Western blot a partir de extractos de proteína.

Los extractos de proteínas fueron cuantificados empleando el reactivo Bradford (BioRad, ref. 5000006). Se emplearon placas de 96 pocillos y se cuantificó la absorbancia a 595 nm mediante un lector de placas multipocillo (Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter). Se empleó una recta de calibrado realizada con BSA para estimar la concentración de proteína contenida en cada muestra. Se utilizaron 15-20 µgr de extracto proteico total que fueron sometidos a una electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida al 10% (v/v) (apartado 3.2.3). La electroforesis se llevó a cabo a 90V durante 90 minutos empleando geles de 1 mm de grosor. Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran®, GE Healthcare, ref. GE10600002) en las mismas condiciones mencionadas en el apartado 3.4.8. Al final de la transferencia se comprobó la presencia de las proteínas transferidas en la membrana mediante tinción reversible con rojo Ponceau S 0,2% (p/v) (Serva, ref. 33427).

La membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante usando PBS-Tween 0,1% (v/v) suplementado con un 5% (p/v) de leche desnatada. A continuación, la membrana fue incubada con el correspondiente anticuerpo primario a 4°C durante 16 horas. Se realizaron tres lavados a temperatura ambiente con PBS-Tween 0,1% (v/v) a fin de eliminar el exceso de anticuerpo. La membrana fue entonces incubada con el correspondiente anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron otros tres lavados con PBS-Tween 0,1% (v/v). Finalmente, la membrana fue revelada según el mismo protocolo descrito en el apartado 3.4.8. Todos los anticuerpos tanto primarios como secundarios fueron diluidos en PBS-Tween 0,1% (v/v) suplementado con un 5% (p/v) de leche desnatada. La Tabla 3.14 incluye la información relativa a los distintos anticuerpos primarios y secundarios usados en este trabajo (apartados 3.4.8 y 3.5.5.2).

Tabla 3.14: Anticuerpos utilizados en los experimentos de western Blot.

Anticuerpo	Referencia	Proveedor	Origen	Dilución
6xHis-HRD Peroxidasa	11965085001	Roche	Ratón	1/500
cMyc	sc-40	SCB	Ratón	1/300
p53	sc-126	SCB	Ratón	1/200
p21/Waf1/Cip1	sc-6246	SCB	Ratón	1/200
p73	sc-17823	SCB	Ratón	1/200
caspasa 3	sc-271028	SCB	Ratón	1/1000
Actina	A2066	Sigma Aldrich	Conejo	1/1000
Secundario ratón-HRD Peroxidasa	NXA931	Cytiva	Oveja	1/1000
Secundario conejo-HRD Peroxidasa	NA934	Cytiva	Burro	1/1000

Abreviatura: SCB: Santa Cruz Biotechnology. **HRD:** horseradish (rábano). His: histidina.

3.6 Herramientas bioinformáticas y análisis de datos.

El análisis de estructuras tridimensionales procedentes del *Protein Data Bank* (PDB) se realizó mediante los programas PyMol (Schrödinger, L. and DeLano, W. 2020) y Chimera Inc. (Pettersen et al. 2004). Para los alineamientos múltiples de secuencias de proteínas se empleó el programa ClustalW (Sievers et al. 2011). Los estudios de predicción de regiones desordenadas se realizaron empleando el *software* IUPred3 (Erdős, Pajkos, y Dosztányi 2021). Los ensayos de actividad enzimática, así como los ensayos *in vitro* de viabilidad y activación de caspasas se analizaron mediante el paquete informático GraphPad Prism4 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Se realizó un test ANOVA seguido de un test Bonferroni para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones experimentales.

Los análisis de predicción de regiones de interacción proteína:proteína y proteína:ARN se realizaron mediante el *software* PDBe PISA (Krissinel y Henrick 2007) empleando la información estructural correspondiente procedente del PDB. Se utilizó la base de datos BioGrid (Oughtred et al. 2021) para la recopilación de información relativa a interactómica de proteínas. Se utilizó el programa informático ProtParam (Gasteiger et al. 2005) para calcular el punto isoeléctrico teórico y el peso molecular de las distintas construcciones empleadas en este trabajo. Se utilizó el programa de modelado Swiss Model (Waterhouse et al. 2018) para llevar a cabo la predicción de la estructura tridimensional de la proteína MAK5 de *Chaetomium thermophilum*.

4. Resultados.

4.1 Clonación, expresión y purificación de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5.

Estudios previos empleando la técnica TAP TAG de purificación en tándem han documentado la existencia de interacciones entre los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 en el contexto del pre-ribosoma de levaduras (Saveanu et al. 2003) (Zisser et al. 2018). Estas evidencias previas nos impulsaron a seleccionar estos tres factores de ensamblaje con vistas al diseño de péptidos de interferencia específicos. La disponibilidad de información estructural es clave para el diseño eficaz de péptidos de interferencia (Orea-Ordóñez et al. 2021). Como se ha explicado en la Introducción (apartados 1.1.4.2.2 y 1.1.4.2.3), estos tres factores de ensamblaje han sido estudiados principalmente en levaduras (Milkereit et al. 2001) (Brüning et al. 2018) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). Sin embargo, para nuestro estudio decidimos emplear los genes correspondientes a las proteínas homólogas presentes en *Chaetomium thermophilum*. Las proteínas de este hongo termófilo presentan mayor estabilidad térmica que las de otros organismos (Perutz y Raitd 1975). Esto supone una ventaja clave para la realización de estudios de estructura de proteínas mediante difracción de rayos X, razón por la que este organismo ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios de cristalografía y particularmente en el estudio del ribosoma eucariota mediante crio-microscopía (Cheng et al. 2019) (Kišonaitė et al. 2022). Ninguna de estos tres factores de ensamblaje (NOG1, MAK5 y NOC2) ha sido caracterizado desde el punto de vista bioquímico y biofísico en *Chaetomium thermophilum*, aunque en el caso de MAK5 sí existen datos disponibles en levaduras (Brüning et al. 2018). Además, estas proteínas tampoco han sido caracterizadas estructuralmente en *Chaetomium thermophilum*, aunque en el caso de NOG1 existen datos disponibles en levaduras y humanos (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020).

4.1.1 Clonación, expresión y purificación de ctNOC2.

A partir de la proteína NOC2 de *Chaetomium thermophilum* (ctNOC2, referencia de UniProt G0SD05), generamos la construcción 6xHis-NOC2. Esta construcción se purificó mediante una cromatografía de iones inmobilizados (IMAC) consistente en el uso de una columna HisTrap HP, seguida de una segunda cromatografía de exclusión molecular (Figura 4.1). La proteína obtenida en esta segunda cromatografía fue concentrada, congelada en N₂ líquido y almacenada a -80°C hasta su posterior uso. La construcción de interés presenta un perfil de elución formando un solo pico en la cromatografía de exclusión molecular. En el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE (Figura 4.1) se aprecia que la proteína purificada tiene el peso molecular esperado (92 KDa aproximadamente) (Tabla 3.5).

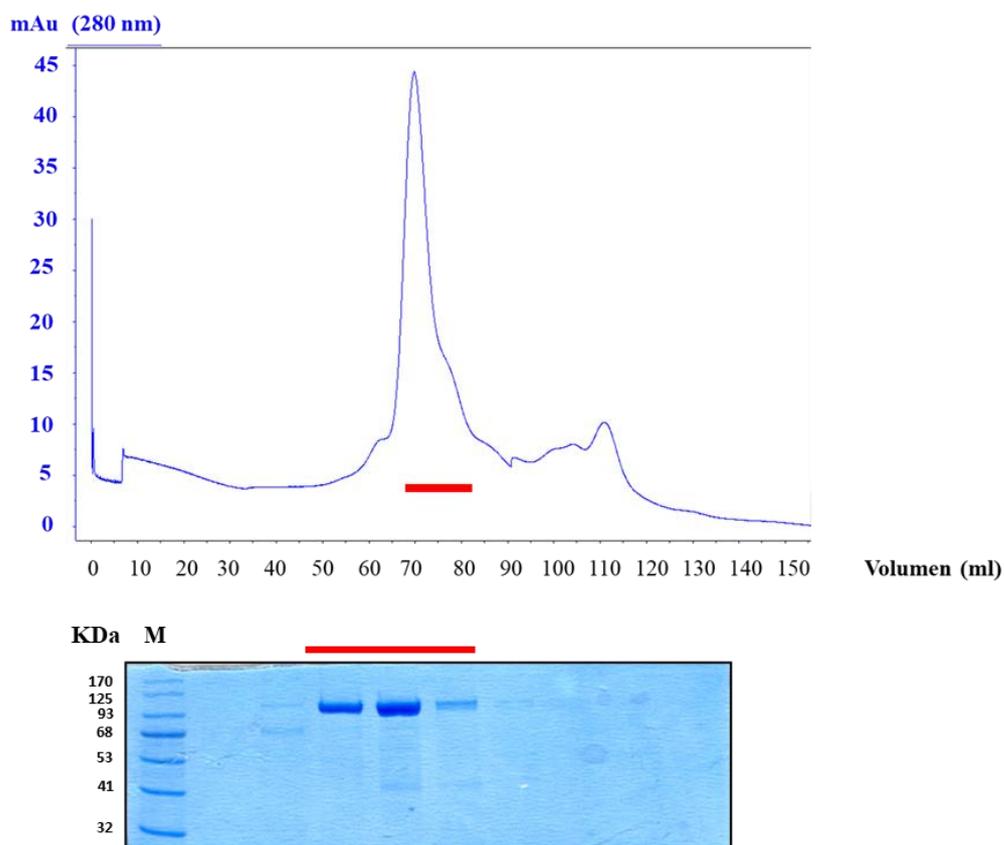


Figura 4.1: Cromatografía de exclusión molecular correspondiente al proceso de purificación de la construcción 6xHis-NOC2 mediante una columna Superdex 200 Hiload 16/60. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de la construcción 6xHis-NOC2 junto con el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

4.1.2 Generación de formas truncadas de ctNOC2.

Ante la dificultad de obtener cristales de la construcción 6xHis-NOC2 de *Chaetomium thermophilum*, decidimos llevar a cabo un estudio predictivo de la presencia de regiones desordenadas mediante el servidor IUPred (Erdős et al. 2021). Los resultados (Figura 4.2A) muestran que esta proteína presenta regiones desordenadas en ambos extremo amino y carboxi-terminal.

En base a estos resultados, decidimos generar una batería de formas truncadas de ctNOC2 en las que se eliminó una cantidad variable de aminoácidos del extremo amino-terminal, carboxi-terminal o ambos a la vez (Figura 4.2B). Cada una de estas formas truncadas fue clonada en el vector pET28-NKI/LIC 6His/3C siguiendo el mismo protocolo que en el caso de la construcción 6xHis-NOC2. Las diferentes construcciones fueron transformadas por separado en la cepa BL21(DE3) CodonPlus-RIPL de *Escherichia coli*.

Sin embargo, solo conseguimos llevar a cabo la expresión y purificación a gran escala de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) en la que tan solo se eliminan los 17 últimos aminoácidos de

su secuencia (que consta en total de 788 aminoácidos). En el resto de casos no se consiguió obtener proteína soluble en ninguna de las condiciones de expresión empleadas (autoinducción, inducción mediante IPTG). Estos resultados sugieren que aunque ambos extremos amino y carboxi-terminal son regiones potencialmente desordenadas, podrían ser sin embargo esenciales para garantizar la estabilidad de la proteína o para garantizar su correcta síntesis empleando *Escherichia coli* como organismo de expresión heteróloga.

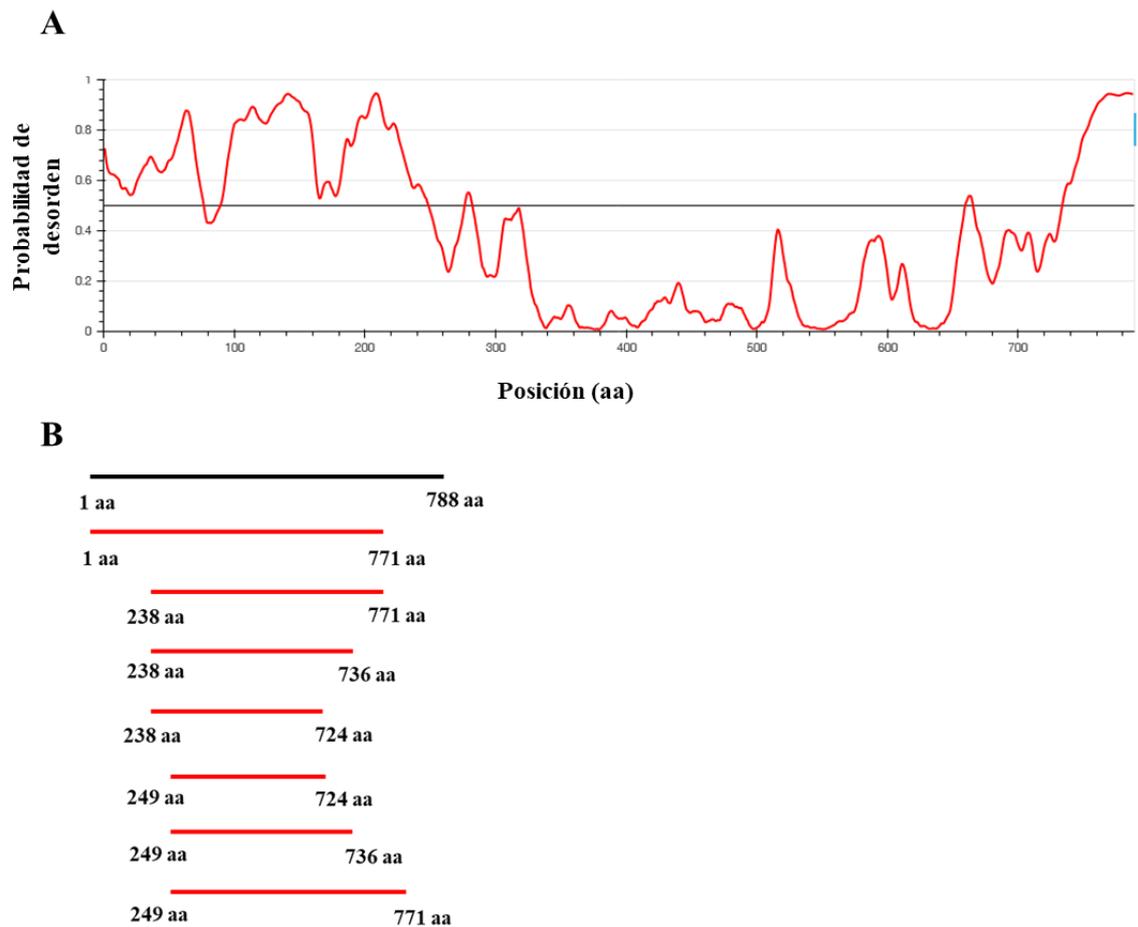


Figura 4.2: Estudio de regiones desordenadas en la proteína NOC2 de *Chaetomium thermophilum* y diseño de formas truncadas de esta proteína **A.** Predicción de regiones desordenadas realizada mediante el programa IUPred3 (Erdős, Pajkos, y Dosztányi 2021). En el eje X (horizontal) se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, mientras que el eje Y (vertical) muestra la probabilidad de que el correspondiente aminoácido forme parte de una región desordenada (Probabilidad de desorden). Las regiones en las que esta probabilidad es superior a 0,5 (marcado con una barra horizontal) se consideran intrínsecamente desordenadas. **B.** Diseño de formas truncadas de ctNOC2 realizado de acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado A. aa: aminoácido.

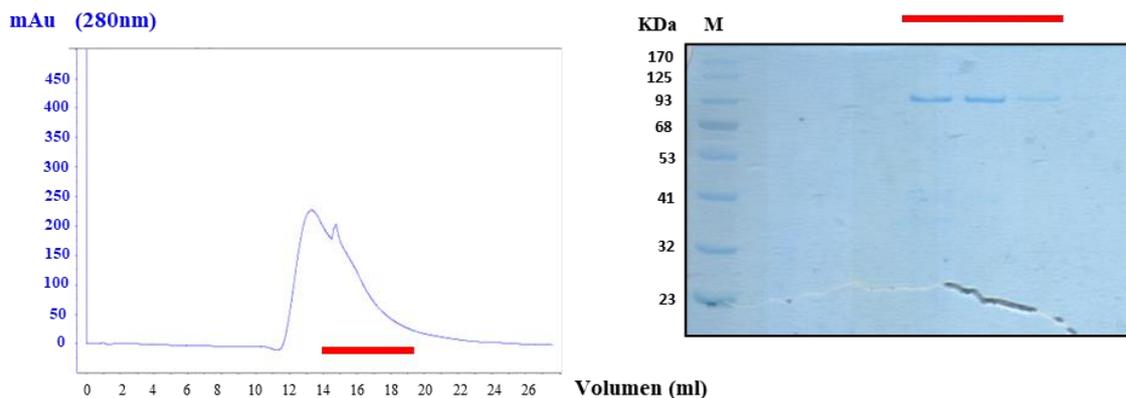


Figura 4.3: Resumen del proceso de purificación de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa). Se muestra una cromatografía representativa de intercambio catiónico mediante columna HiTrap SP HP y el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v). Se muestran las fracciones obtenidas en la cromatografía (identificadas con una barra roja). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

La construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) fue expresada mediante el protocolo de autoinducción. La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad en columna HisTrap HP seguida de una cromatografía de intercambio catiónico mediante columna HiTrap SP HP (Figura 4.3). En esta última cromatografía la proteína muestra un perfil de elución formado por un solo pico. La proteína muestra un peso molecular de aproximadamente 90 KDa, de acuerdo con lo esperado (Tabla 3.5).

4.1.3 Clonación, expresión y purificación de ctNOG1.

El gen correspondiente a la proteína NOG1 de *Chaetomium thermophilum* (ctNOG1, referencia de UniProt G0S8F1) fue clonado en el vector pET28-NKI/LIC 6His/3C, así como en su variante pMBKI, generándose las construcciones codificantes 6xHis-NOG1 y MBP-NOG1.

Ambas construcciones se purificaron según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.3). Se empleó una cromatografía de afinidad (en columna HisTrap para 6xHis-NOG1, y MBPTrap para MBP-NOG1) seguida de una cromatografía de exclusión molecular (Figura 4.4). La proteína obtenida en esta segunda cromatografía fue concentrada, congelada en N₂ líquido y almacenada a -80°C hasta su posterior uso. Como se puede comprobar en la Figura 4.4A, la construcción 6xHis-NOG1 presenta un peso molecular de aproximadamente 75 KDa, mientras que MBP-NOG1 tiene un peso aproximado de 117 KDa (Figura 4.4 B), de acuerdo con el tamaño esperado para ambas proteínas (Tabla 3.5).

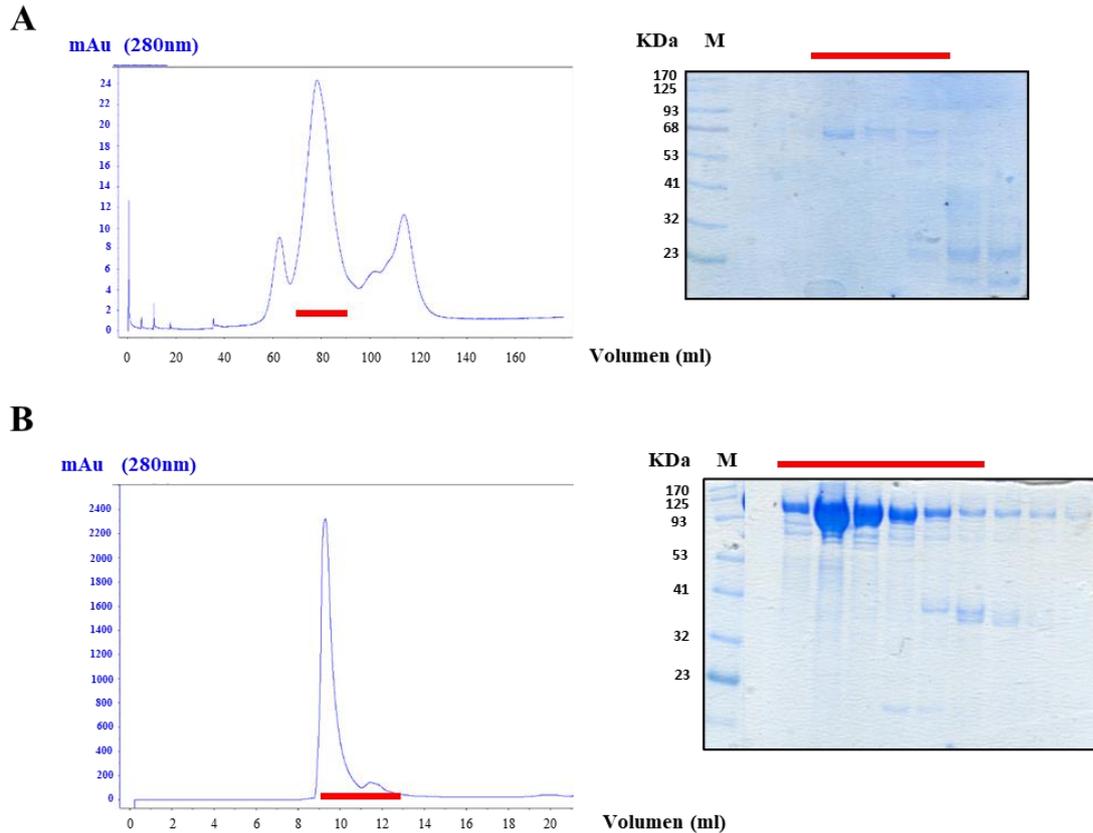


Figura 4.4: Cromatografía de exclusión molecular correspondiente al proceso de purificación de las construcciones 6xHis-NOG1 y MBP-NOG1 en una columna Superdex 200 Hiload 16/60 (6xHis-NOG1) y Superdex 200 10/300 GL (MBP-NOG1). A. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de 6xHis-NOG1 y el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía (marcadas en rojo) B. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de MBP-NOG1 y el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

4.1.4 Clonación, expresión y purificación de ctMAK5 en forma truncada.

La forma completa del factor de ensamblaje MAK5 de *Chaetomium thermophilum* (ctMAK5, referencia de UniProt G0SA42) había sido previamente clonada y purificada en el laboratorio (véase Anexo 4 y apartado 4.3). Al igual que en el caso de ctNOC2, realizamos un análisis predictivo de la presencia de regiones desordenadas en esta proteína empleando para ello el programa informático IUPred (Erdős, Pajkos, and Dosztányi 2021) (Figura 4.5A). Detectamos así la presencia de una región desordenada correspondiente a los aminoácidos 1-200 situados en el extremo amino-terminal de ctMAK5. Asimismo, mediante el programa Swiss-model (Waterhouse et al. 2018) generamos un modelo tridimensional de la estructura de la proteína ctMAK5. Los resultados (Figura 4.5B) muestran que la estructura de esta proteína puede ser modelada en la región comprendida entre los aminoácidos 193 y 617. Para este modelado se empleó como modelo la estructura resuelta del factor de *splicing* Prp28 de levaduras (PDB ID: 4W7S).

Este modelo está de acuerdo con la predicción de regiones desordenadas obtenida mediante IUPred, según la cual los aminoácidos 1-200 se corresponden con una región intrínsecamente desordenada que, por tanto, no resulta fácilmente modelable. Basándonos en ambos resultados decidimos generar una forma truncada de la proteína ctMAK5 que incluyera los aminoácidos 192 a 616 de su secuencia, eliminando así la región intrínsecamente desordenada presente en su extremo amino-terminal. Decidimos eliminar también los aminoácidos 617-767 del extremo carboxi-terminal de la proteína que no se incluyen en el modelo generado mediante el programa Swiss-model (Figura 4.5B). Esta región también incluye zonas desorganizadas según los resultados obtenidos mediante el programa IUPred (Figura 4.5A). Al carecer de ambas regiones desordenadas amino y carboxi-terminal, la forma truncada ctMAK5 (192-616 aa) es potencialmente más estable y por tanto más fácil de cristalizar. Los resultados obtenidos mediante ensayos de termofluór mostraron que si bien la forma completa de ctMAK5 es estable en un mayor número de condiciones experimentales, la forma truncada ctMAK5 (192-616 aa) muestra mayor estabilidad en determinadas condiciones, lo cual podría favorecer la formación de cristales (compárese Figura 4.11 y Anexo 5 y véase apartado 5.1.1).

La clonación de esta forma truncada de ctMAK5 se llevó a cabo según el mismo proceso empleado en el caso de ctNOC2 y ctNOG1. Se empleó el vector pET28-NKI/LIC 6His/3C, generándose la construcción codificante para la proteína truncada 6xHis-MAK5 (192-616 aa). La proteína se expresó a gran escala mediante el protocolo de autoinducción.

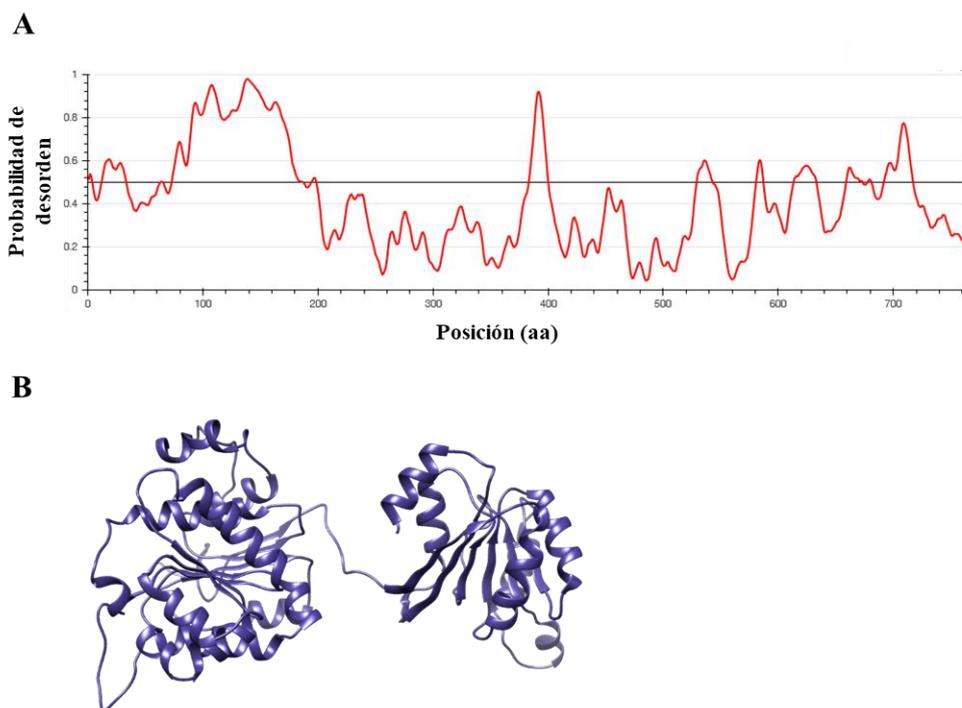


Figura 4.5: Caracterización estructural de la proteína ctMAK5 mediante herramientas bioinformáticas. **A.** Análisis predictivo de la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas mediante el programa IUPred3 (Erdős, Pajkos, and Dosztányi 2021). En el eje X (horizontal) se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína ctMAK5, mientras que el eje Y (vertical) muestra la probabilidad de que el correspondiente aminoácido forme parte de una región desordenada (Probabilidad de desorden). Las regiones en las que esta probabilidad es superior a 0,5 se consideran intrínsecamente desordenadas. **B.** Modelado de la estructura tridimensional de la proteína ctMAK5 realizado mediante Swiss-model (Waterhouse et al. 2018). El modelo generado incluye los aminoácidos 193 a 617 de la secuencia de la proteína. Se empleó como modelo la estructura resuelta del factor de *splicing* Prp28 de levaduras (PDB ID: 4W7S). aa: aminoácido.

La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad en columna HisTrap HP seguida de una cromatografía de exclusión molecular. Como se observa en la Figura 4.6, el cromatograma de exclusión molecular muestra un pico correspondiente a la proteína de interés, con un tamaño aproximado de 50 KDa, de acuerdo con el peso molecular teórico para esta proteína (Tabla 3.5). Sin embargo, parte de la proteína aparece en forma de agregados durante el proceso de purificación. La proteína pura obtenida en la cromatografía de exclusión molecular se concentró, se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

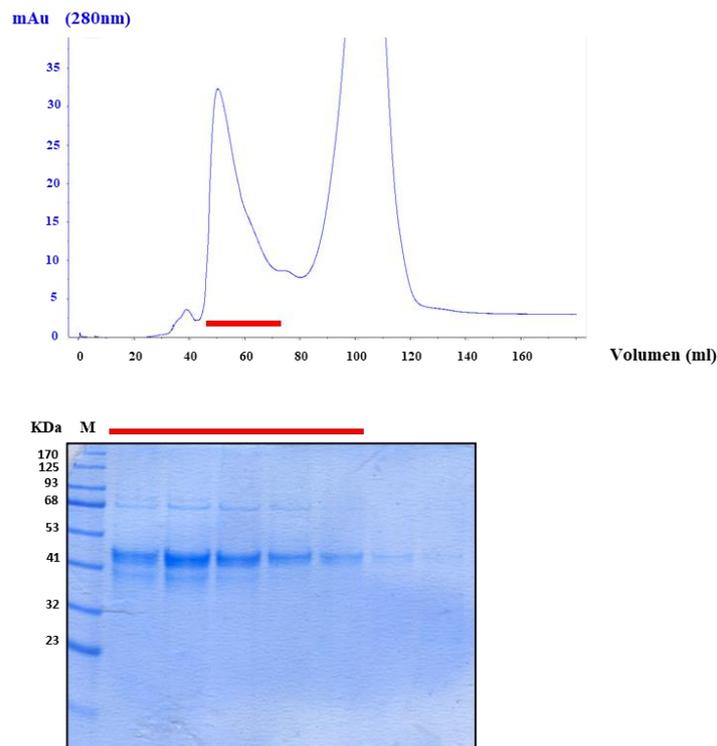


Figura 4.6: Cromatografía de exclusión molecular mostrando el proceso de purificación de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) mediante una columna Superdex 200 Hiload 16/60. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) junto al gel de electroforesis SDS-PAGE correspondiente al 10% (v/v). Se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

4.2 Caracterización funcional y biofísica de las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis/MBP-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa).

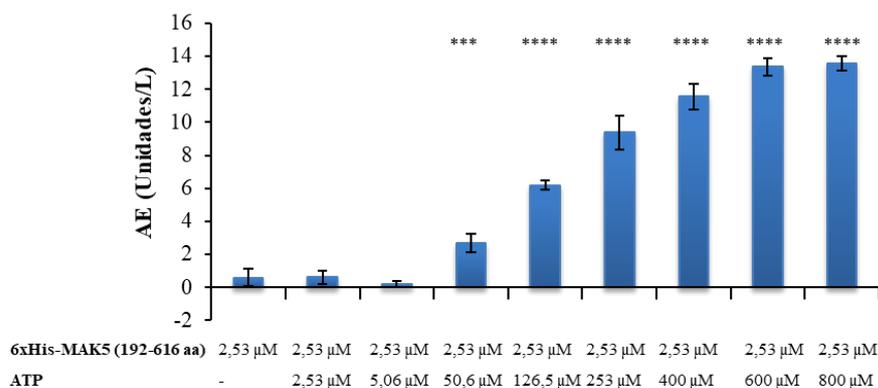
Una vez purificadas las construcciones de interés, el siguiente paso que nos planteamos fue comprobar su estabilidad y funcionalidad. Para ello empleamos dos aproximaciones complementarias. Por un lado, los factores de ensamblaje NOG1 y MAK5 poseen actividad enzimática. Como se ha mencionado en la introducción, NOG1 es una GTPasa de la familia Obg (Leipe et al. 2002) mientras que MAK5 es una ATPasa de la familia DEAD-box (Brüning et al. 2018).

Por consiguiente, a fin de garantizar la funcionalidad de estas dos proteínas procedentes de *Chaetomium thermophilum*, determinamos *in vitro* su actividad enzimática mediante el reactivo verde malaquita (Baykov, Evtushenko y Avaeva 1988). Por otro lado, la proteína NOC2 de *Chaetomium thermophilum* carece de una actividad enzimática que se pueda cuantificar. A fin de estudiar la estabilidad de la forma truncada ctNOC2 (1-771 aa) empleamos la técnica de termofluór, también conocida como DSF (differential scanning fluorimetry) (Pantoliano et al. 2001). Este ensayo también se llevó a cabo con las proteínas ctMAK5 (192-616 aa) y ctNOG1 (procedentes de *Chaetomium thermophilum*).

4.2.1 Determinación de la actividad enzimática de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa).

De acuerdo con lo esperado, la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) muestra actividad ATPasa (Figura 4.7A).

A



B

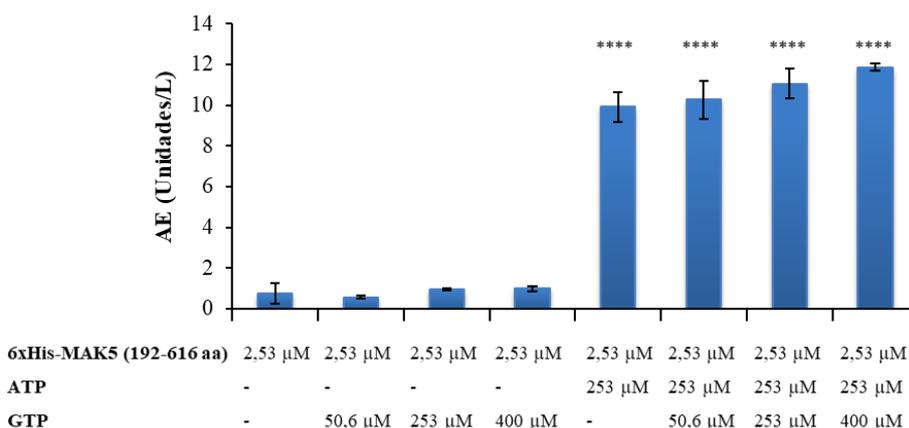


Figura 4.7: Evaluación de la actividad enzimática de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa). **A.** Actividad enzimática (AE) de 6xHis-MAK5 (192-616 aa) en presencia de concentraciones crecientes de ATP. **B.** Actividad enzimática (AE) de 6xHis-MAK5 (192-616 aa) en presencia GTP, ATP o ambos en las concentraciones indicadas. En **(A)** y **(B)** se muestra el valor medio de al menos tres réplicas experimentales \pm SD. La actividad enzimática se muestra en Unidades/L, siendo una Unidad la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de fosfato inorgánico por minuto. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ con respecto al control (enzima sin tratar con ATP/GTP).

Se comprobó asimismo que 6xHis-MAK5 (192-616 aa) no muestra actividad enzimática en presencia de GTP (Figura 4.7B). En presencia de una mezcla de ATP y una concentración creciente de GTP se observa un ligero aumento en la actividad enzimática. Sin embargo, este aumento resulta mucho menor que el que se observa en presencia de concentraciones crecientes de ATP (compárese Figuras 4.7A y 4.7B).

Estos resultados muestran que la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) de *Chaetomium thermophilum* cataliza específicamente la hidrólisis de ATP, pero no GTP, actuando por tanto como una helicasa específica de ATP. Este resultado está en consonancia con lo que se ha descrito para la forma homóloga de esta proteína en levaduras (Brüning et al. 2018).

Los resultados de la Figura 4.7 muestran que la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) es catalíticamente activa a pesar de haber delecionado aminoácidos en los extremos amino y carboxi-terminal. Las proteínas de la familia DEAD-box se caracterizan por la presencia de 9 motivos de secuencia característicos que definen su actividad enzimática (Figura 4.8A) (Cordin et al. 2006). De entre todos ellos destaca el motivo II donde se localiza la secuencia consenso DEAD por la que se nombra a esta familia de proteínas. La forma truncada 6xHis-MAK5 (192-616 aa) de *Chaetomium thermophilum* conserva en su secuencia estos 9 motivos característicos (Figura 4.8B). Esto podría explicar la conservación de su actividad catalítica y sugiere que los aminoácidos eliminados en los extremos amino y carboxi-terminal no son esenciales para la actividad catalítica de esta proteína.

A



B

Chaetomium	----TTD--GTEVSFTDSAATEPTKEEEKDSR--PQEPQQDQKRGKKDKKKNKTA---KT	164
Saccharomyces	E-----SELLEFNKLN---DDIKEGELSAASYSSSDEDEQ--GNI-ESSKLTDPES-ED	140
Candida	EDEKPTQEFFFFFFFFF---FFFFFFFFFFFFFFAGFEDDENNOEDANTSERVSNNDKDD	163
Chaetomium	QQPEADPE-LETNVFAQAAAIADVEAAEDDVLSTWYPLGLSPP----VLSCIARLKFLK	219
Saccharomyces	VDEDVDEDVLEKENVFNKDINI----DDISPVNLPWLNLA---PLSMTILQSLQNLNFLR	193
Candida	KLAESNDELNAVSFANLDLPL----PDDNEINLPIWQEGDLGSSISAYTLYGLSLDFKK	219
Chaetomium	PTPIQARAIVEVINGHDVIGAAATGSGKTAFGIPIVEAWLSKIASAE----SSGQKHPI	275
Saccharomyces	PTEIQKKSIPVIMQGVDMGAASTGSGKTAYGIPIVEKLISNFS-----QKNKKPI	245
Candida	PTPIOKETIPIALSQKDVIGATTGSGKTAYGIPILEKYIOSLNLKONNKDKKINHPT	279
Chaetomium	ALILSPTRELAIQITDHLKQLCAGLA--TAPYICSVTGGGLAVQKQERQLQK---ADIVVG	330
Saccharomyces	SLIFPTRELAIQVTDHLKKICEPVLAKSQYSILSLTGGLSIQKQQRLLKYDNSGQIVIA	305
Candida	GIIFAPRELAIQVVDHLNKLAKYS-PLSTRGIVSITGGLSIQKQQRLLRHG--PGIIVA	336
Chaetomium	TPGRLNEVMSTSNVMSQSFRSISFLVDEADILKDGHFKEAEKILLALDRTPVGEEN	390
Saccharomyces	TPGRFLELEKDNLTIKRFSKVNTLIDDEADLLQDGHFDEFEKIKHLLVE-----RRK	360
Candida	TPGRMELVQGDSELAKRSLASIDIIVLDEADLLQDGHFDEFEKILELFG-----K	387
Chaetomium	DSDDEKTSRRRQTLVFSATFNKALQQLAGKAR---YNLMGETESL----EYLLKRLNF	443
Saccharomyces	NRENSEGSSKIWQTLIFSATSIDLFDKLSRRQVKDRRFKNEDELNAVIQHLMSKIH	420
Candida	NRPKSKSIEWKWQTLVFSATSIRDLFKRLDRHQK GKSSSLMGNDE----IVQLLNEKLF	443
Chaetomium	-REHPKFIDTNPITQMAENLKEGLIQCGDMEKDLYLYAVLLLQPTRRALVFTNSINIVRR	502
Saccharomyces	-NSKPVIIDTNPESKVSSQIKESLIECPPLERDLYCYFFLTMPFG-TLLIFCNAIDSVKK	478
Candida	KDKKPTLVDANPKEIVSGQITEALVECGPTERDLYLYFLLMYKG-STLVFANSIDSVKR	502
Chaetomium	LTAFLNLLNLPVFAHSEMEQKARLRSIERFKADNHPNKS-----SNNAA SILVATDV	556
Saccharomyces	LTVYLLNLLGIPAFQIHSSMTQKNRLKSLERFKQSAKQKTINHSPDVSQVSTVLIA SDV	538
Candida	LVPLLNNLNIPAFSIIHSSMIQQRRLALEKFKEASQKNE-----VAVLVA SDV	550
Chaetomium	AARGLDIPLIDLWVHYHVP RSADYVHRSGR TARVNSGVSI L LCGPKEA IPTQLINKV	616
Saccharomyces	AARGLDIPGVQVHIHYHLPRSTDIYHRSGR TARV GSEGV SAMICSPQESMGPLRKLRT	598
Candida	AARGLDIPNIDHVHYHLPR SADYVHRSGR TARV GKEGV SVMFCSPQ EASGPLRKLRL	610
Chaetomium	HAAAAAKNSN-----PVKSTKALGVQTIIDIRRLVQCLRPVRTLSQKITEATMAKERG	669
Saccharomyces	LATKNSVSTDLNSRSTNRKPIKWQNTVPLLP IETDILSQRERSR LAGELADHEIASNSL	658
Candida	VAGNSNK-----ESRLNMHNDVKLLPIEMDLVLSQIKPRVEISSKLADASISSTAT	660

Figura 4.8: Análisis de secuencia de la proteína MAK5 (192-616 aa) de *Chaetomium thermophilum* en relación a otros miembros de la familia DEAD-box **A.** Representación esquemática de los 9 motivos de secuencia característicos de las proteínas de la familia DEAD-box. Tomado de Cordin et al. 2006. Leyenda de símbolos: o: S, T; l: I, L, V; x: cualquier aminoácido; a: F, W, Y; c: D, E, H, K, R; h: A, F, G, I, L, M, P, V, W, Y; +: H, K, R; u: A, G. **B.** Alineamiento de la secuencia correspondiente a MAK5 en *Chaetomium thermophilum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Se indica con un asterisco el principio (192 aa) y el final (616 aa) de la secuencia correspondiente a MAK5 (192-616 aa) de *Chaetomium thermophilum*, así como la presencia de los motivos de secuencia característicos de esta familia de proteínas (siguiendo el mismo código de colores que en el apartado **A**).

4.2.2 Actividad enzimática de ctNOG1.

A continuación evaluamos la actividad GTPasa de la proteína ctNOG1. Como se muestra en la Figura 4.9, la construcción MBP-NOG1 presenta actividad GTPasa. La construcción 6xHis-NOG1 también muestra actividad GTPasa (ver Anexo 3). Estos experimentos nos permiten demostrar la funcionalidad de ambas proteínas.

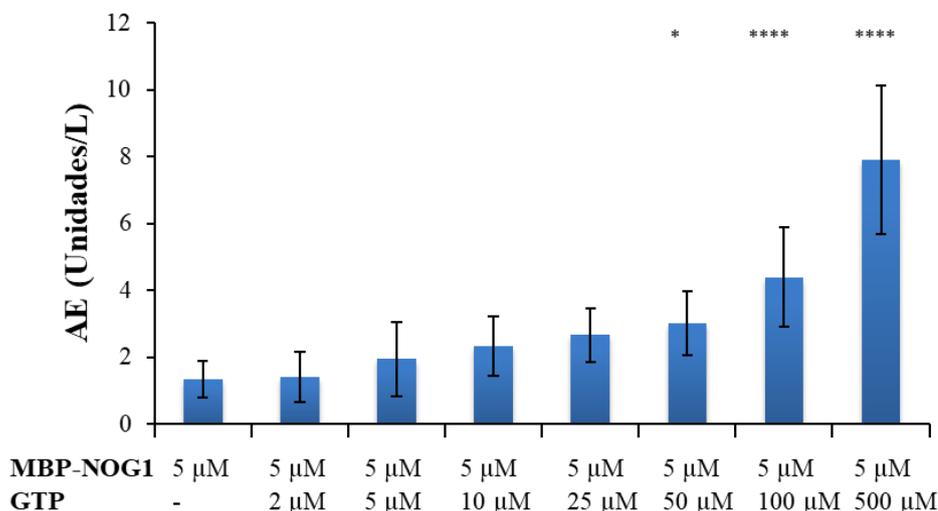


Figura 4.9: Evaluación de la actividad enzimática de la construcción MBP-NOG1. Se muestra la actividad enzimática (AE) de MBP-NOG1 en presencia de concentraciones crecientes de GTP. Se muestra el valor medio de al menos seis réplicas experimentales \pm SD. La actividad enzimática se muestra en Unidades/L, siendo una Unidad la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de fosfato inorgánico por minuto. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$ respecto a MBP-NOG1 5 μ M en ausencia de GTP (control).

Hasta la fecha no se ha caracterizado *in vitro* la actividad catalítica del factor de ensamblaje NOG1. Sin embargo, estudios en levaduras y células de ratón empleando un mutante de NOG1 en el motivo G3 de su dominio catalítico demuestran que la actividad catalítica de NOG1 podría ser esencial para su función en la biogénesis de la subunidad 60S así como para el reciclaje de NOG1 entre el citoplasma y el núcleo (Lapik et al. 2007) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020).

4.2.3 Determinación de la temperatura de fusión de las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa).

A fin de evaluar la estabilidad térmica de las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa) procedentes de *Chaetomium thermophilum*, empleamos la técnica de termofluor, también conocida con DSF (differential scanning fluorimetry) (véase apartado 3.4.1). Esta técnica se basa en el empleo del reactivo Sypro™ Orange, capaz de interactuar con las regiones hidrofóbicas de una proteína a medida que esta se desnatura por efecto de una elevación progresiva de la temperatura. Esta interacción se traduce en la emisión de fluorescencia. Dicha emisión es detectada y cuantificada a fin de comprobar la estabilidad térmica de la proteína de interés en las diferentes condiciones experimentales (véase Tabla 3.7) (Pantoliano et al. 2001).

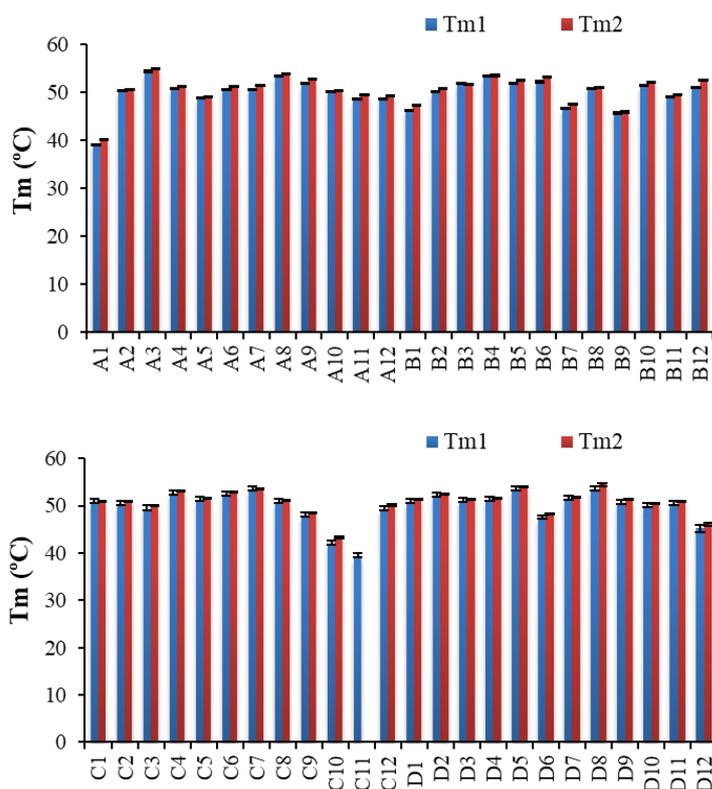


Figura 4.10: Análisis de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) de *Chaetomium thermophilum* mediante termofluór. Se muestra la temperatura de fusión (T_m) que presenta esta construcción en las distintas condiciones experimentales (A1-D12). Cada condición es ensayada por duplicado obteniéndose dos series de datos (T_{m1} y T_{m2}). Se muestra el valor correspondiente a la T_m en cada condición \pm SD.

Realizamos este ensayo con las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y 6xHis-NOG1 de *Chaetomium thermophilum*. Los resultados mostraron que la construcción 6xHisNOC2 (1-771 aa) es estable en las distintas condiciones empleadas en el ensayo, mostrando una temperatura de fusión (T_m) situada en el entorno de los 50°C en la mayoría de condiciones experimentales (Figura 4.10). Esta elevada temperatura de fusión concuerda con el hecho de que se trata de una proteína termoestable procedente de un hongo termófilo. La condición C11 de la serie T_{m2} fue eliminada debido a que no fue posible obtener datos experimentales fiables. La condición A5 (150 mM de NaCl, 100 mM de MES pH 6,5) es la que más se asemeja a las condiciones experimentales que hemos empleado para la purificación de esta proteína (véase Tabla 3.6). En dicho punto experimental, la proteína presenta una temperatura de fusión de 48,74° y 48,93°C en las dos réplicas experimentales respectivamente. Se muestra así que la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) es estable en las condiciones experimentales empleadas para su purificación.

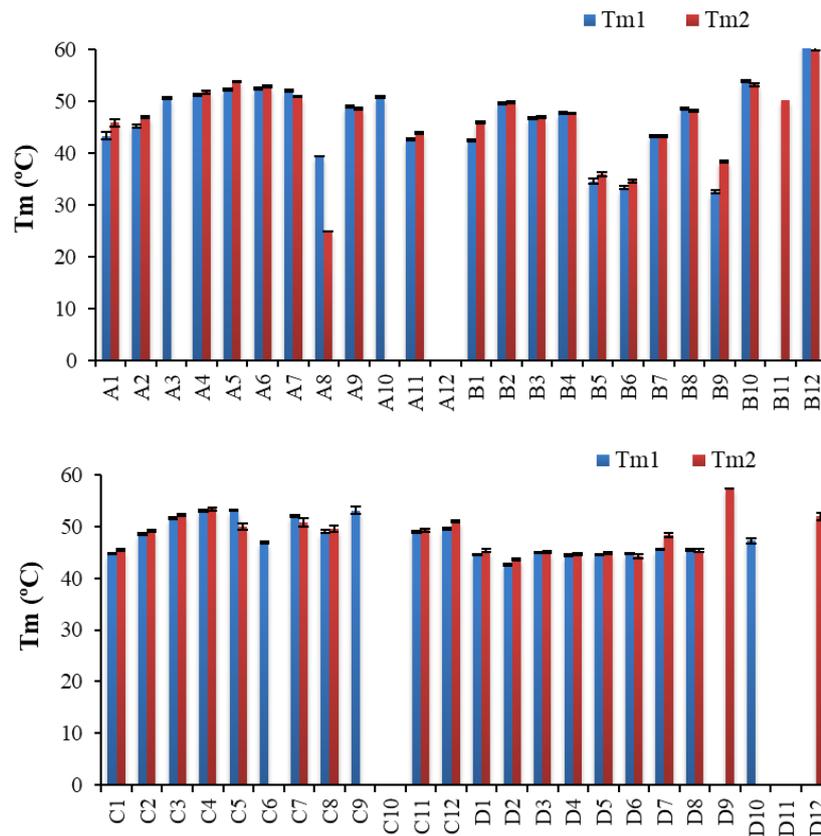


Figura 4.11: Análisis de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) de *Chaetomium thermophilum* mediante termofluór. Se muestra la temperatura de fusión (T_m) que presenta esta construcción en las distintas condiciones experimentales (A1-D12). Cada condición es ensayada por duplicado obteniéndose dos series de datos (T_{m1} y T_{m2}). Se muestra el valor correspondiente a la T_m en cada condición \pm SD.

Los resultados obtenidos con la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) de *Chaetomium thermophilum* son más heterogéneos (Figura 4.11). En algunas condiciones (mostradas en blanco en la Figura 4.11) no fue posible obtener datos experimentales fiables. Sin embargo, en la mayoría de condiciones sí fue posible calcular la temperatura de fusión (T_m) correspondiente. En algunas de estas condiciones (A8, B5, B6 y B9) la proteína muestra baja estabilidad térmica ($T_m < 40^\circ\text{C}$). Sin embargo, en la mayoría de las condiciones la temperatura de fusión se sitúa entre 40 y 50°C .

El punto experimental C5 (150 mM de NaCl, 100 mM de HEPES pH 7,5 y 5% (v/v) de glicerol), es el que más se asemeja a las condiciones empleadas para la purificación de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa). En estas condiciones la proteína es estable, mostrando una temperatura de fusión de 53,04 y 49,9 en ambas réplicas experimentales respectivamente. Se muestra así que la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) es estable en las condiciones empleadas para su purificación.

Por último, en el caso de la construcción 6xHis-NOG1 de *Chaetomium thermophilum*, los resultados mostraron que esta proteína presenta estabilidad térmica en las distintas condiciones experimentales ensayadas mostrando un valor de T_m situado entre 40°C y 50°C (Figura 4.12). En la condición B5

(150 mM NaCl, 1X SPG (tampón Glicina, succinato, fosfato) pH 8) no fue posible obtener datos experimentales fiables, por lo que se muestra en blanco en la Figura 4.12. La condición A9 (150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8) es la que más se asemeja a las condiciones empleadas para la purificación de la construcción 6xHis-NOG1 en este trabajo. En dicha condición la temperatura de fusión se sitúa en torno a los 45°C (46,16 y 45,34 °C en ambas réplicas experimentales). Se puede concluir así que la construcción 6xHis-NOG1 es estable en las condiciones experimentales empleadas para su purificación.

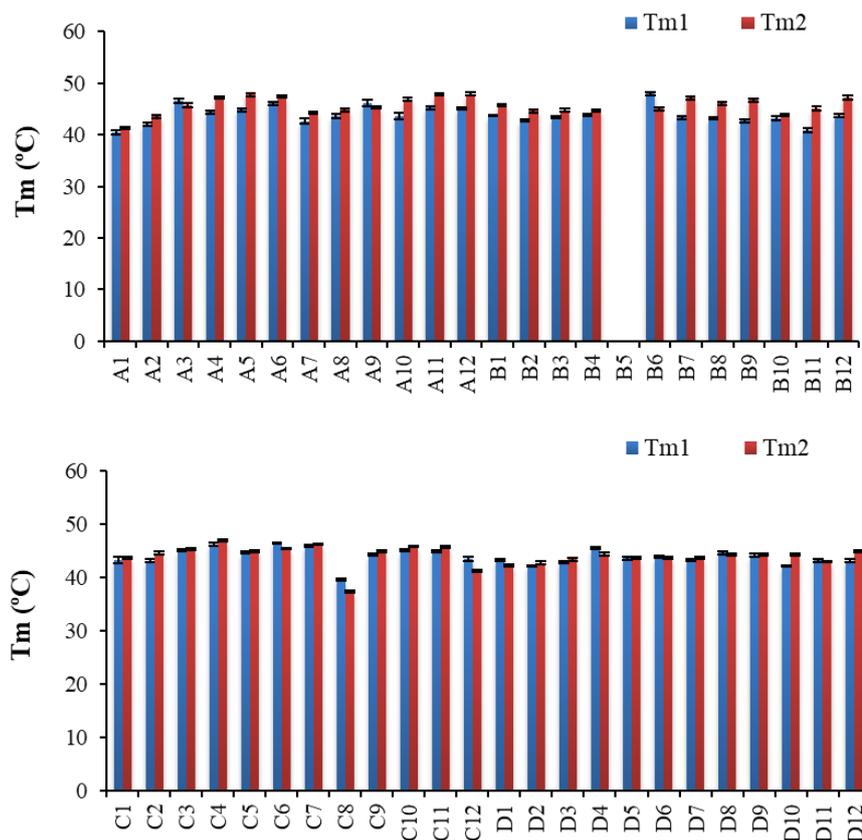


Figura 4.12: Análisis de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-NOG1 de *Chaetomium thermophilum* mediante termofluór. Se muestra la temperatura de fusión (Tm) que presenta esta construcción en las distintas condiciones experimentales (A1-D12). Cada condición es ensayada por duplicado obteniéndose dos series de datos (Tm1 y Tm2). Se muestra el valor correspondiente a la Tm en cada condición \pm SD

En resumen, los resultados de este ensayo realizado con las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y 6xHis-NOG1 nos muestran que las tres proteínas conservan su integridad en las condiciones empleadas para su purificación. Los elevados valores de temperatura de fusión obtenidos concuerdan con el hecho de que las tres proteínas proceden de *Chaetomium thermophilum*, un hongo termófilo con una temperatura óptima de crecimiento de 50°C (Gao, Li, y Li 2021).

Por otro lado, podemos concluir que la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) presenta menor estabilidad térmica que las otras dos construcciones empleadas en este ensayo (6xHis-NOG1 y 6xHis-NOC2 (1-771 aa)) (compárese Figura 4.11 con Figuras 4.10 y 4.12).

4.2.4 Cribados de cristalización de las construcciones 6xHis-NOC2, 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa).

Una vez comprobada la funcionalidad y estabilidad térmica de las distintas construcciones de interés, tratamos de obtener cristales de cada una de ellas con el objetivo de resolver su estructura mediante difracción de rayos X. Utilizamos para ello las distintas proteínas de interés en este trabajo (ctNOC2, ctNOC2 (1-771 aa), ctNOG1 y ctMAK5 (192-616 aa)) provistas de una etiqueta de 6xHis, a fin de minimizar la presencia de elementos exógenos en la estructura final de cada proteína. Las proteínas NOC2 y MAK5 no han sido resueltas estructuralmente en ningún organismo, lo cual hace que resulte interesante su resolución estructural en *Chaetomium thermophilum*. Por otro lado, se dispone de estructuras resueltas de NOG1 en *Homo sapiens* (Liang et al. 2020) y *Saccharomyces cerevisiae* (Wu et al. 2016), obtenidas en ambos casos mediante crio-microscopía electrónica a partir de estructuras pre-ribosómicas. Sin embargo, no se dispone de estructuras resueltas de la proteína NOG1 de *Chaetomium thermophilum*. Tampoco se dispone de la estructura resuelta de este factor de ensamblaje fuera del contexto pre-ribosómico.

Se realizaron una serie de cribados en los que se probaron distintas condiciones de cristalización, así como diferentes concentraciones de cada proteína. Desgraciadamente, estos intentos no dieron resultado, no pudiéndose obtener cristales de ninguna de las cuatro proteínas de interés. En las Tablas 3-10, 3.11, 3.12 y 3.13 se resumen las condiciones de cristalización empleadas con cada proteína de interés en los sucesivos cribados.

De acuerdo con la teoría de diagramas de fases, la aparición de precipitados se corresponde con el estadio final del proceso de supersaturación, cuando la proteína está demasiado concentrada para formar cristales, mientras que las condiciones situadas en la región lábil menos concentrada favorecen la nucleación espontánea (formación de cristales) (Luft, Wolfley, y Snell 2011).

En el caso de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa), al emplear los cribados PACT a 7,5 mg/ml, Wizard I y II a 4 mg/ml y JCSG+ a 5,88 mg/ml se observa la aparición de precipitados marrones en un porcentaje superior al 30% de condiciones experimentales. Este porcentaje supera el 50% en el cribado PACT a 7,5 mg/ml. En cambio, al emplear los cribados JBS I a 3,26 mg/ml, JBS II a 3,1 mg/ml y MIDAS a 3,1 mg/ml no se observan precipitados. Empleando el cribado Cs I y II a 7,5 mg/ml se observa una baja cantidad de precipitados (17%).

En el caso de la construcción 6xHis-NOG1 observamos la aparición de un 50% de precipitados al emplear los cribados de cristalización MIDAS y JBS I ambos a 19,3 mg/ml, mientras que en el caso de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) se observó la aparición de un 50% de precipitados en los cribados JBS II (25 mg/ml), JBS I (25 y 31,9 mg/ml), Cs I y II (25 mg/ml) e Index (25 mg/ml). Por último, en el caso de la construcción 6xHis-NOC2 solamente en el cribado JBS II empleando una concentración de 34,18 mg/ml de proteína observamos un porcentaje alto de precipitados (74%). En el resto de cribados realizados con esta construcción no se observan precipitados o se observa un porcentaje bajo de precipitados (inferior al 50% de condiciones experimentales). Estos resultados subrayan la necesidad de llevar a cabo nuevos cribados de cristalización empleando concentraciones mayores de las distintas proteínas de interés.

4.3 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre los factores de ensamblaje ctNOC2, ctMAK5 y ctNOG1.

Los distintos factores de ensamblaje ribosómicos establecen entre sí diversas interacciones que son esenciales para la correcta maduración del ribosoma (Milkereit et al. 2001) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). La interacción entre los factores de ensamblaje NOG1, NOC2 y MAK5 ya ha sido estudiada en levaduras empleando el método de purificación en tándem acoplado bien a espectrometría de masas o bien a western Blot. Mediante este método se ha validado la interacción entre NOC2 y NOG1 (Saveanu et al. 2003) (Gavin et al. 2006) (Ohmayer et al. 2013) (Ohmayer et al. 2015) (Zisser et al. 2018), entre NOC2 y MAK5 (Ohmayer et al. 2015) (Zisser et al. 2018) y entre NOG1 y MAK5 (Gavin et al. 2002) (Saveanu et al. 2003) (Gavin et al. 2006) (Brüning et al. 2018) (Zisser et al. 2018). En el caso de la interacción NOC2-MAK5, ésta también ha sido confirmada en levaduras mediante ensayos de doble híbrido (McCann et al. 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se ha caracterizado la interacción entre las formas homólogas de estas proteínas presentes en *Chaetomium thermophilum*. A fin de corroborar en *Chaetomium thermophilum* los resultados obtenidos en levaduras decidimos llevar a cabo experimentos de interacción *in vitro* empleando la técnica de interferometría de biocapas.

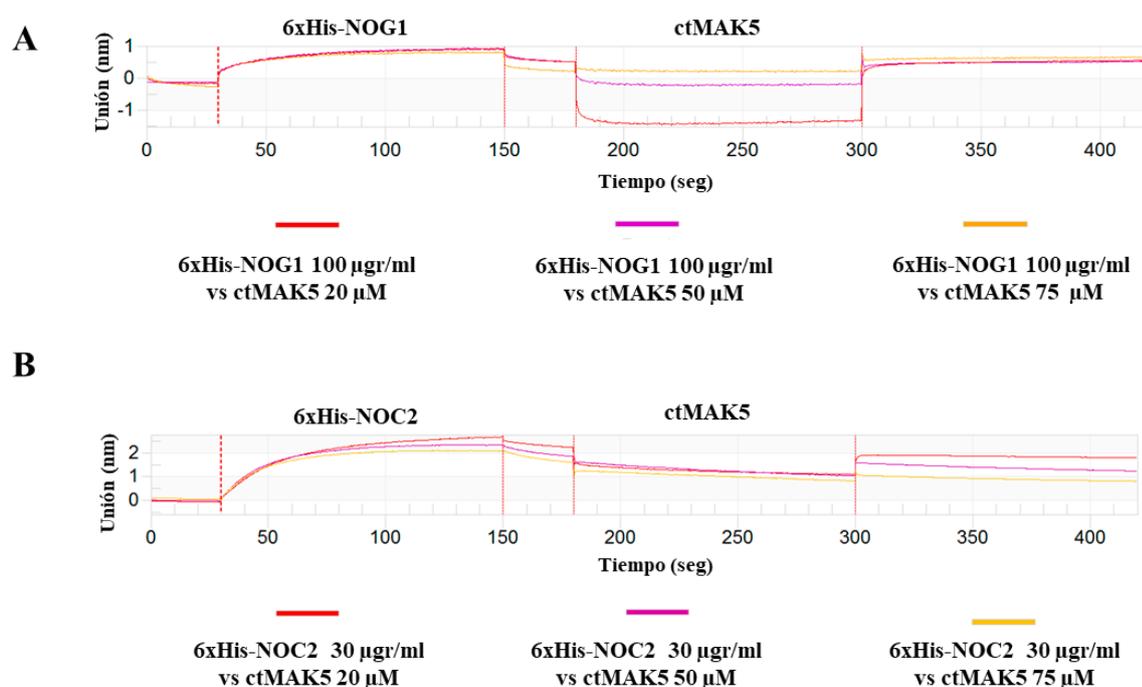


Figura 4.13: Ensayos de interacción entre ctMAK5, 6xHis-NOC2 y 6xHis-NOG1 de *Chaetomium thermophilum* mediante interferometría de biocapas (BLI). Se muestra el resultado del ensayo de interacción entre ctMAK5 y 6xHis-NOG1 (A) y entre ctMAK5 y 6xHis-NOC2 (B). En ambos casos se empleó una concentración fija de 6xHis-NOG1/NOC2 que fue unida al sensor de Níquel, y concentraciones variables de ctMAK5. En la parte superior de cada experimento (A y B) se indica el orden de unión de las distintas construcciones al sensor de Níquel.

Para ello las construcciones 6xHis-NOC2 y 6xHis-NOG1 de *Chaetomium thermophilum* fueron fijadas por separado a un sensor de Níquel y se evaluó la capacidad de la proteína ctMAK5 (en su forma completa y sin etiqueta) de interactuar por separado con cada una de ellas (Figura 4.13). Se determinó que no existe

interacción *in vitro* entre 6xHis-NOC2 y ctMAK5 ni entre 6xHis-NOG1 y ctMAK5 en las condiciones experimentales empleadas en este estudio.

La forma completa de MAK5 de *Chaetomium thermophilum* había sido anteriormente clonada, sobre-expresada y purificada en el laboratorio (Guilherme Dim de Oliveira, véase Anexo 4). Esta proteína se clonó en el vector pGKI siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1 de la sección de Materiales y Métodos. La sobre-expresión se realizó siguiendo el protocolo de autoinducción (apartado 3.2.2), mientras que la purificación (ver Anexo 4) incluyó una cromatografía de afinidad en columna GSTrap HP seguida de una cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap Q HP. Se emplearon los tampones descritos en la Tabla 3.6 para ambas etapas de purificación y se siguieron los protocolos descritos en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos para la purificación de ésta construcción. Previamente a su uso en ensayos de interferometría de bio-capas, la proteína fue digerida a fin de eliminar la etiqueta de GST en su extremo amino-terminal (apartado 3.3.7 de Materiales y Métodos).

4.4 Búsqueda de interacciones entre factores de ensamblaje ribosómicos que constituyan dianas relevantes para el desarrollo de péptidos de interferencia.

La ausencia de interacción entre las proteínas ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 en nuestras condiciones experimentales (Figura 4.13), nos impide evaluar la eficacia de potenciales péptidos diseñados con estas proteínas como diana, al no poder detectar claramente interacciones entre ellas.

Tabla 4.1: Resumen de las interacciones establecidas entre factores de ensamblaje en la subunidad pre-60S

Proteína 1	Proteína 2	PDB ID	Superficie de interacción (Å ²)	Organismo	Referencia
NOG1	ARX1	3JCT	988,1	Levaduras	Wu et al. 2016
NOG1	RLP24	3JCT	2726,9	Levaduras	Wu et al. 2016
NOG1	NOG2	3JCT	1388,9	Levaduras	Wu et al. 2016
NOG1	NSA2	3JCT	979,7	Levaduras	Wu et al. 2016
NOG1	eIF6	3JCT	2606,2	Levaduras	Wu et al. 2016
NOG1	BUD20	3JCT	875,9	Levaduras	Wu et al. 2016
GTPBP4	eIF6	6LU8	2581,8	Humanos	Liang et al. 2020
GTPBP4	RLP24	6LU8	2582,8	Humanos	Liang et al. 2020
GTPBP4	NOG2	6LU8	467,4	Humanos	Liang et al. 2020
HAS1	Erb1	6C0F	506,3	Levaduras	Sanghai et al. 2018
HAS1	NOP16	6C0F	203,3	Levaduras	Sanghai et al. 2018
HAS1	CIC1	6C0F	791,5	Levaduras	Sanghai et al. 2018

Ante esta situación, centramos nuestros esfuerzos en la búsqueda de otras interacciones binarias entre factores de ensamblaje ribosómicos que constituyan potenciales dianas para el desarrollo de péptidos de interferencia.

Para ello utilizamos la información estructural disponible en el *Protein Data Bank* (PDB). En esta base de datos se encuentra disponible una gran cantidad de información estructural derivada de partículas pre-ribosómicas en diversos estadios de maduración resueltas mediante criomicroscopía electrónica o difracción de rayos X. Para el análisis de las interacciones establecidas entre distintos factores de ensamblaje usamos el programa PDBE PISA (Krissinel y Henrick 2007). Concretamente, utilizamos la información depositada en el PDB con el identificador 3JCT, que se corresponde con una partícula pre-60S de levaduras en su estadio de maduración nucleoplásmico (Wu et al. 2016). Partiendo de esta información estructural, determinamos las distintas interacciones que establece el factor de ensamblaje NOG1 de levaduras en el contexto del pre-ribosoma. Los resultados indicaron que en levaduras NOG1 establece interacciones con los factores de ensamblaje NOG2, eIF6, RLP24, NSA2, BUD20 y ARX1 (Tabla 4.1).

Mientras desarrollábamos este análisis se publicó la resolución estructural de una partícula pre-60S aislada de células humanas a partir del factor de exportación nuclear NMD3. Esta partícula se corresponde con la subunidad pre-60S en su estadio inmediatamente anterior a su exportación nuclear al citoplasma (Liang et al. 2020). Mediante el programa PDBE PISA comprobamos que en esta partícula pre-ribosómica también se observa la interacción entre GTPBP4 (la forma homóloga de NOG1 en humanos) y eIF6, así como las interacciones GTPBP4-RLP24 y GTPBP4-NOG2 (Tabla 4.1).

Entre las distintas interacciones que establece tanto el factor de ensamblaje NOG1 de levaduras como su forma homóloga GTPBP4 en células humanas nos llamó la atención la interacción establecida entre NOG1/GTPBP4 y eIF6, por ser, junto con NOG1/GTPBP4-RLP24 la que presenta una mayor superficie de interacción en ambos organismos (Figura 4.5). El análisis de la estructura tridimensional de ambas proteínas humanas depositada en el PDB (identificador 6LU8) nos mostró que la proteína eIF6 presenta una estructura globular e interacciona con un segmento delimitado de la región carboxi-terminal de GTPBP4 (Figura 4.14A). Se consideró esta interacción de especial interés para el desarrollo de nuevos péptidos de interferencia, en comparación con la interacción NOG1/GTPBP4-RLP24. A diferencia de eIF6, RLP24 presenta una estructura desplegada que hace más difícil el diseño de péptidos de interferencia (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020).

La interacción entre NOG1/GTPBP4 y eIF6 está presente tanto en eucariotas unicelulares (*Saccharomyces cerevisiae*) como pluricelulares (*Homo sapiens*). Ambas proteínas NOG1/GTPBP4 y eIF6 se encuentran muy conservadas entre los dos organismos tanto a nivel de secuencia (46% de identidad de secuencia en el caso de NOG1/GTPBP4 y 72% en el caso de eIF6) como estructural (Wu S et al. 2016) (Liang et al. 2020). Esto último implica que en levaduras y células humanas la interacción NOG1/GTPBP4-eIF6 está mediada por las mismas secuencias de aminoácidos en ambos factores de ensamblaje, lo cual subraya el grado de conservación de esta interacción. La información estructural disponible en células humanas se corresponde con una partícula pre-ribosómica en su estadio de maduración nucleoplásmico inmediatamente previo a su exportación nuclear (Liang et al. 2020). La información estructural disponible en levaduras también se corresponde con una partícula pre-60S nucleoplásmica (Wu et al. 2016). Se ha descrito en levaduras que ambos factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 son exportados al citoplasma junto con la partícula pre-60S y allí mantienen su interacción hasta que NOG1 se escinde de la subunidad 60S al final de su proceso de

maduración y es reciclado al núcleo (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). La interacción entre ambos factores de ensamblaje, por tanto, se mantiene durante diversas etapas del proceso de maduración de la subunidad 60S (núcleo y citoplasma). Estas evidencias en su conjunto nos decidieron a utilizar la interacción NOG1/GTPBP4-eIF6 como diana para el desarrollo de péptidos de interferencia. En adelante nos referiremos a esta interacción como NOG1-eIF6 para mayor claridad.

Por otro lado, utilizando la entrada 6C0F del PDB, que se corresponde con una partícula pre-60S de levaduras en su estadio de maduración nucleolar (Sanghai et al. 2018), obtuvimos información relativa a las interacciones establecidas entre otros factores de ensamblaje. Concretamente, nos fijamos en el factor de ensamblaje HAS1. Esta proteína establece interacciones con otros factores de ensamblaje, entre los que se cuentan Erb1, NOP16 y CIC1. De entre todas ellas nos llamó la atención la interacción HAS1-CIC1, por ser la de mayor superficie (Tabla 4.1). El análisis de los detalles estructurales de esta interacción mostró que ambas proteínas son globulares y presentan una amplia superficie de interacción (Figura 4.14 B).

De manera adicional consultamos la base de datos BioGrid a fin de corroborar la información estructural obtenida en el PDB. Esta base de datos recopila información relativa a interactómica de proteínas en una gran variedad de organismos (Oughtred et al. 2021). Gracias a esta base de datos obtuvimos evidencias adicionales del establecimiento de las dos interacciones de interés (NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1) tanto en levaduras como en células humanas. Estas evidencias son derivadas de experimentos de captura por afinidad acoplados a espectrometría de masas o western blot. Mediante esta técnica se ha establecido en levaduras la interacción entre NOG1 y eIF6 (Gavin et al. 2002) (Saveanu et al. 2003) (Gavin et al. 2006) (Ohmayer et al. 2013) (Zisser et al. 2018), y entre HAS1 y CIC1 (Nissan 2002) (Gavin et al. 2006) (Krogan et al. 2006) (Brüning et al. 2018) (Ismail et al. 2022). La interacción entre HAS1 y CIC1 también ha sido confirmada mediante ensayos de doble híbrido de levaduras (Dembowski et al. 2013). Por otro lado corroboramos el establecimiento de la interacción entre los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 en humanos (Ewing et al. 2007) (Li et al. 2014). Por último, utilizamos la herramienta bioinformática BLAST (Altschul et al. 1990) para localizar las proteínas homólogas de HAS1 y CIC1 en humanos.

Estas formas homólogas se corresponden con las proteínas DDX18 y RSL1D1 respectivamente. También en este caso hallamos evidencias de la existencia de la correspondiente interacción en la base de datos BioGrid (Marcon et al. 2014) (Huttlin et al. 2021). Basándonos en este conjunto de evidencias obtenidas de diferentes bases de datos y que se corresponden tanto a información estructural como a datos de estudios de interactómica decidimos seleccionar las interacciones NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1 para el desarrollo de péptidos de interferencia específicos.

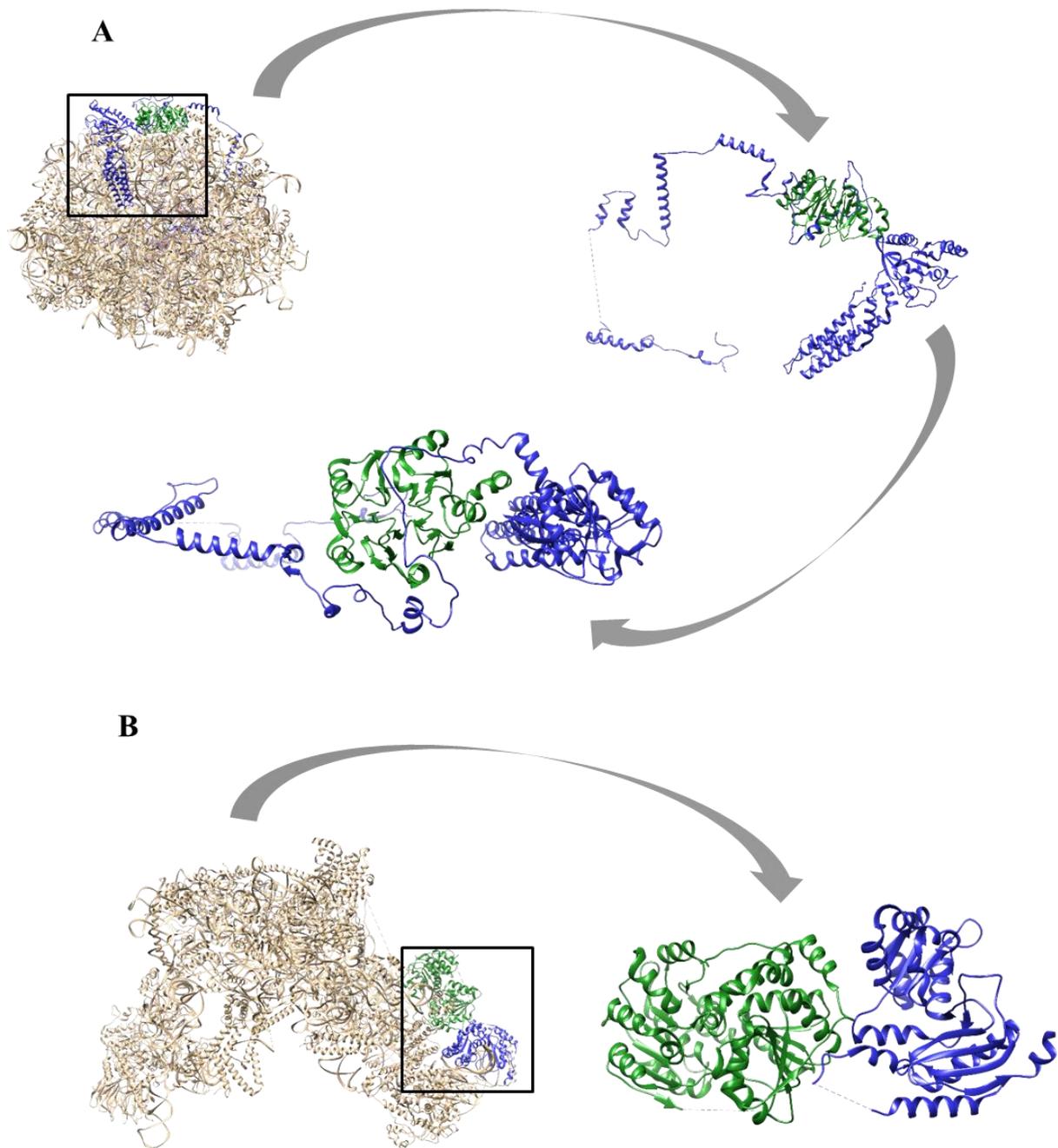


Figura 4.14: Las interacciones NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1 se establecen en el pre-ribosoma de células eucariotas. A. Estructura pre-ribosómica correspondiente a la partícula pre-60S de *Homo sapiens* (Liang et al. 2020) en su estadio de maduración nucleoplásmico (PDB ID: 6LU8). Se muestran resaltados los factores de ensamblaje NOG1 (azul) y eIF6 (verde) respecto al resto de proteínas y moléculas de ARNr presentes (marcadas en gris). **B.** Estructura pre-ribosómica correspondiente a la partícula pre-60S de *Saccharomyces cerevisiae* (Sanghai et al. 2018) en su estadio de maduración nucleolar (6C0F). Se muestran resaltados los factores de ensamblaje CIC1 (azul) y HAS (verde) respecto al resto de proteínas y moléculas de ARNr presentes (marcadas en gris).

4.5 Diseño y evaluación *in vitro* de un péptido de interferencia dirigido contra la interacción entre los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 de *Homo sapiens*.

4.5.1 Diseño y producción del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa).

Para el diseño del péptido seleccionamos la secuencia de aminoácidos 351-412 de la proteína NOG1 de *Homo sapiens*. Como se muestra en la Figura 4.15B, dicha secuencia se corresponde con la región de NOG1 que interacciona con eIF6 en humanos.

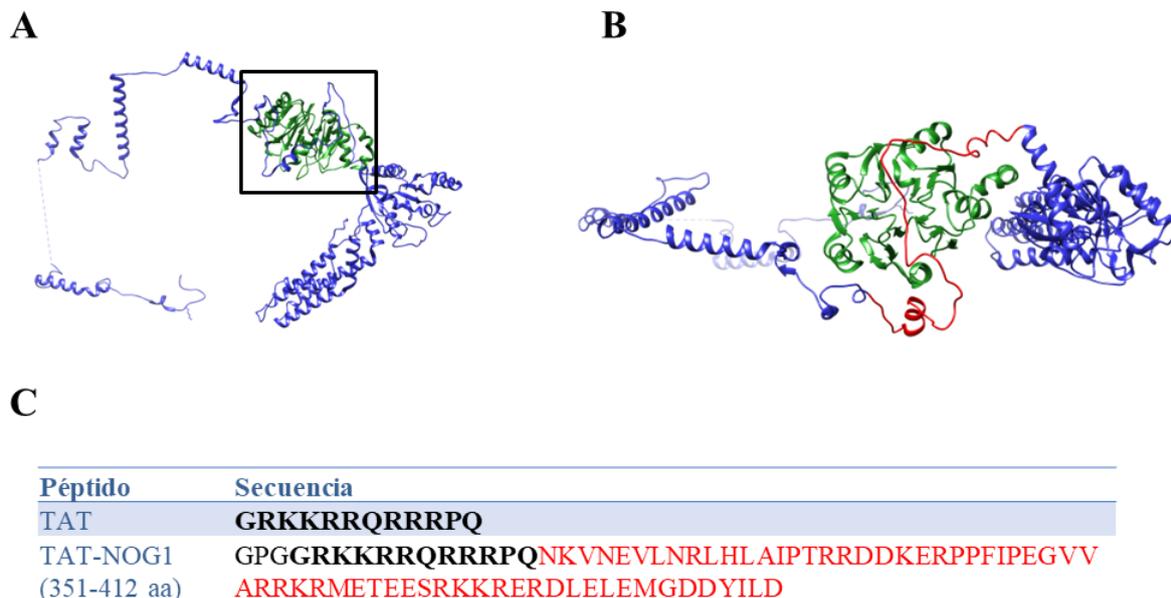


Figura 4.15: Diseño de un péptido dirigido contra la interacción entre NOG1 y eIF6 en *Homo sapiens*. **A.** Estructura tridimensional de los factores de ensamblaje NOG1 (azul) y eIF6 (verde) de *Homo sapiens* (PDB ID: 6LU8). **B.** Detalle de la interacción entre NOG1 (azul) y eIF6 (verde) (correspondiente a la sección recuadrada en el apartado (A)). Se seleccionaron los aminoácidos 351-412 de NOG1 (marcados en rojo) que fueron incluidos en la secuencia de interferencia. **C.** Secuencia del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) y el péptido TAT empleados en los ensayos de viabilidad *in vitro*. Se muestra en negrita la secuencia correspondiente al péptido TAT y en rojo la secuencia de interferencia.

A fin de generar un péptido dotado de penetrabilidad celular, es decir, con capacidad de atravesar las membranas plasmática y nuclear, utilizamos la secuencia TAT. Esta secuencia procedente del virus de la inmunodeficiencia humana (Chauhan et al. 2007), es ampliamente utilizada para la internalización de distintos tipos de biomoléculas en células de mamífero incluyendo péptidos y proteínas de diverso tamaño (Fawell et al. 1994). La eficacia de este péptido ha sido demostrada en una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* realizados con diversos tipos de proteínas y líneas celulares (Vázquez et al. 2003) (Klein et al. 2004) (Ozaki et al. 2004).

La secuencia de ADN codificante para el fragmento comprendido entre los aminoácidos 351 y 412 de la proteína NOG1 humana fue sintetizada por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT,

Coralville, USA) empleando codones optimizados para la expresión en *Escherichia coli*. En el diseño de este ADN codificante se incluyó la secuencia TAT, que fue incorporada en el extremo amino-terminal del péptido de interferencia (Figura 4.15C). La construcción obtenida se clonó en el vector pGKI, que incorpora una etiqueta de GST (Glutathion S-transferasa) en el extremo amino-terminal de la proteína clonada. Se generó así un plásmido codificante para la construcción GST-TAT-NOG1 (351-412 aa).

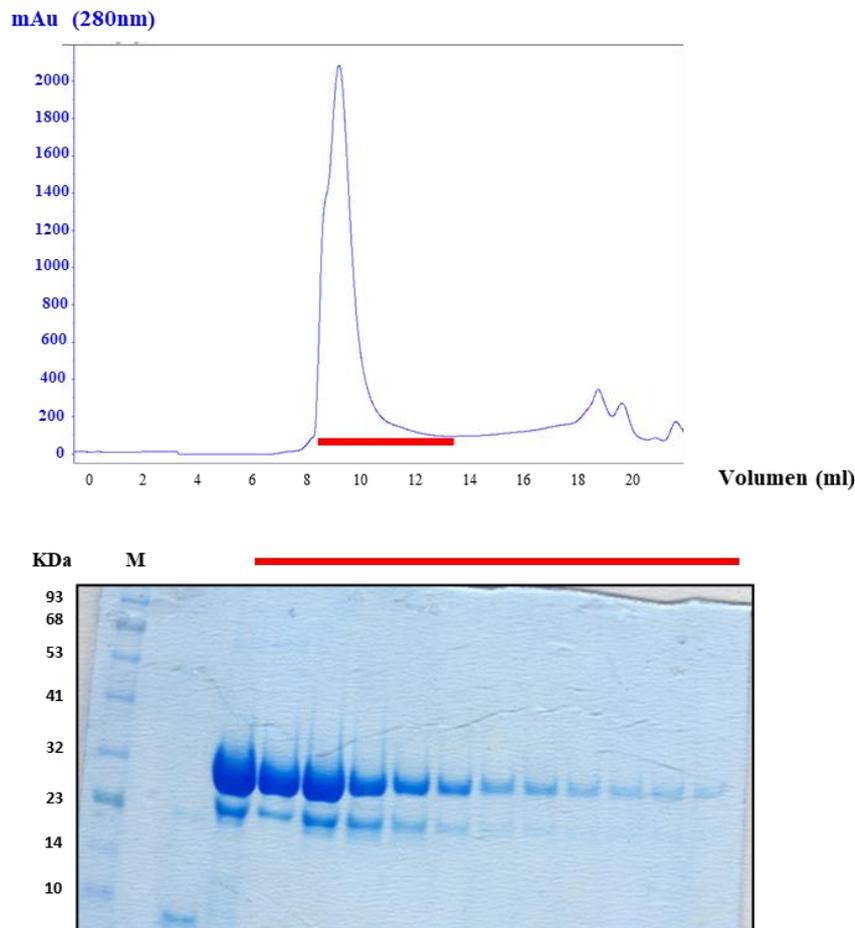


Figura 4.16: Proceso de purificación de la construcción GST-TAT-NOG1 (351-412 aa) mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de GST-TAT-NOG1 (351-412 aa) junto con el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 15% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

La expresión se llevó a cabo mediante un protocolo de inducción con 1 mM IPTG durante 3 horas a 37°C. El protocolo de purificación incluyó una primera cromatografía de afinidad en una columna GSTrap HP seguida de una cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL (Figura 4.16). En esta cromatografía la proteína muestra un peso molecular de 36 KDa, de acuerdo con lo esperado (véase Tabla 3.5). Posteriormente el péptido fue sometido a digestión empleando la proteasa 3C a fin de eliminar la etiqueta de GST en el extremo amino-terminal. Se genera así una proteína con un tamaño aproximado de 9 KDa. Esta proteína contiene un tripéptido GPG en su extremo amino-terminal, resultado de la digestión proteolítica con la proteasa 3C. Se

confirmó la identidad de la proteína mediante espectrometría de masas MALDI-TOF usando para ello el servicio de proteómica e identificación de proteínas de la Universidad de Valencia (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental).

4.5.2 Evaluación *in vitro* del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) empleando células tumorales humanas.

Una vez obtenido el péptido TAT-NOG1 (351-412 aa), se procedió a evaluar su capacidad de disminuir *in vitro* la viabilidad de células tumorales humanas. Para ello se empleó la línea celular HCT116 derivada de carcinoma de colon (Brattain et al. 1981) en las variantes silvestre y *knock out* para el gen codificante para la proteína p53 (denominadas p53+/+ y p53-/- respectivamente). Empleamos también la línea celular Saos2, derivada de osteosarcoma (Rodan et al. 1987) en su variante *knock out* para p53 (células Saos2 p53-/-). Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular basado en la determinación de la actividad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales mediante el reactivo comercial WST-1 (Roche) tras 48 y 72 horas de tratamiento.

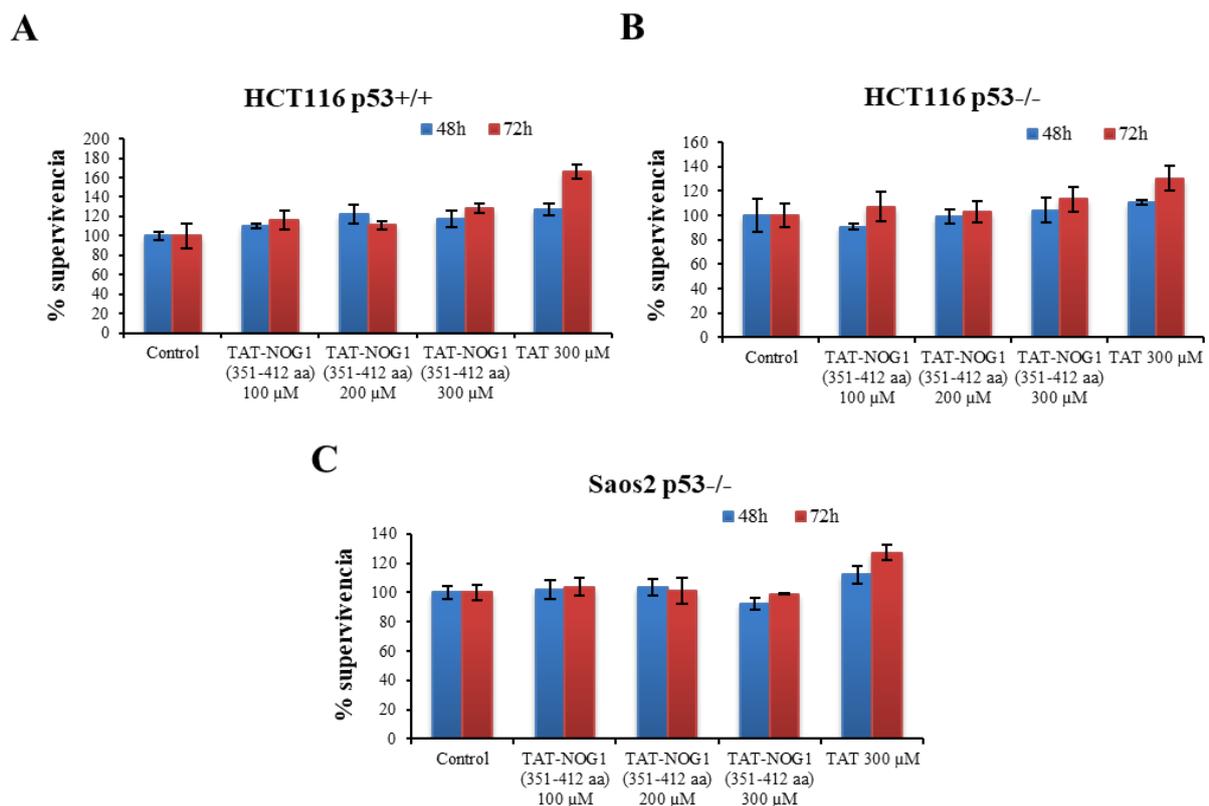


Figura 4.17: Evaluación *in vitro* de la capacidad del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) de alterar la viabilidad de células tumorales humanas. Se emplearon las líneas celulares HCT116 p53+/+ (A), HCT116 p53-/- (B) y Saos2 p53-/- (C) que fueron tratadas durante 48 o 72 horas con las concentraciones indicadas de péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) o péptido TAT. Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. Se muestran los datos normalizados con respecto al control (constituido por células sin tratar).

Asimismo se utilizó un péptido constituido únicamente por la secuencia TAT, a fin de descartar la posibilidad de que esta secuencia por sí sola provoque alteraciones en la viabilidad celular. Los resultados mostraron que el péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) a una concentración de 300 μ M no provoca un descenso significativo en la viabilidad en ninguna de las tres líneas celulares empleadas (Figura 4.17). Una posibilidad sería aumentar la concentración del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) empleada en los experimentos de viabilidad celular. Sin embargo, con vistas al posible uso terapéutico del péptido, esta opción no resulta razonable. Decidimos por tanto abandonar esta línea de investigación y buscar otras alternativas más prometedoras.

La eficacia del péptido TAT ha sido probada en estudios previos para la internalización de péptidos y proteínas de diversos tamaños (Vázquez et al. 2003) (Klein et al. 2004) (Ozaki et al. 2004). Sin embargo, en este trabajo no hemos comprobado la penetrabilidad del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) en células HCT116, por lo que no se puede descartar un fallo en la internalización del péptido. Por otro lado, como se señala más adelante (apartado 5.2), cabe la posibilidad de que los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6 de *Homo sapiens* no presenten la misma conformación cuando están en solución y cuando están formando parte del pre-ribosoma, lo cual condicionaría su capacidad de interacción en ambos contextos y con ello la eficacia del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa).

4.6 Evaluación *in vitro* de las interacciones entre ctNOG1 y cteIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1.

Ante estos resultados, decidimos comprobar la capacidad de los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6, así como HAS1 y CIC1 de interactuar entre sí, de acuerdo con la información estructural disponible (Figura 4.14 y Tabla 4.1). Para ello clonamos, sobre-expresamos y purificamos los factores de ensamblaje cteIF6, ctCIC1 y ctHAS1 procedentes de *Chaetomium thermophilum*. A continuación, como ya hicimos con los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 (192-616 aa) (apartado 4.2), llevamos a cabo una evaluación de la integridad de las proteínas purificadas mediante distintos ensayos funcionales. Finalmente determinamos su capacidad de interacción física mediante dos técnicas complementarias.

4.6.1 Clonación, sobre-expresión y purificación de ctCIC1, cteIF6 y ctHAS1.

4.6.1.1 Clonación, sobre-expresión y purificación de ctHAS1 y su forma truncada ctHAS1 (1-320 aa).

El gen correspondiente a la proteína homóloga de HAS1 en *Chaetomium thermophilum* (ctHAS1, referencia de UniProt GORYU9) fue clonado en el vector pMBKI, derivado del vector pET28-NKI/LIC 6His/3C. La proteína se sobre-expresó empleando la cepa BL21 (DE3) CodonPlus (RIPL) de *Escherichia coli* mediante el protocolo de autoinducción.

La purificación de la construcción MBP-HAS1 se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad en columna MBPTrap HP de 1ml. Debido a la baja unión de esta proteína a la resina de amilosa contenida en la columna MBPTrap, se realizaron tres pases consecutivos del lisado celular por la columna. La proteína resultante de esta primera cromatografía se sometió a una segunda cromatografía de exclusión molecular. Como resultado se obtuvo una proteína pura que muestra un

perfil de elución formado por un único pico en la cromatografía de exclusión molecular (Figura 4.18). El tamaño de esta proteína (aproximadamente 90 KDa) se corresponde con lo esperado (véase Tabla 3.5).

Como se puede observar en la Figura 4.19B, la proteína HAS1 de levaduras presenta una forma globular constituida por dos dominios diferenciados. El dominio carboxi-terminal que comprende los aminoácidos 264 al 489 en la estructura resuelta es el que está implicado en la interacción con CIC1, mientras que el dominio amino-terminal correspondiente a los aminoácidos 42 a 252 no participa en la interacción con CIC1. Los aminoácidos en posición 1-41, 253-263 y 490-505 de HAS1 no aparecen resueltos en esta estructura (PDB ID: 6C0F). A partir de estas observaciones en levaduras decidimos generar una forma truncada de ctHAS1 de *Chaetomium thermophilum* correspondiente a su dominio amino-terminal. Esta forma truncada nos servirá como control negativo de interacción con CIC1 (véase Figura 4.27).

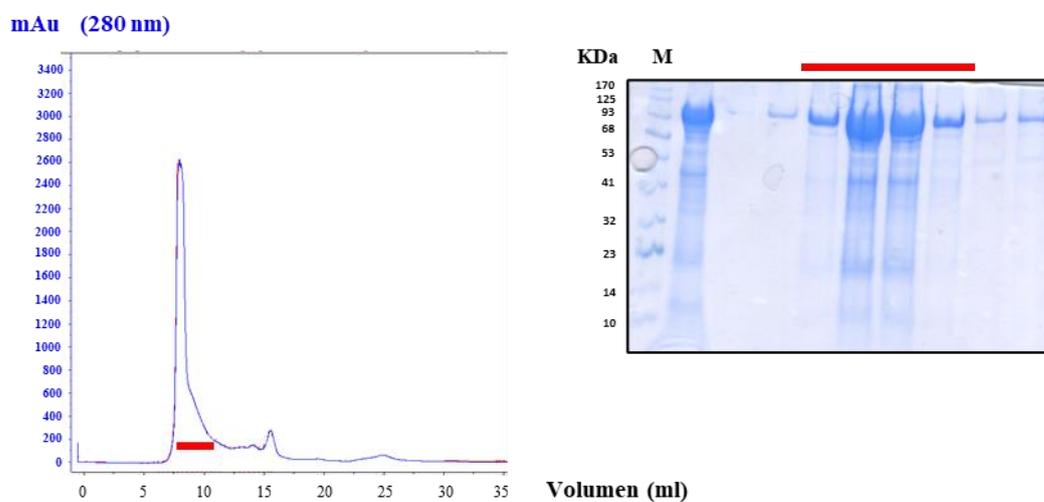


Figura 4.18: Proceso de purificación de la construcción MBP-HAS1 mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de MBP-HAS1 junto con el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

Partiendo de las secuencias de ambas proteínas homólogas en *Saccharomyces cerevisiae* y *Chaetomium thermophilum* realizamos un alineamiento mediante el programa P-BLAST (Altschul et al. 1990), que nos permitió determinar que el aminoácido V252 en HAS1 de levaduras se corresponde con V320 en la proteína homóloga de *Chaetomium thermophilum*. Generamos entonces la forma truncada ctHAS1 (1-320 aa) de *Chaetomium thermophilum* mediante el uso de cebadores específicos (véase Tabla 3.3).

Esta forma truncada de ctHAS1 fue clonada generando la construcción 6xHis-HAS1 (1-320 aa) se sobre-expresó con éxito en *Escherichia coli* siguiendo el protocolo de autoinducción y se purificó mediante una cromatografía de afinidad en columna HisTrap HP seguida de una cromatografía de exclusión molecular (Figura 4.19A).

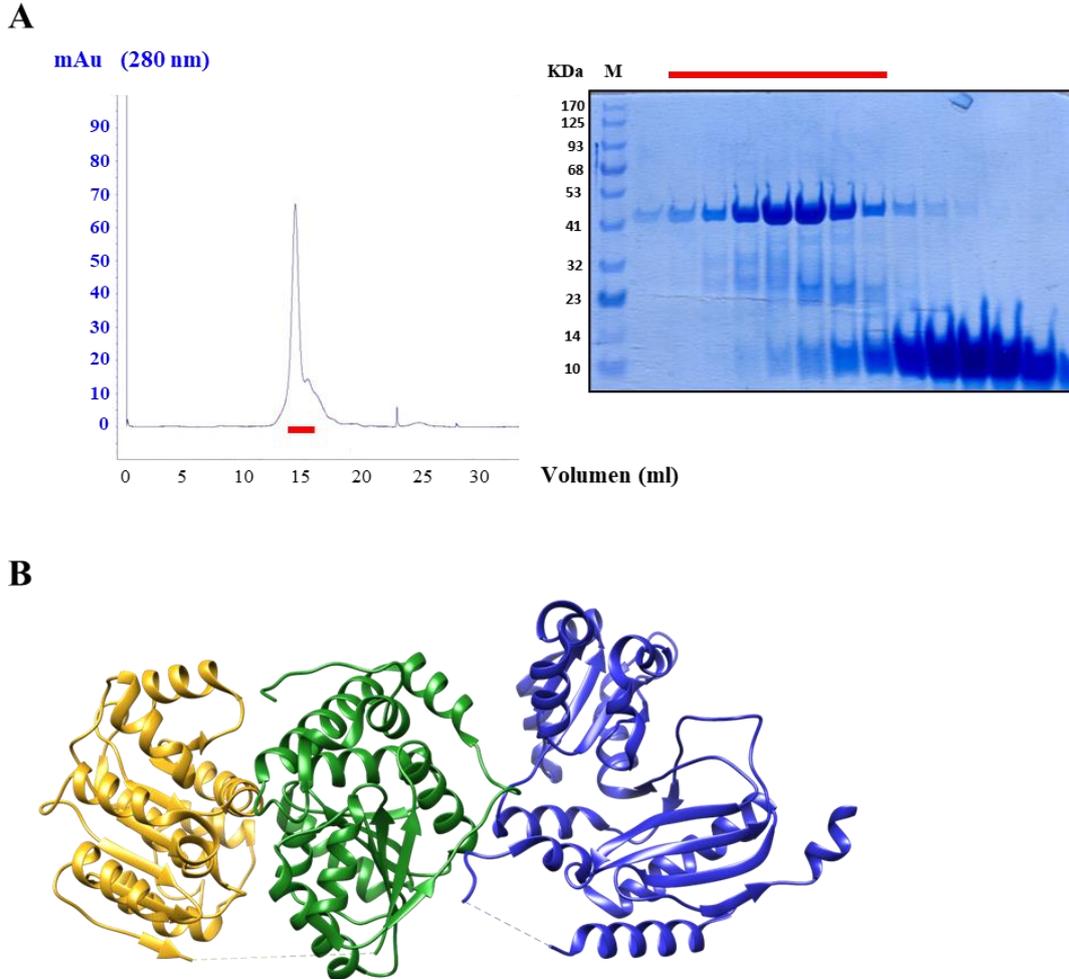


Figura 4.19. Proceso de purificación de la construcción 6xHis-HAS1 (1-320 aa) mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL. A. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de la construcción 6xHis-HAS1 (1-320 aa) junto al correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares. **B.** Estructura tridimensional que muestra la interacción entre CIC1 (azul) y HAS1 de levaduras. Se muestra la región carboxi-terminal de HAS1 comprendiendo los aminoácidos 264-489 en verde, mientras que la región amino terminal que comprende los aminoácidos 42 a 252 se muestra en color ocre. Estructura derivada de la entrada 6C0F del PDB.

4.6.1.2 Clonación, sobre-expresión y purificación de ctCIC1.

Se generó la construcción 6xHis-CIC1 correspondiente a la proteína CIC1 procedente de *Chaetomium thermophilum* (ctCIC1, referencia de UniProt G0S7X0). La purificación de esta construcción se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en una columna HisTrap HP cargada de Níquel seguida de una cromatografía de exclusión molecular (Figura 4.20). En esta última cromatografía, la proteína se recupera en un solo pico y se comprueba mediante electroforesis SDS-PAGE que su tamaño es de aproximadamente 50 KDa, de acuerdo con lo esperado (Tabla 3.5).

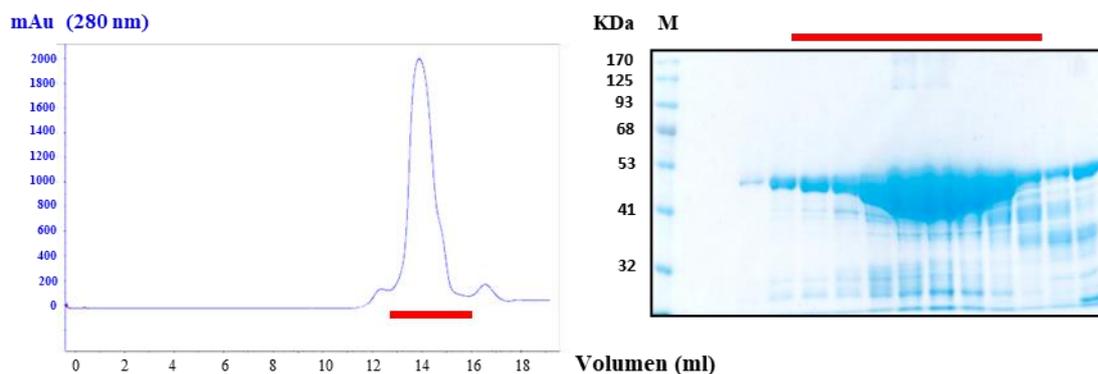


Figura 4.20: Proceso de purificación de la construcción 6xHis-CIC1 mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 GL. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de la construcción 6xHis-CIC1 junto con el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm. M: marcador de pesos moleculares.

4.6.1.3 Clonación, sobre-expresión y purificación de cteIF6.

La construcción 6xHis-eIF6 correspondiente a la proteína eIF6 de *Chaetomium thermophilum* (cteIF6, referencia de UniProt G0S683) se sobre-expresó eficazmente mediante 0,2 mM IPTG a 20°C durante 12 horas (Tabla 3.5). Su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en una columna HisTrap HP cargada de Níquel seguida de una cromatografía de exclusión molecular (Figura 4.21A).

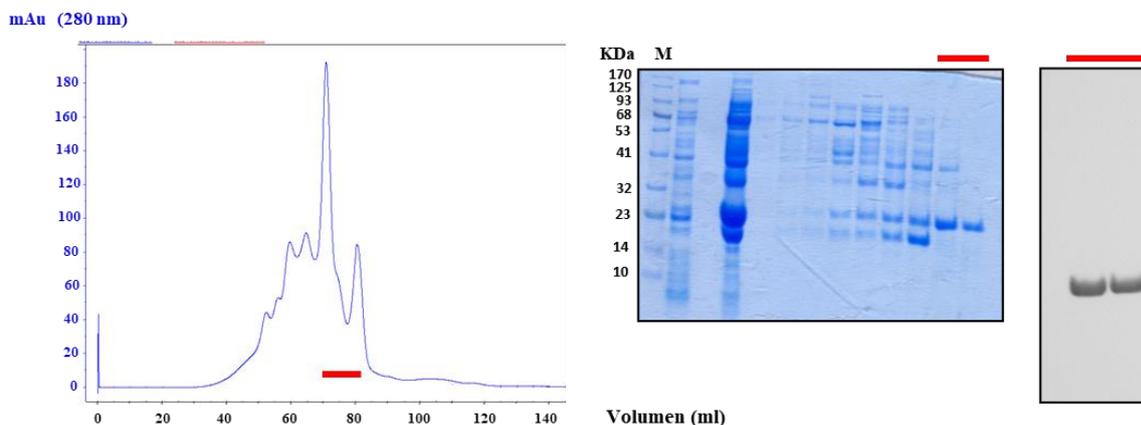


Figura 4.21: Proceso de purificación de la construcción 6xHis-eIF6 mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 Hiload 16/60. A. Cromatograma representativo mostrando el perfil de elución de la construcción 6xHis-eIF6 junto con el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) en el que se muestran las fracciones resultantes de la cromatografía que contienen la proteína de interés (marcadas en rojo). **B.** Experimento de western blot empleando un anticuerpo anti-Histidina conjugado con peroxidasa en el que se comprueba la identidad de la proteína purificada. M: marcador de pesos moleculares. mAu: mili unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm.

En el gel de electroforesis se observa la proteína de interés como una banda de aproximadamente 26 KDa, correspondiéndose con el peso molecular esperado para esta proteína (véase Tabla 3.5). La identidad de la proteína se comprobó mediante un western blot empleando un anticuerpo anti-His conjugado a peroxidasa (Figura 4.21B).

4.6.2 Evaluación funcional de los factores de ensamblaje ctCIC1, cteIF6, ctHAS1 y ctHAS1 (1-320 aa).

4.6.2.1 Evaluación de la actividad ATPasa de las construcciones MBP-HAS1 y 6xHis-HAS1 (1-320 aa).

Puesto que HAS1 es una ATPasa perteneciente a la familia DEAD-box (Rocak et al. 2005), llevamos a cabo un ensayo de actividad enzimática empleando las construcciones MBP-HAS1 y 6xHis-HAS1 (1-320 aa) mediante el reactivo verde malaquita (Baykov et al. 1988). Comprobamos así que tanto la forma truncada ctHAS1 (1-320 aa) como la forma completa ctHAS1 presentan actividad ATPasa (Figura 4.22A, B). La familia de las ATPasas de tipo DEAD-box, a la que pertenecen tanto HAS1 como MAK5, se caracteriza por la presencia de 9 motivos de secuencia responsables de su actividad ATPasa y helicasa (Cordin et al. 2006). Sin embargo, la forma truncada ctHAS1 (1-320 aa) consta únicamente de los motivos Q, I, Ia, Ib, II y III, careciendo de los motivos IV, V y VI (Figura 4.22C). La ausencia de estos tres motivos de secuencia, sin embargo, no abroga su actividad catalítica (Figura 4.22B).

Estudios realizados con la proteína homóloga de HAS1 en levaduras demuestran que su actividad ATPasa es dependiente de la presencia de ARN, siendo especialmente estimulada por la presencia de ARN ribosómico (Rocak et al. 2005). En este trabajo mostramos que tanto ctHAS1 como su forma truncada ctHAS1 (1-320 aa) presentan actividad ATPasa en ausencia de ARN (Figura 4.22 A, B). Existe, sin embargo, la posibilidad de que ambas proteínas arrastren consigo ácidos ribonucleicos de origen bacteriano durante el proceso de purificación, y que estos actúen estimulando su actividad catalítica. Esta posibilidad será investigada en el futuro mediante el tratamiento de la proteína purificada correspondiente con enzima ARNasa.

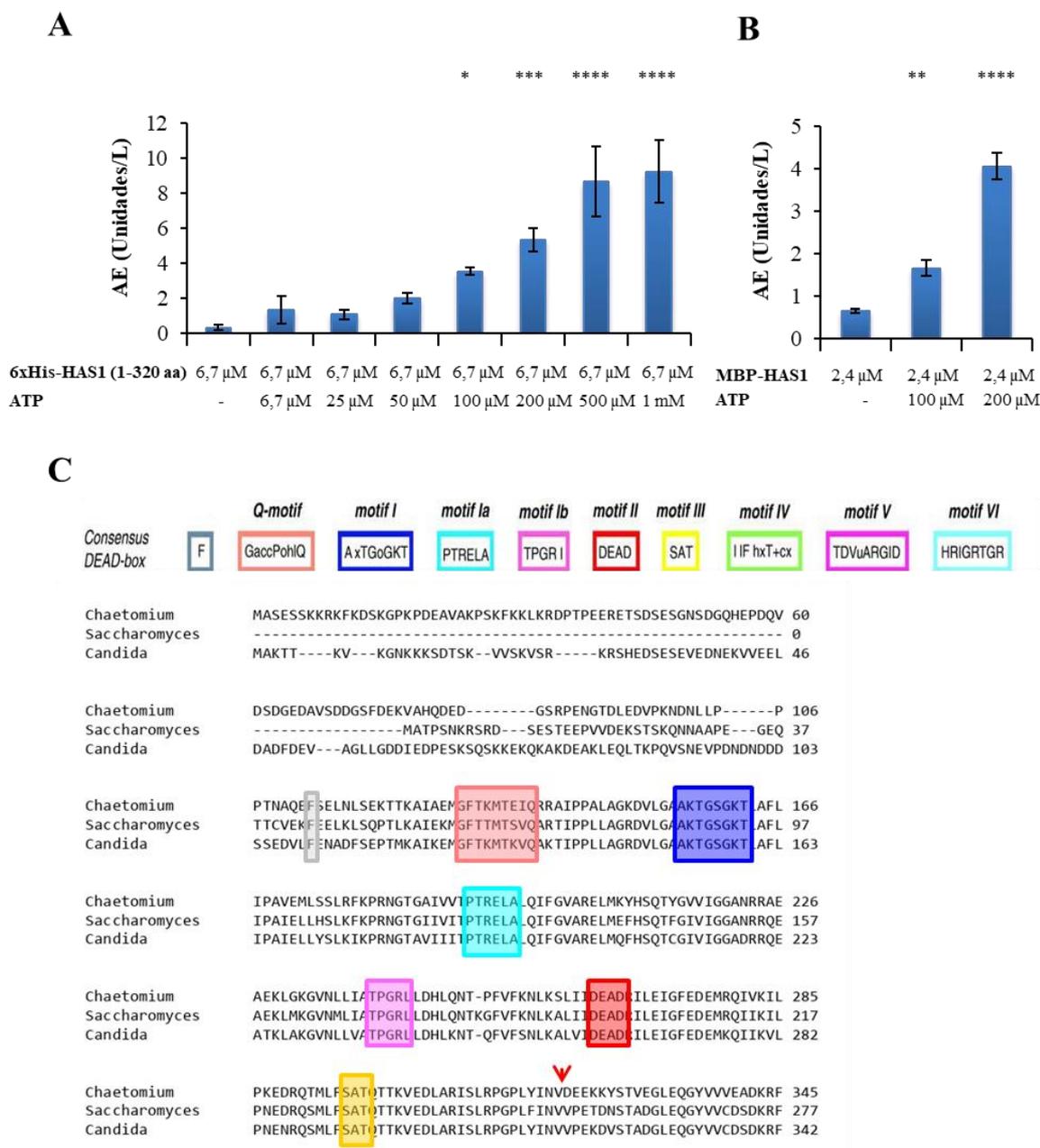


Figura 4.22: Evaluación de la actividad ATPasa de las construcciones MBP-HAS1 y 6xHis-HAS1 (1-320 aa). **A.** Actividad ATPasa de 6xHis-HAS1 (1-320 aa) en presencia de concentraciones crecientes de ATP. **B.** Actividad ATPasa de MBP-HAS1 en presencia de concentraciones crecientes de ATP. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ con respecto a MBP-HAS1/6xHis-HAS1 (1-320 aa) en ausencia de ATP. En **A** y **B** se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. **C.** Análisis comparativo de la secuencia de HAS1 en los organismos *Chaetomium thermophilum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* en el que se muestran los distintos motivos de secuencia característicos de las helicasas de la familia DEAD. Con un asterisco rojo se indica el final de la forma truncada HAS1 (1-320 aa). En la parte superior se muestra la secuencia consenso de los distintos motivos de secuencia (adaptado de Cordin et al. 2006). Código de símbolos: o: S,T; l: I, L,V; x: cualquier aminoácido; a: F, W, Y; c: D, E, H, K, R; h: A, F, G, I, L, M, P, V, W, Y; +: H, K, R; u: A, G. AE: actividad enzimática. Se define una Unidad como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de fosfato inorgánico por minuto.

4.6.2.2 Análisis de la capacidad de ctCIC1 de interactuar con ácido ribonucleico (ARN).

Existen evidencias de que el factor de ensamblaje CIC1 de levaduras interactúa con el ARN ribosómico, concretamente en la región ITS2 del pre-ARNr (Granneman, Petfalski, y Tollervey 2011). También se ha documentado la interacción de HAS1 de levaduras con las especies de ARNr 18S y 25S, así como de MAK5 de levaduras con el ARNr 25S (Brüning et al. 2018). Por último, el factor de ensamblaje NOG1 establece interacciones con las especies de ARNr 25S y 5,8S tanto en levaduras (Wu et al. 2016) como en *Homo sapiens* (Liang et al. 2020) (Tabla 5.1). Partiendo de estas evidencias, decidimos caracterizar la capacidad de los factores de ensamblaje ctCIC1, ctHAS1 y su forma truncada ctHAS1 (1-320 aa); ctNOG1 y ctMAK5 de *Chaetomium thermophilum* de interactuar con ácido ribonucleico. Utilizamos para ello un extracto de ácido ribonucleico total procedente de *Escherichia coli* (Figura 4.23A). Analizamos la capacidad de unión de cada uno de los factores de ensamblaje por separado mediante un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Los resultados mostraron que la construcción 6xHis-CIC1 interactúa con el ácido ribonucleico bacteriano formando al menos dos complejos estables (Figura 4.23B). Se observa la aparición en primer lugar de un complejo de tamaño intermedio. A medida que aumenta la proporción proteína:ARN, este complejo desaparece para dar lugar a un nuevo complejo de mayor tamaño. Este resultado podría indicar la unión de sucesivas moléculas de ctCIC1 a una misma molécula de ARN.

Este resultado fue confirmado mediante un experimento alternativo utilizando partículas de agarosa cargadas de ácidos poliuridílico (PolyU) (Figura 4.23C). En este caso, la presencia de ácido poliuridílico libre se asocia a una menor unión de la construcción 6xHis-CIC1 a las partículas de agarosa. Por lo tanto, se puede concluir que el factor de ensamblaje ctCIC1 de *Chaetomium thermophilum* muestra capacidad de establecer interacciones inespecíficas con ácidos ribonucleicos. Por otro lado, las construcciones MBP-HAS1, 6xHis-HAS1 (1-320 aa), 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y MBP-NOG1 no mostraron capacidad de unión con ácido ribonucleico en un experimento EMSA (véase Anexo 1). Puesto que la integridad funcional de estas proteínas ya ha sido evaluada mediante la determinación de su actividad ATPasa en el caso de MBP-HAS1, 6xHis-HAS1 (1-320 aa) y 6xHis-MAK5 (192-616 aa) (Figuras 4.7 y 4.22 A,B); y mediante la determinación de la actividad GTPasa de MBP-NOG1 (Figura 4.9) se descarta la posibilidad de que este resultado negativo se deba a la falta de integridad funcional de las respectivas proteínas. En conjunto, estos resultados sugieren que los distintos factores de ensamblaje ribosómicos en los que se enfoca este trabajo presentan distinta capacidad de establecer interacciones con ácidos ribonucleicos.

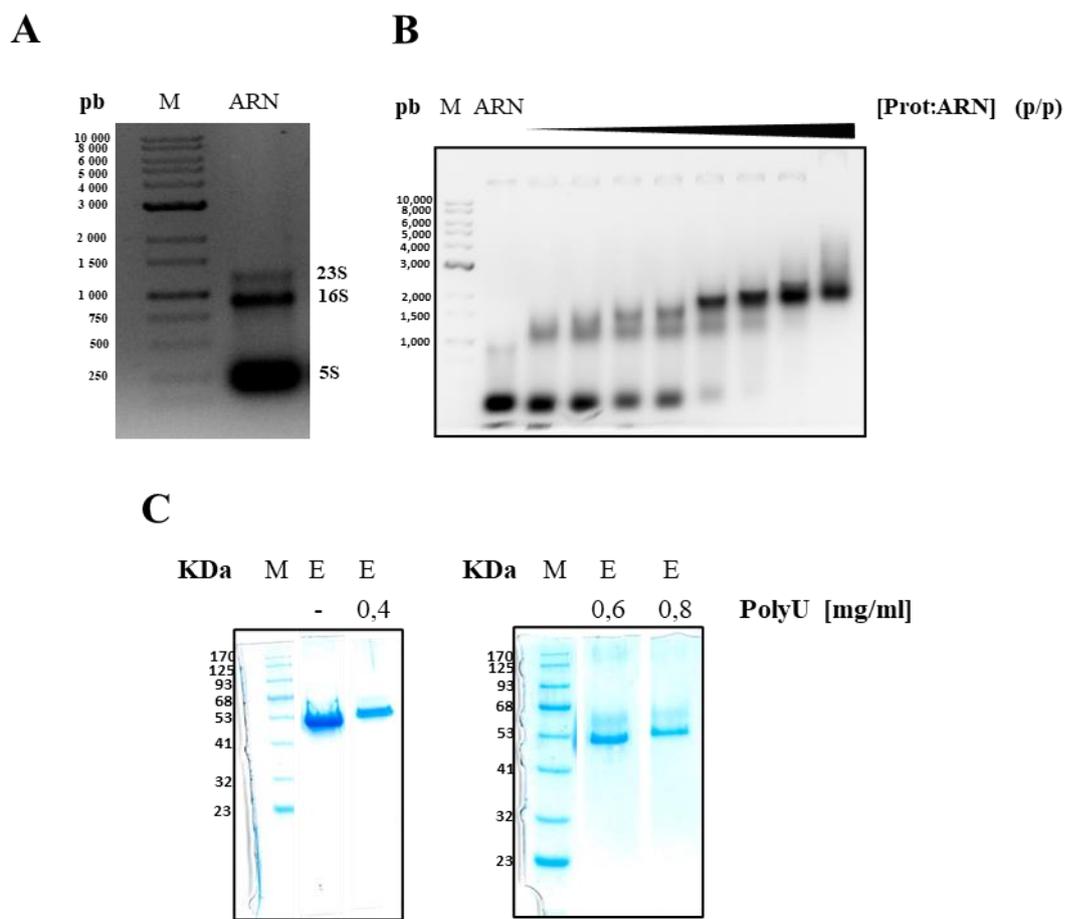


Figura 4.23: Análisis de la capacidad de la construcción 6xHis-CIC1 de interactuar con ácido ribonucleico. **A.** Análisis en gel de agarosa al 1% (p/v) de un extracto de ARN total de *Escherichia coli*. Se identifican las bandas correspondientes a las especies de ARN ribosómico 23S, 16S y 5S, características de células procariotas (Srivastava y Schlessinger 1990). **B.** Experimento de movilidad electroforética (EMSA) empleando un extracto total de ácidos ribonucleicos de *Escherichia coli* (ARN) y 6xHis-CIC1 en diferente proporción de masa. Se utilizan las proporciones 1:1; 1,3:1; 1,5:1; 1,7:1; 2:1; 2,5:1; 3:1 y 4:1 de proteína:ARN en proporción creciente de masa (p:p). **C.** Estudio de la capacidad de interacción entre la construcción 6xHis-CIC1 y partículas de agarosa cargadas con ácido poliuridílico (PolyU), en presencia de concentraciones crecientes de ácido poliuridílico libre (indicadas en la parte superior de cada pocillo). M: marcador de pesos moleculares. ARN: muestra de ARN total de *E.coli* en ausencia de 6xHis-CIC1. E: fracción obtenida tras la elución de la resina. pb: pares de bases. Prot: proteína (6xHis-CIC1). KDa: Kilo Dalton.

4.6.2.3 Evaluación de la estabilidad térmica de las construcciones 6xHis-CIC1 y 6xHis-eIF6.

Las construcciones 6xHis-CIC1 y 6xHis-eIF6 de *Chaetomium thermophilum* no presentan actividad enzimática que pueda ser cuantificada. A fin de comprobar su funcionalidad se sometieron a un ensayo de termofluor de manera análoga a las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa), 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y 6xHis-NOG1 también procedentes de *Chaetomium thermophilum* (Figuras 4.10, 4.11 y 4.12).

Los resultados mostraron que ambas construcciones son estables en las distintas condiciones experimentales empleadas, mostrando una temperatura de fusión (T_m) situada entre 40 y 50°C en el caso de 6xHis-eIF6 (Figura 4.24), y entre 50 y 60°C en el caso de 6xHis-CIC1 (Figura 4.25). Estos

valores concuerdan con el hecho de que ambas proteínas proceden de *Chaetomium thermophilum*, un hongo termófilo cuya temperatura óptima de crecimiento es de 50°C (Gao, Li, y Li 2021). En ambos casos la ausencia de ciertos puntos experimentales es debida a la imposibilidad de obtener datos fiables. Concretamente, esta es la razón de la supresión de los puntos experimentales D5-D12 en la Figura 4.24, así como los puntos experimentales D4-D12 en la Figura 4.25.

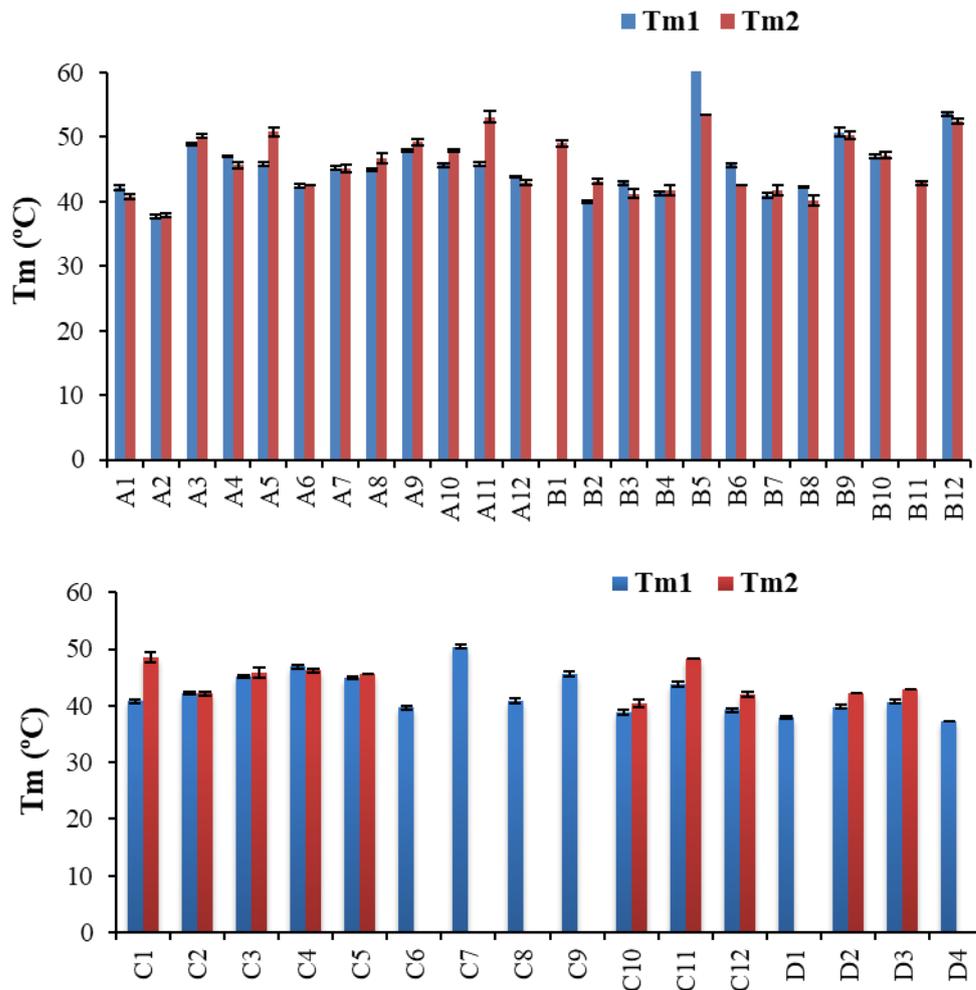


Figura 4.24: Estudio de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-eIF6 de *Chaetomium thermophilum* mediante termofluór. Se muestra la temperatura de fusión (Tm) que presenta esta proteína en las distintas condiciones experimentales (A1-D4). Cada condición es ensayada por duplicado obteniéndose dos series de datos (Tm1 y Tm2). Se muestra el valor de Tm obtenido en cada condición experimental \pm SD.

La condición C5 (150 mM NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5 y 5% (v/v) glicerol) es la que más se asemeja a las condiciones experimentales empleadas para la purificación de ambas construcciones. En esta condición tanto 6xHis-CIC1 como 6xHis-eIF6 se muestran estables con una temperatura de fusión de 57,86/55,78°C en el caso de 6xHis-CIC1 y de 44,92/45,53°C en el caso de 6xHis-eIF6. Comprobamos así que ambas construcciones son estables en las condiciones empleadas para su purificación.

En el caso de la construcción 6xHis-eIF6 se observa que las condiciones experimentales B5 (150 mM NaCl, tampón succinato-fosfato-glicina pH 8) y B12 (150 mM NaCl, tampón MMT pH 9) presentan una temperatura de fusión superior a la condición C5, mientras que en el caso de 6xHis-CIC1 esto sucede con la condición B12 (150 mM NaCl, tampón MMT pH 9). Se decidió sin embargo mantener las condiciones experimentales inicialmente empleadas para la purificación de ambas construcciones puesto que empleando estas condiciones (tampón 50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl, 5% glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol) ambas son solubles y presentan buenos rendimientos de purificación.

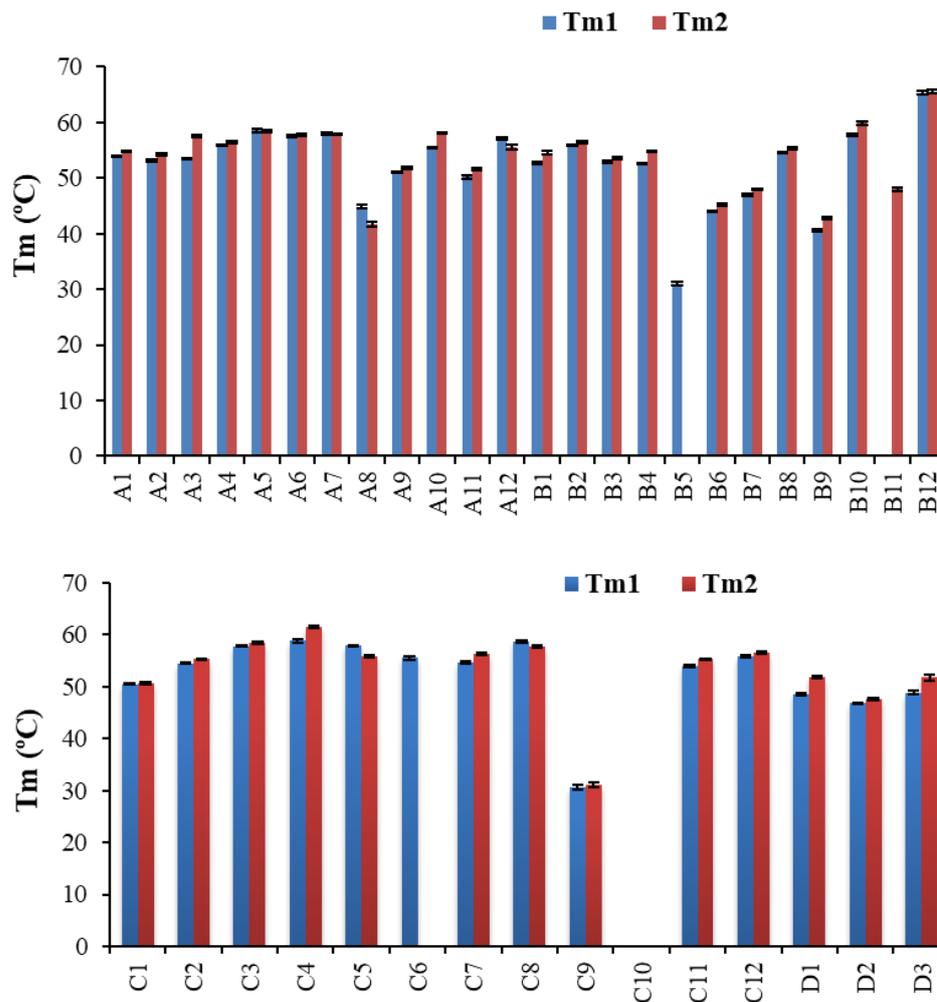


Figura 4.25: Estudio de la estabilidad térmica de la construcción 6xHis-CIC1 de *Chaetomium thermophilum* mediante termofluór. Se muestra la temperatura de fusión (Tm) que presenta esta proteína en las distintas condiciones experimentales (A1-D3). Cada condición es ensayada por duplicado obteniéndose dos series de datos (Tm1 y Tm2). Se muestra el valor de Tm obtenido en cada condición \pm SD.

4.6.3 Análisis *in vitro* de las posibles interacciones establecidas entre ctNOG1 y ctEIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1.

Una vez purificadas las proteínas de interés y comprobada su funcionalidad y estabilidad mediante las técnicas descritas en los apartados anteriores, llevamos a cabo un análisis *in vitro* de su capacidad de interacción, a fin de validar la información estructural disponible (Figura 4.14 y Tabla 4.1). Para

ello empleamos dos técnicas complementarias. En primer lugar llevamos a cabo ensayos de precipitación con las proteínas de interés. Los resultados de este primer ensayo fueron complementados mediante un experimento de interferometría de biocapa (BLI).

4.6.3.1 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre ctNOG1 y ctEIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1 mediante ensayos de precipitación.

Empleando las proteínas purificadas procedentes de *Chaetomium thermophilum* llevamos a cabo ensayos de precipitación a fin de detectar posibles interacciones entre ellas (Figura 4.26). Para ello fijamos la primera proteína (MBP-NOG1 o MBP-HAS1) a una resina de amilosa y analizamos la capacidad de la segunda proteína (6xHis-eIF6 o 6xHis-CIC1 respectivamente) de interactuar con dicha resina. Tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos (apartado 3.4.5), se prepararon muestras correspondientes a cada una de las proteínas implicadas en la interacción (MBP-NOG1/6xHis-eIF6 y MBP-HAS1/6xHis-CIC1) por separado, así como una muestra correspondiente a la elución de la resina en la que cada pareja de proteínas debe interactuar. Estas muestras se visualizaron en una electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% (v/v). En ambos casos se detecta en la fracción de la elución de la resina una banda correspondiente a la proteína fijada a ella (MBP-NOG1/MBP-HAS1), así como una débil banda con un tamaño compatible con la proteína implicada en cada interacción (26 KDa en el caso de 6xHis-eIF6 y 45 KDa en el caso de 6xHis-CIC1). Al analizar esta banda mediante un experimento de western blot empleando un anticuerpo anti-Histidinas acoplado a peroxidasa detectamos una débil señal en el ensayo realizado con MBP-HAS1 y 6xHis-CIC1 (Figura 4.26A). Este resultado podría ser indicativo del establecimiento de una interacción débil entre ambas proteínas. Por otro lado, en el ensayo realizado con MBP-NOG1 y 6xHis-eIF6 la técnica de western blot no permite detectar ninguna señal, lo cual es indicativo de que no se establece ninguna interacción entre estas dos proteínas en nuestras condiciones experimentales (Figura 4.26B).

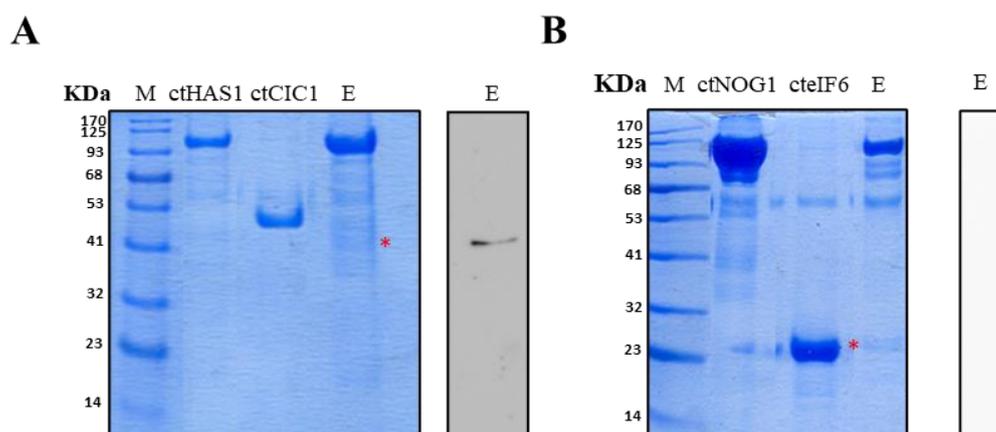


Figura 4.26: Análisis *in vitro* de las posibles interacciones establecidas entre MBP-HAS1 y 6xHis-CIC1 y entre MBP-NOG1 y 6xHis-eIF6. **A.** Experimento de precipitación empleando MBP-HAS1 (indicado como ctHAS1) fijado a resina de amilosa y 6xHis-CIC1 (indicado como ctCIC1) como proteína interactuante. **B.** Experimento de precipitación empleando MBP-NOG1 (indicado como ctNOG1) fijado a resina de amilosa y 6xHis-eIF6 (indicado como cteIF6) como proteína interactuante. M: marcador de pesos moleculares, E: elución de la resina correspondiente. KDa: peso molecular en Kilo Dalton. En ambos casos (**A** y **B**) la identidad de las bandas unidas a la resina (marcadas con un asterisco) se verifica mediante un experimento de western Blot empleando un anticuerpo anti-Histidina conjugado con peroxidasa (a fin de detectar la presencia de las construcciones 6xHis-CIC1 o 6xHis-eIF6 unidas a la resina en la fracción E).

4.6.3.2 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre ctNOG1 y cteIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1 mediante ensayos de interferometría de biocapas.

A fin de complementar los resultados obtenidos mediante los ensayos de precipitación (Figura 4.26), llevamos a cabo un ensayo complementario de interferometría de biocapa (BLI). Para ello utilizamos el sistema comercial de interferometría de biocapa BLItz™ (PALL Forté Bio Corp) dotado del *software* de análisis correspondiente. Los resultados mostraron que no puede detectarse interacción entre las proteínas 6xHis-NOG1 y cteIF6 (Figura 4.27A), ni entre 6xHis-CIC1 y MBP-HAS1 (Figura 4.27B).

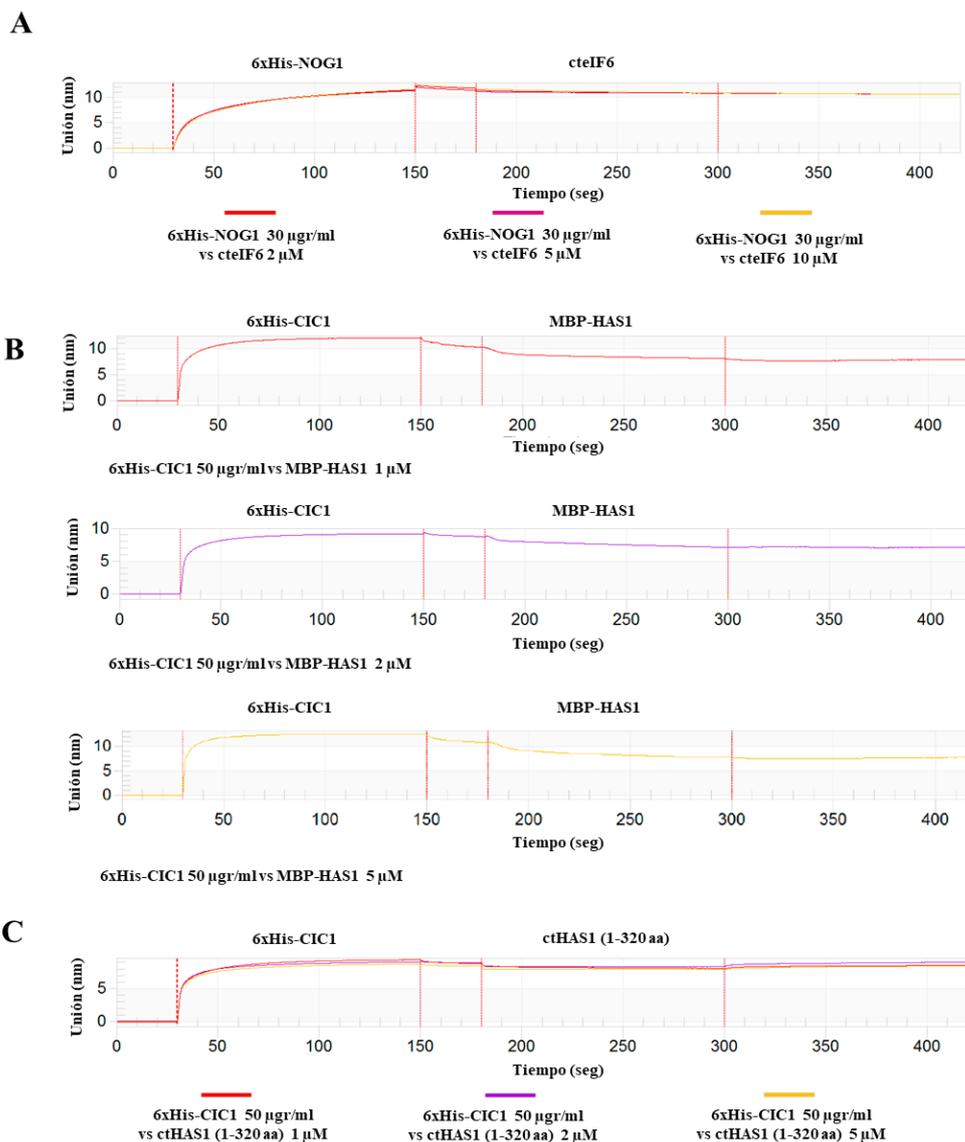


Figura 4.27: Análisis *in vitro* de las posibles interacciones establecidas entre 6xHis-NOG1 y cteIF6, entre 6xHis-CIC1 y MBP-HAS1 y entre 6xHis-CIC1 y ctHAS1 (1-320 aa) mediante interferometría de biocapas. A. La construcción 6xHis-NOG1 fue fijada a un sensor de Níquel. Se analizó la capacidad de cteIF6 (sin etiqueta de 6xHis) de interaccionar con el sensor cargado con 6xHis-NOG1. **B.** La construcción 6xHis-CIC1 fue fijada a un sensor de Níquel. Se analizó la capacidad de MBP-HAS1 de interaccionar con el sensor cargado con 6xHis-CIC1. **C.** La construcción 6xHis-CIC1 fue fijada a un sensor de Níquel y se analizó la capacidad de interacción de ctHAS1 (1-320 aa) (sin etiqueta de 6xHis). Todas las proteínas empleadas proceden de *Chaetomium thermophilum*. En la parte superior de cada experimento (**A**, **B** y **C**) se indica el orden de unión de las distintas proteínas.

Como control negativo utilizamos la proteína ctHAS1 (1-320 aa) (sin etiqueta de 6xHis) y evaluamos su capacidad de interacción con 6xHis-CIC1. De acuerdo con lo esperado, no se detectó interacción entre ambas proteínas (Figura 4.27C), dado que según la información estructural disponible en levaduras, la proteína HAS1 interacciona con CIC1 a través de su región carboxi-terminal (Figura 4.19B).

En vista de los resultados obtenidos en los experimentos de precipitación e interferometría de biocapas (Figuras 4.26 y 4.27) se puede concluir que no existe interacción *in vitro* entre ctNOG1 y cteIF6 en las condiciones experimentales empleadas. En cuanto a ctHAS1 y ctCIC1, el ensayo de precipitación sugiere la posibilidad de que entre ambas proteínas se establezca una débil interacción (Figura 4.26A). Sin embargo, esta interacción no se observa en el correspondiente ensayo de interferometría de biocapa (Figura 4.27B). En conjunto, no se puede excluir la posibilidad de que ctHAS1 y ctCIC1 interaccionen, si bien dicha interacción sería de carácter débil y posiblemente transitorio. En caso de establecerse, este tipo de interacción no resulta idónea para el diseño de péptidos de interferencia, por lo que decidimos no priorizar esta línea de investigación.

Por otro lado, la falta de interacción entre las proteínas ctNOG1 y cteIF6 podría explicar los resultados negativos obtenidos con el péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) en los experimentos *in vitro* con células tumorales (Figura 4.17), en vista de los cuales decidimos no continuar con esta línea de investigación. La información estructural disponible (PDB ID: 3JCT y 6LU8) establece que NOG1 y eIF6 interaccionan en el contexto del pre-ribosoma tanto en levaduras como en células humanas (Figura 4.14 y Tabla 4.1). Sin embargo, no hay información disponible acerca de la capacidad de estos dos factores de ensamblaje de interaccionar fuera del contexto pre-ribosómico. Las distintas hipótesis que podrían explicar estos resultados se detallarán en la sección de Discusión (apartado 5.2).

4.7 Diseño y evaluación *in vitro* de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre las proteínas Bop1 y WDR12 de *Homo sapiens*.

4.7.1 Diseño de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre las proteínas Bop1 y WDR12 de *Homo sapiens*.

Otra de las interacciones de interés en este trabajo es la establecida entre los factores de ensamblaje Bop1 y WDR12 en células humanas. Como se explica en la Introducción (apartado 1.1.4.2.2), estas proteínas son homólogas de los factores de ensamblaje Erb1 y Ytm1 respectivamente, presentes en levaduras y *Chaetomium thermophilum* (Miles et al. 2005) (Orea-Ordóñez et al. 2021). El grupo dirigido por el Dr. Bravo ha logrado la resolución estructural mediante difracción de rayos X del heterodímero formado por Ytm1 y el dominio carboxi-terminal de Erb1 usando *Chaetomium thermophilum* como modelo experimental (Wegrecki et al. 2015). Estos resultados han permitido diseñar una serie de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Erb1 y Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* (Figura 4.28). Se determinó la capacidad de cada péptido de bloquear la formación de la interacción entre Erb1 y Ytm1 empleando las correspondientes proteínas aisladas (Orea-Ordóñez, Masiá, y Bravo 2021). Los péptidos 1 y 3, ambos derivados de la secuencia de Erb1, son los que mostraron los mejores resultados en esta etapa preliminar y fueron consecuentemente seleccionados para la realización de ensayos con líneas celulares derivadas de tumores humanos. Ambos péptidos interaccionan con Ytm1 mediante interacciones establecidas a través de la cadena

lateral de residuos de Glu (E) y Arg (R). En el caso del péptido 1 están implicados los aminoácidos Glu 481 y Arg 486, mientras que en el caso del péptido 3 están implicados los aminoácidos Arg 784 y Glu 785 (Figura 4.28C).

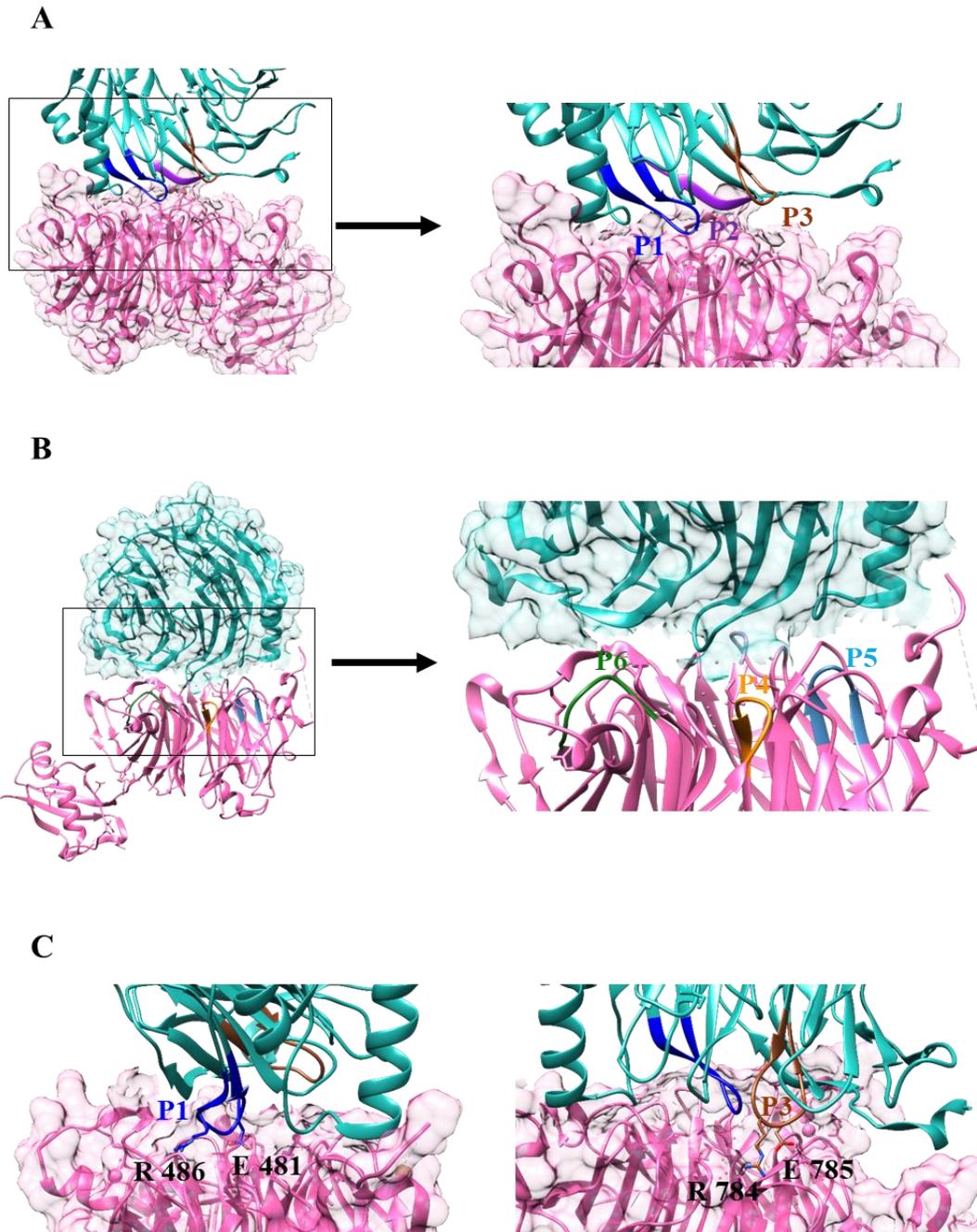


Figura 4.28: Diseño de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Erb1 y Ytm1 de *Chaetomium thermophilum*. Partiendo de la resolución estructural del heterodímero formado por Erb1 (432-801 aa) (azul) y Ytm1 (rosa) de *Chaetomium thermophilum* (Wegrecki et al. 2015), se diseñó una serie de seis péptidos de interferencia. Los tres primeros péptidos se corresponden con distintas secuencias de Erb1 (A), mientras que los tres últimos se corresponden con distintas secuencias de Ytm1 (B). Tras evaluar *in vitro* su capacidad de bloquear la formación del heterodímero Erb1-Ytm1 se seleccionaron los péptidos 1 y 3 para realizar ensayos en células tumorales humanas. C. Visión detallada mostrando los aminoácidos responsables de la interacción de los péptidos P1 y P3 con Ytm1. R: Arg, E: Glu. En (A), (B) y (C) los péptidos 1 y 3 se corresponden respectivamente con los péptidos P10hs y P11hs usados en este trabajo. PDB ID: 5CXB para todas las imágenes.

Dado el elevado grado de conservación entre Erb1 de *Chaetomium thermophilum* y Bop1 de *Homo sapiens* (44% de identidad y 62% de residuos que conservan características físico-químicas similares), consideramos viable trasladar los resultados obtenidos con las proteínas de *Chaetomium thermophilum* a células humanas. Para ello se sintetizaron los péptidos P10hs y P11hs, equivalentes de los péptidos 1 y 3 respectivamente y constituidos por la secuencia correspondiente de Bop1. Como puede comprobarse en la Figura 4.29, las secuencias de Erb1/Bop1 correspondientes a los péptidos P10hs y P11hs presentan diversos residuos conservados entre las especies *Chaetomium thermophilum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*. Al igual que en el caso del péptido TAT-NOG1 (351-412 aa), se adicionó la secuencia TAT en el extremo amino-terminal de cada péptido, a fin de dotarlos de penetrabilidad celular.

Tabla 4.2: Secuencia de los péptidos de interferencia empleados en este trabajo.

Péptido	Secuencia	Aminoácidos (Bop1 de <i>Homo sapiens</i>)
PTAT	GRKKRRQRRRPQ	-
P11hs	GRKKRRQRRRPQIFHPTQPWVF	725-734
P10hs	GRKKRRQRRRPQLWEVATARCVR	439-449
P10hsD	GRKKRRQRRRPQVCRATAVEWL	449-439

Aclaraciones: se marca en negrita la secuencia TAT y en rojo la secuencia de interferencia. La secuencia constituida por D-aa aparece subrayada. Se indica la secuencia de Bop1 a la que se corresponde cada péptido.

Utilizamos asimismo el péptido TAT como control interno a fin de comprobar que la secuencia TAT por sí sola no provoca alteraciones en las células. Los resultados preliminares mostraron la eficacia de los péptidos P10hs y P11hs, que fueron capaces de disminuir la viabilidad de la línea celular HCT116 derivada de carcinoma de colon (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia).

Decidimos ampliar estos resultados preliminares utilizando una gama más amplia de líneas celulares tumorales humanas. En concreto, hemos empleado la línea HCT116 en sus variantes silvestre y *knock out* para p53 (denominadas en adelante HCT116 p53+/+ y p53-/-) así como la línea celular Saos2 en su versión *knock out* para p53 (en adelante Saos2 p53-/-). La línea HCT116 deriva de carcinoma de colon (Brattain et al. 1981), mientras que las células Saos2 derivan de osteosarcoma (Rodan et al. 1987). El objetivo al emplear estas líneas es determinar si el mecanismo por el que actúan estos péptidos es dependiente o independiente de p53. Tal y como se explica en la Introducción (apartado 1.2.2.1), p53 es el principal mediador de los procesos de apoptosis celular derivados de la disrupción de la biogénesis ribosómica (Bursac et al. 2014) (Bustelo y Dosil 2018) (Turi et al. 2019). Sin embargo, este proceso puede estar mediado por otras proteínas reguladoras como p73 y cMyc (apartado 1.2.2.2) (Bursac et al. 2014) (Zhou et al. 2015).

En este estudio utilizamos además una variante retro-inversa del péptido P10hs denominada péptido P10hsD (véase Tabla 4.2). Esta variante posee la misma secuencia de interferencia que el péptido P10hs, pero compuesta por los isómeros D correspondientes a cada aminoácido. Además, se ha invertido la orientación de la secuencia, de manera que el aminoácido que en el péptido P10hs ocupa la posición amino-terminal, en el péptido P10hD aparece ocupando la posición carboxilo-terminal, y viceversa. Los péptidos retro-inversos mantienen la misma disposición espacial de las cadenas laterales de los aminoácidos que los componen pero invierten la orientación del esqueleto

hidrocarbonado con respecto al péptido original (Doti et al. 2021). Estos péptidos presentan la ventaja de ser más resistentes a la acción de proteasas, lo cual es importante para su aplicación clínica. En los ensayos preliminares realizados con el péptido P10hs, se observó una disminución de su eficacia a tiempos de incubación largos, lo que podría deberse a la degradación proteolítica de este péptido (Figura 4.30D) (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). Ante esta situación, decidimos evaluar la eficacia de la variante retro-inversa del péptido P10hs en comparación con el péptido original.

Para que la estrategia basada en el uso de péptidos retro-inversos resulte eficaz es esencial que el péptido interactúe con su proteína diana a través de las cadenas laterales de sus aminoácidos, con implicación mínima del esqueleto hidrocarbonado que invierte su orientación (Doti et al. 2021). El péptido P10hs es una forma homóloga del péptido P1 derivado de la proteína Erb1 de *Chaetomium thermophilum* (Figura 4.28). Según la información estructural disponible, en *C. thermophilum* el péptido P1 interactúa con Ytm1 a través de las cadenas laterales de sus aminoácidos Glu 481 y Arg 486, implicados en el establecimiento de interacciones electrostáticas. Concretamente el aminoácido Arg 486 juega un papel clave en la interacción de Erb1 de *C. thermophilum* con Ytm1 (Wegrecki et al. 2015). No existen evidencias de la implicación de la cadena hidrocarbonada del péptido P1 en su interacción con Ytm1 (Figura 4.28C) (Orea-Ordóñez et al. 2021).

	P10hs								
Homo	CLSVSPGGQWLVS	GGDGLR* LWEVATARC *VRI	TPVPGG-----VVK	SVAWNPSPAVCL	470				
Chaetomium	SVAIDPTGVALATG	GGDGTVRV WELLTGRQ W	SVKLN	GD-----AVNT	VRWRPTKDTFI	512			
Saccharomyces	TLSIDPSGLWLATG	SDDGTVR WEILTGREV Y	RTTLID	DEENPDYHIEC	IEWNP	DANNGI	501		
Homo	VAAAVEDSVLLLNP	ALGDR---LVAG	STDQLLSAFV-----		503				
Chaetomium	LAAAAGEDIFLMIP	THPSVTPALDQ	ASRDILNAGFGHAT	NGKQ-----	555				
Saccharomyces	LAVAVGENIHLIV	PPIFGY--DIEN	NGKTKIEDGFGYD	TFGT	VKKS	NLEVNENGDGEDG	559		
Homo	---	PPEEPLQPARWLE	EASEERQVGLR	LRLRICHGKPV	TQV	TWHGRGDY	LAVVLATQGH	559	
Chaetomium	--	QANLPPGKEPPG	KWARPGTRLEDE	GVLLRITVR	STIKAISWHRR	GDHFATV	SPSGQRS	613	
Saccharomyces		ENESAKNAVKKQ	VQWQNKPSQKQ	LEKIDICITIS	CKKTVK	KLSWHRKGDY	FVTVPD	SGNT	619
Homo	QVLIHQLSRRRSQ	SPFRRSHGQVQ	RVAFHPARPF	LLVASQRSV	RLYHLLRQ	ELTKKLMPN	619		
Chaetomium	SVAIHTLSKHLTQ	IPFRKLNLAQT	ASFHLRPLFF	VATQRSIR	CYDLQKL	ELVKIVQPG	673		
Saccharomyces	SVLIHOVSKHLT	OSPFKKSKGI	MDAKFHPFK	POLFVCS	ORYVRIYD	LS00ILVKLL	679		
Homo	CKWVSSLAVHPAG	DNVICGSYD	SKLWFDL	DLSTKPYR	MLRHKKAL	RAVAFHP	RYPLF	678	
Chaetomium	AKWISSFDVHPG	GNLVVGSYD	KRLWHDLD	LSNRPYK	TRMFHTEA	IRAVRFHKG	GLPLF	733	
Saccharomyces	ARWLSKIDIHPR	GDNLIASSF	DKRVLWHD	LDLSTPYK	T	LR	YHEKAVRS	VNFHK-KLPLF	738
	P11hs								
Homo	ASGSDDGSVIVCH	GMVYNDLLQ	NPLLVPVKV	LKGHVLTRD	LGVLDAIF	HPTQPWF	SSGA	738	
Chaetomium	ADASDDGSLQIF	HGKVPNDQ	LENPTIVP	VKMLKG	HVVNKL	GVLDID	WHPREP	CVSAGA	793
Saccharomyces	SSAADDGTIHV	FHATVYDD	MMKNPMIV	PLKLTG	HKVINSL	GVLDAL	WHPREAW	LFSAGA	798

Figura 4.29: Alineamiento de la secuencia de Erb1 de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Chaetomium thermophilum* y la secuencia de Bop1 de *Homo sapiens*. Aparecen marcadas con un recuadro negro las secuencias correspondientes a los péptidos P10hs (homólogo del péptido P1 de *Chaetomium thermophilum*) y P11hs (homólogo del péptido P3 de *C. thermophilum*). Los aminoácidos conservados entre las tres especies aparecen resaltados en amarillo. Los aminoácidos implicados en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre los péptidos P1/P3 y Ytm1 en *C. thermophilum* aparecen marcados con un asterisco (Orea-Ordóñez et al. 2021).

Estos dos aminoácidos Glu 481 y Arg 486 se encuentran conservados en el péptido P10hs derivado de Bop1 (Figura 4.29). Estos datos preliminares avalan el uso de la variante retro-inversa del péptido P10hs en este trabajo. Los tres péptidos utilizados en este trabajo, P10hs, P10hsD y P11hs fueron sintetizados por la empresa Synpeptide (China). Los péptidos fueron disueltos en PBS estéril y almacenados a -20°C hasta su uso (véase apartado 3.5.2).

4.7.2 Evaluación *in vitro* de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de disminuir la viabilidad de células humanas tumorales.

A fin de probar la eficacia de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs como potenciales fármacos antitumorales, se ensayó su efecto sobre la viabilidad de la línea celular HCT116 derivada de carcinoma de colon (Brattain et al. 1981) en sus variantes p53^{+/+} y p53^{-/-} y la línea celular Saos2 derivada de osteosarcoma (Rodan et al. 1987) en su variante p53^{-/-}. Se empleó el reactivo WST-1 (Sigma Aldrich).

Los resultados confirmaron la capacidad de los tres péptidos (P10hs, P10hsD y P11hs) de disminuir la viabilidad en estas tres líneas celulares tumorales de modo proporcional a la concentración de péptido utilizada y el tiempo de incubación empleado. Sin embargo, estos tres péptidos no muestran el mismo grado de eficacia. Como se puede ver en la Figura 4.30A, B y C, el más eficaz es el péptido P10hsD, y el menos eficaz es el péptido P11hs. La versión retro-inversa del péptido P10hs (péptido P10hsD) presenta una eficacia citotóxica superior a la del péptido P10hs. Este resultado sugiere que la cadena hidrocarbonada de los péptidos P10hs/P10hsD no juega un papel importante en su capacidad de unión a la proteína-diana WDR12, tal y como sugiere la información estructural disponible (Figura 4.28C) (Orea-Ordóñez et al. 2021).

Por otro lado, al tratar la línea celular HCT116 p53^{+/+} con el péptido P10hs a 150 µM, observamos un descenso inicial de la viabilidad celular seguido de una recuperación de la viabilidad a partir de las 48 horas de tratamiento. En cambio, al utilizar el péptido P10hsD en las mismas condiciones, dicho aumento de viabilidad a partir de las 48 horas de tratamiento es significativamente menor (Figura 4.30D). Al emplear concentraciones bajas de péptido (50 y 100 µM), se observa una recuperación de la viabilidad a partir de las 48 horas al emplear tanto el péptido P10hs como el péptido P10hsD. Sin embargo, esta recuperación es menor en el caso del péptido P10hsD (Figura 4.30D).

Estos resultados sugieren que el P10hs sufre degradación proteolítica, lo cual podría explicar la pérdida de eficacia a tiempos largos de tratamiento. Por otro lado, nuestros resultados experimentales sugieren que el péptido P10hsD es más resistente a la degradación proteolítica que el péptido P10hs, dada su menor pérdida de eficacia a partir de las 48 horas de tratamiento (Figura 4.30D). El uso del péptido TAT en las mismas condiciones experimentales no provoca un descenso significativo de la viabilidad celular (ver Anexo 2D) .

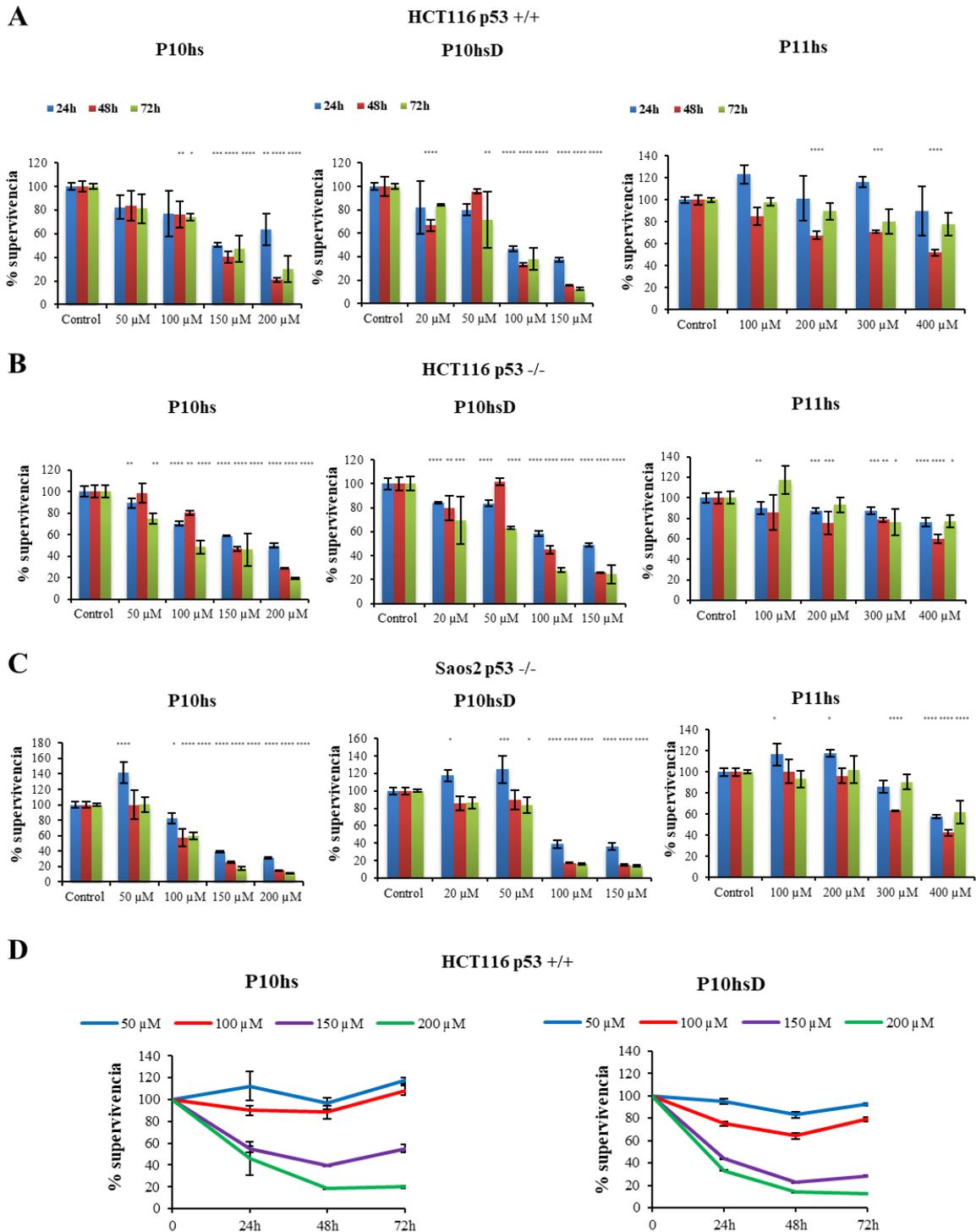


Figura 4.30: Evaluación *in vitro* de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de disminuir la viabilidad de células humanas tumorales. Se utilizaron las líneas celulares HCT116 p53+/+ (A), HCT116 p53-/- (B) y la línea celular Saos2 p53-/- (C) que fueron incubadas con los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs a las concentraciones y tiempos indicados. Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. Se muestra el porcentaje de supervivencia celular en las distintas condiciones con respecto al control (constituido por células sin tratar). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ con respecto al control. **D.** La línea celular HCT116 p53+/+ fue tratada con los péptidos P10hs o P10hsD empleando distintas concentraciones y tiempos de tratamiento. Los resultados fueron normalizados con respecto a un control constituido por células sin tratar. Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD.

En todos los experimentos de viabilidad realizados (Figura 4.30) se empleó el péptido TAT como control interno, a fin de comprobar que esta secuencia por sí sola no provoca un descenso significativo de la viabilidad celular (véase Anexo 2). En algunas condiciones (en células HCT116 p53^{+/+} tratadas con P11hs a 400 μ M durante 24 horas y en células HCT116 p53^{-/-} tratadas con P11hs a 400 μ M durante 24 y 72 horas) se da el caso de que el péptido TAT por sí solo muestra una mayor citotoxicidad que el péptido P11hs en las mismas condiciones (véase Figura 4.30A y B y Anexo 2A y B). Este hecho está en consonancia con la menor eficacia observada del péptido P11hs con respecto a los péptidos P10hs y P10hsD (Figura 4.30). También se da el caso de que el tratamiento de la línea celular HCT116 p53^{+/+} durante 24 horas con el péptido TAT a 200 μ M resulta en aproximadamente el mismo descenso de viabilidad que el tratamiento con el péptido P10hs en las mismas condiciones (véase Figura 4.30A y Anexo 2 A). Este resultado podría explicarse por la menor eficacia relativa del péptido P10hs con respecto al péptido P10hsD (Figura 4.30). En las demás condiciones experimentales los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs demostraron ser más eficaces que el péptido TAT para provocar descenso en la viabilidad celular.

Por último, los resultados de estos experimentos indican que los tres péptidos desarrollados presentan efecto citotóxico independientemente de la expresión de p53. Estos sorprendentes resultados son interesantes dada la elevada tasa de inactivación que presenta p53 en los distintos tipos de cáncer humano (Joerger y Fersht 2016).

4.7.3 Evaluación *in vitro* de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de promover la apoptosis celular.

Ante los sorprendentes resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular (Figura 4.30), decidimos evaluar la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de activar los mecanismos de apoptosis celular mediada por caspasas. Las caspasas son un conjunto de enzimas cuya activación es un signo característico de los procesos de apoptosis celular que actúan por vía extrínseca e intrínseca (McArthur y Kile 2018).

Los resultados preliminares obtenidos en experimentos de citometría de flujo y ensayos de viabilidad celular han mostrado que los péptidos P10hs y P11hs actúan provocando apoptosis en la línea celular HCT116 p53^{+/+} mediante activación de las caspasas 3 y 7 (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). Decidimos ampliar estos resultados empleando las líneas celulares HCT116 y Saos2 en su versión *knock out* para p53.

Para ello realizamos un ensayo *in vitro* de activación de caspasas 3 y 7 empleando el reactivo Caspase-Glo® 3/7 (Promega). Estas dos enzimas se encuentran en la confluencia de las vías intrínseca (mitocondrial) y extrínseca de activación de la apoptosis celular, por lo que su activación es proporcional a la activación global del proceso de apoptosis celular (McArthur y Kile 2018). Los resultados mostraron una activación de las caspasas 3 y 7 en células Saos2 p53^{-/-} tratadas con los péptidos P10hs y P10hsD (Figuras 4.31). En el caso del péptido P10hsD, sin embargo, se observa una marcada activación de las caspasas 3 y 7 a concentraciones intermedias (50 y 75 μ M), mientras que a 100 μ M se observa una menor activación (Figura 4.31B).

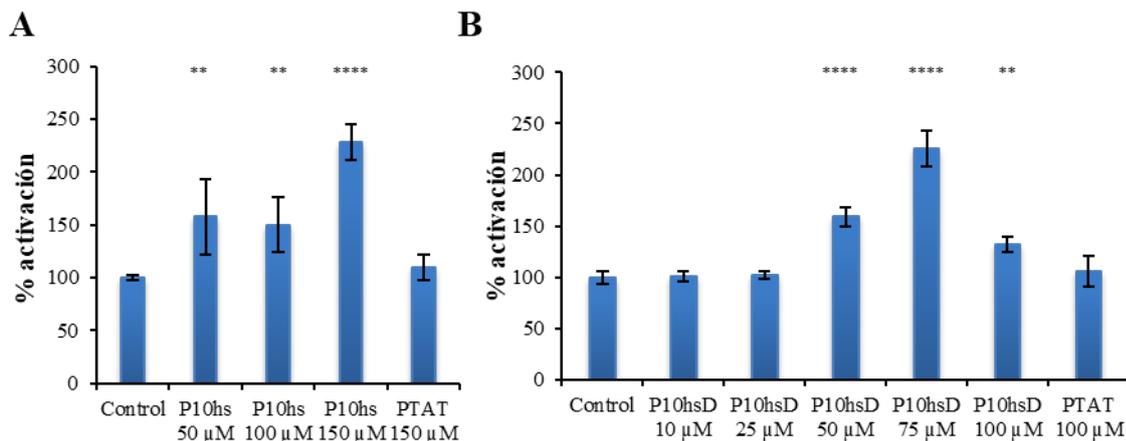


Figura 4.31: Evaluación *in vitro* de la capacidad de los péptidos P10hs y P10hsD de activar la señalización mediada por caspasas en células Saos2 p53^{-/-}. La línea celular Saos2 p53^{-/-} fue tratada con distintas concentraciones de los péptidos P10hs (A) y P10hsD (B) durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se determinó el estado de activación de las caspasas 3 y 7 mediante el reactivo Caspase Glo[®] 3/7 (Promega). Los resultados se muestran como porcentaje de activación con respecto al control (constituido por células sin tratar). Se muestra el valor medio de al menos tres réplicas experimentales \pm SD. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 y **** P < 0,0001 con respecto al control.

Repetimos este experimento empleando la línea celular HCT116 p53^{-/-} y los péptidos P10hs y P11hs. Los resultados (Figura 4.32A) mostraron que también en esta línea celular ambos péptidos actúan promoviendo la activación de las caspasas 3 y 7. En este caso se emplean concentraciones de hasta 150 μ M en el caso del péptido P10hs y de hasta 400 μ M en el caso del péptido P11hs. Por último, realizamos un estudio de activación de caspasas mediante western blot empleando la línea celular HCT116 p53^{+/+} (Figura 4.32B), en el que se determina que el péptido P10hsD actúa promoviendo la activación de la caspasa 3 con la consecuente desaparición de la forma zimogénica pro-caspasa 3.

Estos resultados preliminares deben confirmarse en futuros experimentos, en los que también se evaluará la capacidad del péptido P11hs de activar los mecanismos de apoptosis en células Saos2 p53^{-/-}, así como la capacidad del péptido P10hsD de provocar apoptosis en células HCT116 p53^{-/-}. Todos los ensayos de activación de caspasas fueron realizados corrigiendo los correspondientes valores de activación de caspasas respecto a la supervivencia celular observada en cada condición de tratamiento. Para ello se realizaron dos experimentos en paralelo en los que se determinó el estado de activación de las caspasas 3/7 y el nivel de viabilidad celular empleando las mismas condiciones experimentales. En todos los casos se observa que el péptido TAT por sí solo no provoca alteraciones significativas en el estado de activación de las caspasas 3 y 7 (véase Figuras 4.31 y 4.32).

Estos resultados complementan los datos obtenidos en los experimentos de viabilidad celular (Figura 4.30), en los que se observa la capacidad de los tres péptidos de disminuir la viabilidad de células tumorales humanas independientemente de la expresión de p53. En conjunto, estos datos (Figuras 4.30, 4.31 y 4.32) sugieren que los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs actúan disminuyendo la viabilidad y activando los mecanismos de apoptosis en células tumorales humanas de modo independiente a la expresión de p53.

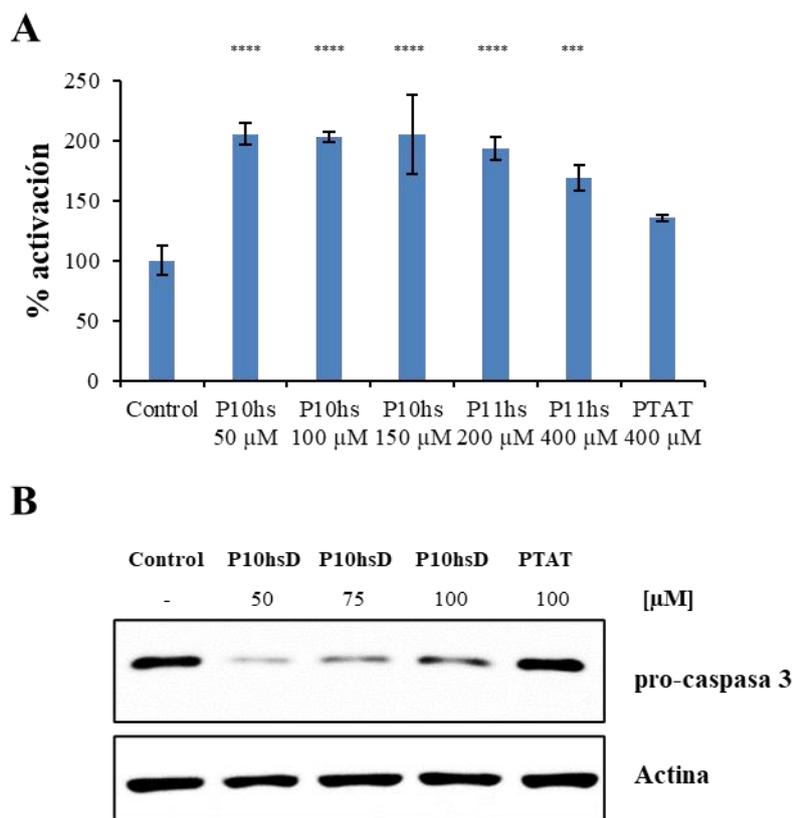


Figura 4.32: Evaluación *in vitro* de la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de activar la señalización mediada por caspasas en células HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-}. **A.** Activación *in vitro* de caspasas 3 y 7 en la línea celular HCT116 p53^{-/-} tratada con distintas concentraciones de los péptidos P11hs y P10hs durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se determinó el estado de activación de las caspasas 3 y 7 mediante el reactivo Caspase Glo[®] 3/7 (Promega). Los resultados se muestran como porcentaje de activación con respecto al control (constituido por células sin tratar). Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. *** P < 0,001 y **** P < 0,0001 con respecto al control. **B.** Experimento de western Blot mostrando la activación de la caspasa 3 en células HCT116 p53^{+/+} tratadas con distintas concentraciones de P10hsD durante 24 horas. Se muestra la disminución de la pro-caspasa 3 (32 KDa) tras el tratamiento de las células con el péptido P10hsD.

4.7.4 Estudio de los mecanismos moleculares de actuación de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs.

Ante los sorprendentes resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y activación de caspasas (Figuras 4.30, 4.31 y 4.32), decidimos estudiar los mecanismos alternativos a p53 por los que actúan estos péptidos. Para ello seleccionamos una serie de proteínas que han sido previamente relacionadas con la activación de los mecanismos de apoptosis en respuesta al estrés ribosómico (p21 y p73) así como con la promoción de la biogénesis ribosómica (cMyc). La proteína cMyc es uno de los mayores promotores de la biogénesis ribosómica actuando en las etapas iniciales de dicho proceso (van Riggelen et al. 2010). P73 es un regulador transcripcional perteneciente a la misma familia que p53. P73 presenta una serie de isoformas marcadas por la presencia o ausencia de un dominio de transactivación (denominado TA por *transactivation domain*) en su extremo amino-terminal debido al uso de dos promotores alternativos, así como por variaciones en su extremo carboxi-terminal debidas a procesos de *splicing* alternativo. Las isoformas de p73 que contienen el dominio TA

(denominadas isoformas TAp73) han sido relacionadas con la activación de los procesos de apoptosis celular independientes de p53 tras la disrupción de la biogénesis ribosómica (Zhou et al. 2015). La expresión de p21 es promovida por p53 y p73, ambos mediadores de la respuesta de estrés ribosómico (Lee y Thangue, 1999) (Ramos et al. 2020). Esta proteína ha sido relacionada con el bloqueo tanto del ciclo celular y como de los mecanismos de apoptosis (Ćmielová y Řezáčová 2011). Utilizamos la técnica de western blot a fin de detectar diferencias en el nivel de expresión de estas proteínas en células tratadas con diferentes concentraciones de los péptidos P10hs y P10hsD.

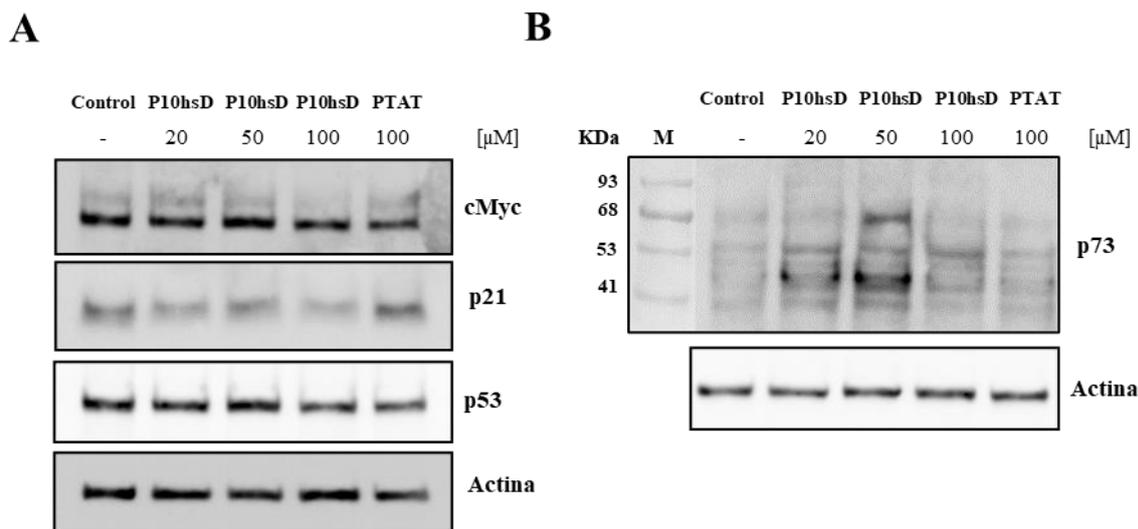


Figura 4.33: Estudio de los mecanismos moleculares de acción del péptido P10hsD en la línea celular HCT116 p53+/+. Se trataron las células HCT116 p53 +/+ con distintas concentraciones del péptido P10hsD durante 48 horas. Se determinó mediante western Blot el nivel de expresión de las proteínas cMyc, p21 y p53 (A) y p73 (B). En ambos casos se utilizó actina como control de carga. M: marcador de pesos moleculares. KDa: peso molecular en Kilo Dalton.

El péptido P11hs fue descartado para estos experimentos debido a su menor capacidad de afectar a la viabilidad celular (Figura 4.30). Los resultados mostraron que no se produce variación en la expresión de cMyc en células HCT116 p53+/+ tratadas con P10hsD (Figura 4.33A). En células Saos2 p53^{-/-} se observa una ligera bajada en la expresión de cMyc tras ser tratadas con el péptido P10hs, pero esta disminución no resulta significativa (Figura 4.34B). Por otro lado, p53 no varía su expresión a nivel de proteína en células HCT116 p53+/+ tratadas con el péptido P10hsD (Figura 4.33A). Este hecho constituye un indicio de que los péptidos desarrollados actúan por mecanismos independientes a la activación de p53. Por último, y de manera sorprendente, se observa una disminución en la expresión de p21 en células HCT116 p53+/+ (Figura 4.33A) y HCT116 p53^{-/-} (Figura 4.34A) tratadas con péptido P10hsD. Este efecto se observa más claramente en las células p53^{-/-} que en las p53+/+ (compárese Figuras 4.33A y 4.34A) lo cual podría relacionarse con el hecho de que p53 es un promotor de la expresión de p21 (Lee y Thangue, 1999). Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que p21, además de actuar en el núcleo promoviendo el bloqueo del ciclo celular, actúa en el citoplasma inhibiendo la apoptosis celular mediante su interacción con la pro-caspasa 3 y el bloqueo de su función (Cazzalini et al. 2010) (Ćmielová y Řezáčová 2011).

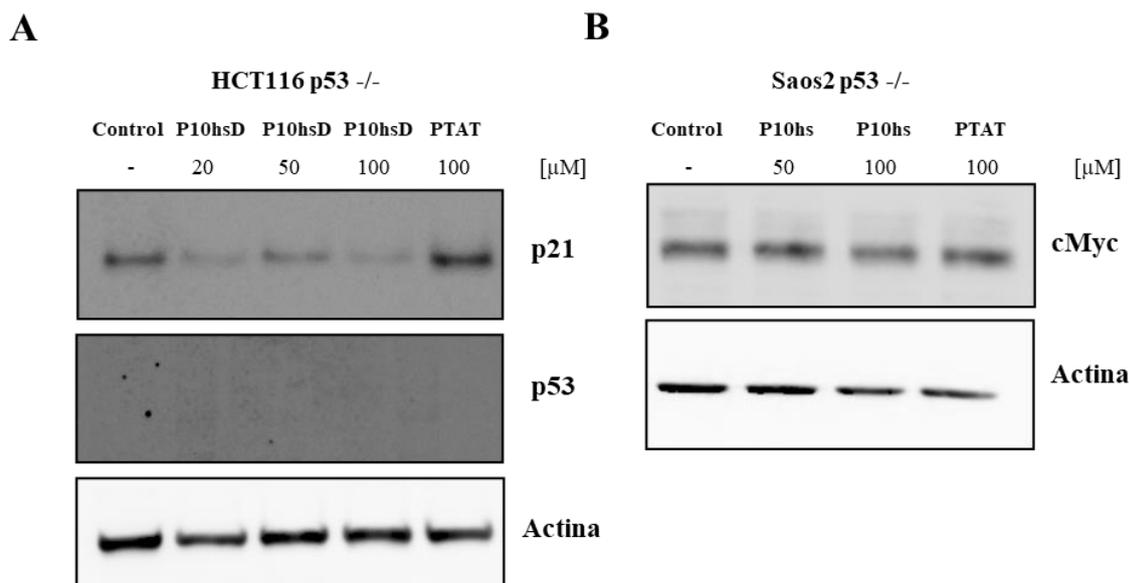


Figura 4.34: Estudio de los mecanismos moleculares de acción de los péptidos P10hsD y P10hs en células *knock out* para p53. Se trataron las células HCT116 p53^{-/-} (A) y Saos2 p53^{-/-} (B) con distintas concentraciones de los péptidos P10hsD y P10hs respectivamente durante 48 horas. Tras este periodo de incubación se determinó mediante western blot el nivel de expresión de las proteínas p21 y p53 (A) y cMyc (B). En ambos casos se utilizó actina como control de carga.

Por último, observamos que tras el tratamiento de la línea celular HCT116 p53^{+/+} con distintas concentraciones de péptido P10hsD y la hibridación con un anticuerpo anti-p73 aparecen distintas bandas con un tamaño comprendido entre los 68 y los 41 KDa (Figura 4.33B). Concretamente, observamos la aparición de una banda con un tamaño aproximado de 45 KDa en los tratamientos con P10hsD a 20 y 50 μ M y que no se observa en la condición de control (células sin tratamiento). Sin embargo, esta banda no se observa en células HCT116 p53^{+/+} tratadas con P10hsD a 100 μ M. Además, su tamaño no coincide con el tamaño esperado para p73, cuyas distintas isoformas se sitúan en torno a los 73 KDa. Este resultado, por tanto, no nos permite concluir que p73 esté implicado en el mecanismo molecular de actuación del péptido P10hsD. Nuestros resultados sugieren que el anticuerpo utilizado no resulta adecuado para la detección de las distintas isoformas que presenta esta proteína, por lo que nos planteamos repetir el experimento empleando un anticuerpo distinto.

4.7.5 Estudio del efecto combinado de los péptidos P10hsD y P11hs sobre la línea celular HCT116 p53^{+/+}.

A continuación estudiamos el resultado de la combinación de los péptidos P10hsD y P11hs sobre la viabilidad de la línea celular HCT116 p53^{+/+}. Para este experimento se descartó el uso del péptido P10hs debido a su menor eficacia sobre la viabilidad celular con respecto al péptido P10hsD (Figura 4.30). Los resultados mostraron que el péptido P10hsD individualmente provoca citotoxicidad al ser empleado a elevada concentración (100 μ M), pero no a concentraciones más bajas (25, 50 y 75 μ M) (Figura 4.35A). Estos resultados concuerdan parcialmente con los datos mostrados en la Figura 4.30A, en la que se observa que tras tratar la línea celular HCT116 p53^{+/+} durante 48 horas con 20 ó 50 μ M de péptido P10hsD se produce una ligera disminución en la viabilidad celular que, sin

embargo, no resulta estadísticamente significativa. En la Figura 4.35A, no se observa disminución de la viabilidad celular tras tratar las células HCT116 p53+/+ con P10hsD a 25 y 50 μ M. Por otro lado, al utilizar el péptido P10hsD a una concentración de 100 μ M sí se observa un efecto significativo sobre la viabilidad de esta línea celular en ambos experimentos (Figuras 4.30A y 4.35A).

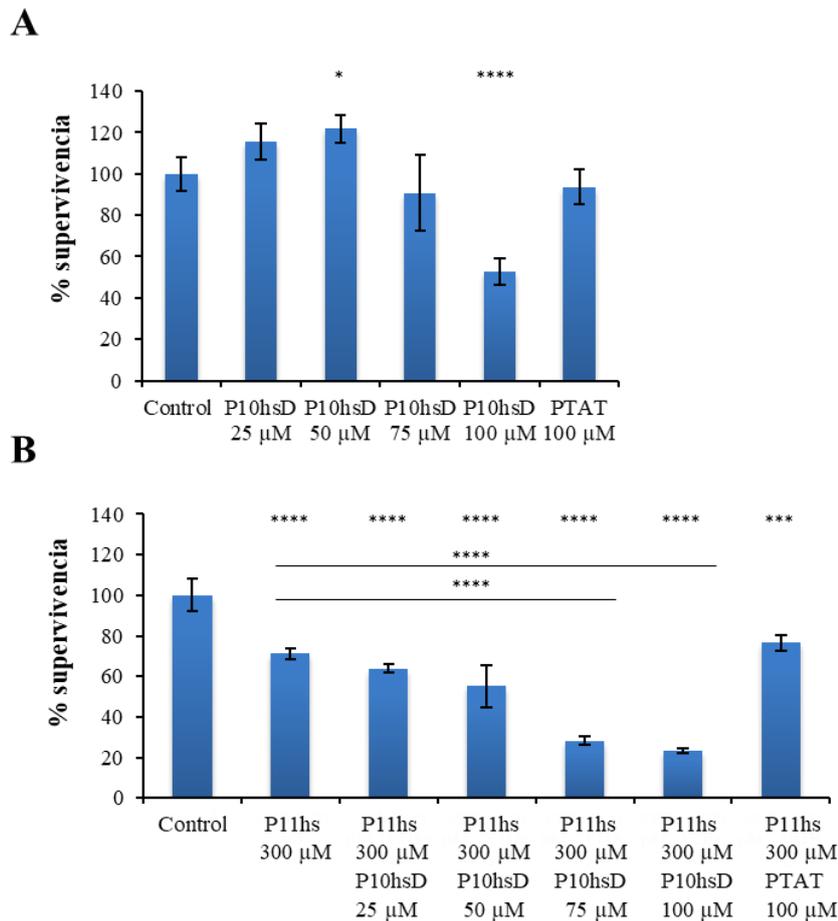


Figura 4.35: Evaluación del efecto combinado de los péptidos P10hsD y P11hs sobre la línea celular HCT116 p53 +/+. Esta línea celular fue tratada con distintas concentraciones del péptido P10hsD (A) y con péptido P11hs a 300 μ M combinado con distintas concentraciones de péptido P10hsD (B) durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la viabilidad celular mediante el reactivo WST-1. Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. Los resultados se muestran como porcentaje de supervivencia con respecto al control (constituido por células sin tratar). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ con respecto al control o bien entre los tratamientos indicados mediante barras.

Por otro lado, la combinación de ambos péptidos P11hs a 300 μ M y P10hsD a 75 y 100 μ M se traduce en una disminución de la viabilidad celular considerablemente mayor que la observada con cualquiera de los dos tratamientos por separado (Figura 4.35B). Tras realizar el correspondiente estudio estadístico mediante el test ANOVA se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa de la viabilidad celular ($P < 0,0001$) entre el tratamiento con P11hs a 300 μ M y los tratamientos combinados con P11hs 300 μ M y P10hsD a las concentraciones de 75 y 100 μ M. Este resultado sugiere que la combinación de ambos péptidos P10hsD y P11hs implica una mejora

significativa en términos de disminución global de la viabilidad celular. Por lo tanto, ambos péptidos podrían administrarse de manera simultánea como parte del mismo tratamiento.

4.8 Combinación de los péptidos P10hsD y P11hs con fármacos de quimioterapia usados en la actualidad.

Como se explica en el apartado 1.2.2 de la Introducción, los fármacos de quimioterapia utilizados en la actualidad basan su acción principalmente en provocar daño en el ADN (genotoxicidad). Este mecanismo de acción da lugar a importantes efectos secundarios derivados del daño que provocan sobre las células sanas del organismo (Partridge, Burstein, y Winer 2001) (van den Boogaard, Komninos, y Vermeij 2022). Los péptidos de interferencia evaluados en este trabajo nos ofrecen una nueva estrategia terapéutica antitumoral que presenta la ventaja de su carácter no genotóxico. Esta propiedad ha sido analizada experimentalmente mediante ensayos de detección de fosforilación de la histona H2A.X, un marcador característico de daño al ADN celular (Dickey et al. 2009), en células HCT116 p53+/+ tratadas con los péptidos P10hs y P11hs. Los resultados preliminares muestran que estos dos péptidos no provocan daño al ADN en esta línea celular (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia).

Tras comprobar la capacidad de estos péptidos, y en especial del péptido P10hsD de disminuir de manera significativa la viabilidad de las líneas celulares tumorales HCT116 p53+/+ y p53-/- así como Saos2 p53-/- (Figura 4.30), decidimos comprobar el efecto que tienen estos péptidos al ser combinados con distintos fármacos de quimioterapia usados en la práctica clínica actual. Elegimos para ello los fármacos quimioterapéuticos oxaliplatino y ciclofosfamida. El oxaliplatino es un derivado de platino de tercera generación ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer colorrectal en sus estadios avanzados (Boyer et al. 2004) (Toscano et al. 2007) (Jensen et al. 2015). La ciclofosfamida es un fármaco antineoplásico utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer tales como el cáncer de mama, cáncer de ovarios, linfomas y cánceres pediátricos (Emadi, Jones, y Brodsky 2009). Ambos fármacos fueron originalmente descritos como genotóxicos, es decir, fármacos que actúan provocando daño al ADN celular. La ciclofosfamida es un agente alquilante del ADN (Emadi et al. 2009), mientras que el oxaliplatino actúa formando metalocomplejos con el ADN (Woynarowski et al. 2000) (Faivre et al. 2003).

El segundo criterio utilizado para la selección de estos fármacos se relaciona con la distinta sensibilidad o resistencia que muestran las líneas celulares empleadas en este trabajo. Según los datos publicados en la literatura, la línea celular HCT116 (en su variante silvestre) muestra resistencia a la acción de la ciclofosfamida (Elmenoufy et al. 2020) (Weilbeer et al. 2022). También está documentada la resistencia de la línea celular Saos2 (silvestre) al tratamiento con ciclofosfamida (Evdokiu et al. 2002). Estos datos son corroborados por la información obtenida en la base de datos GDSC (Yang et al. 2012). Por otro lado, la expresión de p53 se correlaciona con una mayor sensibilidad al oxaliplatino en la línea celular HCT116, mientras que la ausencia de expresión de p53 (células HCT116 p53-/-) se correlaciona con una mayor resistencia a la acción de este fármaco (Boyer et al. 2004) (Toscano et al. 2007). La línea celular Saos2 (en su variante silvestre), se muestra resistente a la acción del oxaliplatino, según datos depositados en la base de datos GDSC (Yang et al. 2012).

Nuestro objetivo experimental consistió en determinar si los péptidos de interferencia desarrollados frente a la interacción Bop1-WDR12 son eficaces en el tratamiento *in vitro* de células tumorales humanas resistentes a ciertos fármacos de quimioterapia (ciclofosfamida). Por otro lado, pretendíamos determinar si los mismos péptidos son capaces de actuar en combinación con un fármaco quimioterapéutico genotóxico (oxaliplatino) disminuyendo la cantidad de dicho fármaco necesaria para provocar un efecto citotóxico. Esta estrategia permitiría disminuir los efectos secundarios nocivos derivados del uso de dicho fármaco genotóxico en la práctica clínica.

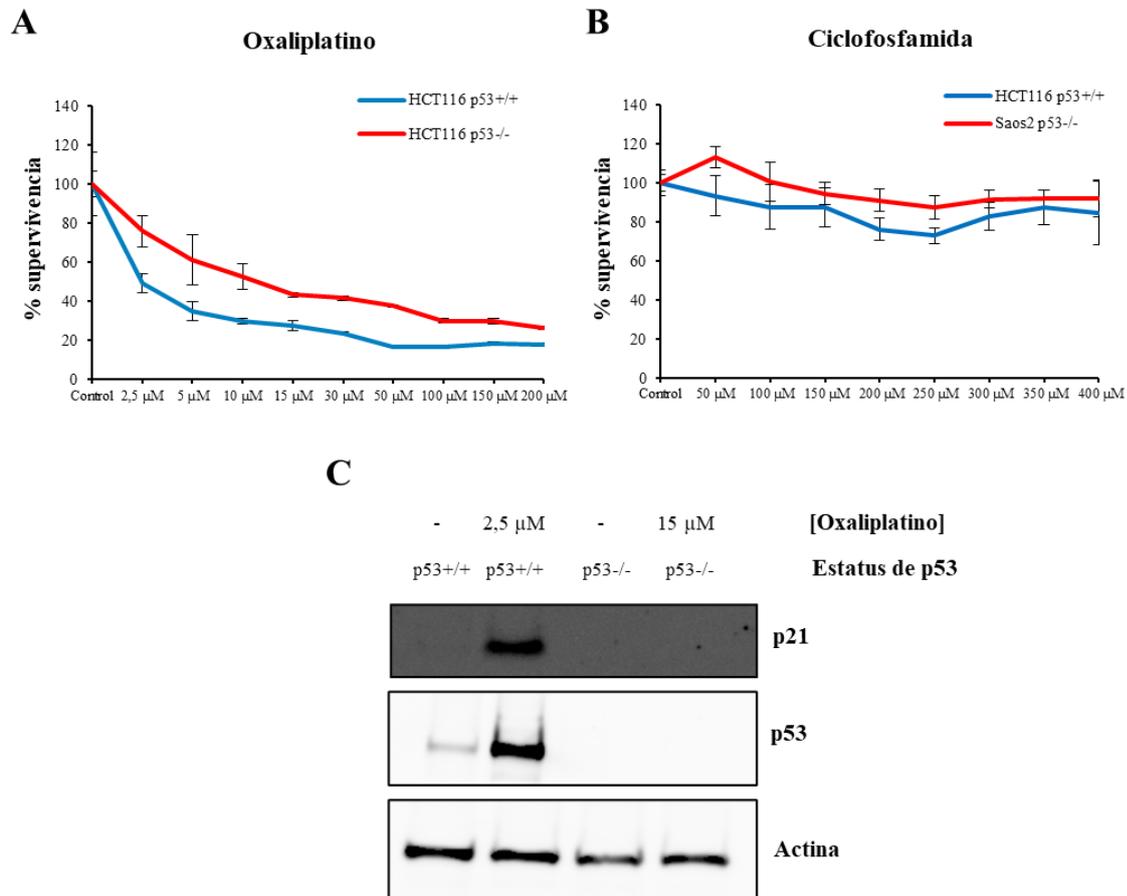


Figura 4.36: Evaluación del efecto citotóxico de los fármacos de quimioterapia oxaliplatino y ciclofosfamida. **A.** Las líneas celulares HCT116 p53 +/+ y p53 -/- se trataron con distintas concentraciones de oxaliplatino durante 48 horas. **B.** Las líneas celulares HCT116 p53 +/+ y Saos2 p53 -/- se trataron con distintas concentraciones de ciclofosfamida durante 48 horas. En **(A)** y **(B)** se cuantificó la viabilidad celular tras el tiempo de tratamiento mediante el reactivo WST-1. Los resultados se muestran como porcentaje de supervivencia con respecto al control (constituido por células sin tratar). Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. **C.** Las líneas celulares HCT116 p53 +/+ y p53 -/- fueron tratadas durante 48 horas con las concentraciones indicadas de oxaliplatino. Se determinó el nivel de expresión de las proteínas p21, p53 y actina (control de carga) mediante los anticuerpos correspondientes.

A fin de abordar estos objetivos experimentales empezamos estudiando el grado de resistencia o sensibilidad de las tres líneas celulares utilizadas en este trabajo (HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/- y Saos2 p53-/-) frente a la acción de la ciclofosfamida y el oxaliplatino. Para ello llevamos a cabo ensayos de viabilidad celular en los que tratamos a las distintas líneas celulares con concentraciones crecientes de estos dos fármacos quimioterapéuticos durante 48 horas. Se determinó el grado de viabilidad celular en cada condición empleando el reactivo WST-1 y se relativizaron los resultados con respecto a un control sin tratar.

Los resultados (Figura 4.36A y B) confirmaron los datos disponibles en la literatura (Boyer et al. 2004) (Toscano et al. 2007). La línea celular HCT116 se mostró sensible a la acción del oxaliplatino de un modo dependiente de la expresión de p53. Así, las células HCT116 p53^{+/+} mostraron una mayor sensibilidad (menor supervivencia) que las células HCT116 p53^{-/-} (Figura 4.36A). Por otro lado, la ciclofosfamida no provoca un descenso significativo de la viabilidad celular en las líneas HCT116 p53^{+/+} y Saos2 p53^{-/-} (Figura 4.36B). Estos resultados concuerdan con los datos disponibles en la literatura (Evdokiou et al. 2002) (Elmenoufy et al. 2020) (Weilbeer et al. 2022).

En vista de estos resultados seleccionamos las concentraciones de oxaliplatino y ciclofosfamida adecuadas para la realización de posteriores experimentos. En el caso del oxaliplatino, decidimos tratar a las células HCT116 p53^{+/+} con una concentración 2,5 μM de este fármaco, mientras que para las células HCT116 p53^{-/-} seleccionamos la concentración de 15 μM . Esta decisión se basó en el hecho de que ambas concentraciones suponen una reducción de aproximadamente el 50% de la viabilidad de las respectivas líneas celulares con respecto a las células control sin tratar (Figura 4.36 A). La línea celular Saos2 p53^{-/-} se trató con 15 μM de oxaliplatino, de manera homóloga a las células HCT116 p53^{-/-}. En el caso de la ciclofosfamida seleccionamos la concentración de 350 μM al ser la concentración a la que se observa una mayor resistencia en ambas líneas celulares testadas (HCT116 p53^{+/+} y Saos2 p53^{-/-}) (Figura 4.36B).

Según la información disponible en la literatura, el oxaliplatino actúa sobre la línea celular HCT116 silvestre provocando la estabilización de p53 (inhibición de su degradación proteolítica) y el consecuente aumento de expresión de p21 (Toscano et al. 2007). Decidimos corroborar este mecanismo de acción en nuestras condiciones experimentales. Para ello tratamos la línea celular HCT116 en sus variantes p53^{+/+} y p53^{-/-} con las concentraciones apropiadas de oxaliplatino (2,5 y 15 μM respectivamente) durante 48 horas. Transcurrido este tiempo determinamos mediante western blot el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21.

Los resultados mostraron que el oxaliplatino actúa en las células HCT116 p53^{+/+} induciendo una acumulación de p53 y p21, de acuerdo con la información disponible en la literatura (Toscano et al. 2007). Por el contrario, en la línea celular HCT116 p53^{-/-} no se observa acumulación de p21 ni de p53 (Figura 4.36C). Actualmente se desconocen las vías alternativas por las que actúa el oxaliplatino en células HCT116 p53^{-/-}, aunque se ha apuntado a una posible implicación de las distintas isoformas de p73 (Toscano et al. 2007) (San Millán et al. 2015).

4.8.1 Combinación de los péptidos P10hsD y P11hs con oxaliplatino en células tumorales humanas.

Nuestro siguiente paso fue llevar a cabo experimentos de viabilidad celular empleando distintas combinaciones de péptidos de interferencia (P10hsD y P11hs) y oxaliplatino en las líneas celulares HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-}. El péptido P10hs se descartó para estos experimentos debido a su menor eficacia con respecto al péptido P10hsD (Figura 4.30). Se empleó el péptido P10hsD a una concentración de 100 μM , y el péptido P11hs a 400 μM . Estas dos concentraciones fueron seleccionadas en base a que ambas provocan un descenso significativo de la viabilidad en las líneas celulares HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-} (Figura 4.30).

Los resultados mostraron que tanto el péptido P10hsD como el péptido P11hs son capaces de actuar de forma combinada con el oxaliplatino en células HCT116 independientemente del estatus de p53 (Figura 4.37). Este tratamiento combinado tiene un efecto sobre la viabilidad celular mayor que cualquiera de los dos tratamientos por separado, dando lugar a diferencias estadísticamente significativas. En estos y sucesivos experimentos se empleó el péptido TAT como control interno, comprobando que éste péptido por sí solo no provoca una alteración significativa de la viabilidad celular.

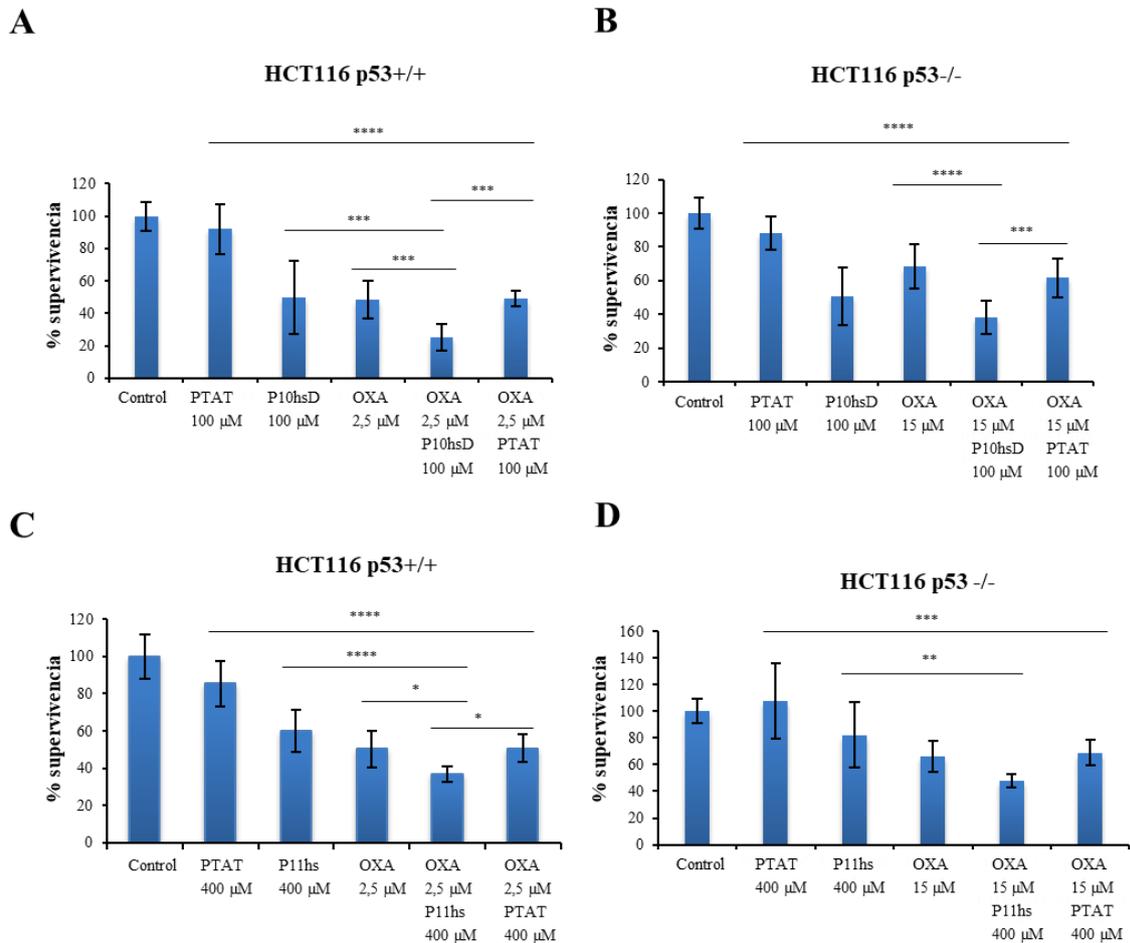


Figura 4.37. Evaluación del efecto combinado del oxaliplatino y los péptidos P10hsD y P11hs sobre la viabilidad celular. Se empleó la línea celular HCT116 p53 +/+ que fue tratada con el péptido P10hsD (A) o bien con el péptido P11hs (C) de manera individual o en combinación con oxaliplatino. La línea celular HCT116 p53-/- fue tratada con el péptido P10hsD (B) o bien con el péptido P11hs (D) de manera individual o en combinación con oxaliplatino. Tras 48 horas de tratamiento se cuantificó el estado de viabilidad celular mediante el reactivo WST-1 en los diferentes experimentos. Se muestra el valor medio de al menos 9 réplicas experimentales \pm SD. Los resultados se muestran como porcentaje de supervivencia con respecto al control (constituido por células sin tratar). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 y **** P < 0,0001 al comparar las condiciones indicadas mediante barras. OXA = oxaliplatino.

Estos resultados sugieren que los péptidos P10hsD y P11hs podrían utilizarse en combinación con el oxaliplatino como tratamiento antitumoral, particularmente en el tratamiento del cáncer colorrectal, del que derivan las células HCT116 utilizadas en este ensayo (Brattain et al. 1981). El oxaliplatino es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de este tipo de cáncer (McQuade et al. 2017). Además, este tratamiento combinado podría ser útil en un contexto tumoral en el que p53 se

encuentre ausente o mutado, dada la observada eficacia *in vitro* en células HCT116 p53^{-/-} (Figura 4.37 B, D).

Decidimos ampliar estos experimentos empleando la línea celular Saos2 p53^{-/-}. Los resultados (Figura 4.38) muestran que esta línea celular es resistente a la acción del oxaliplatino empleando una concentración 15 μM de este fármaco. Este resultado concuerda con la información disponible en la base de datos GDSC (Yang et al. 2012) en la que se muestra que la línea celular Saos2 (en su versión silvestre) es resistente a la acción del oxaliplatino, con un valor de EC50 calculado de 428,73 μM . Cabría esperar que la versión p53 *knock out* de esta línea celular presentase una resistencia todavía mayor a la acción del oxaliplatino, dado el papel central que ejerce p53 en la regulación de la apoptosis celular en respuesta a los tratamientos de quimioterapia (Joerger y Fersht 2016).

Por otro lado, los resultados de la Figura 4.38 sugieren que el péptido P10hsD podría resultar efectivo en líneas celulares resistentes a ciertos tipos de quimioterapia, como es el caso de las células Saos2 p53^{-/-} resistentes al tratamiento con oxaliplatino. Se abre así la posibilidad de usar este péptido en tumores refractarios a los fármacos de quimioterapia usados en la primera línea de tratamiento (ver apartado 4.8.2 y Discusión apartados 5.3.4 y 5.3.5).

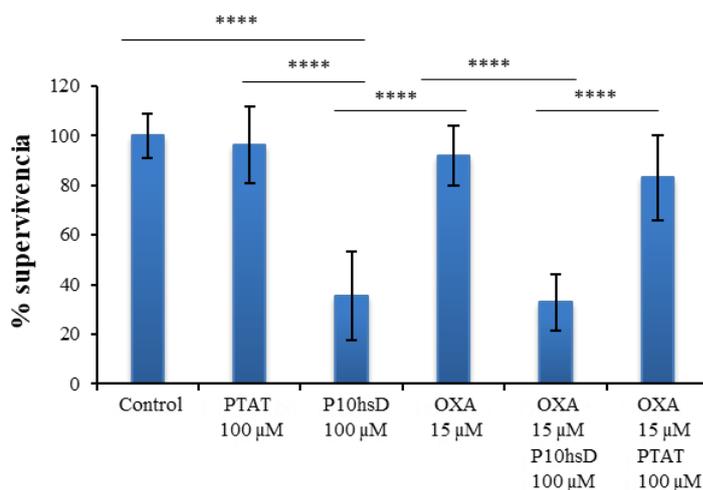


Figura 4.38: Evaluación del efecto combinado del péptido P10hsD y el oxaliplatino en la línea celular Saos2 p53^{-/-}. Las células Saos2 p53^{-/-} se trataron durante 48 horas con oxaliplatino 15 μM y/o P10hsD 100 μM . Tras el tratamiento se determinó la viabilidad celular en cada condición mediante el reactivo WST-1. Se muestra el valor medio de nueve réplicas experimentales \pm SD. **** $P < 0,0001$ al comparar las condiciones indicadas mediante barras. OXA = oxaliplatino.

Los resultados obtenidos al combinar oxaliplatino con P10hsD y P11hs en células HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-} (Figura 4.37) nos impulsaron a evaluar si efectivamente el uso de estos péptidos sirve para disminuir la concentración de oxaliplatino necesaria para alcanzar un efecto citotóxico sobre las células tumorales. Para ello realizamos nuevos experimentos de viabilidad celular en los que combinamos el péptido P10hsD a una concentración fija (100 μM) con concentraciones decrecientes de oxaliplatino en células HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-}.

Los resultados mostraron que en todas las concentraciones de oxaliplatino empleadas la adición de P10hsD disminuye significativamente la viabilidad celular con respecto al tratamiento individual con oxaliplatino. Este efecto se observa en ambas líneas celulares HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-} (Figura 4.39). En nuestras condiciones experimentales observamos que el uso del péptido P10hsD permite disminuir considerablemente la concentración de oxaliplatino manteniendo el mismo efecto citotóxico sobre las células tumorales. En el caso de la línea celular HCT116 p53^{+/+}, es posible disminuir la concentración de oxaliplatino de 2,5 μM a 0,75 μM , es decir, se alcanza una reducción del 70%. En la línea celular HCT116 p53^{-/-} esta reducción alcanza el 67 % (de 15 μM a 5 μM). En

ambas líneas celulares se observa una mayor viabilidad celular a medida que disminuye la concentración de oxaliplatino empleado individualmente, mientras que al combinar oxaliplatino + P10hsD a 100 μ M este aumento progresivo de viabilidad no se produce. Este efecto es más evidente en las células HCT116 p53^{+/+} (Figura 4.39A) que en la variante p53^{-/-} (Figura 4.39B). Esta diferencia podría deberse al hecho de que la línea celular HCT116 p53^{+/+} es más sensible al tratamiento con oxaliplatino (Figura 4.36A).

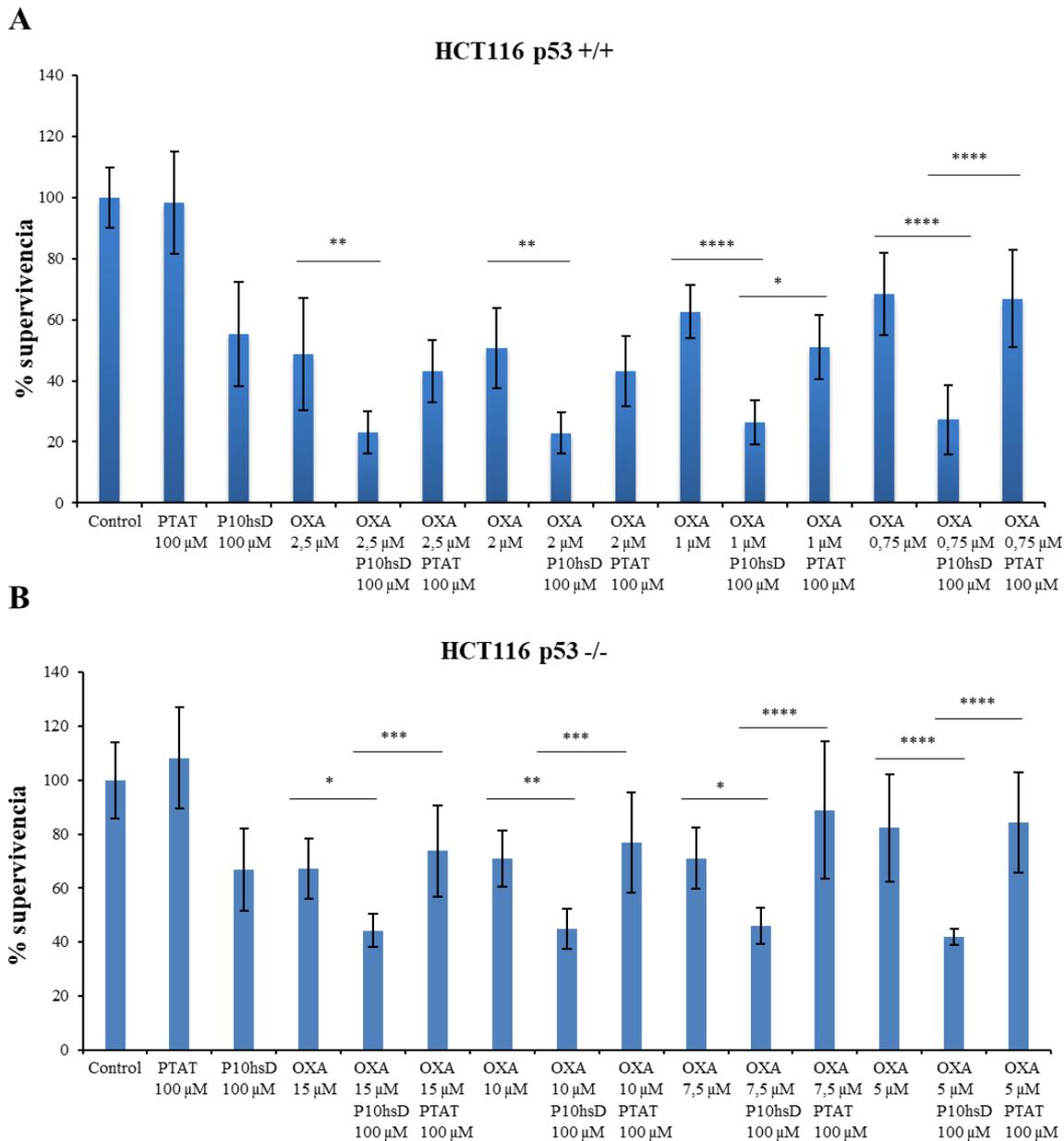


Figura 4.39. Evaluación de la capacidad del péptido P10hsD de disminuir la concentración de oxaliplatino necesaria para provocar citotoxicidad. Las líneas celulares HCT116 p53^{+/+} (A) y p53^{-/-} (B) fueron tratadas durante 48 horas con oxaliplatino y/o P10hsD en las concentraciones indicadas. Se cuantificó la viabilidad celular mediante el reactivo WST-1. Se presenta el valor medio de al menos 6 réplicas experimentales \pm SD. Los datos se muestran como porcentaje de supervivencia con respecto al control, constituido por células sin tratar. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 y **** P < 0,0001 entre las condiciones experimentales indicadas mediante barras. OXA = oxaliplatino.

4.8.2 Combinación del péptido P10hsD con ciclofosfamida en células tumorales humanas.

A continuación llevamos a cabo experimentos análogos a los descritos en el apartado 4.8.1 en los que evaluamos el efecto individual y combinado del péptido P10hsD y la ciclofosfamida sobre la viabilidad de las tres líneas celulares utilizadas en este trabajo. El objetivo de este experimento es determinar si este péptido de interferencia resulta efectivo en el tratamiento *in vitro* de un cultivo de células tumorales resistentes a la acción de la ciclofosfamida. Los datos disponibles en la literatura establecen que ambas líneas celulares HCT116 y Saos2 en su forma silvestre son resistentes al tratamiento con ciclofosfamida (Evdokiou et al. 2002) (Elmenoufy et al. 2020) (Weilbeer et al. 2022). Estos datos fueron corroborados mediante un ensayo de viabilidad celular empleando las células HCT116 p53+/+ y Saos p53-/- tratadas con un amplio rango de concentraciones de ciclofosfamida (Figura 4.36B).

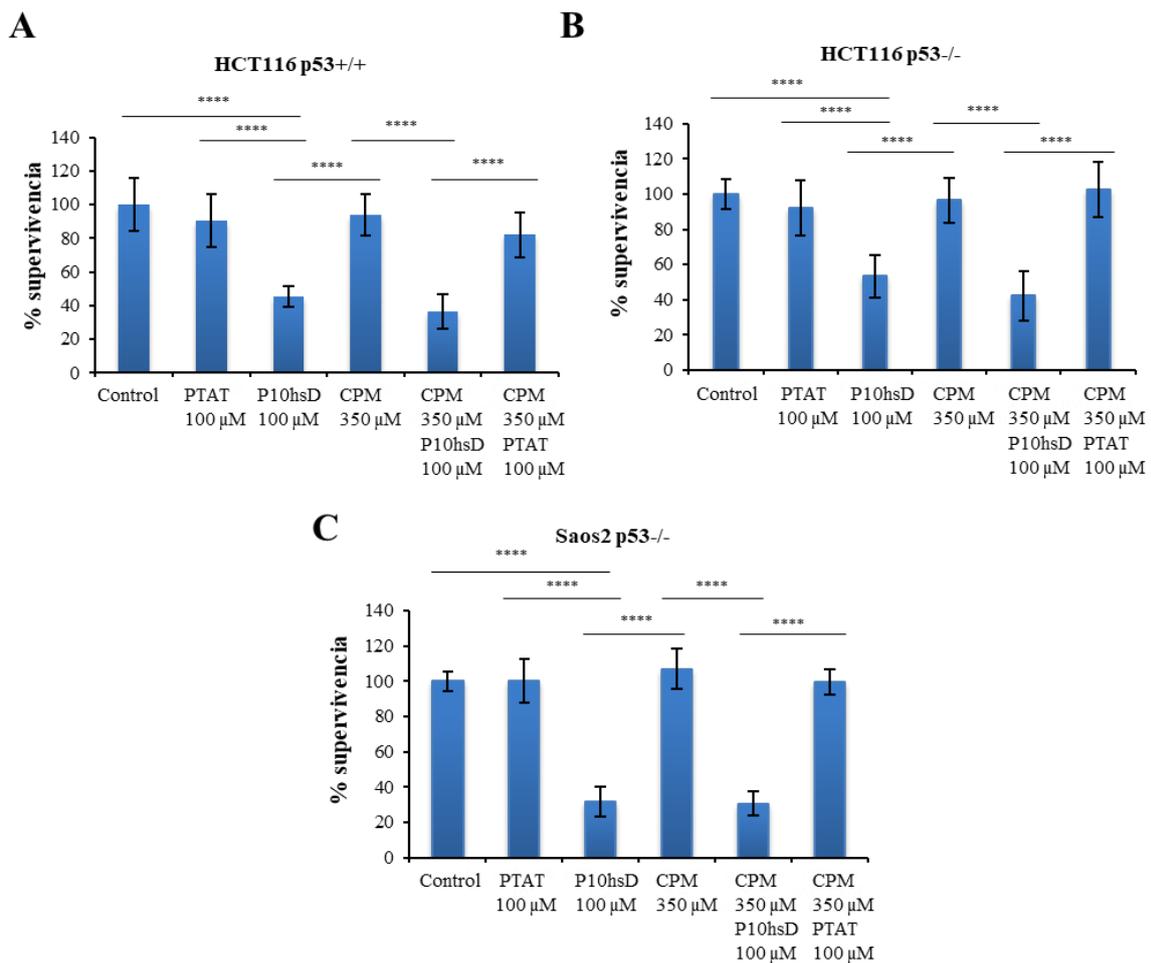


Figura 4.40. Evaluación del efecto combinado del péptido P10hsD y la ciclofosfamida sobre la viabilidad de células tumorales. Las líneas celulares HCT116 p53 +/+ y p53 -/- así como Saos2 p53 -/- fueron tratadas con el péptido P10hsD y/o ciclofosfamida durante 48 horas. Se cuantificó la viabilidad celular mediante el reactivo WST-1. Se muestra el valor medio de 9 réplicas experimentales \pm SD. Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad con respecto al control (constituido por células sin tratar). **** P < 0,0001 entre los tratamientos indicados mediante barras. CPM = ciclofosfamida.

Los resultados (Figura 4.40) mostraron que las tres líneas celulares son resistentes a la acción individual de la ciclofosfamida y sensibles a la acción del péptido P10hsD. El tratamiento combinado con ciclofosfamida y péptido P10hsD no produce un descenso significativo de la viabilidad celular con respecto al uso del péptido P10hsD de manera individual. Estos resultados permiten confirmar que el péptido P10hsD podría constituir una potencial herramienta terapéutica alternativa en tumores refractarios a determinados fármacos de quimioterapia usados en la clínica. Hemos visto también esta situación en la línea celular Saos2 p53 -/- que se muestra resistente al oxaliplatino en nuestras condiciones experimentales, pero sin embargo es sensible a la acción del péptido P10hsD (Figura 4.38).

Dado que la quimio resistencia es uno de los mayores problemas con los que se enfrenta el tratamiento oncológico actual (Yuan et al. 2017)(Zheng 2017)(Palliyage, Ghosh, y Rojanasakul 2020), resulta importante el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas ante este problema.

5. Discusión.

5.1 Evaluación de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 como potenciales dianas para el desarrollo de péptidos de interferencia.

5.1.1 Producción y caracterización *in vitro* de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5.

El objetivo de esta tesis doctoral es la búsqueda y evaluación de nuevas estrategias antitumorales basadas en el uso de péptidos de interferencia contra interacciones específicas entre factores de ensamblaje ribosómicos. Como se ha explicado en la Introducción (apartado 1.1), la biogénesis de la subunidad 60S ribosómica implica la participación de más de 200 factores de ensamblaje diferentes (Woolford y Baserga 2013), que constituyen potenciales dianas terapéuticas. Para alcanzar este objetivo general resulta esencial seleccionar interacciones binarias entre factores de ensamblaje cuya disrupción provoque una respuesta terapéutica.

El primer objetivo de este trabajo ha sido el estudio de los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 de *Chaetomium thermophilum* como potenciales dianas para el desarrollo de péptidos de interferencia. Estos factores de ensamblaje están implicados en distintas etapas de la biosíntesis de la subunidad 60S (Milkereit et al. 2001) (Milkereit et al. 2003) (Chen et al. 2017) (Brüning et al. 2018) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020) (Ismail et al. 2022). Diversos estudios de interactómica realizados en levaduras documentan la interacción entre estas tres proteínas utilizando el método de purificación en tándem (Saveanu et al. 2003) (Ohmayer et al. 2013) (Ohmayer et al. 2015) (Brüning et al. 2018) (Zisser et al. 2018). Esta información preliminar nos decidió a considerar estas proteínas como candidatas para el desarrollo de péptidos de interferencia.

Utilizamos *Chaetomium thermophilum* como organismo modelo para el estudio de estos tres factores de ensamblaje. Utilizamos *Escherichia coli* como organismo de expresión heteróloga. En el caso de MAK5, decidimos generar una forma truncada de esta proteína eliminando una serie de aminoácidos en sus extremos amino y carboxi-terminal (6xHis-MAK5 (192-616 aa)). El objetivo es generar una proteína más estable y por lo tanto más fácilmente cristalizable (Figura 4.5). El mismo objetivo justifica la generación de la forma truncada 6xHis-NOC2 (1-771 aa) (Figura 4.2). El programa bioinformático Alphafold, especializado en la predicción de la estructura tridimensional de proteínas (Jumper et al. 2021) no asigna una estructura tridimensional definida a las regiones 1-191 y 617-767 de la proteína MAK5 de *Chaetomium thermophilum*. Lo mismo sucede con los aminoácidos 772-788 de la proteína NOC2 de *C. thermophilum*. Estos resultados sugieren que dichas regiones podrían corresponderse con regiones desordenadas, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo mediante el programa IUPred (Erdős et al. 2021)(véase Figuras 4.2A y 4.5A)

Una vez obtenidas las proteínas de interés, las sometimos a una serie de ensayos empleando técnicas bioquímicas y biofísicas destinadas a caracterizar su funcionalidad y estabilidad. Comprobamos así que las construcciones 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y MBP-NOG1 presentan actividad enzimática (ATPasa y GTPasa respectivamente) (Figuras 4.7 y 4.9). La proteína 6xHis-NOG1 también presenta actividad GTPasa (Anexo 3). La actividad ATPasa de MAK5 ha sido previamente descrita en levaduras (Brüning et al. 2018). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la actividad enzimática de la proteína homóloga de MAK5 en *Chaetomium thermophilum*. En este trabajo demostramos que los aminoácidos 1-191 y 617-767 correspondientes a los extremos amino y carboxi-terminal de esta proteína no son esenciales para su actividad enzimática (Figura 4.7). Este resultado concuerda con el hecho de que los nueve motivos de secuencia propios de las ATPasas de la familia DEAD, que son

responsables de su actividad catalítica (Cordin et al. 2006) están presentes en la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) (Figura 4.8).

Hasta la fecha no hay datos publicados en relación a la actividad GTPasa *in vitro* de NOG1. Sin embargo, experimentos de mutagénesis dirigida realizados tanto con la proteína NOG1 de ratón como con su forma homóloga en levaduras sugieren que dicha actividad enzimática es esencial para que NOG1 pueda llevar a cabo su función en el contexto de la biogénesis ribosómica (Lapik et al. 2007) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). Asimismo, se ha sugerido que el factor de ensamblaje Nsa2 podría estar implicado en la modulación de la actividad enzimática de NOG1 y su capacidad de reciclarse desde el citoplasma al núcleo (Paternoga et al. 2020). En este estudio hemos logrado determinar *in vitro* la actividad catalítica del factor de ensamblaje NOG1 de *Chaetomium thermophilum* (Figura 4.9), demostrando que presenta actividad GTPasa proporcional a la concentración de GTP presente en el medio. Esta actividad enzimática también se observa en el caso de la proteína 6xHis-NOG1 (Anexo 3). Estos experimentos demuestran que ambos factores de ensamblaje (ctNOG1 y ctMAK5 (192-616 aa)) son funcionales en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo.

El factor de ensamblaje NOC2 de *Chaetomium thermophilum* no posee una actividad enzimática que pueda ser cuantificada. Como alternativa para llevar a cabo su caracterización, decidimos estudiar su estabilidad mediante la técnica de termofluór (Pantoliano et al. 2001). Los resultados mostraron que la forma truncada 6xHis-NOC2 (1-771 aa) presenta estabilidad térmica en las distintas condiciones experimentales empleadas (Figura 4.10). La condición A5 (150 mM de NaCl, 100 mM de MES pH 6,5) es la que más se asemeja a las condiciones experimentales que hemos empleado para la purificación de esta construcción (50 mM MES pH 6,5; 150 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol). En dicho punto experimental, la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) presenta una temperatura de fusión de 48,93° y 48,74°C en las dos réplicas experimentales respectivamente. Se puede concluir por tanto que la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) es estable en las condiciones experimentales empleadas para su purificación. Sin embargo, este experimento muestra la existencia de condiciones experimentales en las que la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) alcanza una mayor estabilidad térmica (condiciones A3, A8, B4, C4, C7, D5 y D8) mientras que en otros casos la estabilidad térmica es menor (condiciones A1 y C10). En el caso de la condición C10, esta menor estabilidad podría deberse al empleo de ZnCl₂ y CoCl₂ como aditivos, los cuales no se emplean en ninguna otra condición del ensayo (véase Tabla 3.7).

Respecto a la baja estabilidad observada en la condición A1 (150 mM NaCl, 100 mM acetato sódico pH 4,5), las condiciones B1 (150 mM NaCl, tampón 1x SPG pH 4,5) y B7 (150 mM NaCl, tampón 1x MMT pH 4,5) tienen una composición idéntica con la excepción del tampón empleado en cada caso. A diferencia de A1, las condiciones B1 y B7 presentan una mayor estabilidad que se traduce en unos valores de temperatura de fusión más elevados (Figura 4.10). Estos resultados sugieren que la baja estabilidad observada en la condición A1 podría deberse al empleo de acetato sódico como tampón. El análisis de las condiciones en las que 6xHis-NOC2 (1-771 aa) se muestra más estable (véase Figura 4.10 y Tabla 3.7) sugiere que el tampón HEPES a pH 7,5 es favorable a la estabilidad de esta proteína. Concretamente, las condiciones C1-C7 en las que se obtiene una temperatura de fusión en torno a los 50° C, emplean este tampón en combinación con NaCl y glicerol. La elección del tampón MES pH 6,5 para la purificación de 6xHis-NOC2 (1-771 aa) estuvo motivada por la necesidad de emplear en el proceso de purificación un pH significativamente por debajo del punto isoeléctrico teórico de esta construcción, a fin de poder llevar a cabo la cromatografía de intercambio catiónico (Figura 4.3). El punto isoeléctrico de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) es de 8,19 calculado mediante ProtParam (Gasteiger et al. 2005). En futuros experimentos se considerará el

empleo del tampón HEPES pH 7,5 para la purificación de esta proteína, así como el empleo de técnicas cromatográficas alternativas, como la cromatografía de exclusión molecular.

Las construcciones 6xHis-NOG1 y 6xHis-MAK5 (192-616 aa) también fueron sometidas al ensayo de termofluór a fin de determinar las condiciones óptimas que garanticen su estabilidad térmica. En el caso de 6xHis-MAK5 (192-616 aa), los resultados mostraron que esta construcción presenta una menor estabilidad térmica en comparación con las construcciones 6xHis-NOC2 (1-771 aa) y 6xHis-NOG1 (compárese Figura 4.11 con Figuras 4.10 y 4.12). La condición C5 (150 mM de NaCl, 100 mM de HEPES pH 7,5 y 5% (v/v) de glicerol), es la que más se asemeja a las condiciones empleadas para la purificación de 6xHis-MAK5 (192-616 aa) (50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol). En estas condiciones esta construcción es estable, mostrando una temperatura de fusión de 53,04 y 49,9 °C en ambas réplicas experimentales. Las condiciones C2, C3 y C4 muestran una estabilidad similar a la condición C5. Estos resultados nos permiten confirmar la estabilidad de 6xHis-MAK5 (192-616 aa) en tampón HEPES pH 7,5 empleado en las condiciones C2-C5 (véase Tabla 3.7).

La construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) muestra sin embargo una mayor estabilidad térmica en la condición B12, mientras que en las condiciones A8, B5, B6 y B9 esta construcción muestra menor estabilidad (Figura 4.11). La condición B12 se caracteriza por el empleo del tampón MMT (ácido málico, MES y Tris en proporción 1:2:2) a pH 9. Por otro lado, la condición B9 presenta la misma composición que la B12 con la excepción de que el pH es de 6,5 en vez de 9 (véase Tabla 3.7). El punto isoeléctrico teórico de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) es de 8,82, calculado mediante ProtParam (Expasy) (Gasteiger et al. 2005). Estos resultados podrían indicar que esta construcción es más estable a un pH cercano a su punto isoeléctrico. Se considerará el uso de estas condiciones en futuros experimentos realizados con esta construcción.

En comparación con la forma completa de MAK5 (construcción GST-MAK5), la forma truncada 6xHis-MAK5 (192-616 aa) muestra una menor estabilidad global en el experimento de termofluór (compárese Figura 4.11 y Anexo 5). Sin embargo, la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) se muestra más estable que GST-MAK5 en determinadas condiciones (A4, A5, B10, B12 y C4; ver Anexo 7), lo cual podría favorecer la formación de cristales al emplear dichas condiciones en los cribados de cristalización (ver más abajo). En la condición C5 (150 mM de NaCl, 100 mM de HEPES pH 7,5 y 5% (v/v) de glicerol), que es la que más se asemeja a las condiciones de purificación empleadas con ambas construcciones, ambas presentan una buena estabilidad térmica, con valores de temperatura de fusión de 53,04/49,9 °C para 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y de 51,73/51,69 °C para GST-MAK5. En conjunto se puede concluir que la delección de regiones específicas en los extremos amino y carboxi-terminal de MAK5 no favorece la estabilidad de esta proteína de manera global, aunque sí podría favorecerla en determinadas condiciones experimentales.

Por último, la construcción 6xHis-NOG1 muestra una estabilidad térmica similar en las distintas condiciones experimentales empleadas en el ensayo (Figura 4.12). La condición A9 (150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8) es la que más se asemeja a las condiciones de purificación de la construcción 6xHis-NOG1 empleadas en este trabajo (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol). En esta condición 6xHis-NOG1 muestra una buena estabilidad térmica (Figura 4.12) con una temperatura de fusión de 46,16 y 45,34°C en las dos réplicas experimentales respectivamente. Se demuestra así la estabilidad de la construcción 6xHis-NOG1 en las condiciones empleadas para su purificación. Por otro lado, en las condiciones A1 y C8 la construcción 6xHis-NOG1 muestra una menor estabilidad térmica con respecto a la condición A9. Estos resultados

podrían deberse al uso de MgCl₂ (condición C8) y al empleo de un pH demasiado ácido (condición A1).

Los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 no han sido resueltos estructuralmente en *Chaetomium thermophilum*, si bien en el caso de NOG1 existen estructuras resueltas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens* (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020). Ante esta falta de datos estructurales, llevamos a cabo una serie de ensayos de cristalización empleando diferentes cribados comerciales (véase Tablas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4).

En el caso de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) se empleó el tampón MMT a pH 9 (que favorece la estabilidad térmica de esta proteína, véase Figura 4.11) en el cribado PACT. El tampón HEPES pH 7,5 (utilizado para la purificación de 6xHis-MAK5 (192-616 aa)) es empleado asiduamente en todos los cribados realizados con esta construcción (JBS I y II, Cs I y II, MIDAS, PACT, Wizard I y II).

Las condiciones A4 (150 mM NaCl, 100 mM cacodilato pH 6,5), A5 (150 mM NaCl, 100 mM MES pH 6,5), C4 (100 mM HEPES pH 7,5; 500 mM NaCl) y B10/B12 (150 mM NaCl, tampón MMT pH 7,5/9) favorecen la estabilidad de 6xHis-MAK5 (192-616 aa) con respecto a GST-MAK5 (véase Anexo 7). Estas condiciones están incluidas en los distintos cribados de cristalización empleados con la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) (cribado PACT en el caso de B10/B12; cribados JBS I, JBS II, Cs I y II y JCSG+ en el caso de A5; cribados JBS I y II, Cs I y II, MIDAS, PACT, Wizard I y II en el caso de C4; cribados Cs I y II, y Wizard I y II en el caso de A4).

En el caso de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) los resultados del experimento de termofluór muestran que esta proteína es estable en tampón HEPES pH 7,5 (Figura 4.10). Este tampón se utiliza ampliamente en los distintos cribados de cristalización realizados con esta construcción, así como con su forma no truncada 6xHis-NOC2. Por otro lado, el tampón MES a pH 6,5; utilizado en este trabajo para la purificación de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) es utilizado en los cribados comerciales JBS I, JBS II, Cs I y II y JCSG+. Los cribados PACT, MIDAS y Wizard I y II emplean a su vez el tampón MES pH 6. En cuanto a la construcción 6xHis-NOG1, el tampón Tris a pH 8 (empleado para la purificación de 6xHis-NOG1 en este trabajo) es utilizado en los cribados comerciales MIDAS y PACT; mientras que los cribados JBS I y II, Cs I y II, Index y Wizard I y II utilizan el tampón Tris a pH 8,5. Se puede concluir, por tanto, que las condiciones experimentales que favorecen la estabilidad de las distintas construcciones empleadas en este trabajo se incluyen en los distintos cribados de cristalización utilizados.

Por desgracia, estos cribados de cristalización no arrojaron resultados satisfactorios, no pudiéndose obtener cristales de ninguna de las construcciones de interés. Una explicación a este resultado podría ser la necesidad de aumentar la concentración de las distintas construcciones empleadas en los cribados de cristalización. En este sentido, cabe señalar algunas conclusiones relativas al porcentaje de precipitados observado en los distintos cribados de cristalización realizados. La aparición de precipitados se corresponde con el estadio final del proceso de supersaturación, cuando la proteína está demasiado concentrada para formar cristales, mientras que las condiciones correspondientes a la región lábil menos concentrada favorecen la nucleación (formación de cristales) (Luft, Wolfley, and Snell 2011). Por esta razón, en este trabajo consideramos un indicio favorable la aparición de precipitados en aproximadamente un 50% de las condiciones de cristalización correspondientes a un determinado cribado.

En el caso de la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa), al emplear los cribados PACT, Wizard I y II y JCSG+ se observa la aparición de precipitados en un porcentaje superior al 30% de condiciones

experimentales. Este porcentaje sube al 50% en el caso del cribado PACT. En cambio, al emplear los cribados JBS I y II y MIDAS no se observan precipitados. Empleando el cribado Cs I y II se observa una baja cantidad de precipitados (17%).

En el caso de la construcción 6xHis-NOG1 observamos la aparición de un 50% de precipitados al emplear los cribados de cristalización MIDAS y JBS I, empleando en ambos casos la proteína de interés a una concentración de 19,3 mg/ml. En el caso de la construcción 6xHis-NOC2 (1-771 aa) se observó la aparición de un 50% de precipitados en los cribados JBS II (25 mg/ml), JBS I (25 y 31,9 mg/ml), Cs I y II (25 mg/ml) e Index (25 mg/ml). Por último, en el caso de la construcción 6xHis-NOC2 solamente en el cribado JBS II empleando una concentración de 34,18 mg/ml de proteína observamos un porcentaje alto de precipitados (74%). En el resto de cribados realizados con esta construcción no se observan precipitados o se observa un porcentaje bajo de precipitados (inferior al 50% de condiciones experimentales). En su conjunto, estos resultados sugieren la necesidad de realizar nuevos ensayos de cristalización empleando mayores concentraciones de las construcciones de interés. En el caso de la construcción 6xHis-NOG1, la información estructural disponible en otros organismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*) se deriva de experimentos de criomicroscopía electrónica que permitieron resolver la estructura tridimensional de ésta proteína en el contexto pre-ribosómico (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020). Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado la resolución estructural de esta proteína fuera del pre-ribosoma. Resulta por tanto relevante determinar la estructura que presenta este factor de ensamblaje en su forma aislada, a fin de comprobar la presencia de posibles cambios con respecto a la estructura que presenta en el contexto pre-ribosómico.

Actualmente estamos trabajando en la realización de cribados de cristalización empleando mayores concentraciones de las distintas construcciones de interés. Paralelamente, nos planteamos la búsqueda de ligandos alternativos para los factores de ensamblaje NOG1, eIF6, HAS1 y CIC1, a fin de intentar la cristalización de los complejos correspondientes. También nos planteamos la posibilidad de utilizar técnicas alternativas tales como SAXS (Small Ange X-ray Scattering) o criomicroscopía electrónica para la resolución estructural de las proteínas de interés. La primera técnica permite obtener envolturas de baja resolución de complejos multiproteicos y proteínas aisladas en solución, siendo especialmente útil para monitorizar cambios en el estado de oligomerización de un complejo o para el estudio de estructuras con variabilidad conformacional (Tuukkanen, Spilotros, y Svergun 2017). La segunda técnica resulta especialmente útil para la cristalización de grandes complejos pre-ribosómicos (Wu et al. 2016) (Kater et al. 2017) (Sanghai et al. 2018) (Pöll et al. 2021), pero su utilidad es menor para el presente caso, que requiere la resolución estructural de proteínas aisladas.

5.1.2 Análisis de las posibles interacciones establecidas entre los factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 de *Chaetomium thermophilum*.

Una vez evaluada la funcionalidad de las proteínas de interés, nuestro siguiente paso consistió en evaluar las posibles interacciones establecidas entre ellas. Para ello llevamos a cabo un experimento *in vitro* empleando la técnica de interferometría de biocapas (BLI). Mediante esta técnica no pudimos observar interacciones entre estas tres proteínas en nuestras condiciones experimentales (Figura 4.13). Nuestros resultados, por tanto, no se corresponden con los datos disponibles en relación al comportamiento de estas proteínas en levaduras (Saveanu et al. 2003) (Ohmayer et al. 2013) (Ohmayer et al. 2015) (Brüning et al. 2018) (Zisser et al. 2018).

Existen diferentes explicaciones posibles para esta divergencia. La primera de ellas implicaría que los tres factores de ensamblaje NOC2, NOG1 y MAK5 de *Chaetomium thermophilum* no interaccionan directamente. Los resultados obtenidos en levaduras que avalan la interacción entre estas tres proteínas han sido obtenidos mediante el método de purificación en tándem (TAP TAG). Este método constituye una herramienta muy útil para la identificación de interacciones proteína-proteína, lo cual ha permitido llevar a cabo estudios masivos empleando el genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* (Gavin et al. 2002) (Gavin et al. 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante esta técnica no permiten inferir que dos proteínas estén interaccionando directamente.

Esta técnica se basa en la purificación de complejos formados por diversas proteínas que se unen a una proteína de interés marcada con una secuencia TAP (Puig et al. 2001), pero no analiza en detalle las interacciones que se establecen entre cada una de las proteínas co-purificadas y la proteína de interés. Dicha interacción puede estar mediada por otras proteínas o, en el contexto del pre-ribosoma, por el ARN ribosómico (Caillet et al. 2019). En el caso de los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5, la observada ausencia de interacción *in vitro* en nuestras condiciones experimentales puede explicarse asumiendo que las tres proteínas sólo interaccionan en el contexto del pre-ribosoma. En dicho contexto su interacción podría ser indirecta, estando mediada por otras proteínas o factores de ensamblaje ribosómicos, o bien por el ARN ribosómico. En este sentido está descrita la capacidad de MAK5 de levaduras de interaccionar *in vivo* con el ARN ribosómico, concretamente con el dominio II del ARNr 25S (Brüning et al. 2018). Por otro lado, NOG1 en el contexto del pre-ribosoma de levaduras ejerce una función esencial en la maduración del túnel de salida polipeptídico, lo que implica la reorganización espacial de la hélice 74 del ARN ribosómico 25S (Wilson et al. 2020). Mediante el análisis de estructuras pre-ribosómicas resueltas y depositadas en el PDB empleando el programa PDBe PISA (Krissinel y Henrick 2007) hemos determinado la capacidad de NOG1 de levaduras y humanos de interaccionar con los ARNr 25S y 5,8S en el contexto del pre-ribosoma (Tabla 5.1).

MAK5 es un factor de ensamblaje nucleolar (Zagulski et al. 2003) (Zisser et al. 2018), mientras que NOC2 fue inicialmente descrito como un factor de ensamblaje presente en el nucléolo y el nucleoplasma (Milkereit et al. 2001). Sin embargo, en posteriores trabajos NOC2 es considerado un factor de ensamblaje nucleolar (Zisser et al. 2018) al que se relaciona con las primeras etapas de procesamiento co-transcripcional del pre-ARNr (Khoshnevis et al. 2019). Por su parte, NOG1 se distribuye entre el nucléolo, el nucleoplasma y el citoplasma, siendo uno de los factores de ensamblaje que se exportan al citoplasma junto con la partícula pre-60S y posteriormente es reciclado al núcleo (Zisser et al. 2018) (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). Está documentado que NOC2 y MAK5 co-purifican con NOG1-TAP en experimentos de purificación en tándem (Saveanu et al. 2003), mientras que MAK5 co-purifica en experimentos de purificación en tándem que emplean NOC2 como cebo (Zisser et al. 2018). Se sugiere así que estos tres factores de ensamblaje podrían coincidir formando parte de los mismos intermediarios de la partícula 60S durante su maduración inicial en el nucléolo, aunque posiblemente no establezcan entre sí interacciones directas.

Otra posibilidad sería que estos tres factores de ensamblaje presenten una conformación estructural distinta fuera y dentro del pre-ribosoma. Esta diferencia conformacional les permitiría establecer las interacciones correspondientes en la partícula pre-60S que, sin embargo, no podrían ser reproducidas al utilizar las proteínas aisladas en un experimento *in vitro* como el que hemos realizado en este trabajo (Figura 4.13). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que en humanos NOG1 presenta una extensa región carboxi-terminal desplegada (véase Figura 4.14). Esta región desplegada también se observa en la forma homóloga de este factor de ensamblaje en levaduras (Wu et al. 2016). Se ha

postulado que esta región flexible experimenta cambios conformacionales durante la maduración de la subunidad 60S, concretamente insertándose y posteriormente escindiéndose del túnel de salida polipeptídico (Klingauf-Nerurkar et al. 2020). Se ha estipulado que el extremo carboxi-terminal de NOG1 juega un papel esencial en la maduración del túnel de salida polipeptídico en levaduras (Wilson et al. 2020). Las estructuras tridimensionales de NOG1 de que se dispone en la actualidad han sido obtenidas mediante experimentos de crio-microscopía electrónica empleando la partícula pre-60S de levaduras y humanos en sus distintas etapas de maduración (Leidig et al. 2014) (Wu et al. 2016) (Kater et al. 2017) (Liang et al. 2020) (Pöll et al. 2021). En estas estructuras el extremo carboxi-terminal de NOG1 de levaduras y de su forma homóloga GTPBP4 en *Homo sapiens* aparece en una conformación extendida estableciendo interacciones con diversos factores de ensamblaje y proteínas ribosómicas (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020). La Tabla 4.1 ofrece un resumen de las interacciones que establece NOG1 y su forma humana homóloga GTPBP4 con otros factores de ensamblaje ribosómicos en el contexto de la partícula pre-60S. Además, NOG1 interactúa con las proteínas ribosómicas uL3, uL4, uL22, eL19 y eL22 en levaduras (Wu et al. 2016). En *Homo sapiens* se han identificado interacciones entre GTPBP4 y las proteínas ribosómicas eL3, uL4, uL22, eL19, eL22, eL31, eL37 y eL39 (Liang et al. 2020).

Actualmente no se dispone de información acerca de la estructura que presenta esta proteína fuera del pre-ribosoma. Es posible por tanto que este factor de ensamblaje, y en particular su región carboxi-terminal, adopte una conformación distinta dentro y fuera del pre-ribosoma, condicionando con ello su posibilidad de interactuar con otros factores de ensamblaje.

Por último, es posible que la interacción entre los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 requiera la presencia de determinadas modificaciones post-traduccionales que no son introducidas por *Escherichia coli*, el organismo usado en este trabajo para la expresión heteróloga de las construcciones de interés. A pesar de sus múltiples ventajas como organismo de expresión heteróloga, una de las desventajas derivadas del uso *Escherichia coli* es que carece de muchos de los sistemas de modificación post-traduccionales propios de organismos eucariotas (Sahdev, Khattar, y Saini 2008) (McElwain et al. 2022). En contraposición a esto, ciertos estudios establecen que *Escherichia coli* puede llevar a cabo la fosforilación de proteínas heterólogas en residuos específicos (Yang y Liu 2004) (Mijakovic 2006).

No existe información relativa a la presencia de modificaciones post-traduccionales en las proteínas NOC2, NOG1 y MAK5 de *Chaetomium thermophilum*. Sin embargo, estos tres factores de ensamblaje poseen diversos sitios de fosforilación documentados en sus formas homólogas de *Saccharomyces cerevisiae*. Concretamente, NOG1 de levaduras presenta tres sitios de fosforilación en Ser 350 (Gnad et al. 2009), Tyr 558 (Holt et al. 2009) y Ser 563 (Holt et al. 2009). Por su parte, la proteína NOC2 de levaduras presenta sitios de fosforilación en residuos de Ser en posición 70, 149, 160, 166, 698 y 708 (Gnad et al. 2009) (Holt et al. 2009), así como en Ser 695 (Helbig et al. 2010).

Por último, MAK5 en levaduras presenta sitios de fosforilación en Ser 95 (Albuquerque et al. 2008), Thr 135 (Holt et al. 2009), Ser 138 (Holt et al. 2009), Ser 436 (Helbig et al. 2010), Ser 575 (Albuquerque et al. 2008), Ser 678 (Albuquerque et al. 2008), Ser 686 (Helbig et al. 2010) y Ser 688 (Albuquerque et al. 2008).

Toda esta información relativa a la modificación post-traduccionales de NOG1, NOC2 y MAK5 procede de estudios de análisis masivo del fosfoproteoma de levaduras basados en el uso de espectrometría de masas. Sin embargo, ninguna de estas modificaciones post-traduccionales ha sido

hasta ahora estudiada en el contexto de la maduración del ribosoma y se desconoce, por tanto, si resultan necesarias para garantizar el correcto funcionamiento de estos tres factores de ensamblaje en el proceso de biogénesis ribosomal. En vista de esta posibilidad, se podría abordar en el futuro la producción de estas tres proteínas usando células de mamífero, capaces de introducir diversas modificaciones post-traduccionales (Wurm 2004) (Walsh 2010) y analizar de nuevo su capacidad de interacción. En caso de observar interacciones entre las proteínas obtenidas de este modo, se podría considerar la posibilidad de que la introducción de modificaciones post-traduccionales en estos tres factores de ensamblaje esté implicada en su capacidad para interactuar entre sí. Surgiría así la necesidad de determinar cuáles son las modificaciones necesarias para el establecimiento de interacciones entre estas tres proteínas.

Por último, hay que tener en cuenta la posible implicación del denominado proceso de *crowding* o saturación molecular en la interacción entre los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 en el contexto intracelular. El citoplasma, núcleo y orgánulos tanto de células procariontas como eucariotas se caracteriza por presentar una elevada concentración de macromoléculas (proteínas, polisacáridos, ADN, ARN, complejos multiproteicos y ribonucleoproteicos). Se calcula que el núcleo de células eucariotas contiene una concentración total de 100-400 mg/ml de biomoléculas, mientras que en el interior de los orgánulos nucleares esta concentración se estima en 100-200 mg/ml (Nakano, Miyoshi, y Sugimoto 2014).

Esta situación modifica drásticamente el comportamiento de las proteínas individuales, afectando a su estructura, plegamiento, estabilidad conformacional, actividad enzimática, y también a su capacidad de establecer interacciones con otras proteínas presentes en el medio intracelular. Concretamente, se ha observado que la presencia de una elevada concentración de moléculas en el medio intracelular actúa favoreciendo diversas interacciones entre proteínas individuales o complejos macromoleculares (Kuznetsova, Turoverov, y Uversky 2014). Concretamente se ha descrito que esta elevada concentración de biomoléculas actúa favoreciendo la interacción entre las subunidades 30S y 50S para formar el ribosoma completo 70S en *Escherichia coli* (Zimmerman y Trach 1988). De manera similar, la saturación molecular es responsable de la formación de una gran variedad de orgánulos no membranosos tanto en el citoplasma como en el nucleoplasma (Shav-Tal et al. 2005) (Kuznetsova et al. 2014). Sería posible, por tanto, que la saturación molecular característica del medio intranuclear favorezca la interacción entre los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 en el contexto de la formación del pre-ribosoma. Estas interacciones, sin embargo, no podrían ser reproducidas en un experimento *in vitro* como el que se ha realizado en este trabajo, en el que la concentración de biomoléculas en el medio es mucho menor.

Una posible manera de modelar las condiciones de saturación molecular que se dan en el medio intracelular es mediante la adición al medio experimental de agentes inertes de saturación tales como polietilenglicol (PEG), dextrano, Ficoll o proteínas inertes (Kuznetsova et al. 2014). Podría considerarse en el futuro emplear esta estrategia para comprobar la posibilidad de que la interacción entre los factores de ensamblaje ctNOC2, ctNOG1 y ctMAK5 sea dependiente del proceso de saturación molecular.

5.2 Selección y evaluación de otras interacciones binarias entre factores de ensamblaje ribosómicos que constituyan potenciales dianas terapéuticas.

Tal y como se ha descrito en el apartado 4.4 de la sección de Resultados, realizamos una búsqueda en el *Protein Data Bank* (PDB) que nos permitió seleccionar las interacciones establecidas entre los

factores de ensamblaje NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1 como potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de péptidos de interferencia. Según los datos publicados, estos factores de ensamblaje forman interacciones en el seno de la partícula pre-60S de levaduras (Wu et al. 2016) (Sanghai et al. 2018). En el caso de la interacción NOG1-eIF6, ésta también se ha observado en partículas pre-60S de *Homo sapiens* (Liang et al. 2020). Sin embargo, no hay disponible información acerca de si estas interacciones pueden establecerse fuera del pre-ribosoma.

Utilizando la información estructural disponible en el PDB diseñamos un péptido dirigido contra la interacción entre NOG1 y eIF6 en células humanas (péptido TAT-NOG1 (351-412 aa)). Utilizamos la secuencia TAT, derivada del virus de la inmunodeficiencia humana (Chauhan et al. 2007) a fin de dotar a este péptido de penetrabilidad celular. Evaluamos *in vitro* la actividad citotóxica de este péptido sobre un cultivo de células humanas tumorales derivadas de carcinoma de colon (línea celular HCT116 p53+/+) (Figura 4.17). Los resultados mostraron que el péptido desarrollado no altera el crecimiento de esta línea celular en las condiciones experimentales empleadas.

Ante este resultado decidimos evaluar *in vitro* la capacidad de interacción de las proteínas implicadas (NOG1 y eIF6), así como de la otra pareja de proteínas seleccionada previamente (HAS1 y CIC1). Como paso previo llevamos a cabo la clonación, sobre-expresión y purificación de las formas homólogas de eIF6, CIC1 y HAS1 de *Chaetomium thermophilum* (proteínas ctEIF6, ctCIC1 y ctHAS1). Generamos así las construcciones 6xHis-eIF6, 6xHis-CIC1 y MBP-HAS1. Generamos asimismo una forma truncada correspondiente al dominio amino-terminal de ctHAS1 (6xHis-HAS1 (1-320 aa)) que, según la información estructural disponible en levaduras, se corresponde con la región de esta proteína que no está implicada en su interacción con ctCIC1 (Figura 4.19B). Mediante ensayos de actividad enzimática comprobamos la funcionalidad de ctHAS1 y su forma truncada ctHAS1 (1-320 aa) (Figura 4.22A, B). Comprobamos asimismo mediante la técnica de termofluór que las construcciones 6xHis-eIF6 y 6xHis-CIC1 presentan estabilidad térmica en las condiciones empleadas para su purificación (Figuras 4.24 y 4.25 respectivamente).

La condición C5 del ensayo de termofluór (100 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl, 5% glicerol) es la que más se asemeja a las condiciones experimentales empleadas para la purificación de ambas construcciones. En esta condición tanto 6xHis-CIC1 como 6xHis-eIF6 se muestran estables con temperaturas de fusión de 57,86/55,78°C en el caso de 6xHis-CIC1 y de 44,92/45,53°C en el caso de 6xHis-eIF6.

En el caso de la construcción 6xHis-eIF6 se observa que las condiciones experimentales B5 (150 mM NaCl, tampón succinato-fosfato-glicina pH 8) y B12 (150 mM NaCl, tampón MMT pH 9) presentan una temperatura de fusión superior a la condición C5, mientras que en el caso de 6xHis-CIC1 esto sucede con la condición B12 (150 mM NaCl, tampón MMT pH 9). Decidimos sin embargo mantener las condiciones experimentales inicialmente empleadas para la purificación de ambas construcciones puesto que empleando estas condiciones (50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl, 5% glicerol, 2 mM β -mercaptoetanol) ambas son solubles y presentan buenos rendimientos de purificación. En futuros experimentos podría considerarse el uso de estas condiciones alternativas en las que se observa una mayor estabilidad de cada construcción.

En el caso de la construcción 6xHis-CIC1 se observa que en las condiciones experimentales A8 (150 mM NaCl, 100 mM tampón fosfato pH 7,5), B9 (150 mM NaCl, 1x MMT pH 6,5) y C9 (150 mM NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5 y 1 mM CaCl_2) esta proteína es más inestable (presenta una menor temperatura de fusión) que en la condición C5. Esto podría deberse al uso de tampón fosfato (condición A8) y CaCl_2 (condición C9). En ninguna otra condición del cribado de termofluór (véase

Tabla 3.7) se emplean estos dos aditivos. En cuanto a la condición B9, su composición es idéntica a la condición B12 (en la que 6xHis-CIC1 muestra la máxima estabilidad) con la excepción de la diferencia de pH. Dado el elevado punto isoeléctrico de esta construcción (9,57 calculado mediante ProtParam (Gasteiger et al. 2005)), los resultados sugieren que un pH similar a su punto isoeléctrico favorece la estabilidad de esta proteína en presencia de tampón MMT. Esta situación también se ha observado con la construcción 6xHis-MAK5 (192-616 aa) (véase apartado 5.1.1).

Una conclusión interesante que puede extraerse de los ensayos de termofluor realizados en este trabajo (Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.24 y 4.25) es que la condición experimental B12 (150 mM NaCl, tampón MMT pH 9) favorece la estabilidad térmica de tres de las cinco construcciones empleadas (6xHis-MAK5 (192-616 aa), 6xHis-CIC1 y 6xHis-eIF6). En adelante se considerará el uso de estas condiciones para la purificación de estas tres construcciones.

El siguiente paso consistió en analizar la capacidad de las proteínas purificadas de interactuar *in vitro* empleando para ello dos técnicas complementarias (interferometría de biocapas y ensayos de precipitación). Sorprendentemente, los resultados nos indicaron que en las condiciones experimentales empleadas no se establece interacción entre las proteínas ctNOG1 y cteIF6 (Figuras 4.26B y 4.27A). En el caso de las proteínas ctHAS1 y ctCIC1, nuestros resultados sugieren la existencia de una interacción débil y transitoria entre estas dos proteínas (Figura 4.26A), que sin embargo no se reproduce en un ensayo de interferometría de bio-capas (Figura 4.27B). Esta posible interacción debe ser confirmada en futuros experimentos.

La falta de interacción observada en nuestras condiciones experimentales entre los factores de ensamblaje ctNOG1 y cteIF6 podría explicar los resultados negativos obtenidos en los experimentos realizados empleando el péptido de interferencia TAT-NOG1 (351-412 aa) sobre la línea celular HCT116 (Figura 4.17). La secuencia TAT ha sido utilizada con éxito para la internalización de proteínas de diversos tamaños (Fawell et al. 1994) (Vázquez et al. 2003) (Klein et al. 2004) (Ozaki et al. 2004). Recientemente, hemos utilizado con éxito esta secuencia para la internalización en células humanas de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción Bop1-WDR12 (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que el péptido TAT-NOG1 (351-412 aa) no haya penetrado correctamente en las células. Serán necesarios experimentos adicionales a fin de comprobar la capacidad de este péptido de atravesar las membranas plasmática y nuclear.

Los resultados obtenidos subrayan la diferencia existente entre el comportamiento que pueden presentar determinados factores de ensamblaje fuera y dentro del pre-ribosoma. El pre-ribosoma es el contexto en el que se producen las diversas interacciones entre factores de ensamblaje ribosómicos, reveladas gracias a los estudios de criomicroscopía electrónica (Wu et al. 2016) (Kater et al. 2017) (Sanghai et al. 2018) (Liang et al. 2020). Algunos factores de ensamblaje, como los que conforman el complejo PeBoW, son capaces de interactuar entre sí fuera del contexto del pre-ribosoma (Miles et al. 2005). En el caso de los factores de ensamblaje NOG1 y eIF6, la información disponible en la bibliografía establece que ambas proteínas interactúan en la partícula 60S inmadura tanto de levaduras como de células humanas (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020). Sin embargo, nuestros resultados experimentales empleando las proteínas homólogas de *Chaetomium thermophilum* sugieren que estos factores de ensamblaje no interactúan fuera del pre-ribosoma (Figuras 4.26 y 4.27).

Una posibilidad que explicaría nuestros resultados es que NOG1 presente una conformación distinta cuando está fuera del pre-ribosoma, tal y como se ha apuntado en el apartado 5.1.2. Más concretamente, es posible que la región carboxi-terminal de NOG1 no presente la conformación desplegada que muestra una vez que la proteína se une a la subunidad pre-60S en levaduras y células humanas (Wu et al. 2016) (Liang et al. 2020). En este sentido, se ha estipulado que también en el contexto de la subunidad pre-60S, la región carboxi terminal de NOG1 muestra cierta flexibilidad conformacional introduciéndose en el túnel de salida polipeptídico y luego escindiéndose del mismo (Klingauf-Nerurkar et al. 2020).

Por otra parte, el factor de ensamblaje Erb1, implicado en las etapas intermedias de biogénesis de la subunidad 60S, también presenta una amplia región amino-terminal desorganizada. En la partícula pre-60S, esta región se encuentra desplegada e interaccionando con diversos factores de ensamblaje (Kater et al. 2017). Erb1 forma un heterotrímero estable con los factores de ensamblaje Ytm1 y Nop7 (complejo PeBoW). Este heterotrímero puede formarse tanto dentro como fuera del pre-ribosoma (véase apartado 1.1.4.2.2 de la Introducción). Estudios recientes en nuestro laboratorio han permitido determinar que la región amino-terminal desorganizada de Erb1 adopta una conformación distinta cuando el heterotrímero está fuera del pre-ribosoma. En esta situación dicha región pierde su conformación extendida, aunque no pierde su capacidad de interacción con Nop7 (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). Es posible, por tanto, que de manera análoga a lo que sucede con la región amino-terminal de Erb1, la región carboxi-terminal de NOG1 presente una conformación distinta dentro y fuera de la subunidad pre-60S, condicionando con ello su capacidad de interacción con eIF6. Esta explicación basada en la variabilidad conformacional de las proteínas de interés también podría aplicarse a la interacción entre los factores de ensamblaje HAS1 y CIC1. La interacción entre ambos factores de ensamblaje está documentada en el contexto del pre-ribosoma de levaduras (Sanghai et al. 2018), pero no se dispone de datos experimentales obtenidos partiendo de las proteínas aisladas.

Otra posibilidad sería que en el contexto del pre-ribosoma el ARN ribosómico actúe como intermediario en las interacciones HAS1-CIC1 y NOG1-eIF6, de modo que estas no puedan reproducirse en ausencia de ARN ribosómico. Está descrita en la literatura la interacción *in vivo* de CIC1 de levaduras con la región ITS2 del pre-ARNr (Granneman, Petfalski, y Tollervey 2011), mientras que HAS1 de levaduras interacciona *in vivo* con los ARNr 18S y 25S (Brüning et al. 2018). Por último, está descrito que NOG1 en levaduras juega un papel clave en la remodelación del túnel de salida polipeptídico, para lo cual debe modular la conformación de la hélice 74 localizada en el ARNr 25S (Wilson et al. 2020).

Estos datos bibliográficos fueron confirmados empleando el servidor PDBe PISA (Krissinel y Henrick 2007) a partir de la información estructural depositada en el PDB que se corresponde con la subunidad pre-60S de levaduras en sus estadios de maduración nucleoplásmico (3JCT) (Wu et al. 2016) y nucleolar (6C0F) (Sanghai et al. 2018), así como con la partícula pre-60S de *Homo sapiens* en el momento previo a su exportación al citoplasma (6LU8) (Liang et al. 2020). La Tabla 5.1 muestra un resumen de las distintas interacciones establecidas entre NOG1/GTPBP4, eIF6, CIC1 y HAS1 y las distintas especies de ARN ribosómico.

Tabla 5.1: Análisis de las interacciones establecidas entre los factores de ensamblaje NOG1/GTPBP4, eIF6, HAS1 y CIC1 y diferentes especies de ARNr.

Proteína	ARNr	PDB ID	Superficie de interacción (Å)	Organismo	Referencia
NOG1	25S	3JCT	6620,3	Levaduras	Wu et al. 2016
NOG1	5,8S	3JCT	201,5	Levaduras	Wu et al. 2016
CIC1	ITS2	3JCT	2682,4	Levaduras	Wu et al. 2016
eIF6	25S	3JCT	276,5	Levaduras	Wu et al. 2016
GTPBP4	28S	6LU8	5268,7	Humanos	Liang et al. 2020
GTPBP4	5,8S	6LU8	240,3	Humanos	Liang et al. 2021
eIF6	28S	6LU8	171,5	Humanos	Liang et al. 2022
CIC1	ITS2	6C0F	2675,8	Levaduras	Sanghai et al. 2018
HAS1	35S	6C0F	646,6	Levaduras	Sanghai et al. 2018
HAS1	ITS2	6C0F	60	Levaduras	Sanghai et al. 2018
eIF6	35S	6C0F	174,8	Levaduras	Sanghai et al. 2018

Se utilizó el servidor PDBe PISA (Krissinel y Henrick 2007) para cuantificar las interacciones proteína: ARN de interés utilizando la información estructural depositada en el PDB relativa a distintos estadios madurativos de la subunidad 60S en *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*.

Utilizando la información estructural obtenida por Wu S et al. y por Liang X et al. determinamos que el factor de ensamblaje NOG1 establece interacciones con los ARNr 25S y 5,8S; mientras que eIF6 interacciona con el ARNr 25S tanto en levaduras como en *Homo sapiens*. Por otro lado, CIC1 en levaduras interacciona con la región ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) situada entre las especies de ARNr 5,8S y 25S. Este resultado está de acuerdo con la información disponible en la literatura (Granneman et al. 2011). Por último, HAS1 de levaduras interacciona con el ARNr 35S y más concretamente con la región ITS2 en la partícula pre-60S nucleolar (Tabla 5.1). En conjunto, estos datos constituyen un indicio de que las interacciones NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1 podrían estar mediadas por las distintas especies de ARNr en el contexto pre-ribosómico. En el caso de la interacción HAS1-CIC1, esta posibilidad se ve reforzada por nuestros resultados experimentales, que muestran la capacidad de CIC1 de *Chaetomium thermophilum* de interaccionar de modo inespecífico con ARN total aislado de *Escherichia coli*, así como con ácido poliuridílico (Figura 4. 23B).

Otra posible explicación para la falta de interacción observada entre las proteínas ctNOG1 y ctEIF6 y entre ctHAS1 y ctCIC1 es que las condiciones experimentales empleadas no sean las adecuadas para observar la interacción entre ambas parejas de proteínas. En este sentido, cabría pensar en la posibilidad de usar técnicas alternativas tales como la microcalorimetría (Falconer, Schuur, y Mittermaier 2021). No se puede excluir tampoco la posibilidad de que ctNOG1 y/o ctEIF6, así como ctHAS1 y/o ctCIC1 presenten modificaciones post-traduccionales que resulten esenciales para su interacción y que no sean introducidas por *Escherichia coli*. Como ya se ha mencionado (apartado 5.1.2), *Escherichia coli* carece de la maquinaria necesaria para introducir modificaciones post-traduccionales en las proteínas que produce (Sahdev, Khattar, y Saini 2008) (McElwain et al. 2022), aunque estudios recientes apuntan la posibilidad de que esta bacteria pueda llevar a cabo la fosforilación de residuos específicos de una proteína heteróloga (Yang y Liu 2004) .

En el apartado 5.1.2 se enumeran las modificaciones post-traduccionales conocidas que presenta NOG1 en levaduras. El factor de ensamblaje eIF6 de *Saccharomyces cerevisiae* presenta dos sitios de fosforilación situados en Ser174 y Ser175, que son responsables de la capacidad de esta proteína de ser exportada al citoplasma (Ray et al. 2008). Aparte de ello eIF6 de levaduras presenta sitios de fosforilación adicionales en Ser 231 (Albuquerque et al. 2008) (Holt et al. 2009) y Ser 233 (Albuquerque et al. 2008). El factor de ensamblaje CIC1 de levaduras presenta sitios de fosforilación en Ser 5, Ser 7, Ser 10, Thr 11, Ser 14 (Smolka et al. 2007), Thr 15, Ser 17 (Gnad et al. 2009), Ser 359 (Smolka et al. 2007), Ser 365 (Holt et al. 2009) y Ser 366 (Smolka et al. 2007) (Albuquerque et al. 2008). Por último, el factor de ensamblaje HAS1 de levaduras presenta fosforilaciones en Ser 12 (Holt et al. 2009), Ser 14 (Albuquerque et al. 2008) y Ser 427 (Gnad et al. 2009) (Helbig et al. 2010). El papel de estas modificaciones post-traduccionales no ha sido estudiado aún en el contexto de la biogénesis ribosómica y se desconoce, por tanto, la importancia que puedan tener para el correcto funcionamiento de los respectivos factores de ensamblaje en dicho proceso.

Por último, hay que tener en cuenta la posible implicación del fenómeno de *crowding* o saturación molecular en el establecimiento de las interacciones ctNOG1-cteIF6 y ctHAS1-ctCIC1. Tal y como se explica en el apartado 5.1.2, este fenómeno puede condicionar el establecimiento de interacciones proteína:proteína en el medio intracelular (Kuznetsova et al. 2014). Serán necesarios experimentos adicionales empleando distintos agentes de saturación a fin de comprobar esta posibilidad.

En conjunto, nuestros datos experimentales (Figuras 4.26 y 4.27) junto con la información estructural disponible en la literatura sugieren que los factores de ensamblaje NOG1/eIF6 y HAS1/CIC1 necesitan el contexto del pre-ribosoma para interactuar de manera estable. Esto nos lleva a descartar estas dos interacciones como dianas para el desarrollo de péptidos de interferencia, puesto que resulta difícil bloquear mediante esta estrategia interacciones que no se establezcan fuera del contexto pre-ribosómico. Una vez dentro del pre-ribosoma, cada factor de ensamblaje establece una red de interacciones con diversos elementos, entre los que se encuentran otros factores de ensamblaje, proteínas ribosómicas y regiones de ARN ribosómico. La red de interacciones establecidas por NOG1 y HAS1 es un ejemplo de ello (Tablas 4.5 y 5.1). Todas estas interacciones actúan de modo coordinado haciendo que sea muy difícil intervenir sobre todas ellas, o que la intervención sobre una de ellas implique la disociación de un factor de ensamblaje o la alteración de su funcionalidad. Además, las interacciones que se establecen entre factores de ensamblaje en el contexto del pre-ribosoma son de gran afinidad, por lo que resulta muy difícil desplazarlas mediante el uso de péptidos de interferencia cuya afinidad por las proteínas de interés será siempre más baja.

Un ejemplo de ello son los factores de ensamblaje Erb1 y Ytm1 que, junto con Nop7 forman el llamado complejo PeBoW (véase apartado 1.1.4.2.2 de la Introducción). Recientemente el grupo dirigido por el Dr. Bravo ha diseñado un conjunto de 6 péptidos dirigidos contra la interacción entre los factores de ensamblaje Erb1 y Ytm1 en *Chaetomium thermophilum*. Dichos péptidos se derivan de distintas secuencias de Erb1 o Ytm1 implicadas en la interacción establecida entre ambas proteínas (Orea-Ordóñez et al. 2021). En base a los resultados de este estudio dos de estos péptidos, derivados de la secuencia de Erb1, han sido seleccionados para su uso en experimentos *in vitro* empleando células tumorales humanas (véase apartado 4.7.1 de Resultados y apartado 5.3 de Discusión). Se ha observado que la interacción Erb1-Ytm1 en *Chaetomium thermophilum* presenta una afinidad mayor que la afinidad que presentan estos péptidos seleccionados por Ytm1 (péptidos P1 y P3, véase Figura 4.28) (Orea-Ordóñez et al. 2021). Por lo tanto, dichos péptidos no pueden ser utilizados para desplazar la interacción entre Erb1 y Ytm1 una vez que ésta ya ha sido establecida. Por el contrario, su utilidad consiste en evitar que dicha interacción llegue a formarse. Para ello resulta esencial el hecho de que la interacción Erb1-Ytm1 se establezca antes de que ambos factores de ensamblaje se

incorporen al pre-ribosoma (Miles et al. 2005) (Wegrecki et al. 2015). Las últimas referencias bibliográficas establecen que los factores de ensamblaje Erb1 y Ytm1 se asocian y se disocian de la subunidad pre-60S en forma de dímero pre-formado (Klinge y Woolford 2019). Los péptidos de interferencia desarrollados actuarían por tanto en el estadio extra-ribosómico, evitando la formación del dímero Erb1-Ytm1 (o el dímero formado por las proteínas homólogas Bop1 y WDR12 en células de mamífero) previamente a su incorporación al pre-ribosoma. Nuestra estrategia basada en el uso de péptidos de interferencia no resulta útil, por lo tanto, en el caso de interacciones entre factores de ensamblaje que sólo se formen en el contexto del pre-ribosoma. Tal podría ser el caso, según nuestros resultados experimentales (Figuras 4.26 y 4.27), de las interacciones NOG1-eIF6 y HAS1-CIC1, razón por la que hemos decidido descartarlas como posibles dianas terapéuticas.

5.3 Diseño y evaluación de péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Bop1 y WDR12 en células humanas.

Como se ha explicado en la Introducción (apartado 1.1.4.2.2), el complejo PeBoW es un heterotrímero estable formado por las proteínas Nop7, Erb1 y Ytm1 en levaduras y por sus homólogos Pes1, Bop1 y WDR12 en células de mamífero (Hölzel et al. 2005) (Miles et al. 2005). Este heterotrímero resulta esencial para la correcta maduración de la subunidad 60S, interviniendo en las etapas intermedias de su proceso de maduración (Pestov 2001) (Hölzel et al. 2005) (Miles et al. 2005) (Granneman et al. 2011) (Woolford y Baserga 2013).

Diversas razones hacen que el complejo PeBoW resulte una diana interesante para el desarrollo de péptidos de interferencia. En primer lugar y como se ha mencionado en el apartado anterior, este complejo puede formarse fuera del pre-ribosoma (Miles et al. 2005). El complejo PeBoW puede construirse *in vitro* partiendo de sus componentes aislados Nop7, Erb1 y Ytm1 procedentes de levaduras o *Chaetomium thermophilum* (Wegrecki, M (2015). Structural, biophysical and functional characterization of Nop7-Erb1-Ytm1 complex and its implications in eukaryotic ribosome biogenesis [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia) (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). El grupo de investigación liderado por el Dr. Bravo ha resuelto recientemente la estructura tridimensional del heterodímero formado por Ytm1 y el dominio carboxi-terminal de Erb1 usando *Chaetomium thermophilum* como organismo modelo (Wegrecki et al. 2015). En esta estructura ambas proteínas interactúan a través de sus respectivos dominios β -propeller. Recientes publicaciones establecen la importancia funcional de la interacción entre Erb1 y Ytm1 para garantizar la correcta maduración de la subunidad 60S ribosómica. La introducción de mutaciones puntuales en Erb1 o Ytm1 de levaduras que afectan a la formación de esta interacción se traduce en defectos de incorporación de ambos factores de ensamblaje a la subunidad pre-60S en formación, provocando defectos en su proceso de maduración y finalmente un déficit global de subunidades 60S en relación a las 40S que afecta a la formación del ribosoma completo (Miles et al. 2005) (Wegrecki et al. 2015).

Ante estas evidencias, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Jerónimo Bravo ha diseñado una serie de 6 péptidos de interferencia dirigidos contra la interacción entre Erb1 y Ytm1. Para su diseño se ha empleado la información estructural disponible en *Chaetomium thermophilum* (Orea-Ordóñez et al. 2021). Mediante ensayos *in vitro* empleando las proteínas Erb1 y Ytm1 de *Chaetomium thermophilum* se determinó la capacidad de cada péptido de prevenir la interacción entre ambas proteínas. En base al resultado de este experimento, se seleccionaron dos de estos péptidos

(denominados P1 y P3) para realizar ensayos en líneas celulares tumorales humanas (Figura 4.28) (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia). Estos dos péptidos son derivados de dos secuencias distintas de Erb1 de *Chaetomium thermophilum*, ambas implicadas en su interacción con Ytm1.

Para la realización de ensayos en células tumorales humanas decidimos utilizar la tecnología de los péptidos de penetración celular (denominados CPP por sus siglas en inglés: Cell Penetrating Peptide), que se caracterizan por ser capaces de atravesar las membranas celulares (Habault y Poyet 2019). Utilizamos para ello la secuencia TAT derivada del virus de la inmunodeficiencia humana (Chauhan et al. 2007). Para el diseño de los péptidos empleamos las secuencias equivalentes de Bop1 (la proteína homóloga de Erb1 en humanos) (Figura 4.29) a las que adicionamos la secuencia TAT en su extremo amino-terminal. Se generan así los péptidos P10hs y P11hs (homólogos de P1 y P3 respectivamente) dirigidos contra la interacción entre los factores de ensamblaje Bop1 y WDR12 (véase Tabla 4.2).

Los resultados preliminares avalaron la eficacia de los péptidos P10hs y P11hs, demostrando que son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de las células HCT116, una línea celular derivada de carcinoma colorrectal (Brattain et al. 1981). En el caso del péptido P10hs, sin embargo, se observó una pérdida de su eficacia a tiempos de incubación largos, que podría ser consecuencia de la degradación proteolítica del péptido (Figura 4.30D). Se comprobó, empleando células HCT116, que los péptidos P10hs y P11hs activan los mecanismos de apoptosis celular a través de la señalización mediada por caspasas. Se determinó experimentalmente que estos péptidos no provocan daño al ADN (genotoxicidad), marcando así una diferencia esencial respecto a los tratamientos de quimioterapia utilizados actualmente (van den Boogaard et al. 2022). Por último, se comprobó mediante experimentos de microscopía de fluorescencia que el péptido P10hs es capaz de atravesar las membranas celulares hasta llegar al nucléolo, donde tiene lugar la biogénesis ribosómica (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia).

5.3.1 Los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs causan citotoxicidad y muerte celular en células tumorales humanas.

Ante estos prometedores resultados, decidimos ampliar la investigación basada en estos péptidos de interferencia. Para ello empleamos el péptido P10hsD además de los ya mencionados péptidos P10hs y P11hs. Como se explica en el apartado 4.7.1 de Resultados, este péptido es una variante retro-inversa del péptido P10hs en el que la secuencia de interferencia está formada por D-aminoácidos en lugar de los L-aminoácidos naturales, y se ha invertido la orientación del esqueleto hidrocarbonado (véase Tabla 4.2). El objetivo es disminuir la susceptibilidad del péptido P10hs a ser degradado proteolíticamente. El péptido P10hsD constituye por tanto una segunda generación del péptido P10hs inicial. Un péptido retro-inverso se define como una variante de un péptido natural constituido por D-aminoácidos y con un orden de secuencia invertido. De esta manera, la disposición espacial de las cadenas laterales de los aminoácidos se mantiene invariable, pero se invierte la orientación de la cadena hidrocarbonada del péptido. Para que un péptido retro-inverso constituya una estrategia eficaz resulta esencial que su unión a la proteína-diana esté mediada principalmente por las cadenas laterales de los aminoácidos que lo forman, y no por el esqueleto hidrocarbonado. Los péptidos retro-inversos han ganado un creciente interés en los últimos años como estrategia terapéutica en diversas patologías

como procesos tumorales, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes. También se está explorando su uso como péptidos antimicrobianos con función antibiótica. Sus principales ventajas sobre los péptidos naturales son su mayor resistencia a la degradación proteolítica y menor inmunogenicidad. Además, en muchos casos los péptidos retro-inversos muestran una eficacia mejorada debido a su mayor penetrabilidad celular y mayor afinidad por la proteína-diana (Doti et al. 2021).

Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 4.30) mostraron que los tres péptidos P10hs, P10hsD y P11hs presentan carácter citotóxico dependiente de su concentración y el tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas) en las tres líneas celulares empleadas (HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/- y Saos2 p53 -/-). Sin embargo, estos péptidos no muestran una eficacia homogénea. El péptido P10hD muestra un mayor efecto citotóxico que el péptido P10hs. Concretamente, se observa que el péptido P10hsD a una concentración de 100 μ M provoca un efecto citotóxico equivalente al observado con el péptido P10hs a 150 μ M (Figura 4.30). Por otro lado, el péptido P11hs es el que muestra una menor eficacia. En algunas condiciones (en células HCT116 p53+/+ tratadas con P11hs a 400 μ M durante 24 horas y en células HCT116 p53-/- tratadas con P11hs a 400 μ M durante 24 y 72 horas) se da el caso de que el péptido TAT muestra una mayor citotoxicidad que el péptido P11hs (véase Figura 4.30 y Anexo 2). Este hecho demuestra la menor eficacia global del péptido P11hs con respecto a los péptidos P10hs y P10hsD. Este resultado coincide con los resultados preliminares obtenidos con los péptidos P10hs y P11hs en las células HCT116 p53+/+ (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia)

Un factor que podría contribuir a la menor eficacia del péptido P11hs con respecto al péptido P10hs/P10hsD en células humanas es el hecho de que los dos residuos del péptido P11hs que establecen interacciones electrostáticas con Ytm1 en *Chaetomium thermophilum* (Arg 784 y Glu 785) (Orea-Ordóñez et al. 2021) no están conservados Bop1. En la secuencia de Bop1 estos residuos se corresponden con Thr y Gln respectivamente (Figura 4.29). Por otro lado, el péptido P10hs/P10hsD en *Chaetomium thermophilum* establece interacciones electrostáticas con Ytm1 a través de los residuos Glu 481 y Arg 486. Estos dos residuos están conservados en la proteína Bop1 de *Homo sapiens*.

Por otro lado, el hecho de que el péptido P10hsD no presente menor capacidad citotóxica que el péptido P10hs sugiere que la interacción entre los péptidos P10hs/P10hsD y su proteína diana (Bop1) está mediada principalmente por las cadenas laterales de su secuencia de aminoácidos, sin participación significativa del esqueleto hidrocarbonado (con orientación invertida entre los dos péptidos). Esta hipótesis está de acuerdo con la información estructural disponible en *Chaetomium thermophilum* (Figura 4.28C) (Orea-Ordóñez et al. 2021). La mayor eficacia del péptido P10hD con respecto al péptido P10hs podría ser debida a su mayor resistencia frente a la degradación proteolítica. En este sentido, al tratar la línea celular HCT116 p53+/+ con el péptido P10hs a 150 μ M, observamos un descenso inicial de la viabilidad celular seguido de una recuperación de la viabilidad a partir de las 48 horas de tratamiento. En cambio, al utilizar el péptido P10hsD en las mismas condiciones, dicho aumento de viabilidad a partir de las 48 horas de tratamiento es considerablemente menor (Figura 4.30D). Estos resultados sugieren que el péptido P10hsD es más resistente a la degradación proteolítica que el péptido P10hs. Serán necesarios futuros experimentos para confirmar esta hipótesis.

Otra conclusión importante es que los tres péptidos actúan de manera independiente a la expresión de p53, es decir, son efectivos en la línea celular HCT116 tanto en presencia (p53+/+) como en ausencia (p53-/-) de expresión de este factor transcripcional, así como en la línea celular Saos2 p53-/- (Figura 4.30).

Estos sorprendentes resultados fueron corroborados mediante experimentos de activación de caspasas 3 y 7. Estas dos enzimas se encuentran en la confluencia de las vías intrínseca (mitocondrial) y extrínseca de activación de apoptosis celular, por lo que su activación es proporcional a la activación global del proceso de apoptosis (McArthur y Kile 2018). En estos experimentos se comprobó que los péptidos P10hs y P10hsD provocan la activación de las caspasas 3/7 en la línea celular Saos2 p53-/- (Figura 4.31). Asimismo, los péptidos P10hs y P11hs provocan la activación de las caspasas 3/7 en la línea celular HCT116 p53-/- (Figura 4.32A), mientras que el péptido P10hsD provoca activación de la caspasa 3 en células HCT116 p53+/+ (Figura 4.32B). Resultados previos ya han demostrado la capacidad de los péptidos P10hs y P11hs de activar la apoptosis celular mediada por caspasas en la línea celular HCT116 p53+/+ (Orea Ordóñez, L. (2022). Estructura y función del complejo PeBoW como modelo en el desarrollo de posibles herramientas terapéuticas [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia).

En conclusión, estos resultados demuestran que los tres péptidos (P10hs, P10hsD y P11hs) actúan en células tumorales disminuyendo la viabilidad celular y activando la maquinaria de apoptosis celular independientemente de la expresión de p53. En el caso de la línea celular Saos2 p53-/- tratada con el péptido P10hsD se obtiene un resultado contradictorio puesto que la activación de las caspasas 3/7 es mayor a 75 μ M que a 100 μ M (Figura 4.31B). Serán necesarias futuras investigaciones para profundizar en las causas de este resultado. Estos resultados son relevantes puesto que sugieren que los péptidos desarrollados, y en especial el péptido P10hsD por ser el más efectivo, podrían ser utilizados en tumores en los que la vía de señalización de p53 se encuentre inactiva.

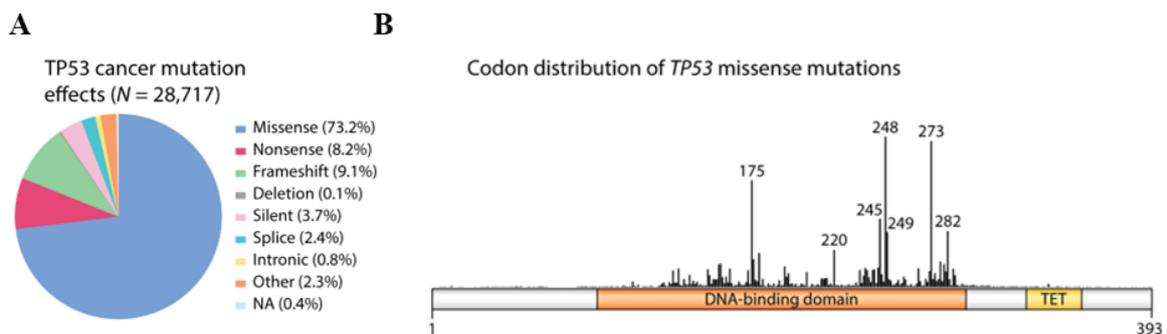


Figura 5.1: Mutaciones de diverso tipo afectan a la funcionalidad de p53 en el contexto de distintos tipos de tumores. A. Distribución de los distintos tipos de mutaciones somáticas de p53 asociadas a tumores según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (17 de noviembre de 2013 (<http://p53.iarc.fr/>)). **B.** Distribución relativa de mutaciones con cambio de sentido de acuerdo con la misma base de datos. Figura adaptada de Joerger y Fersht 2016.

Como se explica en el apartado 1.2.2.1 de la Introducción, p53 ejerce un papel esencial en la activación de la apoptosis celular en respuesta a diversos estímulos, entre los que se encuentra el estrés ribosómico (Bursac et al. 2014) (Turi et al. 2019).

La inactivación funcional de p53 es un problema recurrente en el tratamiento clínico de diversos tipos de tumores. Hasta la fecha se han identificado cientos de mutaciones que afectan a este regulador transcripcional provocando alteraciones en su funcionalidad. La inactivación funcional de p53 debida a mutaciones presenta distinta incidencia según el tipo de tumor: desde < 5% en el cáncer de cérvix hasta > 90% en el cáncer ovárico. La mayor parte de las mutaciones son de cambio de sentido, implicando la sustitución de un aminoácido, y afectan al dominio de unión al ADN (Figura 5.1) (Leroy, Anderson, y Soussi 2014) (Joerger y Fersht 2016). Dada la capital importancia que tiene p53 en el control del desarrollo tumoral, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas orientadas a recuperar la funcionalidad de p53 mutado o bien potenciar la funcionalidad de p53 en ausencia de mutaciones (Joerger y Fersht 2016). La inactivación de la cascada de señalización transcripcional regulada por p53 constituye un marcador pronóstico en diversos tipos de cáncer (Schaafsma et al. 2022). En este contexto, el desarrollo de fármacos antitumorales que actúen por vías independientes a p53 representa una clara ventaja clínica. Se han descrito mecanismos moleculares de apoptosis independientes a p53, tales como los mediados por p73 y p63 (Gressner et al. 2005) (Zhou et al. 2015). Estos mecanismos constituyen dianas terapéuticas alternativas en el desarrollo de fármacos antitumorales. Hasta la fecha se han desarrollado diversos fármacos de quimioterapia que actúan por mecanismos moleculares independientes a p53 (Park et al. 2017) (Abdelaal et al. 2022) (Kwon et al. 2022) (Takahashi, Shinomiya, y Nagahara 2022).

5.3.2 Posibles mecanismos alternativos de actuación de los péptidos P10hs y P10hsD.

Ante estos resultados inesperados, decidimos investigar las vías alternativas por las que podrían actuar los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs. Para ello analizamos el nivel de expresión de una serie de proteínas que actúan como mediadoras en los procesos de apoptosis celular y biogénesis ribosomal y que pueden constituir vías alternativas a la intervención de p53 en dichos procesos. p73 es una proteína perteneciente a la misma familia que p53. Las isoformas de p73 que contienen su dominio de transactivación (TAp73) comparten con p53 sus funciones onco-supresoras y pro-apoptóticas, mientras que las isoformas que carecen de dicho dominio (Δ Np73) actúan como antagonistas de p53 y TAp73 (Ramos et al. 2020). p21 es un inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas que actúa promoviendo la parada del ciclo celular y bloqueando la apoptosis. El gen codificante para p21 constituye una diana transcripcional tanto de p53 como de las isoformas TAp73 (Ćmielová y Řezáčová 2011) (Bursac et al. 2014) (Zhou et al. 2015) (Ramos et al. 2020).

cMyc es una oncoproteína que constituye uno de los promotores más conocidos de la biogénesis ribosómica. Esta proteína actúa en las primeras etapas de este proceso, promoviendo la actividad de las ARN Polimerasas I, II y III (van Riggelen et al. 2010). Ante la disrupción de la biogénesis ribosómica, las proteínas ribosómicas RPL5/uL18 y RPL11/uL5 actúa inhibiendo las funciones de cMyc en un mecanismo de retroalimentación negativa. Para ello actúan sobre la estabilidad del ARNm codificante para cMyc y, en el caso de RPL11/uL5, sobre la funcionalidad de la proteína traducida (Dai et al. 2010) (Bursac et al. 2014) (Liao et al. 2014). Por esta razón consideramos relevante determinar el nivel de expresión de cMyc como indicador general del estado de activación de la biogénesis ribosómica. Sería posible que al bloquear aguas abajo la biogénesis ribosómica mediante nuestros péptidos de interferencia se produjese la inactivación de cMyc por un mecanismo de retroalimentación negativa posiblemente mediado por las proteínas ribosómicas RPL5/uL18 y RPL11/uL5.

Esta situación, sin embargo, no se corresponde con nuestros resultados experimentales, que muestran que cMyc no experimenta un cambio significativo en su nivel de expresión tras el tratamiento de la línea celular HCT116 p53+/+ con el péptido P10hsD (Figura 4.33A) o de la línea celular Saos2 p53 -/- con el péptido P10hs (Figura 4.34B). Este resultado podría explicarse asumiendo que no existe una conexión funcional entre el punto de la biogénesis ribosómica en el que actúan los péptidos de interferencia (etapa intermedia de la biogénesis de la subunidad 60S) y la etapa en la que actúa cMyc (primeras etapas de la biogénesis ribosómica). También podría deberse a que se necesite una ventana temporal distinta para observar variaciones en el nivel de expresión de cMyc. En este trabajo comprobamos el nivel de expresión de cMyc (junto con p21 y p73) tras 48 horas de tratamiento (Figuras 4.33 y 4.34). En futuros experimentos podría emplearse una ventana temporal más corta (12 o 24 horas) a fin de detectar posibles cambios en el nivel de expresión de cMyc.

Los resultados obtenidos con la proteína p73 no nos permiten alcanzar conclusiones definitivas. Empleando un anticuerpo anti-p73 capaz de detectar las distintas isoformas de esta proteína, observamos la aparición de una multitud de bandas con un tamaño comprendido entre 68 y 41 KDa en células HCT116 p53+/+ tratadas con el péptido P10hsD (Figura 4.33B). Concretamente, observamos la aparición de una banda con un tamaño aproximado de 45 KDa en los tratamientos con P10hsD a 20 y 50 μ M, que no se observa en la condición de control (células sin tratamiento). Sin embargo, esta banda no se observa en células HCT116 p53+/+ tratadas con P10hsD a 100 μ M. Además, su tamaño no coincide con el tamaño esperado para p73, cuyas distintas isoformas se sitúan en torno a los 73 KDa. Este resultado no nos permite concluir que p73 esté implicado en el mecanismo molecular de actuación del péptido P10hsD. Nuestros resultados sugieren que el anticuerpo utilizado no resulta adecuado para la detección de las distintas isoformas que presenta esta proteína. Nos planteamos, por tanto, repetir este experimento empleando un anticuerpo anti-p73 más adecuado.

Por último, se observa que el tratamiento de las células HCT116 p53+/+ y p53-/- con concentraciones crecientes de péptido P10hsD implica una disminución en el nivel de expresión de p21 en nuestras condiciones experimentales (Figuras 4.33A y 4.34A). Este efecto se ve con mayor claridad en las células HCT116 p53-/- (Figura 4.34A). Una posible explicación a este resultado es el hecho de que p21, a pesar de ser una diana transcripcional de p53 y p73, es una proteína con funciones anti-apoptóticas que actúa en el citoplasma interaccionando con la pro-caspasa 3 y bloqueando su procesamiento para formar la caspasa 3 (Cazzalini et al. 2010) (Ćmielová y Řezáčová 2011). Según datos publicados en la literatura, la degradación de p21 tras el daño al ADN mediado por radiación UV se relaciona con la activación de la apoptosis celular mediada por las caspasas 3 y 9 (Suzuki et al. 2013). Asumiendo que p21 actúa como antagonista de la apoptosis celular mediada por caspasas, la observada disminución en la expresión de esta proteína tras el tratamiento de las células HCT116 p53 +/+ y p53 -/- con el péptido P10hsD (Figuras 4.33A y 4.34A) sería consistente con el resultado obtenido en el experimento de activación de la caspasa 3 empleando células HCT116 p53+/+ (Figura 4.32B). En este experimento se observa que el tratamiento con el péptido P10hsD provoca la activación (y consecuente desaparición) de la pro-caspasa 3. También sería consistente con la observada activación de los mecanismos de apoptosis mediados por caspasas 3/7 en células Saos2 p53-/- tratadas con el péptido P10hsD (Figura 4.31B).

En conjunto, nuestros resultados preliminares (Figuras 4.31B, 4.32B, 4.33A y 4.34A) sugieren que no existe un acoplamiento entre el bloqueo de la biogénesis ribosómica mediado por el péptido P10hsD y el bloqueo del ciclo celular mediado por p21. La observada disminución en la viabilidad celular tras el tratamiento con P10hsD (Figura 4.30) estaría, por tanto, principalmente mediada por la activación de los mecanismos de apoptosis celular (Figuras 4.31B y 4.32B) y no por la activación

de los mecanismos de bloqueo del ciclo celular mediados por p21. En futuros experimentos abordaremos el efecto ejercido por los péptidos P10hs y P11hs sobre la expresión de p21, a fin de comprobar si comparten el mecanismo de actuación del péptido P10hsD.

5.3.3 Los péptidos P10hsD y P11hs pueden actuar de modo combinado.

La combinación de los péptidos P10hsD y P11hs en el tratamiento de la línea celular HCT116 p53 +/- produce un efecto aditivo, es decir, el uso combinado de los dos péptidos provoca un descenso de la viabilidad celular que equivale aproximadamente a la suma del efecto observado al usar los dos péptidos por separado en las mismas condiciones experimentales (Figura 4.35). Puesto que ambos péptidos están dirigidos contra la misma diana (interacción Bop1-WDR12), no es esperable un comportamiento sinérgico entre ambos. Se concluye así que los péptidos P10hsD y P11hs son capaces de actuar de manera complementaria.

5.3.4 Los péptidos P10hsD y P11hs pueden actuar *in vitro* en combinación con oxaliplatino.

A pesar de sus innegables beneficios, los fármacos quimioterapéuticos usados actualmente en la práctica clínica presentan el inconveniente de generar numerosos efectos secundarios adversos, lo cual es principalmente debido a la genotoxicidad que provocan sobre las células sanas del organismo (Partridge et al. 2001) (van den Boogaard et al. 2022). Además, uno de los principales obstáculos a los que se enfrenta la quimioterapia actual es la generación de resistencias en los tumores (Ramos, Sadeghi, y Tabatabaeian 2021). Surge así la necesidad de buscar estrategias destinadas a eliminar o atenuar estos dos obstáculos manteniendo los beneficios que representa el uso de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer.

Una estrategia interesante para alcanzar estos objetivos consiste en el uso de otros compuestos que actúen como co-adyuvantes. Se trata de compuestos que actúan de manera sinérgica con un determinado fármaco de quimioterapia potenciando sus efectos antitumorales y atenuando sus efectos adversos. Esto permite disminuir la dosis de quimioterapia manteniendo su carácter citotóxico sobre las células cancerosas y disminuyendo tanto los efectos secundarios adversos como la aparición de resistencias. Se han descrito numerosos compuestos que pueden actuar como co-adyuvantes con distintos fármacos de quimioterapia para el tratamiento de diversos tipos de tumores. La mayoría de estos compuestos son derivados de productos naturales con especial énfasis en los productos derivados de plantas, conocidos como fitoquímicos.

Los compuestos fitoquímicos tanto naturales como sus derivados sintéticos son un campo de investigación emergente en el ámbito de la oncología (Choudhari et al. 2020). Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que estos compuestos pueden ser combinados con distintos fármacos quimioterapéuticos contribuyendo a potenciar sus efectos citotóxicos sobre las células tumorales y a disminuir sus efectos secundarios nocivos, así como la aparición de resistencias (Pinmai et al. 2008) (Knežević et al. 2011) (Singh et al. 2019).

Un ejemplo de ello son la curcumina y el resveratrol, dos polifenoles presentes naturalmente en la dieta con propiedades antioxidantes. Ambos presentan actividad anti-tumoral y limitada toxicidad sobre los tejidos sanos. Diversos estudios preclínicos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de ratón avalan su capacidad de actuar de manera sinérgica con diversos fármacos

quimioterapéuticos tales como el docetaxel, el paclitaxel, la doxorubicina, el cisplatino o el oxaliplatino. Ambos compuestos, curcumina y resveratrol han entrado en fase de ensayos clínicos (Patra et al. 2021).

Una vez que hemos comprobado la capacidad de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs de disminuir *in vitro* la viabilidad de células tumorales humanas (Figura 4.30), nos planteamos la posibilidad de usar estos péptidos en combinación con fármacos quimioterapéuticos usados actualmente en la clínica. Dado que la línea celular HCT116 utilizada en este estudio se deriva de cáncer colorrectal (Brattain et al. 1981), seleccionamos el fármaco de quimioterapia oxaliplatino para nuestro estudio. El oxaliplatino, un derivado de platino de tercera generación, es uno de los principales fármacos usados en el tratamiento clínico del cáncer colorrectal junto con el irinotecan y las fármacos pertenecientes al grupo de las fluoropirimidinas (5-fluorouracilo, capecitabine, leucovorin) (McQuade et al. 2017). Los primeros estudios realizados con el oxaliplatino estipularon que es un fármaco genotóxico, que actúa formando metalocomplejos con el ADN genómico (Faivre et al. 2003). Sin embargo, de manera sorprendente, las últimas investigaciones establecen que el principal mecanismo de acción del oxaliplatino es la inhibición de la biogénesis ribosómica, concretamente la inhibición de la actividad de la ARN Polimerasa I (Burger et al. 2010) (Bruno et al. 2017) (Sutton y DeRose 2021).

La eficacia clínica del oxaliplatino se ve menoscabada por la aparición de resistencias y efectos secundarios nocivos, entre los que destaca la neurotoxicidad (Kang et al. 2021). Una estrategia para superar estos obstáculos es el uso de co-adyuvantes que potencien la actividad citotóxica del oxaliplatino y mitiguen sus efectos secundarios adversos. Con este objetivo se han desarrollado diversas investigaciones en los últimos años que se han traducido en avances significativos en el desarrollo de nuevos tratamientos oncológicos.

La β -criptoxantina, un carotenoide presente en las frutas cítricas y otros alimentos actúa de manera sinérgica con el oxaliplatino potenciando sus efectos antitumorales tanto *in vitro* (utilizando la línea celular HCT116) como *in vivo* en un modelo de ratón de cáncer colorrectal. Significativamente, este efecto se observa tanto en la línea celular HCT116 silvestre como en su variante *knock out* para p53. El tratamiento combinado con β -criptoxantina y oxaliplatino permite disminuir la concentración de oxaliplatino necesaria para alcanzar el mismo efecto citotóxico, lo cual puede contribuir a limitar sus efectos secundarios adversos. Además, la β -criptoxantina podría contribuir a disminuir la genotoxicidad provocada por el oxaliplatino en células sanas. Estos efectos beneficiosos de la β -criptoxantina se relacionan con su capacidad de modular la expresión transcripcional de las diversas isoformas de p73 (San Millán et al. 2015).

De manera similar, la mahanina, un alcaloide vegetal extraído de *Murraya koenigii* y *Micromelum minsutum* posee actividad antiproliferativa en la línea celular HCT116 independientemente del estatus de p53. El uso combinado de mahanina y 5-fluorouracilo para el tratamiento la línea celular HCT116 en sus variantes p53+/+ y p53-/- muestra un efecto sinérgico que potencia los efectos del 5-FU. Al igual que la β -criptoxantina, la mahanina no presenta toxicidad sobre las células no tumorales (Das et al. 2014).

En base a estos antecedentes descritos en la bibliografía, decidimos comprobar si los péptidos de interferencia utilizados en este trabajo pueden usarse como co-adyuvantes del oxaliplatino en la línea celular HCT116.

Según datos publicados en la literatura (Boyer et al. 2004), la línea celular HCT116 p53+/+ es más sensible a la acción del oxaliplatino que la variante HCT116 p53-/. Esta mayor sensibilidad está

mediada por la activación de la vía de señalización p53-p21 (Toscano et al. 2007). En vista de esta información, realizamos un experimento de control en el que comprobamos que la línea celular HCT116 p53+/+ es más sensible a la acción del oxaliplatino que la variante HCT116 p53-/- en nuestras condiciones experimentales (Figura 4.36A). Por otro lado, comprobamos mediante western blot que en la línea celular HCT116 p53+/+ el oxaliplatino actúa provocando un incremento en la expresión tanto de p53 como de p21 mientras que en la línea celular HCT116 p53-/- no se observa expresión de ninguno de estos dos mediadores (Figura 4.36C). En la actualidad se considera que la vía p53-p21 constituye el principal mediador del efecto citotóxico del oxaliplatino y no se conoce con exactitud el mecanismo de acción del oxaliplatino en líneas celulares en las que p53 se encuentre ausente o mutado (Boyer et al. 2004) (Toscano et al. 2007).

A continuación, realizamos ensayos de viabilidad celular en los que tratamos a las células HCT116 p53+/+ y p53-/- con los péptidos P10hsD/P11hs y con oxaliplatino bien de manera individual o bien combinando ambos tratamientos. Los resultados mostraron que la combinación de P10hsD/P11hs + oxaliplatino en ambas líneas celulares resulta en un mayor descenso de la viabilidad celular que con cualquiera de los dos tratamientos por separado (Figura 4.37). Se observa que la combinación de ambos tratamientos tiene un efecto aditivo. La ausencia de sinergia entre ambos tratamientos podría explicarse por el hecho de que tanto los péptidos P10hsD/P11hs como el oxaliplatino actúan sobre el mismo proceso celular (biogénesis ribosomal). El oxaliplatino actúa principalmente mediante la activación de p53 y sus dianas transcripcionales (Toscano et al. 2007) (Figura 4.36C), mientras que los péptidos P10hsD y P11hs actúan por vías independientes a p53 según nuestros resultados experimentales (Figuras 4.30, 4.31B, 4.32A y 4.34A). El tratamiento combinado con péptido P10hsD/P11hs + oxaliplatino implica por tanto la activación simultánea de vías de señalización dependientes e independientes de p53. Esto constituye una posible explicación al efecto aditivo observado al combinar ambos tratamientos. (Figura 4.37).

Por otro lado, hemos comprobado que el uso del péptido P10hsD a una concentración 100 μ M junto con oxaliplatino en la línea celular HCT116 p53 +/+ permite disminuir de 2,5 μ M a 0,75 μ M (reducción del 70%) la concentración de oxaliplatino manteniendo el mismo efecto citotóxico sobre las células (disminución de la viabilidad celular en aproximadamente un 50%) (Figura 4.39A). En la línea celular HCT116 p53 -/- el uso de P10hsD en combinación con oxaliplatino permite disminuir la concentración de oxaliplatino de 15 a 5 μ M (reducción de un 67%) (Figura 4.39B). En ambas líneas celulares se observa una correlación inversa entre viabilidad celular y concentración de oxaliplatino, mientras que al combinar oxaliplatino + P10hsD a 100 μ M la viabilidad se mantiene constante. Este efecto es más evidente en las células HCT116 p53 +/+ que en las p53 -/- (compárese Figura 4.39A y B). Esto puede explicarse por el hecho de que la línea celular HCT116 p53+/+ es más sensible que la variante p53-/- a la acción del oxaliplatino (Figura 4.36A) (Boyer et al. 2004) (Toscano et al. 2007).

Vistos los anteriores resultados en relación a la eficacia del tratamiento con oxaliplatino en células HCT116 bien de manera individual o combinada con los péptidos P10hsD/P11hs (Figuras 4.36A, C, 4.37 y 4.39), nos planteamos comprobar el efecto del tratamiento combinado P10hsD + oxaliplatino en la línea celular Saos2 p53-/- derivada de osteosarcoma (Rodan et al. 1987). Evaluamos el efecto de ambos compuestos de manera individual y combinada. Los resultados (Figura 4.38) mostraron que el oxaliplatino no es efectivo en el tratamiento de esta línea celular tumoral. Este resultado concuerda con la información disponible en la base de datos GDSC (Yang et al. 2012), según la cual el oxaliplatino muestra un valor de EC50 de 428,73 μ M en la línea celular Saos2 silvestre. En nuestro sistema experimental, la ausencia de p53 en las células Saos2 p53-/- podría contribuir a aumentar todavía más la resistencia de esta línea celular frente a la acción del oxaliplatino en comparación con

la variante silvestre. Por otro lado, en este experimento el péptido P10hsD muestra eficacia citotóxica en esta línea celular, de acuerdo con los datos de la Figura 4.30C. El tratamiento combinado con oxaliplatino y P10hsD muestra el mismo efecto citotóxico que el tratamiento con P10hsD solo, de acuerdo con el hecho de que el oxaliplatino no resulta eficaz en esta línea celular (Figura 4.38).

En resumen, los resultados preliminares *in vitro* obtenidos en este estudio sugieren la posibilidad de utilizar los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs como fármacos antitumorales. Hemos determinado que los péptidos P10hsD y P11hs pueden utilizarse tanto de manera individual como en combinación con oxaliplatino contribuyendo a disminuir notablemente la concentración necesaria de este fármaco de quimioterapia para provocar un efecto citotóxico sobre la línea celular HCT116 derivada de cáncer colorrectal (Figuras 4.37 y 4.39). Esta estrategia contribuiría a disminuir los efectos secundarios asociados al uso del oxaliplatino en el tratamiento de este tipo de cáncer (Kang et al. 2021). Por otro lado, hemos observado que el péptido P10hsD podría ser eficaz en un contexto de quimio resistencia de una línea celular tumoral (Saos2 p53^{-/-}) frente al oxaliplatino (Figura 4.38).

Estos resultados están siendo ampliados mediante el uso de una serie de líneas celulares representativas de diferentes tipos de tumores, a fin de avalar la eficacia de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs en distintos contextos tumorales. Surge asimismo la necesidad de confirmar los resultados obtenidos *in vitro* mediante un modelo *in vivo* de desarrollo tumoral. Estos dos objetivos constituyen nuevas líneas de investigación que se planean llevar a cabo.

5.3.5 El péptido P10hsD es eficaz en el tratamiento *in vitro* de líneas celulares resistentes a la acción de la ciclofosfamida.

Como ya se ha mencionado, la quimio resistencia es uno de los mayores problemas a los que se enfrentan los tratamientos antitumorales actuales, y una de las principales causas de la aparición de recidivas en los pacientes oncológicos (Yuan et al. 2017) (Zheng 2017) (Palliyage, Ghosh, y Rojanasakul 2020). En la actualidad se tiene un conocimiento incompleto de los mecanismos celulares y moleculares que rigen la aparición de quimio resistencias. Sin embargo, hasta la fecha se han propuesto diversos mecanismos, tales como la sobre-expresión de transportadores en la membrana plasmática de las células cancerosas encargados de expulsar determinados fármacos de quimioterapia, el proceso de transición epitelio-mesénquima, mecanismos de inactivación química de los fármacos de quimioterapia, cambios epigenéticos en las células cancerosas que afectan a la expresión de determinados genes o alteraciones genéticas en las moléculas diana de los fármacos de quimioterapia (Palliyage et al. 2020).

A nivel molecular se ha relacionado el desarrollo de quimio resistencias con alteraciones en los procesos de señalización mediados por diversas onco-proteínas (EGFR, Akt, Erk1/2, NF- κ B) y proteínas supresoras de tumores (p53), así como con alteraciones en los procesos de reparación del ADN, funcionamiento mitocondrial y autofagia. Otro factor importante en el desarrollo de quimio resistencias son las llamadas células madre cancerosas, una subpoblación de células cancerosas indiferenciadas con capacidad de promover el desarrollo tumoral y la formación de nuevos tumores. Estas células se caracterizan por su carácter quimio resistente mediado por la presencia de transportadores de membrana especializados en el transporte reverso de fármacos de quimioterapia del citoplasma al exterior celular. Por último, recientes investigaciones han puesto al descubierto el papel ejercido por los exosomas en el desarrollo de quimio resistencias (Zheng 2017).

A la vista de los resultados positivos conseguidos en los ensayos de combinación de los péptidos P10hsD/P11hs y oxaliplatino, decidimos comprobar si el péptido P10hsD resulta eficaz en el tratamiento *in vitro* de células tumorales quimio resistentes. En este estudio preliminar se descartó el uso del péptido P11hs debido a su menor eficacia citotóxica en relación con el péptido P10hsD (Figura 4.30A,B y C). Seleccionamos la ciclofosfamida, un fármaco de quimioterapia ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, siendo uno de los primeros fármacos desarrollados para el tratamiento oncológico (Ahlmann y Hempel 2016). El mecanismo de acción de la ciclofosfamida implica la producción de daño al ADN, considerándose por tanto un fármaco genotóxico (Hengstler et al. 1997). A diferencia del oxaliplatino, la acción de la ciclofosfamida no se ha relacionado con alteraciones en la biogénesis ribosómica (Burger et al. 2010).

Según la información disponible en la literatura, las líneas celulares HCT116 y Saos2 (ambas en su variante silvestre) son resistentes *in vitro* al tratamiento con ciclofosfamida (Evdokiou et al. 2002) (Elmenoufy et al. 2020) (Weilbeer et al. 2022). Estos datos concuerdan con la información disponible en la base de datos GDSC (Yang et al. 2012), especializada en determinar el patrón de sensibilidad/resistencia de distintas líneas celulares tumorales frente a distintos fármacos de quimioterapia.

Utilizamos las tres líneas celulares disponibles en el laboratorio, HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} y Saos2 p53^{-/-} para la realización de ensayos de viabilidad empleando el péptido P10hsD, ciclofosfamida o bien la combinación de ambos tratamientos. Utilizamos una concentración de ciclofosfamida (350 μ M) a la que no se observa una inhibición significativa de la viabilidad celular en las líneas HCT116 p53^{+/+} y Saos2 p53^{-/-} (Figura 4.36B). Los resultados (Figura 4.40) mostraron que las tres líneas celulares se muestran resistentes a la acción de la ciclofosfamida, pero sensibles a la acción del péptido P10hsD. El tratamiento combinado P10hsD + ciclofosfamida no produce un descenso significativo de la viabilidad celular con respecto al tratamiento con P10hsD solo, de acuerdo con el hecho de que la ciclofosfamida no resulta efectiva en estas tres líneas celulares. Se trata de un resultado análogo al obtenido al tratar la línea celular Saos2 p53^{-/-} con oxaliplatino y P10hsD de manera individual o combinada (Figura 4.38).

En resumen, en este trabajo observamos que la línea celular Saos2 p53^{-/-} muestra resistencia *in vitro* al tratamiento con oxaliplatino y ciclofosfamida, mientras que se muestra sensible a la acción del péptido P10hsD (Figuras 4.38 y 4.40C). Por otro lado, las líneas celulares HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-} son resistentes *in vitro* a la acción de la ciclofosfamida, pero se muestran sensibles en las mismas condiciones experimentales a la acción del péptido P10hsD (Figura 4.40A y B). En conjunto, estos resultados sugieren que el péptido P10hsD podría ser efectivo para el tratamiento de células tumorales que se muestran resistentes a la acción del oxaliplatino y la ciclofosfamida. Como se explica más arriba, la quimio resistencia es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta en la actualidad la terapia antitumoral. Muchos pacientes oncológicos sometidos a tratamiento quimioterápico acaban sufriendo recidivas. Los tumores recidivantes con frecuencia han desarrollado resistencia al tratamiento con uno o varios fármacos de quimioterapia (Yuan et al. 2017) (Zheng 2017) (Palliyage, Ghosh, y Rojanasakul 2020)

Nuestros resultados preliminares sugieren que el péptido P10hsD podría utilizarse en el tratamiento de estos tumores recidivantes. Estos resultados, sin embargo, deben ser ampliados en futuros experimentos *in vitro* empleando diversas líneas celulares y los correspondientes fármacos de quimioterapia a los que se muestran resistentes, así como mediante estudios *in vivo* empleando modelos murinos.

5.4 Perspectivas futuras.

El desarrollo de esta tesis doctoral nos ha permitido demostrar el potencial terapéutico que puede derivarse del uso de péptidos de interferencia dirigidos contra interacciones específicas entre factores de ensamblaje ribosómicos. Concretamente, hemos demostrado mediante ensayos *in vitro* la capacidad citotóxica de tres péptidos (P10hs, P10hsD y P11hs) dirigidos contra la interacción entre los factores de ensamblaje Bop1 y WDR12, implicados en la biogénesis de la subunidad mayor (60S) del ribosoma de células humanas. Dada la elevada cantidad de factores de ensamblaje implicados en este proceso (más de 200 descritos hasta la fecha), se trata de una estrategia con un elevado potencial para el desarrollo de futuros fármacos antitumorales (Kressler et al. 2017).

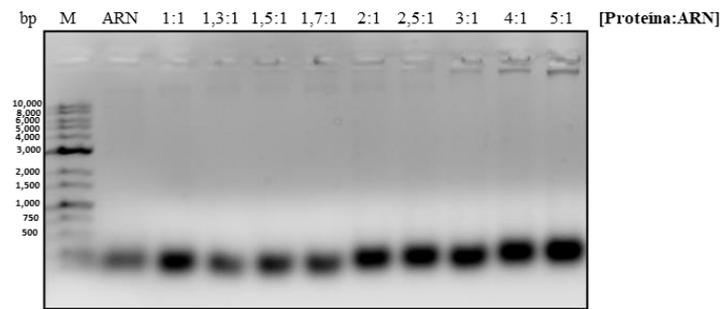
Los resultados presentados en este trabajo nos impulsan a continuar la investigación con estos péptidos de interferencia, y en especial con el péptido P10hsD, que es el que ha mostrado la mayor capacidad citotóxica. Nuestras perspectivas futuras incluyen la continuación de los ensayos *in vitro* destinados a probar la eficacia de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs en distintas líneas celulares tumorales y su posible uso combinado con distintos fármacos de quimioterapia. Una vez probada la eficacia *in vitro* de estos péptidos, se pretende comprobar su eficacia *in vivo* mediante el establecimiento de modelos murinos de desarrollo tumoral. Por último, nos planteamos explorar vías alternativas para la administración de los péptidos desarrollados como es el uso de nanopartículas de silicio, estrategia recientemente utilizada en el grupo de investigación dirigido por el Dr. Bravo (de la Torre et al. 2018).

6. Conclusiones.

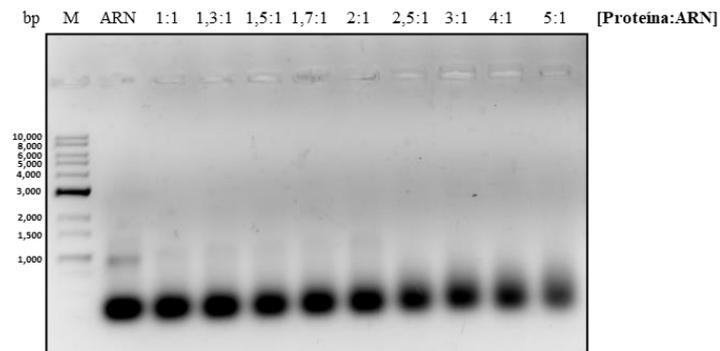
1. La información estructural relativa al comportamiento de los factores de ensamblaje en el contexto del pre-ribosoma eucariota no puede extrapolarse al comportamiento que presentan los mismos factores de ensamblaje fuera del pre-ribosoma.
2. El diseño efectivo de péptidos de interferencia dirigidos contra interacciones específicas entre factores de ensamblaje ribosómicos debe focalizarse en interacciones binarias que se establezcan antes de que las proteínas implicadas entren a formar parte del pre-ribosoma.
3. Los péptidos de interferencia P10hs, P10hsD y P11hs derivados de la secuencia de Bop1 y dirigidos contra la interacción Bop1-WDR12 muestran actividad citotóxica y pro-apoptótica en las líneas celulares tumorales HCT116 y Saos2, derivadas de cáncer colorrectal y osteosarcoma respectivamente. El péptido P10hsD es el que muestra mayor eficacia.
4. La acción citotóxica de los péptidos P10hs, P10hsD y P11hs es independiente de la señalización mediada por el supresor tumoral p53.
5. Los péptidos de interferencia P10hsD y P11hs pueden usarse *in vitro* en combinación con el fármaco quimioterapéutico oxaliplatino sobre la línea celular HCT116 en sus variantes silvestre y *knock out* para p53. En el caso del péptido P10hsD, esta estrategia permite disminuir la concentración de oxaliplatino necesaria para alcanzar un efecto citotóxico sobre esta línea celular. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar los péptidos P10hsD y P11hs como co-adyuvantes en la práctica clínica, a fin de disminuir los efectos adversos asociados al uso del oxaliplatino.
6. El péptido P10hsD muestra eficacia *in vitro* en un contexto de quimio resistencia. Concretamente, hemos demostrado la eficacia de este péptido sobre la línea celular tumoral HCT116 en sus variantes silvestre y *knock out* para p53 que se muestran resistentes a la acción de la ciclofosfamida, y sobre la línea celular tumoral Saos2 *knock out* para p53 que se muestra resistente a la acción de los fármacos ciclofosfamida y oxaliplatino.

7. Anexo.

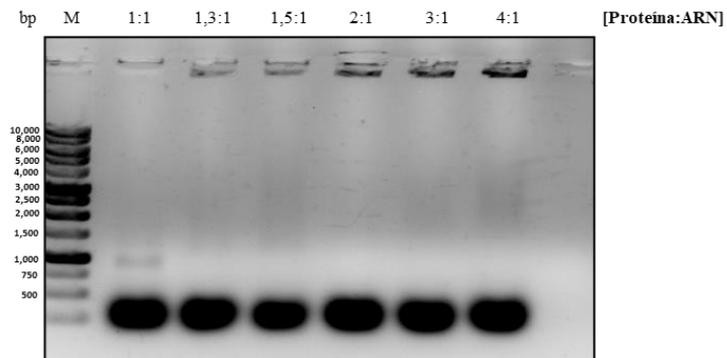
A



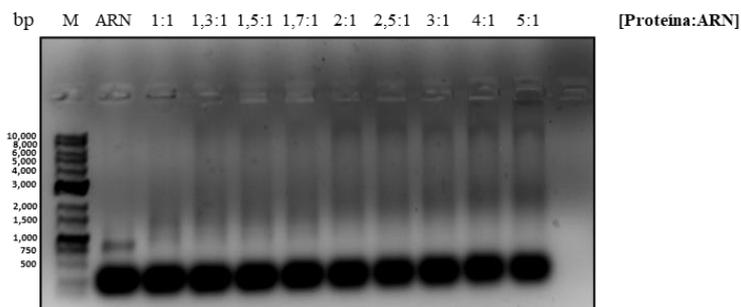
B



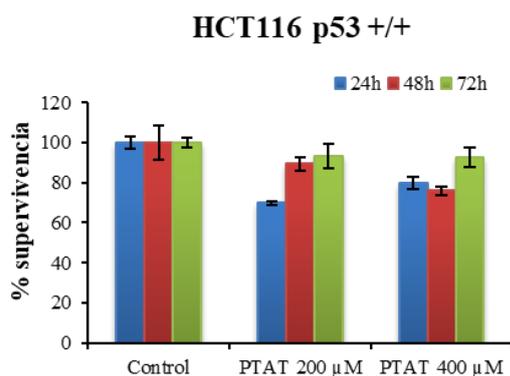
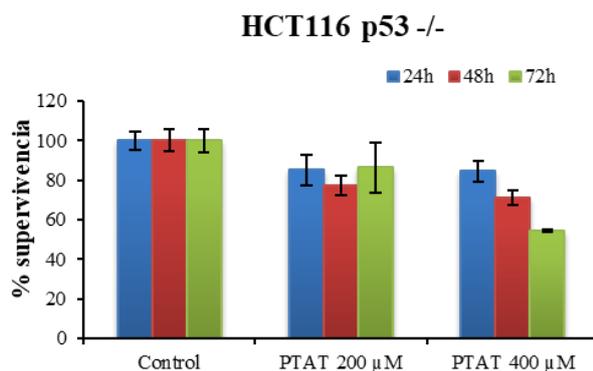
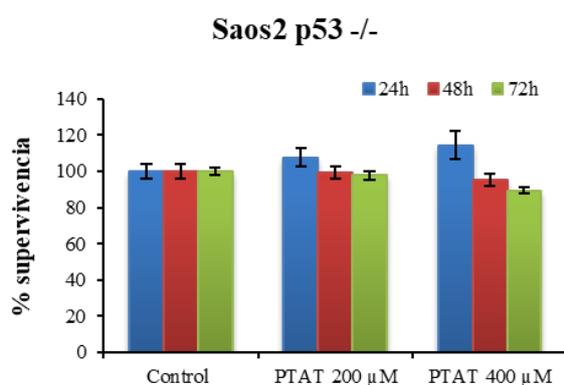
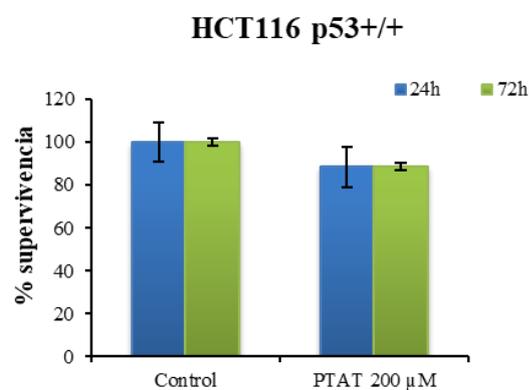
C



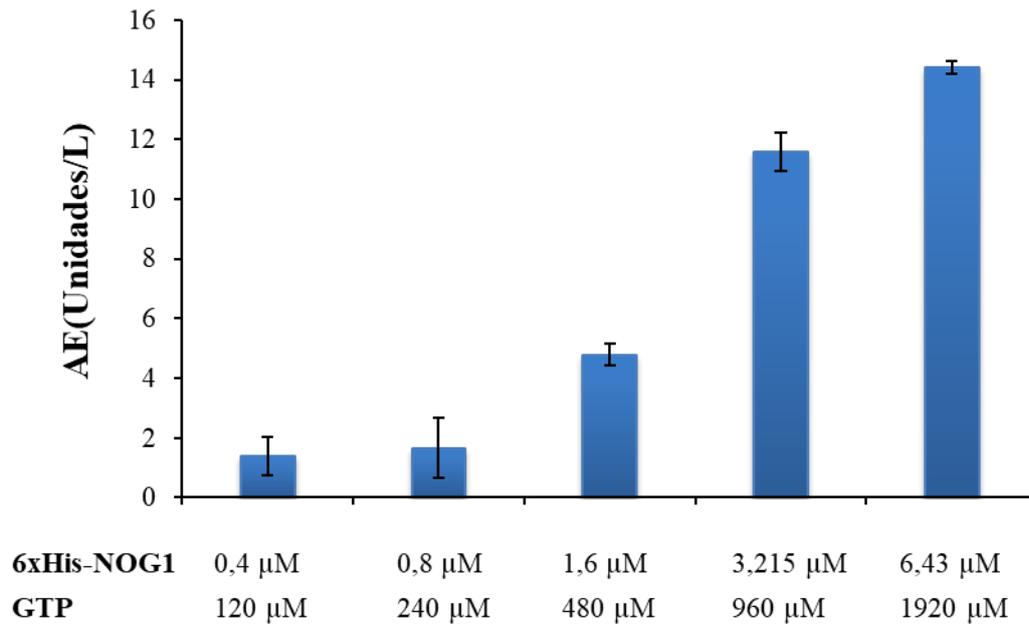
D



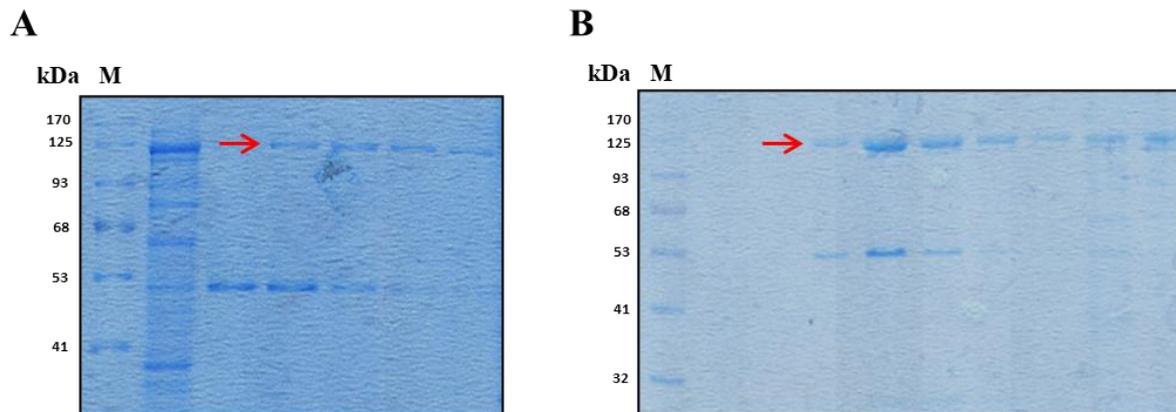
Anexo 1: Estudio de la capacidad de interacción de distintos factores de ensamblaje ribosómicos con el ácido ribonucleico extraído de *Escherichia coli*. Se realizó un ensayo de movilidad electroforética para determinar la capacidad de las construcciones MBP-HAS1 (A), 6xHis-HAS1 (1-320 aa) (B), 6xHis-MAK5 (192-616 aa) (C) y MBP-NOG1 (D) de interactuar con una muestra de ácido ribonucleico total extraído de *Escherichia coli*. Se emplearon distintas proporciones de proteína y ARN en relación de masa (p:p). M: marcador de pesos moleculares. ARN: muestra de ARN total de *Escherichia coli* en ausencia de proteína.

A**B****C****D**

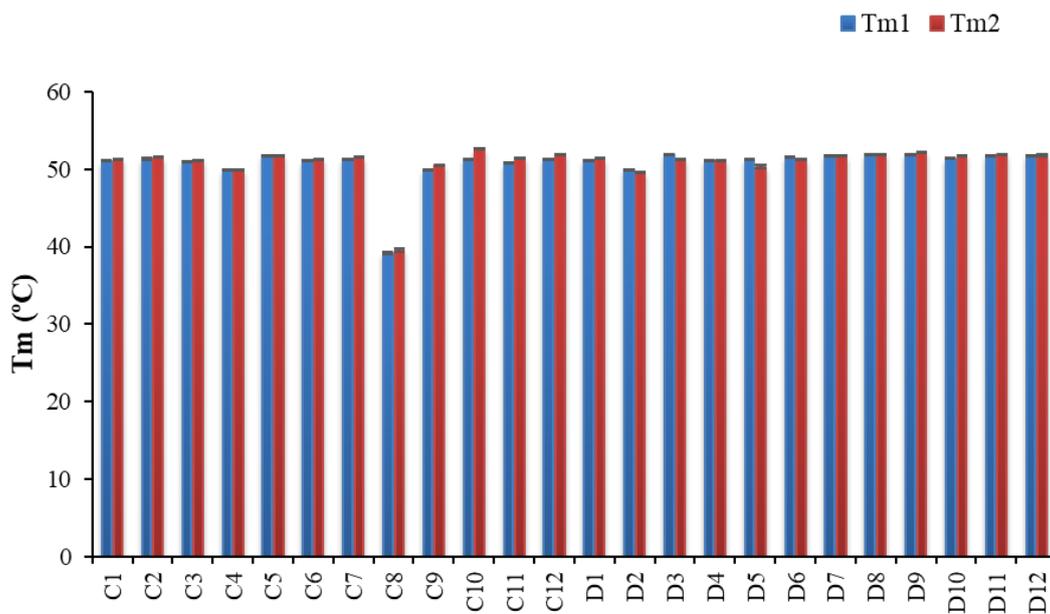
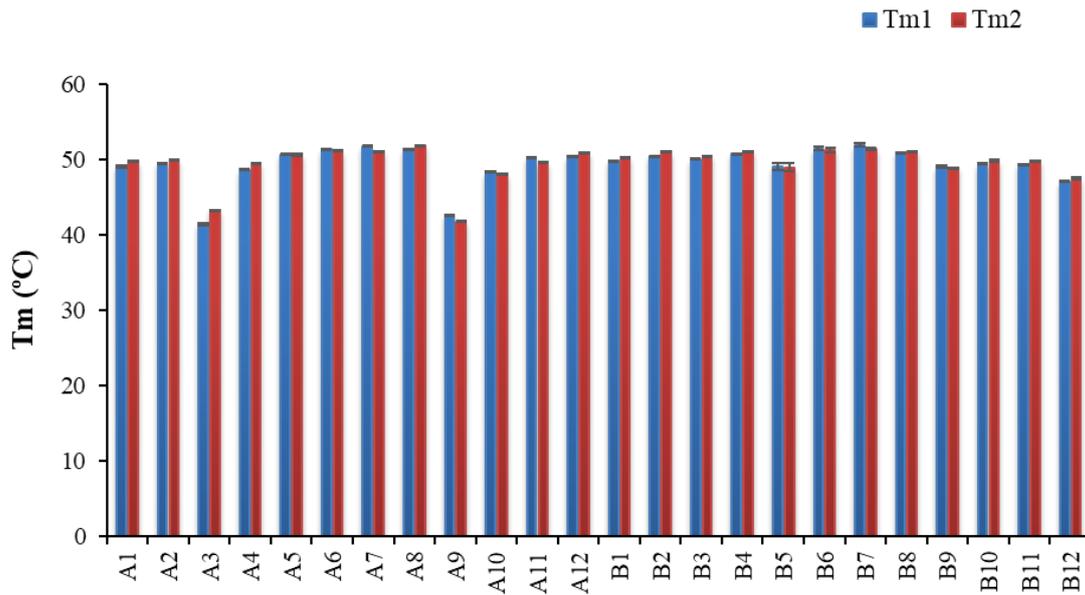
Anexo 2: Estudio de viabilidad celular tras el tratamiento con el péptido TAT a diferentes concentraciones. Las líneas celulares HCT116 p53+/+ (**A**), HCT116 p53-/- (**B**) y Saos2 p53-/- (**C**) fueron tratadas con el péptido TAT durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la viabilidad celular mediante el reactivo WST-1. Se muestra el valor medio de 3 réplicas experimentales \pm SD. Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad con respecto al control (constituido por células sin tratar). **D.** La línea celular HCT116 p53+/+ fue tratada con el péptido TAT durante 24 y 72 horas. Se muestra el valor medio de dos réplicas experimentales \pm SD. Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad con respecto al control (constituido por células sin tratar).



Anexo 3. Cuantificación de la actividad enzimática de la construcción 6xHis-NOG1 en presencia de GTP. Se emplearon concentraciones crecientes y proporcionales de enzima (6xHis-NOG1) y GTP manteniendo una proporción molar enzima:GTP de 1:300 en todos los casos. Se muestra el valor medio de tres réplicas experimentales \pm SD. Los resultados se muestran en Unidades/L, siendo 1 Unidad la cantidad de enzima capaz de catalizar la producción de 1 μ mol de fosfato inorgánico (Pi) por minuto. AE: actividad enzimática.



Anexo 4. Resumen del proceso de purificación de la construcción GST-MAK5 de *Chaetomium thermophilum*. **A.** Electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) mostrando las fracciones resultantes de la cromatografía de afinidad en columna HisTrap HP realizada con esta construcción. **B.** Electroforesis SDS-PAGE al 10% (v/v) de acrilamida mostrando las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio aniónico en columna HiTrap Q HP realizada con las muestras resultantes de la cromatografía de afinidad.



Anexo 5. Análisis de la estabilidad térmica de la construcción GST-MAK5 de *Chaetomium thermophilum* mediante termofluór. Se muestra la temperatura de fusión (Tm) que presenta esta proteína en las distintas condiciones experimentales (A1-D12). Cada condición es ensayada por duplicado obteniéndose dos series de datos (Tm1 y Tm2). Se muestra el valor de Tm obtenido en cada condición \pm SD.

Inserto	Tm (C°)
ctNOC2	63
ctNOC2 (1-771 aa)	60
ctNOG1	63
ctMAK5	60
ctMAK5 (192-616 aa)	57
ctHAS1	60
ctHAS1 (1-320 aa)	62
cteIF6	62
ctCIC1	62
hsTAT-NOG1 (351-412 aa)	60

Abreviaturas: ct: *Chaetomium thermophilum*, hs: *Homo sapiens*.

Anexo 6: Tabla-resumen mostrando el valor de temperatura de fusión (Tm) empleado para la amplificación mediante PCR de los distintos insertos de interés empleados en este estudio (véase apartado 3.1.2).

Condición	6xHis-MAK5 (192-616 aa)	GST-MAK5
A4	51,25/51,72 °C	48,62/49,47°C
A5	52,25/53,79°C	50,68/50,62°C
B10	53,81/53,18°C	49,41/49,82°C
B12	60,76/60°C	47,07/47,48°C
C4	53,02/53,31°C	49,85/49,92°C

Anexo 7: Tabla-resumen mostrando el valor de temperatura de fusión (Tm) obtenido al utilizar las construcciones 6xHis-MAK5 (192-616 aa) y GST-MAK5 en un ensayo de termofluor en diferentes condiciones experimentales. En la Tabla 3.7 se indica la composición de los tampones empleados en las distintas condiciones experimentales (A4, A5, B10, B12 y C4). Se muestran en cada caso los dos valores de Tm obtenidos en las dos réplicas experimentales realizadas.

8. Bibliografía.

- Abdelaal, Gina, Andrew Carter, Mihalis I. Panayiotides, David Tetard, y Stephany Veuger. 2022. «Novel iron chelator SK4 demonstrates cytotoxicity in a range of tumour derived cell lines». *Frontiers in Molecular Biosciences* 9.
- Ahlmann, Martina, y Georg Hempel. 2016. «The Effect of Cyclophosphamide on the Immune System: Implications for Clinical Cancer Therapy». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78(4):661-71. doi: 10.1007/s00280-016-3152-1.
- Ajore, Ram, David Raiser, Marie McConkey, Magnus Jöud, Bernd Boidol, Brenton Mar, Gordon Saksena, David M. Weinstock, Scott Armstrong, Steven R. Ellis, Benjamin L. Ebert, y Björn Nilsson. 2017. «Deletion of Ribosomal Protein Genes Is a Common Vulnerability in Human Cancer, Especially in Concert with TP53 Mutations». *EMBO Molecular Medicine* 9(4):498-507. doi: 10.15252/emmm.201606660.
- Albuquerque, Claudio P., Marcus B. Smolka, Samuel H. Payne, Vineet Bafna, Jimmy Eng, y Huilin Zhou. 2008. «A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis». *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 7(7):1389-96. doi: 10.1074/mcp.M700468-MCP200.
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, y David J. Lipman. 1990. «Basic Local Alignment Search Tool». 8.
- Aslanidis, Charalampos, y Pieter J. de Jong. 1990. «Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-POR)». 6.
- Awad, Dominik, Michael Prattes, Lisa Kofler, Ingrid Rössler, Mathias Loibl, Melanie Pertl, Gertrude Zisser, Heimo Wolinski, Brigitte Pertschy, y Helmut Bergler. 2019. «Inhibiting Eukaryotic Ribosome Biogenesis». *BMC Biology* 17(1):46. doi: 10.1186/s12915-019-0664-2.
- Ban, Nenad, Roland Beckmann, Jamie HD Cate, Jonathan D. Dinman, François Dragon, Steven R. Ellis, Denis LJ Lafontaine, Lasse Lindahl, Anders Liljas, Jeffrey M. Lipton, Michael A. McAlear, Peter B. Moore, Harry F. Noller, Joaquin Ortega, Vikram Govind Panse, V. Ramakrishnan, Christian MT Spahn, Thomas A. Steitz, Marek Tchorzewski, David Tollervey, Alan J. Warren, James R. Williamson, Daniel Wilson, Ada Yonath, y Marat Yusupov. 2014. «A New System for Naming Ribosomal Proteins». *Current Opinion in Structural Biology* 24:165-69. doi: 10.1016/j.sbi.2014.01.002.
- Barna, Maria, Aya Pusic, Ornella Zollo, Maria Costa, Nadya Kondrashov, Eduardo Rego, Pulivarthi H. Rao, y Davide Ruggero. 2008. «Suppression of Myc Oncogenic Activity by Ribosomal Protein Haploinsufficiency». *Nature* 456(7224):971-75. doi: 10.1038/nature07449.
- Baßler, Jochen, y Ed Hurt. 2019. «Eukaryotic Ribosome Assembly». *Annual Review of Biochemistry* 88(1):281-306. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-110817.
- Basu, Uttiya, Kausik Si, Jonathan R. Warner, y Umadas Maitra. 2001. «The *Saccharomyces Cerevisiae* TIF6 Gene Encoding Translation Initiation Factor 6 Is Required for 60S Ribosomal Subunit Biogenesis». *Molecular and Cellular Biology* 21(5):1453-62. doi: 10.1128/MCB.21.5.1453-1462.2001.

- Baykov, A. A., O. A. Evtushenko, y S. M. Avaeva. 1988. «A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay». *Analytical Biochemistry* 171(2):266-70. doi: 10.1016/0003-2697(88)90484-8.
- Bleichert, F., S. Granneman, Y. N. Osheim, A. L. Beyer, y S. J. Baserga. 2006. «The PINc Domain Protein Utp24, a Putative Nuclease, Is Required for the Early Cleavage Steps in 18S RRNA Maturation». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(25):9464-69. doi: 10.1073/pnas.0603673103.
- van den Boogaard, Winnie M. C., Daphne S. J. Komninos, y Wilbert P. Vermeij. 2022. «Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal». *Cancers* 14(3):627. doi: 10.3390/cancers14030627.
- Boyer, John, Estelle G. McLean, Somaiah Aroori, Peter Wilson, Andrea McCulla, P. Declan Carey, Daniel B. Longley, y Patrick G. Johnston. 2004. «Characterization of P53 Wild-Type and Null Isogenic Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and Irinotecan». *Clinical Cancer Research* 10(6):2158-67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0362.
- Bradford, Marion M. 1976. «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding». 7.
- Brattain, M. G., W. D. Fine, F. M. Khaled, J. Thompson, y D. E. Brattain. 1981. «Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma». *Cancer Research* 41(5):1751-56.
- Brina, Daniela, Annarita Miluzio, Sara Ricciardi, y Stefano Biffo. 2015. «EIF6 Anti-Association Activity Is Required for Ribosome Biogenesis, Translational Control and Tumor Progression». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849(7):830-35. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.09.010.
- Brüning, Lukas, Philipp Hackert, Roman Martin, Jimena Davila Gallesio, Gerald Ryan R. Aquino, Henning Urlaub, Katherine E. Sloan, y Markus T. Bohnsack. 2018. «RNA Helicases Mediate Structural Transitions and Compositional Changes in Pre-Ribosomal Complexes». *Nature Communications* 9(1):5383. doi: 10.1038/s41467-018-07783-w.
- Bruno, Peter M., Yunpeng Liu, Ga Young Park, Junko Murai, Catherine E. Koch, Timothy J. Eisen, Justin R. Pritchard, Yves Pommier, Stephen J. Lippard, y Michael T. Hemann. 2017. «A Subset of Platinum-Containing Chemotherapeutic Agents Kills Cells by Inducing Ribosome Biogenesis Stress». *Nature Medicine* 23(4):461-71. doi: 10.1038/nm.4291.
- Bruno, Peter M., Mengrou Lu, Kady A. Dennis, Haider Inam, Connor J. Moore, John Sheehe, Stephen J. Elledge, Michael T. Hemann, y Justin R. Pritchard. 2020. «The primary mechanism of cytotoxicity of the chemotherapeutic agent CX-5461 is topoisomerase II poisoning». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(8):4053-60. doi: 10.1073/pnas.1921649117.
- Burger, Kaspar, Bastian Mühl, Thomas Harasim, Michaela Rohmoser, Anastassia Malamoussi, Mathias Orban, Markus Kellner, Anita Gruber-Eber, Elisabeth Kremmer, Michael Hölzel, y Dirk Eick. 2010. «Chemotherapeutic Drugs Inhibit Ribosome Biogenesis at Various Levels». *The Journal of Biological Chemistry* 285(16):12416-25. doi: 10.1074/jbc.M109.074211.

- Bursac, Sladana, Maja Cokaric Brdovcak, Giulio Donati, y Sinisa Volarevic. 2014. «Activation of the Tumor Suppressor P53 upon Impairment of Ribosome Biogenesis». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842(6):817-30. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.014.
- Bursać, Sladana, Maja Cokarić Brdovčak, Martin Pfannkuchen, Ines Orsolić, Lior Golomb, Yan Zhu, Chen Katz, Lilyn Daftuar, Kristina Grabušić, Iva Vukelić, Vedrana Filić, Moshe Oren, Carol Prives, y Siniša Volarevic. 2012. «Mutual Protection of Ribosomal Proteins L5 and L11 from Degradation Is Essential for P53 Activation upon Ribosomal Biogenesis Stress». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(50):20467-72. doi: 10.1073/pnas.1218535109.
- Bustelo, Xosé R., y Mercedes Dosil. 2018. «Ribosome Biogenesis and Cancer: Basic and Translational Challenges». *Current Opinion in Genetics & Development* 48:22-29. doi: 10.1016/j.gde.2017.10.003.
- Bywater, Megan J., Gretchen Poortinga, Elaine Sanij, Nadine Hein, Abigail Peck, Carleen Cullinane, Meaghan Wall, Leonie Cluse, Denis Drygin, Kenna Anderes, Nanni Huser, Chris Proffitt, Joshua Bliesath, Mustapha Haddach, Michael K. Schwaebe, David M. Ryckman, William G. Rice, Clemens Schmitt, Scott W. Lowe, Ricky W. Johnstone, Richard B. Pearson, Grant A. McArthur, y Ross D. Hannan. 2012. «Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of P53». *Cancer Cell* 22(1):51-65. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.019.
- Caillet, Joël, Bruno Baron, Irina V. Boni, Célia Caillet-Saguy, y Eliane Hajnsdorf. 2019. «Identification of Protein-Protein and Ribonucleoprotein Complexes Containing Hfq». *Scientific Reports* 9(1):14054. doi: 10.1038/s41598-019-50562-w.
- Catez, Frédéric, Nicole Dalla Venezia, Virginie Marcel, Christiane Zorbas, Denis L. J. Lafontaine, y Jean-Jacques Diaz. 2019. «Ribosome Biogenesis: An Emerging Druggable Pathway for Cancer Therapeutics». *Biochemical Pharmacology* 159:74-81. doi: 10.1016/j.bcp.2018.11.014.
- Cazzalini, Ornella, A. Ivana Scovassi, Monica Savio, Lucia A. Stivala, y Ennio Prospero. 2010. «Multiple Roles of the Cell Cycle Inhibitor P21CDKN1A in the DNA Damage Response». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704(1-3):12-20. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.009.
- Ceci, Marcello, Cristina Gaviraghi, Chiara Gorrini, Leonardo A. Sala, Nina Offenhäuser, Pier Carlo Marchisio, y Stefano Biffo. 2003. «Release of EIF6 (P27BBP) from the 60S Subunit Allows 80S Ribosome Assembly». *Nature* 426(6966):579-84. doi: 10.1038/nature02160.
- Chauhan, Ashok, Akshay Tikoo, Arvinder K. Kapur, y Mahavir Singh. 2007. «The Taming of the Cell Penetrating Domain of the HIV Tat: Myths and Realities». *Journal of Controlled Release* 117(2):148-62. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.10.031.
- Chen, Cammy K. M., Nei-Li Chan, y Andrew H. J. Wang. 2011. «The Many Blades of the β -Propeller Proteins: Conserved but Versatile». *Trends in Biochemical Sciences* 36(10):553-61. doi: 10.1016/j.tibs.2011.07.004.

- Chen, Jiandong. 2016. «The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of P53 in Tumor Initiation and Progression». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(3):a026104. doi: 10.1101/cshperspect.a026104.
- Chen, Wu, Zhensheng Xie, Fuquan Yang, y Keqiong Ye. 2017. «Stepwise Assembly of the Earliest Precursors of Large Ribosomal Subunits in Yeast». *Nucleic Acids Research* 45(11):6837-47. doi: 10.1093/nar/gkx254.
- Cheng, Jingdong, Jochen Baßler, Paulina Fischer, Benjamin Lau, Nikola Kellner, Ruth Kunze, Sabine Griesel, Martina Kallas, Otto Berninghausen, Daniela Strauss, Roland Beckmann, y Ed Hurt. 2019. «Thermophile 90S Pre-Ribosome Structures Reveal the Reverse Order of Co-Transcriptional 18S RRNA Subdomain Integration». *Molecular Cell* 75(6):1256-1269.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.032.
- Choudhari, Amit S., Pallavi C. Mandave, Manasi Deshpande, Prabhakar Ranjekar, y Om Prakash. 2020. «Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice». *Frontiers in Pharmacology* 10:1614. doi: 10.3389/fphar.2019.01614.
- Čmielová, Jana, y M. Řezáčová. 2011. «Protein and Its Function Based on a Subcellular Localization». *Journal of Cellular Biochemistry* 112(12):3502-6. doi: 10.1002/jcb.23296.
- Colis, Laureen, Karita Peltonen, Paul Sirajuddin, Hester Liu, Sara Sanders, Glen Ernst, James C. Barrow, y Marikki Laiho. 2014. «DNA Intercalator BMH-21 Inhibits RNA Polymerase I Independent of DNA Damage Response». *Oncotarget* 5(12):4361-69. doi: 10.18632/oncotarget.2020.
- Cordin, Olivier, Josette Banroques, N. Kyle Tanner, y Patrick Linder. 2006. «The DEAD-Box Protein Family of RNA Helicases». *Gene* 367:17-37. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.019.
- de la Cruz, Jesús, Katrin Karbstein, y John L. Woolford. 2015. «Functions of Ribosomal Proteins in Assembly of Eukaryotic Ribosomes In Vivo». *Annual Review of Biochemistry* 84(1):93-129. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033917.
- Dai, Mu-Shui, Xiao-Xin Sun, y Hua Lu. 2010. «Ribosomal Protein L11 Associates with C-Myc at 5 S RRNA and TRNA Genes and Regulates Their Expression». *The Journal of Biological Chemistry* 285(17):12587-94. doi: 10.1074/jbc.M109.056259.
- Dannheisig, David P., Anna Schimansky, Cornelia Donow, y Astrid S. Pfister. 2021. «Nucleolar Stress Functions Upstream to Stimulate Expression of Autophagy Regulators». *Cancers* 13(24):6220. doi: 10.3390/cancers13246220.
- Das, Ranjita, Kaushik Bhattacharya, Sayantani Sarkar, Suman Kumar Samanta, Bikas C. Pal, y Chitra Mandal. 2014. «Mahanine Synergistically Enhances Cytotoxicity of 5-Fluorouracil through ROS-Mediated Activation of PTEN and P53/P73 in Colon Carcinoma». *Apoptosis* 19(1):149-64. doi: 10.1007/s10495-013-0907-6.
- de la Torre, Cristina, Leticia Domínguez-Berrocal, José R. Murguía, M. Dolores Marcos, Ramón Martínez-Máñez, Jerónimo Bravo, y Félix Sancenón. 2018. «ε -Polylysine-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles as Carrier of the C 9 h Peptide to Induce Apoptosis in Cancer Cells». *Chemistry - A European Journal* 24(8):1890-97. doi: 10.1002/chem.201704161.

- Dembowski, Jill A., Benjamin Kuo, y John L. Woolford. 2013. «Has1 Regulates Consecutive Maturation and Processing Steps for Assembly of 60S Ribosomal Subunits». *Nucleic Acids Research* 41(16):7889-7904. doi: 10.1093/nar/gkt545.
- Dickey, Jennifer S., Christophe E. Redon, Asako J. Nakamura, Brandon J. Baird, Olga A. Sedelnikova, y William M. Bonner. 2009. «H2AX: Functional Roles and Potential Applications». *Chromosoma* 118(6):683-92. doi: 10.1007/s00412-009-0234-4.
- Dlakić, Mensur, y David Tollervey. 2004. «The Noc Proteins Involved in Ribosome Synthesis and Export Contain Divergent HEAT Repeats». *RNA* 10(3):351-54. doi: 10.1261/rna.5184704.
- Donati, Giulio, Elisa Brighenti, Manuela Vici, Giuliano Mazzini, Davide Treré, Lorenzo Montanaro, y Massimo Derenzini. 2011. «Selective Inhibition of RRNA Transcription Downregulates E2F-1: A New P53-Independent Mechanism Linking Cell Growth to Cell Proliferation». *Journal of Cell Science* 124(Pt 17):3017-28. doi: 10.1242/jcs.086074.
- Donati, Giulio, Suresh Peddigari, Carol A. Mercer, y George Thomas. 2013. «5S Ribosomal RNA Is an Essential Component of a Nascent Ribosomal Precursor Complex That Regulates the Hdm2-P53 Checkpoint». *Cell Reports* 4(1):87-98. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.045.
- Doti, Nunziata, Mario Mardirossian, Annamaria Sandomenico, Menotti Ruvo, y Andrea Caporale. 2021. «Recent Applications of Retro-Inverso Peptides». *International Journal of Molecular Sciences* 22(16):8677. doi: 10.3390/ijms22168677.
- Dötsch, V., F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi, y G. Melino. 2010. «P63 and P73, the Ancestors of P53». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(9):a004887. doi: 10.1101/cshperspect.a004887.
- Drygin, Denis, Amy Lin, Josh Bliesath, Caroline B. Ho, Sean E. O'Brien, Chris Proffitt, Mayuko Omori, Mustapha Haddach, Michael K. Schwaebe, Adam Siddiqui-Jain, Nicole Streiner, Jaclyn E. Quin, Elaine Sanij, Megan J. Bywater, Ross D. Hannan, David Ryckman, Kenna Anderes, y William G. Rice. 2011. «Targeting RNA Polymerase I with an Oral Small Molecule CX-5461 Inhibits Ribosomal RNA Synthesis and Solid Tumor Growth». *Cancer Research* 71(4):1418-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1728.
- Drygin, Denis, Adam Siddiqui-Jain, Sean O'Brien, Michael Schwaebe, Amy Lin, Josh Bliesath, Caroline B. Ho, Chris Proffitt, Katy Trent, Jeffrey P. Whitten, John K. C. Lim, Daniel Von Hoff, Kenna Anderes, y William G. Rice. 2009. «Anticancer Activity of CX-3543: A Direct Inhibitor of RRNA Biogenesis». *Cancer Research* 69(19):7653-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1304.
- Elmenoufy, Ahmed H., Francesco Gentile, David Jay, Feridoun Karimi-Busheri, Xiaoyan Yang, Olivier M. Soueidan, Rajam S. Mani, Gloria Ciniero, Jack A. Tuszynski, Michael Weinfeld, y Frederick G. West. 2020. «Design, Synthesis and in Vitro Cell-Free/Cell-Based Biological Evaluations of Novel ERCC1-XPF Inhibitors Targeting DNA Repair Pathway». *European Journal of Medicinal Chemistry* 204:112658. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112658.
- Emadi, Ashkan, Richard J. Jones, y Robert A. Brodsky. 2009. «Cyclophosphamide and Cancer: Golden Anniversary». *Nature Reviews Clinical Oncology* 6(11):638-47. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.146.

- Emery, Bertrand, Jesús De La Cruz, Sanda Rocak, Olivier Deloche, y Patrick Linder. 2004. «Has1p, a Member of the DEAD-Box Family, Is Required for 40S Ribosomal Subunit Biogenesis in *Saccharomyces Cerevisiae*†». *Molecular Microbiology* 52(1):141-58. doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03973.x.
- Erdős, Gábor, Mátyás Pajkos, y Zsuzsanna Dosztányi. 2021. «IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation». *Nucleic Acids Research* 49(W1):W297-303. doi: 10.1093/nar/gkab408.
- Ericsson, Ulrika B., B. Martin Hallberg, George T. DeTitta, Niek Dekker, y Pär Nordlund. 2006. «Thermofluor-Based High-Throughput Stability Optimization of Proteins for Structural Studies». *Analytical Biochemistry* 357(2):289-98. doi: 10.1016/j.ab.2006.07.027.
- Erzberger, Jan P., y James M. Berger. 2006. «EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AND STRUCTURAL MECHANISMS OF AAA+ PROTEINS». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 35(1):93-114. doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.101933.
- Evdokiou, Andreas, Stelios Bouralexis, Gerald J. Atkins, Fugui Chai, Shelley Hay, Mark Clayer, y David M. Findlay. 2002. «Chemotherapeutic Agents Sensitize Osteogenic Sarcoma Cells, but Not Normal Human Bone Cells, to Apo2l/Trail-Induced Apoptosis». *International Journal of Cancer* 99(4):491-504. doi: 10.1002/ijc.10376.
- Ewing, Rob M., Peter Chu, Fred Elisma, Hongyan Li, Paul Taylor, Shane Climie, Linda McBroom-Cerajewski, Mark D. Robinson, Liam O'Connor, Michael Li, Rod Taylor, Moyez Dharsee, Yuen Ho, Adrian Heilbut, Lynda Moore, Shudong Zhang, Olga Ornatsky, Yury V. Bukhman, Martin Ethier, Yinglun Sheng, Julian Vasilescu, Mohamed Abu-Farha, Jean-Philippe Lambert, Henry S. Duewel, Ian I. Stewart, Bonnie Kuehl, Kelly Hogue, Karen Colwill, Katharine Gladwish, Brenda Muskat, Robert Kinach, Sally-Lin Adams, Michael F. Moran, Gregg B. Morin, Thodoros Topaloglou, y Daniel Figeys. 2007. «Large-Scale Mapping of Human Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry». *Molecular Systems Biology* 3:89. doi: 10.1038/msb4100134.
- Faivre, Sandrine, Denise Chan, Richard Salinas, Barbara Woynarowska, y Jan M. Woynarowski. 2003. «DNA Strand Breaks and Apoptosis Induced by Oxaliplatin in Cancer Cells». *Biochemical Pharmacology* 66(2):225-37. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00260-0.
- Falconer, Robert J., Boelo Schuur, y Anthony K. Mittermaier. 2021. «Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Pure and Applied Research from 2016 to 2020». *Journal of Molecular Recognition* 34(10):e2901. doi: 10.1002/jmr.2901.
- Fancello, Laura, Kim R. Kampen, Isabel J. F. Hofman, Jelle Verbeeck, y Kim De Keersmaecker. 2017. «The Ribosomal Protein Gene RPL5 Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in Multiple Cancer Types». *Oncotarget* 8(9):14462-78. doi: 10.18632/oncotarget.14895.
- Fatica, Alessandro, Marlene Oeffinger, Mensur Dlakić, y David Tollervey. 2003. «Nob1p Is Required for Cleavage of the 3' End of 18S RRNA». *Molecular and Cellular Biology* 23(5):1798-1807. doi: 10.1128/MCB.23.5.1798-1807.2003.
- Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, y J. Barsoum. 1994. «Tat-Mediated Delivery of Heterologous Proteins into Cells.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(2):664-68. doi: 10.1073/pnas.91.2.664.

- Fernández-Pevida, Antonio, Dieter Kressler, y Jesús de la Cruz. 2015. «Processing of Preribosomal RNA in *Saccharomyces Cerevisiae*: Yeast Pre-RRNA Processing». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 6(2):191-209. doi: 10.1002/wrna.1267.
- Ferreira, Rita, John S. Schneekloth, Konstantin I. Panov, Katherine M. Hannan, y Ross D. Hannan. 2020. «Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age». *Cells* 9(2):266. doi: 10.3390/cells9020266.
- Frankowski, Kevin J., Chen Wang, Samarjit Patnaik, Frank J. Schoenen, Noel Southall, Dandan Li, Yaroslav Teper, Wei Sun, Irawati Kandela, Deqing Hu, Christopher Dextras, Zachary Knotts, Yansong Bian, John Norton, Steve Titus, Marzena A. Lewandowska, Yiping Wen, Katherine I. Farley, Lesley Mathews Griner, Jamey Sultan, Zhaojing Meng, Ming Zhou, Tomas Vilimas, Astin S. Powers, Serguei Kozlov, Kunio Nagashima, Humair S. Quadri, Min Fang, Charles Long, Ojus Khanolkar, Warren Chen, Jinsol Kang, Helen Huang, Eric Chow, Esthermanya Goldberg, Coral Feldman, Romi Xi, Hye Rim Kim, Gary Sahagian, Susan J. Baserga, Andrew Mazar, Marc Ferrer, Wei Zheng, Ali Shilatifard, Jeffrey Aubé, Udo Rudloff, Juan Jose Marugan, y Sui Huang. 2018. «Metarrestin, a Perinucleolar Compartment Inhibitor, Effectively Suppresses Metastasis». *Science Translational Medicine* 10(441):eaap8307. doi: 10.1126/scitranslmed.aap8307.
- Fu, Xinxu, Lu Xu, Ling Qi, Hongyan Tian, Dan Yi, Yang Yu, Shibing Liu, Songyan Li, Ye Xu, y Chunyan Wang. 2017. «BMH-21 Inhibits Viability and Induces Apoptosis by P53-Dependent Nucleolar Stress Responses in SKOV3 Ovarian Cancer Cells». *Oncology Reports* 38(2):859-65. doi: 10.3892/or.2017.5750.
- Fuentes, Jennifer L., Kaustuv Datta, Susan M. Sullivan, Angela Walker, y Janine R. Maddock. 2007. «In Vivo Functional Characterization of the *Saccharomyces Cerevisiae* 60S Biogenesis GTPase Nog1». *Molecular Genetics and Genomics* 278(1):105-23. doi: 10.1007/s00438-007-0233-1.
- Fumagalli, Stefano, Vasily V. Ivanenkov, Teng Teng, y George Thomas. 2012. «Suprainduction of P53 by Disruption of 40S and 60S Ribosome Biogenesis Leads to the Activation of a Novel G2/M Checkpoint». *Genes & Development* 26(10):1028-40. doi: 10.1101/gad.189951.112.
- Gamalinda, Michael, Jelena Jakovljevic, Reyes Babiano, Jason Talkish, Jesús de la Cruz, y John L. Woolford. 2013. «Yeast Polypeptide Exit Tunnel Ribosomal Proteins L17, L35 and L37 Are Necessary to Recruit Late-Assembling Factors Required for 27SB Pre-RRNA Processing». *Nucleic Acids Research* 41(3):1965-83. doi: 10.1093/nar/gks1272.
- Gao, Jinpeng, Qingchao Li, y Duochuan Li. 2021. «Novel Proteome and N-Glycoproteome of the Thermophilic Fungus *Chaetomium thermophilum* in Response to High Temperature». *Frontiers in Microbiology* 12.
- Gasteiger, Elisabeth, Christine Hoogland, Alexandre Gattiker, S'everine Duvaud, Marc R. Wilkins, Ron D. Appel, y Amos Bairoch. 2005. «Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server». Pp. 571-607 en *The Proteomics Protocols Handbook, Springer Protocols Handbooks*, editado por J. M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press.

- Gavin, Anne-Claude, Patrick Aloy, Paola Grandi, Roland Krause, Markus Boesche, Martina Marzioch, Christina Rau, Lars Juhl Jensen, Sonja Bastuck, Birgit Dümpelfeld, Angela Edelmann, Marie-Anne Heurtier, Verena Hoffman, Christian Hoefert, Karin Klein, Manuela Hudak, Anne-Marie Michon, Malgorzata Schelder, Markus Schirle, Marita Remor, Tatjana Rudi, Sean Hooper, Andreas Bauer, Tewis Bouwmeester, Georg Casari, Gerard Drewes, Gitte Neubauer, Jens M. Rick, Bernhard Kuster, Peer Bork, Robert B. Russell, y Giulio Superti-Furga. 2006. «Proteome Survey Reveals Modularity of the Yeast Cell Machinery». *Nature* 440(7084):631-36. doi: 10.1038/nature04532.
- Gavin, Anne-Claude, Markus Bösche, Roland Krause, Paola Grandi, Martina Marzioch, Andreas Bauer, Jörg Schultz, Jens M. Rick, Anne-Marie Michon, Cristina-Maria Cruciat, Marita Remor, Christian Höfert, Malgorzata Schelder, Miro Brajenovic, Heinz Ruffner, Alejandro Merino, Karin Klein, Manuela Hudak, David Dickson, Tatjana Rudi, Volker Gnau, Angela Bauch, Sonja Bastuck, Bettina Huhse, Christina Leutwein, Marie-Anne Heurtier, Richard R. Copley, Angela Edelmann, Erich Querfurth, Vladimir Rybin, Gerard Drewes, Manfred Raida, Tewis Bouwmeester, Peer Bork, Bertrand Seraphin, Bernhard Kuster, Gitte Neubauer, y Giulio Superti-Furga. 2002. «Functional Organization of the Yeast Proteome by Systematic Analysis of Protein Complexes». *Nature* 415(6868):141-47. doi: 10.1038/415141a.
- Gilles, Arnaud, Léo Frechin, Kundhavai Natchiar, Giulia Biondani, Ottilie von Loeffelholz, Samuel Holvec, Julie-Lisa Malaval, Jean-Yves Winum, Bruno P. Klaholz, y Jean-François Peyron. 2020. «Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies». *Cells* 9(3):E629. doi: 10.3390/cells9030629.
- Gnad, Florian, Lyris M. F. de Godoy, Jürgen Cox, Nadin Neuhauser, Shubin Ren, Jesper V. Olsen, y Matthias Mann. 2009. «High-Accuracy Identification and Bioinformatic Analysis of in Vivo Protein Phosphorylation Sites in Yeast». *PROTEOMICS* 9(20):4642-52. doi: 10.1002/pmic.200900144.
- Gnanasundram, Sivakumar Vadivel, Isabelle C. Kos-Braun, y Martin Koš. 2019. «At least two molecules of the RNA helicase Has1 are simultaneously present in pre-ribosomes during ribosome biogenesis». *Nucleic Acids Research* 47(20):10852-64. doi: 10.1093/nar/gkz767.
- Granneman, Sander, Elisabeth Petfalski, y David Tollervey. 2011. «A Cluster of Ribosome Synthesis Factors Regulate Pre-RRNA Folding and 5.8S RRNA Maturation by the Rat1 Exonuclease: Pre-60S Ribosome Synthesis». *The EMBO Journal* 30(19):4006-19. doi: 10.1038/emboj.2011.256.
- Groft, Caroline M., Roland Beckmann, Andrej Sali, y Stephen K. Burley. 2000. «Crystal Structures of Ribosome Anti-Association Factor IF6». *Nature Structural Biology* 7(12):1156-64. doi: 10.1038/82017.
- Habault, Justine, y Jean-Luc Poyet. 2019. «Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies». *Molecules* 24(5):927. doi: 10.3390/molecules24050927.

- Hein, Nadine, Donald P. Cameron, Katherine M. Hannan, Nhu-Y. N. Nguyen, Chun Yew Fong, Jirawas Sornkom, Meaghan Wall, Megan Pavy, Carleen Cullinane, Jeannine Diesch, Jennifer R. Devlin, Ameer J. George, Elaine Sanij, Jaclyn Quin, Gretchen Poortinga, Inge Verbrugge, Adele Baker, Denis Drygin, Simon J. Harrison, James D. Rozario, Jason A. Powell, Stuart M. Pitson, Johannes Zuber, Ricky W. Johnstone, Mark A. Dawson, Mark A. Guthridge, Andrew Wei, Grant A. McArthur, Richard B. Pearson, y Ross D. Hannan. 2017. «Inhibition of Pol I Transcription Treats Murine and Human AML by Targeting the Leukemia-Initiating Cell Population». *Blood* 129(21):2882-95. doi: 10.1182/blood-2016-05-718171.
- Helbig, Andreas O., Sara Rosati, Pim WWM Pijnappel, Bas van Breukelen, Marc HTH Timmers, Shabaz Mohammed, Monique Slijper, y Albert JR Heck. 2010. «Perturbation of the yeast N-acetyltransferase NatB induces elevation of protein phosphorylation levels». *BMC Genomics* 11(1):685. doi: 10.1186/1471-2164-11-685.
- Hellman, Lance M., y Michael G. Fried. 2007. «Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein–Nucleic Acid Interactions». *Nature Protocols* 2(8):1849-61. doi: 10.1038/nprot.2007.249.
- Hengstler, J. G., A. Hengst, J. Fuchs, B. Tanner, J. Pohl, y F. Oesch. 1997. «Induction of DNA Crosslinks and DNA Strand Lesions by Cyclophosphamide after Activation by Cytochrome P450 2B1». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 373(2):215-23. doi: 10.1016/S0027-5107(96)00200-X.
- Hilton, John, Karen Gelmon, Philippe L. Bedard, Dongsheng Tu, Hong Xu, Anna V. Tinker, Rachel Goodwin, Scott A. Laurie, Derek Jonker, Aaron R. Hansen, Zachary W. Veitch, Daniel J. Renouf, Linda Hagerman, Hongbo Lui, Bingshu Chen, Deb Kellar, Irene Li, Sung-Eun Lee, Takako Kono, Brian Y. C. Cheng, Damian Yap, Daniel Lai, Sean Beatty, John Soong, Kathleen I. Pritchard, Isabel Soria-Bretones, Eric Chen, Harriet Feilotter, Moira Rushton, Lesley Seymour, Samuel Aparicio, y David W. Cescon. 2022. «Results of the Phase I CCTG IND.231 Trial of CX-5461 in Patients with Advanced Solid Tumors Enriched for DNA-Repair Deficiencies». *Nature Communications* 13(1):3607. doi: 10.1038/s41467-022-31199-2.
- Holt, Liam J., Brian B. Tuch, Judit Villén, Alexander D. Johnson, Steven P. Gygi, y David O. Morgan. 2009. «Global Analysis of Cdk1 Substrate Phosphorylation Sites Provides Insights into Evolution». *Science* 325(5948):1682-86. doi: 10.1126/science.1172867.
- Hölzel, Michael, Michaela Rohmoser, Martin Schlee, Thomas Grimm, Thomas Harasim, Anastassia Malamoussi, Anita Gruber-Eber, Elisabeth Kremmer, Wolfgang Hiddemann, Georg W. Bornkamm, y Dirk Eick. 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):367-78. doi: 10.1083/jcb.200501141.
- van Hoof, A. 2000. «Three Conserved Members of the RNase D Family Have Unique and Overlapping Functions in the Processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in Yeast». *The EMBO Journal* 19(6):1357-65. doi: 10.1093/emboj/19.6.1357.
- Horn, Darryl M., Sandra L. Mason, y Katrin Karbstein. 2011. «Rcl1 Protein, a Novel Nuclease for 18 S Ribosomal RNA Production». *Journal of Biological Chemistry* 286(39):34082-87. doi: 10.1074/jbc.M111.268649.

- Huttlin, Edward L., Raphael J. Bruckner, Jose Navarrete-Perea, Joe R. Cannon, Kurt Baltier, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, Alexandra Thornock, Gabriela Zarraga, Stanley Tam, John Szpyt, Brandon M. Gassaway, Alexandra Panov, Hannah Parzen, Sipei Fu, Arvene Golbazi, Eila Maenpaa, Keegan Stricker, Sanjukta Guha Thakurta, Tian Zhang, Ramin Rad, Joshua Pan, David P. Nusinow, Joao A. Paulo, Devin K. Schweppe, Laura Pontano Vaitea, J. Wade Harper, y Steven P. Gygi. 2021. «Dual Proteome-Scale Networks Reveal Cell-Specific Remodeling of the Human Interactome». *Cell* 184(11):3022-3040.e28. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.011.
- Ismail, Sherif, Dirk Flemming, Matthias Thoms, José Vicente Gomes-Filho, Lennart Randau, Roland Beckmann, y Ed Hurt. 2022. «Emergence of the Primordial Pre-60S from the 90S Pre-Ribosome». *Cell Reports* 39(1). doi: 10.1016/j.celrep.2022.110640.
- Jacobs, Ruth Q., Abigail K. Huffines, Marikki Laiho, y David A. Schneider. 2022. «The Small-Molecule BMH-21 Directly Inhibits Transcription Elongation and DNA Occupancy of RNA Polymerase I in Vivo and in Vitro». *Journal of Biological Chemistry* 298(1):101450. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101450.
- Jager, S. 2001. «Cic1, an Adaptor Protein Specifically Linking the 26S Proteasome to Its Substrate, the SCF Component Cdc4». *The EMBO Journal* 20(16):4423-31. doi: 10.1093/emboj/20.16.4423.
- Jensen, Niels F., Jan Stenvang, Mette K. Beck, Barbora Hanáková, Kirstine C. Belling, Khoa N. Do, Birgitte Viuff, Sune B. Nygård, Ramneek Gupta, Mads H. Rasmussen, Line S. Tarpgaard, Tine P. Hansen, Eva Budinská, Per Pfeiffer, Fred Bosman, Sabine Tejpar, Arnaud Roth, Mauro Delorenzi, Claus L. Andersen, Maria U. Rømer, Nils Brünner, y José M. A. Moreira. 2015. «Establishment and Characterization of Models of Chemotherapy Resistance in Colorectal Cancer: Towards a Predictive Signature of Chemoresistance». *Molecular Oncology* 9(6):1169-85. doi: 10.1016/j.molonc.2015.02.008.
- Joerger, Andreas C., y Alan R. Fersht. 2016. «The P53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches». *Annual Review of Biochemistry* 85:375-404. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014710.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Augustin Žídek, Anna Potapenko, Alex Bridgland, Clemens Meyer, Simon A. A. Kohl, Andrew J. Ballard, Andrew Cowie, Bernardino Romera-Paredes, Stanislav Nikolov, Rishub Jain, Jonas Adler, Trevor Back, Stig Petersen, David Reiman, Ellen Clancy, Michal Zielinski, Martin Steinegger, Michalina Pacholska, Tamas Berghammer, Sebastian Bodenstein, David Silver, Oriol Vinyals, Andrew W. Senior, Koray Kavukcuoglu, Pushmeet Kohli, y Demis Hassabis. 2021. «Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold». *Nature* 596(7873):583-89. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kampen, Kim R., Sergey O. Sulima, Stijn Vereecke, y Kim De Keersmaecker. 2020. «Hallmarks of Ribosomopathies». *Nucleic Acids Research* 48(3):1013-28. doi: 10.1093/nar/gkz637.
- Kang, Lumei, Yuyang Tian, Shilin Xu, y Hongping Chen. 2021. «Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy: Clinical Features, Mechanisms, Prevention and Treatment». *Journal of Neurology* 268(9):3269-82. doi: 10.1007/s00415-020-09942-w.

- Karimian, Ansar, Yasin Ahmadi, y Bahman Yousefi. 2016. «Multiple Functions of P21 in Cell Cycle, Apoptosis and Transcriptional Regulation after DNA Damage». *DNA Repair* 42:63-71. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
- Kater, Lukas, Matthias Thoms, Clara Barrio-Garcia, Jingdong Cheng, Sherif Ismail, Yasar Luqman Ahmed, Gert Bange, Dieter Kressler, Otto Berninghausen, Irmgard Sinning, Ed Hurt, y Roland Beckmann. 2017. «Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes». *Cell* 171(7):1599-1610.e14. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.039.
- Khoshnevis, Sohail, Xin Liu, Maria D. Dattolo, y Katrin Karbstein. 2019. «Rrp5 Establishes a Checkpoint for 60S Assembly during 40S Maturation». *RNA* 25(9):1164-76. doi: 10.1261/rna.071225.119.
- Khot, Amit, Natalie Brajanovski, Donald P. Cameron, Nadine Hein, Kylee H. Maclachlan, Elaine Sanij, John Lim, John Soong, Emma Link, Piers Blombery, Ella R. Thompson, Andrew Fellowes, Karen E. Sheppard, Grant A. McArthur, Richard B. Pearson, Ross D. Hannan, Gretchen Poortinga, y Simon J. Harrison. 2019. «First-in-Human RNA Polymerase I Transcription Inhibitor CX-5461 in Patients with Advanced Hematologic Cancers: Results of a Phase I Dose-Escalation Study». *Cancer Discovery* 9(8):1036-49. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1455.
- Kim, Dong-Wook, Nan Wu, Young-Chul Kim, Pei Feng Cheng, Ryan Basom, Dongkyoon Kim, Colin T. Dunn, Anastasia Y. Lee, Keebeom Kim, Chang Sup Lee, Andrew Singh, Adi F. Gazdar, Chris R. Harris, Robert N. Eisenman, Kwon-Sik Park, y David MacPherson. 2016. «Genetic Requirement for Mycl and Efficacy of RNA Pol I Inhibition in Mouse Models of Small Cell Lung Cancer». *Genes & Development* 30(11):1289-99. doi: 10.1101/gad.279307.116.
- Kišonaitė, Miglė, Klemens Wild, Karine Lapouge, Thomas Ruppert, y Irmgard Sinning. 2022. «High-Resolution Structures of a Thermophilic Eukaryotic 80S Ribosome Reveal Atomistic Details of Translocation». *Nature Communications* 13(1):476. doi: 10.1038/s41467-022-27967-9.
- Klein, Dagmar, Melina M. Ribeiro, Valeska Mendoza, Sundararajan Jayaraman, Norma S. Kenyon, Antonello Pileggi, R. Damaris Molano, Luca Inverardi, Camillo Ricordi, y Ricardo L. Pastori. 2004. «Delivery of Bcl-XL or Its BH4 Domain by Protein Transduction Inhibits Apoptosis in Human Islets». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323(2):473-78. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.116.
- Klingauf-Nerurkar, Purnima, Ludovic C. Gillet, Daniela Portugal-Calisto, Michaela Oborská-Oplová, Martin Jäger, Olga T. Schubert, Agnese Pisano, Cohue Peña, Sanjana Rao, Martin Altvater, Yiming Chang, Ruedi Aebersold, y Vikram G. Panse. 2020. «The GTPase Nog1 Co-Ordinates the Assembly, Maturation and Quality Control of Distant Ribosomal Functional Centers». *ELife* 9:e52474. doi: 10.7554/eLife.52474.
- Klinge, Sebastian, y John L. Woolford. 2019. «Ribosome Assembly Coming into Focus». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20(2):116-31. doi: 10.1038/s41580-018-0078-y.
- Knežević, Anica Horvat, Domagoj Đikić, Duje Lisičić, Nevenka Kopjar, Nada Oršolić, Sanja Karabeg, y Vesna Benković. 2011. «Synergistic Effects of Irinotecan and Flavonoids on Ehrlich Ascites Tumour-Bearing Mice: SYNERGISTIC EFFECTS OF IRINOTECAN AND FLAVONOIDS ON MICE». *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 109(5):343-49. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00735.x.

- Koš, Martin, y David Tollervey. 2010. «Yeast Pre-RRNA Processing and Modification Occur Cotranscriptionally». *Molecular Cell* 37(6):809-20. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.024.
- Kressler, Dieter, Gert Bange, Yutaka Ogawa, Goran Stjepanovic, Bettina Bradatsch, Dagmar Pratte, Stefan Amlacher, Daniela Strauß, Yoshihiro Yoneda, Jun Katahira, Irmgard Sinning, y Ed Hurt. 2012. «Synchronizing Nuclear Import of Ribosomal Proteins with Ribosome Assembly». *Science* 338(6107):666-71. doi: 10.1126/science.1226960.
- Kressler, Dieter, Ed Hurt, y Jochen Baßler. 2017. «A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits». *Trends in Biochemical Sciences* 42(8):640-54. doi: 10.1016/j.tibs.2017.05.005.
- Kressler, Dieter, Ed Hurt, y Jochen Baßler. 2010. «Driving Ribosome Assembly». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803(6):673-83. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.10.009.
- Krissinel, Evgeny, y Kim Henrick. 2007. «Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State». *Journal of Molecular Biology* 372(3):774-97. doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.022.
- Krogan, Nevan J., Gerard Cagney, Haiyuan Yu, Gouqing Zhong, Xinghua Guo, Alexandr Ignatchenko, Joyce Li, Shuye Pu, Nira Datta, Aaron P. Tikuisis, Thanuja Punna, José M. Peregrín-Alvarez, Michael Shales, Xin Zhang, Michael Davey, Mark D. Robinson, Alberto Paccanaro, James E. Bray, Anthony Sheung, Bryan Beattie, Dawn P. Richards, Veronica Canadien, Atanas Lalev, Frank Mena, Peter Wong, Andrei Starostine, Myra M. Canete, James Vlasblom, Samuel Wu, Chris Orsi, Sean R. Collins, Shamanta Chandran, Robin Haw, Jennifer J. Rilstone, Kiran Gandhi, Natalie J. Thompson, Gabe Musso, Peter St Onge, Shaun Ghanny, Mandy H. Y. Lam, Gareth Butland, Amin M. Altaf-Ul, Shigehiko Kanaya, Ali Shilatifard, Erin O'Shea, Jonathan S. Weissman, C. James Ingles, Timothy R. Hughes, John Parkinson, Mark Gerstein, Shoshana J. Wodak, Andrew Emili, y Jack F. Greenblatt. 2006. «Global Landscape of Protein Complexes in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*». *Nature* 440(7084):637-43. doi: 10.1038/nature04670.
- Kufel, Joanna, Bernhard Dichtl, y David Tollervey. 1999. «Yeast Rnt1p Is Required for Cleavage of the Pre-Ribosomal RNA in the 3' ETS but Not the 5' ETS». *RNA* 5(7):909-17. doi: 10.1017/S135583829999026X.
- Kühn, Holger, Thomas Hierlmeier, Juliane Merl, Steffen Jakob, Almass-Houd Aguisa-Touré, Philipp Milkereit, y Herbert Tschochner. 2009. «The Noc-Domain Containing C-Terminus of Noc4p Mediates Both Formation of the Noc4p-Nop14p Submodule and Its Incorporation into the SSU Processome» editado por L. Tora. *PLoS ONE* 4(12):e8370. doi: 10.1371/journal.pone.0008370.
- Kusnadi, Eric P., Anna S. Trigos, Carleen Cullinane, David L. Goode, Ola Larsson, Jennifer R. Devlin, Keefe T. Chan, David P. De Souza, Malcolm J. McConville, Grant A. McArthur, George Thomas, Elaine Sanij, Gretchen Poortinga, Ross D. Hannan, Katherine M. Hannan, Jian Kang, y Richard B. Pearson. 2020. «Reprogrammed mRNA Translation Drives Resistance to Therapeutic Targeting of Ribosome Biogenesis». *The EMBO Journal* 39(21). doi: 10.15252/embj.2020105111.
- Kuznetsova, Irina M., Konstantin K. Turoverov, y Vladimir N. Uversky. 2014. «What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein». *International Journal of Molecular Sciences* 15(12):23090-140. doi: 10.3390/ijms151223090.

- Kwon, Mincheol, Taehoon Oh, Mina Jang, Gun-Hee Kim, Jung-Hee Kim, Hyung Won Ryu, Sei-Ryang Oh, Jae-Hyuk Jang, Jong Seog Ahn, y Sung-Kyun Ko. 2022. «Kurarinone Induced P53-Independent G0/G1 Cell Cycle Arrest by Degradation of K-RAS via WDR76 in Human Colorectal Cancer Cells». *European Journal of Pharmacology* 923:174938. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174938.
- Lapik, Yevgeniya R., Julia M. Misra, Lester F. Lau, y Dimitri G. Pestov. 2007. «Restricting Conformational Flexibility of the Switch II Region Creates a Dominant-Inhibitory Phenotype in Obg GTPase Nog1». *Molecular and Cellular Biology* 27(21):7735-44. doi: 10.1128/MCB.01161-07.
- Lawrence, Mitchell G., Laura H. Porter, Nicholas Choo, David Pook, Jeremy P. Grummet, Carmel J. Pezaro, Shahneen Sandhu, Susanne Ramm, Jennii Luu, Andrew Bakshi, David L. Goode, Elaine Sanij, Richard B. Pearson, Ross D. Hannan, Kaylene J. Simpson, Renea A. Taylor, Gail P. Risbridger, y Luc Furic. 2021. «CX-5461 Sensitizes DNA Damage Repair-proficient Castrate-resistant Prostate Cancer to PARP Inhibition». *Molecular Cancer Therapeutics* 20(11):2140-50. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0932.
- Lebaron, Simon, Åsa Segerstolpe, Sarah L. French, Tatiana Dudnakova, Flavia de lima Alves, Sander Granneman, Juri Rappsilber, Ann L. Beyer, Lars Wieslander, y David Tollervey. 2013. «Rrp5 Binding at Multiple Sites Coordinates Pre-RRNA Processing and Assembly». *Molecular Cell* 52(5):707-19. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.017.
- Lee, Chang-Woo, y Nicholas B. La Thangue. 1999. «Promoter Specificity and Stability Control of the P53-Related Protein P73». 11.
- Leidig, Christoph, Matthias Thoms, Iris Holdermann, Bettina Bradatsch, Otto Berninghausen, Gert Bange, Irmgard Sinning, Ed Hurt, y Roland Beckmann. 2014. «60S Ribosome Biogenesis Requires Rotation of the 5S Ribonucleoprotein Particle». *Nature Communications* 5(1):3491. doi: 10.1038/ncomms4491.
- Leipe, Detlef D., Yuri I. Wolf, Eugene V. Koonin, y L. Aravind. 2002. «Classification and Evolution of P-Loop GTPases and Related ATPases». *Journal of Molecular Biology* 317(1):41-72. doi: 10.1006/jmbi.2001.5378.
- Leroy, Bernard, Martha Anderson, y Thierry Soussi. 2014. «TP53 Mutations in Human Cancer: Database Reassessment and Prospects for the Next Decade». *Human Mutation* 35(6):672-88. doi: 10.1002/humu.22552.
- Li, Shitao, Lingyan Wang, Bishi Fu, Michael A. Berman, Alos Diallo, y Martin E. Dorf. 2014. «TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(19):6970-75. doi: 10.1073/pnas.1322545111.
- Li, Xu, Leiming Li, Yan Li, Jiansong Zhao, Shuli Fan, y Ligu Wang. 2016. «CX-5461 Induces Autophagy and Inhibits Tumor Growth via Mammalian Target of Rapamycin-Related Signaling Pathways in Osteosarcoma». *OncoTargets and Therapy* Volume 9:5985-97. doi: 10.2147/OTT.S104513.
- Liang, Xiaomeng, Mei-Qing Zuo, Yunyang Zhang, Ningning Li, Chengying Ma, Meng-Qiu Dong, y Ning Gao. 2020. «Structural Snapshots of Human Pre-60S Ribosomal Particles before and after Nuclear Export». *Nature Communications* 11(1):3542. doi: 10.1038/s41467-020-17237-x.

- Liao, J. M., X. Zhou, A. Gatignol, y H. Lu. 2014. «Ribosomal Proteins L5 and L11 Co-Operatively Inactivate c-Myc via RNA-Induced Silencing Complex». *Oncogene* 33(41):4916-23. doi: 10.1038/onc.2013.430.
- Low, Jin-Yih, Paul Sirajuddin, Michael Moubarek, Shreya Agarwal, Apurv Rege, Gunes Guner, Hester Liu, Zhiming Yang, Angelo M. De Marzo, Charles Bieberich, y Marikki Laiho. 2019. «Effective Targeting of RNA Polymerase I in Treatment-Resistant Prostate Cancer». *The Prostate* 79(16):1837-51. doi: 10.1002/pros.23909.
- Luft, Joseph R., Jennifer R. Wolfley, y Edward H. Snell. 2011. «What's in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments». *Crystal growth & design* 11(3):651-63. doi: 10.1021/cg1013945.
- Makhale, Ashwini, Devathri Nanayakkara, Prahlad Raninga, Kum Kum Khanna, y Murugan Kalimutho. 2021. «CX-5461 Enhances the Efficacy of APR-246 via Induction of DNA Damage and Replication Stress in Triple-Negative Breast Cancer». *International Journal of Molecular Sciences* 22(11):5782. doi: 10.3390/ijms22115782.
- Manikas, Rizos-Georgios, Emma Thomson, Matthias Thoms, y Ed Hurt. 2016. «The K⁺-Dependent GTPase Nug1 Is Implicated in the Association of the Helicase Dbp10 to the Immature Peptidyl Transferase Centre during Ribosome Maturation». *Nucleic Acids Research* 44(4):1800-1812. doi: 10.1093/nar/gkw045.
- Mantovani, Fiamma, Licio Collavin, y Giannino Del Sal. 2019. «Mutant P53 as a Guardian of the Cancer Cell». *Cell Death and Differentiation* 26(2):199-212. doi: 10.1038/s41418-018-0246-9.
- Marcel, Virginie, Sandra E. Ghayad, Stéphane Belin, Gabriel Therizols, Anne-Pierre Morel, Eduardo Solano-González, Julie A. Vendrell, Sabine Hacot, Hichem C. Mertani, Marie Alexandra Albaret, Jean-Christophe Bourdon, Lee Jordan, Alastair Thompson, Yasmine Tafer, Rong Cong, Philippe Bouvet, Jean-Christophe Saurin, Frédéric Catez, Anne-Catherine Prats, Alain Puisieux, y Jean-Jacques Diaz. 2013. «P53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and RRNA Methylation in Cancer». *Cancer Cell* 24(3):318-30. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.013.
- Marcin, Wegrecki, Jose Luis Neira, y Jeronimo Bravo. 2015. «The Carboxy-Terminal Domain of Erb1 Is a Seven-Bladed β -Propeller That Binds RNA» editado por M. Sola. *PLOS ONE* 10(4):e0123463. doi: 10.1371/journal.pone.0123463.
- Marcon, Edyta, Zuyao Ni, Shuye Pu, Andrei L. Turinsky, Sandra Smiley Trimble, Jonathan B. Olsen, Rosalind Silverman-Gavrila, Lorelei Silverman-Gavrila, Sadhna Phanse, Hongbo Guo, Guoqing Zhong, Xinghua Guo, Peter Young, Swneke Bailey, Denitza Roudeva, Dorothy Zhao, Johannes Hewel, Joyce Li, Susanne Gräslund, Marcin Paduch, Anthony A. Kossiakoff, Mathieu Lupien, Andrew Emili, Shoshana J. Wodak, y Jack Greenblatt. 2014. «Human-Chromatin-Related Protein Interactions Identify a Demethylase Complex Required for Chromosome Segregation». *Cell Reports* 8(1):297-310. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.050.
- Mars, Jean-Clément, Michel G. Tremblay, Mélissa Valere, Dany S. Sibai, Marianne Sabourin-Felix, Frédéric Lessard, y Tom Moss. 2020. «The Chemotherapeutic Agent CX-5461 Irreversibly Blocks RNA Polymerase I Initiation and Promoter Release to Cause Nucleolar Disruption, DNA Damage and Cell Inviability». *NAR Cancer* 2(4):zcaa032. doi: 10.1093/narcan/zcaa032.

- Martin, Roman, Annika U. Straub, Carmen Doebele, y Markus T. Bohnsack. 2013. «DExD/H-Box RNA Helicases in Ribosome Biogenesis». *RNA Biology* 10(1):4-18. doi: 10.4161/rna.21879.
- McArthur, Kate, y Benjamin T. Kile. 2018. «Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?» *Trends in Cell Biology* 28(6):475-93. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.003.
- McCann, Kathleen L., J. Michael Charette, Nicholas G. Vincent, y Susan J. Baserga. 2015. «A Protein Interaction Map of the LSU Processome». *Genes & Development* 29(8):862-75. doi: 10.1101/gad.256370.114.
- McElwain, L., K. Phair, C. Kealey, y D. Brady. 2022. «Current Trends in Biopharmaceuticals Production in Escherichia Coli». *Biotechnology Letters* 44(8):917-31. doi: 10.1007/s10529-022-03276-5.
- McQuade, Rachel M., Vanesa Stojanovska, Joel C. Bornstein, y Kulmira Nurgali. 2017. «Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches». *Current Medicinal Chemistry* 24(15). doi: 10.2174/0929867324666170111152436.
- Menne, Tobias F., Beatriz Goyenechea, Nuria Sánchez-Puig, Chi C. Wong, Louise M. Tonkin, Philip J. Ancliff, Renée L. Brost, Michael Costanzo, Charles Boone, y Alan J. Warren. 2007. «The Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Protein Mediates Translational Activation of Ribosomes in Yeast». *Nature Genetics* 39(4):486-95. doi: 10.1038/ng1994.
- Mijakovic, I. 2006. «Bacterial Single-Stranded DNA-Binding Proteins Are Phosphorylated on Tyrosine». *Nucleic Acids Research* 34(5):1588-96. doi: 10.1093/nar/gkj514.
- Miles, Tiffany D., Jelena Jakovljevic, Edward W. Horsey, Piyanun Harnpicharnchai, Lan Tang, y John L. Woolford. 2005. «Ytm1, Nop7, and Erb1 Form a Complex Necessary for Maturation of Yeast 66S Preribosomes». *Molecular and Cellular Biology* 25(23):10419-32. doi: 10.1128/MCB.25.23.10419-10432.2005.
- Milkereit, Philipp, Olivier Gadal, Alexander Podtelejnikov, Stephanie Trumtel, Nicole Gas, Elisabeth Petfalski, David Tollervey, Mathias Mann, Ed Hurt, y Herbert Tschochner. 2001. «Maturation and Intranuclear Transport of Pre-Ribosomes Requires Noc Proteins». *Cell* 105(4):499-509. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00358-0.
- Milkereit, Philipp, Daniela Strauss, Jochen Bassler, Olivier Gadal, Holger Kühn, Sylvia Schütz, Nicole Gas, Johannes Lechner, Ed Hurt, y Herbert Tschochner. 2003. «A Noc Complex Specifically Involved in the Formation and Nuclear Export of Ribosomal 40 S Subunits». *Journal of Biological Chemistry* 278(6):4072-81. doi: 10.1074/jbc.M208898200.
- Morgado-Palacin, Lucia, Susana Llanos, Manuel Urbano-Cuadrado, Carmen Blanco-Aparicio, Diego Megias, Joaquín Pastor, y Manuel Serrano. 2014. «Non-Genotoxic Activation of P53 through the RPL11-Dependent Ribosomal Stress Pathway». *Carcinogenesis* 35(12):2822-30. doi: 10.1093/carcin/bgu220.
- Nakano, Shu-ichi, Daisuke Miyoshi, y Naoki Sugimoto. 2014. «Effects of Molecular Crowding on the Structures, Interactions, and Functions of Nucleic Acids». *Chemical Reviews* 114(5):2733-58. doi: 10.1021/cr400113m.

- Narla, Anupama, y Benjamin L. Ebert. 2010. «Ribosomopathies: Human Disorders of Ribosome Dysfunction». *Blood* 115(16):3196-3205. doi: 10.1182/blood-2009-10-178129.
- Negi, Sandeep S., y Patrick Brown. 2015. «RRNA Synthesis Inhibitor, CX-5461, Activates ATM/ATR Pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia, Arrests Cells in G2 Phase and Induces Apoptosis». *Oncotarget* 6(20):18094-104. doi: 10.18632/oncotarget.4093.
- Nicolas, Emilien, Pascaline Parisot, Celina Pinto-Monteiro, Roxane de Walque, Christophe De Vleeschouwer, y Denis L. J. Lafontaine. 2016. «Involvement of Human Ribosomal Proteins in Nucleolar Structure and P53-Dependent Nucleolar Stress». *Nature Communications* 7(1):11390. doi: 10.1038/ncomms11390.
- Nissan, T. A. 2002. «60S Pre-Ribosome Formation Viewed from Assembly in the Nucleolus until Export to the Cytoplasm». *The EMBO Journal* 21(20):5539-47. doi: 10.1093/emboj/cdf547.
- Ohmayer, Uli, Michael Gamalinda, Martina Sauert, Julius Ossowski, Gisela Pöll, Jan Linnemann, Thomas Hierlmeier, Jorge Perez-Fernandez, Beril Kumcuoglu, Isabelle Leger-Silvestre, Marlène Faubladiet, Joachim Griesenbeck, John Woolford, Herbert Tschochner, y Philipp Milkereit. 2013. «Studies on the Assembly Characteristics of Large Subunit Ribosomal Proteins in *S. Cerevisiae*». *PLOS ONE* 8(7):e68412. doi: 10.1371/journal.pone.0068412.
- Ohmayer, Uli, Álvaro Gil-Hernández, Martina Sauert, Pilar Martín-Marcos, Mercedes Tamame, Herbert Tschochner, Joachim Griesenbeck, y Philipp Milkereit. 2015. «Studies on the Coordination of Ribosomal Protein Assembly Events Involved in Processing and Stabilization of Yeast Early Large Ribosomal Subunit Precursors». *PLOS ONE* 10(12):e0143768. doi: 10.1371/journal.pone.0143768.
- Orea-Ordóñez, Lidia, Susana Masiá, y Jerónimo Bravo. 2021. «Peptides Targeting the Interaction Between Erb1 and Ytm1 Ribosome Assembly Factors». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
- Oughtred, Rose, Jennifer Rust, Christie Chang, Bobby-Joe Breitkreutz, Chris Stark, Andrew Willems, Lorrie Boucher, Genie Leung, Nadine Kolas, Frederick Zhang, Sonam Dolma, Jasmin Coulombe-Huntington, Andrew Chatr-aryamontri, Kara Dolinski, y Mike Tyers. 2021. «The BioGRID Database: A Comprehensive Biomedical Resource of Curated Protein, Genetic, and Chemical Interactions». *Protein Science* 30(1):187-200. doi: 10.1002/pro.3978.
- Ozaki, Daiya, Kentaro Sudo, Sadamitsu Asoh, Kumi Yamagata, Hiromoto Ito, y Shigeo Ohta. 2004. «Transduction of Anti-Apoptotic Proteins into Chondrocytes in Cartilage Slice Culture». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313(3):522-27. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.144.
- Palliyage, Gayathri Heenatigala, Rajib Ghosh, y Yon Rojanasakul. 2020. «Cancer Chemoresistance and Therapeutic Strategies Targeting Tumor Microenvironment». *ScienceAsia* 46(6):639. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2020.092.

- Pan, Min, William C. Wright, Richard H. Chapple, Asif Zubair, Manbir Sandhu, Jake E. Batchelder, Brandt C. Huddle, Jonathan Low, Kaley B. Blankenship, Yingzhe Wang, Brittney Gordon, Payton Archer, Samuel W. Brady, Sivaraman Natarajan, Matthew J. Posgai, John Schuetz, Darcie Miller, Ravi Kalathur, Siquan Chen, Jon Patrick Connelly, M. Madan Babu, Michael A. Dyer, Shondra M. Pruett-Miller, Burgess B. Freeman, Taosheng Chen, Lucy A. Godley, Scott C. Blanchard, Elizabeth Stewart, John Easton, y Paul Geeleher. 2021. «The Chemotherapeutic CX-5461 Primarily Targets TOP2B and Exhibits Selective Activity in High-Risk Neuroblastoma». *Nature Communications* 12(1):6468. doi: 10.1038/s41467-021-26640-x.
- Pantoliano, Michael W., Eugene C. Petrella, Joseph D. Kwasnoski, Victor S. Lobanov, James Myslik, Edward Graf, Ted Carver, Eric Asel, Barry A. Springer, Pamela Lane, y F. R. Salemme. 2001. «High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery». *Journal of Biomolecular Screening* 6(6):429-40. doi: 10.1177/108705710100600609.
- Park, J. H., B. C. Jensen, C. T. Kifer, y M. Parsons. 2001. «A novel nucleolar G-protein conserved in eukaryotes». *Journal of Cell Science* 114(1):173-85. doi: 10.1242/jcs.114.1.173.
- Partridge, A. H., H. J. Burstein, y E. P. Winer. 2001. «Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer». *JNCI Monographs* 2001(30):135-42. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451.
- Paternoga, Helge, Alexander Früh, Ruth Kunze, Bettina Bradatsch, Jochen Baßler, y Ed Hurt. 2020. «Mutational Analysis of the Nsa2 N-Terminus Reveals Its Essential Role in Ribosomal 60S Subunit Assembly». *International Journal of Molecular Sciences* 21(23):9108. doi: 10.3390/ijms21239108.
- Patra, Srimanta, Biswajita Pradhan, Rabindra Nayak, Chhandashree Behera, Laxmidhar Rout, Mrutyunjay Jena, Thomas Efferth, y Sujit Kumar Bhutia. 2021. «Chemotherapeutic Efficacy of Curcumin and Resveratrol against Cancer: Chemoprevention, Chemoprotection, Drug Synergism and Clinical Pharmacokinetics». *Seminars in Cancer Biology* 73:310-20. doi: 10.1016/j.semcan.2020.10.010.
- Pellegrino, Simone, Mélanie Meyer, Christiane Zorbas, Soumaya A. Bouchta, Kritika Saraf, Stephen C. Pelly, Gulnara Yusupova, Antonio Evidente, Véronique Mathieu, Alexander Kornienko, Denis L. J. Lafontaine, y Marat Yusupov. 2018. «The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth». *Structure* 26(3):416-425.e4. doi: 10.1016/j.str.2018.01.009.
- Pelletier, Joffrey, George Thomas, y Siniša Volarević. 2018. «Ribosome Biogenesis in Cancer: New Players and Therapeutic Avenues». *Nature Reviews Cancer* 18(1):51-63. doi: 10.1038/nrc.2017.104.
- Peltonen, Karita, Lauren Colis, Hester Liu, Sari Jäämaa, Henna M. Moore, Juulia Enbäck, Pirjo Laakkonen, Anne Vaahtokari, Richard J. Jones, Taija M. af Hällström, y Marikki Laiho. 2010. «Identification of Novel P53 Pathway Activating Small-Molecule Compounds Reveals Unexpected Similarities with Known Therapeutic Agents» editado por J. A. Bauer. *PLoS ONE* 5(9):e12996. doi: 10.1371/journal.pone.0012996.

- Peltonen, Karita, Laureen Colis, Hester Liu, Rishi Trivedi, Michael S. Moubarek, Henna M. Moore, Baoyan Bai, Michelle A. Rudek, Charles J. Bieberich, y Marikki Laiho. 2014. «A Targeting Modality for Destruction of RNA Polymerase I That Possesses Anticancer Activity». *Cancer Cell* 25(1):77-90. doi: 10.1016/j.ccr.2013.12.009.
- Penzo, Marianna, Lorenzo Montanaro, Davide Treré, y Massimo Derenzini. 2019. «The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection». *Cells* 8(1):E55. doi: 10.3390/cells8010055.
- Pertschy, Brigitte, Cosmin Saveanu, Gertrude Zisser, Alice Lebreton, Martin Tengg, Alain Jacquier, Eva Liebming, Berthold Nobis, Lisa Kappel, Ida van der Klei, Gregor Högenauer, Micheline Fromont-Racine, y Helmut Bergler. 2007. «Cytoplasmic Recycling of 60S Preribosomal Factors Depends on the AAA Protein Drg1». *Molecular and Cellular Biology* 27(19):6581-92. doi: 10.1128/MCB.00668-07.
- Perutz, M. F., y H. Raidt. 1975. «Stereochemical Basis of Heat Stability in Bacterial Ferredoxins and in Haemoglobin A2». *Nature* 255(5505):256-59. doi: 10.1038/255256a0.
- Pestov, D. G. 2001. «ERB1, the Yeast Homolog of Mammalian Bop1, Is an Essential Gene Required for Maturation of the 25S and 5.8S Ribosomal RNAs». *Nucleic Acids Research* 29(17):3621-30. doi: 10.1093/nar/29.17.3621.
- Petersen, Rejane L. 2017. «Strategies Using Bio-Layer Interferometry Biosensor Technology for Vaccine Research and Development». *Biosensors* 7(4):49. doi: 10.3390/bios7040049.
- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, y Thomas E. Ferrin. 2004. «UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis». *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-12. doi: 10.1002/jcc.20084.
- Pinmai, Khosit, Sriharut Chunlaratthanabhorn, Chatri Ngamkitidechakul, Noppamas Soonthornchareon, y Chariya Hahnvajjanawong. 2008. «Synergistic Growth Inhibitory Effects of Phyllanthus Emblica and Terminalia Bellerica Extracts with Conventional Cytotoxic Agents: Doxorubicin and Cisplatin against Human Hepatocellular Carcinoma and Lung Cancer Cells». *World Journal of Gastroenterology* 14(10):1491-97. doi: 10.3748/wjg.14.1491.
- Pöll, Gisela, Michael Pilsl, Joachim Griesenbeck, Herbert Tschochner, y Philipp Milkereit. 2021. «Analysis of Subunit Folding Contribution of Three Yeast Large Ribosomal Subunit Proteins Required for Stabilisation and Processing of Intermediate Nuclear RRNA Precursors». *PLOS ONE* 16(11):e0252497. doi: 10.1371/journal.pone.0252497.
- Pratte, Dagmar, Ujjwala Singh, Guillaume Murat, y Dieter Kressler. 2013. «Mak5 and Ebp2 Act Together on Early Pre-60S Particles and Their Reduced Functionality Bypasses the Requirement for the Essential Pre-60S Factor Nsa1» editado por S. Granneman. *PLoS ONE* 8(12):e82741. doi: 10.1371/journal.pone.0082741.
- Prattes, Lo, Bergler, y Stanley. 2019. «Shaping the Nascent Ribosome: AAA-ATPases in Eukaryotic Ribosome Biogenesis». *Biomolecules* 9(11):715. doi: 10.3390/biom9110715.
- Puig, Oscar, Friederike Caspary, Guillaume Rigaut, Berthold Rutz, Emmanuelle Bouveret, Elisabeth Bragado-Nilsson, Matthias Wilm, y Bertrand Séraphin. 2001. «The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification». *Methods* 24(3):218-29. doi: 10.1006/meth.2001.1183.

- Quin, Jaclyn, Keefe T. Chan, Jennifer R. Devlin, Donald P. Cameron, Jeannine Diesch, Carleen Cullinane, Jessica Ahern, Amit Khot, Nadine Hein, Ameer J. George, Katherine M. Hannan, Gretchen Poortinga, Karen E. Sheppard, Kum Kum Khanna, Ricky W. Johnstone, Denis Drygin, Grant A. McArthur, Richard B. Pearson, Elaine Sanij, y Ross D. Hannan. 2016. «Inhibition of RNA Polymerase I Transcription Initiation by CX-5461 Activates Non-Canonical ATM/ATR Signaling». *Oncotarget* 7(31):49800-818. doi: 10.18632/oncotarget.10452.
- Ramos, Alisha, Samira Sadeghi, y Hossein Tabatabaeian. 2021. «Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them». *International Journal of Molecular Sciences* 22(17):9451. doi: 10.3390/ijms22179451.
- Ramos, Helena, Liliana Raimundo, y Lucília Saraiva. 2020. «P73: From the P53 Shadow to a Major Pharmacological Target in Anticancer Therapy». *Pharmacological Research* 162:105245. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105245.
- Ray, Partha, Uttiya Basu, Anirban Ray, Romit Majumdar, Haiteng Deng, y Umadas Maitra. 2008. «The Saccharomyces Cerevisiae 60 S Ribosome Biogenesis Factor Tif6p Is Regulated by Hrr25p-Mediated Phosphorylation *». *Journal of Biological Chemistry* 283(15):9681-91. doi: 10.1074/jbc.M710294200.
- van Riggelen, Jan, Alper Yetil, y Dean W. Felsher. 2010. «MYC as a Regulator of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis». *Nature Reviews Cancer* 10(4):301-9. doi: 10.1038/nrc2819.
- Rocak, Sanda, Bertrand Emery, N. Kyle Tanner, y Patrick Linder. 2005. «Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs». *Nucleic Acids Research* 33(3):999-1009. doi: 10.1093/nar/gki244.
- Rocchi, Laura, Annalisa Pacilli, Rajni Sethi, Marianna Penzo, Robert J. Schneider, Davide Treré, Maurizio Brigotti, y Lorenzo Montanaro. 2013. «Dyskerin Depletion Increases VEGF mRNA Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation». *Nucleic Acids Research* 41(17):8308-18. doi: 10.1093/nar/gkt587.
- Rodan, S. B., Y. Imai, M. A. Thiede, G. Wesolowski, D. Thompson, Z. Bar-Shavit, S. Shull, K. Mann, y G. A. Rodan. 1987. «Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties». *Cancer Research* 47(18):4961-66.
- Rohrmoser, Michaela, Michael Hölzel, Thomas Grimm, Anastassia Malamoussi, Thomas Harasim, Mathias Orban, Iris Pfisterer, Anita Gruber-Eber, Elisabeth Kremmer, y Dirk Eick. 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):3682-94. doi: 10.1128/MCB.00172-07.
- Rule, Chelsea S., Marcella Patrick, y Maria Sandkvist. 2016. «Measuring In Vitro ATPase Activity for Enzymatic Characterization». *Journal of Visualized Experiments* (114):54305. doi: 10.3791/54305.
- Russell, David W., y Linda L. Spemulli. 1980. «Mechanism of Action of the Wheat Germ Ribosome Dissociation Factor: Interaction with the 60 S Subunit». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 201(2):518-26. doi: 10.1016/0003-9861(80)90540-8.

- Sahasranaman, Aarti, Jill Dembowski, John Strahler, Philip Andrews, Janine Maddock, y John L. Woolford. 2011. «Assembly of *Saccharomyces Cerevisiae* 60S Ribosomal Subunits: Role of Factors Required for 27S Pre-RRNA Processing: Analysing Ribosome Assembly One Step at a Time». *The EMBO Journal* 30(19):4020-32. doi: 10.1038/emboj.2011.338.
- Sahdev, Sudhir, Sunil K. Khattar, y Kulvinder Singh Saini. 2008. «Production of Active Eukaryotic Proteins through Bacterial Expression Systems: A Review of the Existing Biotechnology Strategies». *Molecular and Cellular Biochemistry* 307(1):249-64. doi: 10.1007/s11010-007-9603-6.
- San Millán, Coral, Beatriz Soldevilla, Paloma Martín, Beatriz Gil-Calderón, Marta Compte, Belén Pérez-Sacristán, Encarnación Donoso, Cristina Peña, Jesús Romero, Fernando Granado-Lorencio, Félix Bonilla, y Gemma Domínguez. 2015. « β -Cryptoxanthin Synergistically Enhances the Antitumoral Activity of Oxaliplatin through Δ NP73 Negative Regulation in Colon Cancer». *Clinical Cancer Research* 21(19):4398-4409. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2027.
- Sanghai, Zahra Assur, Linamarie Miller, Kelly R. Molloy, Jonas Barandun, Mirjam Hunziker, Malik Chaker-Margot, Junjie Wang, Brian T. Chait, y Sebastian Klinge. 2018. «Modular Assembly of the Nucleolar Pre-60S Ribosomal Subunit». *Nature* 556(7699):126-29. doi: 10.1038/nature26156.
- Sanij, Elaine, Katherine M. Hannan, Jiachen Xuan, Shunfei Yan, Jessica E. Ahern, Anna S. Trigos, Natalie Brajanovski, Jinbae Son, Keefe T. Chan, Olga Kondrashova, Elizabeth Lieschke, Matthew J. Wakefield, Daniel Frank, Sarah Ellis, Carleen Cullinane, Jian Kang, Gretchen Poortinga, Purba Nag, Andrew J. Deans, Kum Kum Khanna, Linda Mileskin, Grant A. McArthur, John Soong, Els M. J. J. Berns, Ross D. Hannan, Clare L. Scott, Karen E. Sheppard, y Richard B. Pearson. 2020. «CX-5461 Activates the DNA Damage Response and Demonstrates Therapeutic Efficacy in High-Grade Serous Ovarian Cancer». *Nature Communications* 11(1):2641. doi: 10.1038/s41467-020-16393-4.
- Saveanu, Cosmin, Abdelkader Namane, Pierre-Emmanuel Gleizes, Alice Lebreton, Jean-Claude Rousselle, Jacqueline Noaillac-Depeyre, Nicole Gas, Alain Jacquier, y Micheline Fromont-Racine. 2003. «Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal Particles». *Molecular and Cellular Biology* 23(13):4449-60. doi: 10.1128/MCB.23.13.4449-4460.2003.
- Schaafsma, Evelien, Eric M. Takacs, Sandeep Kaur, Chao Cheng, y Manabu Kurokawa. 2022. «Predicting Clinical Outcomes of Cancer Patients with a P53 Deficiency Gene Signature». *Scientific Reports* 12(1):1317. doi: 10.1038/s41598-022-05243-6.
- Shav-Tal, Yaron, Janna Blechman, Xavier Darzacq, Cristina Montagna, Billy T. Dye, James G. Patton, Robert H. Singer, y Dov Zipori. 2005. «Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition». *Molecular Biology of the Cell* 16(5):2395-2413. doi: 10.1091/mbc.e04-11-0992.
- Shutes, Adam, y Channing J. Der. 2005. «Real-Time in Vitro Measurement of GTP Hydrolysis». *Methods* 37(2):183-89. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.05.019.

- Sievers, Fabian, Andreas Wilm, David Dineen, Toby J. Gibson, Kevin Karplus, Weizhong Li, Rodrigo Lopez, Hamish McWilliam, Michael Remmert, Johannes Söding, Julie D. Thompson, y Desmond G. Higgins. 2011. «Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega». *Molecular Systems Biology* 7(1):539. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Singh, Vipendra Kumar, Deepika Arora, Mohammad Imran Ansari, y Pradeep Kumar Sharma. 2019. «Phytochemicals Based Chemopreventive and Chemotherapeutic Strategies and Modern Technologies to Overcome Limitations for Better Clinical Applications». *Phytotherapy Research* 33(12):3064-89. doi: 10.1002/ptr.6508.
- Smolka, Marcus B., Claudio P. Albuquerque, Sheng-hong Chen, y Huilin Zhou. 2007. «Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(25):10364-69. doi: 10.1073/pnas.0701622104.
- Srivastava, Anand K., y David Schlessinger. 1990. «Mechanism and Regulation of Bacterial Ribosomal Rna Processing». *Annual Review of Microbiology* 44(1):105-29. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.000541.
- Stirnimann, Christian U., Evangelia Petsalaki, Robert B. Russell, y Christoph W. Müller. 2010. «WD40 Proteins Propel Cellular Networks». *Trends in Biochemical Sciences* 35(10):565-74. doi: 10.1016/j.tibs.2010.04.003.
- Studier, F. William. 2005. «Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures». *Protein Expression and Purification* 41(1):207-34. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
- Sutton, Emily C., y Victoria J. DeRose. 2021. «Early Nucleolar Responses Differentiate Mechanisms of Cell Death Induced by Oxaliplatin and Cisplatin». *Journal of Biological Chemistry* 296:100633. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100633.
- Suzuki, Hirokazu, Norikazu Yabuta, Nobuhiro Okada, Kosuke Torigata, Yael Aylon, Moshe Oren, y Hiroshi Nojima. 2013. «Lats2 phosphorylates p21/CDKN1A after UV irradiation and regulates apoptosis». *Journal of Cell Science* 126(19):4358-68. doi: 10.1242/jcs.125815.
- Takahashi, Shunsuke, Takahisa Shinomiya, y Yukitoshi Nagahara. 2022. «Azoxystrobin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Leukemia Cells Independent of P53 Expression». *Anticancer Research* 42(3):1307-12. doi: 10.21873/anticancer.15598.
- Talkish, Jason, Jingyu Zhang, Jelena Jakovljevic, Edward W. Horsey, y John L. Woolford. 2012. «Hierarchical Recruitment into Nascent Ribosomes of Assembly Factors Required for 27SB Pre-RRNA Processing in *Saccharomyces Cerevisiae*». *Nucleic Acids Research* 40(17):8646-61. doi: 10.1093/nar/gks609.
- Tang, Lan, Aarti Sahasranaman, Jelena Jakovljevic, Erica Schleifman, y John L. Woolford. 2008. «Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 Required for Assembly of the Nop7-Subcomplex in Yeast Preribosomes». *Molecular Biology of the Cell* 19(7):2844-56. doi: 10.1091/mbc.e07-12-1281.

- Taylor, Jordan S., Jasmine Zeki, Kimberly Ornell, Jeannine Coburn, Hiroyuki Shimada, Naohiko Ikegaki, y Bill Chiu. 2019. «Down-Regulation of MYCN Protein by CX-5461 Leads to Neuroblastoma Tumor Growth Suppression». *Journal of Pediatric Surgery* 54(6):1192-97. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2019.02.028.
- Teng, Teng, George Thomas, y Carol A. Mercer. 2013. «Growth Control and Ribosomopathies». *Current Opinion in Genetics & Development* 23(1):63-71. doi: 10.1016/j.gde.2013.02.001.
- de la Torre, Cristina, Laura Mondragón, Carmen Coll, Alba García-Fernández, Félix Sancenón, Ramón Martínez-Mañez, Pedro Amorós, Enrique Pérez-Payá, y Mar Orzáez. 2015. «Caspase 3 Targeted Cargo Delivery in Apoptotic Cells Using Capped Mesoporous Silica Nanoparticles». *Chemistry – A European Journal* 21(44):15506-10. doi: 10.1002/chem.201502413.
- Toscano, Florent, Béatrice Parmentier, Zineb El Fajoui, Yann Estornes, Jean-Alain Chayvialle, Jean-Christophe Saurin, y Jacques Abello. 2007. «P53 Dependent and Independent Sensitivity to Oxaliplatin of Colon Cancer Cells». *Biochemical Pharmacology* 74(3):392-406. doi: 10.1016/j.bcp.2007.05.001.
- Turi, Zsofia, Matthew Lacey, Martin Mistrik, y Pavel Moudry. 2019. «Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging». *Aging* 11(8):2512-40. doi: 10.18632/aging.101922.
- Turowski, Tomasz W., Simon Lebaron, Elodie Zhang, Lauri Peil, Tatiana Dudnakova, Elisabeth Petfalski, Sander Granneman, Juri Rappsilber, y David Tollervey. 2014. «Rio1 Mediates ATP-Dependent Final Maturation of 40S Ribosomal Subunits». *Nucleic Acids Research* 42(19):12189-99. doi: 10.1093/nar/gku878.
- Tuukkanen, A. T., A. Spilotros, y D. I. Svergun. 2017. «Progress in Small-Angle Scattering from Biological Solutions at High-Brilliance Synchrotrons». *IUCr* 4(5):518-28. doi: 10.1107/S2052252517008740.
- Valenzuela, D. M., A. Chaudhuri, y U. Maitra. 1982. «Eukaryotic Ribosomal Subunit Anti-Association Activity of Calf Liver Is Contained in a Single Polypeptide Chain Protein of Mr = 25,500 (Eukaryotic Initiation Factor 6).» *Journal of Biological Chemistry* 257(13):7712-19. doi: 10.1016/S0021-9258(18)34440-5.
- Vázquez, Jorge, Chengwen Sun, Jianqing Du, Lucía Fuentes, Colin Sumners, y Mohan K. Raizada. 2003. «Transduction of a Functional Domain of the AT1 Receptor in Neurons by HIV-Tat PTD». *Hypertension* 41(3):751-56. doi: 10.1161/01.HYP.0000047878.13793.41.
- Veinot-Drebot, Lela M., R. A. Singer, y G. C. Johnston. 1988. «Rapid Initial Cleavage of Nascent Pre-RRNA Transcripts in Yeast». *Journal of Molecular Biology* 199(1):107-13. doi: 10.1016/0022-2836(88)90382-8.
- Venturi, Giulia, y Lorenzo Montanaro. 2020. «How Altered Ribosome Production Can Cause or Contribute to Human Disease: The Spectrum of Ribosomopathies». *Cells* 9(10):2300. doi: 10.3390/cells9102300.
- Walker, John M., ed. 2005. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press.

- Walsh, Gary. 2010. «Post-Translational Modifications of Protein Biopharmaceuticals». *Drug Discovery Today* 15(17-18):773-80. doi: 10.1016/j.drudis.2010.06.009.
- Waterhouse, Andrew, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Gumienny, Florian T. Heer, Tjaart A. P. de Beer, Christine Rempfer, Lorenza Bordoli, Rosalba Lepore, y Torsten Schwede. 2018. «SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes». *Nucleic Acids Research* 46(W1):W296-303. doi: 10.1093/nar/gky427.
- Watkins, Nicholas J., y Markus T. Bohnsack. 2012. «The Box C/D and H/ACA SnoRNPs: Key Players in the Modification, Processing and the Dynamic Folding of Ribosomal RNA: Box C/D and H/ACA SnoRNPs». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3(3):397-414. doi: 10.1002/wrna.117.
- Weaver, P. L., C. Sun, y T. H. Chang. 1997. «Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3». *Molecular and Cellular Biology* 17(3):1354-65. doi: 10.1128/MCB.17.3.1354.
- Wegrecki, Marcin, Olga Rodríguez-Galán, Jesús de la Cruz, y Jeronimo Bravo. 2015. «The Structure of Erb1-Ytm1 Complex Reveals the Functional Importance of a High-Affinity Binding between Two β -Propellers during the Assembly of Large Ribosomal Subunits in Eukaryotes». *Nucleic Acids Research* 43(22):11017-30. doi: 10.1093/nar/gkv1043.
- Weilbeer, Claudia, David Jay, James C. Donnelly, Francesco Gentile, Feridoun Karimi-Busheri, Xiaoyan Yang, Rajam S. Mani, Yaping Yu, Ahmed H. Elmenoufy, Khaled H. Barakat, Jack A. Tuszynski, Michael Weinfeld, y Frederick G. West. 2022. «Modulation of ERCC1-XPF Heterodimerization Inhibition via Structural Modification of Small Molecule Inhibitor Side-Chains». *Frontiers in Oncology* 12.
- Wilson, Daniel M., Yu Li, Amber LaPeruta, Michael Gamalinda, Ning Gao, y John L. Woolford. 2020. «Structural Insights into Assembly of the Ribosomal Nascent Polypeptide Exit Tunnel». *Nature Communications* 11(1):5111. doi: 10.1038/s41467-020-18878-8.
- Wójcik, Paulina, y Łukasz Berlicki. 2016. «Peptide-Based Inhibitors of Protein–Protein Interactions». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26(3):707-13. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.084.
- Woolford, John L., y Susan J. Baserga. 2013. «Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*». *Genetics* 195(3):643-81. doi: 10.1534/genetics.113.153197.
- Woynarowski, Jan M., Sandrine Faivre, Maryanne C. S. Herzig, Brenda Arnett, William G. Chapman, Alex V. Trevino, Eric Raymond, Stephen G. Chaney, Alexandra Vaisman, Maria Varchenko, y Paul E. Juniewicz. 2000. «Oxaliplatin-Induced Damage of Cellular DNA». *Molecular Pharmacology* 58(5):920-27. doi: 10.1124/mol.58.5.920.
- Wu, Shan, Beril Tutuncuoglu, Kaige Yan, Hailey Brown, Yixiao Zhang, Dan Tan, Michael Gamalinda, Yi Yuan, Zhifei Li, Jelena Jakovljevic, Chengying Ma, Jianlin Lei, Meng-Qiu Dong, John L. Woolford, y Ning Gao. 2016. «Diverse Roles of Assembly Factors Revealed by Structures of Late Nuclear Pre-60S Ribosomes». *Nature* 534(7605):133-37. doi: 10.1038/nature17942.
- Wurm, Florian M. 2004. «Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells». *Nature Biotechnology* 22(11):1393-98. doi: 10.1038/nbt1026.

- Xu, Guangwu, y Yufang Shi. 2007. «Apoptosis Signaling Pathways and Lymphocyte Homeostasis». *Cell Research* 17(9):759-71. doi: 10.1038/cr.2007.52.
- Xu, Hong, Marco Di Antonio, Steven McKinney, Veena Mathew, Brandon Ho, Nigel J. O'Neil, Nancy Dos Santos, Jennifer Silvester, Vivien Wei, Jessica Garcia, Farhia Kabbeer, Daniel Lai, Priscilla Soriano, Judit Banáth, Derek S. Chiu, Damian Yap, Daniel D. Le, Frank B. Ye, Anni Zhang, Kelsie Thu, John Soong, Shu-chuan Lin, Angela Hsin Chin Tsai, Tomo Osako, Teresa Algara, Darren N. Saunders, Jason Wong, Jian Xian, Marcel B. Bally, James D. Brenton, Grant W. Brown, Sohrab P. Shah, David Cescon, Tak W. Mak, Carlos Caldas, Peter C. Stirling, Phil Hieter, Shankar Balasubramanian, y Samuel Aparicio. 2017. «CX-5461 Is a DNA G-Quadruplex Stabilizer with Selective Lethality in BRCA1/2 Deficient Tumours». *Nature Communications* 8(1):14432. doi: 10.1038/ncomms14432.
- Xuan, Jiachen, Kezia Gitareja, Natalie Brajanovski, y Elaine Sanij. 2021. «Harnessing the Nucleolar DNA Damage Response in Cancer Therapy». *Genes* 12(8):1156. doi: 10.3390/genes12081156.
- Xue, Shifeng, y Maria Barna. 2012. «Specialized Ribosomes: A New Frontier in Gene Regulation and Organismal Biology». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(6):355-69. doi: 10.1038/nrm3359.
- Yang, Liuqing, y Zhi-Ren Liu. 2004. «Bacterially Expressed Recombinant P68 RNA Helicase Is Phosphorylated on Serine, Threonine, and Tyrosine Residues». *Protein Expression and Purification* 35(2):327-33. doi: 10.1016/j.pep.2004.02.004.
- Yang, Wanjuan, Jorge Soares, Patricia Greninger, Elena J. Edelman, Howard Lightfoot, Simon Forbes, Nidhi Bindal, Dave Beare, James A. Smith, I. Richard Thompson, Sridhar Ramaswamy, P. Andrew Futreal, Daniel A. Haber, Michael R. Stratton, Cyril Benes, Ultan McDermott, y Mathew J. Garnett. 2012. «Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): A Resource for Therapeutic Biomarker Discovery in Cancer Cells». *Nucleic Acids Research* 41(D1):D955-61. doi: 10.1093/nar/gks1111.
- Yuan, Renyikun, Ying Hou, Wen Sun, Jie Yu, Xin Liu, Yanan Niu, Jin-Jian Lu, y Xiuping Chen. 2017. «Natural Products to Prevent Drug Resistance in Cancer Chemotherapy: A Review: Natural Products Prevent Drug Resistance». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1401(1):19-27. doi: 10.1111/nyas.13387.
- Zagulski, M., D. Kressler, A. M. Bécam, J. Rytka, y C. J. Herbert. 2003. «Mak5p, Which Is Required for the Maintenance of the M1 DsRNA Virus, Is Encoded by the Yeast ORF YBR142w and Is Involved in the Biogenesis of the 60S Subunit of the Ribosome». *Molecular Genetics and Genomics* 270(3):216-24. doi: 10.1007/s00438-003-0913-4.
- Zhang, Zhen-Lei, Chun-Lai Zhao, Qian Chen, Kai Xu, Xin Qiao, y Jing-Yuan Xu. 2018. «Targeting RNA Polymerase I Transcription Machinery in Cancer Cells by a Novel Monofunctional Platinum-Based Agent». *European Journal of Medicinal Chemistry* 155:434-44. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.05.045.
- Zheng, Hua-Chuan. 2017. «The Molecular Mechanisms of Chemoresistance in Cancers». *Oncotarget* 8(35):59950-64. doi: 10.18632/oncotarget.19048.
- Zhou, X., Q. Hao, Q. Zhang, J. -m Liao, J. -w Ke, P. Liao, B. Cao, y H. Lu. 2015. «Ribosomal Proteins L11 and L5 Activate TAp73 by Overcoming MDM2 Inhibition». *Cell Death & Differentiation* 22(5):755-66. doi: 10.1038/cdd.2014.167.

- Zimmerman, Steven B., y Stefan O. Trach. 1988. «Effects of Macromolecular Crowding on the Association of *E.Coli* Ribosomal Particles». *Nucleic Acids Research* 16(14):6309-26. doi: 10.1093/nar/16.14.6309.
- Zisi, Asimina, Jiri Bartek, y Mikael S. Lindström. 2022. «Targeting Ribosome Biogenesis in Cancer: Lessons Learned and Way Forward». *Cancers* 14(9):2126. doi: 10.3390/cancers14092126.
- Zisser, Gertrude, Uli Ohmayer, Christina Mauerhofer, Valentin Mitterer, Isabella Klein, Gerald N. Rechberger, Heimo Wolinski, Michael Prattes, Brigitte Pertschy, Philipp Milkereit, y Helmut Bergler. 2018. «Viewing Pre-60S Maturation at a Minute's Timescale». *Nucleic Acids Research* 46(6):3140-51. doi: 10.1093/nar/gkx1293.

