

**PROCESOS MOLECULARES IMPLICADOS EN
LOS PASOS INICIALES DE LA SÍNTESIS
DE LOS RIBOSOMAS HUMANOS**



TESIS DOCTORAL

Sonia Gómez Gaspar

Salamanca, Julio 2022

**Centro de Investigación del Cáncer
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
Universidad de Salamanca**



Centro de Investigación del Cáncer
IBMCC-FICUS
(University of Salamanca – CSIC)
Miguel de Unamuno Campus
37007 Salamanca (Spain)
Tel.: (+34) 923 294 720
www.cicancer.org

La **Dra. MERCEDES DOSIL CASTRO**, Profesora Titular de la Universidad de Salamanca en el área de conocimiento de Bioquímica y Biología Molecular,

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis titulado “**Procesos moleculares implicados en los pasos iniciales de la síntesis de los ribosomas humanos**”, presentado por D^a SONIA GÓMEZ GASPARG para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo mi dirección en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (USAL/CSIC). Considerando que cumple con las condiciones necesarias, autorizo su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 21 de junio de 2022.

Fdo.: Dra. Mercedes Dosil Castro

ABSTRACT

Ribosome synthesis is an intricate process during which the transcription, modification, folding, and processing of the rRNA precursors (pre-rRNAs) are coordinated to build mature ribosome subunits. This process is driven by more than 200 ribosome biogenesis factors (RBFs) that, together with the pre-rRNAs and ribosomal proteins, form different preribosomal complexes. These complexes migrate from the nucleolus to the cytoplasm as they mature. The composition and structure of preribosomes in human cells are ill-defined and, in the case of those formed in the most internal regions of the nucleolus, this is caused by technical limitations. The main reason for those limitations is that the highly viscous nature of the inner regions of the nucleolus precludes the extraction of the complexes. The first part of this thesis is focused on the generation of tools and the development of extraction methods to characterize early nucleolar preribosomes in human cells. The initial studies were the validation of the PSE extraction method to isolate early preribosomes and the generation of cell lines that endogenously express an early RBF fused to GFP to be used as bait for preribosome purification by affinity chromatography. Using these tools, and a combination of mass-spectrometry compositional analysis and sucrose-gradient sedimentation experiments, it was found that the composition of the preribosomal subcomplex UTP-B and the function of the UTP14A protein are conserved in humans and yeast. The second part of the thesis was devoted to the functional characterization of RRP8, a methyltransferase responsible for the m¹A1322 modification in the 28S rRNA. The identification of RBFs that interact with RRP8 and the characterization of the RRP8 knockout phenotype unveiled that this protein forms a module with one 40S subunit RBF that binds to the bipartite preribosome, the initial intermediate that contains the primordial precursors of both the small and large subunits. The RRP8 module is required for the efficient formation of bipartite preribosomes. The complete loss of RRP8 is well tolerated by transformed cell lines, but not by non-transformed cells indicating that its function is essential for the viability of some cell types.

RESUMEN

La síntesis de ribosomas es un proceso complejo en el que la transcripción, modificación, plegamiento y procesamiento del precursor del rRNA (pre-rRNA) se tienen que coordinar para dar lugar a la formación de las subunidades ribosómicas maduras. Este proceso es asistido por más de 200 factores de biogénesis de ribosomas (RBFs) que, junto con el pre-rRNA y las proteínas ribosómicas, van conformando diferentes complejos pre-ribosómicos. Estos complejos migran desde el nucleolo al citoplasma a medida que van madurando. En células humanas, la información disponible acerca de la composición de los pre-ribosomas, sobre todo la que se refiere a aquellos que son nucleolares y más iniciales, es muy escasa debido a que existen limitaciones técnicas para poder analizarlos bioquímicamente. Esto se debe a que las partículas pre-ribosómicas más tempranas son producidas en regiones internas del nucleolo que tienen una alta viscosidad, lo cual dificulta su extracción. La primera parte de esta tesis se centra en la generación de herramientas y el desarrollo de métodos de extracción que permitan caracterizar a los pre-ribosomas nucleolares tempranos de células humanas. Primero, se realizó una validación del método de extracción PSE y se generaron líneas celulares que expresan endógenamente un RBF fusionado a la GFP, para utilizarlo como cebo de purificación de pre-ribosomas tempranos por cromatografía de afinidad. Seguidamente, utilizando esas herramientas en combinación con análisis composicionales por espectrometría de masas y experimentos de sedimentación en gradientes de sacarosa, se comprobó que la composición del subcomplejo pre-ribosómico UTP-B y que la función de la proteína UTP14A están conservados en células humanas y células de levadura. En la segunda parte de la tesis se realizó un estudio de caracterización funcional de la proteína RRP8, la metiltransferasa que introduce la modificación m¹A1322 en el rRNA 28S. La identificación de RBFs que interaccionan con RRP8 y la caracterización del fenotipo inducido por su silenciamiento o eliminación total evidenciaron que esta proteína forma un módulo con un RBF de la subunidad 40S que se une y es importante para la producción eficiente del pre-ribosoma bipartito, el intermediario inicial que contiene todavía unidos los precursores prematuros de la subunidad pequeña y de la subunidad grande. Aunque la pérdida de RRP8 es bien tolerada por células transformadas en cultivo, no lo es en células no transformadas, lo cual revela que su función es esencial en algunos tipos celulares.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
1.EL RIBOSOMA	12
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	12
1.2. ARQUITECTURA Y FUNCIÓN DE LAS SUBUNIDADES RIBOSÓMICAS	14
1.3. RIBOSOMAS HETEROGÉNEOS	15
2.BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS	16
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	16
2.2. SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL PRE-rRNA	18
2.2.1. <i>Procesamiento del pre-rRNA en S. cerevisiae</i>	19
2.2.2. <i>Procesamiento del pre-rRNA en células humanas</i>	21
2.3. FORMACIÓN Y MADURACIÓN DE PRE-RIBOSOMAS	23
2.3.1. <i>Ensamblaje y maduración del procesoma SSU</i>	24
2.3.2. <i>Maduración de pre-ribosomas 40S</i>	26
2.3.3. <i>Ensamblaje y maduración de pre-ribosomas 60S</i>	27
3.DIFICULTADES TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LOS PRE-RIBOSOMAS NUCLEOLARES HUMANOS.	29
4.MODIFICACIONES EN EL RNA RIBOSÓMICO	31
4.1. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL rRNA	32
4.2. PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LAS MODIFICACIONES DEL rRNA	34
4.2.1. <i>snoRNPs</i>	34
4.2.2. <i>Enzimas individuales</i>	36
5.LA METILTRANSFERASA DE RRNA RRP8	37
5.1. FUNCIÓN DE RRP8 EN LA FORMACIÓN DE LA SUBUNIDAD 40S	40
5.2. FUNCIÓN DE RRP8 EN LA FORMACIÓN DE LA SUBUNIDAD 60S	41
6.CUESTIONES PENDIENTES ACERCA DE LA PROTEÍNA RRP8	41
OBJETIVOS	45
RESULTADOS I	48
DISCUSIÓN I	75
CONCLUSIONES I	81
RESULTADOS II	85
DISCUSIÓN II	123
CONCLUSIONES II	129
MATERIALES Y MÉTODOS	133
REFERENCIAS	155
FINANCIACIÓN	169
PUBLICACIONES	173

INTRODUCCIÓN

1. EL RIBOSOMA

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos (RNA-proteína) responsables de traducir la información genética codificada en el mRNA a proteínas, lo que se conoce como traducción. Los ribosomas de células eucariotas (80S) están constituidos por dos subunidades, la subunidad pequeña 40S (o SSU) y la subunidad grande 60S (o LSU). La subunidad pequeña está formada por una molécula de RNA ribosómico (rRNA), el 18S, y por 33 proteínas ribosómicas (RPSs). Por su parte, la subunidad grande contiene tres moléculas de rRNA, el 28S (25S en levaduras), el 5.8S y el 5S y, en la mayoría de las células eucariotas, 47 proteínas ribosómicas (RPLs) (1–5).

La composición de los ribosomas ha variado considerablemente a lo largo de la evolución (ver **Tabla I**). Todos los ribosomas poseen un núcleo conservado alrededor del cual van apareciendo componentes adicionales de rRNA (segmentos de expansión) y proteínas ribosómicas nuevas (**Figura 1**) (1,3). Este núcleo altamente conservado contiene el centro catalítico peptidil-transferasa (PTC), localizado en la subunidad grande, y el sitio de descodificación (DCS), en la subunidad pequeña. Esta conservación es coherente con que en ambas regiones tienen lugar las dos funciones principales de los ribosomas: la descodificación del mRNA en el DCS y la formación de los enlaces peptídicos en el PTC (2).

Tabla I. Composición de los ribosomas de bacterias y de eucariotas (3).

Organismo	Bacteria (<i>T. thermophilus</i>)	Eucariotas Inferiores (<i>S. cerevisiae</i>)	Eucariotas Superiores (<i>H. sapiens</i>)
Peso molecular	2.3 MDa	3.3 MDa	4.3 MDa
Composición	54 proteínas 3 rRNAs	79 proteínas 4 rRNAs	80 proteínas 4 rRNAs
Subunidad Grande	50S 33 proteínas 23S rRNA: 2 904 b. 5S rRNA: 121 b.	60S 46 proteínas 5.8S rRNA: 158 b. 25S rRNA: 3 396 b. 5S rRNA: 121 b.	60S 47 proteínas 5.8S rRNA: 156 b. 28S rRNA: 5 034 b. 5S rRNA: 121 b.
Subunidad Pequeña	30S 21 proteínas 16S rRNA: 1 542 b.	40S 33 proteínas 18S rRNA: 1 800 b.	40S 33 proteínas 18S rRNA: 1 870 b.

A pesar del alto grado de conservación de su región central, los ribosomas de eucariotas superiores han adquirido estructuras más complejas y, como consecuencia, requieren un proceso de biogénesis más elaborado. Este incremento en complejidad refleja la adquisición de funciones más sofisticadas que las células de eucariotas superiores han adquirido con la evolución (3,6).

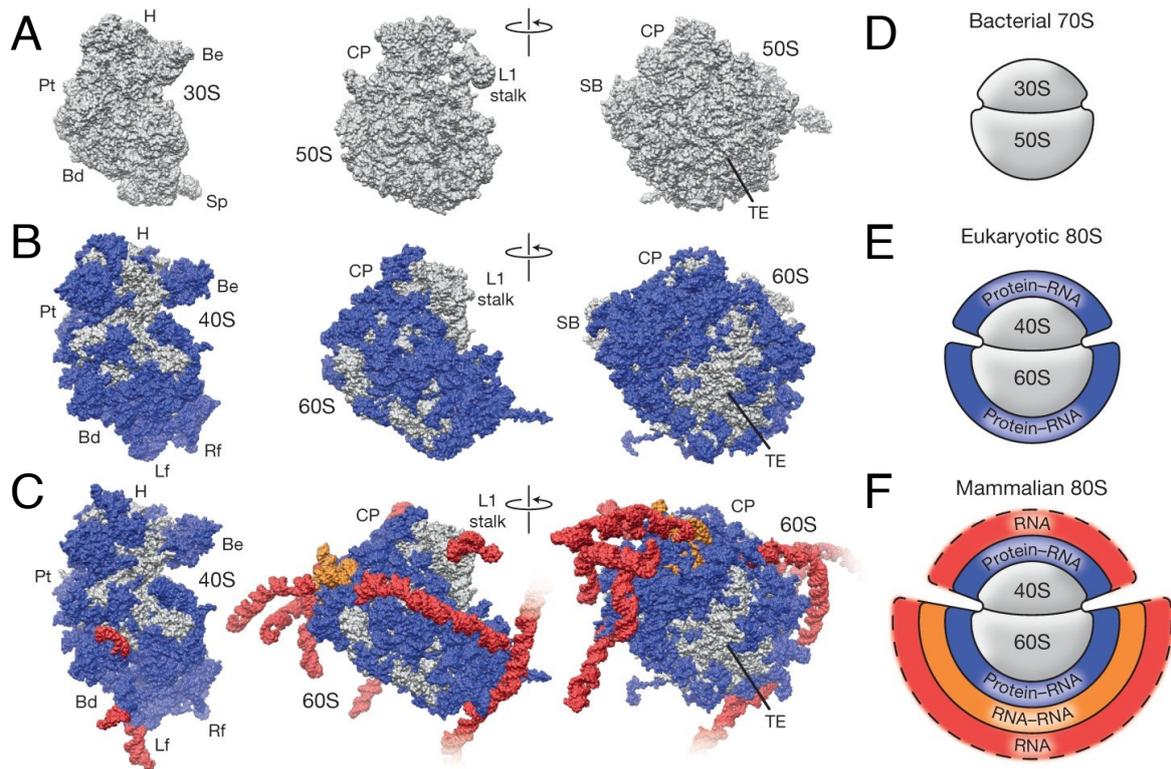


Figura 1. Comparación entre las subunidades ribosómicas de bacterias y células eucariotas. (A, B, C) Representación de las estructuras de las subunidades 40S y 60S de (A) la bacteria *T. thermophilus*, (B) la levadura *S. cerevisiae* y (C) el mamífero *H. sapiens*. Los segmentos de RNA y proteínas de extensión específicas de células eucariotas se muestran en azul y las dos capas adicionales de segmentos de extensión presentes en los ribosomas de mamíferos se muestran en naranja y rojo. (D, E, F). Representación esquemática de los ribosomas de (D) la bacteria *T. thermophilus*, (E) la levadura *S. cerevisiae* y (F) el mamífero *H. sapiens*. Los segmentos de RNA y proteínas de expansión se muestran como en (A, B, C). Figura tomada de Anger et al., 2013 (1)

1.2. ARQUITECTURA Y FUNCIÓN DE LAS SUBUNIDADES RIBOSÓMICAS

La criomicroscopía electrónica (cryo-EM) de alta resolución ha sido revolucionaria en el estudio de la estructura de los ribosomas. Esta tecnología ha permitido revelar las estructuras tridimensionales (3D) de ribosomas pertenecientes a diferentes organismos, desde bacterias (7) hasta humanos (2). También ha permitido visualizar los ribosomas de mitocondrias (mito-ribosomas) (8–10), así como ribosomas en diferentes estados durante la traducción (11–13).

En la **Figura 2** se representan las estructuras de ambas subunidades ribosómicas con las regiones de importancia funcional. En la SSU se encuentra el DCS, donde el RNA de transferencia (tRNA) cargado con el aminoácido correcto es seleccionado de acuerdo con la secuencia del mRNA, el canal que conduce al mRNA durante la traducción y la hélice 44, una hélice altamente conservada del rRNA 18S que mantiene la unión de las subunidades durante la traslocación y contribuye a la correcta fidelidad de traducción (3,14,15).

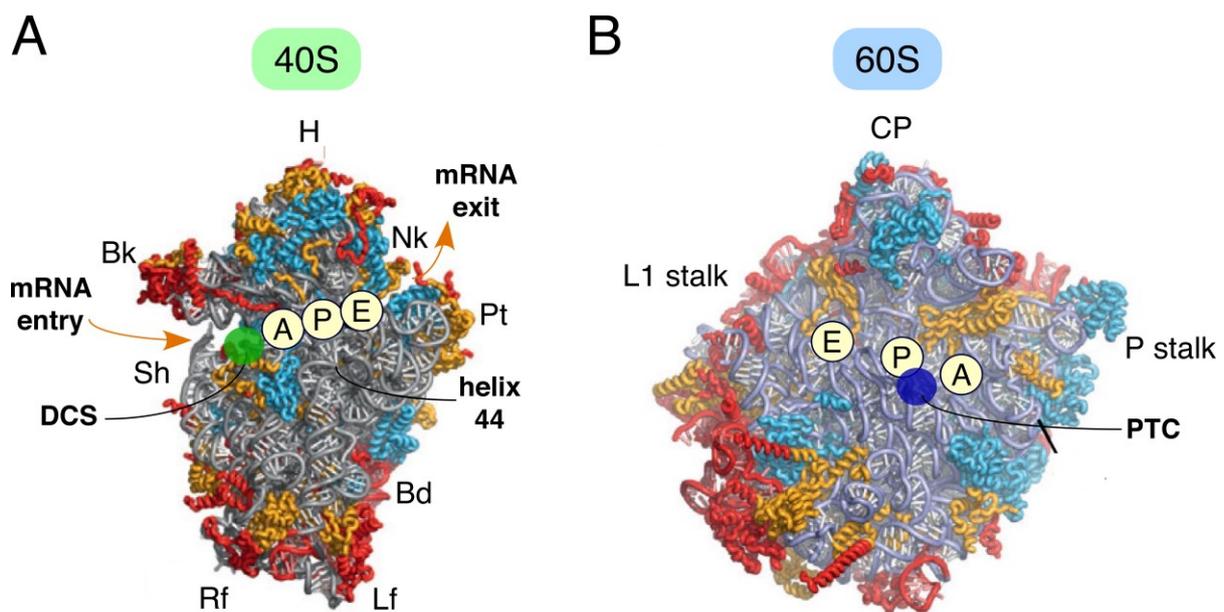


Figura 2. Representaciones de las subunidades ribosómicas eucariotas vistas desde la superficie de contacto entre ambas partículas. (A) Representación de la subunidad pequeña (40S) de células eucariotas. La entrada del mRNA (mRNA entry) y la salida del mRNA (mRNA exit) delimitan el canal del mRNA. El mRNA se lee en el centro de decodificación (DCS; círculo verde) en la subunidad 40S. El tRNA que va a ser incorporado, cargado con su aminoácido, se recluta en el sitio A (de aminoacil). También se señala la hélice 44. (B) Representación de la subunidad grande (60S) de células eucariotas. Los aminoácidos se unen en el centro peptidil-transferasa (PTC; círculo morado) localizado en la subunidad 60S. El tRNA que transporta la cadena peptídica naciente se traspasa al sitio P (de peptidil), mientras que el sitio E (de salida) aloja al tRNA deacilado antes de su expulsión del ribosoma. Las regiones morfológicas distintivas de cada subunidad se indican de la siguiente manera: H, cabeza; Nk, cuello; Pt, plataforma; Bd, cuerpo; Lf, pie izquierdo; Rf, pie derecho; Sh, hombro; Bk, pico; CP, protuberancia central; L1 stalk, tallo L1; P stalk, tallo P. Figura adaptada de Klinge, et al., 2012 (16).

La LSU, por su parte, se encarga de la actividad catalítica que tiene lugar en el PTC, por la que los aminoácidos se incorporan en las cadenas polipeptídicas nacientes a través de enlaces peptídicos. Aparte del PTC, en la subunidad grande también se encuentra el túnel de salida del péptido que se extiende a lo largo del cuerpo de la LSU. El PTC está adyacente al túnel peptídico en una región muy conservada que está formada mayoritariamente por rRNA.

Los tres sitios de unión del tRNA (A, P y E) comprenden regiones de ambas subunidades. En el sitio A se une el aminoacil-tRNA que se incorpora al ribosoma, en el sitio P se une el peptidil-tRNA, que es el tRNA unido a la cadena polipeptídica (a través del último aminoácido unido al péptido naciente) y el sitio E es donde se posiciona el tRNA que va a abandonar el ribosoma (tRNA deacilado, que ya ha transferido su grupo aminoacilo al péptido naciente) (3,15).

1.3. RIBOSOMAS HETEROGÉNEOS

Aunque se considera que los ribosomas maduros, dentro de cada especie, contienen un número fijo de proteínas ribosómicas y moléculas de rRNA, estudios recientes han detectado cambios en su composición y se ha planteado la hipótesis de la existencia de “ribosomas especializados” (17). Estas variaciones pueden ocurrir a nivel de proteínas ribosómicas (RPs) o a nivel de las moléculas de rRNA. Existen RPs parálogas, en las que la misma RP es codificada por varios genes diferentes, y distintas isoformas de una misma RP. Dependiendo del tipo celular y/o del estado de la célula predomina una determinada variante u otra. Dentro del mismo tipo celular también se han detectado cambios en la expresión de RPs dependiendo de la etapa del desarrollo embrionario del organismo (18–20). También se sabe que hay variaciones en la secuencia de los rRNAs. Por ejemplo, en levaduras se ha descrito que la molécula de rRNA 5.8S puede encontrarse en los ribosomas maduros en dos versiones diferentes según haya sido procesada de una forma u otra. Una versión más larga, el 5.8S_L, y una versión más corta, el 5.8S_S. El rRNA 5.8S_L tiene 7-8 nucleótidos más que la forma corta en su extremo 5' (4). También en humanos y ratón, la reciente secuenciación de todos los cromosomas que contienen repeticiones del DNA ribosómico (rDNA) ha revelado variaciones en sus secuencias (20). Sin embargo, la mayor fuente de heterogeneidad de los ribosomas se encuentra en el diferente contenido en modificaciones del rRNA. Las modificaciones más abundantes son las metilaciones en la ribosa (2'-O-metilaciones o Nm) y la conversión de la uridina en pseudouridina (Ψ). Además, se producen otro tipo de modificaciones (metilaciones, acetilaciones y amino-carboxipropilaciones) en las bases nitrogenadas del rRNA que son menos abundantes. Se ha

detectado que no todos los ribosomas se encuentran igualmente modificados. Los niveles de estas modificaciones varían dependiendo del contexto celular y las condiciones de crecimiento (4,21,22). Se cree que estas variaciones pueden “customizar” a los ribosomas para optimizar la traducción o para traducir específicamente algún subgrupo de mRNAs requerido sólo en ciertos tipos celulares (23–25) o procesos como la diferenciación (26) , el desarrollo embrionario (27–29) , la respuesta a estrés (30,31), la transformación celular (23,32,33) y otros contextos patogénicos (19,34,35).

2. BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

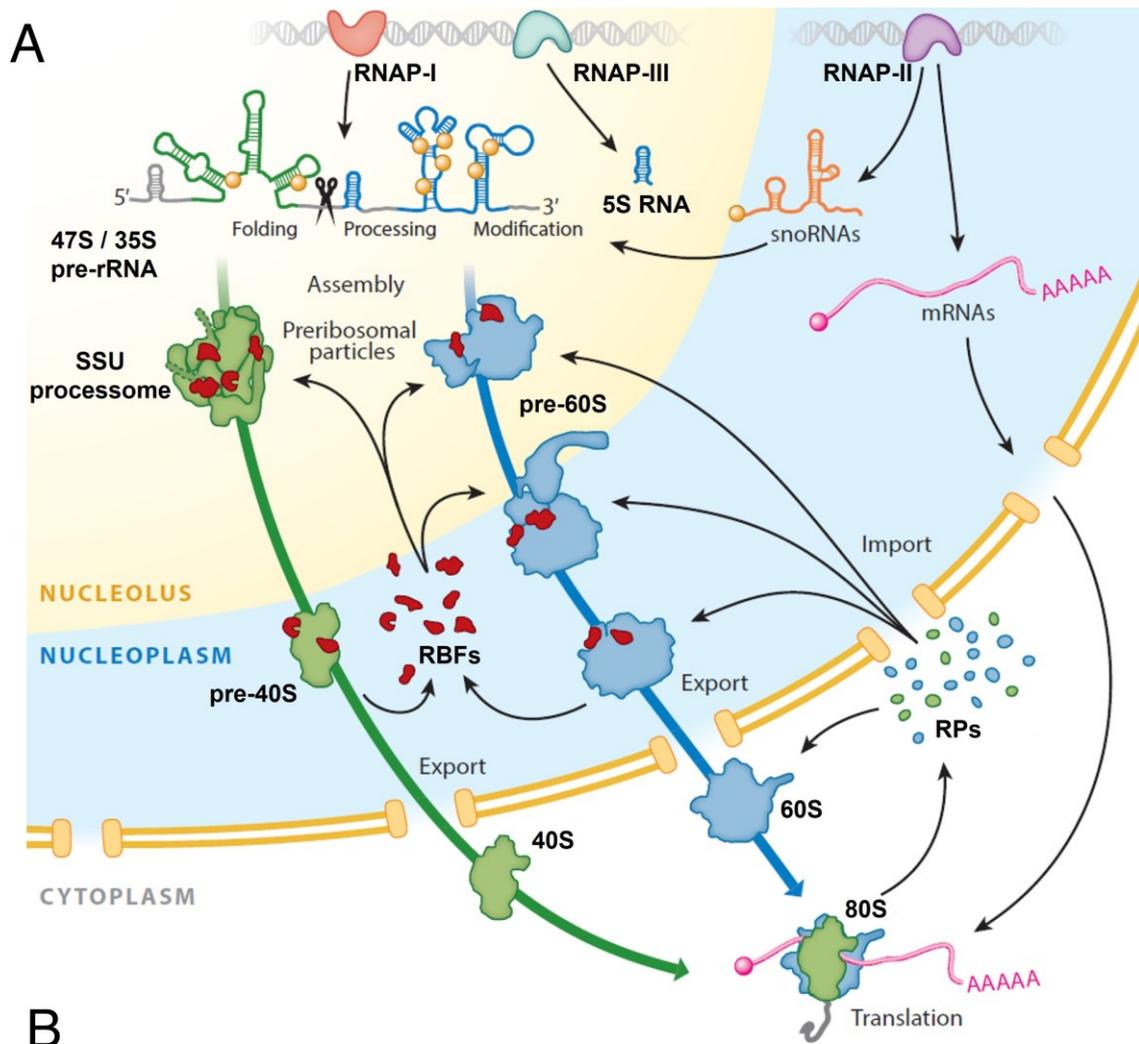
La síntesis de ribosomas (esquemática en la **Figura 3A**) comienza con la transcripción del primer precursor del RNA ribosómico (pre-rRNA) por la RNA Polimerasa I (RNAP-I). La transcripción del pre-rRNA tiene lugar en el nucleolo, una región bien definida del núcleo que se forma alrededor de las regiones organizadoras nucleolares (NORs) y que contiene las repeticiones del DNA ribosómico (rDNA). El pre-rRNA inicial (47S en células humanas, 35S en levaduras) contiene tres de las cuatro moléculas de rRNA que van a formar parte de los ribosomas maduros, los rRNAs 18S, 5.8S y 28S (25S en levaduras). La otra molécula de rRNA, el 5S, es transcrita por la RNA polimerasa III (RNAP-III) en el nucleoplasma y posteriormente transportada al nucleolo e incorporada a la ruta de maduración de la subunidad 60S. En el pre-rRNA 47S, las secuencias de los rRNAs están separadas entre sí por dos regiones espaciadoras transcritas internas (ITS1, entre el rRNA 18S y el 5.8S; e ITS2, entre los rRNAs 5.8S y 28S) y flanqueadas por otras dos regiones espaciadoras transcritas externas (5'-ETS y 3'-ETS) (**Figura 3B**). Estas regiones espaciadoras son eliminadas, en lo que se conoce como procesamiento del pre-rRNA, para dar lugar a las secuencias de rRNA maduras. El procesamiento conlleva una serie de cortes endonucleolíticos y exonucleolíticos (indicados en la **Figura 3B**) que originan diferentes especies de pre-rRNA intermediarias (4,36–39).

El pre-rRNA naciente se asocia co-transcripcionalmente con algunas proteínas ribosómicas, factores de biogénesis de ribosomas (RBFs) y pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleolares (snoRNPs) y forma unos grandes complejos denominados pre-ribosomas o partículas pre-ribosómicas. Dentro de estos complejos tiene lugar el procesamiento y modificación del pre-rRNA. El primer pre-ribosoma que se ensambla es el procesoma SSU (también denominado pre-ribosoma 90S) y contiene RBFs que intervienen en la maduración de

la subunidad pequeña. Al ensamblaje del procesoma SSU le sigue el ensamblaje del complejo inicial pre-60S. La maduración de ambas subunidades se separa con el corte en el sitio 2 de la región ITS1 (**Figura 3B**) y las dos partículas resultantes siguen rutas de maduración independientes. A medida que van madurando, los diferentes pre-ribosomas 40S y 60S van transitando desde el nucleolo al nucleoplasma, en donde son exportadas al citoplasma. (17,39–41). La mayor parte de las proteínas ribosómicas son incorporadas a estas partículas en los primeros pasos de la maduración, pero algunas van siendo reclutadas a lo largo de ella. En humanos hay más de 350 RBFs involucrados en la maduración de ambas subunidades. Los RBFs se unen transitoriamente a los complejos y son liberados una vez que han realizado su función (42). Los RBFs son un conjunto heterogéneo de proteínas que incluye a las proteínas que catalizan los cortes en los pre-rRNAs (endo- y exoRNAsas), proteínas modificadoras (componentes de snoRNPs o enzimas modificadoras) o remodeladoras (helicadas, ATPasas y GTPasas) del pre-rRNA, y a las proteínas estructurales necesarias para reclutar otros RBFs o proteger alguna región importante de la subunidad ribosómica hasta que alcance su maduración (4,42).

El ensamblaje de los pre-ribosomas ocurre mayoritariamente en el nucleolo, pero hay pasos de maduración que tienen lugar en el nucleoplasma, sobre todo en el caso de los pre-ribosomas de la LSU. Las partículas correctamente ensambladas viajan desde el nucleoplasma al citoplasma a través de los complejos del poro nuclear (NPC) donde finalizan su maduración y se convierten en subunidades ribosómicas competentes (**Figura 3A**) (37–39).

Figura 3. Esquema general de la biogénesis de ribosomas en células eucariotas. (A) Las tres RNA polimerasas (RNAPs) están involucradas en la síntesis de ribosomas. La RNAP-I transcribe el pre-rRNA 47S (35S en levaduras). Este precursor contiene las secuencias de los rRNAs 18S, 5.8S y 28S (25S en levaduras). El rRNA 5S es transcrito por la RNAP-III de forma independiente. La RNAP-II es la encargada de transcribir el mRNA de las RPSs, RPLs y RBFs, que son sintetizados en el citoplasma y activamente importados al núcleo para incorporarse a los pre-ribosomas. Algunos RBFs van a ser reciclados en el proceso de maduración de los pre-ribosomas para ser incorporados nuevamente a estas partículas. La RNA polimerasa II también transcribe los snoRNAs que van a modificar o procesar el pre-rRNA. (B) Esquema del primer precursor del rRNA en humanos (47S) donde se señalan todos los cortes que tienen que ocurrir para eliminar las regiones 5'ETS, ITS1, ITS2 y 3'ETS. El corte en el sitio 2 que separa la maduración de las dos subunidades se indica en rojo. Figura adaptada de Baßler *et al.*, 2019 (39)



2.2. SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL PRE-rRNA

En levaduras (*S. cerevisiae*) el pre-rRNA inicial (35S) es sintetizado por la RNAP-I a partir de repeticiones en tándem del rDNA localizadas en un único cromosoma (cromosoma 12). La secuencia del RNA 5S también se encuentra en esas repeticiones, pero es sintetizado por la RNAP-III en dirección inversa. En células humanas, el número de repeticiones del rDNA es mucho mayor (300-400 repeticiones, aunque pueden llegar a ~800 en células transformadas (43)) que en levaduras (~150 repeticiones). Además, esas repeticiones se encuentran repartidas

en 5 cromosomas diferentes (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22). A diferencia de levaduras, en este caso, el RNA 5S es codificado en otra región genómica en el cromosoma 1 (40,41,44).

Aunque el primer precursor de pre-rRNA fue descrito en células humanas, la síntesis y procesamiento del pre-rRNA han sido mejor caracterizados en *S. cerevisiae*. Esta levadura ha sido el organismo modelo preferente en el estudio de la ruta de biogénesis de ribosomas debido a su sencillez (eucariota unicelular) y a que su manipulación genética es más fácil que la de las células de mamífero. Sin embargo, aunque los aspectos más básicos y el esquema general del procesamiento está conservado entre células eucariotas, se han detectado diferencias importantes entre células humanas y de levadura. La mayor complejidad en la organización del rDNA en células humanas y el mayor tamaño de las subunidades ribosómicas maduras (ver **Tabla I**) son dos de estas diferencias. El incremento en el número de RBFs involucrados en la maduración de las subunidades, de los cuales algunos no tienen homólogos en levadura y otros tienen funciones adicionales (45–48), y la mayor longitud de los segmentos espaciadores del pre-rRNA (algunos segmentos son hasta cinco veces más largos que en levadura (34)) ya hacen presuponer que debe haber pasos adicionales en el procesamiento de los rRNAs humanos (4,34,36,41,49,50) (comparar **Figura 4** y **Figura 5**).

2.2.1. Procesamiento del pre-rRNA en *S. cerevisiae*

Para llevar a cabo el procesamiento del pre-rRNA (**Figura 4**) es necesaria la intervención de varias endonucleasas y exonucleasas, cuyas digestiones van a ir eliminando las secuencias espaciadoras. Cuando las células de levadura se encuentran en crecimiento exponencial, los primeros cortes (B₀, A₀, A₁ y A₂) ocurren principalmente de forma co-transcripcional eliminando rápidamente la región 5'-ETS y separando los precursores de la subunidad pequeña (20S) y la subunidad grande (27SA₂) (51). El precursor de la subunidad pequeña no sufre ningún procesamiento adicional hasta que es transportado al citoplasma, donde se produce el corte en el sitio D que es catalizado por la endonucleasa Nob1. Después del corte en A₂, la mayor parte del 27SA₂ es cortado en A₃ generando el pre-rRNA 27SA₃. Tras ese corte, se produce la maduración del extremo 5' del 5.8S_S. Una vez que las partículas pre-ribosómicas llegan al nucleoplasma, se produce el corte en C₂ separando el precursor del 5.8S (7S) y del 25S (25.5S). Ambos extremos son procesados posteriormente por diferentes exonucleasas. El pequeño porcentaje del rRNA 27SA₂ que no ha sido procesado en A₃, es alternativamente procesado en el sitio B_{1L} produciendo la variante de pre-rRNA 5.8S_L (41,50,52,53).

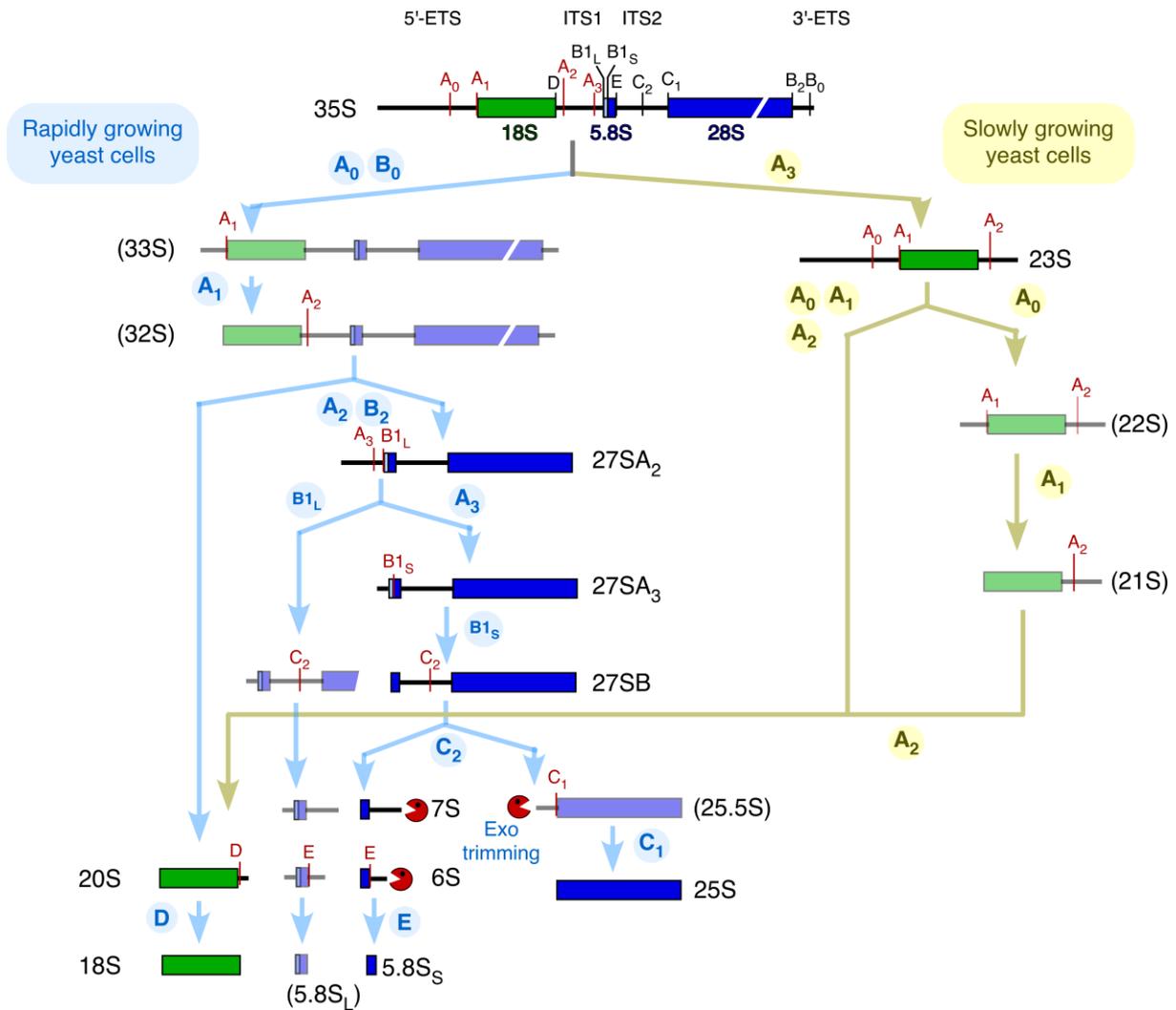


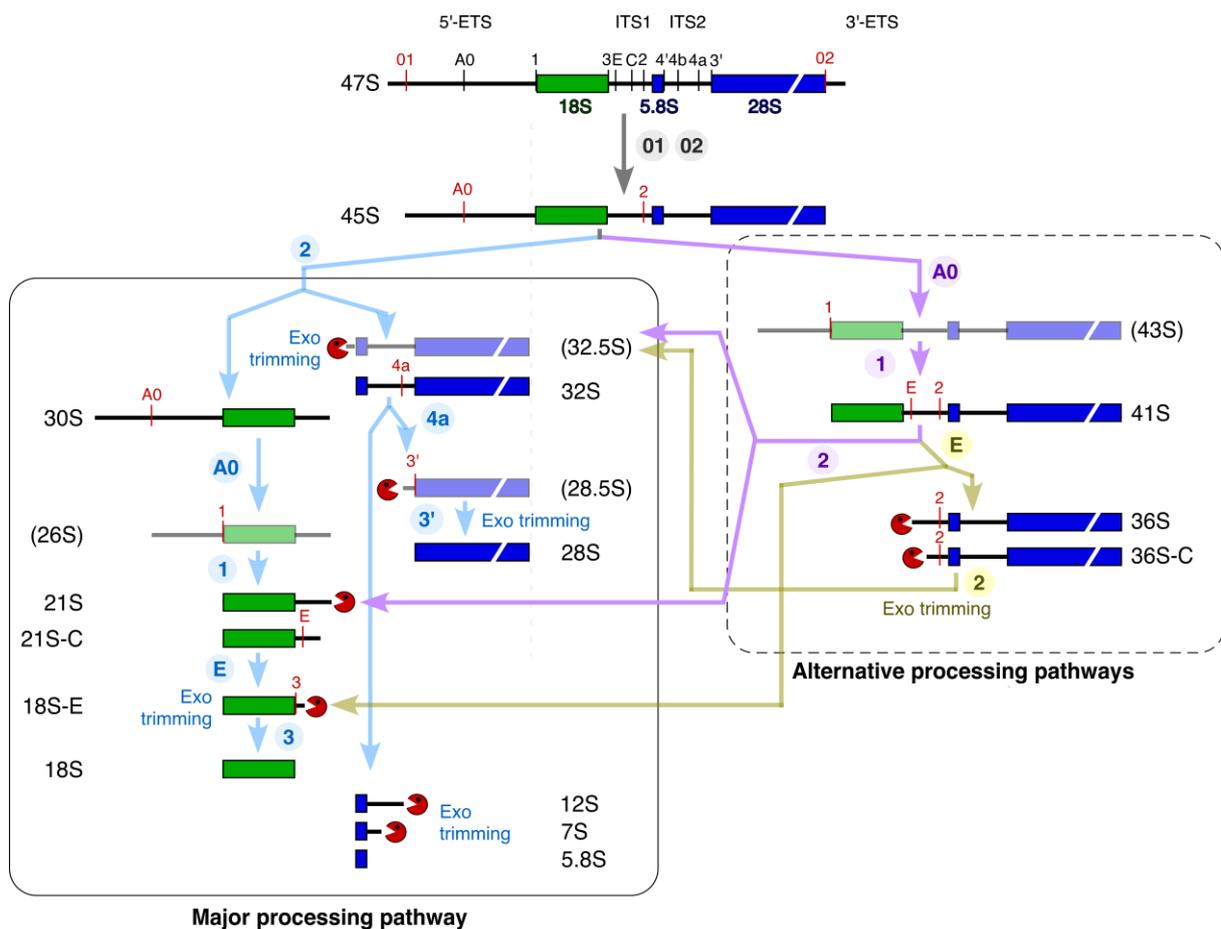
Figura 4. Esquema del procesamiento del pre-rRNA en células de levadura. A través de diferentes pasos consecutivos de procesamiento del pre-rRNA se van produciendo diferentes especies intermediarias de pre-rRNA hasta obtener las moléculas maduras. Los precursores de la subunidad pequeña se muestran en verde y los precursores de la subunidad grande se muestran en azul. Los sitios donde se van a producir los cortes o van a detenerse las exonucleasas se encuentran marcados en rojo en el paso en el que van a ocurrir. Cada precursor es designado por su tamaño (determinado por la velocidad a la que sedimentan en gradientes de sacarosa) y por el sitio procesado para generar dicho intermediario (por ejemplo, 27SA₂). Hay ciertos pasos del procesamiento que ocurren verdaderamente rápido generando especies muy transitorias que sólo son detectables bajo condiciones excepcionales. Estas especies se encuentran indicadas entre paréntesis. La vía de procesamiento principal, que tiene lugar en células en crecimiento exponencial, aparece señalada con flechas azules y la vía de procesamiento de las células que crecen despacio se señala con flechas amarillas. Más detalles en el texto principal. Figura adaptada de Klinge and Woolford, 2019 (52).

En condiciones óptimas de crecimiento, aunque de forma muy minoritaria, puede ocurrir el corte en A₃ antes de que se escinda el fragmento 5'-ETS, lo cual genera la especie de pre-rRNA 23S. Sin embargo, cuando las células presentan un crecimiento retardado, esta especie se produce en mayor cantidad, puesto que la cinética de cortes cambia (52,53). Los pre-rRNAs

22S (A₀–A₃) y 21S (A₁–A₃) son también detectados en ciertas circunstancias. Estas especies se acumulan en los pre-ribosomas de cepas mutantes de algunos RBFs y, durante mucho tiempo, fueron consideradas intermediarios improductivos destinados a ser degradados (34). Sin embargo, se sabe que estas especies son co-inmunoprecipitadas con RBFs en cepas silvestres. Además, se ha visto que la especie 21S, por ejemplo, es acumulada en una cepa portadora de mutaciones en el RBF Rrp5, en la que el procesamiento en A₂ está completamente inhibido. Dado que la tasa de crecimiento de esta cepa mutante es igual a la cepa silvestre, se cree que el pre-rRNA 21S es una especie productiva que puede ser procesada para dar el rRNA 18S maduro (54).

2.2.2. Procesamiento del pre-rRNA en células humanas

A diferencia de las levaduras, en las que la eliminación del fragmento 5'-ETS y el corte en ITS1 ocurre mayoritariamente de forma co-transcripcional, el procesamiento del pre-rRNA humano



(Figura 5) parece ocurrir post-transcripcionalmente, con la excepción de los cortes en el fragmento 5'ETS (55). Otras diferencias es que son necesarios un mayor número de cortes endo- y exonucleolíticos, tal y como cabría esperar por la mayor longitud de sus segmentos espaciadores (34).

Los primeros cortes que se producen, de forma muy rápida en condiciones normales, son en el extremo 5' (01) y 3' (02) de las regiones 5'-ETS y 3'-ETS, respectivamente. De forma diferente a levaduras, el corte en el sitio 2 de la región ITS1, que separa los precursores de las dos subunidades, suele producirse mayoritariamente antes de que el extremo 5'-ETS sea completamente escindido, generando las especies 30S (precursor del 18S) y 32.5S (precursor del 5.8S y del 28S). En levaduras, tras el corte en ITS1, el precursor del rRNA 18S no sufre ningún procesamiento adicional hasta llegar al citoplasma. En cambio, en células humanas el pre-rRNA 30S sufre varios cortes adicionales. Primero, se finaliza la eliminación del fragmento 5'-ETS cortando rápidamente en los sitios A₀ (la especie 26S apenas es detectada en condiciones normales) y 1, lo cual produce el pre-rRNA 21S. Esta especie es digerida en su extremo 3' por una exonucleasa para originar el pre-rRNA 21S-C. Posteriormente el 21S-C es procesado en el sitio E originando el 18S-E. Esta especie, antes de ser finalmente procesada en su extremo 3' por NOB1 en el citoplasma, es poliadenilada en ese mismo extremo y digerida parcialmente por la exonucleasa específica de poliA PARN en el nucleolo. En cuanto al precursor inmediato de los rRNAs de la subunidad grande, tras el corte en el sitio 2, el extremo 5' del pre-rRNA 32.5S es rápidamente digerido y da lugar al pre-rRNA 32S. El corte en ITS2 ocurre principalmente en el sitio 4a formando las especies 12S y 28.5S. Los extremos 5' de los rRNAs 5.8S (en la especie 32.5S) y 28S (en la especie 28.5S) ocurren por digestiones llevadas a cabo por exonucleasas 5'-3'. El procesamiento del extremo 3' del 12S y de su producto de digestión, el pre-rRNA 7S, son producidas por digestiones sucesivas de diferentes exonucleasas 3'-5' (34,41,49,50,53,56).

Figura 5. Esquema del procesamiento del pre-rRNA en células humanas. Al igual que en levaduras, en el procesamiento del pre-rRNA humano se van formando diferentes especies intermediarias. Los precursores de la subunidad pequeña se muestran en verde y los precursores de la subunidad grande se muestran en azul. Los sitios donde se van a producir los cortes o van a detenerse las exonucleasas se encuentran marcados en rojo en el paso en el que van a ocurrir. Cada precursor es designado por su tamaño (determinado por la velocidad a la que sedimentan en gradientes de sacarosa) y por el sitio procesado para generar dicho intermediario (por ejemplo, 21S-C). Hay ciertos pasos del procesamiento que ocurren muy rápido generando especies muy transitorias que sólo son detectables bajo condiciones excepcionales. Estas especies se encuentran indicadas entre paréntesis. La vía de procesamiento principal aparece señalada con flechas azules y las vías de procesamiento alternativas aparecen señaladas con flechas rosas y amarillas. Figura adaptada de Henras et al., 2015 (41).

Se ha visto que los cortes en los pre-rRNAs no siempre ocurren siguiendo un orden estricto. Como se describió más arriba, en levadura hay un paso sujeto a procesamiento alternativo y es en el corte de ITS1, que es producido en un pequeño porcentaje de pre-rRNAs en A₃ (~15%) en lugar de en A₂ (~85%) (40). En células humanas y de ratón hay muchas más rutas alternativas de procesamiento. En un bajo porcentaje de pre-rRNAs humanos la eliminación completa de la región 5'-ETS puede ocurrir antes que el corte en 2 produciendo las especies 43S (corte en A₀) o 41S (corte en 1). Estas especies pueden ser procesadas posteriormente en el sitio 2 formando las especies 32.5S y 21S que continuarán madurando por la ruta de procesamiento mayoritario. Además, si el corte en 2 es retardado, puede producirse el corte en E en la región ITS1 formando las especies 18S-E y 36S. Esta última especie acaba siendo procesada en el sitio 2, dando lugar al pre-rRNA 32.5S (41,49,53,56,57).

La funcionalidad de estas vías de procesamiento alternativo es aún desconocida. Aunque todo parece indicar que el acceso a los diferentes sitios de corte por parte de las endonucleasas pueda ser el factor decisivo para seguir una ruta de procesamiento u otra, esta cuestión está aún por determinar. Se ha especulado que el orden de los cortes en ITS1 podría depender de la cinética de maduración de las subunidades (56). Se desconoce totalmente si la alteración de los cortes conlleva alguna consecuencia en la composición de las partículas pre-ribosómicas o en el desensamblaje de estas. Si todas las especies producidas por estas vías de procesamiento alternativo son productivas o, por el contrario, parte de ellas son degradadas, es otra de las cuestiones que queda por resolver.

2.3. FORMACIÓN Y MADURACIÓN DE PRE-RIBOSOMAS

Al igual que ocurre con la síntesis y el procesamiento del pre-rRNA, es en *S. cerevisiae* en donde se han caracterizado con mayor detalle la formación y composición de las partículas pre-ribosómicas. La facilidad para la manipulación genética y el alto rendimiento obtenido en las purificaciones de pre-ribosomas en esa levadura han favorecido enormemente la caracterización bioquímica de diferentes pre-ribosomas. En células humanas su estudio ha estado frenado por la falta de técnicas eficientes de solubilización y purificación de pre-ribosomas, en gran parte debida a la alta viscosidad de las capas internas del nucleolo.

Con el desarrollo de técnicas de cryo-EM de alta resolución se han ido conociendo en detalle las composiciones y estructuras de la mayor parte de los pre-ribosomas más abundantes de levadura (58–70). En células humanas, el número de partículas conocidas a nivel estructural es mucho menor (71–73). Se han caracterizado algunos de los complejos pre-40S de pasos

intermedios y tardíos y, recientemente, se ha conseguido purificar y caracterizar el procesoma SSU inicial en varios estados de maduración. A pesar de esto, aún quedan numerosos pasos y partículas humanas por conocer, sobre todo las que se forman en de los primeros pasos de la ruta. Por ello, es necesaria la búsqueda de métodos y estrategias que faciliten la purificación de pre-ribosomas humanos que se forman en las regiones más internas del nucleolo.

2.3.1. Ensamblaje y maduración del procesoma SSU

Tanto en levadura como en humanos, el ensamblaje de los primeros RBFs y RPs a las partículas se produce de forma co-transcripcional, siguiendo un orden coordinado y estricto. La incorporación de los RBFs de ambas subunidades al pre-rRNA naciente se conoce con bastante detalle en levaduras. Los primeros estudios que analizaron este proceso de forma sistemática utilizaron como estrategia la expresión de fragmentos del pre-rRNA 35S truncados en el extremo 3' seguidos de la purificación e identificación de los RBFs unidos a esos fragmentos (**Figura 6**) (74–76). El primer módulo que se une al pre-rRNA es el complejo UTP-A, seguido del snoRNP U3 y del subcomplejo UTP-B. Estos primeros componentes, junto con otros RBFs que se unen posteriormente van a formar el primer bloque del procesoma SSU, denominado partícula 5'ETS, que contiene la región 5'ETS del pre-rRNA (58–60).

Tras su formación, el procesoma SSU (**Figura 7**) sufre diferentes remodelaciones como parte de su maduración mediadas por diferentes helicasas y endo- y exonucleasas. La helicasa Dhr1 (DHX37 en humanos) y su co-activador Utp14 (UTP14A en humanos) tienen un papel importante en el desensamblaje del procesoma SSU y en la liberación de la partícula 5'ETS. Los fragmentos 5'ETS del pre-rRNA son degradados por el exosoma y los RBFs son reciclados para volver a formar parte de nuevos procesomas SSU (77,78). La partícula resultante (pre-40S) no tiene bien formado el DCS. El rRNA 18S todavía tiene que sufrir plegamientos adicionales del para que se genere la arquitectura característica del centro descodificador de la subunidad pequeña (42,72).

Los pasos y subcomplejos que median la formación procesoma SSU humano no se han estudiado en detalle y, aunque hay un número alto de RBFs del procesoma de levadura que tienen homólogos en humanos y cuyos fenotipos de depleción sugieren una función conservada, muchos de ellos todavía no se han visualizado en las estructuras reveladas por cryo-EM. Las primeras estructuras del procesoma SSU humano se publicaron el año pasado. Contienen el pre-rRNA ya procesado en ITS1 (30S) (72). La estructura de la partícula que contiene el pre-rRNA inicial sin procesar (47S, 45S y 41S) no se conoce.

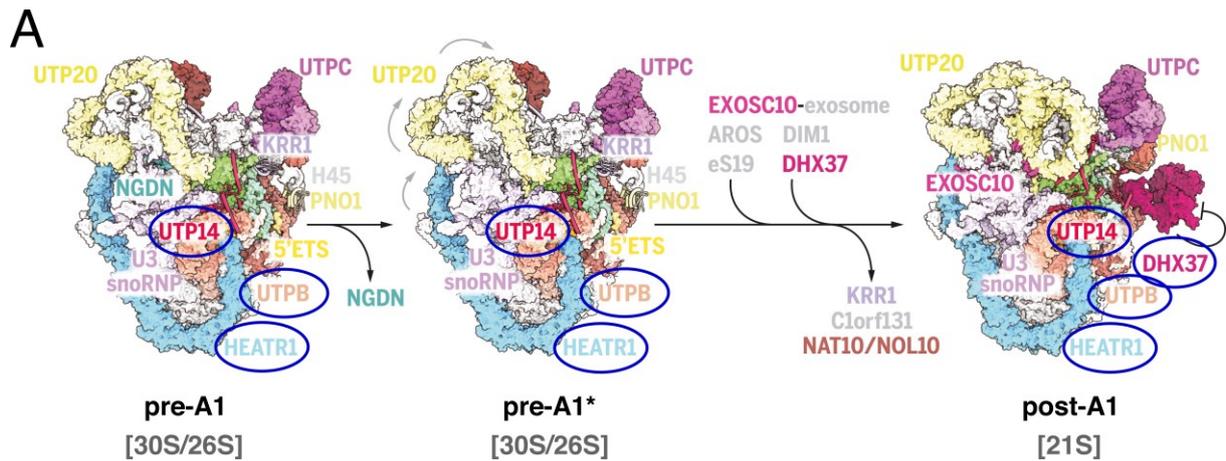


Figura 7. La cryo-EM de alta resolución ha revelado las estructuras de tres intermediarios del procesoma SSU humano. Representación esquemática de las estructuras reveladas por cryo-EM del procesoma SSU humano donde se señalan alguno de los RBFs, principalmente, aquellos distintivos de cada intermediario. Una vez que el procesoma SSU ha madurado lo suficiente y se produce el corte en A1, los RBFs UTP14A y DHX37 van a tener un papel fundamental en la disociación de la partícula 5'ETS. DHX37, tras ser activada por UTP14A, va a promover la disociación de la snoRNP U3 provocando la liberación de la partícula 5'ETS del pre-40S que va a seguir la ruta de maduración. Las secuencias de pre-rRNA que contienen cada una de estas partículas aparecen indicadas y alguna de las proteínas que vamos a mencionar en el trabajo presentado en esta tesis aparecen rodeadas con un círculo azul (72,77). Figura tomada de Singh Sameer *et al.*, 2022.

2.3.2. Maduración de pre-ribosomas 40S

Tras la disociación de la partícula 5'ETS, las partículas pre-40S continúan su maduración en diferentes pasos en las diferentes regiones del nucleolo, nucleoplasma y citoplasma. Aunque los pre-40S de células humanas solo han sido visualizados por cryo-EM en los pasos de maduración más tardíos, en el nucleoplasma y citoplasma (71,80), en el laboratorio de Mercedes Dosil se han caracterizado bioquímicamente dos partículas pre-40S nucleolares (pre-40S No1 y pre-40S No2) de distinta composición (81) (**Figura 8**). Los resultados de ese trabajo, junto con datos de las estructuras 3D de las partículas que intervienen en pasos posteriores, permiten plantear un modelo (representado en la **Figura 8**) sobre el intercambio de RBFs en la partícula pre-40S durante los pasos finales de su maduración. Esa partícula sufre remodelaciones en su estructura hasta adoptar una conformación en la que el extremo 3' del pre-rRNA 18S-E se posiciona en el centro activo de la endonucleasa NOB1 para que realice el corte en el sitio 3 (**Figura 5**) (71,80,81). Este proceso en levaduras es precedido de la formación de un complejo similar al de traducción (80S) en el que interviene la subunidad 60 madura actuando como un mecanismo de control de calidad. Nob1 escinde el extremo 3' del pre-rRNA 20S (el precursor inmediato al rRNA 18S en levaduras) sólo cuando se produce la correcta unión de las dos subunidades (39,71). No hay evidencia de que la célula humana utilice este mecanismo de

control de calidad. De hecho, parecen contar con un mecanismo diferente en el que intervienen los factores EIF1AD y LRRC47 (71).

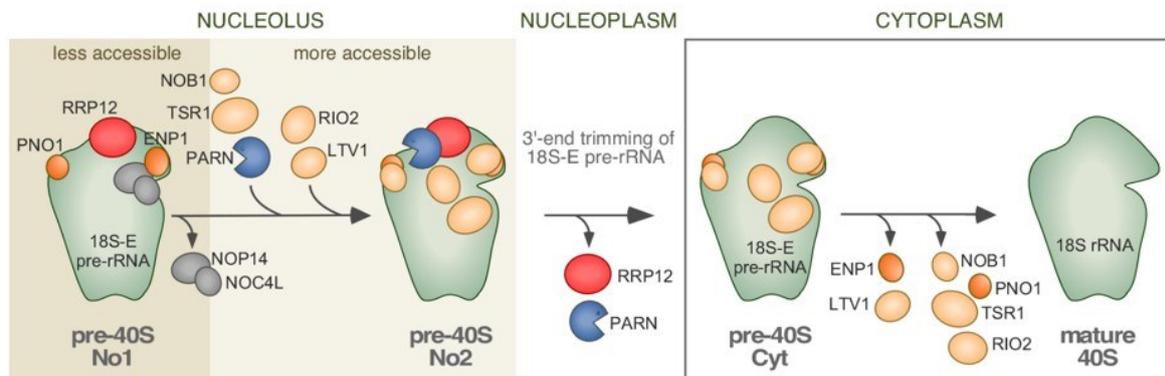


Figura 8. Modelo de los pasos intermedios y tardíos de maduración de las partículas pre-40S. En el nucleolo se distinguen dos intermediarios pre-40S con una composición diferente en RBFs pero con el mismo pre-rRNA, el 18S-E. En estos pasos ya hay pasos específicos que solo ocurren en células humanas, tales como la incorporación de PARN a los pre-40S. PARN es un RBF que no tiene homólogo en levadura. Figura tomada de Nieto *et al.*, 2020 (81).

2.3.3. Ensamblaje y maduración de pre-ribosomas 60S

La maduración de la LSU es mucho más compleja que la de la SSU. En ella intervienen un mayor número de RBFs y se originan un mayor número de pre-ribosomas intermedios con distintas composiciones. La caracterización de esos intermediarios ha sido muy estudiada en *S. cerevisiae* gracias a purificaciones con “baits” específicos de cada partícula y su posterior análisis bioquímico (44,52). Al igual que con el ensamblaje del procesoma SSU, en levadura está establecido qué RBFs se unen a cada dominio del precursor de los rRNAs de la LSU (**Figura 9**) (75,76). En este caso, el pre-rRNA no es plegado de forma co-transcripcional, como ocurre con el precursor de la SSU. Los dominios I y II del 25S junto con el 5.8S y la región ITS-2 se pliegan con el dominio VI formando un núcleo compacto sobre el cual se van a plegar el resto de los dominios del pre-rRNA y se van a unir los diferentes RBFs (67–69). En los sucesivos complejos, que se van formando en el nucleolo, nucleoplasma y citoplasma, se van incorporando y liberando diferentes RBFs que median el resto de cambios estructurales necesarios para configurar la subunidad madura (39,67–69). Uno de los aspectos importantes en la formación de las partículas pre-60S es la incorporación de la RNP 5S, un subcomplejo formado por el RNA 5S y las proteínas ribosómicas RPL5 y RPL11. Su modo de incorporación a las partículas no se conoce en detalle, pero se piensa que debe ocurrir en pasos muy iniciales

de la formación de los pre-60S. El reclutamiento de la RNP 5S y su rotación en 180°, para que la protuberancia central (CP) adquiera su forma madura, dependen del módulo de RBFs RRS1-RPF2 (42,68).

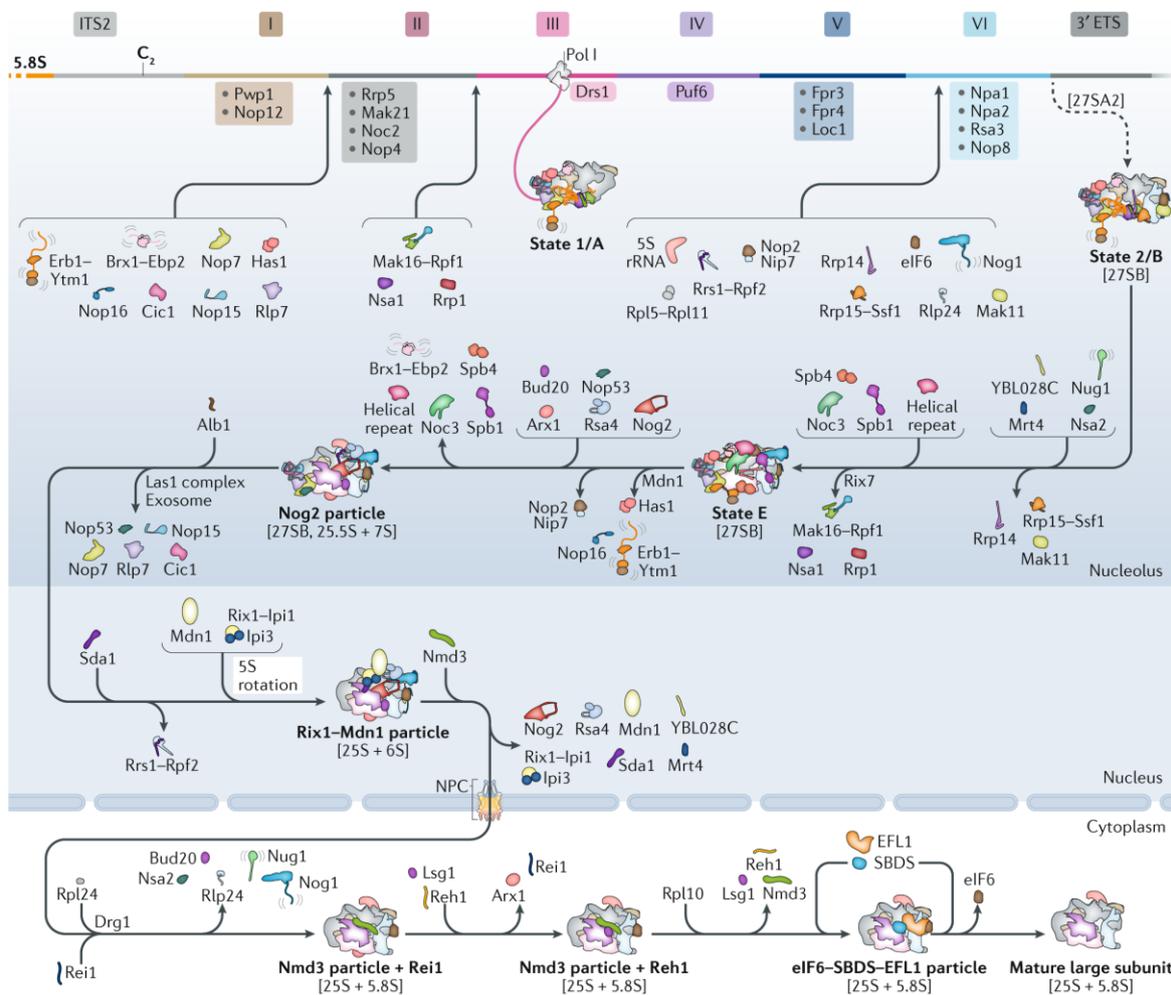


Figura 9. Ensamblaje de la subunidad grande de los ribosomas. Se muestran los pasos consecutivos necesarios para la maduración de la subunidad grande, desde los estados más tempranos en el nucleolo, pasando por las etapas en el nucleoplasma para finalizar su maduración en el citoplasma. Un segmento del rDNA es representado donde cada uno de los segmentos del pre-rRNA se indican de un color distinto. Los segmentos representados son: la región ITS2 (gris claro), los dominios I (marrón), II (magenta), III (rosa), IV (morado), V (azul oscuro) y VI (azul claro) del rRNA 25S y la región 3' ETS (gris oscuro). Se indican los RBFs que son detectados con cada dominio o región del pre-rRNA, así como el momento de su disociación de las partículas pre-60S. Las especies de pre-rRNA presentes en cada complejo aparecen indicadas. Figura tomada de Klinge, y Woolford, 2019 (52).

Los análisis por cryo-EM también se han utilizado para el estudio de complejos pre-60S de levadura aunque, al igual que ocurre con los pre-40S, los mejor caracterizados son los que se encuentran en los pasos más tardíos de la ruta (nucleoplasmáticos y citoplasmáticos). De hecho, los complejos pre-60S más tempranos visualizados mediante esta técnica son posteriores al

corte del pre-rRNA en el sitio B ya que contienen el pre-rRNA 27SB (**Figura 4**) (68,69). Se han intentado algunas estrategias, como el crecimiento de levaduras con limitación de nutrientes o el empleo de cepas con mutaciones en RBFs, para enriquecer las preparaciones de pre-ribosomas en pre-60S tempranos (68,70). En un estudio publicado recientemente se emplean cepas mutantes para caracterizar la partícula pre-60S más inicial, la que está unida al procesoma SSU en el pre-ribosoma bipartito. Este primer pre-60S está unido al procesoma SSU a través del RBF Rrp5 y del subcomplejo Utp-C y contiene otros RBFs que están presentes en partículas pre-60S posteriores (Nop7, Erb1, Nsa3, Rpf2) y algún RBF que parece estar unido sólo a los tempranos, tal como Nop4 (70). No hay ningún estudio publicado sobre las estructuras de complejos tempranos pre-60S humanos.

3. DIFICULTADES TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LOS PRE-RIBOSOMAS NUCLEOLARES HUMANOS.

En este apartado se resume la información que fundamenta los dos primeros objetivos de esta tesis.

Como se ha visto en los apartados anteriores, los aspectos más básicos de la biogénesis de los ribosomas están conservados desde levaduras a células humanas (39,42,52,79). Sin embargo, hay algunas características que son específicas de células humanas que despiertan un gran interés, no sólo porque son parte de un proceso celular básico y esencial, sino porque pueden aportar información sobre las bases moleculares de enfermedades causadas por defectos de síntesis de ribosomas (ribosomopatías) (36,82,83). Además del interés desde el punto de vista básico, la desregulación de la ruta de síntesis de ribosomas en ciertos tipos de cáncer ha generado interés por identificar compuestos que puedan bloquearla específicamente en células tumorales (15,17,18,34,84). A pesar de la creciente atención hacia la ruta, la información sobre la composición y estructura de los pre-ribosomas humanos, especialmente de los pre-ribosomas iniciales nucleolares, es todavía muy limitada. Esto es debido a las dificultades técnicas asociadas a la extracción de estos complejos del nucleolo. Las preparaciones de pre-ribosomas humanos están muy poco enriquecidas en partículas iniciales o tienen composiciones muy heterogéneas debido a que los complejos se rompen con los métodos de extracción empleados (72,81).

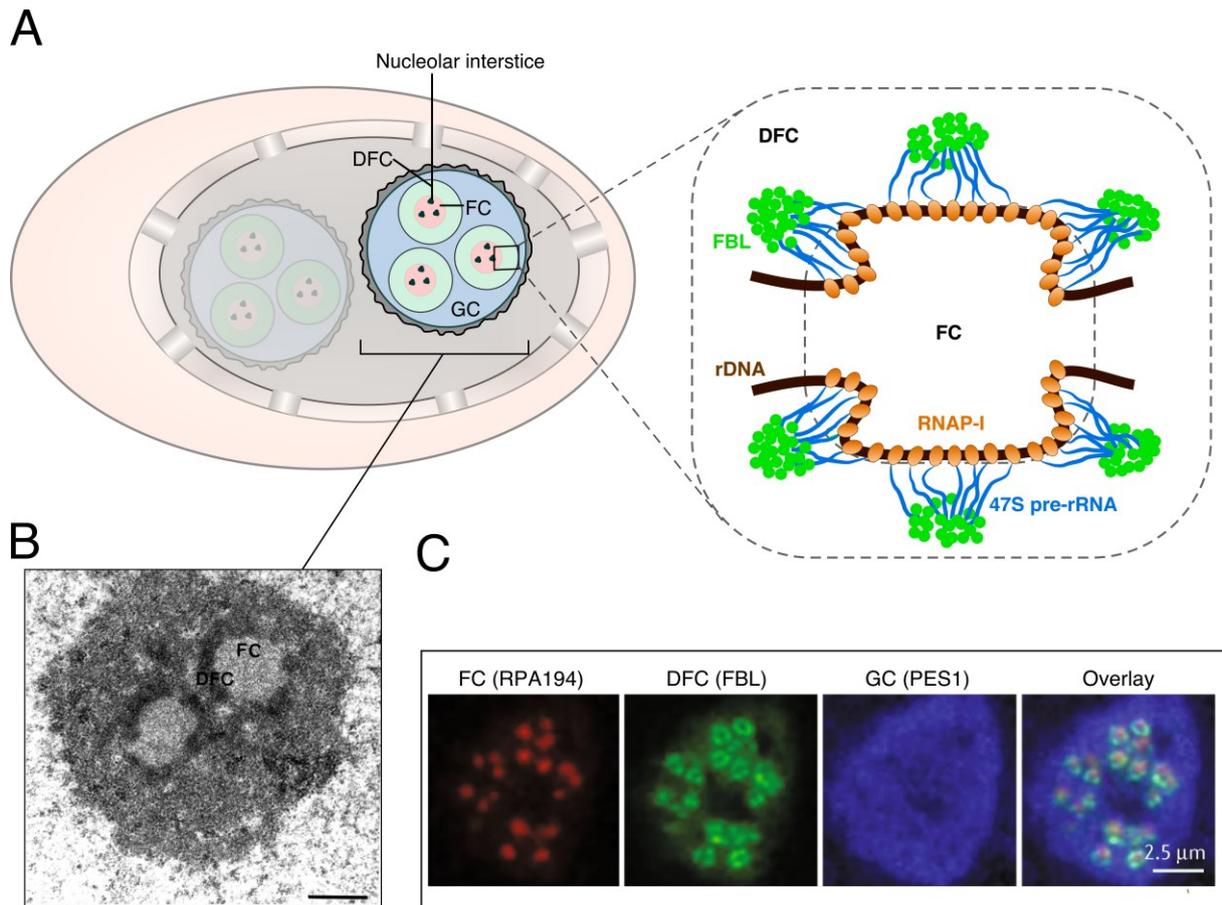


Figura 10. Estructura del nucleolo humano donde se muestra la organización de sus subcompartimentos: el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC). (A) Modelo de la organización del FC/DFC y disposición del pre-rRNA 47S en una de las decenas de unidades transcripcionales que hay en cada nucleolo. Al tiempo que el pre-rRNA se empieza a sintetizar en la interfase formada por el FC y el DFC se asocian los primeros RBFs (tales como FBL, un componente de la snoRNP U3). Esta asociación de factores provoca la formación de la fase del DFC. El pre-rRNA naciente se mueve de la interfase del FC/DFC al DFC, donde va a iniciar su procesamiento. Las unidades transcripcionales de FC/DFC se encuentran embebidas en el GC, región donde continúa el procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje de los ribosomas. Figura adaptada de Lafontaine *et al.*, 2021 (85) y Chen *et al.*, 2019 (43). (B) Micrografía electrónica de una célula HeLa. Las tres regiones del nucleolo humano: FC, DFC y GC aparecen indicadas. Escala: 0.5 μm . Foto tomada de Sirri *et al.* 2002 (86). (C) Análisis de inmunofluorescencia donde se muestran los tres subcompartimentos del nucleolo: el FC detectado con un anticuerpo contra la subunidad RPA194 de la RNAP-I, el DFC con un anti-FBL y el GC con un anti-PES1. Figura tomada de Lafontaine *et al.*, 2021 (85).

Uno de los principales problemas para obtener buenas preparaciones de precursores ribosómicos humanos es que las partículas tempranas son retenidas dentro del condensado multifásico que compone al nucleolo. La transcripción del rDNA y el ensamblaje de las partículas ribonucleoproticas que se producen en ese subcompartimento, además de otros complejos que se sintetizan en el nucleolo o se localizan en él, producen una separación de fases líquido-líquido (43,85). Se piensa que este es el origen de la arquitectura del nucleolo de mamíferos en el que se distinguen tres subcompartimentos (**Figura 10**) (43,85,86). Otro de los

problemas es la selección de “baits” para la purificación de pre-ribosomas. Una buena “bait” de purificación es un RBF (fusionado a una etiqueta) que se encuentra establemente unido al pre-ribosoma. El problema es que la mayoría de los RBFs expresados exógenamente no se incorporan eficientemente a los pre-ribosomas. Debido a estas dificultades, la mayoría de los estudios sobre la funcionalidad de un determinado RBF se han realizado o bien analizando los defectos que su silenciamiento provoca en el procesamiento del pre-rRNA, mediante análisis de Northern blot, u observando los cambios en la localización de otros RBFs. Estas estrategias, aunque son frecuentemente empleadas, pueden dar lugar a conclusiones erróneas sobre el papel de determinados RBFs en la ruta, tal y como se verá en un ejemplo que se mostrará más adelante en este trabajo (72,81).

Por todos los problemas mencionados anteriormente, es necesario desarrollar nuevos métodos y herramientas para la extracción, purificación y caracterización de los pre-ribosomas humanos nucleolares que permitan su aislamiento sin comprometer su integridad. La primera parte de esta tesis se dedica al desarrollo de esos métodos y herramientas. Para consultar esa parte no es estrictamente necesario leer el resto de esta introducción. Está descrita en la sección **RESULTADOS I** (pág. XX)

4. MODIFICACIONES EN EL RNA RIBOSÓMICO

Como se ha mencionado en apartados anteriores, aunque todos los ribosomas contienen numerosos nucleótidos del rRNA modificados, el contenido de algunas de las modificaciones es variable. Se han identificado nucleótidos que se encuentran parcialmente modificados en ciertas condiciones en las que se detecta que la modificación está en cantidades subestequiométricas. También se ha visto que algunas modificaciones del rRNA varían entre diferentes tipos celulares o en ciertas enfermedades como el cáncer (21,22,34). El significado de estas observaciones no es conocido.

La diversidad de modificaciones en el RNA es muy grande en la naturaleza, pero en las moléculas de rRNA solamente existe un pequeño grupo de ellas (25). La mayoría son metilaciones en el residuo de ribosa (2'-O-metilaciones o Nm) e isomerizaciones de las uridinas a pseudouridinas (Ψ) (rotación en 180° del anillo de pirimidina sobre el eje N₃-C₆) que son catalizadas por las snoRNPs de tipo C/D y de tipo H/ACA, respectivamente. Una fracción

minoritaria de las modificaciones del rRNA son modificaciones de las bases nitrogenadas que son catalizadas por enzimas que actúan en los pre-ribosomas de forma individual (4,21,22).

Se piensa que la mayoría de las modificaciones del rRNA sirven para estabilizar las estructuras secundarias o terciarias de las moléculas de rRNA y asegurar una traducción eficiente (4,22).

4.1. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL rRNA

Los ribosomas de células humanas han adquirido un número importante de modificaciones del rRNA si los comparamos con los ribosomas de bacterias e, incluso, de levaduras (**Figura 11**). Los ribosomas de *S. cerevisiae* tienen, aproximadamente, la mitad de modificaciones que las que han sido detectadas en células humanas (25,87,88). Los análisis de cryo-EM también han sido determinantes en este campo porque han permitido identificar y localizar un gran número de modificaciones en la estructura del ribosoma maduro humano (87) y, aunque algunas de esas modificaciones no han podido ser confirmadas por espectrometría de masas, la mayoría de ellas sí están confirmadas. En total, se han identificado 228 nucleótidos modificados en las cuatro moléculas de rRNA humano (25).

La mayoría de estas modificaciones se concentran en las regiones funcionalmente importantes de ambas subunidades (**Figura 12**), lo cual sugiere que su presencia está relacionada con las funciones básicas de los ribosomas, tales como la descodificación del mRNA (en el DCS), la formación del enlace peptídico (en PTC) o la translocación (muchas de ellas en la zona de unión de ambas subunidades). Además de localizarse en esas regiones funcionales, hay modificaciones que se encuentran en otras zonas más alejadas. Se especula que su presencia en esos sitios podría servir para regular la interacción con los ligandos (mRNAs, tRNAs, y factores de traducción) o estabilizar su estructura interna (21,22,34,87).

En la mayoría de los casos, la pérdida de una única modificación no afecta ni a la viabilidad de las células ni al funcionamiento básico los ribosomas. Sin embargo, la pérdida conjunta de varias modificaciones sí lo hace. Aún se desconoce cómo afectan a las funciones del ribosoma las modificaciones variables o subestequiométricas. Se especula, pero no está demostrado, que podrían contribuir al perfeccionamiento u optimización de la traducción de mRNAs específicos en determinados contextos celulares (21,22,25).

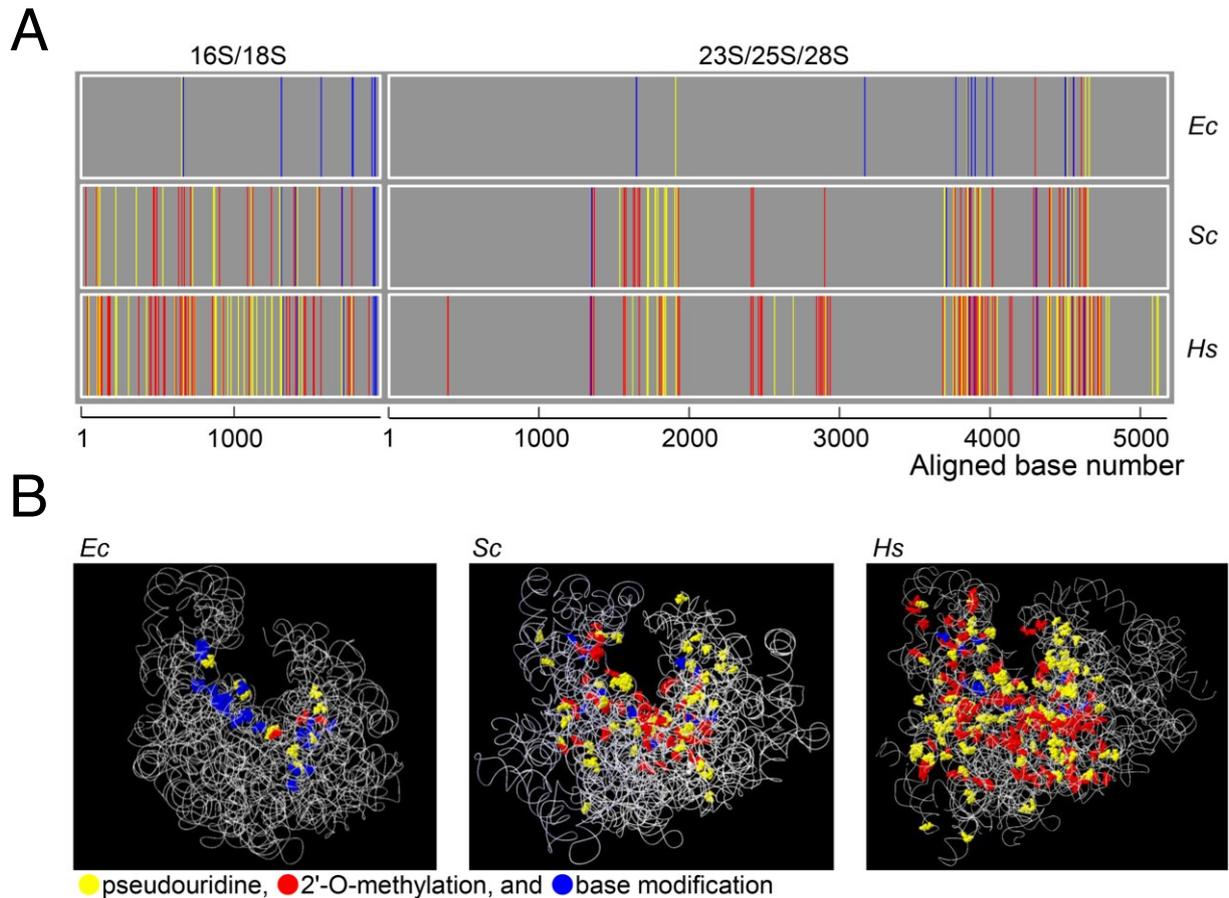
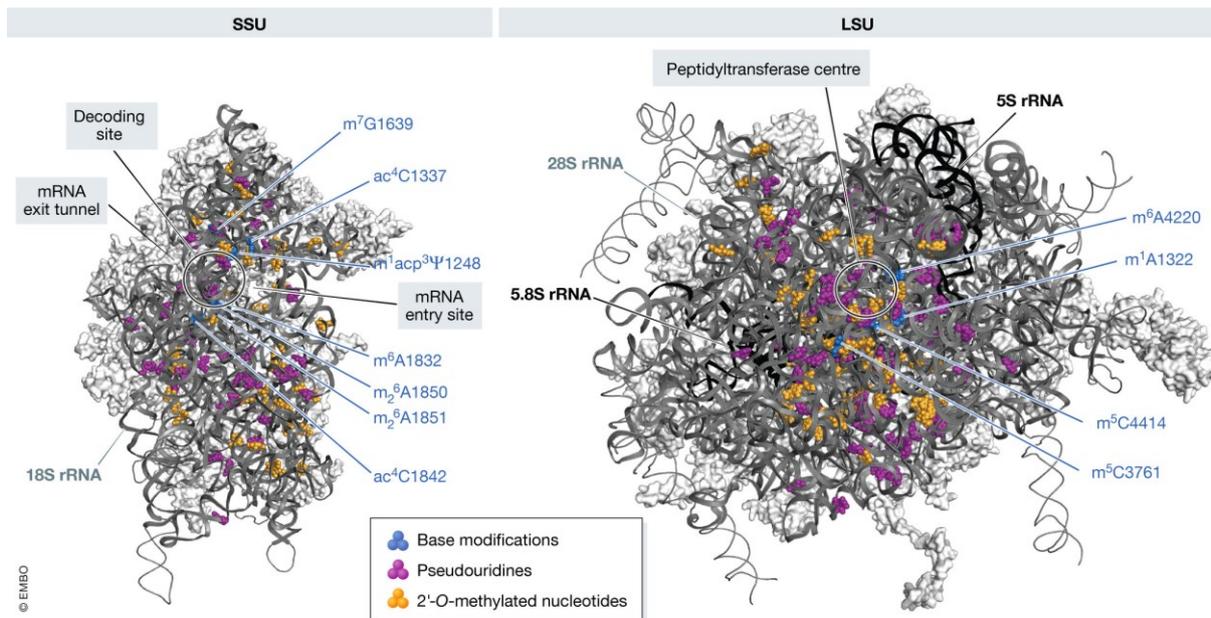


Figura 11. Distribución de las modificaciones de las moléculas de rRNA de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. (A) Mapa unidimensional de las modificaciones de las moléculas de rRNA de *E. coli* (*Ec*), levadura (*S. cerevisiae*, *Sc*) y humanos (*Hs*). Los sitios de modificación se representan frente a secuencia de rRNA alineadas por homología. Las pseudouridinas están indicadas con color amarillo, las 2'-O-metilaciones con rojo y las modificaciones de las bases nitrogenadas en azul. (B) Mapa tridimensional de los ribosomas de *Ec*, *Sc* y *Hs*. Las modificaciones se indican como en (A). Figura tomada de Taoka *et al.*, 2018 (25).

Figura 12. Distribución de las modificaciones del rRNA en las dos subunidades de los ribosomas humanos. Estructuras terciarias de la subunidad ribosómica pequeña (SSU) y subunidad grande (LSU) donde se muestran las moléculas de rRNA y las proteínas ribosómicas. Las pseudouridinas se muestran en morado, las 2'-O-metilaciones en amarillo y las modificaciones de las bases nitrogenadas en azul. El tipo de modificación y el nucleótido de la base nitrogenada modificado, así como, las regiones de importancia funcional están indicadas. Figura tomada de Bohnsack y Bohnsack (34).



4.2. PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LAS MODIFICACIONES DEL rRNA

Las modificaciones del rRNA, recogidas en la **Tabla II**, son catalizadas por enzimas que acceden a los residuos que van a modificar incorporándose a los pre-ribosomas, bien guiados por un RNA en forma de complejo ribonucleoproteico (snoRNP), o bien de forma individual como un RBF más (34).

4.2.1. snoRNPs

La mayoría de las modificaciones encontradas en el rRNA son catalizadas por unos subcomplejos, denominados snoRNPs, que se unen a los pre-ribosomas. Estos subcomplejos están compuestos por un RNA pequeño nucleolar (snoRNA) y otros componentes proteicos. El snoRNA se une por complementación de bases con el pre-rRNA dirigiendo al componente proteico que posee la actividad catalítica hacia el residuo que va a modificar. Hay dos tipos diferentes de snoRNPs, las snoRNPs de tipo H box/ACA que catalizan las pseudouridilaciones (Ψ) y las snoRNPs de tipo C/D box que catalizan las 2'-O-metilaciones (Nm) (89,90).

Tabla II. Modificaciones identificadas en los rRNAs de *S. cerevisiae* y *H. sapiens* y enzimas que las introducen (34,88).

rRNAs	Modificación (<i>S. cerevisiae</i>)	Enzima (<i>S. cerevisiae</i>)	Modificación (<i>H. sapiens</i>)	Enzima (<i>H. sapiens</i>)
18S	m ¹ acp ³ Ψ1191	snR35, Emg1, Tsr3	m ¹ acp ³ Ψ1248	SNORA14, EMG1, TSR3 (91)
	ac ⁴ C1280	Kre33	ac ⁴ C1337	NAT10
	m ⁷ G1575	Bud23	m ⁷ G1639	WBSCR22
	-	-	m ⁶ A1832	METTL5 (32)
	ac ⁴ C1773	Kre33	ac ⁴ C1842	NAT10
	m ₂ ⁶ A1781/2	Dim1	m ₂ ⁶ A1850/1	DIM1L
25 / 28S	m ¹ A645	Rrp8	m ¹ A1322	RRP8 (NML)
	m ¹ A2142	Bmt2	-	-
	m ⁵ C2278	Rcm1 (Bmt3)	m ⁵ C3782	NSUN5
	m ³ U2634	Bmt5	-	-
	m ³ U2843	Bmt6	-	-
	-	-	m ⁶ A4220	ZCCHC4 (92)
	m ⁵ C2870	Nop2 (Bmt4)	m ⁵ C4447	NSUN1 (NOP2, NOL1)
	Gm2922	Spb1	Gm4469	Unkown
-	-	m ³ U4530	Unknown	
18S, 25/28S, 5.8S	Nm (~x55)	Nop1 (snoRNPs C/D)	(~x112)	FBL (snoRNPs C/D box)
	Ψ (~x46)	Cbf5 (snoRNPs H/ACA)	(~x105)	DKC1 (snoRNPs H box/ACA)

Las snoRNPs de tipo H box/ACA están formadas por un snoRNA con estructura de horquilla doble que es estabilizada por los componentes proteicos de la partícula (las proteínas NOP10, NHP2 y GAR1 en humanos). La proteína que cataliza la isomerización de la uridina es la diskerina (DKC1). Las proteínas que forman parte de las snoRNPs de tipo C/D son NOP56, NOP58, 15.5K (Snu13 en levaduras) y FBL (Nop1 en levaduras), que es la metiltransferasa que cataliza la metilación de la ribosa (89,90).

La mayoría de las modificaciones realizadas por las snoRNPs se introducen en el pre-rRNA de forma co-transcripcional, en los pasos más tempranos de la maduración de ribosomas. Se cree que esto es así porque en los pasos más tardíos, el pre-rRNA está plegado de tal forma que los snoRNAs no pueden unirse con él. La mayor parte de las snoRNPs catalizan la modificación de un solo nucleótido del pre-rRNA, pero esto no es siempre así. Hay casos donde una misma snoRNP realiza la modificación de dos nucleótidos diferentes (en la misma molécula o en diferentes moléculas de rRNA). También se han descrito nucleótidos que son modificados por

dos snoRNPs distintas (21,22,89,90). Por último, hay snoRNPs, tales como la snoRNP U14, que, además de modificar un residuo del pre-rRNA, participan en su procesamiento (93). Una snoRNP distintiva es la snoRNP U3, que no modifica el pre-rRNA y, tiene un papel esencial en el ensamblaje del procesoma SSU y, por tanto, en la síntesis de la SSU (22,89,94).

4.2.2. Enzimas individuales

Además de las 2'-O-metilaciones y pseudouridilaciones, los ribosomas de las células eucariotas presentan hasta 8 tipos diferentes de modificaciones en las bases nitrogenadas. Algunas de ellas están conservadas entre células de levadura y células humanas, pero hay otras que son específicas de organismo. Entre las enzimas modificadoras humanas hay metiltransferasas (WBSCR22 (BUD23), DIMT1L, EMG1, NSUN1, NSUN5 y RRP8) que utilizan la S-adenosilmetionina (SAM) como cofactor del cual captan el grupo metilo para transferirlo al RNA, una acetiltransferasa (NAT10) y una aminocarboxipropiltransferasa (TSR3), la cual también usa la SAM como donador del grupo aminocarboxipropilo. La mayoría de estas enzimas, al igual que ocurre con la mayor parte de los RBFs, son esenciales para la viabilidad celular. Mediante experimentos de rescate con versiones catalíticamente inactivas de las enzimas, se ha demostrado que su esencialidad no depende de la actividad modificadora del rRNA, sino de la propia presencia de la proteína, la cual es necesaria para un paso concreto en la maduración de un complejo pre-ribosómico (21,22). Sólo hay tres proteínas modificadoras (NSUN5, TSR3 y RRP8) que no son esenciales para el crecimiento de células en cultivo en condiciones óptimas aunque, en el caso de RRP8, se ha visto que su eliminación o inactivación tiene efectos sobre la viabilidad de células de levadura en condición de estrés o afecta el desarrollo a nivel de organismo (ver siguiente apartado) (95–97).

A diferencia de las 2-O'-metilaciones y pseudouridilaciones, que son introducidas durante los primeros pasos de la formación de los ribosomas, hay datos que indican que las modificaciones de bases son introducidas más tarde y, además, que el paso en el que se incorpora la enzima a los pre-ribosomas no es necesariamente el paso en el que ejecuta la modificación. Por ejemplo, DIMT1L se asocia con pre-ribosomas nucleolares pero cataliza su modificación más tarde en el nucleoplasma, justo después de que WBSCR22 catalice la suya. El caso del residuo hiper modificado del 18S es especial, ya que requiere la acción coordinada de tres factores diferentes. Primero la U1248 es transformada en Ψ1248 por la snoRNP SNORA14, posteriormente es metilada por EMG1 y, finalmente, TSR3 cataliza la

incorporación del residuo aminocarboxipropilo. Se piensa que estos pasos ocurren en el nucleolo, nucleoplasma y citoplasma, respectivamente. Aparte de estos casos, el momento en el que introducen su modificación en el pre-rRNA el resto de las enzimas aún no está bien definido (21,22,34).

5. LA METILTRANSFERASA DE rRNA RRP8

RRP8 (también denominada NML en humanos) es una proteína de 456 aminoácidos altamente conservada en células eucariotas, especialmente en la mitad C-terminal que contiene el dominio metiltransferasa. La mitad N-terminal de la RRP8 humana difiere bastante de la de eucariotas inferiores. Esa región es considerablemente más larga en la humana, lo cual podría deberse a la adquisición de funciones o mecanismos de regulación adicionales (**Figura 13**) (96–98). El nucleótido modificado por esta enzima ha sido identificado en *S. cerevisiae* (A645), *C. elegans* (A674), *M. musculus* (A1136) y *H. sapiens* (A1322) en el rRNA 25/28S de la LSU. Esta adenina se encuentra en una hélice conservada del rRNA, la hélice 25.1, entre los dominios I y II del rRNA 25/28S, cerca del PTC (**Figura 14**) (96,97,99,100). Sin embargo, el residuo equivalente no está modificado en los ribosomas ni de células procariotas ni de mitocondrias (25,88). El momento en el que esta modificación es introducida durante la biogénesis de ribosomas es desconocido pero, teniendo en cuenta la localización de esta adenina en el rRNA, en una zona de difícil acceso para la metiltransferasa, parece que debería tener lugar en pasos tempranos del ensamblaje de la LSU. Además, parece que esta modificación está presente en todos los ribosomas. No se encuentra entre las modificaciones subestequiométricas de los rRNAs (100). En levadura se ha visto que la cantidad de esta m¹A (junto con la de la otra m¹A no conservada del 25S rRNA, la m¹A2142) no varía en condiciones de limitación de nutrientes que reducen el crecimiento celular (101).

Figura 13. Anotación de las secuencias de RRP8 en *C. elegans* (T07A9.8), *S. cerevisiae* (Rrp8) y *H. sapiens* (NML). Las bases conservadas se encuentran sombreadas en negro y los motivos conservados en la familia de metiltransferasa de tipo Rossmann se señalan sombreados en azul. Se observa cómo la región conservada comprende la mitad C-terminal donde se encuentra el dominio metiltransferasa. Figura tomada de Yokoyama W, *et al.*, 2018 (97).

T07A9.8	1	-----	1
Rrp8	1	-----	1
NML	1	MFEPEWAEAAPVAAGLGPVISRPPPAASSQNGKSKRRQLLATLRALEAASLSQHPPSLC	60
T07A9.8	1	-----MGK KR KITDEK	11
Rrp8	1	-----M	1
NML	61	ISDSEEEEEERKKKCPKKASFASASAEVGGKGGKKKQKQGPPCSDSEEEVER KK CHKQA	120
T07A9.8	12	--DAQHVP A E KREK VENWL KK STEKPTSSQSD A E KK K R P W RNKV R KL A AKKAAAD K KSE	69
Rrp8	2	ALFNVEGW S I K T K T V AFDN K TNKSS K D K K N N R K N G L TRE Q L K E E T E A E L K E Q V E D I P	61
NML	121	LVGSDSA E D E K R R K C Q -- K H A P I N S A Q H L D N V D Q T G P K A W K G S T T N ---- D P P K Q S P G S	174
T07A9.8	70	N P E E P P L I L E P K S S S D E N T K K R K R G P K K K F K P - E V A G K A --- A E T E N D D V A A A P ----	121
Rrp8	62	SEGS V A K D I P K K N Q E K S D Q N E T S K K R K H D E E A P L M Q V K E N I E K P T K K Q L T P L Q Q K M M A K L	121
NML	175	T S P K P P H T L S R K Q W R N --- R Q K N K R - R C K N K F O P P Q V P D Q A P A E A P T E K T E V S P V P R T D S	230
T07A9.8	122	-- E E A D P I - A E A K R L D A G R F R L N E K L Y T C T G S E A F D F F K E D P T A F D L Y H K G F A D Q V K K	178
Rrp8	122	T G S R F R W I N E Q L Y T I S S D E A L K L I K E Q L F D E Y H D G F R S Q V Q A W P E N P V D V F D Q I R Y R	181
NML	231	H E A R A G A L R A R M A Q R L D G A R F R Y L N E Q L Y S G P S S A A Q R L F Q E D P E A F L L Y H R G F Q S Q V K K	290
T07A9.8	179	W P N H P L R E T I R W L Q S K P D Q S V F D L G C G E A K I A E A V ----- G E K H K I R S F	223
Rrp8	182	C M K P V N A P G G L P G L K D S K E I V I A D M G C G E A Q L A L E I N N F F K N Y N K K A K K Y L K R R H K V H S F	241
NML	291	W P L Q P V D R I A R D L R Q R P A S L V V A D F G C G D C R L A S S I----- R N F V H C F	333
T07A9.8	224	D L V A V N D R V E S C D M S K L P A E D S S A D I V L Y C L S L M G T N L Y D F I R E A R R V L K I G G I L K I A E V	283
Rrp8	242	D L K K A N E R I T V A D I R N V P L P D E S C T I V V F C L A L M G T N F L D F I K E A Y R I L A P R G E L W I A E I	301
NML	334	D L A S L D P R V T V C D M A Q V P L E D S V D V A V F C L S L M G T N I R D F L E A N R V L K P G G L L K V A E V	393
T07A9.8	284	T S R F V S I K -- Q F C E A I T K M G F E Q S H R R E L T D - Y - F M M E F K K V E K-- V E Q K R P Y - G L K L K	336
Rrp8	302	K S R F S D G K G N E F V D A L K L M G F-- F H K K T F D E N K M F T R F E F F K P P A E I I E R R Q K L E R R Q K	359
NML	394	S S R F E D V R-- T F L R A V T K L G F - K I V S K D L T N S H - F F L F D F Q K T G P P L V G P K A Q L S G L Q L Q	449
T07A9.8	337	P C L Y K K R -----	343
Rrp8	360	F I E V E T E K E E L K R R K I A E G K W L L K P C I Y K R R	392
NML	450	P C L Y K R R -----	456

RRP8 es considerada como una enzima no esencial desde que se observó que su pérdida en células de levadura no afecta el crecimiento en condiciones óptimas de cultivo (96,98,100). Aunque no es esencial, las levaduras que no expresan Rrp8 o que expresan versiones catalíticamente inactivas de la proteína presentan defectos de crecimiento a baja temperatura (95,96,100). También se detecta en esas células una mayor sensibilidad a antibióticos como la paromomicina, lo cual sugiere que la ausencia de Rrp8 o de su modificación podría estar afectando a la estabilidad de los ribosomas (96,102). En líneas celulares humanas transformadas, RRP8 tampoco es esencial para la viabilidad (DepMap). Sin embargo, se sabe que es esencial para el desarrollo en el nemátodo *C. elegans* (97). También se ha analizado su

importancia a nivel de organismo en ratón. Aunque se ha descrito la generación de ratones knockout para RRP8, la tasa de nacimiento de esos ratones fue muy baja, lo cual hace pensar que la función de RRP8 puede ser esencial o muy importante para algunos tipos celulares en mamíferos (99).

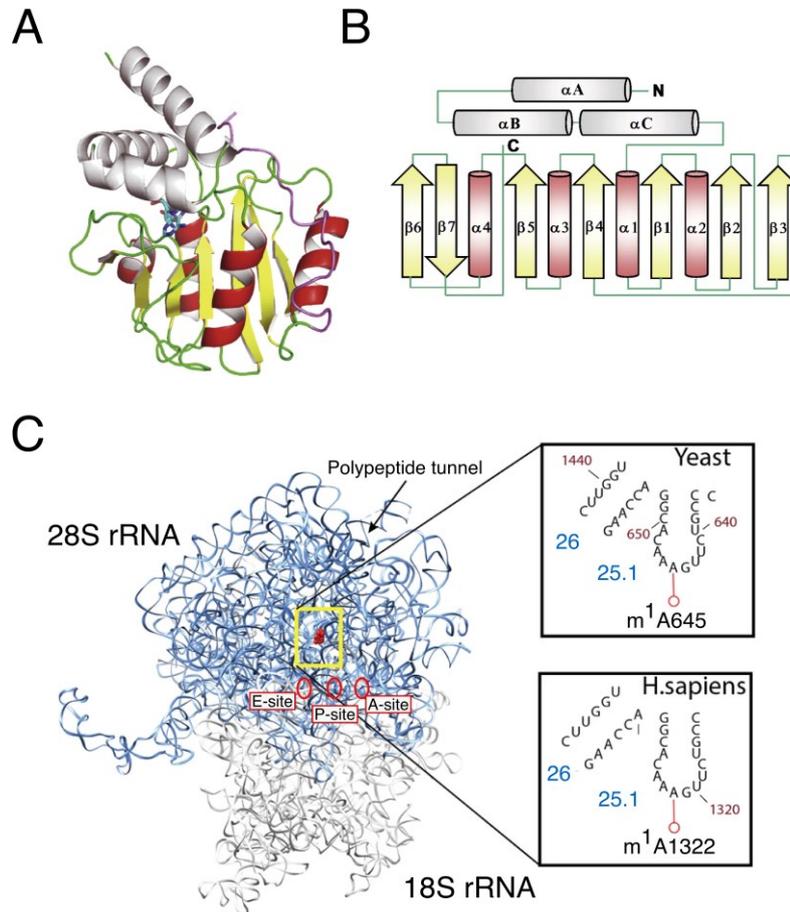


Figura 14. RRP8 es la metiltransferasa responsable de la modificación m^1A645 en el rRNA 25S (*S. cerevisiae*) y m^1A1322 en el rRNA 28S (*H. sapiens*). (A) Representación del dominio metiltransferasa de la RRP8 humana. El extremo N-terminal se muestra en gris. La molécula de S-adenosil homocisteína (SAH) (producto de la hidrólisis del SAM, junto con el grupo metilo) se muestra con la representación de “ball-stick”. (B) Diagrama topológico de los aa 242-456 de RRP8 usando el mismo sistema de colores que en (A). (C) Estructura en 3D de los rRNAs humanos 28S y 18S. El residuo m^1A1322 se encuentra señalado en rojo. En los cuadrados se muestra la conservación en la hélice 25.1 en levaduras y en humanos. Figuras tomadas de Murayama A, *et al.*, 2009 (103) y Sharma S., *et al.*, 2018 (100).

Un aspecto a reseñar en el contexto de este tesis es que la pérdida de RRP8, ni en levadura ni en *C. elegans*, produce un desbalance en la relación 25S:18S (97,98,100). Esto indica que en las células sin RRP8, ambos rRNAs son producidos en cantidades equimoleculares. Sin

embargo, hay estudios que han asignado a RRP8 un papel en la formación de la SSU y otros que han descrito que es importante para la formación de la LSU.

5.1. FUNCIÓN DE RRP8 EN LA FORMACIÓN DE LA SUBUNIDAD 40S

En la primera caracterización de Rrp8 en *S. cerevisiae* se relacionó a esta proteína con la maduración de la subunidad ribosómica pequeña. Esto fue así porque la delección de Rrp8 provoca que las levaduras acumulen la especie de pre-rRNA 21S (98). Esta especie aberrante es originada por una inhibición o retraso del corte en el sitio A₂ y, como consecuencia, se produce antes el corte en el sitio A₃ (ver esquema de procesamiento en la **Figura 4**). Al no detectarse ningún desbalance en la producción de las dos subunidades maduras, se postuló que en lugar de producirse la inhibición completa del corte en el sitio A₂, se está produciendo un retraso que no compromete la tasa de producción de subunidades 40S (98,100). El retraso en el corte del sitio A₂ es producido por la ausencia de la proteína entera y no por la pérdida de la modificación m¹A645 ya que la expresión de las versiones mutantes catalíticamente inactivas no produce la acumulación del pre-rRNA aberrante 21S (96).

Otro hecho que relaciona a Rrp8 con la subunidad 40S fue su detección entre las proteínas que interaccionan con el dominio 3' minor del rRNA 18S, junto con otros RBFs de maduración de la subunidad 40S como Dhr1 o Rrp12 (**Figura 6**) (74). En un estudio masivo de interacciones de RBFs con diferentes moléculas de RNA relacionadas con la formación de ribosomas, también se detectó que Rrp8 interacciona con los snoRNAs U14 (involucrado en la maduración de la SSU) y snR190 (relacionada con la maduración de la LSU), y con pre-rRNA correspondiente a la región donde se encuentra el sitio de corte A₂ en ITS1 (104). Esto sugiere que Rrp8 se localiza en una región de ITS1 cercana al sitio de corte en A₂.

Todos los datos anteriores son de estudios realizados en *S. cerevisiae*. En células humanas no hay datos que vinculen a RRP8 con la maduración de la subunidad 40S. Hay una observación realizada en el laboratorio de Mercedes Dosil que podría estar relacionada con un posible papel con la formación de la SSU. En un estudio de este laboratorio se detectó que RRP8 co-purifica con RRP12 (81), un RBF esencial para la maduración de la SSU. El significado e importancia de la interacción entre RRP12 y RRP8 son desconocidos (105).

5.2. FUNCIÓN DE RRP8 EN LA FORMACIÓN DE LA SUBUNIDAD 60S

La metilación de la A1322 (A645 en levaduras) del rRNA 28S/25S es la actividad mejor caracterizada de RRP8, tanto en levaduras como en células de mamífero. Esto hace pensar que esta proteína puede ser importante para la maduración o las funciones de la subunidad 60S (100,106).

En levadura se ha visto que las células que no tienen la modificación m¹A645 producen unas subunidades 60S defectuosas que no se unen eficientemente a las subunidades 40S, originando la aparición de “halfmers” en los perfiles de polisomas (96,100). Los “halfmers” son el reflejo de la acumulación de complejos de iniciación de la traducción 43S unidos a los mRNAs sin su correspondiente subunidad 60S, bien porque haya menor cantidad de LSU o porque la unión de ambas subunidades sea defectuosa. Dado que no hay un desbalance en la cantidad de SSU y LSU tras la pérdida de Rrp8, este fenotipo parece ser consecuencia de un defecto en la unión entre las subunidades (100).

Se ha descrito que la pérdida de la modificación m¹A645 en el rRNA 25S de levadura provoca cambios en la conformación de las regiones cercanas a la hélice 25.1. Esta hélice interacciona físicamente con Rpl32. En concreto, el residuo Asp39 de Rpl32 interacciona electrostáticamente con la m¹A645. La pérdida de la modificación interrumpe esa interacción electrostática, lo cual puede ocasionar cambios conformacionales que no sólo afectan a Rpl32, sino a toda la red de interacciones con otras RPLs que tiene esa proteína. Otro aspecto descrito acerca de RRP8 en levadura es que la pérdida de m¹A645 favorecen la traducción de un grupo de mRNAs relacionados con el metabolismo de carbohidratos (100).

6. CUESTIONES PENDIENTES ACERCA DE LA PROTEÍNA RRP8.

En este apartado se resume la información que fundamenta el tercer objetivo de esta tesis.

La mayor parte de estudios sobre RRP8 se han llevado a cabo en levadura, en donde se ha demostrado claramente que es la enzima que introduce m¹A645 en el rRNA 25S. Pero ni siquiera en levadura está establecida la importancia funcional de RRP8 en la formación y función del ribosoma. Esto es debido a que hay poca información y la que hay no encaja en ningún modelo claro. Por ejemplo, no está clara cuál es su participación en la formación de la SSU y si esta función está relacionada con la actividad modificadora del rRNA de la LSU. En

relación con este punto, es imprescindible dilucidar cuándo actúa y si se incorpora de forma estable a algún intermediario pre-ribosómico, tal y como hacen otras enzimas modificadoras.

Si en levadura los datos acerca de RRP8 son insuficientes, la información sobre su función en otras células eucariotas es todavía más escasa y, a veces, está acompañada de confusión porque se le han atribuido otras funciones no relacionadas con la formación de los ribosomas (103,106–108). En células humanas, el único dato sólido, confirmado por varios estudios, es que RRP8 introduce la modificación m¹A1322 en el 28S (100,106). Según la base de datos [DepMap](#), que recoge la dependencia que tienen las líneas celulares tumorales a cada proteína (mediante su silenciamiento mediado por RNAi o por eliminación de la proteína mediante CRISPR/Cas9), ninguna línea celular es dependiente de RRP8 para su viabilidad. En ratón, se ha descrito la existencia de ratones RRP8-KO, pero la eficiencia en la generación de estos animales fue muy baja, obteniéndose un alto porcentaje de embriones no viables (99). Y en *C. elegans* la pérdida completa de RRP8 es letal (provoca un arresto en estado de larva) (97). La observación de que RRP8 co-purifica con RRP12 (un RBF de la SSU) se ha tomado como punto de partida en esta tesis para analizar la función de esta proteína en células humanas e intentar resolver algunas de las cuestiones fundamentales arriba mencionadas que se desconocen acerca de ella. La segunda parte de la tesis, dedicada a la caracterización de RRP8, se ha descrito en la sección **RESULTADOS II** (pág. 85)

REFERENCIAS

1. Anger AM, Armache JP, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN, et al. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*. 2013 May 1;497(7447):80–5.
2. Khatter H, Myasnikov AG, Natchiar SK, Klaholz BP. Structure of the human 80S ribosome. *Nature*. 2015 Apr 1;520(7549):640–5.
3. Melnikov S, Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jun 1;19(6):560–7.
4. Lafontaine DLJ. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Jan 1;22(1):11–9.
5. Poitevin F, Kushner A, Li X, Dao Duc K. Structural Heterogeneities of the Ribosome: New Frontiers and Opportunities for Cryo-EM. *Molecules*. 2020;25(18).
6. Timsit Y, Sergeant-Perthuis G, Bennequin D. Evolution of ribosomal protein network architectures. *Sci Rep*. 2021 Jan 12;11(1):625.
7. Khusainov I, Vicens Q, Bochler A, Grosse F, Myasnikov A, Ménétret JF, et al. Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*. 2016 Dec 1;44(21):10491–504.
8. Desai Nirupa, Brown Alan, Amunts Alexey, Ramakrishnan V. The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science*. 2017 Feb 3;355(6324):528–31.
9. Amunts Alexey, Brown Alan, Toots Jaan, Scheres Sjors H. W., Ramakrishnan V. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):95–8.
10. Greber Basil J., Bieri Philipp, Leibundgut Marc, Leitner Alexander, Aebersold Ruedi, Boehringer Daniel, et al. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science*. 2015 Apr 17;348(6232):303–8.
11. Behrmann E, Loerke J, Budkevich TV, Yamamoto K, Schmidt A, Penczek PA, et al. Structural Snapshots of Actively Translating Human Ribosomes. *Cell*. 2015 May 7;161(4):845–57.
12. Carbone CE, Loveland AB, Gamper HB, Hou YM, Demo G, Korostelev AA. Time-resolved cryo-EM visualizes ribosomal translocation with EF-G and GTP. *Nat Commun*. 2021 Dec 13;12(1):7236.
13. Shao S, Murray J, Brown A, Taunton J, Ramakrishnan V, Hegde RS. Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes. *Cell*. 2016 Nov 17;167(5):1229-1240.e15.
14. Nürenberg-Goloub E, Tampé R. Ribosome recycling in mRNA translation, quality control, and homeostasis. *Biol Chem*. 2020;401(1):47–61.

15. Gilles A, Frechin L, Natchiar K, Biondani G, Loeffelholz OV, Holvec S, et al. Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies. *Cells*. 2020;9(3).
16. Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Ban N. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci*. 2012 May 1;37(5):189–98.
17. Pelletier J, Thomas G, Volarević S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer*. 2018 Jan 1;18(1):51–63.
18. Bustelo XR, Dosil M. Ribosome biogenesis and cancer: basic and translational challenges. *Cancer Genomics*. 2018 Feb 1;48:22–9.
19. Xue S, Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jun 1;13(6):355–69.
20. Genuth NR, Barna M. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol Cell*. 2018 Aug 2;71(3):364–74.
21. Sharma S, Lafontaine DLJ. ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification. *Trends Biochem Sci*. 2015 Oct;40(10):560–75.
22. Sloan KE, Warda AS, Sharma S, Entian KD, Lafontaine DLJ, Bohnsack MT. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol*. 2017 Sep 2;14(9):1138–52.
23. Motorin Y, Quinternet M, Rhalloussi W, Marchand V. Constitutive and variable 2'-O-methylation (Nm) in human ribosomal RNA. *RNA Biol*. 2021 Oct 15;18(sup1):88–97.
24. Sharma S, Marchand V, Motorin Y, Lafontaine DLJ. Identification of sites of 2'-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Jul 2];7(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-09734-9>
25. Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, et al. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res*. 2018 Oct 12;46(18):9289–98.
26. Bellodi C, McMahon M, Contreras A, Juliano D, Kopmar N, Nakamura T, et al. H/ACA Small RNA Dysfunctions in Disease Reveal Key Roles for Noncoding RNA Modifications in Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Cell Rep*. 2013 May 30;3(5):1493–502.
27. Incarnato D, Anselmi F, Morandi E, Neri F, Maldotti M, Rapelli S, et al. High-throughput single-base resolution mapping of RNA 2'-O-methylated residues. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 17;45(3):1433–41.

28. D'Souza MN, Gowda NKC, Tiwari V, Babu RO, Anand P, Dastidar SG, et al. FMRP Interacts with C/D Box snoRNA in the Nucleus and Regulates Ribosomal RNA Methylation. *iScience*. 2018/11/07 ed. 2018 Nov 30;9:399–411.
29. Higa-Nakamine S, Suzuki T, Uechi T, Chakraborty A, Nakajima Y, Nakamura M, et al. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan 1;40(1):391–8.
30. Metge BJ, Kammerud SC, Pruitt HC, Shevde LA, Samant RS. Hypoxia re-programs 2'-O-Me modifications on ribosomal RNA. *iScience*. 2021 Jan 22;24(1):102010.
31. Yoluç Y, van de Logt E, Kellner-Kaiser S. The Stress-Dependent Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA and rRNA Modification Profiles. *Genes*. 2021 Aug 28;12(9):1344.
32. Rong B, Zhang Q, Wan J, Xing S, Dai R, Li Y, et al. Ribosome 18S m6A Methyltransferase METTL5 Promotes Translation Initiation and Breast Cancer Cell Growth. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Dec 22 [cited 2022 Jun 13];33(12). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108544>
33. Marcel V, Kielbassa J, Marchand V, Natchiar KS, Paraqindes H, Van Long FN, et al. Ribosomal RNA 2' O-methylation as a novel layer of inter-tumour heterogeneity in breast cancer. *NAR Cancer*. 2021 Mar 1;3(1):zcab006.
34. Bohnsack KE, Bohnsack MT. Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *EMBO J*. 2019 Jul 1;38(13):e100278.
35. Nachmani D, Bothmer AH, Grisendi S, Mele A, Bothmer D, Lee JD, et al. Germline NPM1 mutations lead to altered rRNA 2'-O-methylation and cause dyskeratosis congenita. *Nat Genet*. 2019 Oct 1;51(10):1518–29.
36. Aubert M, O'Donohue MF, Lebaron S, Gleizes PE. Pre-Ribosomal RNA Processing in Human Cells: From Mechanisms to Congenital Diseases. *Biomolecules*. 2018;8(4).
37. Kressler D, Hurt E, Baßler J. Driving ribosome assembly. *Mol Chaperones Intracell Protein Transp*. 2010 Jun 1;1803(6):673–83.
38. Peña C, Hurt E, Panse VG. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Sep;24(9):689–99.
39. Baßler J, Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem*. 2019 Jun 20;88(1):281–306.
40. Turowski TW, Tollervy D. Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *WIREs RNA*. 2015 Jan 1;6(1):129–39.
41. Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015;6:225–42.

42. Kressler D, Hurt E, Baßler J. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem Sci.* 2017 Aug 1;42(8):640–54.
43. Yao RW, Xu G, Wang Y, Shan L, Luan PF, Wang Y, et al. Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense Fibrillar Components in the Human Nucleolus. *Mol Cell.* 2019 Dec 5;76(5):767-783.e11.
44. Woolford JL Jr, Baserga SJ. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2013 Nov 1;195(3):643–81.
45. Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries JL, Mullineux ST, Stamatopoulou V, Mullier R, et al. The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors. *Mol Cell.* 2013 Aug 22;51(4):539–51.
46. Badertscher L, Wild T, Montellese C, Alexander LT, Bammert L, Sarazova M, et al. Genome-wide RNAi Screening Identifies Protein Modules Required for 40S Subunit Synthesis in Human Cells. *Cell Rep.* 2015 Dec 29;13(12):2879–91.
47. Nicolas E, Parisot P, Pinto-Monteiro C, de Walque R, De Vleeschouwer C, Lafontaine DLJ. Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. *Nat Commun.* 2016 Jun 6;7(1):11390.
48. Farley-Barnes KI, McCann KL, Ogawa LM, Merkel J, Surovtseva YV, Baserga SJ. Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number. *Cell Rep.* 2018 Feb 13;22(7):1923–34.
49. Preti M, O’Donohue MF, Montel-Lehry N, Bortolin-Cavaillé ML, Choessel V, Gleizes PE. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2013 Apr 1;41(8):4709–23.
50. Cerezo E, Plisson-Chastang C, Henras AK, Lebaron S, Gleizes PE, O’Donohue MF, et al. Maturation of pre-40S particles in yeast and humans. *WIREs RNA.* 2019 Jan 1;10(1):e1516.
51. Osheim YN, French SL, Keck KM, Champion EA, Spasov K, Dragon F, et al. Pre-18S Ribosomal RNA Is Structurally Compacted into the SSU Processome Prior to Being Cleaved from Nascent Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 2004 Dec 22;16(6):943–54.
52. Klinge S, Woolford JL. Ribosome assembly coming into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Feb 1;20(2):116–31.
53. Tomecki R, Sikorski PJ, Zakrzewska-Placzek M. Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells – focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Lett.* 2017 Jul 1;591(13):1801–50.

54. TORCHET C, JACQ C, DENMAT SHL. Two mutant forms of the S1/TPR-containing protein Rrp5p affect the 18S rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 2002/05/15 ed. 1998;4(12):1636–52.
55. Lazdins IB, Delannoy M, Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma*. 1997 Jun 1;105(7):481–95.
56. Wang M, Anikin L, Pestov DG. Two orthogonal cleavages separate subunit RNAs in mouse ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res*. 2014 Sep 29;42(17):11180–91.
57. Wang M, Pestov DG. 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic Acids Res*. 2011 Mar 1;39(5):1811–22.
58. Kornprobst M, Turk M, Kellner N, Cheng J, Flemming D, Koš-Braun I, et al. Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome. *Cell*. 2016 Jul 14;166(2):380–93.
59. Sun Q, Zhu X, Qi J, An W, Lan P, Tan D, et al. Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. Hinnebusch AG, editor. *eLife*. 2017 Feb 28;6:e22086.
60. Chaker-Margot Malik, Barandun Jonas, Hunziker Mirjam, Klinge Sebastian. Architecture of the yeast small subunit processome. *Science*. 2017 Jan 13;355(6321):eaal1880.
61. Lau B, Cheng J, Flemming D, La Venuta G, Berninghausen O, Beckmann R, et al. Structure of the Maturing 90S Pre-ribosome in Association with the RNA Exosome. *Mol Cell*. 2021 Jan 21;81(2):293-303.e4.
62. Heuer A, Thomson E, Schmidt C, Berninghausen O, Becker T, Hurt E, et al. Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *eLife*. 2017 Nov 20;6:e30189.
63. Du Yifei, An Weidong, Zhu Xing, Sun Qi, Qi Jia, Ye Keqiong. Cryo-EM structure of 90S small ribosomal subunit precursors in transition states. *Science*. 2020 Sep 18;369(6510):1477–81.
64. Barandun J, Chaker-Margot M, Hunziker M, Molloy KR, Chait BT, Klinge S. The complete structure of the small-subunit processome. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Nov 1;24(11):944–53.
65. Cheng Jingdong, Lau Benjamin, La Venuta Giuseppe, Ameismeier Michael, Berninghausen Otto, Hurt Ed, et al. 90S pre-ribosome transformation into the primordial 40S subunit. *Science*. 2020 Sep 18;369(6510):1470–6.
66. Cheng J, Kellner N, Berninghausen O, Hurt E, Beckmann R. 3.2-Å-resolution structure of the 90S preribosome before A1 pre-rRNA cleavage. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Nov 1;24(11):954–64.

67. Zhou D, Zhu X, Zheng S, Tan D, Dong MQ, Ye K. Cryo-EM structure of an early precursor of large ribosomal subunit reveals a half-assembled intermediate. *Protein Cell*. 2019 Feb 1;10(2):120–30.
68. Sanghai ZA, Miller L, Molloy KR, Barandun J, Hunziker M, Chaker-Margot M, et al. Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature*. 2018 Apr 1;556(7699):126–9.
69. Kater L, Thoms M, Barrio-Garcia C, Cheng J, Ismail S, Ahmed YL, et al. Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1599-1610.e14.
70. Ismail S, Flemming D, Thoms M, Gomes-Filho JV, Randau L, Beckmann R, et al. Emergence of the primordial pre-60S from the 90S pre-ribosome. *Cell Rep*. 2022 Apr 5;39(1):110640.
71. Ameismeier M, Zemp I, van den Heuvel J, Thoms M, Berninghausen O, Kutay U, et al. Structural basis for the final steps of human 40S ribosome maturation. *Nature*. 2020 Nov 1;587(7835):683–7.
72. Singh Sameer, Vanden Broeck Arnaud, Miller Linamarie, Chaker-Margot Malik, Klinge Sebastian. Nucleolar maturation of the human small subunit processome. *Science*. 373(6560):eabj5338.
73. Liang X, Zuo MQ, Zhang Y, Li N, Ma C, Dong MQ, et al. Structural snapshots of human pre-60S ribosomal particles before and after nuclear export. *Nat Commun*. 2020 Jul 15;11(1):3542.
74. Chaker-Margot M, Hunziker M, Barandun J, Dill BD, Klinge S. Stage-specific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Nov 1;22(11):920–3.
75. Chaker-Margot M, Klinge S. Assembly and early maturation of large subunit precursors. *RNA*. 2019 Apr 1;25(4):465–71.
76. Chen W, Xie Z, Yang F, Ye K. Stepwise assembly of the earliest precursors of large ribosomal subunits in yeast. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jun 20;45(11):6837–47.
77. Choudhury P, Hackert P, Memet I, Sloan KE, Bohnsack MT. The human RNA helicase DHX37 is required for release of the U3 snoRNP from pre-ribosomal particles. *RNA Biol*. 2019 Jan 2;16(1):54–68.
78. Zhu Jieyi, Liu Xin, Anjos Margarida, Correll Carl C., Johnson Arlen W. Utp14 Recruits and Activates the RNA Helicase Dhr1 To Undock U3 snoRNA from the Preribosome. *Mol Cell Biol*. 36(6):965–78.
79. Vanden Broeck A, Klinge S. An emerging mechanism for the maturation of the Small Subunit Processome. *Curr Opin Struct Biol*. 2022 Apr 1;73:102331.

80. Ameismeier M, Cheng J, Berninghausen O, Beckmann R. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature*. 2018 Jun 1;558(7709):249–53.
81. Nieto B, Gaspar SG, Moriggi G, Pestov DG, Bustelo XR, Dosil M. Identification of distinct maturation steps involved in human 40S ribosomal subunit biosynthesis. *Nat Commun*. 2020 Jan 9;11(1):156.
82. Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, De Keersmaecker K. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res*. 2020 Feb 20;48(3):1013–28.
83. Farley-Barnes KI, Ogawa LM, Baserga SJ. Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. *Trends Genet*. 2019 Oct 1;35(10):754–67.
84. Haruehanroengra P, Zheng YY, Zhou Y, Huang Y, Sheng J. RNA modifications and cancer. *RNA Biol*. 2020 Nov 1;17(11):1560–75.
85. Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Mar 1;22(3):165–82.
86. Sirri V, Hernandez-Verdun D, Roussel P. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol*. 2002 Mar 18;156(6):969–81.
87. Natchiar SK, Myasnikov AG, Kratzat H, Hazemann I, Klaholz BP. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature*. 2017 Nov 1;551(7681):472–7.
88. Sergiev PV, Aleksashin NA, Chugunova AA, Polikanov YS, Dontsova OA. Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*. 2018 Mar 1;14(3):226–35.
89. Watkins NJ, Bohnsack MT. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *WIREs RNA*. 2012 May 1;3(3):397–414.
90. Ojha S, Malla S, Lyons SM. snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *Biomolecules*. 2020;10(5).
91. Meyer B, Wurm JP, Sharma S, Immer C, Pogoryelov D, Kötter P, et al. Ribosome biogenesis factor Tsr3 is the aminocarboxypropyl transferase responsible for 18S rRNA hypermodification in yeast and humans. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 19;44(9):4304–16.
92. Pinto R, Vågbø CB, Jakobsson ME, Kim Y, Baltissen MP, O’Donohue MF, et al. The human methyltransferase ZCCHC4 catalyses N6-methyladenosine modification of 28S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 24;48(2):830–46.
93. Dunbar DA, Baserga SJ. The U14 snoRNA is required for 2’-O-methylation of the pre-18S rRNA in *Xenopus* oocytes. *RNA N Y N*. 1998 Feb;4(2):195–204.

94. Jansen R, Tollervey D, Hurt EC. A U3 snoRNP protein with homology to splicing factor PRP4 and G beta domains is required for ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 1993 Jun 1;12(6):2549–58.
95. Bousquet-Antonelli C, Vanrobays E, Gélugne JP, Caizergues-Ferrer M, Henry Y. Rrp8p is a yeast nucleolar protein functionally linked to Gar1p and involved in pre-rRNA cleavage at site A2. *RNA.* 2000 Jun;6(6):826–43.
96. Peifer C, Sharma S, Watzinger P, Lamberth S, Kötter P, Entian KD. Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(2):1151–63.
97. Yokoyama W, Hirota K, Wan H, Sumi N, Miyata M, Araoi S, et al. rRNA adenine methylation requires T07A9.8 gene as rram-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem (Tokyo).* 2018 Jun 1;163(6):465–74.
98. Bousquet-Antonelli C, Vanrobays E, Gélugne JP, Caizergues-Ferrer M, Henry Y. Rrp8p is a yeast nucleolar protein functionally linked to Gar1p and involved in pre-rRNA cleavage at site A2. *RNA N Y N.* 2000 Jun;6(6):826–43.
99. Oie S, Matsuzaki K, Yokoyama W, Tokunaga S, Waku T, Han SI, et al. Hepatic rRNA Transcription Regulates High-Fat-Diet-Induced Obesity. *Cell Rep.* 2014 May;7(3):807–20.
100. Sharma S, Hartmann JD, Watzinger P, Klepper A, Peifer C, Kötter P, et al. A single N1-methyladenosine on the large ribosomal subunit rRNA impacts locally its structure and the translation of key metabolic enzymes. *Sci Rep.* 2018 Aug 9;8(1):11904.
101. Sharma S, Watzinger P, Kötter P, Entian KD. Identification of a novel methyltransferase, Bmt2, responsible for the N-1-methyl-adenosine base modification of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2013 May 1;41(10):5428–43.
102. Schilling V, Peifer C, Buchhaupt M, Lamberth S, Lioutikov A, Rietschel B, et al. Genetic interactions of yeast NEP1 (EMG1), encoding an essential factor in ribosome biogenesis. *Yeast.* 29(5):167–83.
103. Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, et al. Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status. *Cell.* 2008 May 16;133(4):627–39.
104. Krogan NJ, Peng WT, Cagney G, Robinson MD, Haw R, Zhong G, et al. High-Definition Macromolecular Composition of Yeast RNA-Processing Complexes. *Mol Cell.* 2004 Jan 30;13(2):225–39.
105. Baßler J, Ahmed YL, Kallas M, Kornprobst M, Calviño FR, Gnädig M, et al. Interaction network of the ribosome assembly machinery from a eukaryotic thermophile. *Protein Sci.* 2017 Feb 1;26(2):327–42.

106. Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, et al. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *J Cell Sci.* 2016 Jun 15;129(12):2382–93.
107. Yang L, Song T, Chen L, Kabra N, Zheng H, Koomen J, et al. Regulation of SirT1-Nucleomethylin Binding by rRNA Coordinates Ribosome Biogenesis with Nutrient Availability. *Mol Cell Biol.* 2013 Oct;33(19):3835–48.
108. Yang L, Song T, Chen L, Soliman H, Chen J. Nucleolar repression facilitates initiation and maintenance of senescence. *Cell Cycle.* 2015 Oct 27;14(22):3613–23.
109. Nieto B, Gaspar SG, Sapio RT, Clavaín L, Bustelo XR, Pestov DG, et al. Efficient fractionation and analysis of ribosome assembly intermediates in human cells. *RNA Biol.* 2021 Oct 15;18(sup1):182–97.
110. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *WIREs RNA.* 2010 Nov 1;1(3):415–31.
111. Pérez-Fernández J, Martín-Marcos P, Dosil M. Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 2011 Oct 1;39(18):8105–21.
112. Pérez-Fernández Jorge, Román Ángel, De Las Rivas Javier, Bustelo Xosé R., Dosil Mercedes. The 90S Preribosome Is a Multimodular Structure That Is Assembled through a Hierarchical Mechanism. *Mol Cell Biol.* 2007 Aug 1;27(15):5414–29.
113. Barandun J, Hunziker M, Klinge S. Assembly and structure of the SSU processome—a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit. *Theory Simul • Macromol Assem.* 2018 Apr 1;49:85–93.
114. Wild T, Horvath P, Wyler E, Widmann B, Badertscher L, Zemp I, et al. A Protein Inventory of Human Ribosome Biogenesis Reveals an Essential Function of Exportin 5 in 60S Subunit Export. *PLOS Biol.* 2010 Oct 26;8(10):e1000522.
115. Badertscher L, Wild T, Montellese C, Alexander LT, Bammert L, Sarazova M, et al. Genome-wide RNAi Screening Identifies Protein Modules Required for 40S Subunit Synthesis in Human Cells. *Cell Rep.* 2015 Dec 29;13(12):2879–91.
116. Braun CM, Hackert P, Schmid CE, Bohnsack MT, Bohnsack KE, Perez-Fernandez J. Pol5 is required for recycling of small subunit biogenesis factors and for formation of the peptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 10;48(1):405–20.
117. Ramos-Saenz A, Gonzalez-Alvarez D, Rodriguez-Galan O, Rodriguez-Gil A, Gaspar SG, Villalobo E, et al. Pol5 is an essential ribosome biogenesis factor required for 60S ribosomal subunit maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA [Internet].* 2019 Aug 14; Available from: <http://rnajournal.cshlp.org/content/early/2019/08/14/rna.072116.119.abstract>

118. Moriggi G, Nieto B, Dosil M. Rrp12 and the Exportin Crm1 Participate in Late Assembly Events in the Nucleolus during 40S Ribosomal Subunit Biogenesis. *PLoS Genet.* 2014 Dec 4;10(12):e1004836.
119. Hochstatter J, Hölzel M, Rohrmoser M, Schermelleh L, Leonhardt H, Keough R, et al. Myb-binding Protein 1a (Mybbp1a) Regulates Levels and Processing of Pre-ribosomal RNA *. *J Biol Chem.* 2012 Jul 1;287(29):24365–77.
120. Sloan KE, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJM, Watkins NJ. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol.* 2013 Feb 25;200(5):577–88.
121. Sun C, Woolford Jr JL. The yeast NOP4 gene product is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunits. *EMBO J.* 1994 Jul 1;13(13):3127–35.
122. McCann KL, Teramoto T, Zhang J, Tanaka Hall TM, Baserga SJ. The molecular basis for ANE syndrome revealed by the large ribosomal subunit processome interactome. Nilsen TW, editor. *eLife.* 2016 Apr 14;5:e16381.
123. Bryant Carson J., Lorea Cláudia F., de Almeida Hiram Larangeira, Weinert Letícia, Vedolin Leonardo, Pinto e Vairo Filippo, et al. Biallelic splicing variants in the nucleolar 60S assembly factor RBM28 cause the ribosomopathy ANE syndrome. *Proc Natl Acad Sci.* 2021 May 11;118(19):e2017777118.
124. Wu S, Tutuncuoglu B, Yan K, Brown H, Zhang Y, Tan D, et al. Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature.* 2016 Jun 1;534(7605):133–7.
125. Bryant CJ, McCool MA, Abriola L, Surovtseva YV, Baserga SJ. A high-throughput assay for directly monitoring nucleolar rRNA biogenesis. *Open Biol.* 12(1):210305.
126. Jao Cindy Y., Salic Adrian. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc Natl Acad Sci.* 2008 Oct 14;105(41):15779–84.
127. Szaflarski W, Leśniczak-Staszak M, Sowiński M, Ojha S, Aulas A, Dave D, et al. Early rRNA processing is a stress-dependent regulatory event whose inhibition maintains nucleolar integrity. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 25;50(2):1033–51.
128. Zhu Chengming, Yan Qi, Weng Chenchun, Hou Xinhao, Mao Hui, Liu Dun, et al. Erroneous ribosomal RNAs promote the generation of antisense ribosomal siRNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2018 Oct 2;115(40):10082–7.
129. Meyer B, Wurm JP, Kötter P, Leisegang MS, Schilling V, Buchhaupt M, et al. The Bowen–Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Ψ1191 in yeast 18S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011 Mar 1;39(4):1526–37.

130. Zorbas C, Nicolas E, Wacheul L, Huvelle E, Heurgué-Hamard V, Lafontaine DLJ. The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 2015 Jun 1;26(11):2080–95.
131. Cong L, Zhang F. Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System. In: Pruetz-Miller SM, editor. *Chromosomal Mutagenesis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 197–217. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10
132. Current protocols in molecular biology, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, \$165.00. *Mol Reprod Dev*. 1989 Jan 1;1(2):146–146.
133. Dosil M, Bustelo XR. Functional Characterization of Pwp2, a WD Family Protein Essential for the Assembly of the 90 S Pre-ribosomal Particle * ♦. *J Biol Chem*. 2004 Sep 3;279(36):37385–97.
134. Dokshin GA, Ghanta KS, Piscopo KM, Mello CC. Robust genome editing with short single-stranded and long, partially single-stranded DNA donors in *C. elegans*. *bioRxiv*. 2018 Jan 1;352260.
135. Liu H, Begik O, Lucas MC, Ramirez JM, Mason CE, Wiener D, et al. Accurate detection of m6A RNA modifications in native RNA sequences. *Nat Commun*. 2019 Sep 9;10(1):4079.

FINANCIACIÓN

La investigación realizada en esta tesis ha sido posible gracias a:

- I. Un contrato predoctoral FPU del Ministerio de España de Educación, Cultura y Deporte (FPU2015/01583).

- II. Tres Ayudas a Proyectos I+D del Ministerio de España de Educación, Cultura y Deporte (BFU217-88192-P), Ministerio de España de Ciencia e Innovación (PID2020-118378GB-I00) y Fundación Samuel Solórzano (FS/36-2017).

PUBLICACIONES

El trabajo realizado en la segunda parte de esta tesis será pronto sometido para su publicación.

El trabajo realizado en la primera parte de esta tesis constituye una parte principal de una publicación en la que la doctoranda es primera co-autora:

1. Blanca Nieto, **Sonia G. Gaspar**, Russell T. Sapio, Laura Clavaín, Xosé R. Bustelo, Dimitri G. Pestov & Mercedes Dosil (2021) Efficient fractionation and analysis of ribosome assembly intermediates in human cells, *RNA Biology*, 18:sup1, 182-197, DOI: 10.1080/15476286.2021.1965754
-

La autora también ha participado durante su etapa de formación predoctoral en tres trabajos publicados en los siguientes artículos:

- Blanca Nieto, **Sonia G. Gaspar**, Giulia Moriggi, Dimitri G. Pestov, Xosé R. Bustelo & Mercedes Dosil (2020). Identification of distinct maturation steps involved in human 40S ribosomal subunit biosynthesis. *Nature communications*, 11(1), 156. DOI: 10.1038/s41467-019-13990-w
- Ana Ramos-Sáenz, Daniel González-Álvarez, Olga Rodríguez-Galán, Alfonso Rodríguez-Gil, **Sonia G. Gaspar**, Eduardo Villalobo, Mercedes Dosil, & Jesús de la Cruz, (2019). Pol5 is an essential ribosome biogenesis factor required for 60S ribosomal subunit maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* (New York, N.Y.), 25(11), 1561–1575. DOI: 10.1261/rna.072116.119
- Giulia Moriggi, **Sonia G. Gaspar**, Blanca Nieto, Xosé R. Bustelo, & Mercedes Dosil (2017). Focal accumulation of preribosomes outside the nucleolus during metaphase-anaphase in budding yeast. *RNA* (New York, N.Y.), 23(9), 1432–1443. DOI: 10.1261/rna.061259.117