

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Biología estructural de las ATPasas humanas RuvBL1 y RUVBL2 y su papel en remodelación de cromatina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Andrés López Perrote**

Director

Óscar Llorca Blanco

**Madrid, 2014**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Biología estructural de las ATPasas humanas RuvBL1 y RuvBL2 y su papel en remodelación de cromatina**

TESIS DOCTORAL

Andrés López Perrote

Madrid, 2013









UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Biología estructural de las ATPasas humanas RuvBL1 y RuvBL2 y su papel en remodelación de cromatina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Andrés López Perrote

Esta Tesis ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) bajo la dirección del Prof. Óscar Llorca Blanco

Madrid, 2013





*Para Yoli, Luis y Sergio*



## **Agradecimientos**

Hace más de cuatro años que comencé esta tesis, concretamente el 13 de Abril de 2009. El tiempo pasa volando, y aunque entonces parecía muy lejano el momento de defenderla, aquí estoy escribiendo finalmente los agradecimientos. Es momento de hacer balance, y aunque, como todo en la vida, tiene momentos mejores y peores, esta etapa ha sido sin duda una de las más importantes para mi no sólo a nivel profesional, sino también en lo personal.

El primero de los agradecimientos es para Óscar, por confiar en mi desde el primer momento, por tu dedicación constante, tu apoyo y optimismo. Gracias por sacar tiempo siempre para cada uno de nosotros, que no es fácil, y sobre todo por hacer que me apasione mi trabajo.

No puedo dejar de agradecer al programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio por la financiación recibida durante estos cuatro años, sin la cual nada de esto habría sido posible. Tengo que dar las gracias a David Gil, Silvia Ayora, Jessica A. Downs, Amani Ismail y Hanan E. Alatwi por la excelente colaboración que hemos tenido en algunos de los experimentos presentados en esta tesis.

No me olvido de los compañeros con los que empecé: gracias a Ernesto, Ángel, Isra, Magi, Rafa y Carmen por hacer que el comienzo de mi tesis fuera el mejor que podía haber tenido. Bego, a ti te debo mucho de lo que he aprendido en estos años, pero lo que de verdad quiero agradecerte es tu amistad, tu comprensión, tus consejos, y simplemente todo el cariño que siempre me demuestras; gracias por seguir ahí. Eva, gracias por ayudarme siempre que lo necesito y por tus consejos. César (el siguiente deberías ser tú, así que ¡ánimo!) y Martín, gracias por tantos buenos momentos. Raquel, en este tiempo te has convertido en una gran amiga, mi mayor apoyo, y una compañera excepcional; gracias por estar siempre ahí. Gracias también a Roberto, Hugo M., Hugo Y., Fernando y Jaska, y a todas las personas que se han cruzado en mi camino profesional y me han ayudado. A toda la gente del CIB con la que he compartido algún momento, especialmente a Luque, María y

Sheila. También al grupo de Antonio Romero, Santiago Rodríguez de Córdoba, Germán Rivas y Carlos Fernández Tornero, por estar siempre dispuestos a echar una mano en lo que sea.

Tengo que agradecerle a mis amigas María, Inma, Nata, Mónica, Esther y Mari, todos los buenos momentos durante los primeros años de carrera en Toledo y los que seguimos disfrutando. Cris, el día a día hace que nos veamos mucho menos de lo que quisiéramos, pero lo bueno es que no importa el tiempo que pase, entre nosotros todo sigue igual. Gracias por ser como eres. A Natalia, por tu sonrisa constante y tu cariño, y a Carla y Guillermo por llenar cada momento a su lado de alegría. Y al resto de gente de la que me puedo olvidar pero que han sido y son importantes para mi.

El agradecimiento más especial es para mi familia. A mis padres, Yoli y Luis, porque os lo debo todo, por vuestros esfuerzos para que esto sea posible, por confiar en mi y porque siempre me habéis apoyado en todo de manera incondicional. Os quiero. Gracias a mi abuela Rosa, a mi tía Rosa, y a mi prima Débora, porque siempre habéis estado ahí y parte de lo que soy os lo debo.

Sergio, eres lo más importante en mi vida. Gracias por cada minuto de estos años junto a ti, por entenderme, escucharme, hacerme mejor persona, por el día a día. Gracias por ser como eres, y en definitiva, por hacerme feliz.

# Índice de contenidos

<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
1. Introduction .....	3
2. Aim of this thesis .....	4
3. Results and conclusions .....	5
3.1. Structural and biochemical characterization of the human RuvBL1-RuvBL2 complex.....	5
3.2. Role of YY1 and INO80 in homologous recombination.....	8
4. References .....	9
<b>Capítulo 1: Introducción</b> .....	<b>13</b>
1.1. Organización y dinámica del material genético.....	13
Remodelación de la cromatina mediante modificación de histonas.....	15
Remodelación de la cromatina dependiente de ATP.....	15
1.2. El complejo remodelador de cromatina INO80.....	19
1.3. Las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2.....	23
Funciones Biológicas de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 .....	26
Estructura de RuvBL1 y RuvBL2.....	31
1.4. Yin Yang 1.....	36
Regulación transcripcional mediada por YY1.....	36
Papel de YY1 en el mantenimiento de la estabilidad genómica.....	38
Estructura de la proteína YY1 .....	39
1.5. Microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de macromoléculas .....	41
<b>Capítulo 2: Objetivos</b> .....	<b>47</b>
<b>Capítulo 3: Materiales y métodos</b> .....	<b>51</b>
3.1. Herramientas bioinformáticas .....	51
Búsqueda de similitud, alineamiento de secuencias y determinación de parámetros proteicos .....	51

Predicción de elementos de estructura secundaria y terciaria de proteínas .....	51
<b>3.2. Análisis bioquímico de proteínas .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....</b>	<b>53</b>
Expresión y purificación de las proteínas RuvBL1, RuvBL2 y sus dominios DII aislados .....	55
Expresión y purificación de YY1 .....	60
<b>3.4. Cromatografía de exclusión molecular .....</b>	<b>63</b>
<b>3.5. Experimentos de interacción del complejo RuvBL1-RuvBL2 con nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos.....</b>	<b>63</b>
<b>3.6. Ensayos de interacción entre YY1 y RuvBL1-RuvBL2.....</b>	<b>65</b>
<b>3.7. Ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído .....</b>	<b>66</b>
<b>3.8. Ensayos celulares.....</b>	<b>67</b>
Plásmidos utilizados en ensayos celulares .....	67
Cultivos celulares e irradiación de células .....	67
Experimentos de silenciamiento con siRNA e inmunofluorescencia .....	68
<b>3.9. Experimentos de interacción proteína-DNA.....</b>	<b>70</b>
Sustratos de DNA para ensayos de retardo en la movilidad electroforética .....	70
Ensayos de retardo en la movilidad electroforética .....	71
<b>3.10. Microscopía electrónica de transmisión de proteínas .....</b>	<b>73</b>
GraFix .....	73
Preparación de muestras mediante tinción negativa .....	74
Preparación de muestras vitrificadas .....	75
Visualización de muestras de proteína mediante microscopía electrónica y adquisición de imágenes .....	75
<b>3.11. Procesamiento digital de imágenes.....</b>	<b>75</b>
Alineamiento y clasificación bidimensional de partículas individuales .....	76
Análisis de la simetría rotacional .....	76
<b>3.12. Reconstrucción tridimensional .....</b>	<b>77</b>
Generación de volúmenes iniciales .....	77

Refinamiento angular .....	77
Estimación de la resolución y visualización de volúmenes de microscopía electrónica	78
3.13. Modelado pseudoatómico.....	78
<b>Capítulo 4: Resultados .....</b>	<b>81</b>
<b>Parte I: Caracterización bioquímica y estructural del complejo RuvBL1-RuvBL2.....</b>	<b>81</b>
4.1. Expresión y purificación de las proteínas humanas RuvBL1 y RuvBL2 recombinantes .....	81
4.2. Purificación del complejo RuvBL1-RuvBL2.....	82
4.3. Expresión y purificación de los dominios DII de RuvBL1 y RuvBL2 .....	90
4.4. Análisis del efecto de la cola de histidinas en el estado oligomérico del complejo RuvBL1-RuvBL2.....	92
4.5. Microscopía electrónica de transmisión y procesamiento digital de imágenes del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	95
La estructura tridimensional del complejo RuvBL1-RuvBL2 muestra la coexistencia de dos conformaciones.....	98
4.6. Efecto de la interacción con nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos en la conformación del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	100
4.7. Criomicroscopía electrónica y modelado pseudoatómico del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	102
<b>Parte II: Caracterización bioquímica y estructural de la proteína Yin Yang 1 (YY1).....</b>	<b>108</b>
4.8. YY1 actúa en recombinación homóloga mediante la promoción de filamentos de RAD51 .....	108
La depleción de INO80 y RuvBL2 reproduce los defectos en recombinación homóloga provocados por la depleción de YY1 .....	110
YY1, RuvBL2 e INO80 actúan en la misma vía para promover la formación de focos de RAD51 .....	111
La actividad ATPasa de RuvBL2 es necesaria para la formación de focos de RAD51 .....	114

4.9. Caracterización bioquímica de YY1: expresión, purificación y determinación de la capacidad de interacción con ácidos nucleicos de la proteína YY1 recombinante.....	115
4.10. Caracterización del estado de oligomerización de YY1 .....	119
La proteína YY1 ensambla un núcleo dimérico con forma acampanada.....	122
YY1 multimeriza mediante la asociación de dímeros .....	126
Las formas oligoméricas de YY1 interaccionan con estructuras cruciformes de DNA de manera independiente de secuencia .....	131
4.11. Los oligómeros de YY1 interaccionan con el complejo RuvBL1-RuvBL2 <i>in vitro</i> .....	132
YY1 coopera con RuvBL1 y RuvBL2 en la interacción con intermediarios de recombinación .....	136
<b>Capítulo 5: Discusión.....</b>	<b>141</b>
5.1. Arquitectura del complejo humano RuvBL1-RuvBL2 .....	142
El complejo RuvBL1-RuvBL2 humano forma anillos hexaméricos sencillos y dobles .....	142
El complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 coexiste en dos conformaciones.....	147
Los cambios conformacionales del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 podrían explicar las discrepancias descritas sobre la estructura del complejo.....	150
La plasticidad conformacional de los dominios DII dirige la reorganización de la arquitectura del doble anillo RuvBL1-RuvBL2 .....	151
La transición conformacional de RuvBL1-RuvBL2 podría tener un impacto funcional en el mecanismo molecular de actuación de las proteínas.....	153
¿Dos conformaciones distintas o dos complejos diferentes?.....	155
5.2. Caracterización bioquímica y estructural del factor de transcripción YY1 .....	157
La proteína YY1 humana forma diferentes especies oligoméricas <i>in vitro</i> .....	158
Los oligómeros de YY1 interaccionan con intermediarios de procesos de recombinación homóloga en cooperación con las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2 .....	161
YY1 participa en recombinación homóloga mediante su contribución en la formación de filamentos de RAD51 .....	162

Capítulo 6: Conclusiones.....	167
Bibliografía .....	171
Publicaciones .....	187



# Índice de figuras

<b>Figura 1.1:</b> Organización del material genético .....	14
<b>Figura 1.2:</b> Representación esquemática de la secuencia primaria de la subunidad catalítica de las distintas familias de remodeladores de cromatina .....	18
<b>Figura 1.3:</b> Modelo de organización de las subunidades del complejo remodelador de cromatina INO80 y del reconocimiento del nucleosoma .....	20
<b>Figura 1.4:</b> Modelo de interacción entre RuvA, RuvB y la estructura de DNA <i>Holliday junction</i> .....	24
<b>Figura 1.5:</b> Diagrama esquemático de las funciones celulares ejercidas por las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 .....	30
<b>Figura 1.6:</b> Secuencia primaria y estructura terciaria de las proteínas humanas RuvBL1 y RuvBL2 .....	32
<b>Figura 1.7:</b> Estructuras atómicas de RuvBL1 y RuvBL2 .....	33
<b>Figura 1.8:</b> Estructuras mediante microscopía electrónica del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 de humano y levadura .....	35
<b>Figura 1.9:</b> Organización estructural de la proteína YY1 .....	40
<b>Figura 1.10:</b> Esquema del procesamiento digital de imágenes de microscopía electrónica.....	43
<b>Figura 3.1:</b> Representación esquemática del proceso de hidrólisis de ATP.....	65
<b>Figura 3.2:</b> Representación simplificada de la reacción de entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído .....	66
<b>Figura 3.3:</b> Esquema simplificado del método <i>GraFix</i> para la estabilización de proteínas y complejos macromoleculares .....	74
<b>Figura 4.1:</b> Expresión y purificación de la proteína humana RuvBL1 .....	83
<b>Figura 4.2:</b> Expresión y purificación de la proteína humana RuvBL2 .....	84
<b>Figura 4.3:</b> Ensamblaje del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 <i>in vitro</i> .....	85

Figura 4.4: Formación <i>in vivo</i> del complejo His-RuvBL1-RuvBL2.....	87
Figura 4.5: Purificación de la proteína Strep-II-RuvBL1 y coexpresión de Strep-II-RuvBL1 y RuvBL2 .....	89
Figura 4.6: Expresión y purificación de los dominios DII de RuvBL1 y RuvBL2 .....	91
Figura 4.7: Efecto de las colas de histidinas sobre el estado de oligomerización del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	94
Figura 4.8: Dos conformaciones del complejo RuvBL1-RuvBL2 obtenidas mediante microscopía electrónica .....	97
Figura 4.9: Ajuste de estructuras atómicas en los mapas de densidad electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2 obtenidos mediante tinción negativa .....	99
Figura 4.10: Influencia de nucleótidos en la relación entre las conformaciones compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	101
Figura 4.11: Análisis bidimensional mediante criomicroscopía electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	103
Figura 4.12: Estructuras de criomicroscopía electrónica del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 .....	104
Figura 4.13: Regiones del dominio DII de RuvBL1.....	104
Figura 4.14: Modelado pseudoatómico de la transición conformacional del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	105
Figura 4.15: YY1 y RuvBL2 actúan durante la fase G2 del ciclo celular para promover la formación de filamentos de RAD51, pero no de $\gamma$ H2AX o RPA, en respuesta a daño en el DNA .....	109
Figura 4.16: Influencia de RuvBL2 e Ino80 en la formación de filamentos de RAD51 mediada por YY1 .....	113
Figura 4.17: Purificación y caracterización bioquímica de la proteína humana YY1 ...	117
Figura 4.18: Pruebas de expresión y purificación de His-GST-YY1 .....	118
Figura 4.19: Caracterización del estado de oligomerización de la proteína YY1 .....	120
Figura 4.20: Microscopía electrónica del complejo A de YY1 .....	123
Figura 4.21: Estructura del complejo A de YY1 .....	125

<b>Figura 4.22:</b> Ajuste de modelos atómicos de YY1 en el mapa del complejo A .....	126
<b>Figura 4.23:</b> Optimización de las condiciones de purificación del complejo B de YY1.....	128
<b>Figura 4.24:</b> Análisis bidimensional mediante microscopía electrónica del complejo B formado por Strep-II-YY1 .....	129
<b>Figura 4.25:</b> YY1 multimeriza mediante la asociación de dímeros .....	130
<b>Figura 4.26:</b> El complejo B de YY1 interacciona con estructuras de DNA <i>Holliday junction</i> de manera independiente de secuencia .....	133
<b>Figura 4.27:</b> Los oligómeros de YY1 interaccionan <i>in vitro</i> con el complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	135
<b>Figura 4.28:</b> YY1 y RuvBL1-RuvBL2 cooperan en la interacción con intermediarios de recombinación homóloga .....	137
<b>Figura 5.1:</b> Localización de los extremos amino y carboxilo terminales en el dodecámero RuvBL1-RuvBL2 .....	143
<b>Figura 5.2:</b> Arquitectura de los remodeladores de cromatina SWR1 e INO80 .....	147
<b>Figura 5.3:</b> Comparación de las estructuras de microscopía electrónica del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 humano .....	149
<b>Figura 5.4:</b> Comparación entre las conformaciones compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2 humano y de levadura resueltos mediante microscopía .....	151
<b>Figura 5.5:</b> La región de interacción con ácidos nucleicos en el dominio DII de RuvBL1.....	154
<b>Figura 5.6:</b> Representación esquemática del proceso de oligomerización de RuvBL1 y RuvBL2 .....	156
<b>Figura 5.7:</b> Modelo hipotético de oligomerización del factor de transcripción YY1.....	160
<b>Figura 5.8:</b> Esquema del proceso de recombinación homóloga y etapas en las que YY1-RuvBL1/2-INO80 podrían participar .....	164



# Índice de tablas

<b>Tabla 1.1:</b> Subunidades del complejo remodelador de cromatina INO80 en distintos organismos .....	22
<b>Tabla 3.1:</b> Anticuerpos empleados en la detección de proteínas recombinantes mediante ensayos de <i>western blot</i> .....	53
<b>Tabla 3.2:</b> Disoluciones y concentraciones de los antibióticos empleados en el cultivo y selección de bacterias <i>E. coli</i> .....	54
<b>Tabla 3.3:</b> : Oligonucleótidos para la clonación de los cDNAs de las proteínas RuvBL1, RuvBL2 y sus dominios DII aislados .....	57
<b>Tabla 3.4:</b> Condiciones optimizadas de expresión de las proteínas recombinantes RuvBL1, RuvBL2, DII-RuvBL1 y DII-RuvBL2 en <i>E. coli</i> .....	58
<b>Tabla 3.5:</b> Oligonucleótidos para la clonación del cDNA de la proteína YY1 .....	61
<b>Tabla 3.6:</b> Condiciones optimizadas de expresión de las proteínas recombinantes His-YY1, Strep-II-YY1 y His-GST-YY1 en <i>E. coli</i> .....	62
<b>Tabla 3.7:</b> Condiciones experimentales de la cromatografía de exclusión molecular de las distintas proteínas de estudio .....	64
<b>Tabla 3.8:</b> Secuencias de los siRNA utilizados en los experimentos de silenciamiento génico .....	69
<b>Tabla 3.9:</b> Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia (IF) y <i>western blot</i> (WB) en cultivos celulares .....	69
<b>Tabla 3.10:</b> Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de interacción proteína-DNA .	72
<b>Tabla 4.1:</b> Influencia de nucleótidos en la relación entre la conformación compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2 .....	100
<b>Tabla 5.1:</b> Construcciones y sistemas de expresión para la producción de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 recombinantes .....	144



# Abreviaturas y símbolos

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
<sup>32</sup> P	Fósforo isótopo 32
A	Alanina
Å	Angstrom
A549	Células epiteliales 549 de adenocarcinoma humano del alveolo basal ( <i>Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells 549</i> )
AAA+	ATPasa asociada con diversas actividades celulares ( <i>ATPase Associated with diverse cellular Activities</i> )
AAV	Virus Adenoasociado ( <i>Adenoassociated virus</i> )
Ac	Anticuerpo
ADP	Adenosín difosfato
AlF	Fluoruro de aluminio
Anc1	<i>Adenine nucleotide carrier 1</i>
Arg	Arginina
ARP	Proteína relacionada con la actina ( <i>Actin related protein</i> )
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosín Trifosfato
ATPasa	Adenosín Trifosfatasa
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
Baf53	<i>BRG1-associated factor 53</i>
BeF	Fluoruro de berilio
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i>
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovin Serum Albumin</i> )

CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
cDNA	ADN complementario ( <i>complementary DNA</i> )
CHD	<i>Chromodomain/Helicase/DNA binding</i>
COX-2	<i>Ciclooxigenase isoform 2</i>
CREB	<i>Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding Protein</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
CTF	Función de transferencia de contraste ( <i>Contrast transfer function</i> )
D.O.	Densidad Óptica
DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico (ADN) ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DNMT	Metiltransferasa de DNA ( <i>DNA Methyl Transferase</i> )
dsDNA	ADN de doble cadena ( <i>double stranded DNA</i> )
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP54	<i>Erythrocyte cytosolic protein 54</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> )
Ezh1	<i>methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 1</i>
Ezh2	<i>methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2</i>
FCS	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
FHA	<i>Forkhead-associated domain</i>
FSC	<i>Fourier Shell Correlation</i>
G	Glicina
GA	Glutaraldehído
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
h	hora
HAT	Histona Acetiltransferasa
HCl	Ácido clorhídrico

HDAC	Deacetilasa de histonas ( <i>Histone Deacetylases</i> )
HDAC	Histona deacetilasa ( <i>Histone Deacetylase</i> )
HeLa	Células <i>Henrietta Lacks</i>
hINO80	<i>human INO80</i>
Hint1	<i>Histidine triad nucleotide bind protein 1</i>
HIT	<i>Histidine triad motif</i>
HMGB	<i>High Mobility Group Protein</i>
HR	Recombinación homóloga ( <i>Homologous Recombination</i> )
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRV 3C	Proteasa de rinovirus humano 3C ( <i>Human Rhinovirus 3C</i> )
HSA	<i>Helicase/SANT</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
Iec1	<i>INO eighty complex subunit 1</i>
Ies	<i>Ino eighty subunit</i>
IF	Inmunofluorescencia
INO80	<i>Inositol requiring 80</i>
INO80.com	Complejo INO80 ( <i>INO80 complex</i> )
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
ISWI	<i>Imitation Switch</i>
KAI1	<i>Kangai 1</i>
KAP1	<i>KRAB-interacting protein 1</i>
kDa	kilodalton
LB	Luria Bertani
M	molar
MDa	megadalton
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón ( <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> )
MEM	Medio mínimo esencial <i>Eagle</i> ( <i>Minimum Essential Medium Eagle</i> )
mg	miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio

<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>ML2D</b>	Clasificación bidimensional por máxima semejanza ( <i>Maximum likelihood two-dimensional classification</i> )
<b>ML3D</b>	Clasificación tridimensional por máxima semejanza ( <i>Maximum likelihood three-dimensional classification</i> )
<b>mM</b>	milimolar
<b>mRNA</b>	ARN mensajero ( <i>messenger RNA</i> )
<b>MRN</b>	<i>Mre11-Rad50-Nbs1</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato disódico
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monosódico
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NER</b>	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
<b>NF-E1</b>	<i>Nuclear Factor E1</i>
<b>Nhp10</b>	<i>Non-histone Protein 10</i>
<b>NMD</b>	<i>Nonsense-Mediated mRNA Decay</i>
<b>NuA4</b>	<i>Nucleosome acetyltransferase of H4</i>
<b>OB-fold</b>	Plegamiento de interacción con oligonucleótidos/ oligosacáridos ( <i>Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding fold</i> )
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>PALB2</b>	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PCAF</b>	<i>p300/CBP-Associated Factor</i>
<b>PcG</b>	Grupo <i>Polycomb</i> ( <i>Polycomb Group</i> )

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PHO	<i>Pleiohomeotic</i>
PHOL	<i>Pleiohomeotic -like</i>
pI	Punto isoeléctrico
Pih1	<i>Protein interacting with Hsp90</i>
PIH1D1	<i>PIH1 domain-containing protein 1</i>
PIKK	Proteína quinasa relacionada con la fosfatidilinositol-3-quinasa ( <i>Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase</i> )
pmol	Picomol
PONDR	<i>Prediction of Naturally Disordered Regions</i>
PRMT4	<i>Protein arginine methyltransferase 4</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilideno ( <i>Polyvinylidene difluoride</i> )
R2TP	<i>Rvb1-Rvb2-Tah1-Pih1</i>
RBP5	<i>Retinol binding protein 5</i>
RCT	Inclinación cónica al azar ( <i>Random Conical Tilt</i> )
REPO	Reclutamiento de <i>Polycomb</i> ( <i>Recruitment of Polycomb</i> )
REX1	<i>Reduced Expression 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico (ARN) ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RPA	<i>Replication Protein A</i>
RPAP3	<i>RNA polymerase II-associated protein isoform 3</i>
rpm	revoluciones por minuto
RuvBL1	<i>RuvB-like 1</i>
RuvBL2	<i>RuvB-like 2</i>
Rvb1	<i>RuvB homolog 1</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SANT	<i>ySWI3/yADA2/hNCOR/hTFIIIB</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )

<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sulfato sódico ( <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular ( <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
<b>MALLS</b>	Dispersión multiángulo de luz ( <i>Multiangle Laser Light Scattering</i> )
<b>siRNA</b>	RNA pequeño de interferencia ( <i>small interfering RNA</i> )
<b>SLIDE</b>	<i>SANT-like ISWI</i>
<b>SMG-1</b>	<i>Suppressor with Morphogenetic effect on Genitalia-1</i>
<b>snoRNP</b>	Ribonucleoproteína nucleolar de pequeño tamaño ( <i>small nucleolar ribonucleoprotein</i> )
<b>SRCAP</b>	<i>Snf2-Related/CREB-Activator Protein</i>
<b>ssDNA</b>	ADN de cadena sencilla ( <i>single stranded DNA</i> )
<b>ssRNA</b>	ARN de doble sencilla ( <i>single stranded RNA</i> )
<b>SWI/SNF</b>	<i>Switching defective/Sucrose Nonfermenting</i>
<b>SWI2/SNF2</b>	<i>Switching defective 2/Sucrose Nonfermenting 2</i>
<b>SWR1</b>	<i>Swi2/Snf2-Related</i>
<b>T</b>	Treonina
<b>TAE</b>	Tris-Acético EDTA
<b>Taf14</b>	<i>TBP Associated Factor 14</i>
<b>Tah1</b>	<i>TPR-containing protein associated with Hsp90</i>
<b>TAP54<math>\alpha</math></b>	<i>TIP60 associated protein</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borato EDTA
<b>TBP</b>	<i>TATA box Binding Protein</i>
<b>TEV</b>	Proteasa del virus del tabaco ( <i>Tobacco Etch Virus</i> )
<b>TIH1</b>	<i>TIP49A/B homolog 1</i>
<b>TIP49</b>	<i>TATA-binding protein (TBP)-interacting protein 49</i>
<b>TIP60</b>	<i>TAT Interactive Protein 60</i>
<b>TPR</b>	<i>Tetratricopeptide repeat</i>
<b>Tris</b>	Tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>TRRAP</b>	<i>Transformation/Transcription domain Associated Protein</i>

U2OS	Células de osteosarcoma de hueso humano ( <i>Human bone osteosarcome epithelial cells</i> )
UCH	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase</i>
UCRBP	<i>Upstream Control Region Binding Protein</i>
URI	<i>Unconventional prefoldin RBP5 Interactor</i>
v/v	volumen/volumen
WB	<i>Western blot</i>
Wnt	<i>Wingless-int</i>
YY1	<i>Yin yang 1</i>
YY2	<i>Yin Yang 2</i>
ZnCl <sub>2</sub>	Cloruro de cinc
μm	micrómetro
μM	micromolar



## Summary



# Summary

## 1. Introduction

Chromatin remodeling is a key event for the regulation of cellular processes such as transcription or DNA damage repair. Two main mechanisms to remodel chromatin have been described, the modification of histones and specialized protein complexes that remodel genome packaging in an ATP-dependent manner, known as chromatin remodelers. There are four different families of remodelers described to date: SWI/SNF, ISWI, CHD and INO80. All of them use the energy of ATP hydrolysis to modify histone-DNA contacts in the nucleosomes, and they share a similar catalytic subunit belonging to the SWI2/SNF2 family of ATPases (Clapier & Cairns, 2009). The subunit composition of each remodeler is responsible for their different cellular functions. The INO80 chromatin-remodeling complex carries out the displacement of nucleosomes as well as replacement of histones to modify the DNA architecture, and it is involved in transcriptional activation and DNA repair (Conaway & Conaway, 2009). Two subunits of the INO80 complex are the highly conserved AAA+ ATPases RuvBL1 and RuvBL2, which also form part of a wide range of different macromolecular complexes. These proteins are involved in chromatin remodeling, transcriptional regulation, biogenesis of ribonucleoproteins and DNA repair, among other functions (Rosenbaum et al, 2013). In the INO80 complex, RuvBL1 and RuvBL2 subunits are essential for the recruitment of the Arp5 protein, resulting in the formation of the active remodeler complex (Jonsson et al, 2004). RuvBL1 and RuvBL2 assemble as large oligomers, including hexamers and dodecamers, but their involvement in the different macromolecular complexes of which they form part is not very well documented. There are some discrepancies about the oligomeric form of these proteins that is relevant *in vivo*, and their molecular mechanism is still unknown. I believe that the structural and biochemical study of these proteins is needed to improve our understanding on how these proteins

## Summary

---

functions in such a variety of complexes, thus resulting in their participation in a wide range of cellular events.

The Yin Yang 1 (YY1) transcription factor, that regulates transcription of many genes (Zhang et al, 2011), has been recently described as a novel subunit of the INO80 chromatin remodelling complex in mammalian cells (Cai et al, 2007; Wu et al, 2007). In this context, YY1 participates in transcription but also in genomic integrity maintenance. It seems possible that this protein, as part of the INO80 complex, might be directly involved in DNA repair through homologous recombination (Wu et al, 2007). Moreover, YY1 interacts *in vivo* and *in vitro* with different INO80 subunits, including the RuvBL1 and RuvBL2 proteins. In this thesis, we have explored the role of YY1 in homologous recombination in the context of INO80, and the involvement of the RuvBL1 and RuvBL2 proteins in this process.

## 2. Aim of this thesis

The structural characterization of large macromolecular complexes is essential to understand its role in the cellular processes they act. These multi-protein assemblies frequently have a modular organization, comprising several functional subcomplexes. The INO80 complex is involved in transcription (Shen et al, 2000), replication (Papamichos-Chronakis & Peterson, 2008), cell division, and DNA repair (Downs et al, 2004). In this thesis, we have addressed the biochemical and structural characterization of different subunits of the human INO80 chromatin-remodeling complex to investigate the structural and molecular bases that determine their functions.

To reach this aim, we have addressed the following specific objectives:

1. To express and purify full-length human RuvBL1 and RuvBL2 proteins, to characterize the oligomerization state of the complex they form and to solve its tridimensional structure.

2. To determine the molecular and structural mechanisms through which the RuvBL1-RuvBL2 complex regulates the biogenesis, maturation and remodeling of large macromolecular machines, including the INO80 complex, and to propose possible models of action.

3. To express, purify and characterize the structure of the human transcription factor YY1, as well as its nucleic acids binding properties.

4. To study the role of YY1 in homologous recombination *in vivo*, and to characterize the influence of the AAA+ ATPases RuvBL1 and RuvBL2 in this process in the context of the chromatin remodeler INO80.

### 3. Results and conclusions

#### 3.1. Structural and biochemical characterization of the human RuvBL1-RuvBL2 complex

The full-length RuvBL1 and RuvBL2 proteins were coexpressed in bacterial cells to promote the assembly of their complex *in vivo*. Size exclusion chromatography (SEC) experiments revealed that the proteins assembled as hexamers and dodecamers. The sample was analyzed in the electron microscope, and images of complexes corresponding to the dodecamers were visualized. Interestingly, the analysis of the images suggested the presence of two different conformations of the dodecamer, or alternatively, two different complexes.

## Summary

---

We obtained *ab initio* structures for both conformations, which we named compact and stretched, demonstrating the presence of two conformations of the complex. We also analyzed if this conformational transition could be due to a certain nucleotide binding state, by incubating the complex with different nucleotides and non hydrolysable nucleotide analogues and measuring the ratio between the compact and stretched conformations images. We did not find significant differences between the different conditions tested. Our interpretation is that the nucleotide binding was not affecting the conformation of the complex, but we could not exclude the possibility that the oligomer was not interchanging the nucleotide in our experiments, given that in the atomic structure of the RuvBL1 hexamer the nucleotide pocket seems to be blocked by the oligomerization of the protein (Matias et al, 2006). The structures for the compact and stretched RuvBL1-RuvBL2 complexes at 3 nm resolution were compatible with known atomic structures of the complex (Gorynia et al, 2011; Matias et al, 2006).

Some authors have suggested that the dodecameric RuvBL1-RuvBL2 complex could be an artifact induced by the histidine tags included in the recombinant proteins. To address this possibility, we digested the histidine tags in the complex, and we analyzed the oligomerization of the wild type complex compared to the tagged one. In SEC experiments, removal of the tag promoted the complete disassembly of the dodecamer, detecting only hexameric forms. In contrast, native electrophoresis assays showed the presence of dodecamers and hexamers in both samples, regardless of the presence or absence of the histidine tag. In addition, we also detected the dodecamers when the wild type complex was observed in the electron microscope. Together, these results suggested that the histidine tags were not inducing an artifact oligomerization, but they were responsible for the stabilization of the dodecameric complex, making it more resistant to disassembly by dilution.

We also analyzed the RuvBL1-RuvBL2 dodecamer by cryoelectron microscopy, and we obtained 1.6 nm resolution structures for both conformations. This allowed us to model the interface between the two rings by fitting atomic structures in the electron microscopy

maps. The compact conformation showed closer contacts between the DII domains involved in inter-rings interactions, while in the stretched conformation these domains were pulled upwards and slightly rotated, thus extending the complex along the longitudinal axis. The DII domains in the stretched complex showed a looser interface between the two rings.

The DII domain is structurally similar to the ssDNA-binding domain in RPA; in addition, isolated DII domains from RuvBL1 have been shown to bind different nucleotides substrates (Matias et al, 2006). We found that the putative nucleic acids binding regions seem more exposed in the stretched conformation compared with the compact conformation. Hence, we propose that these conformational changes might regulate the interaction with nucleic acids or, alternatively, binding of a certain nucleic acid could promote one of the states, regulating the functions of the complex. In addition, a more general role of these DII domains as protein-binding modules within larger macromolecular complexes could be possible. This hypothesis agrees with the recently described structure of the yeast SWR1 chromatin remodeling complex, where a RuvBL1-RuvBL2 heterohexamer acts as a platform for connecting different multisubunit modules through the DII domains (Nguyen et al, 2013). Each DII domain is directly connected to the ATPase core, so it is reasonable to hypothesize that there is a link between the conformation of the AAA+ core and the DII domains. Conformational changes in DII could also regulate the ATPase activity and/or *vice versa*.

In this work, we have revealed the structure of the full-length human RuvBL1-RuvBL2 double-ring complex, and we have resolved the discrepancies for the different structures described. We show that RuvBL1-RuvBL2 displays two distinct conformations and propose that these transitions could have a functional impact in the context of the large macromolecular complexes containing RuvBL1-RuvBL2. These conformational transitions could be part of the mechanism of remodeling by converting the complex from one state to another, and all these changes could be somehow interconnected with a modulation of the

## Summary

---

ATPase activity and/or nucleic acids binding properties, thanks to the connection between the DII domains and the AAA+ core.

### 3.2. Role of YY1 and INO80 in homologous recombination

A novel subunit of the INO80 chromatin-remodeling complex that we have studied is the YY1 transcription factor. This protein is involved in the transcriptional regulation of a wide range of genes (Gordon et al, 2006). An alternative role for YY1 has been recently described in homologous recombination (HR) in the context of INO80 and their RuvBL1-RuvBL2 subunits (Cai et al, 2007; Wu et al, 2007). We analyzed the participation of YY1 in homologous recombination by combining cellular, biochemical and structural approaches. We found that YY1 mediates the promotion of RAD51 filaments during homologous recombination *in vivo*, in cooperation with INO80 and RuvBL2. These findings corroborates previous results by Wu et al, but also revealed new data supporting a role of YY1 during HR. We also performed an *in vitro* characterization of YY1. Recombinant YY1 was able to interact with *Holliday junctions* DNA substrates, an intermediate in HR, and that this interaction promoted the assembly of several monomers of the protein in the nucleic acid. We explored the possibility of the oligomerization of YY1, and we found that the protein assembles two different oligomers in the absence of DNA. These YY1 oligomers, that we named complex A and complex B, were analyzed in the electron microscope. Complex A was solved as a “bell-shaped” dimeric core structure. The head region of the dimer supported major contacts of the structure, while the other segments assembled as arms slightly protruding around a central cavity. We obtained low resolution *ab initio* structures for the complex B, which showed mass and dimensions compatible with the assembly of two units of complex A. Despite several efforts, we were not able to refine these structures to higher resolution, due to the impossibility of assigning the axis of oligomerization. We proposed two alternatives forms of interaction for these complexes, a back-to-back contacts between two dimers of YY1, and a lateral association. We demonstrated that purified YY1 oligomers, mainly complex B, were able to bind *Holliday*

*junction* intermediates in a sequence-independent manner. YY1 oligomers also interact with the RuvBL1-RuvBL2 complex *in vitro*. Binding of YY1 to *Holliday junctions* was improved when ATPases RuvBL1-RuvBL2 were present, suggesting that the 3 proteins are cooperating in binding HR intermediates, probably as a tripartite complex.

Together, these results suggest that YY1, in the context of INO80 and in cooperation with the RuvBL1-RuvBL2 subunits, is involved in promoting the formation of RAD51 filaments during HR. Moreover, the ability of YY1 to bind HR intermediates in cooperation with RuvBL1-RuvBL2 could be a reflect of its participation in additional steps during HR. Oligomerization of YY1 could have a biological significance, since these oligomers bind HR intermediates, and this could be involved in the molecular mechanism for maintaining genomic integrity.

## 4. References

Cai Y, Jin J, Yao T, Gottschalk AJ, Swanson SK, Wu S, Shi Y, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW (2007) YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 872-874

Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* **78**: 273-304

Conaway RC, Conaway JW (2009) The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair. *Trends in biochemical sciences* **34**: 71-77

Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Cote J (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**: 979-990

Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**: 1125-1142

## Summary

---

Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, McVey CE, Vonnrhein C, Round A, Svergun DI, Donner P, Matias PM, Carrondo MA (2011) Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J Struct Biol* **176**: 279-291

Jonsson ZO, Jha S, Wohlschlegel JA, Dutta A (2004) Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell* **16**: 465-477

Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem* **281**: 38918-38929

Nguyen VQ, Ranjan A, Stengel F, Wei D, Aebersold R, Wu C, Leschziner AE (2013) Molecular Architecture of the ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complex SWR1. *Cell* **154**: 1220-1231

Papamichos-Chronakis M, Peterson CL (2008) The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 338-345

Rosenbaum J, Baek SH, Dutta A, Houry WA, Huber O, Hupp TR, Matias PM (2013) The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. *Sci Signal* **6**: mr1

Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**: 541-544

Wu S, Shi Y, Mulligan P, Gay F, Landry J, Liu H, Lu J, Qi HH, Wang W, Nickoloff JA, Wu C (2007) A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1165-1172

Zhang Q, Stovall DB, Inoue K, Sui G (2011) The oncogenic role of Yin Yang 1. *Crit Rev Oncog* **16**: 163-197

# Introducción



# Capítulo 1

## Introducción

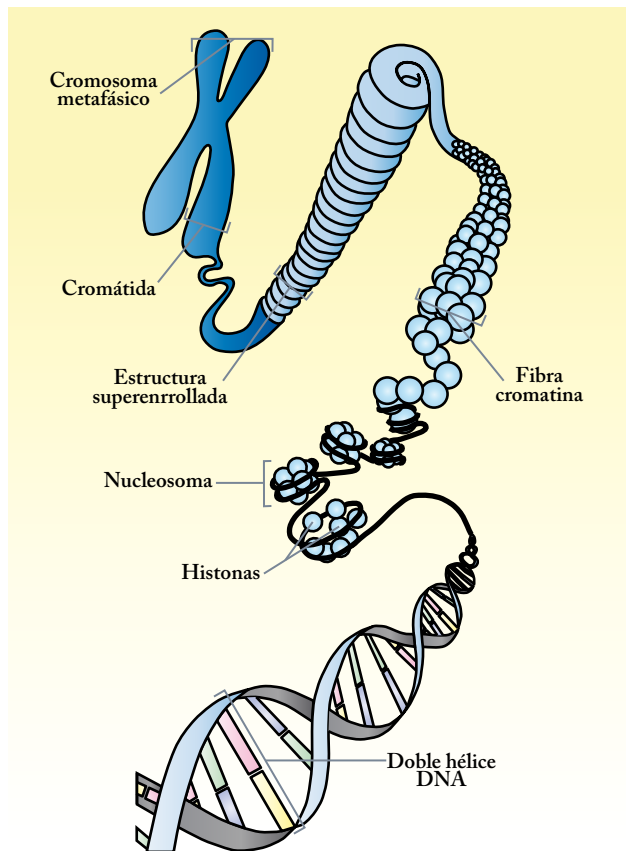
### 1.1. Organización y dinámica del material genético

La longitud del DNA de una célula eucariota supone un importante reto topológico, teniendo que albergar cada núcleo, de unos 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, aproximadamente 2 metros de DNA. La solución a este problema es la compactación del material genético siguiendo un orden jerárquico de plegamiento. El fundamento del empaquetamiento reside en la formación de un complejo entre el DNA y proteínas específicas denominadas histonas, dando lugar al nucleosoma, la unidad repetitiva de la cromatina. El nucleosoma se compone de dos copias de las cuatro histonas principales (H2A, H2B, H3 y H4) que forman un complejo octamérico alrededor del cual se enrolla el DNA a través de contactos de 147 pares de bases con las histonas (Horn & Peterson, 2002). Los nucleosomas a su vez se condensan formando estructuras cada vez más compactas que son estabilizadas por proteínas adicionales, hasta formar el cromosoma, la unidad más compacta del material genético (Figura 1.1).

El empaquetamiento del DNA cromosómico supone además un mecanismo de regulación del acceso a regiones concretas del DNA (promotores, orígenes de replications, etc.) de la maquinaria proteica durante procesos como transcripción, replicación, reparación o recombinación. Por lo tanto, diferentes mecanismos de modificación de esta estructura compacta son requeridos para el correcto funcionamiento de la célula. El proceso de remodelación de la cromatina se realiza mediante diversos mecanismos, que incluyen la modificación postraduccional de histonas mediante enzimas específicas, la incorporación de

## Capítulo 1

variantes de las histonas principales, la eliminación de histonas de los nucleosomas o la remodelación dependiente de ATP a través de complejos multiproteicos específicos.



**Figura 1.1: Organización del material genético.** La doble hebra de DNA (2 nm de diámetro) interacciona con las histonas para generar el nucleosoma, la unidad básica de la cromatina. Los nucleosomas se empaquetan formando fibras de cromatina (diámetro 10 nm), que a su vez se organizan en estructuras superenrolladas (diámetro 200 nm) para formar finalmente las cromátidas (diámetro 700 nm) de los cromosomas metafásicos, la unidad de mayor orden del material genético. Adaptado de Saladin, 1998.

### **Remodelación de la cromatina mediante modificación de histonas**

Las modificaciones covalentes que sufren las histonas incluyen la acetilación, la metilación o la fosforilación de residuos específicos (Campos & Reinberg, 2009). La acetilación suele producirse en residuos de lisina que aparecen en los extremos amino terminal de las histonas, lo que ocasiona una pérdida de cargas positivas, la reducción de las interacciones con el DNA y la formación de una zona en la cromatina de mayor accesibilidad (Narlikar y cols., 2002). Por el contrario, la metilación produce una interacción más fuerte entre las histonas y el DNA, generando una zona en la cromatina de difícil acceso (Paulsen & Ferguson-Smith, 2001). La fosforilación de histonas es un método de señalización en procesos de reparación de daño genómico, en los que la fosforilación de la variante de la histona H2A, H2AX, inicia el reclutamiento de factores implicados en el proceso de reparación (van Attikum & Gasser, 2009). Dado que las modificaciones covalentes de las histonas son reversibles, actúan a modo de interruptor para regular múltiples procesos relacionados con el material genético. Además, las diversas combinaciones en las modificaciones de las histonas proporcionan la señalización necesaria para regular a otros factores que participan en la dinámica de la cromatina (Xu y cols., 2009).

### **Remodelación de la cromatina dependiente de ATP**

La remodelación de la cromatina dependiente de ATP es un proceso dinámico que utiliza la energía producida en la hidrólisis del ATP para alterar de manera reversible los contactos entre el DNA y las histonas (Lusser & Kadonaga, 2003). Este proceso es llevado a cabo por enzimas nucleares que generalmente forman parte de un complejo multiproteico de gran tamaño; son los denominados complejos remodeladores de cromatina. Los remodeladores modifican el empaquetamiento de la cromatina mediante la translocación, eliminación o reestructuración de los nucleosomas, regulando de esta manera la accesibilidad al DNA en zonas concretas.

## Capítulo 1

---

Hasta el momento han sido descritas cuatro familias de complejos remodeladores de cromatina. Todos ellos utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para alterar las interacción entre las histonas y el DNA y comparten un dominio similar con actividad ATPasa. Los remodeladores de la cromatina comparten características comunes, como son la afinidad específica por los nucleosomas, la presencia de dominios encargados de reconocer modificaciones en las histonas, un dominio ATPasa dependiente de DNA que sirve como motor para la translocación del DNA, dominios y/o subunidades que regulan la actividad ATPasa, y dominios y/o subunidades implicados en la interacción con otros factores involucrados en la dinámica de la cromatina y regulación de la transcripción. Sin embargo, cada una de las familias está especializada en procesos biológicos concretos, propiedad que viene determinada por dominios exclusivos en la subunidad ATPasa catalítica así como por las subunidades asociadas a cada uno de los complejos (Figura 1.2). Las subunidades catalíticas de todas las familias de remodeladores pertenecen a la familia de ATPasas SWI2/SNF2 (*Switching defective 2/Sucrose Nonfermenting 2*), cuyo dominio ATPasa aparece dividido en dos regiones, DE<sub>xx</sub> y HELIC<sub>c</sub> (Figura 1.2). Cada una de las familias aparece evolutivamente conservada en levadura y mamífero, aunque existen variaciones en la composición de las proteínas específicas de cada complejo remodelador. Los complejos ortólogos en distintas especies suelen presentar dominios y/o subunidades conservados, reflejando una conservación de la función concreta de estos.

### Remodeladores de la familia SWI/SNF

La familia de remodeladores de cromatina SWI/SNF fue descrita por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson y cols., 1981). La mayoría de los organismos eucariotas presentan dos complejos SWI/SNF, organizados entorno a una subunidad catalítica ATPasa conservada. El número de subunidades de estos varía entre ocho y catorce entre las distintas especies, y su subunidad catalítica presenta dominios específicos HSA (*Helicase/SANT*), y un bromodominio en la región carboxilo terminal. Las proteínas accesorias de esta familia incluyen la actina y proteínas relacionadas con la actina (ARP, *Actin-Related Protein*) en

organismos superiores, y participa en múltiples actividades celulares, remodelando la estructura de la cromatina mediante el deslizamiento y expulsión de nucleosomas.

### Remodeladores de la familia ISWI

Los complejos remodeladores de cromatina de la familia ISWI (*Imitation Switch*) están formados por entre dos y cuatro subunidades (Corona y cols., 1999). Su subunidad catalítica contiene dominios exclusivos SANT (*ySWI3/yADA2/hNCoR/hTFIIIB*) y SLIDE (*SANT-like ISWI*) localizados en la región carboxilo terminal de la subunidad catalítica, que conforman un módulo de reconocimiento de nucleosomas. La mayoría de los remodeladores de esta familia actúan optimizando el espacio entre nucleosomas para promover el ensamblaje de la cromatina y la represión transcripcional; ciertos complejos, sin embargo, pueden alterar este espaciamento entre nucleosomas de manera aleatoria, permitiendo la transcripción mediada por la RNA polimerasa II (Corona & Tamkun, 2004).

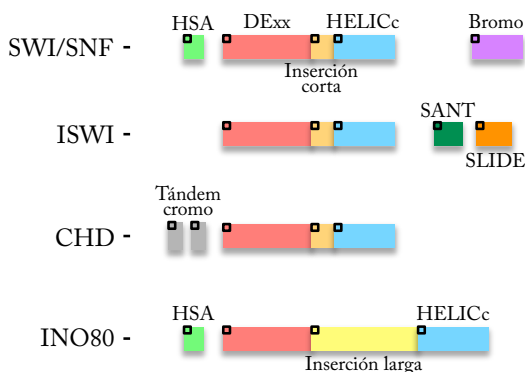
### Remodeladores de la familia CHD

Los remodeladores de la familia CHD (*Chromodomain/Helicase/DNA binding*) están formados por entre 1 y 10 subunidades, y fueron purificados por primera vez de *Xenopus laevis* (Marfella & Imbalzano, 2007). El rasgo característico de esta familia son dos cromodominios dispuestos en tándem en la región amino terminal de la subunidad que contiene la actividad ATPasa. Algunos complejos de esta familia actúan deslizando o eliminando nucleosomas para promover la transcripción, aunque otros presentan una actividad represora dirigida por subunidades accesorias con actividad histona deacetilasa (HDAC, *Histone Deacetylase*) o encargadas de reconocer metilación en el DNA.

## Capítulo 1

### Remodeladores de la familia INO80

La familia INO80 (*Inositol requiring 80*) fue descrita por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (Ebbert y cols., 1999). En levadura han sido descritos dos complejos, denominados INO80 y SWR1 (*Swi2/Snf2-related*) (Krogan y cols., 2003; Shen y cols., 2000), formados por más de diez subunidades. En eucariotas superiores ambos complejos presentan homólogos conservados (Pho-dINO80 y TIP60 (*TAT Interactive Protein 60*) en *D. melanogaster*, y hINO80 (*human INO80*) y TRRAP (*Transformation/Transcription domain Associated Protein*)/TIP60 en humano). También se incluyen en esta familia el complejo p400, que presenta actividad histona acetiltransferasa (HAT) y SRCAP (*Snf2-related/CREB-Activator Protein*). La característica de esta familia de remodeladores es una inserción larga en la secuencia primaria del dominio ATPasa de la subunidad catalítica, que sirve como módulo para la interacción de las subunidades accesorias RuvBL1, RuvBL2 y Arp5. Estos remodeladores participan en procesos como la activación de la transcripción y la reparación del DNA. A pesar de la homología con INO80, SWR1 es el único miembro con capacidad para eliminar dímeros de las histonas H2A-H2B y reemplazarlos por H2A.Z-H2B (Mizuguchi y cols., 2004).

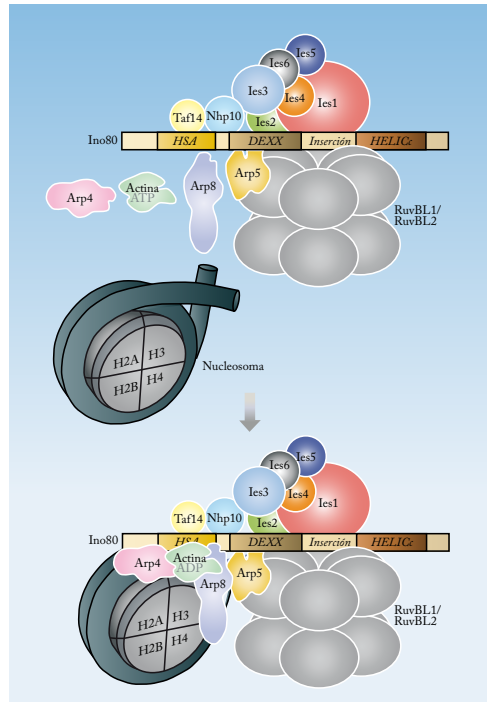


**Figura 1.2: Representación esquemática de la secuencia primaria de la subunidad catalítica de las distintas familias de remodeladores de cromatina.** La subunidad ATPasa de tipo *SWI2/SNF2* que conforma el núcleo catalítico de las diferentes familias presentan su módulo ATPasa dividido en dos secciones: DExx (en

rojo) y HELICc (azul). Cada familia se caracteriza por dominios exclusivos adyacentes al dominio ATPasa o incluidos en este. Los remodeladores de las familias SWI/SNF, ISWI y CHD presentan una inserción corta (naranja) en el dominio ATPasa, mientras que los remodeladores INO80 contienen una inserción más larga (amarillo). En cada familia aparecen dominios distintivos: Bromo (morado) y HSA (verde claro) en el caso de la familia SWI/SNF; el módulo SANT-SLIDE (verde oscuro-naranja) en los remodeladores ISWI; cromodominios (cromo) en tándem (gris) en la familia CHD; y HSA en el caso de INO80. Adaptado de Clapiers & Cairns, 2009.

### 1.2. El complejo remodelador de cromatina INO80

El complejo INO80, denominado INO80.com (*INO80 complex*) fue descrito por primera vez en estudios sobre mutantes en los que se veía afectada la biosíntesis de inositol (Ebbert y cols., 1999). En *S. cerevisiae*, el complejo INO80 contiene 15 subunidades y tiene una masa molecular superior a 1 MDa (Shen y cols., 2000). Los componentes del complejo INO80 de levadura incluyen Ino80, Rvb1, Rvb2, Arp4, Arp5, Arp8, actina, Nhp10 (*Non-histone protein 10*), Anc1 (*Adenine nucleotide carrier 1*) (también denominado Taf14 (*TBP (TATA box binding protein)-associated factor 14*)), Ies1 (*Ino eighty Subunit 1*), Ies2, Ies3, Ies4, Ies5 e Ies6. En humanos aparecen subunidades ortólogas de Ino80, RuvBL1 (ortólogo a Rvb1), RuvBL2 (Rvb2), Arp4, Arp5, Arp8, Ies2 e Ies6, además de 5 subunidades exclusivas (Tabla 1.1). Todas las subunidades del complejo han sido identificadas con una estequiometría similar, a excepción de las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2, que aparecen en una relación 6:1 respecto al resto (Shen y cols., 2000; Shen y cols., 2003a; Shen y cols., 2003b) (Figura 1.3). La subunidad catalítica, Ino80, comparte un grado de similitud significativo con la familia SNF2/SWI2 de remodeladores de cromatina, y se caracteriza por una inserción en el dominio ATPasa y la presencia de dos motivos conservados, *TELY* en la zona amino terminal y *GTIE* en el extremo carboxilo terminal.



**Figura 1.3: Modelo de organización de las subunidades del complejo remodelador de cromatina INO80 y del reconocimiento del nucleosoma. Panel superior:** El núcleo ATPasa, Ino80, contiene un dominio HSA amino terminal que interacciona con las subunidades Taf14, Arp4, Arp8 y Actina (Szerlong y cols., 2008), y un dominio ATPasa carboxilo terminal separado en dos partes, el dominio DEXx y el dominio helicasa HELICc, que sirve como plataforma para la interacción de RuvBL1-RuvBL2 y la subunidad Arp5. **Panel inferior:** Las subunidades Arp4 y Arp8 forman un complejo con la Actina en su estado de unión a ADP (Fenn y cols., 2011). Este módulo Actina-Arp4-Arp8 es probablemente reclutado como una unidad al dominio HSA de Ino80 (Shen y cols., 2003a; Szerlong y cols., 2008). Las proteínas Arps presentan zonas ácidas en su secuencia que median interacciones con las histonas, y estas interacciones dirigen el complejo INO80 hacia el nucleosoma. Adaptado de Kast & Dominguez, 2011. (Kast & Dominguez, 2011)

Una característica de este remodelador de cromatina es la presencia de otras dos subunidades con actividad ATPasa, RuvBL1 y RuvBL2, también presentes en el remodelador SWR1. La subunidad Nhp10 es una proteína de tipo HMGB (*High Mobility Group Protein*) con capacidad de interactuar con DNA estructurado o nucleosomas, mientras que el papel de Ies1 e Ies6 no ha sido aún bien caracterizado; sin embargo, su conservación evolutiva sugiere un papel fundamental en la actividad del complejo INO80. En común con otros remodeladores, INO80 contiene subunidades Arps. Arp4 y actina también aparecen en el complejo HAT NuA4 (*Nucleosome acetyltransferase of H4*), mientras que Arp5 y Arp8 son exclusivos de INO80. La presencia de las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2, aunque no su actividad, es necesaria para la asociación de Arp5 con INO80 (Jonsson y cols., 2004).

Como en otros remodeladores de cromatina de la familia SWI2/SNF2, la actividad ATPasa de INO80 es estimulada por DNA; además presenta actividad helicasa 3'-5' (Shen y cols., 2000). INO80 interactuaba con DNA en ensayos de retardo en la movilidad electroforética, facilitando la transcripción de un sustrato sintético de cromatina; la ruptura de este sustrato mediante enzimas de restricción se veía incrementada en presencia de INO80, lo que ponía en evidencia su actividad remodeladora de cromatina (Shen y cols., 2000). El desplazamiento de nucleosomas por INO80 de manera dependiente de ATP fue posteriormente confirmado y caracterizado con más detalle en otros estudios (Shen y cols., 2003b; Udugama y cols., 2011). Además, recientemente se ha descrito la actividad intercambiadora de histonas (H2A/ H2AZ) del complejo INO80 (Papamichos-Chronakis y cols., 2011). Las subunidades Arp5 y Arp8 son necesarias para la remodelación de la cromatina mediada por INO80, así como para su actividad ATPasa estimulada por nucleosomas y su capacidad de interacción con el DNA (Shen y cols., 2003b). Este hecho hace que se suelen usar cepas de delección de *arp5* y *arp8* en lugar de delecciones de *ino80* en muchos estudios. La proteína Nhp10 no participa en la reposición de los nucleosomas, pero sí afecta a la capacidad de unión de DNA del complejo (Shen y cols., 2003b) (Figura 1.3).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	Descripción
Ino80p	INO80	dIno80	<i>ATPasa tipo SWI2/SNF2</i>
Actina	$\beta$ -actina	Actina 5C	
Arp4p	Arp4	ND	<i>ARP</i>
Arp5p	Arp5	Arp5	<i>ARP</i>
Arp8p	Arp8	Arp8	<i>ARP</i>
Rvb1p	RuvBL1	Pontin	<i>ATPasa AAA+</i>
Rvb2p	RuvBL2	Reptin	<i>ATPasa AAA+</i>
Ies2p	Ies2	ND	<i>Dominio zn finger-HIT</i>
Ies6p	Ies6	ND	
Nhp10p	-	-	<i>Dominio HMG tipo II</i>
Taf14p	-	-	
Ies1p	-	-	
Ies3p	-	-	
Ies4p	-	-	
Ies5p	-	-	
-	YY1	Pho	<i>F.T. GLI-Krüppel</i>
-	Uch37	Uch37	<i>Enzima deubiquitina UCH</i>
-	NFRKB	Nfrkb	
-	MCRS1	ND	<i>Dominio FHA</i>
-	Amida	ND	
-	INO80D	ND	
-	INO80E	ND	<i>Dominio coiled-coil</i>

Tabla 1.1: Subunidades del complejo remodelador de cromatina INO80 en distintos organismos (adaptado de (Conaway & Conaway, 2009). ARP, proteína relacionada con la actina (*Actin-Related Protein*); F.T., factor de transcripción; N.D., no descrito.

Además de la regulación de la transcripción de numerosos genes, el complejo INO80 ha sido implicado en otros procesos como la regulación de los telómeros (Yu y cols., 2007) o en el proceso de reparación del material genético NER (*Nucleotide Excision Repair*) (Sarkar y

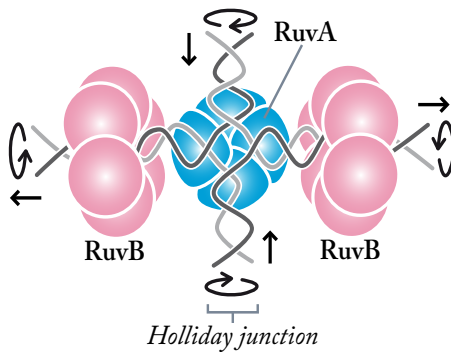
cols., 2010), entre otros. La participación de INO80 en procesos de reparación de daños en el DNA comenzó a observarse en cepas de delección de *ino80*, subunidad catalítica del remodelador, sensibles a diversos agentes que producen daño en el DNA (Shen y cols., 2000). La transcripción de genes implicados en reparación o en puntos de control del ciclo celular en esta cepa era similar a la de una cepa silvestre, lo cual sugería un papel directo del complejo en el proceso de reparación del material genético. Datos acerca del reclutamiento del complejo INO80 a sitios de roturas de doble hebra en el DNA apoyaban esta hipótesis (Downs y cols., 2004; van Attikum y cols., 2004). Posteriormente se observó que INO80 era reclutado a zonas de la cromatina con roturas de doble cadena en el DNA que contenían formas fosforiladas de la histona H2A, contribuyendo a la interacción las subunidades Nhp10/Ies3 y Arp4 (Morrison y cols., 2004). Esto supondría un mecanismo para la regulación de la compactación del material genético en zonas en las que es necesario el acceso de la maquinaria de reparación de DNA. El mecanismo a través del cual actúa INO80 en este contexto no está del todo establecido; una posibilidad es que funcione mediante el deslizamiento de nucleosomas o el intercambio de histonas para facilitar la accesibilidad al DNA. La capacidad del complejo de reemplazar histonas H2AZ por H2A y su localización en zonas del DNA que presentan roturas, plantean la posibilidad de que la eliminación de H2AZ suponga el mecanismo de regulación de la accesibilidad a la cromatina durante la reparación del daño genómico.

### 1.3. Las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2

Las proteínas RuvBL1 (*RuvB-like 1*) (también denominada Rvb1 (*RuvB homolog 1*), Pontin, TIP49 (*TATA-binding protein (TBP)-interacting protein 49*), TIP49A, TAP54 $\alpha$  (*TIP60 associated protein 54 $\alpha$* ), TIH1 (*TIP49A/B homolog 1*), y ECP54 (*Erythrocyte cytosolic protein 54*)) y RuvBL2 (*RuvB-like 2*; Rvb2, Reptin, TIP48, TIP49B, TAP54 $\beta$ , TIH2, y ECP51) son ATPasas pertenecientes a la familia AAA+ (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares) (Bauer y cols., 1998; Ikura y cols., 2000; Jonsson y cols., 2001; Kanemaki y cols., 1997; Lim y cols., 2000; Makino y cols., 1998; Salzer y cols., 1999; Wood

## Capítulo 1

y cols., 2000). Esta familia engloba proteínas con funciones muy variadas, como proteasas, chaperonas o enzimas implicadas en el procesamiento de ácidos nucleicos (Tucker & Sallai, 2007). Las proteínas AAA+ suelen presentar una estructura cuaternaria característica de anillos hexaméricos, y contienen motivos conservados encargados de la unión e hidrólisis del ATP como los motivos Walker A (GXXXXGKT) y Walker B (DEXH/N) (Walker y cols., 1982), residuos sensores I y II, y un residuo de arginina catalítico (*Arg-finger*) (Tucker & Sallai, 2007). La energía proporcionada por la hidrólisis del ATP es utilizada por estas proteínas para generar fuerzas mecánicas en determinadas ocasiones, y en el caso de RuvBL1 y RuvBL2 la hidrólisis de ATP es esencial para sus actividades biológicas (Feng y cols., 2003; Jonsson y cols., 2001; Wood y cols., 2000).



**Figura 1.4: Modelo de interacción entre RuvA, RuvB y la estructura de DNA *Holliday junction*.** El complejo RuvAB cataliza el movimiento de la región de entrecruzamiento de las hebras de DNA en la estructura *Holliday junction* (*branch migration*). El octámero de RuvA interacciona con la estructura cruciforme de DNA y la mantiene en una configuración

cuadrada plana desplegada (en el esquema se indica sólo uno de los tetrámeros de RuvA para simplificar). Los anillos hexaméricos de RuvB, que se orientan diametralmente opuestos en los dos brazos del DNA, llevan a cabo el movimiento de las hebras de DNA a través de su actividad helicasa. Las flechas indican la dirección del movimiento del DNA durante el proceso. Adaptado de van Gool y cols., 1998.

RuvBL1 y RuvBL2 están compuestas por 456 y 463 aminoácidos, respectivamente, y comparten un 43 % de identidad y un 65 % de similitud de secuencia. Su localización es

fundamentalmente nuclear, pero también presentan funciones citosólicas (Holzmann y cols., 1998; Kim y cols., 2006; Lim y cols., 2000; Salzer y cols., 1999). Ambas proteínas están evolutivamente conservadas y presentan similitud (30 %) con la ATPasa dependiente de DNA y helicasa procariota RuvB, encargada junto con RuvA y RuvC de la resolución de estructuras de DNA de tipo *Holliday junction* generadas en procesos de recombinación del material genético (Shinagawa & Iwasaki, 1996; Tsaneva y cols., 1993; Yamada y cols., 2002) (Figura 1.4). Se ha descrito que las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 son esenciales en *Saccharomyces cerevisiae* (Qiu y cols., 1998), *Drosophila melanogaster* (Bauer y cols., 2000) y en *Caenorhabditis elegans*.

Varios estudios han demostrado que RuvBL1 y RuvBL2 presentan una baja capacidad de hidrolizar ATP (Ikura y cols., 2000; Puri y cols., 2007), siendo consistentes estos datos con las observaciones de la estructura atómica de RuvBL1 (Matias y cols., 2006), en la que la liberación del ADP está bloqueada por la formación de un oligómero hexamérico. La interacción de ambas proteínas conlleva a un incremento significativo (unas 10 veces) de la actividad ATPasa con respecto a las proteínas individuales (Ikura y cols., 2000; Puri y cols., 2007), indicativo de que un complejo RuvBL1-RuvBL2 podría ser la forma catalíticamente relevante en la célula. La abolición de la actividad ATPasa en experimentos de mutagénesis de los motivos catalíticos Walker A y Walker B de RuvBL1 o RuvBL2 en levadura produce un fenotipo letal (Jonsson y cols., 2001; King y cols., 2001; Lim y cols., 2000; Wood y cols., 2000), indicando que tanto la unión como la hidrólisis de ATP de ambas proteínas son necesarias para el correcto funcionamiento celular.

En levaduras, RuvBL1 y RuvBL2 forman un complejo con actividad ATPasa estimulada por ssDNA y actividad helicasa 5'-3' *in vitro* (Gribun y cols., 2008), aunque la direccionalidad helicasa es opuesta a la ejercida por los complejos TIP60 e INO80 de los que las proteínas forman parte. Otros estudios han demostrado una actividad helicasa de las proteínas con polaridades opuestas *in vitro* (Kanemaki y cols., 1997; Makino y cols., 1998). Sin embargo, son varios los grupos que no han detectado actividad helicasa estimulada por

## Capítulo 1

---

ssDNA en RuvBL1, RuvBL2 o el complejo de ambas (Jonsson y cols., 2004; Matias y cols., 2006; Puri y cols., 2007; Qiu y cols., 1998). Una posibilidad es que la presencia de contaminantes podría ser responsables de la observación de actividad ATPasa y helicasa estimuladas por DNA. Los resultados obtenidos en los distintos estudios hacen difícil llegar a una conclusión acerca de la actividad helicasa de estas proteínas.

La proteína humana RuvBL1 y su dominio DII aislado interaccionan con ácidos nucleicos de distinto tipo *in vitro* (ssRNA, ssDNA y dsDNA) (Matias y cols., 2006). Para RuvBL2 no hay datos publicados a cerca de su capacidad de interaccionar con ácidos nucleicos.

### **Funciones Biológicas de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2**

Las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 aparecen involucradas en multitud de procesos biológicos, en la mayor parte de ellos como subunidades de complejos macromoleculares multiproteicos. Tales funciones incluyen la remodelación de la estructura de la cromatina, regulación de la transcripción, reparación de daño genómico, mantenimiento de los telómeros o mitosis, entre otras. La mayoría de estudios realizados hasta el momento se limitan a describir la participación de las proteínas en ciertos complejos, pero son pocos los que ofrecen información acerca del mecanismo de acción que ejercen estas ATPasas en el contexto celular (Figura 1.5).

#### Remodelación de cromatina

RuvBL1 y RuvBL2 son componentes esenciales de los complejos remodeladores de cromatina de la familia INO80, incluyendo en mamíferos el propio complejo INO80 y SRCAP (ortólogo a SWR1 de levadura) (Jin y cols., 2005). En levadura, los homólogos de RuvBL1 y RuvBL2 reclutan la subunidad Arp5 para formar un complejo INO80 catalíticamente activo (Jonsson y cols., 2004). En levadura RuvBL1 y RuvBL2 forman parte

del complejo con actividad HAT NuA4 (complejo TIP60 en humanos), que incluye otras subunidades como la ATPasa p400, la PIKK (proteínas quinasas relacionadas con las fosfatidilinositol-3-quininas) TRRAP (*Transformation/transcription domain associated protein*) y TIP60; RuvBL1 y RuvBL2 son esenciales para la actividad acetiltransferasa de la subunidad catalítica del complejo TIP60 en procesos de reparación del DNA (Jha y cols., 2008), y contribuyen al ensamblaje y organización estructural del complejo NuA4 (Jha y cols., 2013).

### Transcripción

Ambas proteínas interactúan con TBP (Bauer y cols., 2000; Bauer y cols., 1998; Kanemaki y cols., 1997; Ohdate y cols., 2003), y con componentes de la RNA polimerasa II (Qiu y cols., 1998), lo cual podría suponer un papel conjunto de RuvBL1 y RuvBL2 con la maquinaria de transcripción. RuvBL1 y RuvBL2 interactúan directamente y regulan factores de transcripción fundamentales en la célula, como c-myc (Wood y cols., 2000),  $\beta$ -catenina (Bauer y cols., 2000; Bauer y cols., 1998), Hint1 (*Histidine triad nucleotide binding protein 1*) (Weiske & Huber, 2005), ATF2 (*Activating transcription factor 2*) (Cho y cols., 2001) y E2F (Dugan y cols., 2002). En la regulación de c-myc, tanto RuvBL1 como RuvBL2 interactúan directamente con este factor de transcripción como parte del complejo NuA4/TIP60, y suponen cofactores esenciales para la transformación celular promovida por c-myc (Wood y cols., 2000). En la ruta de señalización de Wnt (*Wingless-int*) mediada por  $\beta$ -catenina RuvBL1 y RuvBL2 juegan un papel antagónico en la regulación de KAI1 (*Kangai 1*), cuya represión es una etapa fundamental en la progresión metastásica de tumores (Baek, 2008; Kim y cols., 2006).

### Biogénesis y maduración de ribonucleoproteínas

En levadura RuvBL1 y RuvBL2 forman, junto con Pih1 (*Protein Interacting with Hsp90*) (PIH1D1 (*PIH1 domain-containing protein 1*) en humano) y Tah1 (*TPR-containing protein*

## Capítulo 1

---

*Associated with Hsp90*) (RPAP3 (*RNA polymerase II-associated protein isoform 3*) en humano), el complejo R2TP (*Rvb1-Rvb2-Tab1-Pib1 complex*), que interacciona con la chaperona Hsp90 (*Heat shock protein 90*) y está involucrado en la biogénesis y maduración de ribonucleoproteínas nucleolares de pequeño tamaño (snoRNPs) (King y cols., 2001; Machado-Pinilla y cols., 2012; Watkins y cols., 2004). Además, RuvBL1 y RuvBL2 son necesarias para la biogénesis y maduración del complejo ribonucleoproteico de la Telomerasa, proceso que requiere la actividad ATPasa de RuvBL1 (Venteicher y cols., 2008).

### Regulación de las PIKK y del proceso de NMD

RuvBL1 y RuvBL2 interaccionan y regulan la abundancia, al menos a nivel de mRNA, de las PIKKs ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad3-related*), mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) y SMG-1 (*Suppressor with Morphogenetic effect on Genitalia-1*) (Izumi y cols., 2010). Las PIKKs regulan procesos celulares como la respuesta al daño en el DNA, control de calidad del mRNA, transcripción y traducción, contribuyendo al mantenimiento de la integridad genómica y correcta expresión génica (Lovejoy & Cortez, 2009). La supresión de RuvBL1 y RuvBL2 disminuye los niveles de las PIKKs, modificando los procesos de señalización regulados por estas (Izumi y cols., 2010). RuvBL1 y RuvBL2 no sólo regulan los niveles de SMG-1, sino que ejercen un papel directo en el proceso de degradación de RNA con codones de terminación prematuros (*NMD*, *Nonsense-Mediated mRNA Decay*) a través de la regulación de SMG-1 (Izumi y cols., 2010).

### Mitosis y otras funciones

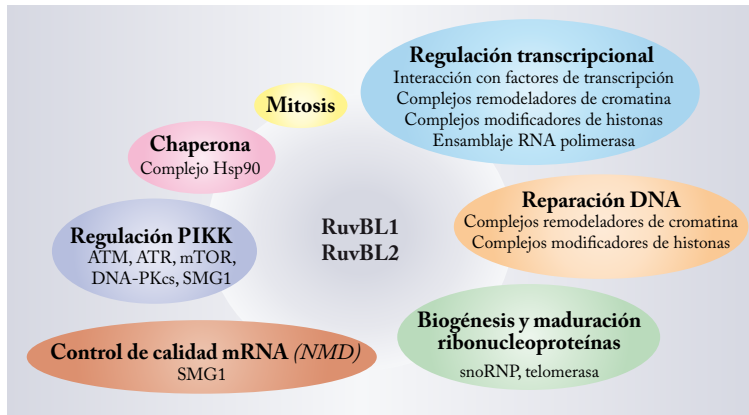
RuvBL1 y RuvBL2 participan en el ensamblaje del huso mitótico, apareciendo asociadas a los centrosomas y a elementos del aparato mitótico. RuvBL1 interacciona con tubulina (Gartner y cols., 2003), y presenta una localización distinta a RuvBL2 durante la telofase y citoquinesis (Sigala y cols., 2005), lo cual sugiere que ambas proteínas podrían estar actuando de manera individual en este proceso. Además, RuvBL1 y RuvBL2 son subunidades del complejo URI (*Unconventional prefoldin RBP5 Interactor*), involucrado en la regulación de la transcripción en respuesta a nutrientes a través de la ruta de mTOR (Gstaiger y cols., 2003).

### Implicación en procesos de transformación celular

La expresión de RuvBL1 y RuvBL2 aparece desregulada en ciertos procesos tumorigénicos. Los niveles de ambas proteínas se encuentran elevados en células de hepatocarcinoma en comparación con células hepáticas normales (Blanc y cols., 2005; Huber y cols., 2008; Rousseau y cols., 2007); además, el incremento en la expresión de RuvBL2 se correlaciona con una mala prognosis en pacientes con este tipo de cáncer (Rousseau y cols., 2007). La elevada expresión de RuvBL1 y RuvBL2 también se ha detectado en otros tipos de cánceres, como melanomas y tumores de vejiga (Huber y cols., 2008); la desregulación de RuvBL2 en cáncer de colon se asocia al incremento en el marcador COX-2 (*Ciclooxigenase isoform 2*), regulado a través de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina (Carlson y cols., 2003). También se han descrito modificaciones postraduccionales de estas proteínas, como la sumoilación/desumoilación de RuvBL2, que se relaciona con la modulación de la capacidad de invasión de células tumorales (Kim y cols., 2006). Además de las evidencias clínicas que relacionan a las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 con procesos cancerígenos, la participación de estas ATPasas en procesos de señalización celular y transcripción génica que frecuentemente están relacionados con procesos de transformación celular, hace que puedan ser candidatos como potenciales dianas terapéuticas, especialmente por presentar una actividad catalítica ATPasa que podría ser específicamente inhibida (Elkaim y cols., 2012).

# Capítulo 1

En muchos de los procesos celulares en los que participan, RuvBL1 y RuvBL2 funcionan conjuntamente formando complejo. Sin embargo, algunas de las funciones son ejercidas por las proteínas individuales, como durante la mitosis (Gartner y cols., 2003), e incluso en ciertos procesos presentan papeles antagónicos, como en la regulación del factor de transcripción KAI1 (Baek, 2008; Kim y cols., 2006). Por lo tanto, el mecanismo de actuación de estas proteínas debe estar altamente regulado de manera dependiente del contexto macromolecular en el que se encuentren, formando complejos RuvBL1-RuvBL2 dinámicos que posiblemente dependan de la interacción con otros cofactores.



**Figura 1.5: Diagrama esquemático de las funciones celulares ejercidas por las proteínas RuvBL1 y RuvBL2.** La participación de RuvBL1 y RuvBL2 en múltiples complejos macromoleculares de diversas funciones amplía el espectro de la implicación biológica de estas ATPasas desde procesos de remodelación de la cromatina, regulación transcripcional, reparación de daños en el DNA y ensamblaje de complejos ribonucleoproteicos como la telomerasa, entre otros.

### Estructura de RuvBL1 y RuvBL2

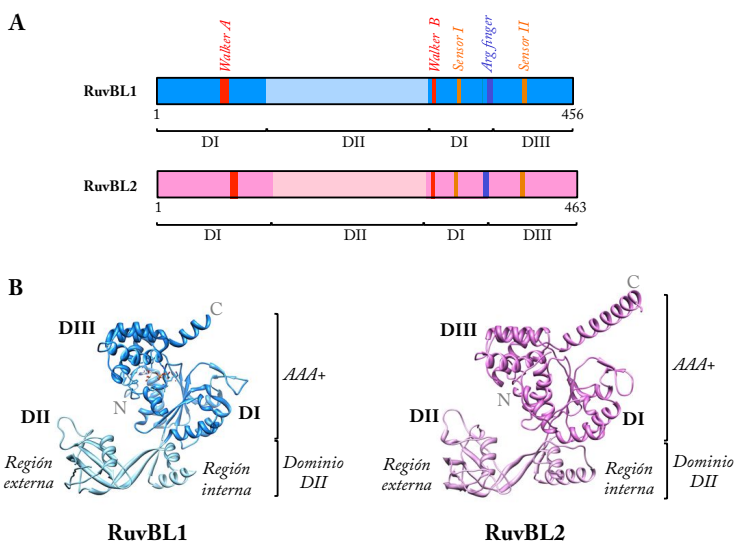
El monómero de RuvBL1 se organiza en 3 dominios: DI (residuos 1-120 y 296-365) y DIII (residuos 366-456) forman el núcleo catalítico ATPasa que además es responsable de la oligomerización; el dominio DII (residuos 121-295), exclusivo de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 dentro de la familia AAA+, aparece plegado como un dominio independiente que se conecta al módulo DI-DIII mediante una región flexible formada por 2 láminas  $\beta$  (Matias y cols., 2006) (Figura 1.6). Dentro del dominio DII se distinguen 2 regiones (interna y externa); la zona interna incluye 2  $\alpha$ -hélices y bucles, mientras que la externa presenta cierta similitud estructural con dominios de tipo *OB-fold* (*Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding fold*) implicados en la interacción con ácidos nucleicos.

La proteína RuvBL1 humana expresada de manera recombinante se ensambla como homohexámeros cuya estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Matias y cols., 2006) (Figura 1.7). En el anillo hexamérico de RuvBL1 los monómeros se acomodan formando un canal central, característica común en la familia AAA+ a la que pertenece (Figura 1.7). Por similitud con proteínas de la familia AAA+ con actividad helicasa, el canal central de RuvBL1 podría servir para la interacción con ácidos nucleicos, si bien sus dimensiones sólo permitirían albergar ácidos nucleicos de cadena sencilla. En experimentos *in vitro*, RuvBL1, así como su dominio DII aislado, interacciona con ácidos nucleicos de distinto tipo (ssDNA, dsDNA y ssRNA) (Matias y cols., 2006), por lo que esta interacción podría producirse a través de diferentes regiones de la proteína, incluyendo el canal central y los dominios DII; para RuvBL2 no hay datos publicados acerca de su capacidad de interaccionar con ácidos nucleicos. Recientemente ha sido descrita la estructura atómica de RuvBL2 sin la región *OB-fold* del dominio DII (residuos 131-241), la cual forma un hexámero similar al de RuvBL1 (Petukhov y cols., 2012) (Figura 1.7).

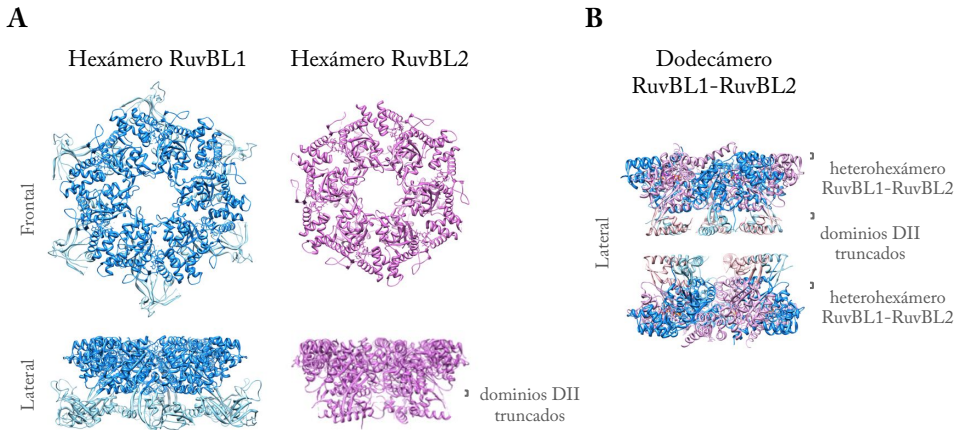
La estructura del complejo RuvBL1-RuvBL2 de humano con los dominios DII en su mayor parte truncados (residuos 127-233 en RuvBL1, y 134-237 en RuvBL2) (Gorynia y

## Capítulo 1

cols., 2011) mostró el ensamblaje de estas dos proteínas formando un oligómero dodecamérico en el que dos anillos heterohexaméricos interaccionan a través de los residuos aún presentes de los dominios DII. Las interacciones entre los dos anillos se producen a través de contactos entre un monómero de RuvBL1 en uno de los anillos y un monómero de RuvBL2 del otro anillo. La reconstrucción del complejo RuvBL1-RuvBL2 humano mediante microscopía electrónica difiere notablemente de la estructuras atómicas (Puri y cols., 2007); para explicar estas discrepancias se ha propuesto que RuvBL1 y RuvBL2 podrían formar diferentes tipos de complejos para llevar a cabo las distintas funciones celulares (Cheung y cols., 2010b; Niewiarowski y cols., 2010).



**Figura 1.6: Secuencia primaria y estructura terciaria de las proteínas humanas RuvBL1 y RuvBL2.** (A) Representación esquemática de la secuencia primaria de RuvBL1 (azul) y RuvBL2 (rosa). Los motivos catalíticos *Walker A* y *Walker B* (en rojo), *Sensores I* y *II* (naranja) y el residuo de arginina catalítico (*Arg finger*) (azul oscuro) se localizan en los dominios DI y DIII. El dominio DI presenta una inserción en su secuencia primaria que forma un dominio independiente, denominado DII. (B) Arquitectura del monómero de RuvBL1 (en azul, panel izquierdo) (Matias y cols., 2006) y RuvBL2 (rosa, panel derecho) (modelo atómico generado con el servidor *I-TASSER* (Roy y cols., 2010; Zhang, 2008)). Ambas proteínas presentan una organización muy similar.



**Figura 1.7: Estructuras atómicas de RuvBL1 y RuvBL2.** (A) Vistas frontales y laterales de los oligómeros hexaméricos formados por las proteínas RuvBL1 (en azul) (Matias y cols., 2006) y RuvBL2 (rosa) (sin la región *OB-fold* de los dominios DII, residuos 131-241) (Petukhov y cols., 2012). Los anillos homohexaméricos de RuvBL1 y RuvBL2 se organizan de manera similar a otras proteínas de la familia AAA+, dejando un canal central (de 17,7 Å de diámetro en el caso de RuvBL1). Las interacciones entre monómeros adyacentes generan las regiones catalíticas ATPasa proporcionadas por los dominios DI y DIII. Los dominios DII en RuvBL1 se organizan como módulos independientes proyectados hacia el exterior del núcleo hexamérico. (B) Vista lateral del complejo heterododecamérico formado por las proteínas RuvBL1 (azul) y RuvBL2 (rosa) con los dominios DII parcialmente truncados (residuos 127-233 en RuvBL1, y 134-237 en RuvBL2) (Gorynia y cols., 2011). Dos anillos heterohexaméricos de RuvBL1-RuvBL2 interactúan a través de residuos de los dominios DII. Los contactos entre los dos anillos son proporcionados por interacciones entre un monómero de RuvBL1 de uno de los hexámeros y un monómero de RuvBL2 del hexámero opuesto.

El estudio estructural de las proteínas humanas ha sido complementado con estructuras mediante microscopía electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2 de levadura. Los homólogos de levadura de RuvBL1 y RuvBL2 han sido descritos como anillos heterohexaméricos (Gribun y cols., 2008) y como dobles anillos dodecaméricos en los que la

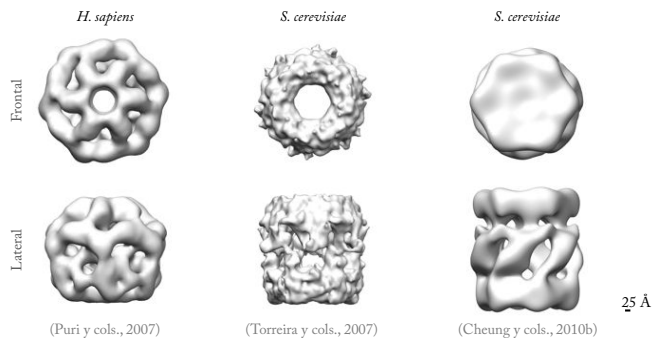
## Capítulo 1

---

superficie de contacto entre los dos anillos está proporcionada por los dominios DII (Cheung y cols., 2010b; Torreira y cols., 2008). Las dos estructuras del complejo dodecamérico de levadura, sin embargo, difieren significativamente. En la estructura de Torreira y cols. (Torreira y cols., 2008) los dominios DII están interconectados, mientras que el modelo de Cheung y cols. (Cheung y cols., 2010b) es más elongado, y presenta una distancia mayor entre los dos anillos.

Los experimentos de Cheung y cols. (Cheung y cols., 2010b) en el sistema RuvBL1 y RuvBL2 de levadura apoyaban la formación de un complejo heterohexamérico de las proteínas, y proponían que las formas dodecaméricas serían artefactos producidos por las colas de histidinas incluidas en las proteínas recombinantes (Cheung y cols., 2010b; Gribun y cols., 2008). Sin embargo, las proteínas humanas han sido descritas como complejos dodecaméricos en diversas condiciones experimentales (Gorynia y cols., 2011; Niewiarowski y cols., 2010; Puri y cols., 2007). La interacción entre ambas proteínas *in vitro* está afectada por las condiciones experimentales, tales como la expresión y purificación de las proteínas recombinantes, por lo que es difícil concluir qué complejo de los identificados *in vitro* representa un estado oligomérico *in vivo*. Además, las especies oligoméricas con relevancia fisiológica están influenciadas por su contexto celular en complejos macromoleculares de mayor tamaño, habiendo sido descrita una estequiometría 6:6:1 para RuvBL1 y RuvBL2 en el complejo remodelador de cromatina INO80 respecto al resto de subunidades (Jonsson y cols., 2004; Shen y cols., 2000); además, la estructura del complejo INO80 de levadura contiene el dodecámero de RuvBL1-RuvBL2 (Tosi y cols., 2013). Por otro lado, el complejo RuvBL1-RuvBL2 en el complejo R2TP sería un hexámero sencillo (Cheung y cols., 2010b), lo mismo que en la estructura del complejo SWR1 de levadura (Nguyen y cols., 2013). Por tanto, parece posible que tanto los hexámeros como los dobles anillos tengan un papel funcional en la célula, pudiendo depender su estado oligomérico del complejo macromolecular en el que estén presentes.

A pesar de la gran cantidad de estudios bioquímicos, celulares y estructurales entorno a RuvBL1 y RuvBL2, existen controversias en distintos ámbitos que no permiten entender el mecanismo de actuación de estas ATPasas en la célula. La primera duda acerca de la estructura de estas proteínas se refiere al papel de los complejos RuvBL1-RuvBL2 hexaméricos y dodecaméricos, su composición (homo- o heterooligomérica), y las posibles diferencias entre distintos organismos. Además, el mecanismo de activación de la actividad ATPasa de las proteínas, así como su capacidad helicasa y la manera en la que interaccionan con ácidos nucleicos son puntos en los que no hay información suficiente hasta la fecha. Es necesario comprender en qué contexto celular las proteínas presentan papeles individuales o conjuntos y porqué; elucidar el complejo mecanismo de acción de estas proteínas es imprescindible para poder interferir en los casos en los que su desregulación conlleva a procesos de transformación celular. Una comprensión estructural más completa de RuvBL1 y RuvBL2 proporcionará información para interpretar la función de los oligómeros que forman en cada uno de los contextos celulares en los que participan.



**Figura 1.8: Estructuras mediante microscopía electrónica del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 de humano y levadura.** Vistas frontales y laterales de los mapas de microscopía electrónica del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 humano (panel izquierdo) (Puri y cols., 2007), y de levadura (paneles central y derecho) (Cheung y cols., 2010b; Torreira y cols., 2008). Las diversas estructuras presentan diferencias notables. El complejo humano RuvBL1-RuvBL2 (Puri y cols., 2007) tiene una arquitectura diferente al complejo truncado (Gorynia y cols., 2011), mientras que las estructuras de levadura (paneles central y derecho) difieren en el tamaño a lo largo del eje longitudinal así como en el canal central. Barra de escala, 25 Å.

### 1.4. Yin Yang 1

La proteína Yin Yang 1 (YY1) (también denominada NF-E1 (*Nuclear Factor E1*),  $\delta$ , y UCRBP (*Upstream Control Region Binding Protein*)) es un factor de transcripción de la familia GLI-Krüppel cuya característica principal es una región carboxilo terminal formada por motivos de dedos de cinc (*zinc finger*). YY1 participa en la regulación transcripcional de diferentes procesos biológicos como replicación, diferenciación, proliferación, embriogénesis y desarrollo a través de su capacidad multifuncional de activar o reprimir la transcripción génica (Calame & Atchison, 2007; Gordon y cols., 2006; He & Casaccia-Bonofil, 2008; Jeon & Lee, 2011). Recientemente, YY1 ha sido descrita como subunidad del complejo remodelador de cromatina INO80, ejerciendo funciones no sólo de regulación transcripcional en este contexto, sino también en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Cai y cols., 2007; Wu y cols., 2007).

### Regulación transcripcional mediada por YY1

YY1 fue descubierto e identificado como un factor de transcripción que regulaba el promotor P5 del virus adenoasociado (AAV), dependiendo su funcionamiento de la oncoproteína viral E1A. Este promotor, que se encontraba silenciado en condiciones normales, era activado transcripcionalmente por E1A. La activación de la transcripción mediada por E1A requería de un elemento *cis*, el cual en ausencia de E1A mediaba la represión basal del promotor. A través de este elemento *cis* se purificó un polipéptido de 68 kDa, YY1, y el cDNA de la proteína fue posteriormente clonado (Shi y cols., 1991). Por tanto, ya desde su descubrimiento se apreció su funcionamiento dual en la regulación de la transcripción, actuando como activador o represor en función de su interacción con otras proteínas. Además, YY1 fue identificada como regulador transcripcional en otros dos estudios independientes, tanto como represor (Flanagan y cols., 1992; Park & Atchison, 1991) como activador (Hariharan y cols., 1991). Estudios posteriores identificaron numerosos genes (alrededor del 7 % de los genes de vertebrados) regulados por YY1.

La capacidad dual de esta proteína de activar o reprimir la transcripción reside en los cofactores que recluta a los promotores, muchos de los cuales son proteínas implicadas en la modificación de histonas o el DNA. Entre estos se encuentran p300, CBP (*CREB (Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding Protein) Binding Protein*), PCAF (*p300/CBP-Associated Factor*) y PRMT4 (*Protein arginine methyltransferase 4*), mientras que los correpresores incluyen HDACs (*Histone Deacetylases*), Ezh2 (*methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2*), Ezh1 (*methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 1*) y DNMTs (*DNA Methyl Transferases*) (Zhang y cols., 2011). El mecanismo por el que esta proteína es capaz tanto de activar como de reprimir la transcripción de ciertos genes ha sido explicado mediante diferentes modelos (Shi y cols., 1991; Thomas & Seto, 1999). En los procesos de represión transcripcional YY1 podría actuar siguiendo uno de los modelos propuestos: I) desplazamiento de activadores; II) interferencia con activadores, impidiendo su comunicación con la maquinaria general de transcripción; III) mediante el reclutamiento de correpresores, especialmente aquellos que afectan a la estructura de la cromatina (Galvin & Shi, 1997; Thomas & Seto, 1999). En el caso de la activación de la transcripción mediada por YY1 también se han propuesto distintos modelos de actuación: I) activación directa; II) inhibición de represores y/o desenmascaramiento de dominios de activación; III) reclutamiento de coactivadores (Galvin & Shi, 1997; Thomas & Seto, 1999).

Muchos de los genes regulados por YY1 están relacionados con procesos de transformación celular, y son muchos los estudios funcionales que han implicado el papel regulador de esta proteína con tumorigénesis (Gordon y cols., 2006; Zhang y cols., 2011). YY1 se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de tumores (Castellano y cols., 2009; Zaravinos & Spandidos, 2010), como cáncer de mama (Begon y cols., 2005), próstata (Seligson y cols., 2005), ovario (Matsumura y cols., 2009), osteosarcoma (de Nigris y cols., 2011) o hepatoblastoma (Powe y cols., 2009), entre otros. Sin embargo, la relación entre los niveles de YY1 y el pronóstico clínico varía entre los distintos tejidos debido al complejo papel regulador de esta proteína.

### Papel de YY1 en el mantenimiento de la estabilidad genómica

El papel que ejerce la proteína YY1 como factor de transcripción ha sido ampliamente estudiado, pero recientemente se han descrito funciones celulares diferentes para esta proteína. La participación de YY1 en el complejo remodelador de cromatina INO80 ha sido observada tanto en células de mamífero (Cai y cols., 2007; Wu y cols., 2007) como en levadura (Hogan y cols., 2010), ejerciendo a través de este complejo no sólo funciones de regulación transcripcional mediante un mecanismo potencialmente distinto a los modelos descritos hasta el momento (Cai y cols., 2007), sino además un efecto directo en procesos de reparación de daños en el DNA mediante recombinación homóloga (Wu y cols., 2007). La asociación entre YY1 e INO80 regula la accesibilidad de este complejo remodelador de cromatina a los genes regulados por YY1, actuando INO80 como un coactivador del factor de transcripción (Cai y cols., 2007). La pérdida de YY1 induce poliploidía y aberraciones cromosómicas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast*), lo cual sugirió a los autores la posible participación de la proteína en procesos de reparación de daños en el DNA (Wu y cols., 2007). La purificación de YY1 de células HeLa, así como experimentos de copurificación (*pull down*) demostraron la interacción de este factor de transcripción con componentes del remodelador de cromatina INO80 tanto *in vivo* como *in vitro* (Wu y cols., 2007). La interacción directa de YY1 se produce con los componentes Ino80 (subunidad catalítica del complejo INO80), Arp4 (Baf53 (*BRG1-associated factor 53*) en humanos), Arp5, Arp8,  $\beta$ -actina y las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2. También se ha descrito la capacidad de YY1 de interactuar con intermediarios de DNA implicados en procesos de recombinación (Wu y cols., 2007). Estos hechos, junto con la interacción de YY1 con RuvBL1 y RuvBL2, llevaron a Wu y cols. a sugerir la posibilidad de que YY1 pudiera actuar como un homólogo funcional de RuvA, que junto con RuvB (helicasa procariota respecto a la que presentan homología RuvBL1 y RuvBL2) y RuvC, llevan a cabo la resolución de estructuras *Holliday junction* en procesos de recombinación homóloga en procariotas (Shinagawa & Iwasaki, 1996; Tsaneva y cols., 1993; Yamada y cols., 2002). Además, un homólogo de YY1 en *Schizosaccharomyces pombe*, Iec1 (*INO Eighty Complex*

*subunit 1*), también interacciona con Ino80 y promueve el desalajo de los nucleosomas mediado por este remodelador de la cromatina (Hogan y cols., 2010).

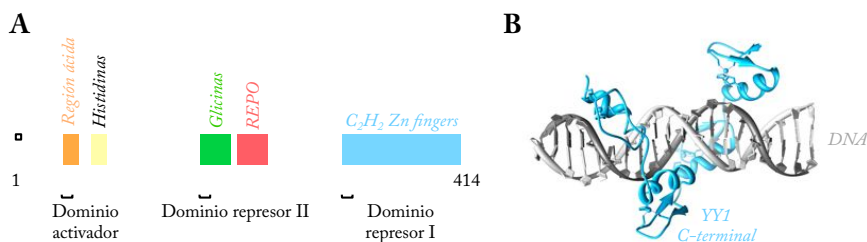
### Estructura de la proteína YY1

La proteína YY1 humana consta de 414 aminoácidos y tiene una masa molecular teórica de 44 kDa. Sin embargo, la proteína migra como una banda de unos 65-68 kDa en geles desnaturalizantes de poliacrilamida debido a su composición aminoacídica (Gordon y cols., 2006; Shi y cols., 1991). Esta proteína aparece altamente conservada en eucariotas, con una similitud superior al 98 % entre las proteínas humana y de ratón (Gordon y cols., 2006). Además, se han descrito ortólogos funcionales en *Schizosaccharomyces pombe* (Iec1) (Hogan y cols., 2010) y *Drosophila melanogaster* (PHO (*Pleiohomeotic*), y su duplicado PHOL (*Pho-like*)) (Brown y cols., 2003; Brown y cols., 1998). En mamíferos se han descrito dos homólogos de YY1, generados mediante eventos de retroposición, YY2 (*Yin Yang 2*) y REX1 (*Reduced Expression 1*), cuya afinidad y especificidad en la interacción con DNA han sufrido cierto grado de divergencia evolutiva para adaptarse a tejidos específicos, como la placenta (Kim y cols., 2007; Klar, 2011).

La secuencia primaria de YY1 contiene una región carboxilo terminal formada por 4 motivos de dedos de cinc de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (residuos 298-297), implicada en represión transcripcional y responsable del reconocimiento de la secuencia específica de DNA [5'(C/g/a)(G/t)(C/t/a)CATN(T/a)(T/g/c)3'], siendo los motivos CCAT y ACAT las secuencias consenso más frecuentes de interacción de YY1 (Golebiowski y cols., 2012) (Figura 1.9A). La estructura atómica de la región carboxilo terminal de YY1 (residuos 293-414) unida al promotor P5 del virus AAV demostró cómo los motivos de dedos de cinc interaccionan con el surco mayor de la doble hebra de DNA, existiendo contactos específicos entre las cadenas laterales de los residuos de la proteína con el ácido nucleico que justifican la especificidad de la interacción (Houbaviy y cols., 1996) (Figura 1.9B). El extremo amino terminal de la proteína está implicado en activación transcripcional, formado por una zona

## Capítulo 1

rica en aminoácidos ácidos (residuos 43-53) y glicinas, seguida de una región con un porcentaje elevado de histidinas (residuos 70-80). La región central (aminoácidos 154-201) incluye una zona rica en glicinas y alaninas con actividad represora de la transcripción, así como un dominio REPO (*Recruitment of Polycomb*) (residuos 201-226) (Wilkinson y cols., 2006). REPO está implicado en el reclutamiento e interacción con proteínas del grupo *Polycomb* (PcG) y actúa en la represión transcripcional mediada por estas proteínas (Wilkinson y cols., 2010) (Figura 1.9A). Los motivos localizados en las posiciones 176-182 (GGKKSGK) y 189-195 (GAGAAG), dentro del dominio represor rico en glicinas, concuerdan con las secuencias consenso GxxxxGK y GxGxxG, respectivamente. El primero se encuentra en proteínas de interacción con mononucleótidos, incluidas ATPasas, y el segundo motivo se corresponde con la secuencia consenso de interacción con dinucleótidos de algunas quinasas. Sin embargo, hasta el momento no se han detectado estas actividades para la proteína YY1, y se desconoce el papel que juegan dentro del dominio represor.



**Figura 1.9: Organización estructural de la proteína YY1.** (A) Esquema de la secuencia primaria de la proteína humana YY1. La región carboxilo terminal contienen cuatro motivos  $C_2H_2$  dedos de cinc (en azul) responsables de la interacción con el DNA, y que conforman el dominio represor I. La zona central está formada por una región rica en residuos de glicina (verde) y por el dominio REPO (rojo) implicado en reclutamiento de proteínas *Polycomb*, y conforman el dominio represor II. En la región amino terminal reside el dominio activador, y contiene una región rica en aminoácidos ácidos (naranja) y otra región con 11 residuos consecutivos de histidinas (amarillo). (B) Estructura atómica del dominio carboxilo terminal de YY1 unido al promotor P5 del virus AAV (PDB 1UBD; Houbaviy y cols., 1996). Los 4 dominios de dedos de cinc (azul) interactúan con el surco mayor del DNA a través de contactos con las bases de manera específica de secuencia.

En este trabajo se ha abordado el estudio tanto bioquímico como estructural de la proteína YY1 humana para comprender el mecanismo a través del cual este factor de transcripción es capaz de regular la respuesta a daños en el DNA en el contexto del remodelador de cromatina INO80.

### 1.5. Microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de macromoléculas

La microscopía electrónica de transmisión es a día de hoy una de las técnicas más potentes para la determinación de la estructura de proteínas, alcanzando en muchos casos resultados comparables a los obtenidos mediante otras técnicas como la cristalografía de rayos X. El gran avance tecnológico en el desarrollo de los microscopios electrónicos y en los sistemas de detección, así como en los algoritmos y paquetes informáticos para procesar las imágenes de microscopía electrónica, hace posible en determinados casos alcanzar resolución cercana a la atómica. Como ventajas de esta técnica frente a la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear están los menores requerimientos en la cantidad y concentración de la muestra, la ilimitación en el tamaño del espécimen de estudio, y la posibilidad de poder estudiar muestras heterogéneas.

La idea principal en el procesamiento digital de imágenes de microscopía electrónica de proteínas es que estas imágenes corresponden a proyecciones bidimensionales de las moléculas, producidas por la incisión del haz de electrones. Estas imágenes recogen en dos dimensiones toda la información tridimensional de la molécula, por lo que combinando todas estas proyecciones de manera adecuada se puede reconstruir la estructura original. El vacío existente en el interior de la columna del microscopio electrónico, así como el daño producido por la radiación de electrones, hace necesaria la protección de la muestra biológica. Para ello los especímenes se preparan de distintas maneras: mediante vitrificación (criomicroscopía) (Dubochet y cols., 1988), tinción negativa (Ohi y cols., 2004), o

## Capítulo 1

---

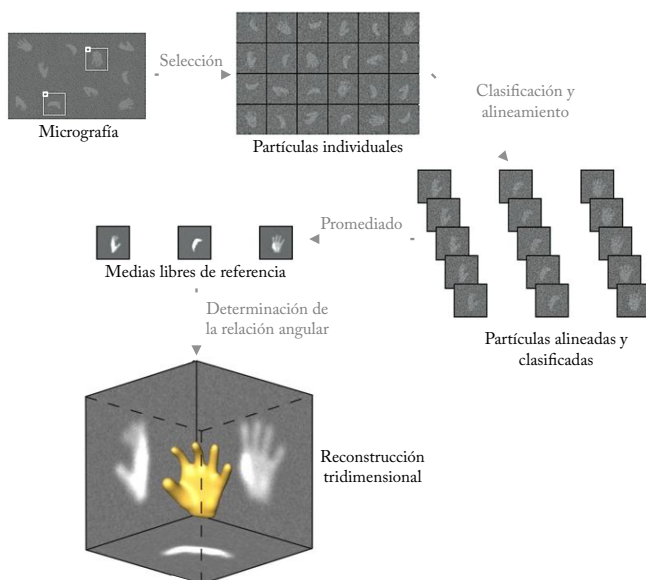
criotinción negativa (Adrian y cols., 1998). En la criomicroscopía electrónica la muestra se observa en su propio tampón vitrificada a temperaturas de nitrógeno líquido (aproximadamente  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), por lo que la molécula se encuentra en su estado nativo. Sin embargo, esta técnica ofrece muy poco contraste en las imágenes obtenidas, por lo que requiere que la molécula tenga una masa molecular a partir de unos 500 kDa. Con esta técnica es posible alcanzar, en los casos más favorables, resoluciones de hasta 3.5-4 Å (Zhang y cols., 2013). La tinción negativa consiste en el recubrimiento de las moléculas con sales de metales pesados, lo cual ofrece un mayor contraste y permite estudiar muestras de menor tamaño. La desventaja de esta técnica es que no se observa directamente la molécula, sino la capa de agente de tinción que la recubre, por lo que el tamaño del grano de este agente limita la resolución que se puede alcanzar. La criotinción negativa es una variante en la que la muestra es vitrificada en un tampón que contiene un agente de tinción, de manera que se consigue aumentar el contraste de las imágenes a la vez que se preserva la estructura nativa de la molécula, aunque la resolución que permite alcanzar esta técnica suele ser similar a la de la tinción negativa.

Una vez preparada, la muestra es observada al microscopio electrónico y se toman imágenes siguiendo normalmente un protocolo de mínima dosis de electrones para minimizar el daño de las moléculas, preservando así la mayor información estructural posible. Esto, sin embargo, hace que las imágenes presenten una relación señal-ruido muy baja. Se parte de la base de que las moléculas biológicas se disponen en el soporte de manera aleatoria, de forma que cada molécula individual va a adherirse con una determinada orientación. Las imágenes correspondientes a moléculas individuales son seleccionadas, alineadas y clasificadas; suelen ser necesarias miles de partículas individuales para poder promediar aquellas que corresponden a una misma orientación de la molécula. Este promediado de los datos aumenta la relación señal-ruido de las imágenes, y generalmente se realiza sin utilizar información estructural de la molécula (medias libres de referencia).

El siguiente paso es la determinación de la orientación de cada una de las partículas para reconstruir la estructura tridimensional de la que provienen. Es necesario encontrar la relación angular correcta de cada una de las imágenes, para lo cual es necesario que las moléculas se dispongan en todas las orientaciones posibles para cubrir la totalidad de la superficie angular en el espacio. La asignación de los ángulos de orientación (denominados ángulos de Euler) puede llevarse a cabo a través de distintas estrategias, aunque todas ellas necesitan un modelo inicial como partida. El modelo inicial es refinado en un proceso iterativo que mejora en cada paso la asignación de los ángulos de Euler, hasta converger en una estructura coherente con los datos experimentales (Figura 1.10). La estructura final debe ser verificada e interpretada, proceso que dependerá de la información estructural de la molécula de que se disponga. La existencia de estructuras atómicas de la molécula completa o de dominios aislados puede ser de ayuda para interpretar el mapa de microscopía electrónica obtenido.

**Figura 1.10: Esquema del procesamiento digital de imágenes de microscopía electrónica.**

Se ha empleado un mapa artificial con forma de mano para ilustrar el proceso. Las partículas individuales son extraídas de las micrografías, alineadas, clasificadas y promediadas para aumentar su relación señal/ruido. El volumen tridimensional se obtiene tras determinar la relación angular de las partículas. Imagen cedida por el Dr. Ernesto Arias-Palomo.





# Objetivos



## Capítulo 2

### Objetivos

El conocimiento de la estructura de cualquier macromolécula resulta imprescindible para comprender sus mecanismos moleculares de acción. La caracterización estructural de las subunidades que forman un determinado complejo macromolecular resulta útil en aquellos casos en los que el abordaje del ensamblado completo es experimentalmente complicado. En esta tesis hemos llevado a cabo estudios estructurales y bioquímicos de diferentes subunidades del complejo remodelador de cromatina INO80, implicado en la regulación de la transcripción y la reparación de daños en el DNA, para avanzar en el conocimiento de las bases estructurales y moleculares que determinan sus funciones. Para ello se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Expresar y purificar las proteínas humanas RuvBL1 y RuvBL2, caracterizar el estado de oligomerización del complejo formado por ambas y reconstruir su estructura 3D.
2. Avanzar en la determinación de las bases moleculares y estructurales a través de las cuales el complejo RuvBL1-RuvBL2 regula la biogénesis, maduración y remodelación de grandes ensamblados macromoleculares, y proponer posibles modelos de funcionamiento.
3. Expresar, purificar y caracterizar estructuralmente el factor de transcripción YY1 y sus propiedades de interacción con ácidos nucleicos.
4. Estudiar el papel de YY1 en procesos de recombinación homóloga *in vivo*, y caracterizar la influencia de las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2 en este proceso en el contexto del remodelador de cromatina INO80.



## **Materiales y métodos**



## Capítulo 3

### Materiales y métodos

#### 3.1. Herramientas bioinformáticas

##### Búsqueda de similitud, alineamiento de secuencias y determinación de parámetros proteicos

Las secuencias de DNA y proteína se obtuvieron de la base de datos *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para la búsqueda de similitud de las secuencias se utilizó el servidor *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y el alineamiento de múltiples secuencias de ácidos nucleicos y proteínas se realizó con la herramienta *ClustalW2* ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)). Los parámetros físicos y químicos teóricos de las proteínas recombinantes (masa molecular, punto isoelectrico y coeficiente de extinción molar) se calcularon con la aplicación *ProtParam* del servidor de proteómica *Expasy* (<http://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger, 2006).

##### Predicción de elementos de estructura secundaria y terciaria de proteínas

En los casos en los que la información estructural de la proteína era limitada se realizó una predicción de los elementos de estructura secundaria utilizando el servidor *Phyre* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>; Kelley & Sternberg, 2009). Además, se llevó a cabo la predicción de estructura terciaria de la proteína utilizando los servidores *ROBETTA* (<http://robetta.bakerlab.org>; Kim y cols., 2004) y *I-TASSER*

## Capítulo 3

---

(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; Roy y cols., 2010; Zhang, 2008), y de elementos de estructura terciaria potencialmente desordenados con el servidor *PONDR* (*Prediction Of Naturally Disordered Regions*; <http://www.pondr.com>; Romero y cols., 2001).

### 3.2. Análisis bioquímico de proteínas

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes: El análisis de las proteínas se realizó mediante su separación en geles de poliacrilamida de los porcentajes adecuados en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie, plata, cinc o agentes comerciales (*SimplyBlue SafeStain* (Invitrogen), *Oriole Fluorescent Gel Stain* (Bio-Rad)).

Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (*Blue Native PAGE*): La electroforesis en condiciones nativas *Blue Native PAGE* (Schagger & von Jagow, 1991) se realizó utilizando geles con un porcentaje de poliacrilamida en gradiente del 3-12 % (*NativePAGE 3-12 % Bis-Tris gel 1,0 mm, Novex*). Se utilizaron como tampones para el ánodo y el cátodo los recomendados por el fabricante (tampón ánodo 1X: 50 mM BisTris, 50 mM Tricina; tampón cátodo 1X: 50 mM BisTris, 50 mM Tricina, 0,002 % (p/v) azul de Coomassie G-250). A las muestras de proteína se les añadió tampón de carga (*NativePAGE Sample Buffer 4X* (Invitrogen): 200 mM BisTris, 6 N HCl, 200 mM NaCl, 40 % (v/v) glicerol, 0,004 % Ponceau S, pH 7,2), se cargaron en los geles y se realizó la electroforesis a un amperaje constante de 0,10 A y a 4 °C. Tras la electroforesis los geles se destiñeron durante 15 min con una solución 40 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ácido acético seguida de una solución 8 % (v/v) ácido acético.

Detección mediante anticuerpos específicos (*western blot*): La detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (Tabla 3.1) se realizó mediante la transferencia de los geles de poliacrilamida a membranas de PVDF. La membrana se incubó en solución de bloqueo (PBS 1X, 3 % (p/v) BSA) durante 30 min a temperatura ambiente, seguida de

incubación con una disolución del anticuerpo adecuado en tampón PBS 1X, 0,1 % (p/v) BSA durante 1 h. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante 3 lavados de 20 min en solución PBS 1X, 25 % (v/v) Tween 20. Tras secar la membrana, se incubó con solución de revelado (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se visualizó en un equipo *Fujifilm Fluorescent Image Analyzer FLA-3000* o mediante autorradiografía.

Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
<i>anti-polibistidinas-HRP (clon HIS-1)</i>	1:5000	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>anti-YY1 (H-414)</i> <sup>(1)</sup>	1:400	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
<i>anti-IgG ratón-HRP</i> <sup>(2)</sup>	1:3000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

Tabla 3.1: Anticuerpos empleados en la detección de proteínas recombinantes mediante ensayos de *western blot* (*HRP, horseradish peroxidase*)<sup>(1)</sup>, anticuerpo primario; <sup>(2)</sup>, anticuerpo secundario).

### 3.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Los cDNAs de las proteínas de estudio fueron clonados en plásmidos que permitieron su expresión recombinante en bacteria. Para las diferentes construcciones realizadas, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del cDNA de las proteínas completas o de dominios independientes mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando un sistema comercial (*Expand Long Template PCR System, Roche*), incluyendo diferentes secuencias de corte de enzimas de restricción para la posterior inserción del fragmento amplificado en el plásmido. Para las construcciones indicadas, diferentes secuencias peptídicas (etiqueta o *tag*) se incluyeron en la secuencia de la proteína para facilitar su posterior purificación como proteínas de fusión, así como dianas para proteasas específicas para eliminar dichas etiquetas. Tras digestión con las correspondientes enzimas de restricción se realizó la inserción del fragmento en el plásmido

## Capítulo 3

---

digerido con las mismas enzimas de restricción utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (*Roche*).

Las construcciones de DNA fueron transformadas en distintas cepas de expresión de *E. coli*, y se optimizaron las condiciones de expresión para favorecer la producción de proteína en forma soluble. De manera general, las bacterias se seleccionaron mediante su cultivo en placas Petri con medio LB agar conteniendo el antibiótico adecuado a 37 °C durante 20 horas. Las colonias obtenidas en placa se utilizaron para inocular medio LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado (Tabla 3.2) y se incubaron a 37 °C durante 20 horas en un incubador de agitación orbital a 230 rpm. Los cultivos saturados (preinóculos) fueron utilizados para inocular medio LB fresco (suplementado con el antibiótico adecuado) a una D.O.<sub>600nm</sub> = 0,15. Tras la incubación de los cultivos a 37 °C con agitación de 230 rpm hasta una D.O.<sub>600nm</sub> = 0,5-0,6, el medio se suplementó con la cantidad adecuada de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) para inducir la expresión de las proteínas recombinantes a una temperatura concreta durante un tiempo de entre 3 y 4 horas. Las células inducidas se recogieron mediante centrifugación (7500 rpm durante 10 min a 4 °C). El precipitado de células fue resuspendido en el tampón de lisis adecuado suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche*), congelado en nieve carbónica y almacenado a -80 °C.

Antibiótico	Concentración final	Disolvente
Ampicilina	100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Agua
Kanamicina	25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Agua
Estreptomicina	50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Agua
Cloranfenicol	35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Etanol

Tabla 3.2: Disoluciones y concentraciones de los antibióticos empleados en el cultivo y selección de bacterias *E. coli*.

Para la purificación de las proteínas, las células inducidas (procedentes de 1 L de cultivo) y resuspendidas en 20 ml de tampón de lisis fueron descongeladas y lisadas mediante sonicación en ciclos de 10 s al 20 % de potencia seguido de 10 s en hielo durante 2 minutos utilizando un sonicador *Branson Sonifier 450 Cell Disruptor*. El lisado celular fue sometido a centrifugación (37000 rpm durante 1 hora a 4 °C) para separar los restos celulares (precipitado) de la fracción de proteínas solubles (sobrenadante). Los extractos solubles se filtraron utilizando un filtro de 2 µm (*Minisart, Sartorius Stedim Biotech*) antes de ser cargados en los sistemas cromatográficos de purificación de proteínas. Las proteínas purificadas fueron alicuoteadas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C. Las distintas etapas del proceso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de proteínas mediante el método adecuado y ensayos de *western blot* con anticuerpos específicos.

### Expresión y purificación de las proteínas RuvBL1, RuvBL2 y sus dominios DII aislados

Los cDNAs de las proteínas RuvBL1 (NM\_003707) y RuvBL2 (NM\_006666) humanas fueron cedidos por el Dr. Michael D. Cole (*Norris Cotton Cancer Center, Dartmouth Hitchcock Medical Center, República Libanesa*), y el cDNA de la proteína YY1 humana (NM\_003403) fue adquirido en *ImaGenes Bio*.

Los cDNAs de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 fueron clonados de manera independiente para su posterior expresión. En el caso de RuvBL1, se incluyó una cola de ocho histidinas o el péptido Strep-II-tag (secuencia WSHPQFEK) en el extremo amino terminal. En RuvBL2 se incorporó una cola de ocho histidinas amino terminal y una construcción en su forma salvaje. Para la caracterización de las interacciones intermoleculares de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2, se clonaron las secuencias de cDNA de los dominios DII aislados de ambas proteínas (DII-RuvBL1, residuos 119-298; DII-RuvBL2, residuos 127-295) incluyendo una cola de ocho histidinas en el extremo amino terminal.

## Capítulo 3

---

En todos los casos en los que se utilizó una etiqueta se incluyó detrás de esta una secuencia de digestión para las proteasas TEV (*Tobacco Etch Virus*) (secuencia de corte ENLYFQ) o HRV 3C (*Human Rhinovirus 3C*) (secuencia LEVLFQGP) para poder eliminar dicha etiqueta. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la secuencia codificante de las proteínas y los plásmidos en los que se insertaron dichas secuencias aparecen reflejados en la Tabla 3.3.

La expresión de las proteínas recombinantes se realizó en las condiciones indicadas en la Tabla 3.4. En todos los casos se utilizó como tampón de lisis 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,1 % (v/v) N-P40 suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche*), y el precipitado de células inducidas se resuspendió en tampón de lisis (1L cultivo/20 ml).

Para la purificación de His-RuvBL1, el precipitado de células resuspendidas en tampón de lisis se cargó en una columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* de 1 ml equilibrada en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 20 mM imidazol. La elución se realizó mediante un gradiente de concentración creciente de imidazol de 12 ml (20-500 mM) utilizando tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 500 mM imidazol. Tras el análisis de las fracciones mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, aquellas que contenían la proteína His-RuvBL1 se juntaron y dializaron en tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) glicerol a 4 °C durante 20 h utilizando un sistemas de membranas de diálisis de 3,5 kDa de tamaño de poro (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 3,5 MWCO, Thermo Scientific*). La proteína His-RuvBL1 dializada fue finalmente concentrada (*Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel – 3000 MWCO, Millipore*).

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Plásmido	Construcción
his_ruvbl1_dir	AGTTCTGACATATGAAGATTGAGGA GGTGAAGAGCAC	pETEV15b	His-RuvBL1
his_ruvbl1_rev	ATCAACCTCTCGAGTTATCACTTCAT GTACTTATCCTGCTG		
strep_ruvbl1_dir	AGTTCTGACATATGTGGAGCCATCC GCAGTTTGAAAAAGCAGCGGCGA GAATCTTTATTTTCAGGGCGCAATG AAGATTGAGGAGGTGAAGAGCAC	pET29a	Strep-II-RuvBL1
strep_ruvbl1_rev	ATCAACCTCTCGAGTTATCACTTCAT GTACTTATCCTGCTGGTCAGCCAGG ATTTTGCGGAGGACTTGGCATCAT AGAAAAGTTCACT		
his_ruvbl2_dir	ACTTAGAAGGTACCATGGGCAGCAG CCATCATCATCATCACCACCACA GCAGCGGCGAGAATCTTTATTTTCA GGGCGCAATGGCAACCGTTACAGCC	pETEV15b	His-RuvBL2
his_ruvbl2_rev	TCAACTAGTTAATTAATTATCAGGAG GTGTCCATGGTCT		
wt_ruvbl2_dir	ACTTAGAAGGTACCATGGCAACCGT TACAGCC	pCDFDuet-1	RuvBL2
wt_ruvbl2_rev	TCAACTAGTTAATTAATTATCAGGAG GTGTCCATGGTCT		
his_dii_ruvbl1_dir	AATCTGGACATATGGGCAGCAGCCA TCATCATCATCACCACCACAGCA GCGGCGAGAATCTTTATTTTCAGGG CGCAATGCCATGGGGCTGC	pCDFDuet-1	His-DII-RuvBL1
his_dii_ruvbl1_rev	ATGCCAATCTCGAGTTATCAACCCG GGACCAGCTCAG		
his_dii_ruvbl2_dir	AACTGGACCCATGGGCAGCAGCCAT CATCATCATCACCACCACAGCAG CGGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGC GCAATGATCGGCGTTCGCATCAA	pRSFDuet-1	His-DII-RuvBL2
his_dii_ruvbl2_rev	ACCGATGTGCGACTTATCATCCAGG GATCTCCGCCT		

Tabla 3.3: Oligonucleótidos para la clonación de los cDNAs de las proteínas RuvBL1, RuvBL2 y sus dominios DII aislados. El plásmido pTEV15b (Dr. J. M. Pereda, *CIC, Salamanca*), generado a partir de pET15b (*Novagen*), incluye una cola de ocho histidinas y sitio de corte para la proteasa TEV.

## Capítulo 3

La proteína His-RuvBL2 se purificó utilizando el mismo protocolo que en el caso de His-RuvBL1, pero se incorporó una etapa de eliminación de la cola de histidinas mediante digestión con proteasa TEV (relación molar 1:1000) durante su diálisis en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA a 4 °C durante 20 h. Tras la digestión, la proteína RuvBL2 fue cargada en una columna *HisTrap HP* (GE Healthcare) de 1 ml y se realizó la cromatografía en las mismas condiciones que para His-RuvBL1. En este caso se recogió la fracción de proteínas no retenidas en la columna donde eluía la proteína RuvBL2.

Proteína	Cepa <i>E. coli</i>	[IPTG] (mM)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
His-RuvBL1	BL21 (DE3)	0,10	28	3
Strep-II-RuvBL1	BL21 (DE3)	0,10	28	3
His-RuvBL2	BL21 (DE3)	0,10	28	4
His-DII-RuvBL1	BL21 (DE3)	0,50	37	3
His-DII-RuvBL2	BL21 Rosseta (DE3)	0,05	37	3

Tabla 3.4: Condiciones optimizadas de expresión de las proteínas recombinantes RuvBL1, RuvBL2, DII-RuvBL1 y DII-RuvBL2 en *E. coli*.

La purificación de la proteína Strep-II-RuvBL1 se realizó mediante una cromatografía de afinidad usando una columna *StrepTrap HP* (GE Healthcare) de 1 ml equilibrada en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl. La elución de las proteínas unidas a la resina se realizó con el mismo tampón de equilibrado conteniendo 2,5 mM D-destiobiotina.

La purificación del dominio DII-RuvBL1 se realizó mediante la inyección del extracto soluble de células inducidas (1 L de cultivo resuspendido en 20 ml de tampón de lisis) en una columna *HisTrap HP* (GE Healthcare) de 1 ml equilibrada en tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) glicerol, 50 mM imidazol. La elución de la

proteína se realizó mediante un gradiente de 12 ml de concentración creciente de imidazol (50-500 mM) utilizando tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) glicerol, 500 mM imidazol. Las fracciones enriquecidas en la proteína His-DII-RuvBL1 se juntaron y dializaron en tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol conteniendo proteasa TEV (relación molar 1:1000) a 4 °C durante 20 h para la eliminación de la cola de histidinas. Posteriormente se cargó la muestra en la columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* de 1 ml y se realizó la cromatografía de afinidad en las mismas condiciones antes descritas, recogiendo la proteína DII-RuvBL1 en la fracción de proteínas no retenidas en la columna. El dominio DII-RuvBL2 se purificó en las mismas condiciones que en el caso de DII-RuvBL1.

En otra serie de experimentos, los plásmidos conteniendo los cDNAs de las proteínas His-RuvBL1 y RuvBL2 fueron utilizados para cotransformar células *E. coli* BL21 (DE3). Las células que contenían ambos plásmidos fueron seleccionadas mediante su cultivo en placas de LB agar suplementadas con ampicilina y estreptomina aprovechando la resistencia a distintos antibióticos que confería cada plásmido. La expresión del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 fue inducida mediante la adición de 0,1 mM IPTG (concentración final) a 28 °C durante 3 h. Las células inducidas (1 L de cultivo) fueron recolectadas mediante centrifugación, y se resuspendieron en tampón de lisis (20 ml) 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,1 % (v/v) N-P40 suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche*). La purificación del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 se realizó siguiendo el mismo protocolo que en el caso de His-RuvBL1. En los experimentos indicados, se eliminó la cola de histidinas de la proteína His-RuvBL1 mediante digestión con la proteasa TEV siguiendo el protocolo descrito para RuvBL2. Siguiendo este mismo protocolo, se coexpresaron las proteínas Strep-II-RuvBL1 y RuvBL2 en células *E. coli* BL21 (DE3) para favorecer el ensamblaje *in vivo* del complejo. El complejo Strep-II-RuvBL1-RuvBL2 se purificó siguiendo el esquema descrito para el caso de la proteína Strep-II-RuvBL1.

### Expresión y purificación de YY1

El cDNA de proteína YY1 humana fue clonado incluyendo una cola de histidinas o la secuencia Strep-II-tag en el extremo amino terminal. Para la eliminación de la etiqueta en las construcciones His-YY1 y Strep-II-YY1 se introdujeron secuencias de corte para las proteasas HRV 3C y TEV, respectivamente. Adicionalmente, se diseñó una construcción para la expresión de YY1 como proteína de fusión con GST (His-GST-YY1). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA de la proteína y los vectores en los que se clonó aparecen reflejados en la Tabla 3.5.

Las proteínas recombinantes se expresaron en las condiciones indicadas en la Tabla 3.6. En todos los casos, en el momento de la inducción se suplementó el medio LB con 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> (concentración final). Los precipitados de 1 L de cultivo células inducidas se resuspendieron en 20 ml del correspondiente tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche*).

La proteína His-YY1 fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando una columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* de 1 ml equilibrada en tampón 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol. La elución se realizó mediante un gradiente de 12 ml de concentración creciente de imidazol (50-500 mM) usando tampón 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, y las fracciones que contenían His-YY1 se juntaron y fueron dializadas en tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl a 4 °C durante 20 h. Tras la diálisis la muestra se cargó en un columna *Mini S 3.2/3 (GE Healthcare)* equilibrada en el mismo tampón de diálisis, y la elución se llevó a cabo usando un gradiente de 20 ml de concentración creciente de NaCl (0,1-1 M) con tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 M NaCl. Las fracciones de proteína His-YY1 purificada se juntaron y dializaron en tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol a 4 °C durante 20 h.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Plásmido	Construcción
his_yy1_dir	TCCAGTCCATGGCCTCGGGCGACA	pRAT4	His-YY1
his_yy1_rev	TTACTAGTGGATCCTTATCACTGG TTGTTTTTTGGCCT		
strep_yy1_dir	AGTTCTGACATATGTGGAGCCATC CGCAGTTTGAAAAAAGCAGCGGC GAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCA ATGGCCTCGGGCGACACCCTCTAC AT	pET-21b	Strep-II-YY1
	strep_yy1_rev		
gst_yy1_dir	ATTCGACTCCATGGCCTCGGGCGA C	pETM-33	His-GST-YY1
gst_yy1_rev	ATCAACCTCTCGAGTTATTACTACT GGTTGTTTTTTGGCCT		

Tabla 3.5: Oligonucleótidos para la clonación del cDNA de la proteína YY1 (*Sigma-Aldrich*). Se indican los vectores (pRAT4, (Peranen y cols., 1996); pET-21b (*Novagen*); pETM-33 (*EMBL-AG*)) en los que se insertaron los cDNA de las proteínas y los nombres de las construcciones generadas.

En el caso de la proteína Strep-II-YY1 la purificación se realizó en único paso de cromatografía de afinidad utilizando una columna *StrepTrap HP (GE Healthcare)* de 1 ml equilibrada en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, y la elución de las proteínas unidas a la resina se realizó con 2,5 mM D-destiobiotina en el mismo tampón de equilibrado. Las fracciones de proteína Strep-II-YY1 purificada se juntaron y dializaron en tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol a 4 °C durante 20 h.

## Capítulo 3

Proteína	Cepa <i>E. coli</i>	[IPTG] (mM)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Tampón de lisis
His-YY1	BL21	0,50	37	3	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>
	Origami (DE3)				
Strep-II-YY1	BL21	0,50	28	4	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 2 mM DTT, 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>
	(DE3)				
His-GST-YY1	BL21 (DE3)	0,50	28	4	PBS 1X pH 7,5, 2 mM DTT, 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>

Tabla 3.6: Condiciones optimizadas de expresión de las proteínas recombinantes His-YY1, Strep-II-YY1 y His-GST-YY1 en *E. coli*.

La proteína His-GST-YY1 fue purificada mediante la incubación del extracto soluble de células inducidas con 1 ml de resina *Glutathione Sepharose 4B* (*Amersham Biosciences*) equilibrada en tampón PBS 1X pH 7,5, 2 mM DTT durante 2 h 30 min a temperatura ambiente con agitación. Tras 3 lavados en el mismo tampón de equilibrado, la proteína se eluyó mediante la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tritón X-100, 15 mM L-glutación reducido. Adicionalmente, la proteína His-GST-YY1 se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna *HisTrap HP* (*GE Healthcare*) de 1 ml aprovechando la cola de histidinas incluida delante de la proteína de fusión GST, para lo cual se utilizaron las condiciones descritas para la purificación de His-YY1.

### 3.4. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó para la purificación y caracterización oligomérica de las proteínas His-RuvBL1, His-RuvBL2, His-RuvBL1-RuvBL2, RuvBL1-RuvBL2, Strep-II-RuvBL1-RuvBL2, His-YY1 y Strep-II-YY1. La columna utilizada en cada caso aparece reflejada en la Tabla 3.7, así como el tampón de equilibrado de la columna. Los experimentos se realizaron siguiendo un protocolo adecuado de flujo, composición del tampón y volumen de muestra inyectada, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.5. Experimentos de interacción del complejo RuvBL1-RuvBL2 con nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos

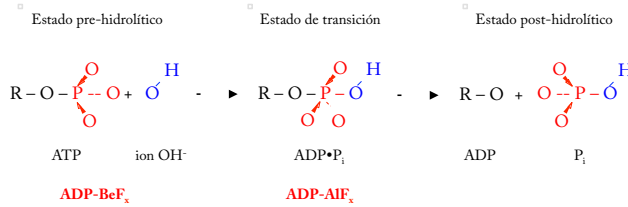
Se estudió el efecto de los nucleótidos en la conformación del complejo RuvBL1-RuvBL2 mediante la incubación de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular enriquecidas en especies dodecaméricas (concentración de proteína de 0,01 mg/ml) con distintos nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos (Figura 3.1). En una serie de experimentos se incubaron 5  $\mu$ g de proteína con 2 mM ADP (estado posthidrolítico) en el tampón de la cromatografía de exclusión molecular (apartado 3.4) suplementado con 2 mM  $MgCl_2$  (concentración final) a 30 °C durante 1 h. Como control se realizó el mismo experimento sin ADP. En otra serie de experimentos se utilizaron análogos no hidrolizables de ATP que mimetizaban diferentes estados del proceso de hidrólisis. Los análogos de nucleótidos se prepararon mediante la incubación de 1 mM ADP con 30 mM NaF y 5 mM  $BeCl_3$  en tampón de reacción suplementado con 5 mM  $MgCl_2$  (ADP-BeFx, estado prehidrolítico) o 1 mM ADP con 30 mM NaF y 5 mM  $AlCl_3$  (ADP-AlFx, estado de transición) durante 10 min a 30 °C; tras este tiempo se añadieron 5  $\mu$ g de proteína a cada reacción y se incubó durante 1 h a 30 °C. Las mezclas de reacción fueron utilizadas para obtener imágenes de microscopía electrónica, de las que se seleccionaron, clasificaron y

## Capítulo 3

alinearon partículas individuales. Se obtuvieron medias 2D libres de patrón en cada una de las condiciones utilizando el comando *CL2D* (*XMIPP* (Scheres y cols., 2008)).

Proteína	Columna	Tampón
His-RuvBL1	<i>BioSep-SEC-S4000</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
His-RuvBL2	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
DII-RuvBL1	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
DII-RuvBL2	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
His-RuvBL1-RuvBL2	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
RuvBL1-RuvBL2	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
Strep-II-RuvBL1-RuvBL2	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol
His-YY1	<i>BioSep-SEC-S4000</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>
Strep-II-YY1	<i>Superdex 200 PC 3.2/30</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>

**Tabla 3.7:** Condiciones experimentales de la cromatografía de exclusión molecular de las distintas proteínas de estudio. Se indican el tampón de equilibrado, así como la columna utilizada (*Superdex 200 PC 3.2/30* (GE Healthcare) o *BioSep-SEC-S4000* (Phenomenex)).



**Figura 3.1: Representación esquemática del proceso de hidrólisis de ATP.** Los derivados de sales de flúor de ADP mimetizan los diferentes estados de la molécula de ATP durante el proceso de hidrólisis. Adaptado de Meyer y cols., 2003.

### 3.6. Ensayos de interacción entre YY1 y RuvBL1-RuvBL2

La formación de un complejo entre las proteínas YY1 y RuvBL1-RuvBL2 se analizó *in vitro* mediante ensayos de copurificación entre las 3 proteínas (*pull down*). Para ello se incubaron las proteínas purificadas Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2 en una relación molar 1:5 durante 30 min a 4 °C en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Tras la incubación la mezcla se inyectó en una columna *StrepTrap HP (GE Healthcare)* de 1 ml equilibrada en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, y las proteínas unidas a la resina se eluyeron con tampón de equilibrado conteniendo 2,5 mM D-destiobiotina. Como control se realizó el mismo experimento con el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 en ausencia de Strep-II-YY1.

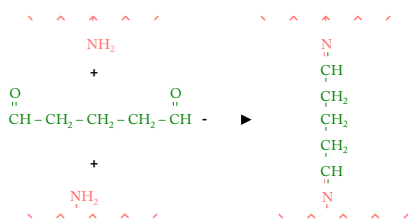
Alternativamente, se mezclaron los extractos solubles de células productoras de proteína Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2 y se incubaron durante 30 min a 4 °C. La mezcla se cargó en una columna *StrepTrap HP (GE Healthcare)* 1 ml y se realizó el ensayo en las mismas condiciones que en el caso anterior. En este ensayo también se realizó un control con el extracto soluble de células productoras de His-RuvBL1-RuvBL2 en ausencia de la proteína Strep-II-YY1. La fracción de la cromatografía de afinidad en la que coelúan las

## Capítulo 3

tres proteínas fue cargada en una columna de exclusión molecular *BioSep-SEC-S4000* (*Phenomenex*) equilibrada en el mismo tampón.

### 3.7. Ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído

La proteína His-YY1 se dializó en tampón 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  a 4 °C durante 20 h (para eliminar el compuesto Tris), y la reacción de entrecruzamiento se llevo cabo mediante la incubación de 1,5  $\mu\text{g}$  de proteína con 0,005 % (v/v) glutaraldehído (concentración final) en hielo durante diferentes tiempos de incubación desde 0 a 10 min en un volumen de reacción de 12  $\mu\text{l}$  (Figura 3.2). El tampón de reacción fue el mismo que el utilizado para la diálisis de la proteína His-YY1. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón 192 mM Tris-HCl pH 7,5 (concentración final), y se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida del 8 % y *western blot* con un anticuerpo específico anti-YY1 (*Anti-YY1 H-10*, *Santa Cruz Biotechnologies*).



**Figura 3.2: Representación simplificada de la reacción de entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído.** Los grupos aldehído de la molécula de glutaraldehído (en verde) reaccionan con los grupos amino de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas (en rojo) para formar enlaces covalentes.

### 3.8. Ensayos celulares

Los ensayos celulares fueron diseñados y definidos como parte de una colaboración entre el grupo del Prof. Óscar Llorca (*Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC, Madrid*) y el grupo de la Dra. Jessica A. Downs (*Genome Damage and Stability Center, Universidad de Sussex, Brighton, Reino Unido*). Los experimentos fueron realizados en su totalidad por el grupo de la Dra. Jessica A. Downs.

#### Plásmidos utilizados en ensayos celulares

El cDNA de la proteína RuvBL2 humana (NM\_006666) fue adquirido como DNA para transfección incluyendo una etiqueta GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo amino terminal (GFP-RuvBL2) (*Origene*). Para generar construcciones de expresión de RuvBL2 resistentes a siRNA se introdujeron las siguientes mutaciones: G451A, A460T y A466T, utilizando un kit comercial (*QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene*). El mutante en la actividad ATPasa GFP-RuvBL2<sup>K83A</sup> se generó mediante mutagénesis dirigida (*QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene*) utilizando como molde de DNA la construcción resistente a siRNA.

#### Cultivos celulares e irradiación de células

Las líneas celulares A549 (*Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells 549*) y U2OS (*Human bone osteosarcome epithelial cells*) se cultivaron en medio MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (*Gibco*), respectivamente, suplementado con 10 % (v/v) FCS (*Fetal Calf Serum*), L-glutamina, penicilina y estreptomina (*Gibco*) a 37 °C con el 95 % de humedad y 5 % CO<sub>2</sub>. En los experimentos que se indican, las células fueron irradiadas mediante su exposición a una fuente de radiación  $\gamma$  <sup>137</sup>Cs con una dosis de 3 Gy/min durante 26 s.

### Experimentos de silenciamiento con siRNA e inmunofluorescencia

Se transfectaron  $4 \cdot 10^5$  células con 8  $\mu$ l del siRNA (*small interfering RNA*) (5 nM) (*Smartpool on-target plus siRNAs*, Dharmacon, Thermo Scientific) indicado en cada caso (Tabla 3.8) utilizando un reactivo comercial (*HiPerFect Transfection REagent*, Qiagen). Pasadas 24 h, se recogieron y se volvieron a transfectar, fueron sembradas y se dejaron crecer durante 48 h.

Para los ensayos de inmunofluorescencia las células fueron fijadas durante 10 min (2 % (p/v) PFA (para-formaldehído), 3 % (p/v) sacarosa, 1X PBS) y se permeabilizaron durante 3 min con 2 % (v/v) Tritón X-100 en 1X PBS. En el caso de la tinción para RPA/ RAD51 en células sin transfectar con el plásmido, se realizó una preextracción mediante tratamiento con 2 % (v/v) Tritón X-100 en 1X PBS durante 1 min antes de la fijación. Las células se lavaron con 1X PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 3.9) diluido en 1X PBS, 2 % (p/v) BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces, se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 3.9) (diluido en 1X PBS, 2 % (p/v) BSA) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, se incubaron con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) durante 10 min y se lavaron 3 veces con 1X PBS. Las muestras se montaron utilizando un sistema *Vectashield*<sup>®</sup>, se visualizaron y analizaron en un microscopio *Nikon-e400*, y se tomaron imágenes en un microscopio *Applied Precision*<sup>®</sup> *Delta Vision*<sup>®</sup> *RT Olympus LX70* utilizando el programa informático *softWoRX*<sup>®</sup> *Suite Software*. Para la cuantificación de los focos de  $\gamma$ H2AX, RPA y RAD51, se tomaron datos para un mínimo de 30 células seleccionadas al azar por experimento.

siRNA	Secuencias 5'-3'
siYY1	CCAAACAACUGGCAGAAUU, GAACUCACCUCCUGAUUUAU, UAACACAUGCUAAGGCCAA, CAUAAAGGCUGCACAAAGA
siIno80	GGAAUUGAGUUUCGAUAGA, GGAGUUUUUGAACGGCAA, GAAUCAACUUUCUCGCUUA, GAGGAAACCAACCGAGUGA
siRuvBL2	GGAAUUGAGUUUCGAUAGA, GGAGUUUUUGAACGGCAA, GAAUCAACUUUCUCGCUUA, GAGGAAACCAACCGAGUGA
siBRCA2	GAAACGGACUUGCUAUUUA, GGUAUCAGAUGCUCUUAUA, GAAGAAUGCAGGUUUAUA, UAAGGAACGUCAAGAGUA

Tabla 3.8: Secuencias de los siRNA utilizados en los experimentos de silenciamiento génico. Se indican las secuencias de los siRNA sentido y antisentido de las hebras directa y complementaria que formaban la mezcla comercial de siRNAs para cada caso.

Anticuerpo	Ensayo	Dilución	Casa Comercial
<i>anti-γH2AX</i>	IF <sup>(1)</sup>	1:800	Millipore
<i>anti-RPA</i>	IF <sup>(1)</sup>	1:100	Millipore
<i>anti-RAD51</i>	IF <sup>(1)</sup>	1:200	Santa Cruz Biotechnologies
<i>anti-CENPF</i>	IF <sup>(1)</sup>	1:1000	Abcam
<i>anti-YY1 (H-414)</i>	WB <sup>(1)</sup>	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies
<i>anti-RuvBL2</i>	WB <sup>(1)</sup>	1:5000	Abcam
<i>anti-Ino80</i>	WB <sup>(1)</sup>	1:1000	Abcam
<i>anti-KAP1</i>	WB <sup>(1)</sup>	1:1000	Abcam
<i>anti-FITC</i>	IF <sup>(2)</sup>	1:100	Sigma-Aldrich
<i>anti-Cy3</i>	IF <sup>(2)</sup>	1:200	Sigma-Aldrich
<i>anti-AlexaFluor 488/555/350</i>	IF <sup>(2)</sup>	1:400	Invitrogen

Tabla 3.9: Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia (IF) y *western blot* (WB) en cultivos celulares <sup>(1)</sup>, anticuerpo primario; <sup>(2)</sup>, anticuerpo secundario).

### 3.9. Experimentos de interacción proteína-DNA

Los experimentos de interacción proteína-DNA mediante retardo en la movilidad electroforética fueron diseñados y realizados de manera conjunta en colaboración con la Dra. Eva Torreira (*Centro de Investigaciones Biológicas – CSIC, Madrid*) y la Dra. Silvia Ayora (*Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, Madrid*).

#### Sustratos de DNA para ensayos de retardo en la movilidad electroforética

Las estructuras de DNA se generaron mediante el anillamiento de distintas combinaciones de oligonucleótidos de 80-pb descritos en Zecchi y cols. (Zecchi y cols., 2012) o los oligonucleótidos indicados (Tabla 3.10). En cada caso, uno de los oligonucleótidos fue marcado en el extremo 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  con polinucleótido quinasa T4 (*New England Biolabs*) mediante incubación a 37 °C durante 45 min, antes de la reacción de anillamiento. Los oligonucleótidos marcados se purificaron en una columna *Sephadex G50* (*GE Healthcare*) y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-urea en condiciones no desnaturizantes.

El sustrato *Holliday junction* J3 fue generado a partir de los oligonucleótidos J3-1, J3-2, J3-3 y J3-4, y *Holliday junction* HJ\_25 a partir de los oligonucleótidos HJ\_1, HJ\_2, HJ\_3 y HJ\_4. La reacción de anillamiento se realizó en tampón 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5 mezclando el oligonucleótido marcado con los oligonucleótidos complementarios sin marcar en una relación molar 1:2. Las reacciones se analizaron en geles de poliacrilamida del 8 % en condiciones no desnaturizantes, y las bandas correspondientes a los sustratos anillados se cortaron y el DNA fue extraído mediante incubación durante 18 h a 4 °C con tampón 5 M acetato amónico, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA. La concentración de DNA se determinó en un contador de centelleo. Los sustratos marcados con el fluoróforo Cy5 en el extremo 5' se anillaron siguiendo un protocolo similar al descrito para los sustratos marcados con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . El sustrato *Holliday junction* HJ\_25\_sp se generó a partir de los oligonucleótidos HJ\_12 y HJ\_34\_1, y HJ\_25\_no\_sp a partir de HJ\_12 y HJ\_34\_2.

### Ensayos de retardo en la movilidad electroforética

Los ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) suponen un método sensible y rápido para detectar interacciones proteína-ácidos nucleicos. Su fundamento reside en la diferencia en la movilidad electroforética entre un complejo proteína-ácido nucleico y el ácido nucleico libre, siendo generalmente la de este último mayor (Hellman & Fried, 2007). Este tipo de ensayos son utilizados para la caracterización cualitativa de las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, pero en las condiciones adecuadas también pueden ofrecer información cuantitativa para la determinación de la estequiometría, la afinidad y la cinética de la interacción. La detección de los ácidos nucleicos se realiza mediante el marcaje de estos con isótopos radiactivos, fluorescencia o quimioluminiscencia. El método es compatible con ácidos nucleicos de longitudes muy variables y de diferentes estructuras.

La interacción proteína-DNA se estudió mediante EMSA utilizando diferentes sustratos de DNA (3 nM) marcados radiactivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mg/ml BSA, 60 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT durante 30 min a 37 °C. Los complejos se separaron en geles del 6 % de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes en tampón TBE 0,5X a 4 °C. Posteriormente, los geles se secaron y se revelaron mediante autorradiografía. Para los experimentos de desplazamiento de los complejos proteína-DNA con anticuerpos específicos (*super shift*), tras la incubación a 37 °C durante 30 min, se añadió a las reacciones la cantidad adecuada de anticuerpo (*anti-YY1 H-10 X*, Santa Cruz Biotechnologies) o 1X PBS como control, y se incubaron durante 15 min a 37 °C. En otra serie de experimentos las fracciones de proteína procedentes de una cromatografía de exclusión molecular se incubaron con sustratos de DNA (10 nM) con marca fluorescente Cy5. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 30 min en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Tras la separación de los complejos en geles del 6 % de poliacrilamida en condiciones nativas, se detectó la fluorescencia del DNA con un equipo Fujifilm FLA-3000. Los geles nativos fueron

## Capítulo 3

transferidos a membranas de PVDF y se detectó la presencia de proteína mediante *western blot* con un anticuerpo específico.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Marca 5'
J3-1	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGAAGCTTCCGGTAGCAGC CTGAGCGGTGGTTGAATTCCTCGAGGTTCTGTGCGCTTG CG	-
J3-2	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGGAATTCAACCACCGCTC AACTCAACTGCAGTCTAGACTCGAGGTTCTGTGCGCTTGC G	-
J3-3	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGTCTAGACTGCAGTTGAG TCCTTGCTAGGACGGATCCCTCGAGGTTCTGTGCGCTTG CG	$\gamma$ - <sup>32</sup> P
J3-4	CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGGGATCCGTCTAGCAAG GGGCTGCTACCGGAAGCTTCTCGAGGTTCTGTGCGCTTG CG	-
HJ_1	GACGCTGCCGAATTCTGGCGTTAGGAGATACCGATAAGCT TCGGCTTAA	$\gamma$ - <sup>32</sup> P
HJ_2	CTTAAGCCGAAGCTTATCGGTATCTTGCTTACGACGCTAG CAAGTGATC	-
HJ_3	TGATCACTTGCTAGCGTCGTAAGCAGCTCGTGCTGTCTAG AGACATCGA	-
HJ_4	ATCGATGTCTCTAGACAGCACGAGCCCTAACGCCAGAATT CGGCAGCGT	-
HJ_12	GACGCTGCCGAATTCTGGCGTTAGGAGATACCGATAAGCT TCGGCTTAATTTCTTAAGCCGAAGCTTATCGGTATCTTGC TTACGACGCTAGCAAGTGATC	Cy5
HJ_34_1	TGATCACTTGCTAGCGTCGTAAGCAGCTCGTGCTGTCTAG AGACATCGATTTATCGATGTCTCTAGACAGCACGAGCCCT AACGCCAGAATTCGGCAGCGT	-
HJ_34_2	TGATCACTTGCTAGCGTCGTAAGCAGCTCGTGCTGTCTAG AGTATACGATTTATCGTATACTCTAGACAGCACGAGCCCTA ACGCCAGAATTCGGCAGCGT	-

Tabla 3.10: Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de interacción proteína-DNA.

### 3.10. Microscopía electrónica de transmisión de proteínas

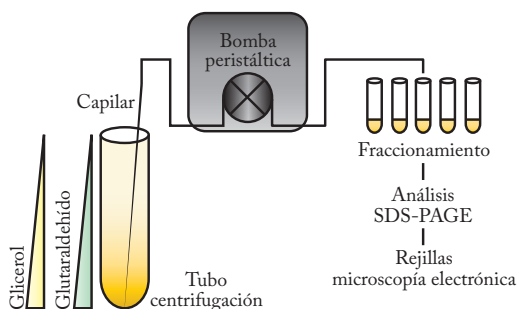
#### GraFix

El método de *GraFix* (*Gradient Fixation*) o fijación en gradiente es un procedimiento para la purificación y estabilización de complejos macromoleculares utilizado en la preparación de muestras de microscopía electrónica. Su fundamento reside en el entrecruzamiento químico débil de las macromoléculas mientras son separadas en un gradiente de densidad mediante centrifugación. Este método puede contribuir a reducir los problemas de heterogeneidad debidos a las disociación de los complejos u oligómeros durante la preparación de las muestras para su análisis en el microscopio electrónico. Además, este protocolo suele incrementar el número de partículas que se adhieren al soporte de carbón, sin producir artefactos estructurales aparentes en las moléculas, y ofrece en la mayoría de los casos una tinción mejorada de las partículas, permitiendo obtener imágenes de mayor calidad (Kastner y cols., 2008; Stark, 2010).

El método de *GraFix* se utilizó para la estabilización de la proteína Strep-II-YY1 y su posterior análisis mediante microscopía electrónica. Se preparó un gradiente discontinuo de glicerol de 4 ml en tampón 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, formado por 4 capas de 1 ml con concentraciones de glicerol del 20, 10, 7,5 y 5 % (v/v) y glutaraldehído 0,1, 0,05, 0,02 y 0,01 % (v/v). Como control se utilizó un gradiente de glicerol de las mismas características sin glutaraldehído. Se cargaron 100 µl de la proteína Strep-II-YY1 a una concentración 10 µM, previamente dializada en tampón 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, en cada uno de los gradientes y se realizó la separación en el gradiente mediante ultracentrifugación (30000 rpm durante 18 h a 4 °C) utilizando un rotor SW 55 Ti (*Beckman Coulter*). Los gradientes se fraccionaron (250 µl) desde el fondo del tubo y se detuvo la reacción de entrecruzamiento mediante la adición de tampón 192 mM Tris-HCl pH 7,5 (concentración final) (Figura 3.3). Las muestras fraccionadas se analizaron mediante SDS-PAGE y *western blot* con un anticuerpo anti-polihistidinas. Las fracciones que contenían las proteína Strep-II-YY1 entrecruzada se

## Capítulo 3

utilizaron para la preparación de rejillas de microscopía electrónica. Como control se analizaron también las mismas fracciones separadas en el gradiente de glicerol sin agente entrecruzador.



**Figura 3.3: Esquema simplificado del método GraFix para la estabilización de proteínas y complejos macromoleculares.** La proteína fue purificada y entrecruzada químicamente en un gradiente de glicerol/glutaraldehído mediante centrifugación. El gradiente fue

fraccionado mediante una bomba peristáltica, y la reacción de entrecruzamiento se detuvo mediante la adición de 192 mM Tris-Glicina (concentración final). Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con plata y ensayos de *western blot*, y se prepararon rejillas de microscopía electrónica de las fracciones que contenían la proteína entrecruzada.

### Preparación de muestras mediante tinción negativa

Se emplearon rejillas de cobre cubiertas de una capa de carbón (*CF-400 Cu 50/pk Carbon Film On 400 Square Mesh Copper Grids, Electron Microscopy Sciences*) sometidas a descarga iónica durante 1 min para generar una superficie hidrofílica que facilitó la adsorción de la muestra. Sobre las rejillas activadas se depositó la muestra de proteína (aproximadamente 8-10  $\mu$ l a una concentración de entre 0,05-0,1 mg/ml) y se dejó adherir a la superficie de carbón durante 2 min. Se retiró el exceso de muestra de las rejillas con papel de filtro (*Whatman*), y tras dos lavados en agua mili-Q durante 30 s y eliminación del exceso de esta, se tiñeron con acetato de uranilo o formiato de uranilo al 2 % (p/v) durante 1 min. Se volvió a retirar el exceso de agente de tinción sobre las rejillas y se dejaron secar al aire.

### Preparación de muestras vitrificadas

La preparación de muestras vitrificadas fue realizada en colaboración con David Gil Cartón (*CIC bioGUNE, Bilbao*). Las muestras de proteína se depositaron sobre rejillas de cobre con recubrimiento de carbón (*QUANTIFOIL 300 mesh R2/1 holey carbon copper grids, Quantifoil Micro Tools GmbH*) y previamente ionizadas en condiciones de 4 °C y 100 % de humedad, y fueron seguidamente vitrificadas utilizando un sistema automatizado (*Vitrobot Mark III, FEI Inc.*), mediante su inmersión en etano líquido a -180 °C.

### Visualización de muestras de proteína mediante microscopía electrónica y adquisición de imágenes

Las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL 1230* estabilizado a 100 kV. La adquisición de imágenes se realizó bajo condiciones de mínima dosis (10-15 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>) utilizando un detector *4 k x 4 k TVIPS CMOS* bajo el control del paquete informático *EM TOOLS (TVIPS)* a una magnificación final de 68222x y 2,28 Å/píxel. En el caso de las muestras vitrificadas, su visualización se realizó en un microscopio electrónico de transmisión *JEM-2200FS FEG* equipado con un filtro de energía (*Omega Filter*) estabilizado a 200 kV. Las imágenes se tomaron utilizando una cámara *4 k x 4 k UltraScan 4000 CCD (Gatan Inc.)* a una magnificación final de 86856x y 1,73 Å/píxel, en un rango de desenfoque de entre 1,2 y 3,5 µm.

#### 3.11. Procesamiento digital de imágenes

La función de transferencia de contraste (*Contrast Transfer Function, CTF*) fue estimada para cada micrografía utilizando el programa *CTFFIND3b* (Mindell y Grigorieff, 2003) y corregida con el programa *BSOFT* (Heymann y Belnap, 2007). Las micrografías con la corrección de CTF aplicada fueron utilizadas para la selección y extracción de partículas

## Capítulo 3

---

individuales. Las partículas correspondientes a moléculas individuales fueron seleccionadas y extraídas de las micrografías utilizando el comando *e2boxer.py* del paquete *EMAN2* (Tang y cols., 2007) o, alternativamente, con el programa *micrograph\_mark* del paquete *XMIPP* (Scheres y cols., 2008). Las partículas fueron preprocesadas previamente a su procesamiento bidimensional; se escalaron, recortaron y centraron según los requerimientos de cada muestra, y fueron normalizadas para hacer equivalentes los niveles de grises entre las distintas micrografías (comando *proc2d*, *EMAN* (Ludtke y cols., 1999)).

### Alineamiento y clasificación bidimensional de partículas individuales

Para la obtención de medias libres de patrón se utilizaron los programas *r2d.py* (*EMAN* (Ludtke y cols., 1999)), *e2r2d.py* (*EMAN2* (Tang y cols., 2007)), *ML2D* (*XMIPP* (Scheres y cols., 2008)) y *CL2D* (*XMIPP* (Scheres y cols., 2008)). A partir de las medias libres de patrón se realizó una selección manual de las partículas con mejor calidad, obteniendo un nuevo set de datos que fue utilizado en el posterior proceso de refinamiento angular.

### Análisis de la simetría rotacional

En los casos en los que fue necesario, se analizó computacionalmente la simetría de la molécula. Para ello, el volumen obtenido mediante el método de Inclinación cónica al azar o RCT (*Random Conical Tilt*) (Radermacher y cols., 1987) (apartado 3.12) se orientó según un eje *Z* seleccionado de manera visual utilizando el programa *UCSF Chimera* (Pettersen y cols., 2004). El volumen correctamente orientado fue seccionado a lo largo del eje *Z* utilizando el programa *SPIDER* (Shaikh y cols., 2008), y se analizaron los espectros rotacionales de las distintas secciones generadas utilizando el programa *rot\_spectra* implementado en el paquete *XMIPP* (Scheres y cols., 2008). En otra serie de experimentos se analizaron del mismo modo los espectros rotacionales de las medias libres de patrón de las moléculas.

### 3.12. Reconstrucción tridimensional

#### Generación de volúmenes iniciales

Para la obtención de volúmenes iniciales se utilizaron distintas aproximaciones. Para muestras con simetría se identificaron las vistas frontales y laterales en las medias libres de patrón y a partir de estas se generó un volumen inicial utilizando el comando *startcsym* (*EMAN* (Ludtke y cols., 1999)). Siguiendo una aproximación similar se generaron volúmenes iniciales utilizando el programa *Initial model* (*EMAN2* (Tang y cols., 2007)).

Como método alternativo se obtuvieron modelos iniciales mediante el método de Inclinación cónica al azar o RCT (Radermacher y cols., 1987). Para ello se tomaron pares de imágenes de las partículas a 0 y 45° de inclinación, y tras su selección, alineamiento y clasificación bidimensional, se reconstruyeron los volúmenes utilizando la información estructural obtenida desde los dos ángulos de inclinación del espécimen (*XMIPP* (Scheres y cols., 2008)).

#### Refinamiento angular

La asignación angular de las imágenes de microscopía electrónica de partículas individuales se realizó mediante un proceso de refinamiento angular iterativo utilizando los comandos *refine* (*EMAN* (Ludtke y cols., 1999)) y *projection\_matching* (*XMIPP* (Scheres y cols., 2008)), tomando los volúmenes iniciales como partida. Se refinaron de forma paralela distintos modelos iniciales para cada muestra estudiada, y se seleccionó finalmente el modelo que presentaba mejor evolución, concluyendo el procesamiento cuando los volúmenes ya no presentaban variaciones en las distintas etapas del refinamiento y eran consistentes con los datos experimentales obtenidos (partículas individuales y medias libres de referencia). En los casos necesarios, se aplicó la simetría adecuada durante el refinamiento angular. En los casos de refinamiento de moléculas simétricas se realizó un control de refinamiento de las estructuras sin imposición de la simetría, comprobándose que los volúmenes refinados no se desestabilizaban al eliminar dicha imposición. La visualización de los volúmenes de

microscopía electrónica y de estructuras atómicas se realizó utilizando el programa *UCSF Chimera* (Pettersen y cols., 2004).

### Estimación de la resolución y visualización de volúmenes de microscopía electrónica

La resolución de las estructuras obtenidas se calculó utilizando el comando *eotest* (*EMAN* (Ludtke y cols., 1999)). Para ello, la población de partículas asignadas a cada una de las proyecciones en la última iteración del proceso de refinamiento angular se dividió de manera aleatoria en dos grupos, y cada una fue utilizada para reconstruir volúmenes de manera independiente. La determinación de la similitud entre estos dos volúmenes mediante correlación en función de la frecuencia espacial ofrece una estimación de la resolución del volumen. El valor de resolución se calculó fijando un valor de 0,5 en el coeficiente de correlación en el espacio de Fourier (FSC, *Fourier Shell Correlation*).

#### 3.13. Modelado pseudoatómico

El ajuste de estructuras o modelos atómicos en los mapas de densidad electrónica se realizó con el comando *Fit in Map* del programa *UCSF Chimera* (Pettersen y cols., 2004) combinado con un ajuste manual determinado por el mejor valor de correlación.

# Resultados



## Capítulo 4

### Resultados

#### Parte I: Caracterización bioquímica y estructural del complejo RuvBL1-RuvBL2

##### 4.1. Expresión y purificación de las proteínas humanas RuvBL1 y RuvBL2 recombinantes

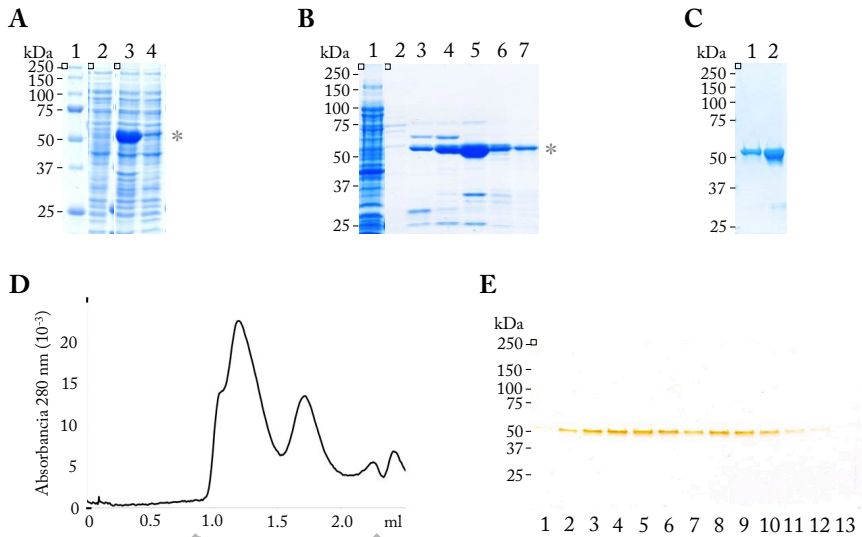
En una primera aproximación para reconstituir el complejo formado por las proteínas humanas RuvBL1 y RuvBL2 se clonaron y expresaron en células bacterianas ambas proteínas por separado. Las clonaciones se diseñaron incluyendo una cola de 8 histidinas en el extremo amino terminal en ambas proteínas recombinantes, seguida de la secuencia de corte para la proteasa TEV, de manera que la etiqueta de histidinas pudiera ser eliminada. Las condiciones para la expresión de las construcciones His-RuvBL1 y His-RuvBL2 fueron optimizadas para la obtención de proteína recombinante soluble (Figuras 4.1 y 4.2), y su purificación se realizó en un primer paso de cromatografía de afinidad en una columna *HisTrap HP (GE Healthcare)*. En el caso de His-RuvBL1, la proteína purificada era muy estable, permitiendo su concentración en sistemas comerciales (*Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel – 3K, Millipore*) hasta 0,5 mg/ml (Figura 4.1C); la proteína His-RuvBL2, sin embargo, presentaba gran tendencia a la agregación, por lo que no se pudo incrementar su concentración mediante este sistema, obteniéndose un rendimiento de 0,05 mg/ml (Figura 4.2C).

Las proteínas His-RuvBL1 y His-RuvBL2 purificadas se analizaron en una columna de exclusión molecular, proceso que proporcionó información acerca de su estado oligomérico. En el caso de RuvBL1 (0,5 mg/ml), la cromatografía de filtración en gel mostraba la formación de un oligómero de aproximadamente 300 kDa (por comparación con estándares de calibración, (*GE Healthcare*)) (Figuras 4.1D y 4.1E), correspondiente presumiblemente a un anillo hexamérico como había sido previamente descrito (Matias y cols., 2006).

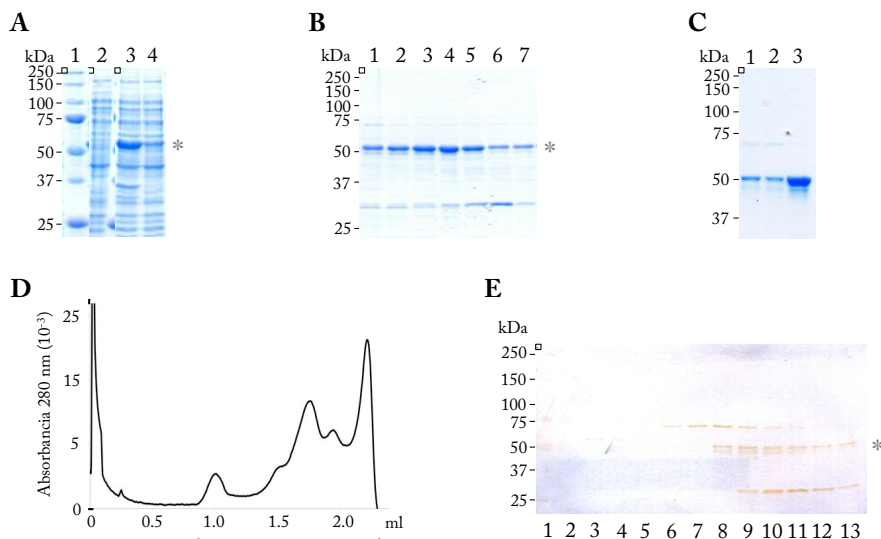
La proteína RuvBL2 (0,05 mg/ml) por su parte, al inyectarla en la columna de filtración en gel, eluía en fracciones compatibles con formas monoméricas (Figuras 4.2D y 4.2E). A pesar de que RuvBL2 también es capaz de formar homooligómeros hexaméricos, este proceso parece ser dependiente de la concentración y la presencia de nucleótidos (Puri y cols., 2007). La concentración alcanzada en la purificación no resultó suficiente para aislar las formas hexaméricas de la proteína.

### 4.2. Purificación del complejo RuvBL1-RuvBL2

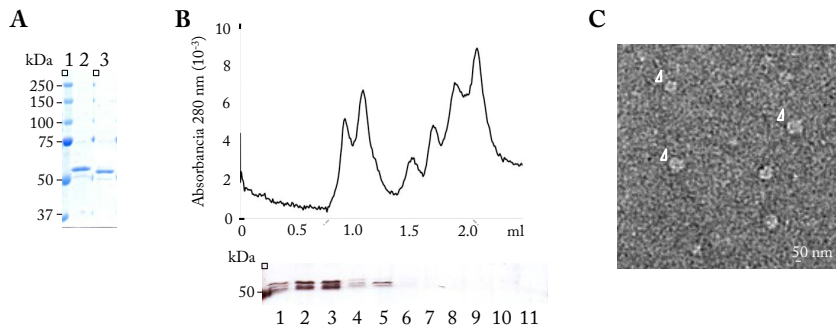
Se ensayó el ensamblaje del complejo RuvBL1-RuvBL2 *in vitro* mediante la incubación de las proteínas purificadas His-RuvBL1 y RuvBL2, seguida de su separación cromatográfica por tamaño molecular en una columna de exclusión molecular para determinar el patrón de oligomerización del complejo. El complejo His-RuvBL1-RuvBL2 fue aislado en la cromatografía de filtración en gel en fracciones correspondientes masas moleculares de aproximadamente 600 kDa (por comparación con estándares de calibración) (Figura 4.3A). El complejo presumiblemente dodecamérico formado por His-RuvBL1-RuvBL2 fue visualizado en el microscopio electrónico, pero la muestra presentaba un elevado grado de heterogeneidad, posiblemente debido a que el complejo tendía a desensamblarse (Figura 4.3B). Además, la reproducibilidad del experimento fue limitada, por lo que no resultó útil para los ensayos bioquímicos y estructurales de las proteínas.



**Figura 4.1: Expresión y purificación de la proteína humana RuvBL1.** (A) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la expresión en células BL21 (DE3) de la proteína His-RuvBL1. Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, extracto celular no inducido; carril 3, extracto celular inducido con IPTG durante 3 h; carril 4, fracción de proteína soluble tras la lisis celular. (B) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la purificación de His-RuvBL1 mediante cromatografía de afinidad en columna *HisTrap HP* (*GE Healthcare*). Carril 1, fracción de proteínas no retenidas en la columna; carriles 2-7, elución mediante gradiente de imidazol de las proteínas unidas a la columna. (C) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la concentración de la proteína His-RuvBL1 purificada. Carriles 1 y 2, muestras antes y después del proceso de concentración, respectivamente. (D) Cromatografía de exclusión molecular de la proteína His-RuvBL1. Se indican las fracciones analizadas en (E) mediante una línea. (E) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con plata de las fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular en (D). En todos los casos se indica la masa molecular de los estándares en la parte izquierda de los geles de poliacrilamida, y se indica la posición de la proteína con un asterisco.



**Figura 4.2: Expresión y purificación de la proteína humana RuvBL2.** (A) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la expresión en células BL21 (DE3) de la proteína His-RuvBL2. Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, extracto celular no inducido; carril 3, extracto celular inducido con IPTG durante 3 h; carril 4, fracción de proteína soluble tras la lisis celular. (B) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la purificación de His-RuvBL2 mediante cromatografía de afinidad en columna *HisTrap HP* (*GE Healthcare*). Carriles 1-7, elución mediante gradiente de imidazol de las proteínas unidas a la columna. (C) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la concentración de la proteína His-RuvBL2 purificada. Carriles 1 y 2, muestras antes y después del proceso de concentración, respectivamente; carril 3, precipitado. (D) Cromatografía de exclusión molecular de la proteína His-RuvBL2. Se indican las fracciones analizadas en (E) mediante una línea. (E) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con plata de las fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular en (D). En todos los casos se indica la masa molecular de los estándares en la parte izquierda de los geles de poliacrilamida, y se indica la posición de la proteína con un asterisco.



**Figura 4.3: Ensamblaje del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 *in vitro*.** Las proteínas His-RuvBL1 y RuvBL2 purificadas se incubaron durante 30 min en hielo y fueron analizadas mediante cromatografía de exclusión molecular. **(A)** SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la digestión de la cola de histidinas en His-RuvBL2. Carril 1, marcadores de masa molecular; carriles 2 y 3, antes y después de la incubación con proteasa TEV, respectivamente. **(B)** Cromatograma de la columna *Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare)* correspondiente a la separación de la mezcla His-RuvBL1 y RuvBL2. El inserto inferior muestra el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con plata de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular. Ambas proteínas elúan en un volumen correspondiente a una masa molecular de 600 kDa (por comparación con estándares de masa molecular). **(C)** Campo de microscopía electrónica del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 ensamblado *in vitro*. Se señalan algunas partículas representativas con círculos. Barra de escala, 50 nm.

Como alternativa para purificar el complejo RuvBL1-RuvBL2 se llevó a cabo la coexpresión de ambas proteínas en el interior de la célula bacteriana para favorecer su ensamblaje *in vivo*. Para ello se cotransformaron células *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos que contenían las proteínas His-RuvBL1 y RuvBL2 (salvaje) y se seleccionaron colonias positivas para ambas proteínas. Tras la optimización de las condiciones para la expresión del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 (Figura 4.4A), se realizó su purificación en condiciones similares a las utilizadas en el caso de las proteínas aisladas, utilizando un único paso cromatográfico de afinidad en columna *HisTrap HP (GE Healthcare)*, aprovechando la

## Capítulo 4

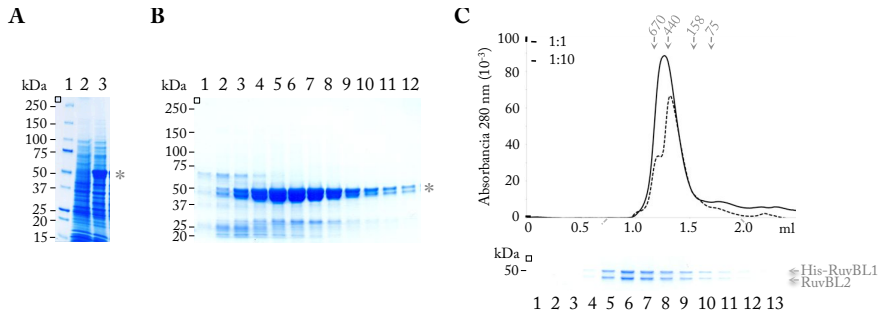
---

cola de histidinas incluida en el extremo amino terminal de RuvBL1. Tras el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue (Invitrogen)* de las fracciones de la cromatografía de afinidad, se comprobó que ambas proteínas copurificaban en una relación aproximada de 1:1, lo que sugería que estaban formando un complejo, eluyendo RuvBL2 a través de su interacción con His-RuvBL1 con un rendimiento de aproximadamente 1 mg/ml y un elevado grado de pureza (Figura 4.4B). Este resultado indicaba la formación de un complejo equimolar y estable de ambas proteínas, de acuerdo con lo descrito previamente (Cheung y cols., 2010b; Gorynia y cols., 2011; Puri y cols., 2007; Torreira y cols., 2008).

Las fracciones que contenían el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 (1 mg/ml) se juntaron y dializaron para su posterior análisis mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna *Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare)*. El perfil cromatográfico mostraba un máximo de absorbancia compatible con formas del complejo de un tamaño molecular entre 670-440 kDa por comparación con los estándares de calibración (Figura 4.4C, línea continua), correspondientes presumiblemente a una mezcla de oligómeros dodecaméricos (600 kDa) y hexaméricos (300 kDa) del complejo, cuya resolución en la columna era limitada. Este máximo de absorbancia (0,1 mg/ml aprox.) se reinyectó en la misma columna, apreciándose el enriquecimiento en la especie hexamérica, lo cual se interpretó como consecuencia de la dilución de la muestra en el proceso de separación cromatográfica (Figura 4.4C, línea discontinua). Las fracciones de la columna de exclusión molecular enriquecidas en formas dodecaméricas fueron utilizadas para la preparación de rejillas de microscopía electrónica.

De forma paralela se siguió una estrategia alternativa para el ensamblaje del complejo RuvBL1-RuvBL2 mediante la utilización de una etiqueta diferente en las proteínas recombinantes. Para ello se clonó la proteína RuvBL1 con la secuencia Strep-II-tag en el extremo amino terminal. La proteína Strep-II-RuvBL1 se expresó en células *E. coli* BL21 (DE3) y se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna *StrepTrap HP (GE Healthcare)*. La Figura 4.5A muestra el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *Simply*

Blue (*Invitrogen*) de la purificación de la proteína, la cual se obtiene con un elevado grado de pureza y elevada concentración (1 mg/ml).



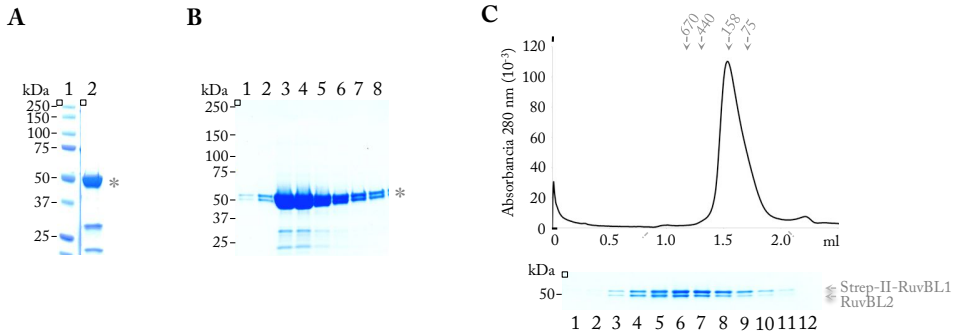
**Figura 4.4: Formación *in vivo* del complejo His-RuvBL1-RuvBL2.** (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de la coexpresión de His-RuvBL1 y RuvBL2 en células *E. coli* BL21 (DE3). Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, extracto celular no inducido; carril 3, extracto celular inducido con IPTG durante 3 h. (B) SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de las fracciones de la columna *HisTrap HP* (*GE Healthcare*) (carriles 1-12) donde se cargó el extracto soluble de células inducidas para la expresión de His-RuvBL1 y RuvBL2. RuvBL2 coeluye con His-RuvBL1 gracias a la formación de un complejo equimolar entre ambas proteínas. (C) Cromatografía de exclusión molecular del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 purificado (línea continua), y reinyección de fracciones correspondientes a masas moleculares de entorno a 670 kDa (dilución 1:10; línea discontinua). Las flechas en la parte superior indican marcadores de masa molecular. En el panel inferior se muestra el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de la cromatografía de exclusión molecular correspondiente al complejo His-RuvBL1-RuvBL2 purificado (línea continua del cromatograma). El complejo His-RuvBL1-RuvBL2 presenta un volumen de elución de entre 600-400 kDa (por comparación con estándares de calibración), compatible con una mezcla de especies hexaméricas y dodecaméricas. Se indica la masa molecular de los estándares a la izquierda de los geles de poliácridamida, así como las posiciones de las proteínas (asterisco).

## Capítulo 4

---

Una vez comprobada la correcta expresión y purificación de la proteína Strep-II-RuvBL1, se realizó la coexpresión de esta con la proteína RuvBL2 salvaje mediante la cotransformación con ambos plásmidos de células *E. coli* BL21 (DE3). De nuevo se seleccionaron colonias positivas gracias a la diferente resistencia a antibióticos proporcionada por los dos plásmidos, de manera similar a lo realizado en el caso del complejo His-RuvBL1-RuvBL2. El complejo Strep-II-RuvBL1-RuvBL2 se purificó siguiendo el mismo protocolo que en el caso de la proteína Strep-II-RuvBL1 (Figura 4.5B), comprobándose que ambas proteínas interactúan en una relación aproximada 1:1, y obteniendo un rendimiento de aproximadamente 1,2 mg/ml.

El análisis del complejo Strep-II-RuvBL1-RuvBL2 mediante cromatografía de exclusión molecular no mostró un perfil similar al de los dodecámeros observados en el caso de His-RuvBL1-RuvBL2 (Figura 4.5C), por lo que se decidió no utilizar esta muestra para el análisis estructural del complejo. El máximo de absorbancia a 280 nm de la cromatografía corresponde a un tamaño molecular aproximado de 158 kDa, que podría corresponder a especies oligoméricas intermedias de las proteínas (Niewiarowski y cols., 2010).

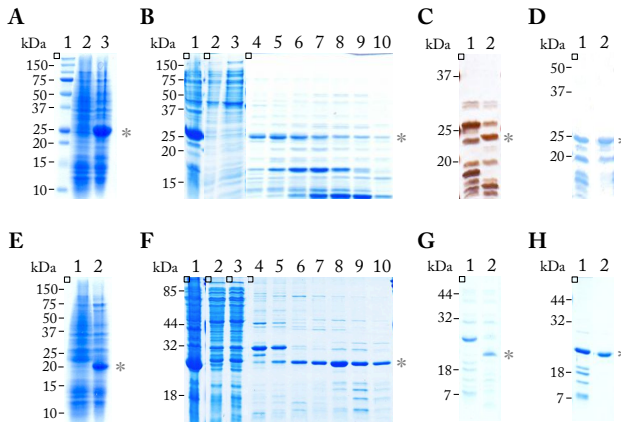


**Figura 4.5: Purificación de la proteína Strep-II-RuvBL1 y coexpresión de Strep-II-RuvBL1 y RuvBL2.** (A) SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de la purificación de Strep-II-RuvBL1. Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, elución de la columna de afinidad *StrepTrap HP* (*GE Healthcare*). (B) SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de la purificación del complejo Strep-II-RuvBL1-RuvBL2 ensamblado *in vivo* mediante la coexpresión de las dos proteínas en células *E. coli* BL21 (DE3). Carriles 1-8, elución de la columna *StrepTrap HP* (*GE Healthcare*). Las proteínas coeluyen gracias a la formación de un complejo equimolar entre ambas. (C) Cromatografía de exclusión molecular del complejo Strep-II-RuvBL1-RuvBL2 fraccionado en una columna *Superdex 200 PC 3.2/30* (*GE Healthcare*). Las flechas en la parte superior indican marcadores de masa molecular. Panel inferior: análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del complejo Strep-II-RuvBL1-RuvBL2. Este complejo formaba especies oligoméricas de entorno a 158 kDa, pero no los ensamblados hexaméricos (300 kDa) ni dodecaméricos (600 kDa) esperados. La masa molecular de los estándares se indica en la parte izquierda de los geles de poliacrilamida, así como las posiciones de las proteínas (asterisco).

### 4.3. Expresión y purificación de los dominios DII de RuvBL1 y RuvBL2

En el comienzo de este trabajo los monómeros y/o dominios implicados en la interacción entre subunidades para el ensamblaje del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 no había sido descrita, por lo que se diseñaron experimentos de interacción de las proteínas completas con los dominios DII aislados para aportar datos acerca de las interacciones intermoleculares que mantienen la estructura del dodecámero. Para ello, se expresaron los dominios DII de ambas proteínas en bacteria incluyendo una cola de histidinas en el extremo amino terminal (Figuras 4.6A y 4.6E). El dominio DII de RuvBL1 (His-DII-RuvBL1) fue purificado en un primer paso mediante cromatografía de afinidad en una columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* (Figura 4.6B), seguido de digestión de la cola de histidinas con proteasa TEV durante la diálisis de la muestra, y una segunda columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* (Figura 4.6C). Finalmente se purificó el dominio DII-RuvBL1 mediante su concentración (*Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel – 3000 MWCO, Millipore*) e inyección en una columna de exclusión molecular *Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences)* (Figura 4.6D). El protocolo de purificación del dominio DII de RuvBL2 (His-DII-RuvBL2) fue similar al utilizado para His-DII-RuvBL1 (Figuras 4.6F-H).

Los dominios DII parcialmente purificados de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 no fueron utilizados en ningún experimento descrito en esta tesis debido a la descripción de los contactos intermoleculares entre los dos anillos del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011), y por la información obtenida en el análisis estructural del complejo (ver apartado 4.5).



**Figura 4.6: Expresión y purificación de los dominios DII de RuvBL1 y RuvBL2.** (A) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la expresión de His-DII-RuvBL1. Carril 1,

marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, extracto de células no inducidas; carril 3, extracto de células inducidas con IPTG para la expresión de

la proteína recombinante. (B) Purificación de His-DII-RuvBL1 mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel. SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del proceso de purificación. Carril 1, extracto celular de proteínas totales; carril 2, extracto celular de proteínas solubles; carril 3, fracción de proteínas no retenidas en la columna; carriles 4-10, elución mediante gradiente de imidazol de la columna de afinidad. (C) SDS-PAGE y tinción con plata de la digestión de la cola de histidinas de His-DII-RuvBL1 con proteasa TEV. Carriles 1 y 2, antes y después de la incubación con proteasa TEV, respectivamente. (D) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de DII-RuvBL1 tras su fraccionamiento en una columna *Superdex 200 10/300 GL* (*Amersham Biosciences*). Carril 1, muestra antes de su fraccionamiento; carril 2, fracción de la cromatografía de exclusión molecular correspondiente a la elución de la proteína DII-RuvBL1. El dominio DII-RuvBL1 eluía como forma monomérica (25 kDa aproximadamente). (E) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las expresión de His-DII-RuvBL2. Carril 1, extracto de células no inducidas; carril 2, extracto de células inducidas con IPTG. (F) Purificación de His-DII-RuvBL2. SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel. Carril 1, extracto celular de proteínas totales; carril 2, extracto celular de proteínas solubles; carril 3, fracción de proteínas no retenidas en la columna; carriles 4-10, elución mediante gradiente de imidazol de la columna de afinidad. (G) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la digestión de la cola de histidinas de His-DII-RuvBL2 con proteasa TEV. Carriles 1 y 2, antes y después de la incubación con proteasa TEV, respectivamente. (H) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de DII-RuvBL2 tras su fraccionamiento en una columna *Superdex 200 10/300 GL* (*Amersham Biosciences*). Carril 1,

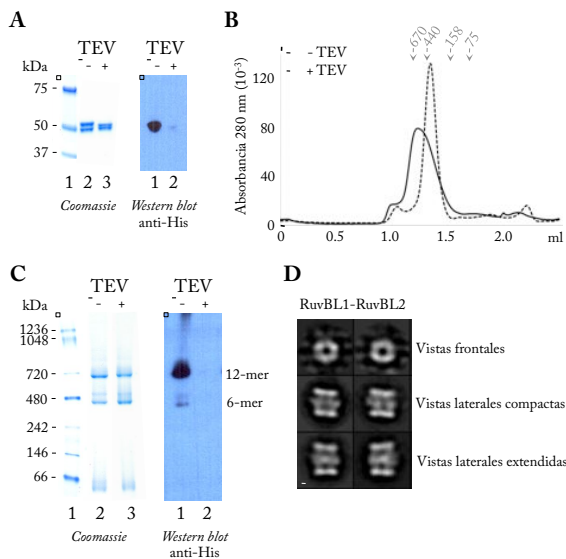
muestra antes de su fraccionamiento; carril 2, fracción de la cromatografía de exclusión molecular correspondiente a la elución de la proteína DII-RuvBL2. El dominio DII-RuvBL2 eluía como forma monomérica (25 kDa aproximadamente). Se indica la masa molecular de los estándares en la parte izquierda de los geles de poliacrilamida, y la posición de las proteínas (asterisco).

### 4.4. Análisis del efecto de la cola de histidinas en el estado oligomérico del complejo RuvBL1-RuvBL2

Algunos autores han descrito que la formación del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 puede ser un artefacto causado por la inclusión de colas de histidinas en las proteínas recombinantes (Cheung y cols., 2010b). Por ello, se estudió el efecto de estas en el estado oligomérico del complejo a través de varias aproximaciones experimentales. Se eliminó la cola de histidinas de RuvBL1 en el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 mediante digestión con la proteasa TEV. El complejo RuvBL1-RuvBL2 fue purificado mediante su inyección en una columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* para asegurar la separación de la fracción de complejo en el que no se hubiera digerido la cola de histidinas, así como la propia proteasa TEV y las colas de histidina eliminadas. Este proceso se comprobó mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue (Invitrogen)* gracias a la distinta movilidad electroforética entre las proteínas His-RuvBL1 y RuvBL1, así como mediante *western blot* con un anticuerpo anti-polihistidinas (Figura 4.7A). El complejo RuvBL1-RuvBL2 también fue fraccionado en una columna de exclusión molecular *Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare)* y se comparó el perfil cromatográfico con el del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 (Figura 4.7B). Con este experimento se comprobó que al eliminar la cola de histidinas el complejo RuvBL1-RuvBL2 eluía de la columna de exclusión molecular fundamentalmente en forma hexamérica.

En otra serie de experimentos se comparó el estado oligomérico del complejo con y sin colas de histidinas mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (*Blue Native PAGE*). Este método de separación de proteínas y complejos proteicos utiliza el agente de tinción azul brillante de Coomassie para favorecer la migración hacia el ánodo de las proteínas en estado nativo independientemente de su punto isoeléctrico (pI) intrínseco. El azul de Coomassie se une de manera no específica a las proteínas y aporta la carga negativa necesaria para la correcta migración electroforética en el gel, dependiendo esta de la masa y la forma de la proteína. Este colorante no actúa como un detergente y, por lo tanto, no altera la estructura de las proteínas. La tinción con azul de Coomassie de los geles nativos y su análisis mediante *western blot* con un anticuerpo anti-polihistidinas mostró el mismo patrón de oligomerización en ambas muestras (Figura 4.7C). De esta manera, la electroforesis en condiciones nativas demostró que la eliminación de la cola de histidinas no provocaba la desaparición del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2. Sin embargo, dicha cola sí parecía tener un efecto estabilizador del complejo, haciéndolo más resistente al desensamblaje detectado en los experimentos mediante cromatografía de exclusión molecular, probablemente debido a la dilución de la muestra durante la cromatografía.

Como control adicional, se examinó el complejo RuvBL1-RuvBL2 tras la eliminación de la cola de histidinas en el microscopio electrónico, observando partículas similares a las del complejo dodecamérico His-RuvBL1-RuvBL2 (ver apartado 4.5) (Figura 4.7D).



**Figura 4.7: Efecto de las colas de histidinas sobre el estado de oligomerización del complejo RuvBL1-RuvBL2.** La inclusión de colas de histidinas en las proteínas recombinantes ha sido descrito como causa artefactual de la formación de los oligómeros dodecaméricos de RuvBL1-RuvBL2 (Cheung y cols., 2010b). Para abordar esto, se ha realizado un estudio sobre este fenómeno mediante la combinación de diversas técnicas. **(A) Panel izquierdo:** SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue*

(*Invitrogen*) de la digestión de la cola de histidinas presente en His-RuvBL1 en el complejo His-RuvBL1-RuvBL2. Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carriles 2 y 3, antes (-TEV, His-RuvBL1-RuvBL2) y después (+TEV, RuvBL1-RuvBL2) de la digestión con la proteasa, respectivamente. **Panel derecho:** SDS-PAGE y análisis mediante *western blot* con anticuerpo anti-poli-histidinas-histidinas de la digestión de la cola de histidinas. Carriles 1 y 2, antes (-TEV, His-RuvBL1-RuvBL2) y después (+TEV, RuvBL1-RuvBL2) de la digestión con la proteasa, respectivamente. Se indica la masa molecular de los estándares en la parte izquierda de los geles de poli-acrilamida. **(B)** Cromatografía de exclusión molecular del complejo con cola de histidinas His-RuvBL1-RuvBL2 (-TEV, línea continua) y sin cola (+TEV, línea discontinua). Las flechas en la parte superior indican marcadores de masa molecular. El complejo salvaje RuvBL1-RuvBL2 eluye en fracciones correspondientes a formas hexaméricas (*6-mer*) fundamentalmente. **(C)** Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (*Blue Native PAGE*). **Panel izquierdo:** tinción con azul de Coomassie del gel nativo. Carril 1, marcadores de masa molecular (*Native Mark Unstained Protein Standard, Invitrogen*); carril 2, His-RuvBL1-RuvBL2 (-TEV); carril 3, RuvBL1-RuvBL2 (+TEV). **Panel derecho:** ensayo de *western blot* con anticuerpo anti-poli-histidinas-histidinas del gel nativo. Carril 1, His-RuvBL1-RuvBL2 (-TEV); carril 2, RuvBL1-RuvBL2 (+TEV). Se indica la masa molecular de los estándares en la parte izquierda del gel nativo. A la derecha aparecen señaladas las posiciones de las bandas de proteína correspondientes a

dodecámeros (*12-mer*) y hexámeros (*6-mer*). **(D)** Análisis mediante microscopía electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2. Se tomaron imágenes del complejo salvaje RuvBL1-RuvBL2, y se seleccionaron partículas individuales para su procesamiento bidimensional. En la figura se muestran medias 2D libres de referencia correspondientes a vistas frontales y laterales características del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2. Barra de escala, 10 nm.

#### 4.5. Microscopía electrónica de transmisión y procesamiento digital de imágenes del complejo RuvBL1-RuvBL2

El complejo His-RuvBL1-RuvBL2 purificado mediante cromatografía de exclusión molecular se observó en el microscopio electrónico (Figura 4.8A). Se seleccionó la fracción de la cromatografía correspondiente a especies de un tamaño aproximado de 600 kDa (por comparación con estándares de calibración), y se prepararon las rejillas de microscopía electrónica mediante tinción negativa con sales de uranilo. Se seleccionaron un total de 10000 partículas individuales aproximadamente de las micrografías (Figura 4.8B), las cuales fueron clasificadas en 2D mediante métodos libres de referencia (Figura 4.8C). En el análisis de las partículas y medias libres de referencia se identificaron dos tipos de vistas, unas circulares y otras con forma aproximadamente rectangular, que fueron interpretadas como vistas frontales y laterales del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 dodecamérico, respectivamente (Figura 4.8C). Las vistas frontales con forma de anillo (40 % del total de partículas) presentaban un tamaño similar al previamente descrito para el complejo de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 (Cheung y cols., 2010b; Gorynia y cols., 2011; Puri y cols., 2007; Torreira y cols., 2008). En las vistas laterales se apreciaban dos bandas de densidad electrónica más intensa en cada uno de los extremos y una región central de menor intensidad. Basándonos en las información existente de las proteínas (Cheung y cols., 2010b; Gorynia y cols., 2011; Puri y cols., 2007; Torreira y cols., 2008) y la similitud estructural con otros complejos proteicos analizados mediante microscopía electrónica, estas medias fueron interpretadas como vistas laterales de un oligómero dodecamérico formado por dos anillos.

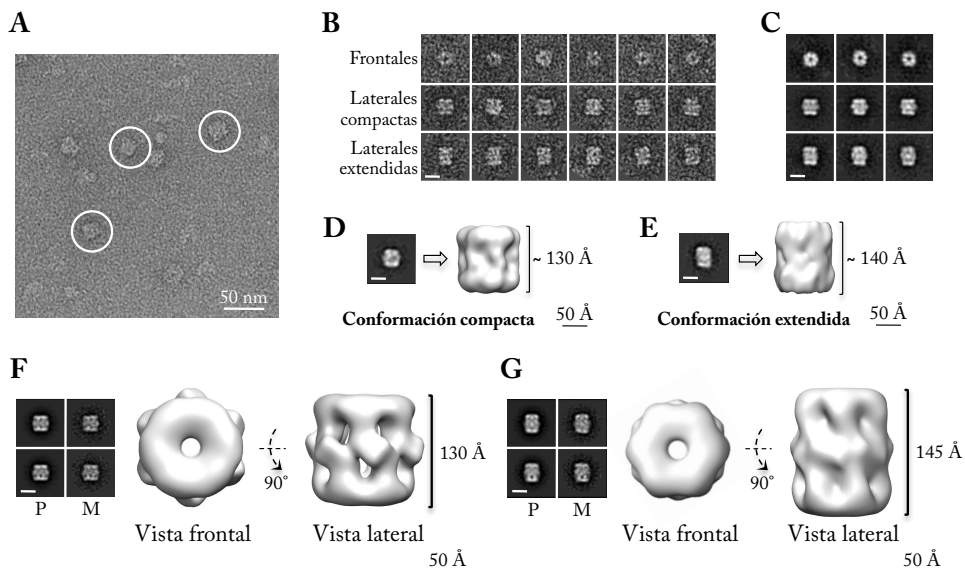
## Capítulo 4

---

Las bandas más intensas de los extremos podrían corresponder a cada uno de los núcleos AAA+ de los anillos hexaméricos, mientras que la zona de menor densidad podría corresponder a los dominios DII, de menor tamaño. El análisis exhaustivo de estas vistas laterales mostró la aparente existencia de dos tipos de vistas laterales, con una longitud más corta (37 % del total de partículas) o más larga (23 % del total de partículas) entre los anillos AAA+, las cuales fueron denominadas conformaciones “compacta” y “extendida”, respectivamente. A pesar de que la muestra analizada procedía de un pico de la cromatografía de exclusión molecular en la que las formas dodecaméricas y hexaméricas del complejo no pudieron ser completamente resueltas, esta heterogeneidad de especies no pudo ser resuelta con la metodología de procesamiento de imágenes empleado. Probablemente, las vistas frontales, en las que no se pueden distinguir aquellas procedentes de anillos sencillos o de anillos dobles, estén enriquecidas en el complejo hexamérico, ya que no se detectaron partículas correspondientes a vistas laterales de los anillos sencillos. La solución para lidiar con esta heterogeneidad fue utilizar exclusivamente vistas laterales del complejo dodecamérico para el refinamiento angular de las estructuras de microscopía electrónica.

La aparición de dos tipos de vistas laterales del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 sugería la posibilidad de la existencia de dos conformaciones distintas del complejo. Sin embargo, estas vistas también podrían ser producidas por una única estructura, en la que la vista lateral pudiera aparecer con cierto grado de inclinación. Para distinguir entre estas dos opciones se obtuvieron modelos estructurales *ab initio* mediante el método RCT (Radermacher y cols., 1987) a partir de cada una de las vistas laterales. El fundamento de este método se basa en la relación entre imágenes sin inclinar e inclinadas un cierto ángulo de un mismo objeto, a partir de la cual es posible reconstruir una estructura tridimensional *ab initio* para cada grupo de imágenes con similar morfología, vistas laterales compactas o extendidas en nuestro caso. Los dos tipos de vistas laterales, compacta y extendida, produjeron modelos *ab initio* diferentes, demostrando que dichas vistas efectivamente correspondían a dos conformaciones diferentes del complejo RuvBL1-RuvBL2 con una distancia significativamente distinta entre

las regiones correspondientes a los anillos ATPasa, haciendo que el complejo aparezca extendido a lo largo de su eje longitudinal (Figuras 4.8D y 4.8E).



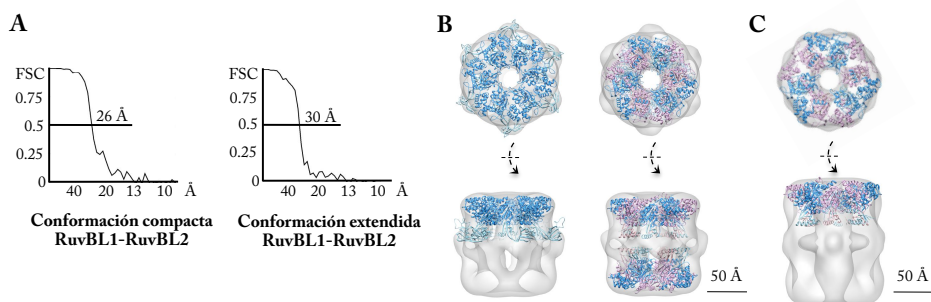
**Figura 4.8: Dos conformaciones del complejo RuvBL1-RuvBL2 obtenidas mediante microscopía electrónica.** (A) Campo de microscopía electrónica representativo obtenido para el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 mediante tinción negativa. Algunas partículas se señalan con círculos. Barra de escala, 50 nm. (B) Partículas individuales del complejo His-RuvBL1-RuvBL2 correspondientes a vistas frontales y laterales (compactas y extendidas). Barra de escala, 10 nm. (C) Medias 2D libres de referencia de His-RuvBL1-RuvBL2 correspondientes a vistas frontales y laterales (compactas y extendidas). Barra de escala, 10 nm. (D) Media 2D libre de referencia (barra de escala, 10 nm) y modelo 3D *ab initio* (barra de escala, 50 Å) obtenido mediante RCT (Radermacher y cols., 1987) para las vistas laterales en conformación compacta. (E) Media 2D libre de referencia (barra de escala, 10 nm) y modelo 3D *ab initio* (barra de escala, 50 Å) obtenido mediante RCT (Radermacher y cols., 1987) para las vistas laterales en conformación extendida. (F) Vistas frontal y lateral de la estructura compacta del dodecámero RuvBL-RuvBL2. Barra de escala, 50 Å. Se muestran dos pares proyección (P) y media 2D (M) representativos tras el refinamiento angular. Barra de escala 10 nm. (G) Vistas frontal y lateral de la estructura extendida del dodecámero RuvBL1-RuvBL2. Barra de escala, 50 Å. Se muestran dos pares proyección (P) y media 2D (M) representativos tras el refinamiento angular. Barra de escala 10 nm.

### **La estructura tridimensional del complejo RuvBL1-RuvBL2 muestra la coexistencia de dos conformaciones**

La estructura obtenida mediante RCT (Radermacher y cols., 1987) de cada una de las conformaciones, compacta y extendida, del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 fue mejorada mediante métodos de refinamiento angular utilizando un set de datos independiente. Tras la clasificación y promediado bidimensionales libres de referencia de las partículas, los sucesivos pasos de procesamiento digital de las imágenes de microscopía electrónica fueron realizados utilizando exclusivamente las partículas correspondientes a vistas laterales, dado que estas son suficientes para la reconstrucción del complejo gracias a su simetría rotacional. Las partículas correspondientes a vistas laterales compactas y extendidas (37 % y 23 % del total de partículas, respectivamente) fueron separadas en dos grupos y se refinaron de manera independiente para obtener dos estructuras, “compacta” (Figura 4.8F) y “extendida” (Figura 4.8G). Durante el refinamiento angular, las simetrías rotacional  $c_6$  y diédrica  $d_2$  fueron aplicadas, dado que la resolución de las imágenes no permitía la distinción de los monómeros de RuvBL1 y RuvBL2. Estas dos estructuras corroboraban la existencia de dos conformaciones del complejo His-RuvBL1-RuvBL2. Como control adicional, se comprobó mediante el cálculo computacional de las proyecciones para cada conformación que no era posible que un mismo volumen generara ambos tipos de vistas.

La estructura de la conformación compacta del complejo RuvBL1-RuvBL2 (Figura 4.8F), obtenida a una resolución de 26 Å (Figura 4.9A), mostraba dos regiones densas en los extremos y 6 densidades conectadas en el centro. El ajuste de las estructuras atómicas correspondientes al hexámero de RuvBL1 (Matias y cols., 2006) y el complejo truncado RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011) (Figura 4.9B) corroboraba la organización estructural descrita, mostrando un alto grado de correlación con las estructuras atómicas (correlación=0,91). El núcleo formado por el anillo AAA+ presentaba un canal central de dimensiones similares a las de la estructura atómica RuvBL1 (Matias y cols., 2006), formado

por los dominios DI y DIII de cada monómero. La región central, organizada en 6 densidades que se proyectaban ligeramente hacia fuera, fueron asignadas a los dominios DII, ausentes en el cristal del complejo RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011). Sin embargo, la estructura de la conformación extendida, a una resolución de 30 Å (Figura 4.9A), presentaba una mayor distancia entre las zonas correspondientes a las anillos AAA+. En esta estructura extendida, el ajuste de la estructura atómica del anillo de RuvBL1 (Matias y cols., 2006) dentro del mapa de microscopía electrónica presentaba una elevada correlación, pero el centro de la molécula aparecía alargado y los dominios DII notablemente extendidos. La longitud de esta conformación era claramente incompatible con la estructura atómica del complejo RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011), pudiendo ser ajustado sólo uno de los anillos en la densidad del volumen (Figura 4.9C) (correlación=0,92).



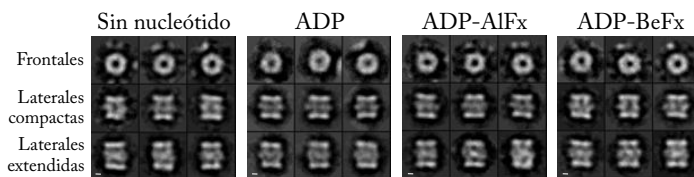
**Figura 4.9: Ajuste de estructuras atómicas en los mapas de densidad electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2 obtenidos mediante tinción negativa. (A)** Estimación de la resolución de las estructuras compacta (gráfica izquierda) y extendida (gráfica derecha) mediante el criterio FSC=0,5. **(B)** Ajuste de las estructuras atómicas de hexámero RuvBL1 (PDB 2C9O, Matias y cols., 2006) (cros-correlación = 0,91) y del dodecámero truncado RuvBL1-RuvBL2 (PDB 2XSZ, Gorynia cols., 2011) (cros-correlación = 0,91) en la estructura compacta de RuvBL1-RuvBL2. Se muestran vistas laterales y frontales de la estructura. Barra de escala, 50 Å. **(C)** Ajuste de la estructura atómica de uno de los hexámeros del dodecámero truncado RuvBL1-RuvBL2 (PDB 2XSZ, Gorynia y cols., 2011) (cros-correlación = 0,92) en la estructura extendida de RuvBL1-RuvBL2. Se muestran las vistas lateral y frontal del modelo. Barra de escala, 50 Å.

#### 4.6. Efecto de la interacción con nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos en la conformación del complejo RuvBL1-RuvBL2

Llevamos a cabo experimentos para comprobar si la transición conformacional del complejo RuvBL1-RuvBL2 podría estar modulada por la interacción con distintos nucleótidos. RuvBL1 y RuvBL2 ejercen una actividad ATPasa que se ve incrementada cuando forman complejo (Niewiarowski y cols., 2010), y la extensión del complejo a lo largo de su eje longitudinal observada mediante microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes podría suponer un mecanismo de funcionamiento de estas proteínas como motores moleculares dependientes de la hidrólisis de ATP. Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular de RuvBL1-RuvBL2 enriquecidas en formas dodecaméricas fueron incubadas con ADP-Mg<sup>2+</sup> (estado post-hidrolítico del ATP), el análogo de nucleótido ADP-BeFx (que simula el estado pre-hidrolítico), y el análogo de nucleótido ADP-AIFx (estado de transición o intermedio de la hidrólisis de ATP). Los experimentos se realizaron por duplicado, con resultados similares, y se incluyó un control en las mismas condiciones sin añadir nucleótido. Cada muestra fue analizada mediante microscopía electrónica, se seleccionaron moléculas individuales y se procesaron para su clasificación y alineamiento 2D. Con esta estrategia se determinó el porcentaje de partículas correspondientes a cada tipo de vista en cada una de las condiciones (Tabla 4.1 y Figura 4.10).

Nucleótido	Total vistas laterales	Conformación compacta		Conformación extendida	
	Nº partículas	Nº partículas	%	Nº partículas	%
No nucleótido	4286	2695	62,88	1591	37,12
ADP	4482	1702	37,97	2780	62,03
ADP-AIFx	4836	2460	50,87	2376	49,13
ADP-BeFx	3638	2038	56,02	1600	43,98

Tabla 4.1: Influencia de nucleótidos en la relación entre la conformación compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2. Se indican los porcentajes de partículas clasificadas como vistas laterales compactas o extendidas cuantificadas tras la incubación con los distintos nucleótidos.



**Figura 4.10: Influencia de nucleótidos en la relación entre las conformaciones compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2.** Medias 2D libres de referencia obtenidas para cada una de las condiciones de incubación con nucleótidos o análogos no hidrolizables de nucleótido. Se muestran imágenes medias representativas de vistas frontales, laterales compactas y laterales extendidas del complejo RuvBL1-RuvBL2. Barra de escala, 10 nm.

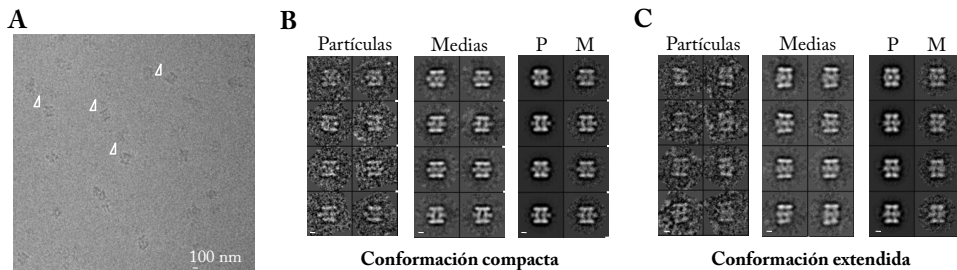
Las conformaciones compacta y extendida coexistían en todas las condiciones testadas, con un ligero incremento de partículas extendidas en la muestra con ADP. El porcentaje de partículas correspondientes a vistas frontales fue del 38 % (2644 partículas de 6930), 60 % (6730 partículas de 11212), 55 % (5804 partículas de 10640) y 58 % (4984 partículas de 8622) para cada condición (sin nucleótido, ADP, ADP-AIFx y ADP-BeFx, respectivamente). Estas vistas frontales no pudieron ser asignadas a anillos sencillos o dobles ni a conformaciones compacta o extendida, por lo que no se tuvieron en cuenta a la hora de comparar las vistas laterales en cada una de las conformaciones. La relación entre las partículas en cada una de las conformaciones (vistas laterales) no fue significativamente diferente en presencia de los distintos nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos.

### 4.7. Criomicroscopía electrónica y modelado pseudoatómico del complejo RuvBL1-RuvBL2

El complejo RuvBL1-RuvBL2 fue analizado mediante criomicroscopía electrónica de muestras vitrificadas para incrementar la resolución de los mapas obtenidos mediante microscopía electrónica de muestras teñidas negativamente y modelar las bases estructurales de la flexibilidad conformacional observada (Figura 4.11A). Se seleccionaron un total de 24500 imágenes de partículas individuales de las micrografías, que se clasificaron y alinearon bidimensionalmente. Las partículas correspondientes a vistas laterales de las conformaciones compacta y extendida (52 % y 27 % del set de datos, respectivamente) se separaron y se procesaron de manera independiente (Figuras 4.11B y 4.11C). El refinamiento angular generó estructuras a 15 y 16 Å de resolución para la conformación compacta y extendida, respectivamente (Figuras 4.12A y 4.12B). La práctica totalidad de partículas laterales fueron asignadas a las conformaciones compacta o extendida, lo que sugería que no existían otras conformaciones en la preparación, al menos en una proporción significativa. Algunas medias libres de referencia de vistas laterales presentaron una ligera asimetría entre los dos extremos de la molécula, pero al analizar este fenómeno se comprobó que dichas imágenes correspondían a vistas laterales con un cierto grado de inclinación respecto a la vista lateral perfecta. Por lo tanto, no representaban una conformación alternativa del complejo RuvBL1-RuvBL2. Las vistas frontales, de nuevo, no pudieron ser asignadas a anillos sencillos o dobles, por lo fueron excluidas del análisis.

La presencia de conformaciones intermedias entre las conformaciones compacta y extendida también fue evaluada mediante un refinamiento angular multi-referencia utilizando el comando *multirefine* (*EMAN* (Ludtke y cols., 1999) y una aproximación de máxima verosimilitud con el comando *ML3D* (*XMIPP*, (Scheres y cols., 2008). Estas pruebas sugerían que nuestro set de datos estaba únicamente representado por las conformaciones compacta y extendida. Por lo tanto, transiciones conformacionales entre

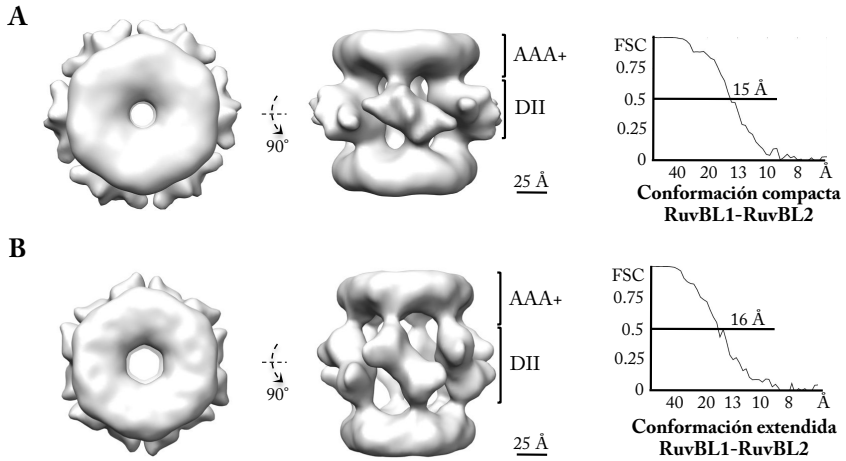
estos dos estados no estaban presentes o bien no suponían una población de partículas suficientemente representativa en el conjunto de datos totales.



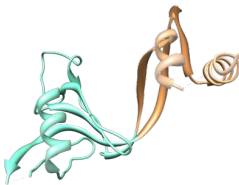
**Figura 4.11: Análisis bidimensional mediante criomicroscopía electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2.** (A) Campo de criomicroscopía electrónica. Se indican con círculos partículas representativas. El contraste está invertido respecto al resto de imágenes. Barra de escala, 100 nm. (B) Partículas individuales, medias 2D libres de referencia y comparativa entre proyección (P) y media 2D (M) obtenida tras el refinamiento angular de la conformación compacta de RuvBL1-RuvBL2. Barra de escala, 10 nm. (C) Partículas individuales, medias 2D libres de referencia y comparativa entre proyección (P) y media 2D (M) obtenida tras el refinamiento angular de la conformación extendida de RuvBL1-RuvBL2. Barra de escala, 10 nm. Durante el procesamiento de las imágenes de criomicroscopía electrónica se utilizaron exclusivamente partículas correspondientes a vistas laterales del complejo dodecamérico.

El núcleo AAA+ mostraba una excelente correlación con la estructura atómica de RuvBL1 (Matias y cols., 2006) en la conformación compacta (cros-correlación=0,87) (Figura 4.13 y 4.14A, panel izquierdo) y extendida (cros-correlación=0,87) (Figura 4.14B, panel izquierdo), por lo que a la resolución alcanzada se pueden considerar idénticos. El diámetro del canal central del anillo podría permitir el acceso de ssDNA o ssRNA, pero no dsDNA, en consonancia con los datos de la estructura atómica de RuvBL1 (Matias y cols., 2006). Las dimensiones de la estructura atómica del complejo dodecamérico truncado RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011) se ajustaron perfectamente a las de la conformación compacta (Figura 4.14A, panel derecho), mientras que para ajustar dicha

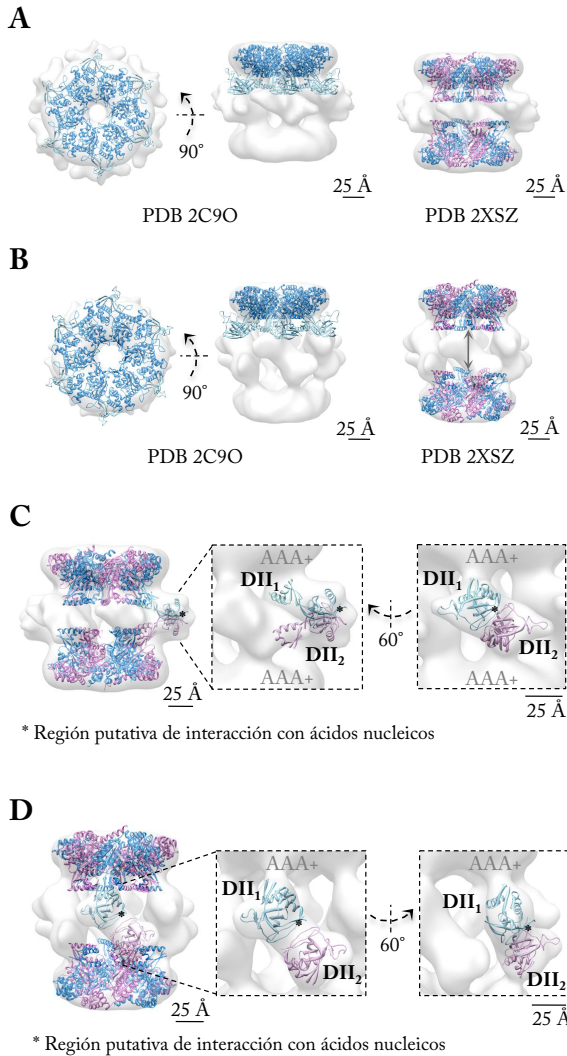
estructura en la conformación extendida fue necesario separar los anillos ATPasa sobre el eje longitudinal (cros-correlación=0,92 tras desplazar los anillos) (Figura 4.14B, panel derecho).



**Figura 4.12: Estructuras de criomicroscopía electrónica del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2.** (A) Mapa de criomicroscopía electrónica a 15 Å obtenido para la conformación compacta del dodecámero RuvBL1-RuvBL2. Se muestran las vistas frontal y lateral del complejo. Barra de escala, 25 Å. A la derecha se incluye la gráfica de estimación de la resolución del modelo mediante el criterio FSC=0,5. (B) Mapa de criomicroscopía electrónica a 16 Å de la conformación extendida del dodecámero RuvBL1-RuvBL2. Se muestran las vistas frontal y lateral del complejo. Barra de escala, 25 Å. A la derecha se incluye la gráfica de estimación de la resolución del modelo mediante el criterio FSC=0,5.



**Figura 4.13: Regiones del dominio DII de RuvBL1.** Para los experimentos de pseudomodelado atómico, el dominio DII de RuvBL1 (PDB 2C9O, Matias y cols., 2006) se dividió en sus regiones interna (naranja) y externa (verde), y se encajaron individualmente en el mapa de criomicroscopía electrónica manteniendo las conexiones y los elementos de estructura secundaria.



**Figura 4.14: Modelado pseudoatómico de la transición conformacional del complejo RuvBL1-RuvBL2.**

(A) Ajuste de las estructuras atómicas de hexámero RuvBL1 (PDB 2C9O, Matias y cols., 2006) (cross-correlación = 0,87) y del dodecámero truncado RuvBL1-RuvBL2 (PDB 2XSZ, Gorynia y cols., 2011) (cross-correlación = 0,93) en la estructura compacta del dodecámero. Barra de escala,  $25 \text{ \AA}$ . (B) Ajuste de las estructuras atómicas de hexámero RuvBL1 (PDB 2C9O, Matias y cols., 2006) (cross-correlación = 0,87) y del dodecámero truncado RuvBL1-RuvBL2 (PDB 2XSZ, Gorynia y cols., 2011) (cross-correlación = 0,92) en la estructura extendida del dodecámero. Para el ajuste del doble anillo con los dominios DII truncados los hexámeros se desplazaron sobre el eje longitudinal para acomodarlos a la densidad

electrónica del mapa. Barra de escala,  $25 \text{ \AA}$ . Los dominios DII de RuvBL1 (PDB 2C9O, Matias y cols., 2006) fueron divididos en dos partes, interna y externa, y se ajustaron a la densidad electrónica correspondiente en el mapa de criomicroscopía electrónica de la conformación compacta (C) y extendida (D). Se muestran los complejos con la estructura atómica del dodecámero truncado (PDB 2XSZ, Gorynia y cols., 2001) encajada y el ajuste de uno de los módulos de interacción entre los dominios DII de ambos hexámeros. Los paneles de la derecha

## Capítulo 4

---

corresponden a la vista aumentada de la región formada por los dominios DII. El asterisco señala la región putativa de interacción con ácidos nucleicos del dominio DII de RuvBL1, basándose en la homología estructural con la proteína RPA (Matias y cols., 2006). Barras de escala, 25 Å.

Los dominios DII aparecían en una conformación diferente en la conformación compacta y extendida, que además era distinta a la que presentaban en la estructura atómica del homohexámero de RuvBL1 (Matias y cols., 2006). Para modelar la interfase entre los dos anillos formada por los dominios DII, realizamos el ajuste del dominio DII de RuvBL1 (Matias y cols., 2006) dentro de las estructuras obtenidas mediante criomicroscopía electrónica para cada una de las conformaciones. El ajuste se realizó dividiendo el dominio DII de RuvBL1 (PDB 2C90) en sus zonas interna (residuos 120-128, 232-247 y 277-296) y externa (residuos 156-234), que se encajaron de manera independiente en la densidad electrónica correspondiente del mapa. Las posiciones de los dominios DII colocadas manualmente fueron refinadas con el programa *UCSF Chimera* (Pettersen y cols., 2004) para optimizar la correlación entre la estructura atómica y la densidad electrónica de los mapas, minimizando los movimientos de dichos dominios respecto a su posición en la estructura atómica de RuvBL1 y manteniendo la conectividad entre las regiones interna y externa. En la estructura compacta, las regiones internas de los dominios DII de subunidades opuestas aparecían próximas, siendo esta conformación compatible con la interacción entre las regiones internas de los dominios DII propuesta en la estructura atómica del complejo RuvBL1-RuvBL2 truncado (Gorynia y cols., 2011) (Figura 4.14C). Estas interacciones entre los dos anillos ofrecían, además, una única opción para seleccionar la mano de los mapas de microscopía electrónica.

Nuestro modelo estructural del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 está basado en la observación en la estructura atómica de que cada monómero de RuvBL1 de uno de los anillos interacciona con un monómero de RuvBL2 del anillo opuesto (Gorynia y cols., 2011), y sugiere que las regiones externas de los dominios DII de estas subunidades se

organizan en íntimo contacto en la conformación compacta. Este modelo implica que los dominios DII son competentes para establecer interacciones proteína-proteína, y suponen el punto principal de interacción entre los dos anillos.

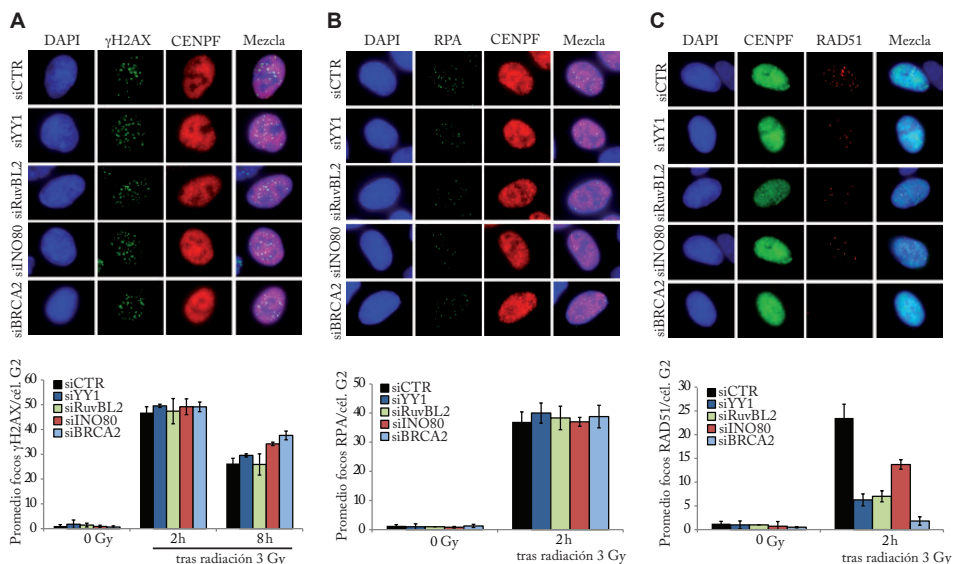
Los experimentos de ajuste de estructuras atómicas (Figura 4.13) en el mapa de densidad electrónica de la conformación extendida (Figura 4.14D) mostraron que los dominios DII aparecen extendidos y ligeramente rotados, conduciendo a la separación de los anillos AAA+ a lo largo del eje longitudinal del complejo. Algunos autores han hipotetizado sobre el papel de los dominios DII en unión de ácidos nucleicos (Matias y cols., 2006) basándose en la similitud estructural de estos dominios con la proteína RPA unida a ssDNA (Bochkarev y cols., 1997) y en la interacción de formas recombinantes del dominio DI de RuvBL1 a distintos sustratos de DNA (Matias y cols., 2006). La superposición de los residuos 183-23 de RPA con los residuos 127-233 del dominio DII de RuvBL1 y la comparación de ambas estructuras sugiere que la región propuesta para la interacción con ácidos nucleicos (Figura 4.14C, marcado con un asterisco), podría presentar un distinto grado de accesibilidad y exposición al potencial sustrato en cada una de las conformaciones. Este cambio conformacional produce una mayor exposición de las regiones putativas de interacción con ácidos nucleicos de los dominios DII, pasando de formar un contacto más íntimo en la conformación compacta (Figura 4.14C, marcado con un asterisco en RuvBL1), a una superficie de interacción menor en la conformación extendida (Figura 4.14D, marcado con un asterisco en RuvBL1).

### Parte II: Caracterización bioquímica y estructural de la proteína Yin Yang 1 (YY1)

#### 4.8. YY1 actúa en recombinación homóloga mediante la promoción de filamentos de RAD51

La proteína YY1 ha sido previamente implicada en recombinación homóloga en el contexto del complejo remodelador de cromatina INO80, pero el mecanismo a través del cuál actúa en este proceso aún es desconocido (Wu y cols., 2007). Para investigar este fenómeno, se estableció una colaboración con el grupo de la Dra. Jessica A. Downs. Los experimentos descritos en el apartado 4.8 fueron realizados en su laboratorio, con el constante intercambio de información entre los dos grupos, y el diseño conjunto de los experimentos y la interpretación de los resultados. Se transfectaron células con siRNA (*small interfering RNA*) para deplecionar la expresión de la proteína YY1 y, tras tratar las células con radiación ionizante para producir roturas de doble hebra en el DNA, se analizó el efecto producido en distintas etapas del proceso de recombinación homóloga. El proceso de recombinación homóloga está restringido a las fases S y G2 del ciclo celular en mamíferos, por lo que realizamos una inmunotinción con CENPF para identificar células en fase G2 y medimos la acumulación de factores de respuesta a daños en el DNA en los focos inducidos por la radiación ionizante. En este ensayo observamos que el número de focos que contenían histonas H2AX fosforiladas ( $\gamma$ H2AX) no se veía afectado por la depleción de YY1 2 horas después de inducir el daño genómico (Figuras 4.15A), lo cual sugiere que las etapas iniciales de detección y señalización del daño no se veían modificadas. A las 8 horas, sin embargo, se apreciaba un leve incremento, aunque reproducible, en estos focos, que podría reflejar las roturas del DNA sin reparar como resultado del defecto observado en recombinación homóloga (Figura 4.15A, panel inferior) (Wu y cols., 2007). Las células deplecionadas para BRCA2 (*Breast cancer type 2 susceptibility protein*), las cuales son defectivas en recombinación

homóloga, mostraban un mayor incremento, aunque moderado, en la formación de focos de daño al tiempo de 8 h (Figura 4.15A).



**Figura 4.15: YY1 y RuvBL2 actúan durante la fase G2 del ciclo celular para promover la formación de filamentos de RAD51, pero no de  $\gamma$ H2AX o RPA, en respuesta a daño en el DNA.** (A) Las células A549 fueron transfectadas con siRNA control (siCTR) o siRNA dirigidos contra YY1, RuvBL2, Ino80 o BRCA2, se irradiaron (3 Gy), y fueron recogidas tras 2 u 8 h. Las células fueron inmunoteñidas para  $\gamma$ H2AX y CENPF (para identificar células en fase G2). Se cuantificaron y promediaron los focos de  $\gamma$ H2AX por células en fase G2 (panel inferior). (B) Células transfectadas como en (A) fueron irradiadas (3 Gy), recogidas tras 2 h, e inmunoteñidas para RPA y CENPF. Se cuantificaron y promediaron los focos de RPA por células en fase G2 (panel inferior). (C) Células tratadas como en (A) fueron inmunoteñidas para RAD51 y CENPF, y se cuantificaron y promediaron los focos de RAD51 por células en fase G2 (panel inferior). Todos los datos (A-C) corresponden al promediado de >3 experimentos. Barras de error, desviación estándar (s.d., *standard deviation*).

Una vez detectado el daño, la zona del DNA donde se ha producido la rotura es digerida (etapa de resección) para generar extremos 3' de DNA de cadena sencilla (ssDNA) solapantes que son recubiertos por la proteína RPA. Lo siguiente que examinamos fue la formación de focos de RPA en las células en fase G2 irradiadas tras la depleción de YY1, pero no se detectaron diferencias respecto a las células control (Figura 4.15B), indicativo de que no había un efecto pronunciado en el proceso de resección en estas células. Tras la resección se produce el reemplazamiento de las moléculas de RPA por filamentos de RAD51 mediado por BRCA2 sobre los extremos de ssDNA; los filamentos de RAD51 llevan a cabo la búsqueda de homología en el DNA y el proceso de invasión de la hebra (Thompson, 2012). Las células deplecionadas para BRCA2 presentan focos normales de  $\gamma$ H2AX y RPA, pero poseen defectos en la formación de focos de RAD51 tras ser irradiadas (Figura 4.15C). De manera similar a la pérdida de BRCA2, se detectó un importante defecto en la formación de filamentos de RAD51 en células deplecionadas para YY1 y RuvBL2, aunque no de forma tan pronunciada como en el caso de las células deplecionadas para BRCA2 (Figuras 4.15A-C). Todos estos resultados sugieren que YY1, así como RuvBL2, promueven la formación de filamentos de RAD51, bien participando en la transición de filamentos de RPA a filamentos de RAD51, o bien previniendo la disociación de nuevos filamentos de RAD51.

### **La depleción de INO80 y RuvBL2 reproduce los defectos en recombinación homóloga provocados por la depleción de YY1**

La función de la proteína YY1 como factor de transcripción podría ser responsable del estímulo en la formación de filamentos de RAD51 observada mediante la regulación de genes involucrados en este proceso. De manera alternativa, YY1 podría funcionar de manera directa en los focos de RAD51 en conjunto con INO80, ya que este remodelador de cromatina se localiza en sitios de daño en el DNA (Gospodinov y cols., 2011; Kashiwaba y cols., 2010). Para examinar si YY1 actuaba con INO80, se deplecionaron dos subunidades del complejo INO80, RuvBL2 y la subunidad catalítica Ino80, y examinamos la respuesta

celular al daño en el DNA. En este ensayo se observó que la depleción de RuvBL2 o Ino80 no afectaba a la formación de focos de  $\gamma$ H2AX y RPA (Figura 4.15A-B y 4.15E), aunque se detectó un leve incremento en los focos de  $\gamma$ H2AX a las 8 h en las células deplecionadas para Ino80, de manera similar a los observado al deplecionar YY1. Sin embargo, sí se apreció un descenso significativo en la formación de filamentos de RAD51 tanto en las células deplecionadas para RuvBL2 como para las de Ino80 (Figura 4.15C). El defecto en las células con depleción de RuvBL2 fue similar al observado en las células deplecionadas para YY1, mientras que el efecto en la depleción de Ino80 fue menos pronunciado. Estos datos podrían sugerir que YY1 y RuvBL2 son capaces de llevar a cabo funciones de manera independiente del complejo INO80 en esta etapa del proceso de recombinación homóloga. El conjunto de datos obtenidos en los experimentos celulares sugieren un papel activo YY1 en la formación de filamentos de RAD51, posiblemente independiente de su actividad como regulador transcripcional.

### **YY1, RuvBL2 e INO80 actúan en la misma vía para promover la formación de focos de RAD51**

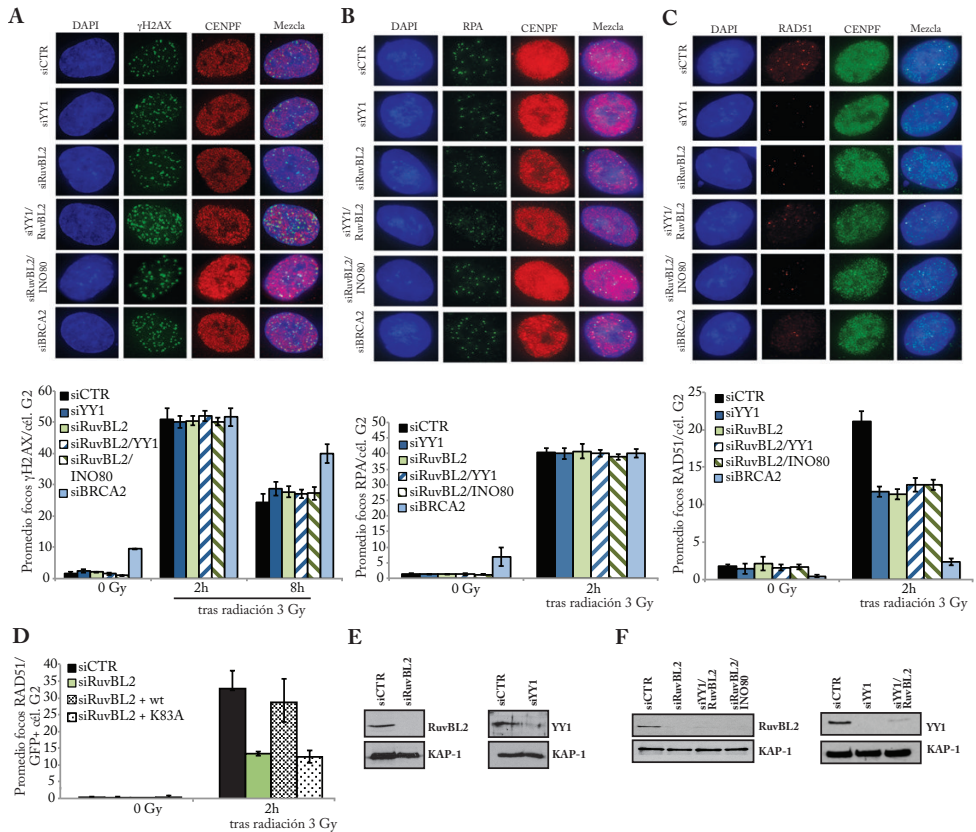
Los resultados obtenidos sugerían la cooperación de YY1, RuvBL2 (y posiblemente RuvBL1) e Ino80 en alguna de las etapas del proceso de recombinación homóloga. Estos datos son consistentes con observaciones previas en las que la codepleción de YY1 y la subunidad catalítica Ino80 no producía un defecto aditivo en el proceso de recombinación homóloga, en comparación con lo que ocurría al deplecionar cada proteína de manera individual (Wu y cols., 2007), indicativo de que ambas proteínas actúan conjuntamente. Además, el complejo RuvBL1-RuvBL2 ha sido previamente implicado en la formación de filamentos de RAD51 (Gospodinov y cols., 2009). Sin embargo, nosotros observamos que el defecto producido por la depleción de Ino80 fue menos pronunciado que el detectado en la depleción de YY1 o RuvBL2; además, el complejo RuvBL1-RuvBL2 está asociado a otros complejos remodeladores de cromatina que también están involucrados en respuesta a daños

## Capítulo 4

---

en el DNA (Seeber y cols., 2013). En otro estudio, sin embargo, no se observó ningún defecto en la formación de filamentos de RAD51 tras la exposición a irradiación en células deplecionadas para Ino80 (Gospodinov y cols., 2011).

Todos estos datos no resultan suficientes para determinar si YY1, RuvBL1-RuvBL2 e INO80 actúan de manera conjunta durante el proceso de recombinación homóloga. Por ello, decidimos analizar la formación de focos de  $\gamma$ H2AX, RPA y RAD51 en células en fase G2 tras ser irradiadas en las que se codepleccionaron las proteínas YY1 y RuvBL2, o RuvBL2 e Ino80 (Figura 4.16). Si estas subunidades estuvieran actuando en etapas diferentes del proceso de recombinación homóloga, sería predecible un incremento en los daños no reparados en el DNA cuando son codeplecionadas, provocando un incremento en los focos de  $\gamma$ H2AX. Sin embargo, en estos experimentos no detectamos un incremento en los focos  $\gamma$ H2AX ni RPA en las células codeplecionadas para YY1/RuvBL2 y RuvBL2/Ino80 en comparación con las células deplecionadas para las proteínas individuales (Figuras 4.16A-B y 4.16F), lo que sugería que no estaban realizando funciones separadas en el proceso de recombinación homóloga. Además, el defecto en la formación de filamentos de RAD51 tras la irradiación de las células tampoco era sustancialmente distinto en las células codeplecionadas respecto a las deplecciones individuales (Figura 4.16C). En conjunto, estos resultados indicaban que YY1, RuvBL2 e Ino80 podrían estar actuando de manera conjunta para promover la formación de filamentos de RAD51 en respuesta al daño en el DNA.



**Figura 4.16: Influencia de RuvBL2 e Ino80 en la formación de filamentos de RAD51 mediada por YY1.** (A) Las células A549 fueron transfectadas con siRNA control (siCTR) o siRNA dirigido contra YY1, RuvBL2, Ino80 o BRCA2, se irradiaron (3 Gy), se recogieron 2 u 8 h después y fueron inmunoteñidas para  $\gamma$ H2AX y CENPF (para identificar células en fase G2). Se cuantificaron y promediaron los focos de  $\gamma$ H2AX por células en fase G2 (panel inferior). (B) Células transfectadas como en (A) fueron irradiadas (3 Gy), recogidas tras 2 h, e inmunoteñidas para RPA y CENPF. Se cuantificaron y promediaron los focos de RPA por células en fase G2 (panel inferior). (C) Células tratadas como en (A) fueron inmunoteñidas para RAD51 y CENPF, se cuantificaron y promediaron los focos de RAD51 por células en fase G2 (panel inferior). Todos los datos (A-C) corresponden al promediado de >3 experimentos. Barras de error, s.d. (D) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA dirigido contra RuvBL2 y GFP, GFP-RuvBL2 o GFP-RuvBL2<sup>K83A</sup>, se irradiaron (3 Gy), recogieron e inmunoteñieron para RAD51 y CENPF. Se

representa el promedio de 3 experimentos de focos de RAD51 por células G2 positivas para GFP. Barras de error, s.d. (E) Análisis mediante *western blot* de extractos celulares totales de células A549 transfectadas con el siRNA indicado. Los paneles inferiores anti-KAP1 se muestran como controles. (F) Análisis mediante *western blot* de extractos celulares totales de células A549 transfectadas con las construcciones simples o dobles de siRNA indicadas. Los paneles inferiores anti-KAP1 se muestran como controles.

### La actividad ATPasa de RuvBL2 es necesaria para la formación de focos de RAD51

El defecto en la formación de filamentos de RAD51 observado en ausencia de la subunidad RuvBL2 del complejo INO80 podría ser debido a la pérdida de la integridad del complejo INO80 y/o ser provocado por la pérdida de la actividad ATPasa del sistema RuvBL1-RuvBL2, imprescindible para el correcto funcionamiento del remodelador de cromatina. Para investigar el papel de la actividad enzimática de RuvBL2 en la formación de los filamentos de RAD51 tras la exposición de las células a la radiación, utilizamos una mutación puntual en el motivo Walker A de RuvBL2 que abolía la capacidad de hidrolizar ATP de la proteína, pero que no afectaba a su plegamiento (Maslon y cols., 2010). Para ello, generamos una construcción para la expresión de GFP-RuvBL2 resistente a siRNA, y se introdujo la mutación puntual (K83A) en esta construcción (Figura 4.16D). Transfectamos las células con las construcciones mutante y salvaje (además de con un control de GFP) junto con el siRNA para la depleción de RuvBL2, y analizamos la formación de focos de  $\gamma$ H2AX y RAD51 en células positivas para GFP en fase G2 (Figura 4.16D). En este experimento encontramos que la construcción salvaje era capaz de complementar el defecto en la formación de filamentos de RAD51 en las células deplecionadas para RuvBL2 (Figura 4.16D). En contraste, la construcción mutada no complementaba este defecto, indicando que la actividad ATPasa de RuvBL2 es necesaria para esta etapa de la recombinación homóloga (Figura 4.16D).

El conjunto de estos resultados apuntaba a la participación de YY1 en el proceso de recombinación homóloga en cooperación con el complejo INO80 y sus subunidades RuvBL1-RuvBL2, situando su acción en una etapa concreta: la promoción de la formación de filamentos de RAD51.

### 4.9. Caracterización bioquímica de YY1: expresión, purificación y determinación de la capacidad de interacción con ácidos nucleicos de la proteína YY1 recombinante

Para explorar las bases estructurales del papel de YY1 en procesos de reparación del DNA, la proteína humana se expresó de manera recombinante en bacterias incluyendo una cola de histidinas en el extremo amino terminal (His-YY1) (Figura 4.17A). La purificación de His-YY1 se realizó utilizando una columna *HisTrap HP (GE Healthcare)* (Figura 4.17B), seguida de una cromatografía de intercambio iónico en una columna *Mini S PC 3.2/3 (GE Healthcare)* (Figura 4.17C). El análisis mediante SDS-PAGE mostró un elevado grado de pureza de la muestra, la cual migraba con una movilidad electroforética aparente mayor a lo esperado para una proteína de 44 kDa (65-68 kDa), como había sido descrito previamente, debido a su composición aminoacídica (Shi y cols., 1991).

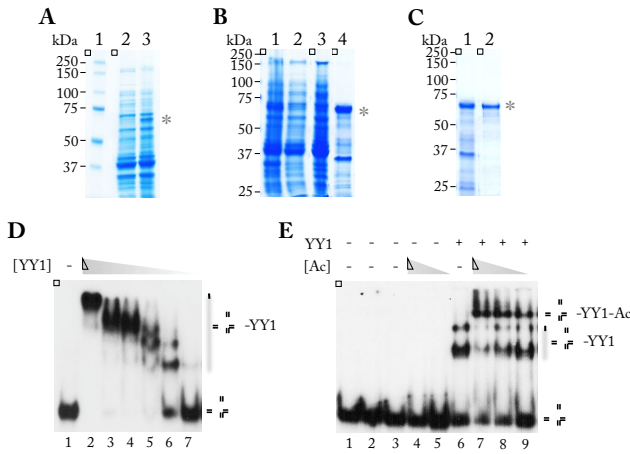
Para analizar la funcionalidad de la proteína recombinante purificada, se realizaron experimentos de interacción con ácidos nucleicos mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), utilizando como sustrato estructuras sintéticas cruciformes (*Holliday junction*) que reproducen intermediarios generados durante el proceso de recombinación homóloga (Figura 4.17D). Se tituló en un primer experimento la interacción con una *Holliday junction* de brazos de 40 pares de bases (pb) (J3) (6 pmol) con concentraciones crecientes de proteína (15, 31, 62, 125, 250 y 500 nM). En estas condiciones se detectaron múltiples bandas de DNA retardado, que podrían ser debidas a la

## Capítulo 4

---

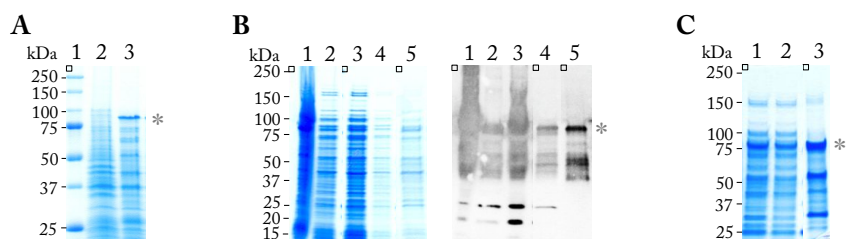
interacción cooperativa de varios monómeros de la proteína o a la formación de oligómeros de manera dependiente de DNA (Figura 4.17D). Estos datos estaban de acuerdo con lo descrito previamente (Wu y cols., 2007). La constante de afinidad de la proteína por el sustrato de DNA ( $K_{app}$ ) determinada a partir de cuatro experimentos independientes fue 100 nM. También se comprobó la interacción de YY1 con una *Holliday junction* de brazos de 25-pb (HJ\_25), observándose de nuevo la aparición de diversas bandas de retardo (Figura 4.17E). En este experimento se comprobó la especificidad de la interacción mediante la adición de un anticuerpo anti-YY1 (H-10 X, *Santa Cruz Biotechnologies*), apareciendo bandas de super-retardo (*super shift*) correspondientes al complejo proteína-DNA-anticuerpo (Figura 4.17E), lo cual demostró que el retardo del DNA observado era debido a la interacción con la proteína YY1.

De manera paralela se expresó la proteína YY1 con una etiqueta His-GST en el extremo amino terminal (His-GST-YY1) (Figura 4.18A). La purificación de esta construcción se abordó utilizando una resina de afinidad por GST (Figura 4.18B) y también a través de la cola de histidinas con una columna *HisTrap HP* (*GE Healthcare*) (Figura 4.18C). En la purificación con resina de afinidad por GST el rendimiento en la obtención de proteína purificada fue muy bajo, detectándose mediante *western blot* con un anticuerpo específico anti-YY1 (Figura 4.18B, panel derecho). La cromatografía de afinidad en columna de níquel no ofrecía un buen grado de pureza (Figura 4.18C). El protocolo de purificación de His-GST-YY1 no se continuó optimizando, puesto que los resultados obtenidos con esta construcción no parecían mejorar la pureza ni el rendimiento alcanzados en el caso de la proteína His-YY1.



**Figura 4.17: Purificación y caracterización bioquímica de la proteína humana YY1. (A)** SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) de la expresión de His-YY1 recombinante en células BL21 Origami (DE3). Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, extracto de células no inducidas; carril 3, extracto de células inducidas

con IPTG. **(B)** SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) del primer paso de purificación de His-YY1 mediante cromatografía de afinidad en columna *HisTrap HP* (*GE Healthcare*). Carril 1, extracto celular de proteínas totales; carril 2, extracto celular de proteínas solubles; carril 3, fracción de proteínas no retenidas en la columna; carril 4, elución mediante gradiente de imidazol de la columna de níquel. **(C)** SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (*Invitrogen*) del segundo paso de purificación de His-YY1 mediante cromatografía de intercambio iónico en columna *Mini S PC 3.2/3* (*GE Healthcare*). Carril 1, proteína cargada en la columna; carril 2, elución de la columna mediante gradiente de concentración creciente de NaCl. Se indica la posición de la proteína (asterisco). **(D)** Experimentos de interacción de His-YY1 purificada con intermediarias de recombinación homóloga. La proteína His-YY1 fue incubada con un sustrato de 4 brazos *Holliday junction* (J3) y las reacciones se analizaron en geles del 6 % de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. 6 pmol de DNA *Holliday junction* (carril 1) fueron titulados con concentraciones crecientes de His-YY1 (carriles 2-7, 500, 250, 125, 62, 31 y 15 nM, respectivamente). A la derecha se indican las posiciones del DNA libre y de las bandas desplazadas por YY1 (complejos DNA-YY1). **(E)** Los experimentos de *super shift* con un anticuerpo específico demostraron la especificidad de la interacción entre la proteína His-YY1 y el DNA. Carril 1, control de DNA *Holliday junction* (HJ\_25); carriles 2-5, 2, 1, 0,5 y 0,25 µg de anticuerpo anti-YY1, respectivamente; carril 6, control proteína His-YY1 (100 ng); carriles 7-9, incubación de la proteína His-YY1 (100 ng) con 2, 1 y 0,5 µg de anticuerpo anti-YY1 (Ac), respectivamente. A la derecha se indican las posiciones del DNA libre, los complejos DNA-YY1 y el complejo DNA-YY1-anticuerpo.



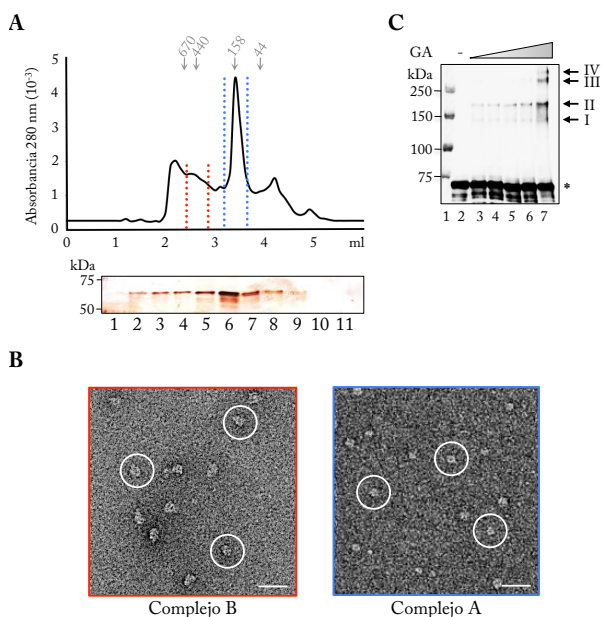
**Figura 4.18: Pruebas de expresión y purificación de His-GST-YY1.** La proteína YY1 se clonó como proteína de fusión con GST, incluyendo además una cola de histidinas en el extremo amino terminal (His-GST-YY1). **(A)** SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue (Invitrogen)* de la expresión de His-GST-YY1 recombinante en células BL21 (DE3). Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, extracto de células no inducidas; carril 3, extracto de células inducidas con IPTG. **(B)** SDS-PAGE, tinción con *SimplyBlue (Invitrogen)* (panel izquierdo) y *western blot* con anticuerpo anti-YY1 (panel derecho) de la purificación de His-GST-YY1 mediante resina *Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences)*. Carril 1, extracto celular de proteínas totales; carril 2, extracto celular de proteínas solubles; carril 3, fracción de proteínas no retenidas en la resina; carril 4, elución con L-glutatión reducido de las proteínas unidas a la resina. **(C)** SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue (Invitrogen)* de la purificación de His-GST-YY1 mediante columna de níquel. Carril 1, extracto celular de proteínas totales; carril 2, extracto celular de proteínas solubles; carril 3, elución mediante gradiente de imidazol de la columna de níquel. El rendimiento y pureza obtenidos en la purificación de His-GST-YY1 no fueron los esperados, por lo que no se realizaron más experimentos con esta proteína. Se indica la posición de la proteína a la derecha de los geles con un asterisco.

#### 4.10. Caracterización del estado de oligomerización de YY1

El patrón de bandas observado en los experimentos de interacción con DNA sugería la interacción de varios monómeros de la proteína YY1 con la estructura de DNA *Holliday junction*, por lo que se comenzó a caracterizar el estado de oligomerización de la proteína. En una primera serie de experimentos mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna *BioSep-SEC-S4000 (Phenomenex)*, se detectó un máximo de absorbancia correspondiente a una masa molecular de entre 100-150 kDa (por comparación con estándares de calibración, *GE Healthcare*) (Figura 4.19A). Este pico contenía la proteína YY1, como demostró su análisis mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata (Figura 4.19A, panel inferior); además, en el gel se detectó proteína en fracciones de la cromatografía correspondientes a masas moleculares de entre 200-300 kDa (por comparación con estándares de calibración, *GE Healthcare*) (Figura 4.19A, panel inferior), aunque el máximo de absorbancia en el cromatograma no era tan pronunciado. Estos datos apuntaban a la existencia de, al menos, dos tipos de oligómeros de la proteína YY1 sin la adición de ningún tipo de ácido nucleico. Ambos máximos de absorbancia se analizaron en el microscopio electrónico, y se tomaron imágenes de muestras teñidas con sales uranilo (Figura 4.19B).

El pico correspondiente a 100-150 kDa, denominado complejo A, mostraba moléculas de un tamaño homogéneo y con una forma característica de círculo (Figura 4.19B, panel derecho). Este oligómero podría corresponder a la asociación de 2 o 3 monómeros de YY1, según la información de masa molecular estimada en la cromatografía de filtración en gel. Al analizar el pico de 200-300 kDa, nombrado complejo B, se observaron moléculas elongadas con aproximadamente el doble de tamaño de las del complejo A (Figura 4.19B, panel izquierdo).

**Figura 4.19:**  
**Caracterización del estado de oligomerización de la proteína YY1.** (A) Cromatografía de exclusión molecular de la proteína His-YY1 y análisis de las fracciones recogidas mediante SDS-PAGE y tinción con plata. En la parte superior del cromatograma se indican con flechas los volúmenes de elución de distintos marcadores de masa molecular. La proteína eluye mayoritariamente en un



máximo de absorbancia a 280 nm de aproximadamente 100-150 kDa (líneas azules punteadas), pero también aparece en fracciones correspondientes a 200-300 kDa (líneas rojas punteadas). (B) Diferentes fracciones de la cromatografía de exclusión molecular de His-YY1 en (A) fueron analizadas en el microscopio electrónico. Se muestran campos representativos para las fracciones de las dos regiones del cromatograma donde eluía His-YY1 (100-150 kDa, complejo A, marco azul; 200-300 kDa, complejo B, marco rojo). Los círculos indican moléculas representativas de cada una de las muestras. Barras de escala, 250 Å. (C) SDS-PAGE y *western blot* con anticuerpo anti-YY1 de la proteína His-YY1 tras entrecruzamiento químico con glutaraldehído (GA). Carril 1, marcadores de masa molecular (*Bio-Rad*); carril 2, control sin GA; carriles 3-7 corresponden a 1, 2, 5, 15 y 30 min de incubación con GA, respectivamente. La banda inferior corresponde al monómero de His-YY1 (marcado con un asterisco). Tras el entrecruzamiento, aparecen bandas con masas moleculares múltiples del monómero de His-YY1 (indicadas con flechas).

Para comprobar la relación entre los complejos A y B de YY1 descubiertos, se realizaron experimentos de filtración en gel en los que las fracciones correspondientes al pico del complejo B se reinyectaron en la columna y se fraccionaron en la mismas condiciones. En estos ensayos se observó el enriquecimiento en el complejo A, posiblemente por efecto de la dilución introducida por la técnica, acompañado de una disminución del máximo de absorbancia de complejo B (datos no mostrados). Estos datos apuntaban a la conversión del complejo B en A de manera dependiente de la concentración, por lo que probablemente el oligómero de mayor tamaño estaba formado por la asociación de varias unidades del complejo A, de acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica en las que el complejo B aparecía como moléculas del doble de tamaño que el complejo A.

De manera adicional se caracterizó el patrón de oligomerización de la proteína YY1 mediante la determinación de su movilidad electroforética en SDS-PAGE y *western blot* tras ser sometida a entrecruzamiento químico con glutaraldehído (Figura 4.19C). La incubación de la proteína con una concentración de glutaraldehído del 0,005 % (v/v) permite la formación de enlaces covalentes intermoleculares entre los distintos monómeros de proteína que componen las formas oligoméricas, ofreciendo información acerca de la tendencia de oligomerización de la proteína. El experimento se realizó titulando el proceso de entrecruzamiento a lo largo del tiempo, y en condiciones de baja temperatura (en hielo) para evitar una excesiva reactividad, ya que la proteína presentaba cierta tendencia a la agregación. El entrecruzamiento con glutaraldehído mostró la aparición de una banda correspondiente a un oligómero que migraba con el doble de masa molecular del monómero, así como bandas de mayor tamaño. Esta información cuadraba con los datos de la cromatografía de exclusión molecular y microscopía electrónica, y todos ellos apuntaban a la existencia de, al menos, dos oligómeros mayoritarios de la proteína YY1. El complejo A, de menor tamaño, podría corresponder a una forma dimérica (o trimérica). Por otro lado, el complejo B podría resultar de la asociación de 2 (o más) moléculas del complejo A, resultando en la formación de un tetrámero (o especies de mayor tamaño).

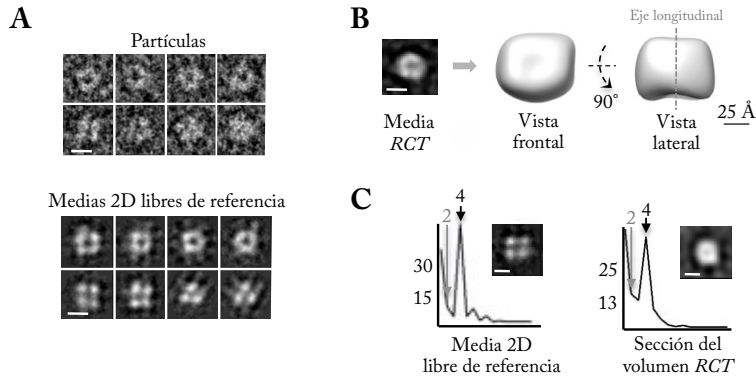
### La proteína YY1 ensambla un núcleo dimérico con forma acampanada

Las fracciones de la cromatografía de filtración en gel correspondiente al complejo A de YY1 fueron observadas en el microscopio electrónico, mostrando moléculas con forma cuadrada con unas dimensiones de 60 x 50 Å y una región central de menor densidad electrónica (Figura 4.20A). El análisis de la simetría rotacional de estas moléculas, analizado sobre las medias libres de referencia obtenidas, mostraba un máximo de simetría rotacional 2 y 4, compatible con la oligomerización de 2 o 4 monómeros de YY1 (Figura 4.20C, panel izquierdo).

La reconstrucción tridimensional del complejo A de YY1 comenzó con la obtención de modelos *ab initio* mediante el método RCT (Radermacher y cols., 1987) (Figura 4.20B). Este método se aplica sobre aquellas imágenes de moléculas clasificadas como un mismo tipo de vista del complejo y utilizando las imágenes de esas mismas moléculas tras inclinar la muestra 45°, por lo que ofrece información estructural *ab initio*, aunque a baja resolución, del espécimen. Se generaron varios modelos iniciales mediante este método, todos ellos muy similares y compatibles con las imágenes experimentales de la molécula. La forma general de estos modelos era cuadrangular y con una región central de menor densidad. El análisis de la simetría rotacional de secciones transversales de estos volúmenes iniciales mostraban máximos de simetría 2 y 4 (Figura 4.20C, panel derecho). Dado que la masa molecular estimada del complejo A de YY1 (100-150 kDa) era compatible con un dímero o trímero, pero no un tetrámero ni estructuras de mayor orden, las imágenes de microscopía electrónica sugerían que este complejo A podría corresponder a un dímero de YY1.

El análisis bidimensional de las imágenes de microscopía electrónica del complejo A de YY1, así como los experimentos bioquímicos, apuntaban a una posible dimerización de esta proteína para formar este complejo. Para abordar esta hipótesis, se resolvió la estructura tridimensional del complejo A mediante procesamiento digital de imágenes de microscopía electrónica. Se seleccionaron 16362 imágenes de partículas individuales, que se alinearon y

clasificaron siguiendo métodos libres de referencia (*EMAN* (Ludtke y cols., 1999), *EMAN2* (Tang y cols., 2007), *XMIPP* (Scheres y cols., 2008)).



**Figura 4.20: Microscopía electrónica del complejo A de YY1.** (A) Partículas y medias 2D libres de referencia obtenidas para el complejo A de YY1 purificado mediante cromatografía de exclusión molecular. Barra de escala, 5 nm. (B) Vistas frontal y lateral de la estructura *ab initio* del complejo A de YY1 obtenida mediante el método de RCT (Radermacher y cols., 1987). Barra de escala, 25 Å. El panel izquierdo muestra la media 2D libre de referencia correspondiente. Barra de escala, 5 nm. (C) Análisis de los espectros de simetría rotacional de una media 2D libre de patrón representativa (gráfica izquierda) y de la sección a lo largo del eje longitudinal de la estructura de YY1 obtenida mediante RCT en (B). Barra de escala, 5 nm. En ambos casos aparece un máximo correspondiente a simetría rotacional 4, y una importante contribución de simetría rotacional 2 (indicado con flechas), compatibles con una estructura tetramérica o dimérica.

Para la reconstrucción tridimensional, se utilizaron los modelos obtenidos mediante RCT (Radermacher y cols., 1987) como volúmenes de partida, y se refinaron siguiendo un protocolo en el que no se impuso ningún tipo de simetría (Figura 4.21A). El volumen refinado sin simetría convergió en una estructura con dos densidades que presentaban cierto grado de simetría rotacional 2. Además, la masa molecular estimada para este volumen, determinada por el número de vóxeles ocupados por la reconstrucción y asumiendo una

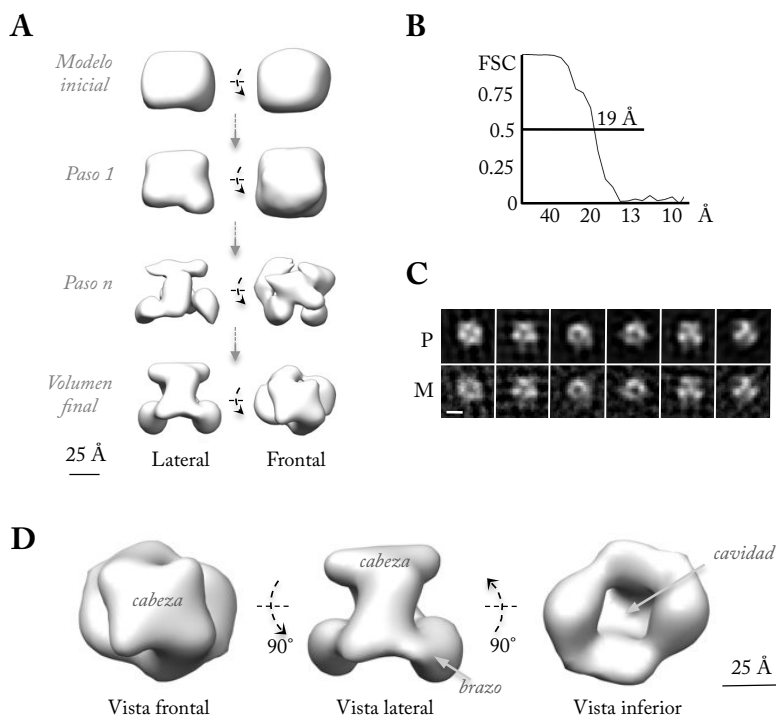
## Capítulo 4

---

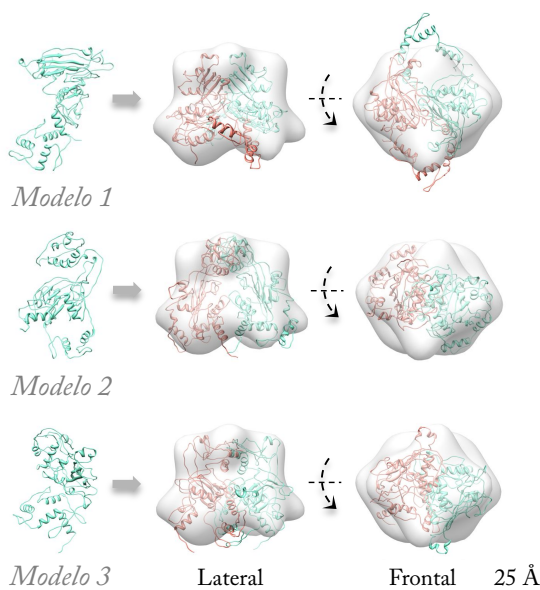
densidad media para las proteínas ( $1.35 \text{ g/cm}^3$ ) (Matthews, 1968), fue de aproximadamente 100 kDa, que sólo era compatible con una especie dimérica. Se impuso a continuación la simetría rotacional 2 en los sucesivos pasos de refinamiento angular, obteniéndose la estructura del complejo A de YY1 a  $19 \text{ \AA}$  de resolución (Figura 4.21B). Las proyecciones del volumen reconstruido eran compatibles con los datos experimentales (Figura 4.21C), así como con las medias 2D libres de referencia.

La estructura del dímero de YY1 (complejo A) mostraba dos regiones estructurales (Figura 4.21D); la zona superior (denominada “cabeza”) era compacta y contenía la mayoría de los contactos entre los monómeros, lo que sugiere que podría actuar manteniendo la estructura del dímero. La zona inferior contenía dos zonas denominadas “brazos” con algunos contactos laterales, y en cuyo centro se alojaba una pequeña cavidad.

Como control adicional, se realizaron predicciones de estructura terciaria del monómero de la proteína YY1 utilizando el servidor *ROBETTA* (<http://robetta.bakerlab.org>; Kim y cols., 2004), obteniéndose varios modelos tridimensionales, todos con una puntuación (*score*) baja debido a la limitada similitud de las regiones central y amino terminal de YY1 con otras proteínas. Estos modelos, sin embargo, resultaron útiles para estimar la ocupación de cada monómero de YY1 en la estructura de microscopía electrónica del dímero (Figura 4.22). En todos los casos, independientemente de qué modelo fuera utilizado, el mapa de microscopía electrónica de YY1 claramente sólo podía alojar como máximo dos monómeros, apoyando firmemente la reconstrucción de un dímero obtenida.



**Figura 4.21: Estructura del complejo A de YY1.** (A) Evolución de la estructura del complejo A de YY1 durante el proceso de refinamiento angular. La estructura *ab initio* (inicial) obtenida mediante RCT (Radermacher y cols., 1987) fue refinada sin imponer restricciones de simetría (Paso 1 y n) hasta su convergencia. Los últimos pasos de refinamiento se realizaron aplicado simetría rotacional  $c_2$  (Volumen final). Se muestran vistas frontales y laterales de las estructuras. Barra de escala, 25 Å. (B) Estimación de la resolución del modelo refinado del complejo A de YY1 mediante el criterio FSC=0,5. (C) Proyecciones (P) del volumen refinado y medias 2D (M) de las partículas individuales asignadas a cada orientación del complejo A de YY1. Barra de escala, 5 nm. (D) Diferentes vistas de la estructura dimerica obtenida para el complejo A de YY1. Barra de escala, 25 Å. Las regiones características del complejo, denominadas como “cabeza” y “brazos” aparecen indicadas.



**Figura 4.22: Ajuste de modelos atómicos de YY1 en la estructura del complejo A.** Los 3 modelos (en verde) generados con el servidor *ROBETTA* (Kim y cols., 2004) que presentaban un mejor valor de correlación fueron encajados en la estructura del dímero de YY1. En todos los casos, el volumen contenido en el mapa de microscopía electrónica sólo podía albergar dos monómeros (verde/naranja). Se muestran vistas frontales y laterales del complejo con las estructuras atómicas ajustadas. Barra de escala, 25 Å.

### YY1 multimeriza mediante la asociación de dímeros

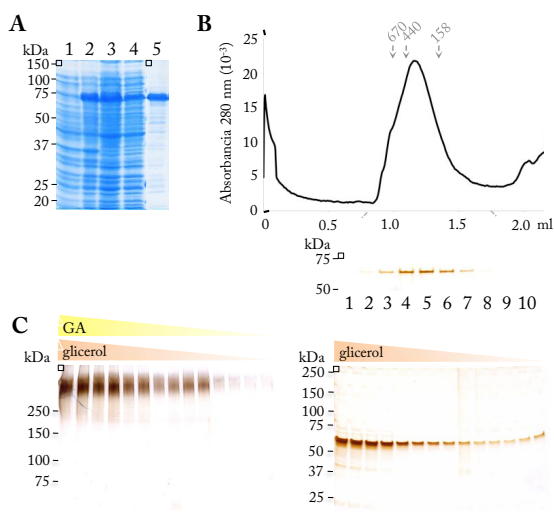
Las formas oligoméricas de mayor tamaño de la proteína YY1 (complejo B) también fueron analizadas en el microscopio electrónico. Para ello, primero era necesario incrementar la concentración de la proteína para desplazar el equilibrio de oligomerización hacia la formación de estos oligómeros, puesto que las preparaciones iniciales no eran suficientemente homogéneas. Sin embargo, no fue posible concentrar la muestra His-YY1, ya que tendía a la agregación durante el proceso. Para solventar este problema, se diseñó una nueva construcción para producir la proteína YY1 con una secuencia Strep-II-tag en el extremo amino terminal (Strep-II-YY1). Esta construcción se expresó en células de *E. coli* y se purificó en un único paso de cromatografía de afinidad utilizando una columna *StrepTrap HP* (*GE Healthcare*) (Figura 4.23A), obteniéndose un mayor rendimiento que en el caso de la proteína con la cola de histidinas, alcanzando una concentración 10  $\mu\text{M}$ . El análisis

mediante cromatografía de exclusión molecular de la proteína purificada mostró un único máximo de absorbancia (correspondiente a una masa molecular de aproximadamente 200-300 kDa, por comparación con estándares de calibración), aparentemente sin agregados (Figura 4.23B). Este pico fue analizado en el microscopio electrónico, comprobándose que estaba compuesto mayoritariamente por una especie correspondiente al complejo B de la proteína YY1, aunque contenía un porcentaje minoritario del complejo A. Con esta aproximación conseguimos aislar y purificar los oligómeros del complejo B (mayoritariamente) con un rendimiento mayor para poder llevar a cabo los estudios estructurales.

En paralelo se llevó a cabo un protocolo de purificación y entrecruzamiento químico mediante el protocolo de *GraFix* (Kastner y cols., 2008) en la muestra de proteína Strep-II-YY1 para estabilizar los oligómeros correspondientes al complejo B. La separación de la proteína en el gradiente de glicerol/glutaraldehído no resolvió las dos formas oligoméricas del complejo, observándose únicamente la banda correspondiente al complejo B en los geles SDS-PAGE (Figura 4.23C). Además, una parte importante de la proteína agregó y precipitó durante el proceso, apareciendo en las fracciones del fondo del tubo. Las fracciones 3, 5 y 7 de ambos gradientes (sin y con glutaraldehído) se analizaron en el microscopio electrónico, apreciándose especies de tamaños y formas similares a lo previamente observado, por lo que el tratamiento con el agente de entrecruzamiento aparentemente no había distorsionado las propiedades estructurales de la molécula. Sin embargo, las imágenes de microscopía electrónica obtenidas a partir de las muestras entrecruzadas ofrecían una mejor calidad, presentando mejor tinción y contraste en comparación con la proteína sin entrecruzar, además de presentar menos formas agregadas. En todas las fracciones del gradiente analizadas aparecían ambos oligómeros de la proteína YY1, probablemente porque el gradiente no resolvía ambas especies. La fracción 5 con el tratamiento *GraFix* fue analizada en el microscopio electrónico y se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica que se utilizaron para el subsecuente procesamiento digital de imágenes y reconstrucción tridimensional.

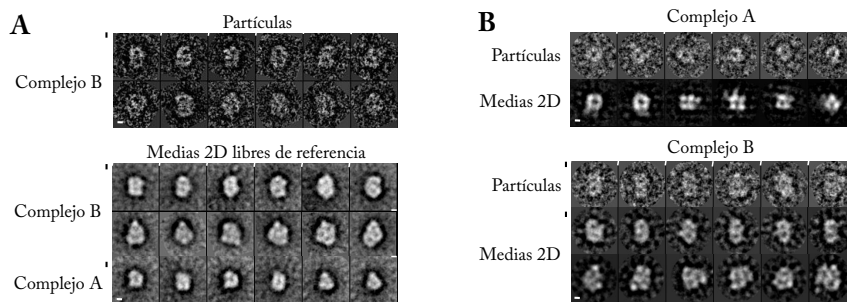
**Figura 4.23: Optimización de las condiciones de purificación del complejo B de YY1.**

El cDNA de la proteína YY1 se clonó con la secuencia Strep-II-tag en el extremo amino terminal (Strep-II-YY1) para mejorar el rendimiento en la obtención de proteína recombinante. (A) SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue (Invitrogen)* de la expresión y purificación de Strep-II-YY1. Carril 1, extracto de células no inducidas; carril 2,



extracto de células inducidas con IPTG; carril 3, fracción de proteínas solubles tras la lisis celular; carril 4, proteínas no retenidas en la columna *StrepTrap Hp (GE Healthcare)*; carril 5, elución de la columna de afinidad. (B) Cromatografía de exclusión molecular de la proteína Strep-II-YY1 purificada. En la parte superior del cromatograma se indican con flechas los volúmenes de elución de distintos marcadores de masa molecular. La proteína eluye en un volumen correspondiente a masas moleculares de 200–300 kDa, compatible con el oligómero de YY1 previamente identificado como complejo B en la muestra His-YY1. El panel inferior corresponde al análisis de las fracciones de la cromatografía mediante SDS-PAGE y tinción con plata. (C) Estabilización del complejo B de YY1 mediante el método *GraFix* (Kastner y cols., 2008; Stark, 2010). El complejo fue fraccionado en un gradiente de glicerol/glutaraldehído (panel izquierdo) y analizado mediante SDS-PAGE y tinción con plata. Como control se fraccionó la muestra en las mismas condiciones en un gradiente de glicerol sin agente entrecruzador (panel derecho).

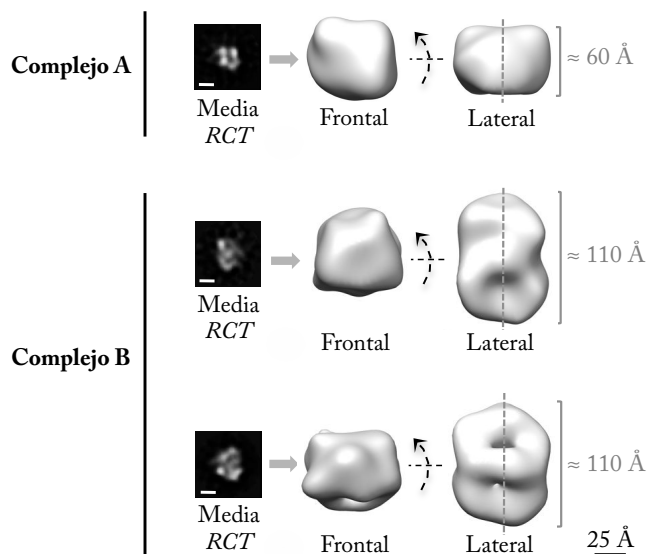
Las imágenes para ambos tipos de complejos, A y B, obtenidos con la muestra Strep-II-YY1, eran similares a las que se habían observado al analizar la muestra His-YY1 (Figura 4.24A y 4.24B).



**Figura 4.24: Análisis bidimensional mediante microscopía electrónica del complejo B formado por Strep-II-YY1.** (A) Partículas y medias 2D libres de referencias obtenidas para la muestra Strep-II-YY1 tras su estabilización mediante *GraFix* (Kastner y cols., 2008; Stark, 2010). La muestra, enriquecida en el complejo B, presenta un pequeño porcentaje de partículas correspondientes al complejo A. Barra de escala, 10 nm. (B) Partículas y medias 2D libres de referencia del complejo A de Strep-II-YY1 (panel superior) y del complejo B de His-YY1 (panel inferior). Barra de escala, 10 nm. Ambas muestras (His- y Strep-II-YY1) producen vistas muy similares de los complejos oligoméricos A y B que forman, descartando cualquier posible artefacto estructural promovido por las etiquetas incluidas en las proteínas recombinantes.

Para resolver la heterogeneidad presente en la muestra (mezcla de complejo A y B de YY1), se obtuvieron modelos *ab initio* mediante el método RCT (Radermacher y cols., 1987) para los distintos tipos de vistas obtenidos (Figura 4.25). Las imágenes de moléculas alargadas (80 %) dieron lugar a estructuras de unos 100 Å de longitud (Figura 4.25, panel superior), mientras que las partículas más pequeñas con forma cuadrada (20 %) generaron modelos similares a los obtenidos para el complejo A, corroborando la hipótesis de la mezcla de ambos oligómeros en nuestra preparación (Figura 4.25, panel central). Un tercer tipo de vista alargada, con una anchura algo mayor al resto, también generó un volumen alargado similar al asignado como complejo B (Figura 4.25, panel inferior). Por lo tanto, interpretamos que la mayor parte de las partículas del set de datos podían ser compatibles

con dos especies distintas de la proteína YY1, complejo A y B, siendo este último una especie alargada de, aproximadamente, el doble de tamaño del complejo A.



**Figura 4.25: YY1 multimeriza mediante la asociación de dímeros.** Tres estructuras *ab initio* representativas obtenidas mediante el método de RCT (Radermacher y cols., 1987) para el complejo B de Strep-II-YY1. Se muestran vistas frontales y laterales de los complejos. Barra de escala, 25 Å. Las medias 2D utilizadas para generar cada uno de los modelos aparecen en los paneles de la izquierda. Barra de escala, 5 nm. La muestra presenta una mezcla de ambos oligómeros, A y B, a pesar del enriquecimiento en el complejo B. La arquitectura y dimensiones de la estructura del complejo B es compatible con la formación de un ensamblado a partir de la asociación de unidades diméricas de YY1.

A pesar de múltiples esfuerzos, la resolución de la estructura tridimensional del complejo B de la proteína YY1 no pudo ser mejorada utilizando los modelos *ab initio* como partida para el proceso de refinamiento angular. La mayores dificultades fueron la imposibilidad de asignar cada tipo de imagen de las moléculas a un complejo tipo A o tipo B, y las

ambigüedades para definir los ejes de simetría del complejo. Sin embargo, las medias 2D libres de referencia, así como los modelos a baja resolución del complejo B, mostraban claramente que estos oligómeros eran una especie distinta generada por la asociación de estructuras más simples (Figura 4.25). La interconversión entre el complejo A y B de YY1 dependiente de la concentración de proteína observada en los experimentos de filtración en gel sugiere la hipótesis de que el complejo B resulte de la asociación de dímeros de YY1. Los datos de microscopía electrónica 2D y 3D obtenidos para este complejo podrían ser compatibles con la asociación lateral de dos dímeros de YY1, o alternativamente estos dímeros podrían interactuar a través de las regiones denominadas “brazos” (*back-to-back*) para generar el oligómero de mayor orden.

### **Las formas oligoméricas de YY1 interactúan con estructuras cruciformes de DNA de manera independiente de secuencia**

La interacción de la proteína YY1 con el DNA está mediada por los cuatro motivos de dedos de cinc de su región carboxilo terminal, que reconocen de manera específica una secuencia de DNA de doble cadena (CCAT/ACAT) para regular la transcripción de ciertos genes. Además, la proteína también es capaz de reconocer e interactuar con estructuras de DNA intermediarias en procesos de recombinación homóloga (Wu y cols., 2007). En este trabajo hemos caracterizado la interacción de los oligómeros de YY1 con estas estructuras más complejas de DNA utilizando sustratos de DNA *Holliday junction* conteniendo la secuencia consenso que reconoce la proteína y sin dicha secuencia. Los experimentos realizados con *Holliday junction* de brazos de 40-pb, que no contenía esta secuencia, y de 25-pb, con la secuencia consenso, apuntaban a que la interacción con estructuras cruciformes podría realizarse sin el reconocimiento de dicha secuencia consenso (Figura 4.17D y 4.17E). Por ello, realizamos experimentos de interacción con DNA de tipo *Holliday junction* utilizando este caso los oligómeros de la proteína Strep-II-YY1 (mayoritariamente complejo B), comparando la influencia de la presencia de la secuencia consenso en el sustrato de DNA (Figura 4.26). Se utilizaron las fracciones de una columna de filtración en gel *Superdex 200*

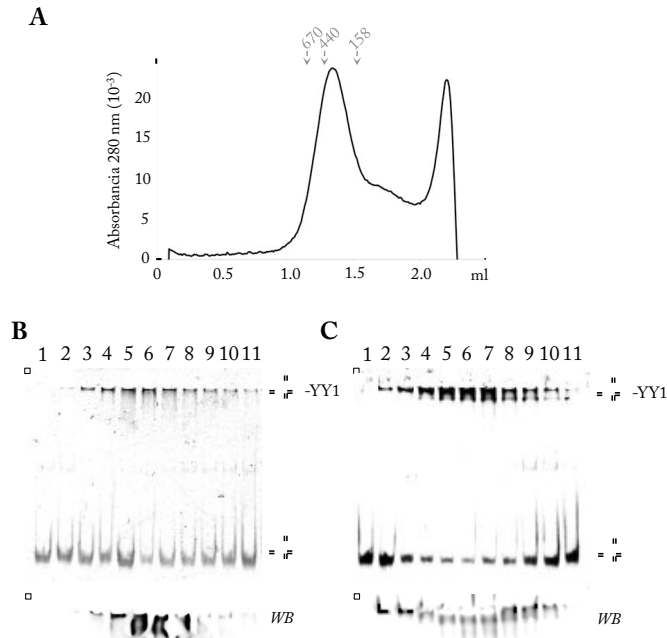
## Capítulo 4

---

PC 3.2/30 (GE Healthcare), cuyo máximo de absorbancia correspondía al complejo B de la proteína (Figura 4.26A), para realizar los experimentos de interacción con DNA utilizando como sustratos de DNA dos estructuras *Holliday junction* con brazos de 25-pb de idéntica secuencia salvo por la variación en la secuencia específica CCAT. La comparativa de los retardos en el DNA provocados por la interacción con los oligómeros de la proteína mostró que el reconocimiento de las estructuras cruciformes se producía con independencia de la secuencia específica CCAT, observando un retardo muy similar en ambos casos (Figura 4.26B y 4.26C). Además, la formación del complejo YY1-*Holliday junction* correlacionaba con la presencia de la proteína en cada fracción, como se detectó mediante ensayos de *western blot* con un anticuerpo anti-YY1, donde comigraba la señal detectada del DNA con la de la proteína (Figura 4.26B y 4.26C, paneles inferiores). El máximo retardo del DNA aparecía en las fracciones de la filtración en gel correspondientes al máximo de absorbancia, el cual estaba enriquecido fundamentalmente en el complejo B de YY1, aunque también contenía complejo A. Estos resultados mostraron que los oligómeros de la proteína YY1 son capaces de reconocer e interactuar con sustratos de DNA intermediarios de procesos de recombinación, independientemente de su secuencia.

### 4.11. Los oligómeros de YY1 interactúan con el complejo RuvBL1-RuvBL2 *in vitro*

La interacción entre las proteínas YY1 y RuvBL1-RuvBL2 dentro del contexto del complejo remodelador de cromatina INO80 ha sido descrita recientemente, demostrando dicha interacción tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* (Wu y cols., 2007). Para caracterizar estructuralmente el complejo formado por YY1 y RuvBL1-RuvBL2 se realizaron experimentos de interacción de las proteínas *in vitro*. Se utilizó el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 previamente purificado, que contenía las formas dodecaméricas y hexaméricas (Figura 4.4). Se incubaron las proteínas Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2



**Figura 4.26: El complejo B de YY1 interactúa con estructuras de DNA *Holliday junction* de manera independiente de secuencia. (A)** Cromatografía de exclusión molecular de la proteína Strep-II-YY1 purificada. En la parte superior del cromatograma se indican con flechas los volúmenes de elución de distintos marcadores de masa molecular. **(B)** Las fracciones de la cromatografía de filtración en gel fueron utilizadas en experimentos EMSA de interacción con un sustrato sintético de DNA de 4 brazos con la secuencia específica de YY1 (CCAT) (HJ\_25\_sp). Carriles 1-11, fracciones de la cromatografía de exclusión molecular en (A). El panel inferior muestra el análisis del gel nativo corrido durante más tiempo mediante *western blot* (WB) con un anticuerpo anti-YY1. **(C)** EMSA como en (B) pero utilizando un sustrato sintético de DNA de 4 brazos sin la secuencia específica de YY1 (HJ\_25\_no\_sp). Carriles 1-11, fracciones de la cromatografía de exclusión molecular en (A). El panel inferior muestra el análisis del gel nativo corrido durante más tiempo mediante *western blot* (WB) con un anticuerpo anti-YY1. En los geles nativos se indican las posiciones del DNA *Holliday junction* libre y de los complejos DNA-YY1.

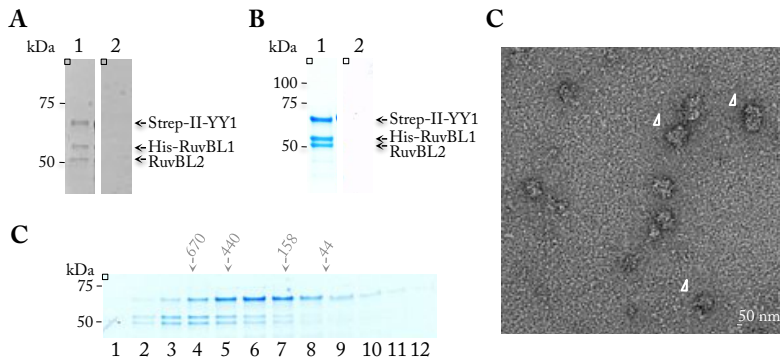
## Capítulo 4

---

y se analizó la interacción mediante cromatografía de afinidad en una columna *StrepTrap HP* (GE Healthcare). Como control se cargó el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 en la misma columna en ausencia de Strep-II-YY1. La interacción de las proteínas se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con *Oriole Fluorescent Gel Stain* (Bio-Rad) (Figura 4.27A), comprobando que la cromatografía de afinidad en la que se retiene Strep-II-YY1 reportaba la elución de las proteínas His-RuvBL1 y RuvBL2 sólo cuando Strep-II-YY1 estaba presente, en comparación con el experimento control. His-RuvBL1 y RuvBL2 eluían en una relación molar 1:1, lo cual sugería que interaccionan con YY1 como un complejo heterooligomérico.

Adicionalmente, se llevó a cabo la incubación de los extractos solubles de células productoras de Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2 y se realizó el experimento en las mismas condiciones, observándose un resultado idéntico (Figura 4.27B). Con esta aproximación se consiguió obtener una mayor concentración del complejo eluído de la columna de afinidad, permitiendo la realización de experimentos posteriores en los que la concentración de muestra era limitante.

El complejo Strep-II-YY1-His-RuvBL1-RuvBL2 se separó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna *BioSep-SEC-S4000* (Phenomenex). Sin embargo, las proteínas eluían en máximos diferentes, como se observó en el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (Invitrogen), indicativo de que el complejo se había desensamblado durante la separación cromatográfica (Figura 4.27C). Debido a esto, se analizó el complejo eluído directamente de la columna de afinidad mediante microscopía electrónica, pero la heterogeneidad de las imágenes obtenidas y la inexistencia de información estructural previa hizo imposible la identificación del complejo YY1-RuvBL1-RuvBL2 para su caracterización estructural (Figura 4.27D).

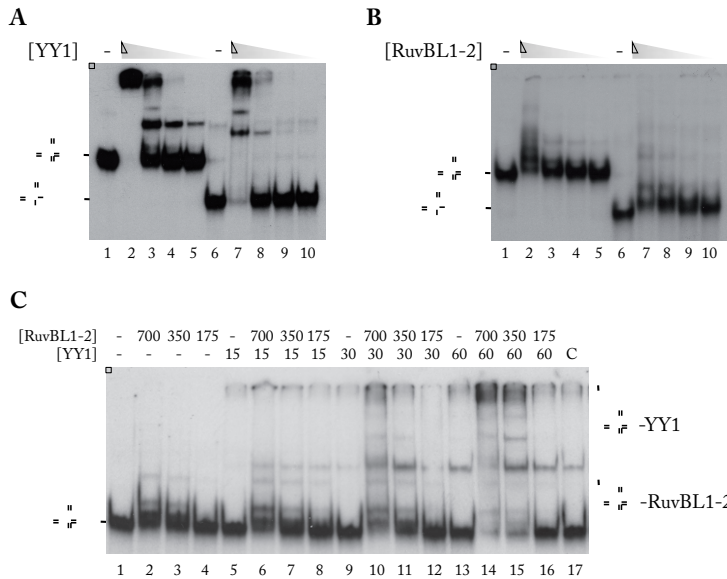


**Figura 4.27: Los oligómeros de YY1 interactúan *in vitro* con el complejo RuvBL1-RuvBL2.** (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *Oriole Fluorescent Gel Stain* (Bio-Rad) de la elución de una columna *StrepTrap HP* (GE Healthcare). Carril 1, coelución de Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2 tras la incubación de las proteínas purificadas; carril 2, elución de un experimento control en el que se cargó el complejo His-RuvBL1-RuvBL2 purificado en ausencia de Strep-II-YY1. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (Invitrogen) de un experimento similar al de (A) pero utilizando los extractos solubles de células productoras de His-RuvBL1-RuvBL2 y Strep-II-YY1. Carril 1, coelución de Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2 tras la incubación de los extractos de proteínas solubles de células productoras de cada proteína y purificación mediante cromatografía de afinidad; carril 2, elución de un experimento control en el que se cargó en la columna el extracto de His-RuvBL1-RuvBL2 en ausencia de Strep-II-YY1. A la derecha de los geles se indican las posiciones de cada una de las proteínas. (C) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con *SimplyBlue* (Invitrogen) de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular en columna *BioSep-SEC-S4000* (Phenomenex) del complejo Strep-II-YY1-His-RuvBL1-RuvBL2 purificado en (B). Las flechas en la parte superior del gel indican el volumen de elución de marcadores de masa molecular. (D) Campo de microscopía electrónica para el experimento de copurificación de YY1-RuvBL1-RuvBL2 descrito en (B). Se indican moléculas individuales con círculos. Barra de escala, 50 nm.

### YY1 coopera con RuvBL1 y RuvBL2 en la interacción con intermediarios de recombinación

Basándonos en los resultados obtenidos, analizamos la interacción de los oligómeros de YY1 con distintas estructuras de DNA que asemejan intermediarios de recombinación, y cómo se ve afectada esta interacción por la presencia de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2, contando para ello con la ayuda de la Dra. Silvia Ayora y la Dra. Eva Torreira. Se llevaron a cabo experimentos EMSA utilizando como sustratos de DNA una estructura cruciforme *Holliday junction* (J3) y una estructura de 3 hebras similar a los denominados *D-loops* formados durante el proceso de recombinación homóloga. En este caso, los oligonucleótidos para generar estos sustratos carecían de la secuencia específica de reconocimiento de YY1. Se detectó la interacción de YY1 con el DNA *Holliday junction*, como ya habíamos visto previamente, y también con la estructura de 3 hebras (Figura 4.28 Figura 4.28A). Además, se estimaron las constantes de afinidad ( $K_{app}$ ) de la proteína para cada sustrato de DNA, obtenidas de cuatro experimentos independientes, siendo de 120 y 148 nM para *Holliday junction* y sustrato de 3 hebras, respectivamente.

También se realizaron estos ensayos con el complejo RuvBL1-RuvBL2, observándose una interacción muy débil con ambos sustratos (la  $K_{app}$  estimada de tres experimentos independientes fue de 0,9 y 1  $\mu$ M para *Holliday junction* y sustrato de 3 hebras, respectivamente), aunque algo mayor con la estructura *Holliday junction*, similar a lo observado en el caso de la proteína YY1 (Figura 4.28B). El uso de diferentes nucleótidos o análogos de nucleótido no ofreció un resultado distinto en estos experimentos (datos no mostrados). Finalmente, se llevaron a cabo experimentos EMSA con la mezcla e incubación de las tres proteínas, utilizando como sustrato de DNA la estructura *Holliday junction*. En este caso se observó un incremento en la interacción con la *Holliday junction* respecto a la unión detectada con las proteínas individualmente, un efecto sinérgico que sugería la cooperación entre YY1 y RuvBL1-RuvBL2, probablemente como un complejo tripartito, para reconocer e interactuar con el intermediario de recombinación (Figura 4.28C).



**Figura 4.28: YY1 y RuvBL1-RuvBL2 cooperan en la interacción con intermediarios de recombinación homóloga.** (A) Experimentos de interacción de Strep-II-YY1 con sustratos de DNA ramificados. Las reacciones contenían 0, 240, 120, 60 o 30 nM de proteína y 0,3 nM de las especies de DNA: *Holliday junction* (J3) (carriles 1-5, respectivamente) y sustrato de 3 hebras (carriles 6-10, respectivamente). (B) Experimentos de interacción de His-RuvBL1-RuvBL2 con sustratos de DNA ramificados. Las reacciones contenían 0, 1,4, 0,7, 0,35 o 0,17  $\mu$ M de proteína y 0,3 nM de las especies de DNA: *Holliday junction* (J3) (carriles 1-5, respectivamente) y sustrato de 3 hebras (carriles 6-10, respectivamente). (C) EMSA de la estructura *Holliday junction* J3 (0,3 nM) en presencia de las concentraciones indicadas de las proteínas Strep-II-YY1 y His-RuvBL1-RuvBL2 (nM) (carriles 1-16); carril 17 (C), control del sustrato de DNA incubado con 60 nM Strep-II-YY1 y un exceso de BSA para demostrar que la mejora en la interacción con el ácido nucleico no era producida por la estabilización por efecto de la concentración de proteína en el medio. La incubación de las proteínas se llevó a cabo en hielo, y tras la adición del DNA se incubó la mezcla durante 30 min a 37 °C. Las reacciones se separaron en geles nativos del 6 % de poliacrilamida y fueron visualizadas mediante autorradiografía. La incubación de YY1 con el complejo RuvBL1-RuvBL2 produce un incremento en la interacción con la sustrato cruciforme.



**Discusión**



## Capítulo 5

### Discusión

La regulación de la accesibilidad al DNA es fundamental en procesos celulares como la replicación, la transcripción o la reparación de daños génicos. La maquinaria proteica que lleva a cabo estos procesos necesita establecer interacciones con el DNA, y el extremado grado de compactación del material genético supone una barrera para ello. Los mecanismos que controlan la dinámica de la estructura de la cromatina incluyen la modificación de histonas y complejos que remodelan esta arquitectura de manera dependiente de ATP. El estudio estructural de los remodeladores de cromatina es imprescindible para comprender los mecanismos moleculares a través de los que actúan. Sin embargo, estos complejos suelen estar formados por múltiples subunidades, formando un ensamblado de gran masa molecular de composición variable y dinámica, lo que dificulta en muchas ocasiones la obtención de estructuras atómicas mediante cristalografía de rayos X de los complejos intactos. Por ello, la mayoría de los datos estructurales a resolución atómica descritos hasta el momento corresponden a subunidades individuales o módulos de los complejos remodeladores. La visión del conjunto estructural puede ser aportada por otras técnicas, como la microscopía electrónica de transmisión, cuyos menores requerimientos en la cantidad y concentración de muestra, así como la ilimitación en el tamaño del espécimen, hacen que sea útil en el estudio estructural de grandes complejos macromoleculares. En este trabajo se ha utilizado la microscopía electrónica para la caracterización estructural de varias subunidades del complejo remodelador de cromatina INO80. Este remodelador de cromatina juega un papel fundamental en transcripción, pero también en procesos de reparación de daños en el DNA. La caracterización del submódulo RuvBL1-RuvBL2 resulta interesante por su implicación en muchos otros complejos macromoleculares de diversas funciones, mientras que la recientemente descrita subunidad YY1 parece establecer el nexo entre el remodelador y su participación en recombinación homóloga.

### 5.1. Arquitectura del complejo humano RuvBL1-RuvBL2

RuvBL1 y RuvBL2, dos ATPasas de la familia AAA+ relacionadas con la helicasa procariota RuvB, han sido implicadas en procesos celulares esenciales como la reparación de daños en el DNA, transcripción, remodelación de cromatina, NMD y en el ensamblaje de la telomerasa, entre otros. Esta diversidad funcional viene dada por su contribución en grandes complejos macromoleculares, entre los que se incluyen el complejo SWR1 y otros remodeladores de cromatina relacionados, por la asociación y regulación de factores de transcripción, como c-myc y  $\beta$ -catenina, complejos implicados en la biogénesis de snoRNP, y en la maduración del complejo telomerasa (Huen y cols., 2010; Jha & Dutta, 2009; Rosenbaum y cols., 2013). A pesar de su importancia fisiológica, la estructura de RuvBL1 y RuvBL2 está rodeada de diversas controversias (Cheung y cols., 2010a; Cheung y cols., 2010b; Gorynia y cols., 2011; Torreira y cols., 2008). Como resultado, las bases moleculares que rigen sus funciones celulares son desconocidas. En este trabajo, a través de aproximaciones bioquímicas y estructurales, se han obtenido datos en la caracterización del complejo humano RuvBL1-RuvBL2 que clarifican muchas de estas cuestiones.

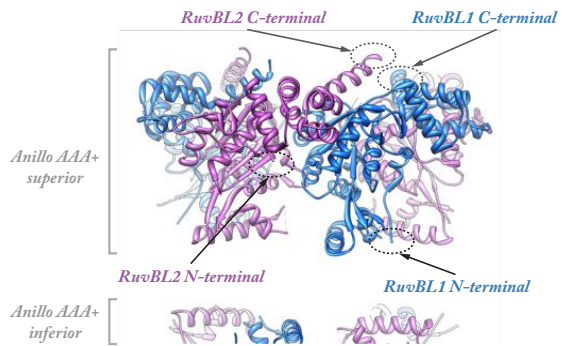
#### **El complejo RuvBL1-RuvBL2 humano forma anillos hexaméricos sencillos y dobles**

Ha habido cierta incertidumbre acerca del papel que juegan las etiquetas utilizadas en la purificación de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 recombinantes en la estabilidad del complejo dodecamérico que forman. Los experimentos de Cheung y cols. (Cheung y cols., 2010b) mostraron que los dobles anillos de las proteínas de levadura estaban presentes sólo cuando una o las dos proteínas incluían una cola de histidinas en su extremo amino terminal. Sin embargo, la relación 1:6:6 para las proteínas Arp5:RuvBL1:RuvBL2 descrita en el complejo INO80 de levadura es consistente con la interacción entre un monómero de Arp5 con el complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 en el contexto de este remodelador de cromatina (Jonsson y cols., 2004), así como con la presencia del doble anillo en la estructura

del complejo INO80 de *S. cerevisiae* (Tosi y cols., 2013). El complejo dodecamérico humano era estable tras la eliminación de la cola de histidinas (Gorynia y cols., 2011), y los dobles anillos han sido detectados con proteínas en las que las etiquetas para su purificación eran diferentes (Tabla 5.1) y estaban situadas tanto en el extremo amino (Matias y cols., 2006; Torreira y cols., 2008) como carboxilo terminal (Niewiarowski y cols., 2010; Puri y cols., 2007). El extremo carboxilo terminal de RuvBL1 y RuvBL2 aparece proyectado hacia el exterior en la zona superior de los anillos en el complejo dodecamérico, en una posición opuesta al extremo amino terminal, lo que excluye la posibilidad de que esta región esté implicada en las interacciones intermoleculares entre los dos hexámeros y que pueda modificar la arquitectura del doble anillo (Figura 5.1).

**Figura 5.1: Localización de los extremos amino y carboxilo terminales en el dodecámero RuvBL1-RuvBL2.**

Las regiones amino y carboxilo terminales de RuvBL1 y RuvBL2 se disponen en regiones opuestas en la estructura dodecamérica (Gorynia y cols., 2011).



En este trabajo hemos demostrado que el complejo dodecamérico humano RuvBL1-RuvBL2 se mantiene ensamblado tras la eliminación de la cola de histidinas. La electroforesis en condiciones nativas (*Blue Native PAGE*) de los complejos His-RuvBL1-RuvBL2 y RuvBL1-RuvBL2 mostró un patrón de bandas similar en ambos casos, incluyendo las formas dodecaméricas y hexaméricas de las proteínas. Sin embargo, la etiqueta de histidinas parece influir en la estabilidad del dodecámero, siendo el complejo sin cola de histidinas más sensible al desensamblaje por dilución, como demostraron los experimentos mediante cromatografía de exclusión molecular. Además, la visualización en el microscopio electrónico del complejo RuvBL1-RuvBL2 salvaje corroboró la presencia de

Estructura	Origen	Construcciones/ensamblaje	Sistema de expresión	Forma oligomérica
RuvBL1 (Matias y cols., 2006)	Humano	N-His-FLAG-RuvBL1 <i>in vivo</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Hexámero
RuvBL1-RuvBL2 (Puri y cols., 2007)	Humano	RuvBL1-RuvBL2-His-C <i>in vitro</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Dodecámero
RuvBL1-RuvBL2 (Gribun y cols., 2008)	<i>S. cerevisiae</i>	RuvBL1-RuvBL2 <i>in vitro</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Hexámero
RuvBL1-RuvBL2 (Torreira y cols., 2008)	<i>S. cerevisiae</i>	RuvBL1-His-N-RuvBL2 <i>in vivo</i>	Baculovirus	Dodecámero
RuvBL1-RuvBL2 (Niewiarowski y cols., 2010)	Humano	RuvBL1-His-C-RuvBL2 <i>in vivo</i>	<i>E.coli</i> BL21 Rossetta II (DE3)	Dodecámero
RuvBL1-RuvBL2 (Cheung y cols., 2010b)	<i>S. cerevisiae</i>	N-His-RuvBL1-RuvBL2 <i>in vitro</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Dodecámero
RuvBL1-RuvBL2 (Cheung y cols., 2010b)	<i>S. cerevisiae</i>	RuvBL1-N-His-RuvBL2 <i>in vitro</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Dodecámero
RuvBL1-RuvBL2 (Cheung y cols., 2010b)	<i>S. cerevisiae</i>	N-His-RuvBL1-N-His-RuvBL2 <i>in vitro</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Dodecámero
RuvBL1-RuvBL2 (Cheung y cols., 2010b)	<i>S. cerevisiae</i>	RuvBL1-RuvBL2 <i>in vitro</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Hexámero
RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011)	Humano	N-His-RuvBL1-RuvBL2- FLAG-C <i>in vivo</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Dodecámero
RuvBL2 (Petukhov y cols., 2012)	Humano	RuvBL2-His-C <i>in vivo</i>	<i>E.coli</i> BL21 Gold (DE3)	Hexámero
RuvBL1-RuvBL2 (este trabajo)	Humano	N-His-RuvBL1-RuvBL2 <i>in vivo</i>	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Dodecámero

Tabla 5.1: Construcciones y sistemas de expresión para la producción de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 recombinantes. N- y C-, posición de la etiqueta en el extremo amino o carboxilo terminal, respectivamente.

especies dodecaméricas tras la eliminación de la cola de histidinas. En conjunto, todos los datos sugieren que el complejo dodecamérico es una de las formas de las proteínas RuvBL1-RuvBL2 con potencial relevancia fisiológica. El *tag* influye en la transición entre anillos sencillos y dobles cuando se ensamblan *in vitro* en colaboración con otros factores como la concentración de proteína, y quizás la presencia de nucleótidos.

La formación de anillos sencillos y dobles puede reflejar un sistema de regulación de la función de las proteínas en la célula, o podrían formar distintos tipos de oligómeros dependiendo del contexto macromolecular en el que participan. Es necesario conocer si las formas funcionales de RuvBL1 y RuvBL2 incluyen los monómeros, hexámeros y/o dodecámeros. Una posibilidad sería que las distintas especies formen un ciclo funcional o, alternativamente, cada una podría formar parte de un determinado complejo macromolecular. El estado oligomérico con relevancia fisiológica podría depender de la interacción con otras proteínas y/o ácidos nucleicos dentro de los complejos macromoleculares de los que forman parte en el interior de la célula, por lo que el análisis estructural de complejos de RuvBL1-RuvBL2 con otras proteínas será un importante campo de estudio en el futuro para entender el papel de estas ATPasas en el contexto celular. Esta complejidad se ve incrementada, además, por la posible existencia de homo- y heterohexámeros, y su ensamblaje como anillos sencillos y dobles.

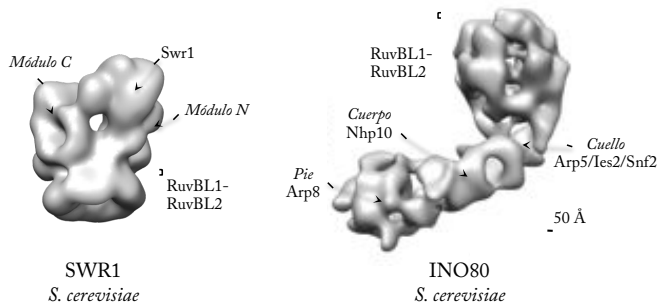
Recientemente se han conocido las estructuras de dos remodeladores de cromatina del los que forman parte RuvBL1-RuvBL2, aportando importantes datos acerca del papel de estas ATPasas en estos complejos macromoleculares. El remodelador SWR1 de *S. cerevisiae*, que realiza el intercambio de dímeros de histonas H2AZ/H2B por H2A/H2B, es un complejo de 1 MDa formado por 14 polipéptidos. La estructura de SWR1 resulta mediante criomicroscopía electrónica muestra un anillo heterohexamérico de RuvBL1-RuvBL2 que, junto con la subunidad catalítica Swr1, conecta dos módulos ensamblados independientemente (Nguyen y cols., 2013) (Figura 5.2). En la estructura del remodelador los dominios DII de RuvBL1-RuvBL2 interactúan con el resto de subunidades, actuando

## Capítulo 5

---

a modo de plataforma para conectar todos los módulos funcionales del complejo, mientras que el núcleo AAA+ aparece orientado hacia el exterior. Esta organización hace que los dominios DII no sean accesibles para la interacción con otro heterohexámero RuvBL1-RuvBL2. Además, los dominios DII, cuya flexibilidad hemos descrito en esta tesis, parecen necesitar cierta reorganización para acomodarse en la densidad del mapa de microscopía electrónica de SWR1 (Nguyen y cols., 2013).

En otro reciente trabajo, la estructura del remodelador INO80 de *S. cerevisiae* mostró una organización muy diferente a otros remodeladores, con una arquitectura en forma de embrión formada por regiones cabeza-cuello-cuerpo-pie (Tosi y cols., 2013) (Figura 5.2). Un aspecto interesante es que en la estructura resuelta mediante microscopía electrónica de INO80 las subunidades RuvBL1-RuvBL2 aparecen como un doble anillo dodecamérico, formando la región de la cabeza del complejo. Los ensayos de entrecruzamiento acoplados a espectrometría de masas realizados en ese trabajo aportaron datos acerca de la composición del complejo RuvBL1-RuvBL2, y estos eran compatibles únicamente con un dodecámero formado por dos heterohexámeros. El dodecámero RuvBL1-RuvBL2 se dispone en el remodelador con los dominios DI y DIII orientados hacia los polos y los dominios DII en el plano ecuatorial. La localización periférica de RuvBL1-RuvBL2 en el complejo INO80 hace improbable un papel como plataforma para el ensamblaje del remodelador. Dado que los dominios DII aparecen cerca del dominio SNF2, los autores sugieren que los cambios en RuvBL1-RuvBL2 podrían cooperar con el motor SNF2 en la remodelación de nucleosomas o en el intercambio de variantes de histonas o, alternativamente, podrían modular la interacción de INO80 con la cromatina. Estos nuevos datos indican que las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 son capaces de ensamblar diferentes oligómeros para participar en distintos complejos macromoleculares, siendo biológicamente relevantes tanto los heterohexámeros como los dodecámeros.



**Figura 5.2: Arquitectura de los remodeladores de cromatina SWR1 e INO80.** El complejo RuvBL1-RuvBL2 participa formando diferentes oligómeros en los distintos complejos macromoleculares en los que participa. En el complejo SWR1 de *S. cerevisiae* RuvBL1-RuvBL2 se ensambla como un anillo heterohexamérico en el que los dominios dominios DII interaccionan con el resto de módulos del remodelador, actuando a modo de plataforma (Nguyen y cols., 2013) (Panel izquierdo). En el complejo INO80 de *S. cerevisiae*, el dodecámero RuvBL1-RuvBL2 forma la región cabeza del remodelador, con los dominios DII orientados en el plano ecuatorial e interaccionando con las subunidades de la zona denominada cuello, por lo que un papel como plataforma en esta localización resulta improbable (Tosi y cols., 2013) (Panel derecho).

## El complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 coexiste en dos conformaciones

El análisis estructural mediante microscopía electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2 realizado en este trabajo ha aclarado diversas discrepancias acerca de su estructura. RuvBL1 y RuvBL2 forman un complejo dodecamérico en el que dos heterohexámeros interaccionan a través de los dominios DII (Gorynia y cols., 2011). Uno de los descubrimientos más interesantes de esta tesis ha sido la descripción por primera vez de la coexistencia de dos

## Capítulo 5

---

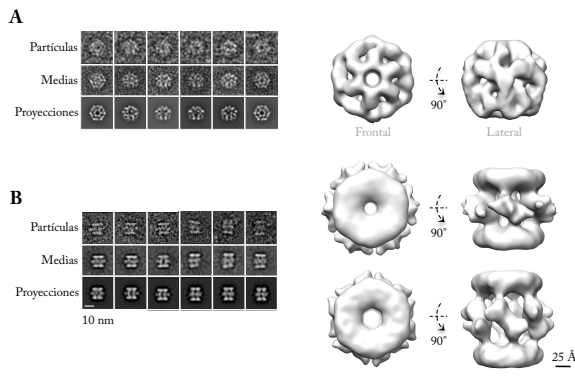
conformaciones distintas del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 en una misma preparación.

La estructura de la conformación compacta del dodecámero RuvBL1-RuvBL2, a 15 Å de resolución, es compatible con las estructuras atómicas resueltas mediante cristalografía de rayos X (Gorynia y cols., 2011; Matias y cols., 2006). El núcleo AAA+ forma un anillo compacto, idéntico a esta resolución a la estructura atómica del hexámero de RuvBL1 (Matias y cols., 2006), y la distancia entre ambos anillos es similar a la del complejo dodecamérico con los dominios DII truncados (Gorynia y cols., 2011). El canal central de la estructura obtenida mediante criomicroscopía electrónica presenta una dimensiones comparables con las estructuras atómicas (Gorynia y cols., 2011; Matias y cols., 2006), y como ocurre en otras proteínas de la familia AAA+, se ha especulado sobre la posibilidad de que pudiera albergar RNA/DNA; sin embargo, las dimensiones del canal restringirían la interacción a sustratos de cadena sencilla (ssDNA o ssRNA) (Matias y cols., 2006). Los dominios DII aparecen proyectados hacia el exterior en la zona de interacción entre los dos hexámeros, estableciendo contactos que estabilizan el doble anillo. La estructura presentada en este trabajo ofrece el mejor grado de detalle descrito hasta el momento para la región formada por los dominios DII, que no estaba presente en la estructura atómica del dodecámero (Gorynia y cols., 2011), al menos en humano. Nuestro modelo estructural para la conformación compacta de RuvBL1-RuvBL2 implica que los dominios DII están involucrados en interacciones proteína-proteína entre los dos anillos, y cabría la posibilidad de que estos dominios pudieran también interaccionar con otras proteínas en ensamblados macromoleculares mayores. Apoyando esta última hipótesis, la reciente estructura del remodelador de cromatina SWR1 de *S. cerevisiae* ha mostrado cómo los dominios DII de un anillo heterohexamérico RuvBL1-RuvBL2 son responsables de la conexión entre el resto de módulos del complejo (Nguyen y cols., 2013).

La conformación extendida del complejo supone el alargamiento de la molécula, desplazando los anillos AAA+ sobre el eje longitudinal. La estructura, a 16 Å de resolución, presenta una organización idéntica a esta resolución en la región de los anillos ATPasa a las

estructuras atómicas (Gorynia y cols., 2011; Matias y cols., 2006), mientras que los dominios DII aparecen en una conformación más extendida en comparación con la conformación compacta.

Aunque nuestra reconstrucción del complejo RuvBL1-RuvBL2 mediante criomicroscopía electrónica (conformación compacta) es compatible con las estructuras atómicas del hexámero de RuvBL1 (Matias y cols., 2006) y del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 con los dominios DII truncados (Gorynia y cols., 2011), difiere significativamente del mapa de microscopía electrónica del dodecámero humano previamente publicado (Puri y cols., 2007) (Figura 5.3). Durante este trabajo no se detectaron un número significativo de imágenes de criomicroscopía que no pudieran ser asignadas a vistas frontales o laterales del complejo, por lo que nuestros datos no son compatibles con modelos estructurales alternativos. Una fuente potencial de errores en el análisis de los datos de Puri y cols. puede resultar de la falta de vistas laterales perfectas del doble anillo en su set de datos y/o la mezcla de partículas correspondientes a distintas conformaciones.



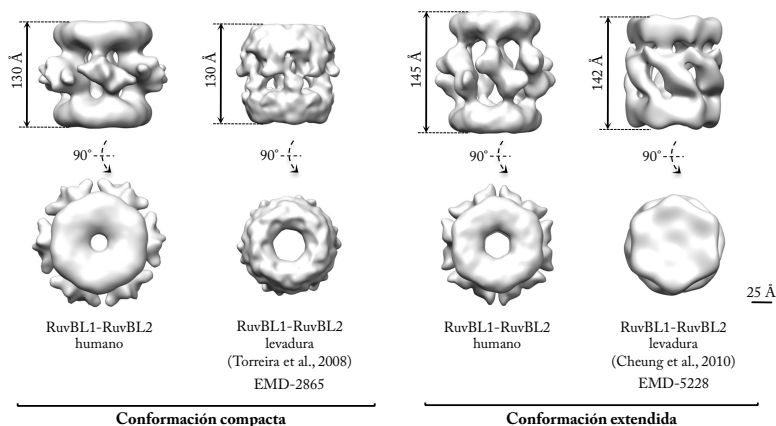
**Figura 5.3: Comparación de las estructuras de microscopía electrónica del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 humano.** Se muestran partículas individuales, medias libres de patrón y la estructura tridimensional del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 humano previamente descrita (Puri y cols., 2007) (A), y los datos obtenidos en este trabajo para el mismo complejo (B).

Barra de escala, 10 nm (panel izquierdo); barra de escala, 25 Å (estructuras microscopía electrónica).

Alternativamente, la estructura resuelta podría corresponder a una conformación completamente diferente del complejo como sugerían los datos presentados por Niewiarowski y cols. (Niewiarowski y cols., 2010). Sin embargo, la elevada correlación entre nuestra estructura de criomicroscopía y las estructuras atómicas de RuvBL1 y RuvBL1-RuvBL2 supone un gran apoyo para la validez del análisis estructural presentado en este trabajo.

### **Los cambios conformacionales del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 podrían explicar las discrepancias descritas sobre la estructura del complejo**

Nuestros resultados sugieren que los cambios conformacionales del complejo descritos en este trabajo son la razón de la divergencia en los resultados estructurales previamente descritos (Cheung y cols., 2010b; Torreira y cols., 2008). En levadura, los complejos dodecaméricos habían sido descritos en una conformación compacta (Torreira y cols., 2008) o extendida (Cheung y cols., 2010b) (Figura 5.4), pero en este trabajo hemos demostrado que ambos estados pueden coexistir de manera simultánea en el sistema humano, lo que sugiere que el complejo es capaz de alternar entre estas dos conformaciones. Es posible que las diferentes estructuras del complejo de levadura reflejen un enriquecimiento en una u otra de las conformaciones, lo cual implica que puedan existir artefactos en aquellas reconstrucciones que derivan de muestras que contienen una mezcla de estados conformacionales diferentes, si esta heterogeneidad no es tenida en cuenta durante el procesamiento de las imágenes de microscopía electrónica. Durante este trabajo hemos diseñado estrategias para abordar este hecho, procesando exclusivamente sets de imágenes homogéneas clasificadas bidimensionalmente de manera exhaustiva. Esta heterogeneidad conformacional, además, puede explicar en parte las dificultades a la hora de cristalizar el complejo dodecamérico completo (Gorynia y cols., 2011).



**Figura 5.4:** Comparación entre las conformaciones compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2 humano (este trabajo) y de levadura resueltos mediante microscopía electrónica (Cheung y cols., 2010b; Torreira y cols., 2008). Barra de escala, 25 Å.

## La plasticidad conformacional de los dominios DII dirige la reorganización de la arquitectura del doble anillo RuvBL1-RuvBL2

Los mapas de criomicroscopía electrónica del doble anillo RuvBL1-RuvBL2 presentados en este trabajo aportan datos estructurales acerca de la interfaz entre los dos hexámeros para la cual no había información a una buena resolución hasta este momento. La transición conformacional entre las estructuras compacta y extendida viene determinada fundamentalmente por cambios en la orientación de los dominios DII, y en este trabajo se han modelado dichos cambios conformacionales. En la conformación compacta, las regiones externas de los dominios DII están íntimamente conectadas en la región central de la molécula, lo que supone un acortamiento significativo en la longitud del complejo. Las regiones internas de los dominios DII aparecen suficientemente cerca como para dar cuenta de los contactos descritos en la estructura atómica del dodecámero truncado (Gorynia y cols., 2011). En la conformación extendida, los dominios DII se inclinan ligeramente hacia el

## Capítulo 5

---

interior de la molécula, desplazando los anillos AAA+ sobre su eje longitudinal. Además, las regiones internas en DII se desplazan, eliminándose los contactos en esta región entre los dos anillos. En nuestro set de datos la práctica totalidad de las imágenes de microscopía electrónica del complejo RuvBL1-RuvBL2 se acomodaban a estas dos estructuras y no se detectaron conformaciones intermedias. Esto sugiere que estas dos conformaciones están estabilizadas por una organización concreta de los dominios DII, y las estructuras intermedias entre ambas son menos abundantes o no son estables. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de otras conformaciones diferentes que en este estudio no hayan sido capturadas. De hecho, la conformación compacta del complejo de levadura (Torreira y cols., 2008) presenta una mayor apertura en el canal del anillo AAA+, lo que sugiere que otras conformaciones son posibles.

En el procesamiento digital de las imágenes de microscopía electrónica realizado en este análisis se asumió la simetría rotacional ( $C_6$ ) durante el refinamiento angular de las estructuras de RuvBL1-RuvBL2, basándonos en la información de la estructura atómica del complejo (Gorynia y cols., 2011). Este hecho hace que no se pueda excluir formalmente una disposición asimétrica de los dominios DII. Para evaluar si dichos dominios podrían presentar una conformación diferente, después de realizar el refinamiento angular con la imposición de la simetría hasta la convergencia de los volúmenes, se llevaron a cabo diversos pasos de refinamiento eliminando esta restricción. En este caso la estructura del complejo no variaba, por lo que las diferencias entre los 6 monómeros de cada anillo, así como diferencias entre ambos anillos (en los que se aplicó simetría diédrica  $d_2$  durante el refinamiento) no podían ser detectadas a la resolución que presentaban estas imágenes. La flexibilidad de los dominios DII en los anillos hexaméricos (Petukhov y cols., 2012) podría estar más restringida en las formas dodecaméricas debido a la implicación de estos dominios en interacciones proteína-proteína.

---

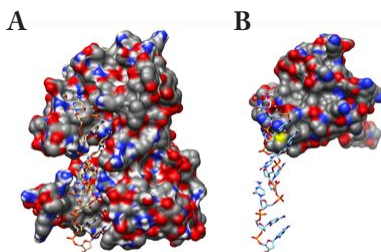
## La transición conformacional de RuvBL1-RuvBL2 podría tener un impacto funcional en el mecanismo molecular de actuación de las proteínas

Uno de los puntos clave de este estudio es el descubrimiento de la coexistencia de dos conformaciones, compacta y extendida, del complejo dodecamérico humano RuvBL1-RuvBL2. Los experimentos de interacción con nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos indican que esta transición conformacional no va asociada a un estado concreto de unión del nucleótido en el núcleo AAA+, ya que ambas conformaciones se encontraron en presencia de diferentes nucleótidos. Sin embargo, esta posibilidad no puede ser formalmente excluida debido a que la región que alberga el nucleótido (ADP o ATP) entre monómeros adyacentes del núcleo hexamérico está protegida de tal forma que es posible que la incorporación del nucleótido no se produzca en un anillo ensamblado en ausencia de otros cofactores. Este hecho hace posible que la falta de diferencias significativas entre las distintas condiciones de interacción con nucleótidos y análogos no hidrolizables de nucleótidos de nuestros experimentos sea debida a que el complejo RuvBL1-RuvBL2 no incorporara estas moléculas.

El significado funcional de la transición conformacional desde una estructura compacta a una extendida podría residir en los dominios DII. Estos dominios, exclusivos de las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 dentro de la familia AAA+, podrían modular las actividades ATPasa y/o helicasa, así como la capacidad de interacción con otras proteínas. El análisis de la estructura atómica del dominio DII de RuvBL1 aporta datos acerca de su funcionalidad, presentado similitudes estructurales con el dominio de interacción con ssDNA de la proteína RPA (Figura 5.5). Esta proteína presenta dominios con un plegamiento característico de tipo *OB-fold*, a través de los cuales interacciona con el ácido nucleico (Bochkarev y cols., 1997). Además, los dominios DII aislados de RuvBL1 son capaces de interaccionar con distintos tipos de ácidos nucleicos *in vitro*, incluyendo ssRNA, ssDNA y dsDNA (Matias y cols., 2006). Las regiones de los dominios DII que podrían estar

## Capítulo 5

implicadas en la interacción con los ácidos nucleicos aparecen más expuestas en la conformación extendida del complejo comparadas con la compacta.



**Figura 5.5:** La región de interacción con ácidos nucleicos en el dominio DII de RuvBL1. **(A)** Representación del potencial electrostático de la proteína RPA (PDB 1JMC, Bochkarev y cols., 1997) mapeado sobre su superficie molecular. La molécula de ssDNA unida a RPA se esquematiza representada como esferas y barras. **(B)** Representación del potencial electrostático del dominio DII (residuos 127-233) de RuvBL1 (PDB 2C9O, Matias y cols., 2006) mapeado sobre su superficie molecular. El ssDNA de la molécula de RPA en (A) se superpone en la zona putativa de interacción con ácidos nucleicos del dominio DII. Adaptado de Matias y cols., 2006.

Por ello, el modelado de estos dominios en los mapas de criomicroscopía electrónica obtenidos sugiere que estos cambios conformacionales en el dodecámero podrían regular la interacción con ácidos nucleicos. Alternativamente, la interacción de los dominios DII con DNA y/o RNA podría desplazar el equilibrio conformacional para favorecer uno de los estados, regulando las funciones del complejo. Además, los dominios DII están implicados en interacciones proteína-proteína entre los dos anillos del complejo; por lo tanto, un papel más general de estos dominios como módulos de interacción con otras proteínas dentro de complejos macromoleculares de mayor tamaño sería posible, como es el caso del complejo SWR1 de *S. cerevisiae*, en el que los dominios DII del anillo heterohexamérico RuvBL1-RuvBL2 aportan las interacciones con otras subunidades para el ensamblaje de los distintos módulos funcionales del remodelador (Nguyen y cols., 2013). Cada uno de los dominios DII

está directamente conectado al núcleo catalítico ATPasa de cada monómero, por lo que la conformación de los anillos AAA+ podría estar directamente influenciada por estos dominios. Una posibilidad es que los cambios conformacionales en los dominios DII puedan regular la actividad ATPasa del complejo, y viceversa, a través de la modificación de la conformación de la región de interacción con el nucleótido. Algunos datos apuntan a que estos dominios podrían modular las actividades ATPasa y helicasa del complejo RuvBL1-RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011; Matias y cols., 2006), lo cual podría indicar que los cambios conformacionales sufridos por el dodecámero podrían tener un gran impacto en la funcionalidad del complejo.

### ¿Dos conformaciones distintas o dos complejos diferentes?

Las dos estructuras del dodecámero RuvBL1-RuvBL2 descritas en este trabajo podrían reflejar dos complejos distintos en lugar de dos conformaciones de un mismo complejo. La estructura atómica del doble anillo mostraba el ensamblaje de dos anillos heterohexaméricos interactuando mediante contactos entre monómeros de RuvBL1 y RuvBL2 (Gorynia y cols., 2011). Sin embargo, dada la capacidad de ambas proteínas de formar homohexámeros de manera aislada (Matias y cols., 2006; Petukhov y cols., 2012), una alternativa estructural para formar el dodecámero sería la interacción de un homohexámero de RuvBL1 con uno de RuvBL2. Tanto complejos dodecaméricos constituidos por homo- o heterohexámeros son conceptualmente posibles, puesto que mantienen la interacción entre los dos anillos mediada por contactos de RuvBL1 con RuvBL2. En este trabajo, la resolución obtenida en los mapas de criomicroscopía electrónica y la imposición de simetría durante el refinamiento, no permiten la diferenciación de los monómeros de RuvBL1 y RuvBL2, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que lo que denominamos conformación compacta y extendida supongan dos complejos dodecaméricos diferentes (uno formado por homohexámeros y otro por heterohexámeros). Las implicaciones funcionales y catalíticas podrían ser las mismas, aunque el mecanismo molecular supondría una reorganización más compleja de la estructura del dodecámero, en lugar de un reajuste conformacional de un único complejo. La

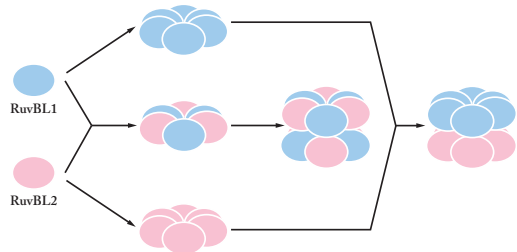
## Capítulo 5

funcionalidad de los complejos RuvBL1-RuvBL2 heterohexaméricos, tanto en forma de anillos sencillos como dobles, es apoyada por su participación en dos remodeladores de cromatina (Nguyen y cols., 2013; Tosi y cols., 2013). En la estructura de SWR1 resuelta mediante criomicroscopía electrónica, las subunidades RuvBL1 y RuvBL2 aparecen formando una plataforma heterohexamérica sobre la que se ensamblan el resto de subunidades (Nguyen y cols., 2013); en el caso de INO80, RuvBL1-RuvBL2 aparecen como un dodecámero formado por la interacción de dos heterohexámeros (Tosi y cols., 2013). Las proteínas RuvBL1-RuvBL2 serían capaces de ensamblar diferentes estructuras oligoméricas dependiendo del complejo macromolecular del que estén formando parte. La existencia de diferentes oligómeros de las proteínas en el contexto celular supone un grado mayor de complejidad para el entendimiento de su mecanismo molecular de acción.

Recientemente se ha depositado en la base de datos de microscopía electrónica una estructura del complejo dodecamérico RuvBL1-RuvBL2 unido a un derivado no hidrolizable de ATP (Song, F. & Zhu, P., EMDB-5599, pendiente de publicación). Aunque la estructura no ha sido todavía publicada, la información depositada en la base de datos indica que la estructura está compuesta por dos homohexámeros. Esto abre el abanico de posibilidades a una amplia variedad de ensamblados de las proteínas, cuya función celular será un campo de estudio interesante en el futuro más inmediato (Figura 5.6).

**Figura 5.6: Representación esquemática del proceso de oligomerización de RuvBL1 y RuvBL2.**

RuvBL1 (en azul) y RuvBL2 (rosa) forman anillos homohexaméricos de manera aislada. El complejo entre las dos proteínas transita entre el heterohexámero y el dodecámero formado por dos anillos heterohexaméricos. Alternativamente, las proteínas podrían formar un dodecámero ensamblado a través de interacciones de dos anillos homohexaméricos.



En este trabajo hemos descrito la estructura del dodecámero completo RuvBL1-RuvBL2 de origen humano, y se han resuelto varias discrepancias sobre las estructuras publicadas hasta el momento. Hemos demostrado que el complejo RuvBL1-RuvBL2 presenta dos conformaciones distintas, y nuestro modelo sugiere que estos cambios conformacionales podrían tener un impacto funcional en el contexto de los complejos macromoleculares que contienen RuvBL1-RuvBL2. Esta transición conformacional podría formar parte del mecanismo de remodelación de dichos ensamblados, convirtiendo el complejo de un estado a otro, y todos estos cambios podrían estar conectados con la modulación de la actividad ATPasa, gracias a la conexión entre los dominios DII y el núcleo AAA+. Alternativamente, las dos estructuras descritas podrían dar cuenta de dos complejos diferentes, organizados con una composición distinta en los anillos hexaméricos que forman el dodecámero.

### 5.2. Caracterización bioquímica y estructural del factor de transcripción

#### YY1

El estudio de la proteína YY1 se abordó debido a su participación en el complejo remodelador de cromatina INO80 (Cai y cols., 2007; Wu y cols., 2007). En este contexto, YY1 interacciona con varias subunidades del complejo de mamíferos, incluidas las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2. El significado funcional de dicha interacción podría explicar, en parte, el papel de INO80 en los procesos de reparación de DNA. Por tanto, la caracterización de YY1, recientemente descrita como subunidad de este complejo, aportaría datos acerca del mecanismo a través del cual mantiene la estabilidad genómica. La información estructural disponible para el factor de transcripción YY1 hasta el momento es limitada. Su motivo estructural característico en una región carboxilo terminal formada por cuatro dominios de tipo dedos de cinc  $C_2H_2$ , para los cuales existe una estructura atómica en complejo con la secuencia del promotor P5 del virus adenoasociado (Houbaviy y cols., 1996). El análisis de la secuencia de YY1 no es especialmente informativo, ya que no presenta una clara similitud con dominios estructurales de otras proteínas, salvo por la región de dedos de cinc. En este

## Capítulo 5

---

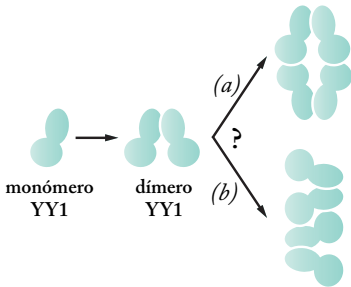
trabajo se han utilizado algoritmos de predicción para obtener más información acerca de la organización estructural de esta proteína. La predicción de elementos de estructura desordenada mediante el servidor *PONDR* (*Prediction Of Naturally Disordered Regions*; <http://www.pondr.com>; Romero y cols., 2001) sugería que largos segmentos de la proteína, localizados fundamentalmente en la región amino terminal, podrían estar poco estructurados, mientras que las predicciones *de novo* de estructura terciaria del servidor *ROBETTA* (<http://robetta.bakerlab.org>; Kim y cols., 2004) ofrecían modelos en los que YY1 presentaba varios dominios independientes, uno de ellos formado por la región de dedos de cinc, y otros dominios estructurados adicionales (Figura 4.22). En este trabajo se ofrece la primera información estructural, aunque a baja resolución, de la proteína humana YY1 completa. La capacidad de formar oligómeros había sido observada en el trabajo de Wu y cols., en el que proponían la tetramerización de la proteína basándose en experimentos de cromatografía de exclusión molecular y ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído (Wu y cols., 2007). Los experimentos realizados en esta tesis han ahondado en el estudio estructural de la molécula, descubriendo un patrón de oligomerización novedoso. En nuestros experimentos hemos aislado dos formas oligoméricas de la proteína, que denominamos complejo A y B de YY1. La combinación de métodos bioquímicos y microscopía electrónica ha aportados datos que apoyan la formación de un complejo dimérico de la proteína (complejo A), mientras que los resultados para el complejo B, sugieren que podría estar formado por la asociación de dos moléculas del complejo A, correspondiendo por lo tanto a una forma tetramérica.

### **La proteína YY1 humana forma diferentes especies oligoméricas *in vitro***

La información estructural a baja resolución proporcionada por el mapa de microscopía electrónica del dímero YY1 muestra la organización de la molécula en dos regiones, una zona implicada en la dimerización de la proteína, denominada “cabeza”, y regiones protuberantes (“brazos”) que también contribuyen a los contactos entre los dos monómeros. La estructura del dímero presenta una forma general acampanada, con una cavidad central

delimitada por la disposición de los brazos de cada subunidad. Los experimentos de Wu y cols. de entrecruzamiento químico de la proteína, mostraban múltiples bandas que podrían corresponder a un patrón de oligomerización, pero esta propiedad desaparecía en una construcción que sólo contenía la región carboxilo terminal de interacción con DNA (residuos 287-414) (Wu y cols., 2007). Si estos datos son interpretados en el contexto del dímero de YY1 que hemos caracterizado, podrían indicar que la región carboxilo terminal no está implicada en la oligomerización. De acuerdo con esta hipótesis, la dimerización de la molécula tendría lugar a través de interacciones entre los dominios amino terminal y/o las regiones centrales (“cabeza”), mientras que el dominio C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> de dedos de cinc formaría la zona protuberante (“brazos”).

La caracterización estructural de la proteína YY1 mostró, además, la formación de oligómeros de mayor tamaño (complejo B). Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular, junto con el análisis de las moléculas de este complejo mediante microscopía electrónica, sugieren que esta estructura está formada por la asociación de unidades diméricas de la proteína. De acuerdo con sus dimensiones y tamaño, el complejo B podría estar formado por la asociación de dos moléculas del complejo A. Esta hipótesis, sin embargo, plantea la incertidumbre acerca del modo de interacción entre los dos dímeros de YY1. Dos modelos alternativos de asociación de los dímeros implicarían la interacción lateral o la interacción a través de las regiones denominadas brazos (Figura 5.7). En ambos casos, se generaría una molécula alargada de dimensiones similares a las del complejo B reconstruido. La segunda opción resulta más frecuente en el ensamblaje oligomérico de proteínas, como es el caso de la familia AAA+, que forman ensamblados oligoméricos a través de interacciones de este tipo (denominadas comúnmente *back-to-back*) (Tucker & Sallai, 2007).



**Figura 5.7: Modelo hipotético de oligomerización del factor de transcripción YY1.** La asociación de dímeros de YY1 (complejo A) daría lugar a la formación del complejo B. Se proponen dos modos de interacción entre los dímeros: (a) a través de contactos entre las regiones denominadas brazos

(*back-to-back*), o (b) asociación lateral, basados en las imágenes 2D y las estructuras de RCT (Radermacher y cols., 1987) de los complejos A y B de YY1 obtenidos mediante microscopía electrónica.

Un estudio biofísico más profundo de la proteína YY1 aportaría datos fundamentales acerca de la arquitectura de los oligómeros que forma. Durante este trabajo se realizaron experimentos de SEC-MALLS (*Size Exclusion Chromatography-Multiangle Laser Light Scattering*) y ultracentrifugación analítica para obtener información acerca de la masa molecular de los oligómeros y el número de subunidades que los conformaban. Sin embargo, la proteína presenta cierta tendencia a la agregación, lo que hizo imposible obtener datos interpretables de estas técnicas (datos no mostrados). Por ello, se realizaron experimentos bioquímicos complementados con microscopía electrónica para comprender la organización de estos ensamblados. Un sencillo experimento que apoya la formación del complejo dimérico de YY1 es el encaje de los modelos atómicos de la proteína en el mapa de densidad electrónica obtenido (Figura 4.22). A pesar de que estos modelos no reflejan la organización real del monómero, fueron de utilidad para determinar la masa que podría ser albergada en el volumen del complejo dimérico. En estos experimentos el mapa del dímero de YY1 sólo podía alojar dos subunidades de cualquiera de los modelos atómicos, apoyando los datos de microscopía electrónica de formación de un complejo dimérico.

## Los oligómeros de YY1 interactúan con intermediarios de procesos de recombinación homóloga en cooperación con las ATPasas RuvBL1 y RuvBL2

La región de dedos de cinc localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína YY1 es responsable de su capacidad de interactuar con sustratos de DNA de doble cadena de manera específica de secuencia, dando cuenta de sus propiedades como regulador transcripcional. Las secuencias consenso más frecuentes de interacción con dsDNA localizadas en los promotores de los genes regulados por YY1 incluyen ACAT y CCAT, siguiendo el esquema [5'-(C/g/a)(G/t)(C/t/a)CATN(T/a)(T/g/c)-3'] (Golebiowski y cols., 2012). En este trabajo hemos producido proteína YY1 recombinante funcionalmente activa, capaz de interactuar con este tipo de sustratos. Además, hemos comprobado que las formas oligoméricas de YY1 son capaces de interactuar con intermediarios de procesos de recombinación homóloga, incluyendo estructuras de tipo *Holliday junction* y de 3 hebras (con cierta semejanza a los *D-loop* formados en el proceso de recombinación homóloga) que no incluyen la secuencia consenso de interacción de la proteína. Estos datos sugieren que YY1 puede reconocer estos sustratos de DNA de manera independiente de secuencia.

Hemos comprobado que YY1 interactúa *in vitro* con el complejo RuvBL1-RuvBL2, de acuerdo a lo descrito por Wu y cols. (Wu y cols., 2007). Sin embargo, nuestros resultados apuntan a los ensamblados oligoméricos de YY1, al menos del complejo B, como uno de los responsables de la interacción con las ATPasas RuvBL1-RuvBL2. RuvBL1 y RuvBL2 también se ensamblan como oligómeros (esta tesis), lo que sugiere la formación de un complejo de gran tamaño entre las subunidades YY1, RuvBL1 y RuvBL2. Este ensamblado YY1-RuvBL1-RuvBL2 supondría un módulo del complejo INO80, quizás junto con otras subunidades. Además, la incubación del complejo RuvBL1-RuvBL2 con los oligómeros de YY1 incrementa la avidéz de YY1 en la interacción con DNA de tipo *Holliday junction*. Estos datos sugieren que la capacidad de YY1 de interactuar con ciertos intermediarios de DNA producidos durante procesos de reparación de daños genómicos y su capacidad de

interacción con RuvBL1-RuvBL2 podrían suponer las bases mecánicas a través de las cuales participa en el proceso de recombinación homóloga.

### **YY1 participa en recombinación homóloga mediante su contribución en la formación de filamentos de RAD51**

La regulación transcripcional que lleva a cabo la proteína YY1 ha sido extensamente caracterizada, siendo numerosos los genes que son activados o reprimidos por este factor de transcripción con actividad dual (Zhang y cols., 2011). Adicionalmente, las evidencias acerca de la función de esta proteína en reparación de daños en el DNA son cada vez mayores. YY1 podría regular la transcripción de genes implicados en reparación del material genético en cooperación con complejos remodeladores de cromatina (Cai y cols., 2007). Sin embargo, recientes estudios han demostrado un novedoso papel para la proteína en procesos de reparación del DNA. Este modelo, alternativo a la regulación transcripcional, se produce en el contexto del complejo remodelador de cromatina INO80, y plantea una participación directa de YY1 en la respuesta al estrés genómico mediante un mecanismo potencialmente distinto a su función como factor de transcripción (Jiang y cols., 2010; Wu y cols., 2007). En este estudio hemos profundizado en el estudio de este fenómeno para elucidar el papel de la proteína YY1 en recombinación homóloga. Nuestros resultados corroboran la participación de YY1 junto con RuvBL1-RuvBL2 en recombinación homóloga a través del complejo INO80. Los datos obtenidos demuestran que el defecto detectado en recombinación homóloga en ausencia de YY1 y RuvBL2 es debido, al menos en parte, a la inhabilidad de reemplazar eficientemente RPA por RAD51, y que la actividad ATPasa de RuvBL2 es necesaria para este proceso.

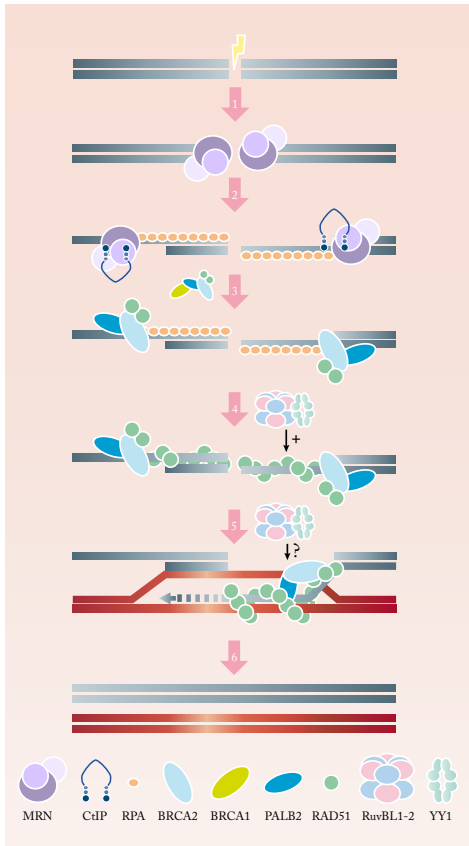
Los mecanismos a través de los cuales YY1 y RuvBL1-RuvBL2 y/o un putativo complejo YY1-RuvBL1-RuvBL2 regulan este proceso podrían ser varios. En primer lugar, es posible que YY1 sea reclutado a los sitios de daño en el DNA a través de la habilidad de los oligómeros que forma de reconocer ciertas estructuras de DNA, mientras que la actividad

ATPasa/helicasa de RuvBL1-RuvBL2 podría ser responsable del desplazamiento de RPA del DNA de cadena sencilla. RPA inhibe la formación de los filamentos de RAD51 *in vitro*, y mientras que se ha descrito que BRCA2 y PALB2 son capaces de reprimir esta inhibición *in vitro* (Buisson y cols., 2010), es posible que *in vivo* un complejo YY1-RuvBL1-RuvBL2 proporcione un mecanismo para estimular el eficiente acceso al ssDNA. Una segunda posibilidad, relacionada con la actividad de RuvBL1-RuvBL2 en el ensamblaje, maduración y remodelación de varios complejos macromoleculares (Rosenbaum y cols., 2013), es que promueva la formación del complejo BRCA2-PALB2-RAD51 funcional. Sin embargo, como hemos observado que INO80 e YY1 también promueven la formación de filamentos de RAD51, y que estas proteínas no poseen actividad chaperona, esta segunda opción parece menos plausible. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la posibilidad de que YY1-RuvBL2-RuvBL2-INO80 puedan tener papeles adicionales durante el proceso de recombinación homóloga. Como hemos demostrado, YY1 interacciona con sustratos de DNA de tipo *Holliday junction* y estructuras de 3 hebras, lo que apuntaría a una función en el reconocimiento de intermediarios de recombinación homóloga en etapas posteriores a la formación de los filamentos de RAD51. Además, INO80 es capaz de eliminar histonas H2AZ de la cromatina, y recientemente se ha descrito la inhibición que ejerce H2AZ sobre la etapa de resección del DNA (Xu y cols., 2012). La presencia de H2AZ en la cromatina podría influenciar la sinapsis, la formación de la estructura *D-loop* o el desplazamiento de la hebra de DNA (*branch migration*).

En conjunto, la información presentada en este trabajo proporciona evidencias de la participación de YY1 en el proceso de recombinación homóloga *in vivo*, y dada la implicación de las distintas subunidades del complejo INO80 en este fenómeno, nuestros datos son consistentes con un papel directo en los sitios de daño en el DNA. La combinación de aproximaciones bioquímicas *in vitro* y experimentos celulares sugieren que la habilidad de YY1 de formar especies oligoméricas podría ser clave durante su participación en recombinación homóloga. Estos oligómeros interactúan con intermediarios de recombinación de manera independiente de secuencia; además son capaces

## Capítulo 5

de interactuar con las ATPasas RuvBL1-RuvBL2, cooperando no sólo en la promoción de la formación de filamentos de RAD51 *in vivo*, sino también en la interacción con intermediarios de recombinación *in vitro* (Figura 5.8). El mecanismo molecular a través del cual las proteínas YY1, INO80, RuvBL1 y RuvBL2 cooperan para promover distintas etapas del proceso de recombinación homóloga supondrá un interesante campo de estudio en el futuro.



**Figura 5.8: Esquema del proceso de recombinación homóloga y etapas en las que YY1-RuvBL1/2-INO80 podrían participar.**

Tras producirse el daño en el DNA, comienza la señalización y reclutamiento del complejo MRN (1), que se encarga de digerir los extremos para generar ssDNA que será recubierto por RPA (2). BRCA1-PALB2-BRCA2 media el ensamblaje del filamento presináptico de RAD51 (3), el cual se extiende reemplazando a RPA (4). El complejo RAD51-BRCA2-PALB2 lleva a cabo la invasión de la hebra complementaria y la búsqueda de homología (5). El último paso es la síntesis de DNA, ligación y resolución del intermediario de recombinación (6). Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a un papel de YY1-RuvBL1-RuvBL2, en el contexto del remodelador de cromatina INO80, en la promoción de los filamentos de RAD51; además, la capacidad de YY1 de

interaccionar con intermediarios de recombinación homóloga en cooperación con RuvBL1-RuvBL2 sugiere la posibilidad de que las proteínas también actúen en otras etapas del proceso en las que se generan este tipo de intermediarios de DNA.

## **Conclusiones**



## Capítulo 6

### Conclusiones

1. La caracterización bioquímica y estructural de los complejos entre las proteínas RuvBL1 y RuvBL2 demuestra que estas se ensamblan como complejos heterohexaméricos y dodecaméricos.

2. RuvBL1 y RuvBL2 pueden ensamblar complejos dodecaméricos independientemente de la presencia de colas de histidinas, y proponemos esta estructura como una de las formas del complejo con potencial relevancia fisiológica.

3. La reconstrucción tridimensional del complejo dodecamérico humano completo RuvBL1-RuvBL2 muestra la coexistencia de dos conformaciones distintas, denominadas compacta y extendida. Esta transición conformacional está mediada por la reorganización estructural de los dominios DII, exclusivos de estas proteínas dentro de la familia AAA+, que extienden la estructura compacta sobre su eje longitudinal a través del reajuste de los contactos entre los dos anillos hexaméricos. El cambio conformacional del complejo RuvBL1-RuvBL2 no parece estar asociado a un estado de interacción con nucleótido concreto.

4. La transición entre la conformación compacta y extendida del complejo RuvBL1-RuvBL2 podría suponer un mecanismo de regulación de las propiedades de interacción con ácidos nucleicos y/o subunidades accesorias en el contexto de ensamblados macromoleculares de mayor tamaño. La región propuesta para la interacción con ácidos nucleicos en el dominio DII de la estructura extendida aparece significativamente más accesible. La reestructuración de los dominios DII, conectados al núcleo AAA+, podría regular las

## Capítulo 6

---

actividades ATPasa y/o helicasa del complejo, así como sus propiedades de interacción con ácidos nucleicos.

5. El descubrimiento de la coexistencia de dos conformaciones del complejo dodecamérico humano RuvBL1-RuvBL2 resuelve algunas de las discrepancias existentes acerca de su estructura.

6. El factor de transcripción YY1 actúa en recombinación homóloga mediante la estimulación de la formación de filamentos de RAD51, formados durante las etapas de búsqueda de homología e invasión de la hebra de DNA complementaria. Este fenómeno ocurre a través de la cooperación de YY1, RuvBL2 y la subunidad catalítica Ino80 del complejo remodelador de cromatina INO80. La actividad ATPasa de RuvBL2 es necesaria para este proceso.

7. YY1 se ensambla formando dos especies oligoméricas distintas; el núcleo básico es una unidad dimérica de forma acampanada, que multimeriza para formar oligómeros de mayor tamaño.

8. Los oligómeros de YY1 interactúan con sustratos de DNA de tipo *Holliday junction* y estructuras de 3 hebras, intermediarios de procesos de recombinación, de manera independiente de secuencia. Estos oligómeros forman un complejo *in vitro* con las ATPasas RuvBL1-RuvBL2, y esta interacción incrementa la afinidad de YY1 por el DNA *Holliday junction*.

9. La cooperación entre YY1 y RuvBL1-RuvBL2 en la unión a intermediarios de recombinación homóloga sugiere que la interacción entre estas proteínas podría ser relevante en varias etapas del proceso de recombinación homóloga.

## Biobliografía



---

## Bibliografia

- Adrian M, Dubochet J, Fuller SD, Harris JR (1998) Cryo-negative staining. *Micron* **29**: 145-160
- Baek SH (2008) When ATPases pontin and reptin met telomerase. *Dev Cell* **14**: 459-461
- Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, Kemler R, Pradel J (2000) Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *The EMBO journal* **19**: 6121-6130
- Bauer A, Huber O, Kemler R (1998) Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14787-14792
- Begon DY, Delacroix L, Vernimmen D, Jackers P, Winkler R (2005) Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells. *J Biol Chem* **280**: 24428-24434
- Blanc JF, Lalanne C, Plomion C, Schmitter JM, Bathany K, Gion JM, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Bonneau M, Rosenbaum J (2005) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. *Proteomics* **5**: 3778-3789
- Bochkarev A, Pfuetzner RA, Edwards AM, Frappier L (1997) Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature* **385**: 176-181
- Brown JL, Fritsch C, Mueller J, Kassis JA (2003) The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development* **130**: 285-294
- Brown JL, Mucci D, Whiteley M, Dirksen ML, Kassis JA (1998) The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell* **1**: 1057-1064
- Buisson R, Dion-Cote AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, Stasiak A, Xia B, Masson JY (2010) Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1247-1254

## **Bibliografia**

---

- Cai Y, Jin J, Yao T, Gottschalk AJ, Swanson SK, Wu S, Shi Y, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW (2007) YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 872-874
- Calame K, Atchison M (2007) YY1 helps to bring loose ends together. *Genes Dev* **21**: 1145-1152
- Campos EI, Reinberg D (2009) Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics* **43**: 559-599
- Carlson M, Osmond BC, Botstein D (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* **98**: 25-40
- Carlson ML, Wilson ET, Prescott SM (2003) Regulation of COX-2 transcription in a colon cancer cell line by Pontin52/TIP49a. *Molecular cancer* **2**: 42
- Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Malaponte G, Militello L, Russo AE, McCubrey JA, Canevari S, Libra M (2009) The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression. *Cell Cycle* **8**: 1367-1372
- Cheung KL, Huen J, Houry WA, Ortega J (2010a) Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. *Biochem Cell Biol* **88**: 77-88
- Cheung KL, Huen J, Kakihara Y, Houry WA, Ortega J (2010b) Alternative oligomeric states of the yeast Rvb1/Rvb2 complex induced by histidine tags. *J Mol Biol* **404**: 478-492
- Cho SG, Bhoumik A, Broday L, Ivanov V, Rosenstein B, Ronai Z (2001) TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol Cell Biol* **21**: 8398-8413
- Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* **78**: 273-304
- Conaway RC, Conaway JW (2009) The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair. *Trends in biochemical sciences* **34**: 71-77
- Corona DF, Langst G, Clapier CR, Bonte EJ, Ferrari S, Tamkun JW, Becker PB (1999) ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol Cell* **3**: 239-245
- Corona DF, Tamkun JW (2004) Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim Biophys Acta* **1677**: 113-119
- de Nigris F, Zanella L, Cacciatore F, De Chiara A, Fazioli F, Chiappetta G, Apice G, Infante T, Monaco M, Rossiello R, De Rosa G, Alberghini M, Napoli C (2011) YY1

- overexpression is associated with poor prognosis and metastasis-free survival in patients suffering osteosarcoma. *BMC cancer* **11**: 472
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Cote J (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**: 979-990
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly reviews of biophysics* **21**: 129-228
- Dugan KA, Wood MA, Cole MD (2002) TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. *Oncogene* **21**: 5835-5843
- Ebbert R, Birkmann A, Schuller HJ (1999) The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Molecular microbiology* **32**: 741-751
- Elkaim J, Castroviejo M, Bennani D, Taouji S, Allain N, Laguerre M, Rosenbaum J, Dessolin J, Lestienne P (2012) First identification of small-molecule inhibitors of Pontin by combining virtual screening and enzymatic assay. *Biochem J* **443**: 549-559
- Feng Y, Lee N, Fearon ER (2003) TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res* **63**: 8726-8734
- Fenn S, Breitsprecher D, Gerhold CB, Witte G, Faix J, Hopfner KP (2011) Structural biochemistry of nuclear actin-related proteins 4 and 8 reveals their interaction with actin. *The EMBO journal* **30**: 2153-2166
- Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, Gleason SL, Driggers PH, Levi BZ, Appella E, Ozato K (1992) Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol Cell Biol* **12**: 38-44
- Galvin KM, Shi Y (1997) Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. *Mol Cell Biol* **17**: 3723-3732
- Gartner W, Rossbacher J, Zierhut B, Daneva T, Base W, Weissel M, Waldhausl W, Pasternack MS, Wagner L (2003) The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. *Cell motility and the cytoskeleton* **56**: 79-93
- Gasteiger J (2006) Chemoinformatics: a new field with a long tradition. *Analytical and bioanalytical chemistry* **384**: 57-64

## Bibliografia

---

- Golebiowski FM, Gorecki A, Bonarek P, Rapala-Kozik M, Kozik A, Dziejzicka-Wasylewska M (2012) An investigation of the affinities, specificity and kinetics involved in the interaction between the Yin Yang 1 transcription factor and DNA. *FEBS J* **279**: 3147-3158
- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**: 1125-1142
- Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, McVey CE, Vorrhein C, Round A, Svergun DI, Donner P, Matias PM, Carrondo MA (2011) Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J Struct Biol* **176**: 279-291
- Gospodinov A, Tsaneva I, Anachkova B (2009) RAD51 foci formation in response to DNA damage is modulated by TIP49. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 925-933
- Gospodinov A, Vaissiere T, Krastev DB, Legube G, Anachkova B, Herceg Z (2011) Mammalian Ino80 mediates double-strand break repair through its role in DNA end strand resection. *Mol Cell Biol* **31**: 4735-4745
- Gribun A, Cheung KL, Huen J, Ortega J, Houry WA (2008) Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J Mol Biol* **376**: 1320-1333
- Gstaiger M, Luke B, Hess D, Oakeley EJ, Wirbelauer C, Blondel M, Vigneron M, Peter M, Krek W (2003) Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional prefoldin URI. *Science* **302**: 1208-1212
- Hariharan N, Kelley DE, Perry RP (1991) Delta, a transcription factor that binds to downstream elements in several polymerase II promoters, is a functionally versatile zinc finger protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9799-9803
- He Y, Casaccia-Bonnel P (2008) The Yin and Yang of YY1 in the nervous system. *J Neurochem* **106**: 1493-1502
- Hellman LM, Fried MG (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature protocols* **2**: 1849-1861
- Hogan CJ, Alijanni S, Durand-Dubief M, Persson J, Will WR, Webster J, Wheeler L, Mathews CK, Elderkin S, Oxley D, Ekwall K, Varga-Weisz PD (2010) Fission yeast Iec1-ino80-mediated nucleosome eviction regulates nucleotide and phosphate metabolism. *Mol Cell Biol* **30**: 657-674

- Holzmann K, Gerner C, Korosec T, Poltl A, Grimm R, Sauer mann G (1998) Identification and characterization of the ubiquitously occurring nuclear matrix protein NMP 238. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 39-45
- Horn PJ, Peterson CL (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* **297**: 1824-1827
- Houbaviy HB, Usheva A, Shenk T, Burley SK (1996) Cocystal structure of YY1 bound to the adeno-associated virus P5 initiator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13577-13582
- Huber O, Menard L, Haurie V, Nicou A, Taras D, Rosenbaum J (2008) Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res* **68**: 6873-6876
- Huen J, Kakihara Y, Uguw F, Cheung KL, Ortega J, Houry WA (2010) Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem Cell Biol* **88**: 29-40
- Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**: 463-473
- Izumi N, Yamashita A, Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, Hirano H, Anderson P, Ohno S (2010) AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci Signal* **3**: ra27
- Jeon Y, Lee JT (2011) YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. *Cell* **146**: 119-133
- Jha S, Dutta A (2009) RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Mol Cell* **34**: 521-533
- Jha S, Gupta A, Dar A, Dutta A (2013) RVBs are required for assembling a functional TIP60 complex. *Mol Cell Biol* **33**: 1164-1174
- Jha S, Shibata E, Dutta A (2008) Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol Cell Biol* **28**: 2690-2700
- Jiang Y, Wang X, Bao S, Guo R, Johnson DG, Shen X, Li L (2010) INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17274-17279
- Jin J, Cai Y, Yao T, Gottschalk AJ, Florens L, Swanson SK, Gutierrez JL, Coleman MK, Workman JL, Mushegian A, Washburn MP, Conaway RC, Conaway JW (2005) A

## Bibliografia

---

mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J Biol Chem* **280**: 41207-41212

Jonsson ZO, Dhar SK, Narlikar GJ, Auty R, Wagle N, Pellman D, Pratt RE, Kingston R, Dutta A (2001) Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *J Biol Chem* **276**: 16279-16288

Jonsson ZO, Jha S, Wohlschlegel JA, Dutta A (2004) Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell* **16**: 465-477

Kanemaki M, Makino Y, Yoshida T, Kishimoto T, Koga A, Yamamoto K, Yamamoto M, Moncollin V, Egly JM, Muramatsu M, Tamura T (1997) Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 64-68

Kashiwaba S, Kitahashi K, Watanabe T, Onoda F, Ohtsu M, Murakami Y (2010) The mammalian INO80 complex is recruited to DNA damage sites in an ARP8 dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **402**: 619-625

Kast DJ, Dominguez R (2011) Arp you ready for actin in the nucleus? *The EMBO journal* **30**: 2097-2098

Kastner B, Fischer N, Golas MM, Sander B, Dube P, Boehringer D, Hartmuth K, Deckert J, Hauer F, Wolf E, Uchtenhagen H, Urlaub H, Herzog F, Peters JM, Poerschke D, Luhrmann R, Stark H (2008) GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nature methods* **5**: 53-55

Kim DE, Chivian D, Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic acids research* **32**: W526-531

Kim JD, Faulk C, Kim J (2007) Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic acids research* **35**: 3442-3452

Kim JH, Choi HJ, Kim B, Kim MH, Lee JM, Kim IS, Lee MH, Choi SJ, Kim KI, Kim SI, Chung CH, Baek SH (2006) Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nature cell biology* **8**: 631-639

King TH, Decatur WA, Bertrand E, Maxwell ES, Fournier MJ (2001) A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol Cell Biol* **21**: 7731-7746

Klar M (2011) Yin Yang 2: the great unknown within the Yin Yang 1 regulatory network. *Crit Rev Oncog* **16**: 239-243

- Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H, Haw RA, Pootoolal J, Tong A, Canadien V, Richards DP, Wu X, Emili A, Hughes TR, Buratowski S, Greenblatt JF (2003) A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* **12**: 1565-1576
- Lim CR, Kimata Y, Ohdate H, Kokubo T, Kikuchi N, Horigome T, Kohno K (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like protein, Tih2p, is required for cell cycle progression and RNA polymerase II-directed transcription. *J Biol Chem* **275**: 22409-22417
- Lovejoy CA, Cortez D (2009) Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA repair* **8**: 1004-1008
- Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**: 82-97
- Lusser A, Kadonaga JT (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **25**: 1192-1200
- Machado-Pinilla R, Liger D, Leulliot N, Meier UT (2012) Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA* **18**: 1833-1845
- Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M, Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T, Tamura T (1998) TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 819-823
- Marfella CG, Imbalzano AN (2007) The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation research* **618**: 30-40
- Maslon MM, Hrstka R, Vojtesek B, Hupp TR (2010) A divergent substrate-binding loop within the pro-oncogenic protein anterior gradient-2 forms a docking site for Reptin. *J Mol Biol* **404**: 418-438
- Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem* **281**: 38918-38929
- Matsumura N, Huang Z, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Mori S, Chang JT, Kuo WL, Gusberg AH, Whitaker RS, Gray JW, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK (2009) Yin yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer. *Molecular cancer research : MCR* **7**: 210-220
- Matthews BW (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**: 491-497

## Bibliografia

---

- Meyer AS, Gillespie JR, Walther D, Millet IS, Doniach S, Frydman J (2003) Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. *Cell* **113**: 369-381
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**: 343-348
- Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**: 767-775
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475-487
- Nguyen VQ, Ranjan A, Stengel F, Wei D, Aebersold R, Wu C, Leschziner AE (2013) Molecular Architecture of the ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complex SWR1. *Cell* **154**: 1220-1231
- Niewiarowski A, Bradley AS, Gor J, McKay AR, Perkins SJ, Tsaneva IR (2010) Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *Biochem J* **429**: 113-125
- Ohdate H, Lim CR, Kokubo T, Matsubara K, Kimata Y, Kohno K (2003) Impairment of the DNA binding activity of the TATA-binding protein renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth. *J Biol Chem* **278**: 14647-14656
- Ohi M, Li Y, Cheng Y, Walz T (2004) Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biological procedures online* **6**: 23-34
- Papamichos-Chronakis M, Peterson CL (2008) The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 338-345
- Papamichos-Chronakis M, Watanabe S, Rando OJ, Peterson CL (2011) Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* **144**: 200-213
- Park K, Atchison ML (1991) Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9804-9808
- Paulsen M, Ferguson-Smith AC (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of pathology* **195**: 97-110

- Peranen J, Rikkonen M, Hyvonen M, Kaariainen L (1996) T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry* **236**: 371-373
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605-1612
- Petukhov M, Dagkessamanskaja A, Bommer M, Barrett T, Tsaneva I, Yakimov A, Queval R, Shvetsov A, Khodorkovskiy M, Kas E, Grigoriev M (2012) Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases. *Structure* **20**: 1321-1331
- Powe DG, Akhtar G, Habashy HO, Abdel-Fatah T, Rakha EA, Green AR, Ellis IO (2009) Investigating AP-2 and YY1 protein expression as a cause of high HER2 gene transcription in breast cancers with discordant HER2 gene amplification. *Breast cancer research: BCR* **11**: R90
- Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR (2007) Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J Mol Biol* **366**: 179-192
- Qiu XB, Lin YL, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, Parvin JD, Dutta A (1998) An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J Biol Chem* **273**: 27786-27793
- Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J (1987) Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *J Microsc* **146**: 113-136
- Rosenbaum J, Baek SH, Dutta A, Houry WA, Huber O, Hupp TR, Matias PM (2013) The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. *Sci Signal* **6**: mr1
- Rousseau B, Menard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemiere S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J (2007) Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **46**: 1108-1118
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* **5**: 725-738
- Salzer U, Kubicek M, Prohaska R (1999) Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of ECP-51 and ECP-54 (TIP49), two homologous, interacting erythroid cytosolic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 365-370

## Bibliografia

---

- Sarkar S, Kiely R, McHugh PJ (2010) The Ino80 chromatin-remodeling complex restores chromatin structure during UV DNA damage repair. *The Journal of cell biology* **191**: 1061-1068
- Schagger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* **199**: 223-231
- Scheres SH, Nunez-Ramirez R, Sorzano CO, Carazo JM, Marabini R (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nature protocols* **3**: 977-990
- Seeber A, Hauer M, Gasser SM (2013) Nucleosome remodelers in double-strand break repair. *Current opinion in genetics & development* **23**: 174-184
- Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, Hanna S, Garban H, Roberts A, Shi T, Liu X, Chia D, Goodglick L, Bonavida B (2005) Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *International journal of oncology* **27**: 131-141
- Shaikh TR, Gao H, Baxter WT, Asturias FJ, Boisset N, Leith A, Frank J (2008) SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nature protocols* **3**: 1941-1974
- Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**: 541-544
- Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C (2003a) Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell* **12**: 147-155
- Shen X, Xiao H, Ranallo R, Wu WH, Wu C (2003b) Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 112-114
- Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T (1991) Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**: 377-388
- Shinagawa H, Iwasaki H (1996) Processing the holliday junction in homologous recombination. *Trends in biochemical sciences* **21**: 107-111
- Sigala B, Edwards M, Puri T, Tsaneva IR (2005) Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis. *Experimental cell research* **310**: 357-369
- Stark H (2010) GraFix: stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle cryo-EM. *Methods in enzymology* **481**: 109-126

- Szerlong H, Hinata K, Viswanathan R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cairns BR (2008) The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 469-476
- Tang G, Peng L, Baldwin PR, Mann DS, Jiang W, Rees I, Ludtke SJ (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* **157**: 38-46
- Thomas MJ, Seto E (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**: 197-208
- Thompson LH (2012) Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation research* **751**: 158-246
- Torreira E, Jha S, Lopez-Blanco JR, Arias-Palomo E, Chacon P, Canas C, Ayora S, Dutta A, Llorca O (2008) Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. *Structure* **16**: 1511-1520
- Tosi A, Haas C, Herzog F, Gilmozzi A, Berninghausen O, Ungewickell C, Gerhold CB, Lakomek K, Aebersold R, Beckmann R, Hopfner KP (2013) Structure and Subunit Topology of the INO80 Chromatin Remodeler and Its Nucleosome Complex. *Cell* **154**: 1207-1219
- Tsaneva IR, Muller B, West SC (1993) RuvA and RuvB proteins of Escherichia coli exhibit DNA helicase activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1315-1319
- Tucker PA, Sallai L (2007) The AAA+ superfamily--a myriad of motions. *Current opinion in structural biology* **17**: 641-652
- Udugama M, Sabri A, Bartholomew B (2011) The INO80 ATP-dependent chromatin remodeling complex is a nucleosome spacing factor. *Mol Cell Biol* **31**: 662-673
- van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**: 777-788
- van Attikum H, Gasser SM (2009) Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* **19**: 207-217
- van Gool AJ, Shah R, Mezard C, West SC (1998) Functional interactions between the holliday junction resolvase and the branch migration motor of Escherichia coli. *The EMBO journal* **17**: 1838-1845

## Bibliografia

---

- Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE (2008) Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* **132**: 945-957
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* **1**: 945-951
- Watkins NJ, Lemm I, Ingelfinger D, Schneider C, Hossbach M, Urlaub H, Luhrmann R (2004) Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell* **16**: 789-798
- Weiske J, Huber O (2005) The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *Journal of cell science* **118**: 3117-3129
- Wilkinson F, Pratt H, Atchison ML (2010) PcG recruitment by the YY1 REPO domain can be mediated by Yaf2. *Journal of cellular biochemistry* **109**: 478-486
- Wilkinson FH, Park K, Atchison ML (2006) Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19296-19301
- Wood MA, McMahon SB, Cole MD (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* **5**: 321-330
- Wu S, Shi Y, Mulligan P, Gay F, Landry J, Liu H, Lu J, Qi HH, Wang W, Nickoloff JA, Wu C (2007) A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1165-1172
- Xu D, Bai J, Duan Q, Costa M, Dai W (2009) Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. *Cell Cycle* **8**: 3688-3694
- Xu Y, Ayrappetov MK, Xu C, Gursoy-Yuzugullu O, Hu Y, Price BD (2012) Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell* **48**: 723-733
- Yamada K, Miyata T, Tsuchiya D, Oyama T, Fujiwara Y, Ohnishi T, Iwasaki H, Shinagawa H, Ariyoshi M, Mayanagi K, Morikawa K (2002) Crystal structure of the RuvA-RuvB complex: a structural basis for the Holliday junction migrating motor machinery. *Mol Cell* **10**: 671-681
- Yu EY, Steinberg-Neifach O, Dandjinou AT, Kang F, Morrison AJ, Shen X, Lue NF (2007) Regulation of telomere structure and functions by subunits of the INO80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* **27**: 5639-5649

Zaravinos A, Spandidos DA (2010) Yin yang 1 expression in human tumors. *Cell Cycle* **9**: 512-522

Zecchi L, Lo Piano A, Suzuki Y, Canas C, Takeyasu K, Ayora S (2012) Characterization of the Holliday junction resolving enzyme encoded by the Bacillus subtilis bacteriophage SPP1. *PloS one* **7**: e48440

Zhang Q, Stovall DB, Inoue K, Sui G (2011) The oncogenic role of Yin Yang 1. *Crit Rev Oncog* **16**: 163-197

Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, Schein S, Zhou ZH (2013) Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 105-110

Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* **9**: 40



**Publicaciones**



# Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1–RuvBL2 complex

Andrés López-Perrote<sup>1</sup>, Hugo Muñoz-Hernández<sup>1</sup>, David Gil<sup>2</sup> and Oscar Llorca<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramiro de Maetzu 9, 28040 Madrid and <sup>2</sup>Structural Biology Unit, CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

Received June 21, 2012; Revised and Accepted August 24, 2012

## ABSTRACT

**RuvBL1 and RuvBL2, also known as Pontin and Reptin, are AAA+ proteins essential in small nucleolar ribonucleoprotein biogenesis, chromatin remodelling, nonsense-mediated messenger RNA decay and telomerase assembly, among other functions. They are homologous to prokaryotic RuvB, forming single- and double-hexameric rings; however, a DNA binding domain II (DII) is inserted within the AAA+ core. Despite their biological significance, questions remain regarding their structure. Here, we report cryo-electron microscopy structures of human double-ring RuvBL1–RuvBL2 complexes at ~15 Å resolution. Significantly, we resolve two coexisting conformations, compact and stretched, by image classification techniques. Movements in DII domains drive these conformational transitions, extending the complex and regulating the exposure of DNA binding regions. DII domains connect with the AAA+ core and bind nucleic acids, suggesting that these conformational changes could impact the regulation of RuvBL1–RuvBL2 containing complexes. These findings resolve some of the controversies in the structure of RuvBL1–RuvBL2 by revealing a mechanism that extends the complex by adjustments in DII.**

## INTRODUCTION

RuvB-like 1 (RuvBL1), also known as Rvb1, Pontin, TIP49 and TIP49A, and RuvB-like 2 (RuvBL2), also known as Rvb2, Reptin, TIP48 and TIP49B, are highly conserved ATPases that belong to the AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) family (1). RuvBL1 and RuvBL2 share 65% of sequence similarity, and they are homologous to prokaryotic RuvB, a protein that together

with RuvA and RuvC provides the energy for the resolution of Holliday junctions, a DNA intermediate in many DNA repair processes (2). RuvBL1 and RuvBL2 are essential components of several unrelated multi-protein complexes (3), including INO80 and SWR1 chromatin remodelling complexes (4), the TIP60 histone acetyltransferase complex (5), the R2TP complex involved in biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) (6,7) and complexes that regulate the activity of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-like kinases (8). RuvBL1 and RuvBL2 have been implicated in multiple and essential functions in the cell (1,3), including transcription (9), DNA repair (8), nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (8) and telomerase assembly (10). In addition, several studies have described a link between deregulation of RuvBL1 and RuvBL2 and some types of cancer (11–13).

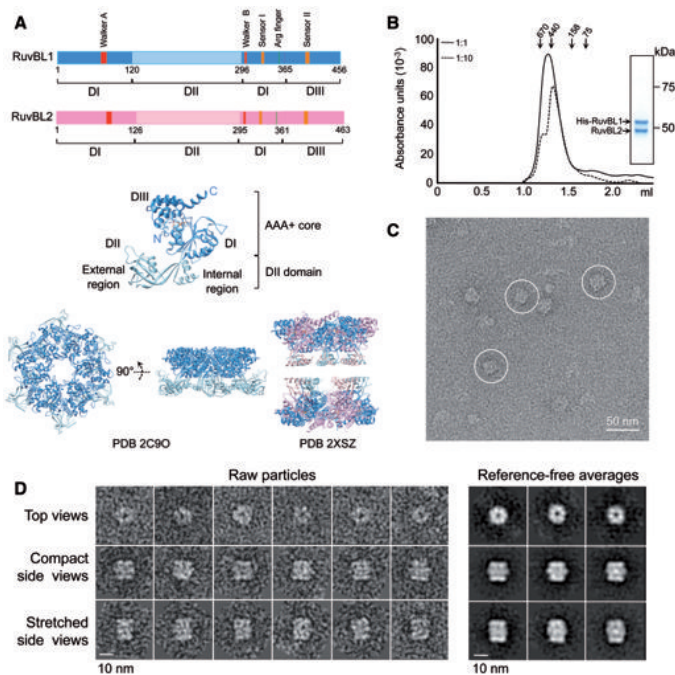
The function of RuvBL1 and RuvBL2 in the context of such diverse sets of complexes is unclear, but current models propose that they act as scaffolds for multi-protein interactions and that their ATPase activity could be important for regulatory steps performed during chromatin remodelling and telomerase assembly (1,3). For instance, human RuvBL1 and RuvBL2 interact with components of telomerase, contributing to the biogenesis of a functional enzyme that requires the ATPase activity of RuvBL1 (10). In yeast, RuvBL1 and RuvBL2 homologues recruit Arp5 to assemble a catalytically active INO80 remodelling complex (14). RuvBL1 and RuvBL2 are also involved in the assembly of complexes containing PI3K-related protein kinases (PIKKs), such as ATM, ATR, mTOR and SMG-1 (15). RuvBL1 and RuvBL2 regulate the functions of SMG-1 and contribute to NMD in mammals (8).

Recently, X-ray crystallography and electron microscopy (EM) have provided important insights about the structure of RuvBL1 and RuvBL2 proteins from human and yeast. A high-resolution structure of human RuvBL1 showed that the protein assembles as a hexameric ring, similar to what has been described for other members of

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 91 837 3112 (extn 4446); Fax: +34 91 536 0432; Email: ollorca@cib.csic.es

© The Author(s) 2012. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Figure 1.** Purification and electron microscopy of human RuvBL1–RuvBL2. (A) Sequence of RuvBL1 and RuvBL2 and atomic structures of homo-hexameric RuvBL1 (PDB code: 2C9O) (16) and the truncated double-ring RuvBL1–RuvBL2 complex (PDB code: 2XSZ) (17). The middle panel shows an enlarged view of a RuvBL1 monomer. Domains and the N- and C-terminal ends of the protein are labelled. Colour codes for different domains in the primary structure are used in the atomic structures. (B) Elution profile from a SEC of the His–RuvBL1–RuvBL2 complex after affinity purification (solid line). The sample was also analysed after 1:10 dilution (dashed line). Molecular weight standards corresponding to 670, 440, 158 and 75 kDa are indicated. Inset shows a SimplyBlue (Novagen) stained SDS–PAGE of purified RuvBL1–RuvBL2 complex after SEC. (C) Representative field of an electron micrograph obtained for RuvBL1–RuvBL2 after negative staining. Selected side view images are highlighted. Scale bar, 50 nm. (D) Raw images and reference-free 2D averages obtained after reference-free classification and averaging. Scale bar, 10 nm.

the AAA+ family, including RuvB (16) (Figure 1A). Each monomer consists of three distinct domains. Domain I (DI), residues 1–120 and 296–365, and domain III (DIII), residues 366–456, make up the AAA+ core of the protein. This core oligomerizes in the archetypical hexamer observed in many AAA+ proteins, and it contains the so-called Walker A and Walker B motifs responsible for the ATPase activity. Domain II (DII), a ~170 amino acid insertion comprising residues 121–295, is connected to the core by a linker containing two  $\beta$ -strands that permit some flexibility. DII is spatially organized into the following two regions: internal and external. The internal region comprises two  $\alpha$ -helices and loops, whereas interestingly, the external region resembles the DNA-binding domain of several proteins, including replication protein A (RPA) (16) (Figure 1A). Previous

studies have shown that the RuvBL1 DII domain binds single-stranded DNA (ssDNA), double-stranded DNA (dsDNA) and single-stranded RNA (ssRNA) *in vitro* (16), whereas some data also suggest a potential role in protein binding (18). Evidence for nucleic acid binding to the DII domain from RuvBL2 has not yet been provided.

Several reports have described that human RuvBL1 and RuvBL2 can assemble a dodecameric complex containing two hexameric rings. A recent crystal structure of RuvBL1–RuvBL2, in which most of DII was truncated (lacking RuvBL1 residues 127–233 and RuvBL2 residues 134–237), revealed that these proteins formed a dodecamer consisting of two heterohexameric rings with alternating subunits in each ring (17). In the structure, the two hexameric rings are bound back-to-back,

and the interaction between rings is mediated, in part, by segments in the internal region of DII still present in these constructs. Interestingly, each RuvBL1 subunit in one of the rings interacts with a RuvBL2 subunit in the other ring. Surprisingly, a negative stain EM reconstruction of the human dodecameric complex differs dramatically from the crystallographic structures (16,17,19). To explain such a discrepancy, it has been argued that RuvBL1 and RuvBL2 could potentially assemble several types of complexes to accommodate the diversity of its functions *in vivo* (20,21).

These findings for the human proteins have been complemented by EM studies in yeast. Yeast homologues of RuvBL1 and RuvBL2 have been described as heterohexameric single rings (22). The yeast proteins also assemble double-ring complexes, with DII domains facing the interface between rings (23,24). Interestingly, two independent structures of yeast double-ring complexes are significantly different. The cryo-EM structure by Torreira *et al.* (24) is compact, and DII domains are interconnected, whereas the structure by Cheung *et al.* (23) is elongated, and the distance between the two rings is significantly larger.

It has been proposed that yeast homologues of RuvBL1 and RuvBL2 assemble *in vivo* as single hexameric rings only, whereas double-ring complexes would be artifacts induced by histidine tags in the recombinant proteins (22,23). However, human proteins have been found to assemble double rings under several experimental conditions (17,19,21). The interaction between RuvBL1 and RuvBL2 *in vitro* is affected by experimental conditions, such as the expression and purification of recombinant proteins. Therefore, it is difficult to assess the extent in which complexes identified *in vitro* will represent a faithful account of the oligomeric state *in vivo*. The relevant oligomeric states of RuvBL1 and RuvBL2 may also be influenced by their context in larger macromolecular complexes. It is conceivable that single- and double-ring complexes might have a functional significance.

A more complete structural understanding of RuvBL1 and RuvBL2 will provide an important platform for interpreting the assemblies they form while performing their diverse cellular functions. Although previous structural studies reveal that RuvBL1 and RuvBL2 form double-ring complexes, structures reported are different (17,19). Discrepancies have been interpreted as a consequence of the different experimental methods used for the production of complexes and/or potential inherent structural heterogeneity (17,20,23,24). A recent study using analytical centrifugation with human RuvBL1–RuvBL2 complexes raised the possibility that these proteins could be assembling a number of different complexes, at least *in vitro* (21). Here, we clarify many of these issues by resolving the structure of the full-length human RuvBL1–RuvBL2 dodecameric complex using cryo-EM of frozen hydrated samples, by improving the resolution of the structures compared with those published and by taking into account conformational heterogeneity using image-processing strategies. We describe a cryo-EM structure of the human

RuvBL1–RuvBL2 dodecamer that is consistent with known crystal structures for parts of the complex. Moreover, we describe two conformations of the double-ring complex that coexist in the same preparation. These conformational changes impact in the exposure of putative DNA-binding regions in DII domains and could have a general role in regulating RuvBL1–RuvBL2. We define the structural basis for this conformational heterogeneity and propose a reasonable explanation for the differences observed in previously reported structures.

## MATERIALS AND METHODS

### Expression and purification of human RuvBL1–RuvBL2 complexes

N-terminal His<sub>10</sub>-tagged human RuvBL1 was cloned using a modified pET15b (Novagen) vector, pETE15b, which includes 10-histidine residues and a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site (kindly provided by Dr J.M. Pereda, CIC Salamanca, Spain). Untagged human RuvBL2 was cloned using a pCDFDuet-1 (Novagen) vector. Both constructs were co-transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells grown in LB medium. Overexpression was induced at 28°C for 3 h by addition of 0.1 mM (final concentration) isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside. Cell lysis was performed by sonication in lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) NP-40) containing a cocktail of ethylenediaminetetraacetic acid-free proteases inhibitors (Roche). Lysate was cleared by centrifugation at 37 000 r.p.m. for 45 min at 4°C, and the supernatant was applied to a HisTrap HP column (GE Healthcare) equilibrated in buffer A (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 20 mM imidazole). Elution was performed using a 20–500 mM imidazole gradient, and fractions containing the His–RuvBL1–RuvBL2 complex were pooled and dialyzed overnight in buffer B (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 250 mM NaCl). The sample was then applied to a size-exclusion chromatography (SEC) using a Superdex 200 PC 3.2/30 column (GE Healthcare) equilibrated in buffer B. Final protein concentration was estimated by measuring of absorbance at 280 nm. Purification was monitored by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and SimplyBlue (Novagen) staining.

For those experiments where the His-tag of His–RuvBL1 was removed, fractions pooled from the HisTrap HP column (GE Healthcare) were incubated overnight with TEV protease at 4°C while dialyzing against buffer A. The sample was reapplied to the HisTrap HP column and eluted as described earlier in the text to separate the untagged complex (flow-through) from any residual His–RuvBL1–RuvBL2 complex, the His-tag and the TEV protease (which includes a N-terminal His<sub>6</sub>-tag). Flow-through from the affinity column was applied to a Superdex 200 PC 3.2/30 column (GE Healthcare) and fractionated under the same conditions as those described for the tagged version of the complex (see earlier in the text). Purification of the untagged RuvBL1–RuvBL2

complex was monitored by SDS-PAGE and SimplyBlue (Novagen) staining and western blot with an anti-His antibody (monoclonal anti-polyhistidine peroxidase conjugate, Sigma-Aldrich).

#### Blue native PAGE

Fifteen microlitres of purified His-RuvBL1-RuvBL2 or RuvBL1-RuvBL2 complexes (both at 1 mg/ml) was mixed with 4  $\mu$ l of loading dye and was loaded into blue native PAGE (BN-PAGE) gels (NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System, Novex). Electrophoresis was performed following manufacturer's instructions. The presence of the tag was monitored by western blot with an anti-His antibody (monoclonal anti-polyhistidine peroxidase conjugate, Sigma-Aldrich).

#### EM and image processing of negative stained images

A few microliters of freshly purified complexes (0.01 mg/ml) were deposited on carbon-coated grids and were stained using 2% (w/v) uranyl formate. Micrographs were recorded using a JEOL 1230 transmission electron microscope and a 4 k  $\times$  4 k TVIPS CMOS detector using a low-dose protocol under control of the EM-TOOLS software (TVIPS). Images were collected at a final magnification of 68 222 $\times$ , and these were down-sampled to a final 4.56  $\text{\AA}$  per pixel. The contrast transfer function (CTF) for each micrograph was estimated using CTFFIND3 (25), and correction was performed using BSOFT (26). Ten thousand particles were extracted from the micrographs. Particles were classified and averaged in 2D using the *e2refine2d.py* command in EMAN2 (27). Roughly, 6000 side views from the data set were split, and these were used for angular refinement using EMAN (28). Templates for starting angular refinement were obtained by applying the *startesym* command in EMAN (28) to side and top view averages. Given the high degree of sequence similarity between RuvBL1 and RuvBL2 (16), the two proteins cannot be distinguished at the resolution provided by negative stain experiments; thus, 6-fold rotational symmetry (C6 symmetry) was assumed through refinement. In addition, the crystal structure of the truncated RuvBL1-RuvBL2 dodecamer revealed the symmetry between the two rings (dihedral rotational symmetry, D2) (17), which was assumed throughout refinement. The resolution of the compact and stretched conformations was estimated as 26  $\text{\AA}$  and 30  $\text{\AA}$ , respectively, using Fourier shell correlation (FSC) with a 0.5 cut-off.

In an independent set of experiments, *ab initio* structures of the RuvBL1-RuvBL2 complexes were obtained using the random conical tilt (RCT) method (29) as implemented in EMAN2 (27). A total of 3200 tilt pairs of images were collected and classified into 30 averages, each with  $\sim$ 100 particles. Representative averages were selected to obtain their 3D structure, imposing C6+D2 symmetry. All structures were displayed using UCSF Chimera (30).

#### EM of His-RuvBL1-RuvBL2 incubated with nucleotides

Fractions from the SEC enriched in His-RuvBL1-RuvBL2 dodecamers (protein concentration = 0.01 mg/ml) were pooled and then split for four independent experiments. One of the experiments was incubated in buffer B without adding any nucleotide as a control sample. In independent experiments, the sample was incubated in buffer B supplemented with 2 mM ADP and 2 mM MgCl<sub>2</sub> or two non-hydrolyzable nucleotide-metal fluoride analogues with 5 mM MgCl<sub>2</sub> for 1 h at 30°C. Nucleotide analogues were prepared by pre-incubation of 1 mM ADP with 30 mM NaF and 5 mM BeCl<sub>3</sub> (ADP-BeFx, pre-hydrolytic state) or 5 mM AlCl<sub>3</sub> (ADP-AlFx, transition state) at 30°C for 10 min. Each reaction was applied on glow-discharged carbon-coated grids and was stained using 2% (w/v) uranyl formate. Grids were imaged as described for other negative stain samples (see earlier in the text), and micrographs were recorded on a 4 k  $\times$  4 k TVIPS CMOS detector. Particles were extracted using EMAN2 (27). Classification and averaging in 2D were performed using the *e2refine2d.py* command in EMAN2 and the *cl2d* command in XMIPP (31), obtaining similar results. Cl2d is a 2D multi-reference alignment and classification procedure based on the hierarchical clustering approach (32). The number of particles assigned to each class was quantified.

#### Cryo-EM and 3D reconstruction

The purified His-RuvBL1-RuvBL2 complex was applied to QUANTIFOIL® 300 mesh R2/1 holey carbon copper grids (Quantifoil® Micro Tools GmbH, Jena, Germany) and vitrified using a Vitrobot Mark III (FEI Inc., Eindhoven, The Netherlands). Vitrified samples were analysed in a JEM-2200FS FEG electron microscope using an in-column energy filter (Omega Filter) and a 626 cryo-holder (Gatan Inc., Warrendale, PA, USA). A total of 338 images were collected on a 4 k  $\times$  4 k UltraScan 4000 CCD camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) at a final magnification of 86 855.8 $\times$ , 1.73  $\text{\AA}$  per pixel. Micrographs were recorded using a defocus range of 1.2–3.5 micron underfocus. Micrographs were pre-processed using XMIPP (31) and binned to 3.45  $\text{\AA}$  per pixel before CTF correction using CTFFIND3 (25) and BSOFT (26). A total of 24 500 particles were boxed using XMIPP (31), and the particles were subsequently classified and averaged in 2D using a 2D multi-reference alignment and classification based on the hierarchical clustering approach described earlier in the text (*cl2d* command) (31,32). This classification procedure enabled splitting images that corresponded to the two conformations of the complex. Each data set was processed independently using only side views. Angular refinement was performed using the *refine* command in EMAN and using the *startesym* command to generate the initial templates (28). Further refinement was performed using the *projection\_matching* command in XMIPP (31). C6 and D2 rotational symmetry was assumed throughout refinement, as the potential differences in structure between RuvBL1 and RuvBL2 are beyond the resolution limits in this work. After convergence, the symmetry was

relaxed to 3-fold rotational symmetry and the structure remained unchanged confirming that any potential difference in structure between RuvBL1 and RuvBL2 in the complex is beyond the resolution obtained in this work. The handedness of the reconstructions was determined by comparison with the crystal structure of the truncated RuvBL1–RuvBL1 complex (17). This crystal structure defined the interaction between the top and bottom rings through RuvBL1 and RuvBL2 subunits from opposite rings. These interactions were only preserved in one of the two possible hands for the cryo-EM reconstruction. A maximum likelihood approach (33) and a multi-reference refinement strategy using the *multi-refine* command in EMAN (28) were used to evaluate the presence of multiple conformers in the data set. The resolution was estimated as 15 Å and 16 Å for the compact and stretched conformations, respectively, by FSC (cut-off of 0.5 correlation coefficient). The structures were displayed using UCSF Chimera (30).

#### Pseudo-atomic modelling

Fitting of atomic structures for the human RuvBL1 hexameric ring (PDB code: 2C9O) (16) and the truncated human RuvBL1–RuvBL2 complex (PDB code: 2XSZ) (17) into the cryo-EM density were performed using UCSF Chimera (30). For the fitting of the DII domains into their cryo-EM density within the complex, the crystal structure of DII was extracted from the PDB (PDB code: 2C9O) (16), split in external and internal regions, and the fitting was performed by a combination of manual fitting and refinement using UCSF Chimera (30). Several constraints were applied during the refinement. For instance, connectivity between external and internal regions was preserved, and deviations from the crystal structure were minimized.

## RESULTS

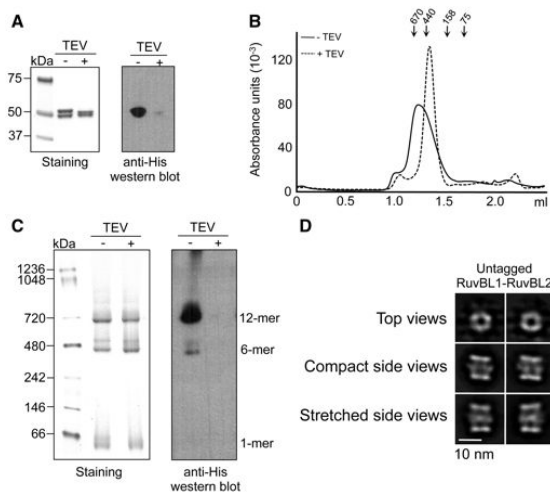
### Human RuvBL1–RuvBL2 assembles as single and double-hexameric rings

Human His-tagged RuvBL1 (RuvBL1 hereafter unless specifically stated) and untagged RuvBL2 were cloned and co-expressed in *E. coli* cells to promote the assembly of the complex *in vivo*. RuvBL2 was found to bind to RuvBL1 in a 1:1 ratio after affinity purification of the complex. The interaction between RuvBL1 and RuvBL2 was maintained after SEC (input protein concentration in SEC  $\approx$  1 mg/ml) (Figure 1B). A calibration using molecular weight standards confirmed that we could resolve single- (~440 kDa) from double-ring (~670 kDa) oligomers under our experimental conditions. The SEC profile, covering the calibrated range, suggested a mixture of single- and double-ring complexes. Double-ring complexes were susceptible to disassembling at lower concentrations, as the same preparation was enriched in single rings after a 1:10 dilution (input protein concentration in SEC  $\approx$  0.1 mg/ml) (Figure 1B). Overall, these experiments suggest that single- and double-ring populations exist in a concentration dependent equilibrium. We found similar

effects when the dilution experiment was performed after incubation with ADP or ATP (data not shown).

Fractions eluting from SEC in the region calibrated as double-ring complexes were observed in the electron microscope after negative staining, and the images obtained were compatible with a double-ring oligomer (Figure 1C). Roughly, 10000 images were extracted from the micrographs, and these were classified and averaged using reference-free methods. Top views were abundant (40%) and displayed a clear ring shape as described previously for RuvBL1 and RuvBL2 (20) (Figure 1D). We also found rectangular views containing two intense bands of density at each end and a region of lower density at the centre. Based on the existing information for RuvBL1 and RuvBL2 (20) and the EM analysis of other ring-shaped complexes, these views were interpreted as side views of a double-ring oligomer. Intense bands at each end of the molecule could be assigned to the core ring of RuvBL1–RuvBL2, whereas the fainter densities at the centre corresponded to the DII domains (Figure 1D). Interestingly, we found two types of side views with either a short (37% of the images) or a long distance (23% of the images) between the putative AAA+ core rings, which we named ‘compact’ and ‘stretched’ conformations, respectively. Side views for hexameric single-ring complexes were not detected; thus, ring-shaped top views are likely enriched in single-ring complexes.

We evaluated the influence of the tag used for affinity purification in the ratio between hexameric and dodecameric complexes. His–RuvBL1–RuvBL2 complexes were purified by affinity chromatography, and the His-tag of RuvBL1 was removed by incubation with His-tagged TEV protease. Residual His–RuvBL1–RuvBL2, cleaved His-tag, and TEV protease were removed by reinjection onto the HisTrap column. Removal of the tag was confirmed by SDS–PAGE, as His–RuvBL1 migrates slower than RuvBL1, and western blotting detecting the histidine tag (Figure 2A). Purified untagged RuvBL1–RuvBL2 complex was subsequently analysed by SEC (Figure 2B), BN–PAGE (Figure 2C) and EM (Figure 2D). SEC (input protein concentration in SEC  $\approx$  0.8 mg/ml) revealed the disassembly of most of the double-ring complexes after removal of the tag (Figure 2B). This was probably a combined effect of removal of the tag and dilution of the sample, as shown in Figure 1B. On the other hand, BN–PAGE showed that both RuvBL1–RuvBL2 preparations, His-tagged and untagged, were enriched in double-ring complexes, but also contained a mixture of monomers and single-rings (Figure 2C). The abundance of double-ring complexes was similar in the tagged and untagged complexes. Importantly, we corroborated that the double-ring complexes resolved by BN–PAGE corresponded to untagged complexes by detecting the histidine tag by western blot. For further confirmation, the untagged RuvBL1–RuvBL2 complex was observed in the electron microscope, and 18500 particles were collected and classified. Double-ring complexes in the compact and stretched conformations were detected for the untagged RuvBL1–RuvBL2 dodecamers, each conformation in a similar percentage



**Figure 2.** RuvBL1 and RuvBL2 assemble as a dodecameric complex in the absence of tags. (A) SDS-PAGE of purified untagged RuvBL1-RuvBL2 complex evaluated by Coomassie staining (left) and western blot against histidine tag (right). Addition of TEV (TEV+) removes the tag of the His-RuvBL1-RuvBL2 complex (TEV-). (B) SEC of His-RuvBL1-RuvBL2 (solid line, TEV-) compared with untagged RuvBL1-RuvBL2 (dash line, TEV+). Molecular weight standards corresponding to 670, 440, 158 and 75 kDa are indicated. (C) BN-PAGE of His-RuvBL1-RuvBL2 (TEV-) compared with untagged RuvBL1-RuvBL2 (TEV+). The different oligomeric species are indicated. Detection of the histidine tag in BN-PAGE was performed by western blot. (D) EM of untagged RuvBL1-RuvBL2. Particles were collected, classified and averaged. 2D reference-free averages for the different views of the complex are shown. Compact and stretched conformations were observed. Scale bar, 10 nm.

to the one observed for the His-tagged complex (Figure 2D). Taken as a whole, these experiments indicate that double-ring complexes do exist in the absence of an affinity tag; thus, these are one of the possible conformers of the human RuvBL1-RuvBL2 complexes.

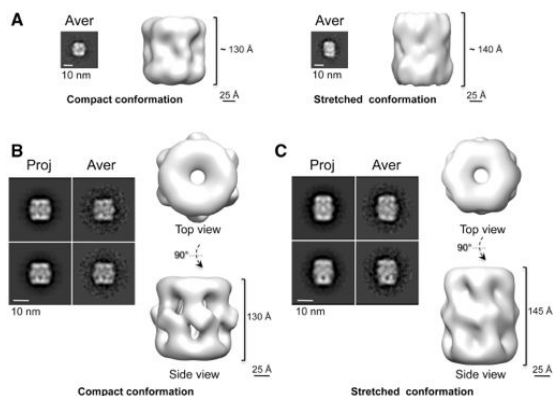
#### Two coexisting conformations for RuvBL1-RuvBL2 double-rings

We obtained low-resolution *ab initio* structures of the RuvBL1-RuvBL2 complexes using the RCT method (29) (Figure 3A). This method exploits the relationship between tilted and untilted images of the same object to calculate a 3D structure from images corresponding to single views. The RCT structures for the short and long side view averages revealed that these images corresponded to distinct conformations of the complex with a significant difference in the length of the longitudinal axis (Figure 3A).

The resolution of the structures obtained from negatively stained images was improved by angular refinement methods using an independent data set (Figure 3B and C, Supplementary Figure S1A). After classification and averaging using reference-free methods, all further image processing was performed using only side views, as these are sufficient to reconstruct the complex. Particles corresponding to short (37% of the data set) and long

(23% of the data set) side views were split in two groups and refined independently to obtain two structures, 'compact' (Figure 3B) and 'stretched' (Figure 3C). These two conformations corroborated the *ab initio* models obtained by the RCT approach applied to short and long side views. As a control, we compared 'long' and 'short' side view images to the 'compact' and 'stretched' conformations, respectively, which confirmed that the two types of views were incompatible, and they could not be derived from the same structure (data not shown).

The 26 Å resolution structure of the compact conformation obtained using negative staining revealed two rings at each end and six densities connected at the centre (Figure 3B). The EM structure was fitted with the atomic structure of RuvBL1 (16) (cross-correlation coefficient = 0.91) and the truncated RuvBL1-RuvBL2 complex (cross-correlation coefficient = 0.91) (17), revealing a strong resemblance between the X-ray and EM structures (Supplementary Figure S1B). The core AAA+ ring was placed at each end of the complex showing a central opening with similar dimensions to those found in the crystal structure of the RuvBL1 hexamer (16). The region at the centre, organized as six bulky densities projecting slightly outwards, could then be assigned to the DII domains missing in the crystallized construct (17). In contrast, the 30 Å resolution structure of the stretched complex displayed a different conformation



**Figure 3.** Two conformations of the human RuvBL1-RuvBL2 complex. (A) RCT structures reveal two coexisting conformations. Each panel shows the average (Aver) of those particles that were used for the RCT reconstruction together with one side view of the RCT structure. (B) Negatively stained structure of the compact conformation. Two representative pairs of projection (Proj) and average (Aver) after angular refinement are shown. (C) Negatively stained structure of the stretched conformation. Two representative pairs of projection (Proj) and average (Aver) after angular refinement are shown. Scale bar, 10 nm.

(Figure 3C). The AAA+ rings could be fitted with crystal structure of the AAA+ core (cross-correlation coefficient = 0.92) (17) (Supplementary Figure S1B), but the centre of the molecule was elongated and the DII domains were noticeably extended. Clearly, the length of this conformation was incompatible with that of the RuvBL1-RuvBL2 dodecamer crystal structure (17), which could not be fitted satisfactorily within the EM density.

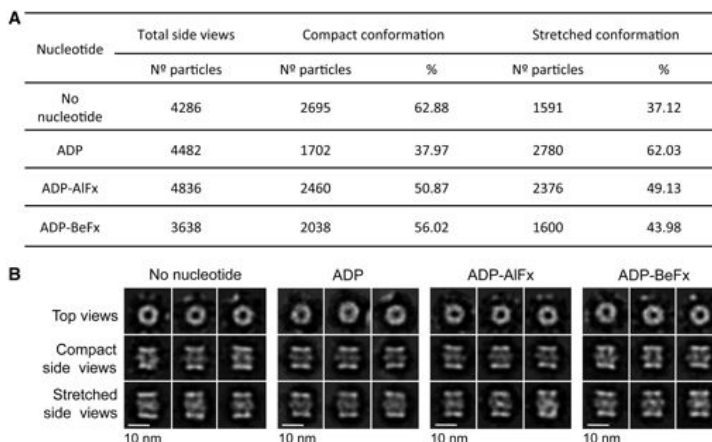
We tested whether the transition from the compact to the stretched conformation could be modulated by nucleotides. Fractions from a SEC enriched in RuvBL1-RuvBL2 dodecamers were pooled, and the resulting preparation was split for four independent experiments. The RuvBL1-RuvBL2 complex was incubated with ADP-Mg<sup>2+</sup>, the nucleotide analogue ADP-BeFx (pre-hydrolytic state) or the nucleotide analogue ADP-AIFx (transition state) (Figure 4). A control was also performed without adding any nucleotide. Each sample was analysed in the electron microscope, and images collected were processed and classified to determine the number of particles corresponding to top views and compact and stretched side views (Figure 4A). 2D averages for each experiment were also obtained (Figure 4B). All experiments were performed in duplicate, with identical results. Compact and stretched conformations co-existed in all conditions, with ADP showing a slight increase in the percentage of molecules found in the stretched conformation. We found that the percentage of top views was approximately 38% (2644 particles of 6930), 60% (6730 particles of 11 212), 55% (5804 particles of 10 640) and 58% (4984 particles of 8622) for each condition (no nucleotide added, ADP, ADP-AIFx and

ADP-BeFx, respectively). Top views cannot be assigned to single or double-ring complexes and to compact or stretched conformations. Reference-free averages were similar in all conditions tested (Figure 4B).

#### Modelling the conformational transitions of RuvBL1-RuvBL2

Images of the RuvBL1-RuvBL2 complex were also obtained from vitrified samples in the absence of staining (cryo-EM) to increase the resolution of the structures and model the structural basis of the conformational flexibility (Figure 5). A total of 24 500 images were extracted from the cryo-EM micrographs (Figure 5A), classified and averaged. Images corresponding to compact (52% of the data set) or extended (27% of the data set) side views were split and processed independently resulting in two structures at 15 Å and 16 Å, respectively (Figure 5). The vast majority of side view images could be assigned to either the extended or the compact structures, suggesting no other conformation is present in our preparation in significant amounts (Figure 5). Some side-view averages displayed a slight asymmetry between the two ends of the molecule. We determined that this was not because of a different conformation of the two rings. The refinement in 3D (see later in the text) defined these images as slightly tilted versions of a perfect side view. Top views could not be ascribed to either of these two conformations, and they were excluded from the analysis.

We evaluated the possibility of intermediate conformations between the compact and stretched structures. A maximum likelihood approach (33) and a multi-reference refinement strategy using the *multi-refine*



**Figure 4.** Influence of nucleotides in the ratio between compact and stretched conformations. (A) Percentage of side view particles classified as compact and stretched quantified after incubation with different nucleotides. (B) 2D averages obtained for each condition are also shown. Scale bar, 10 nm.

command in EMAN (28) revealed that our data set was only represented by the compact and stretched conformations. Thus, conformational transitions between these two conformations were non-existent or not sufficiently populated to be detected with the number of particles collected.

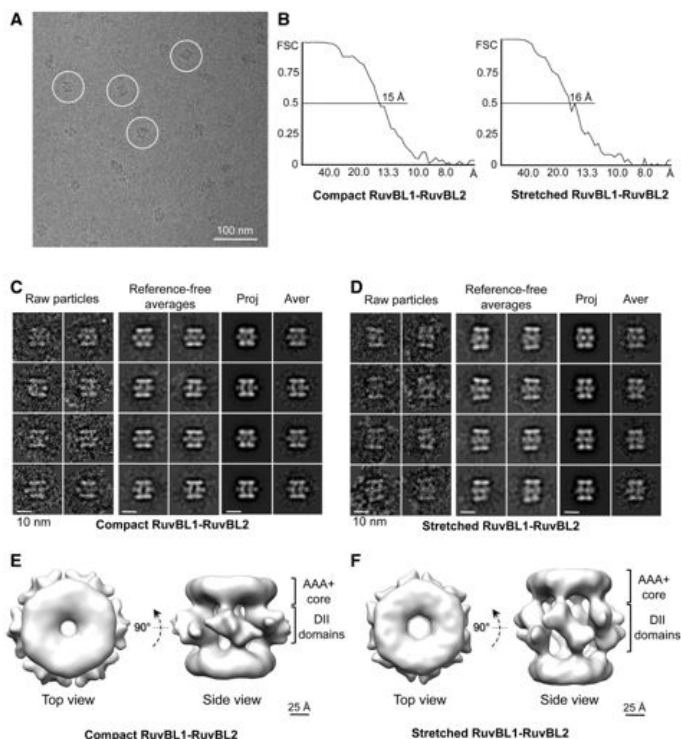
The AAA+ core showed an excellent agreement with the crystal structure of RuvBL1 (16) in the compact (cross-correlation = 0.87) (Figure 6A) and the stretched conformations (cross-correlation = 0.87) (Figure 6A); thus, they can be considered identical at this resolution. The size of the channel at the centre of the ring would permit the access of an ssDNA/ssRNA, whereas a dsDNA/dsRNA would not fit the space available (16). The overall dimensions of the truncated RuvBL1–RuvBL2 dodecamer (17) were found to match closely to those of the compact conformation (Figure 6B), whereas the two AAA+ rings were moved apart significantly to accommodate to their position in the stretched conformation (cross-correlation = 0.92 after displacing the two rings) (Figure 7B).

DII domains displayed different conformations in compact and stretched structures, which were also distinct to the conformation described in the crystal structure of the homo-hexameric RuvBL1 complex (16). We modelled these conformational changes by fitting the atomic structure of the DII domain of RuvBL1 (16) within the compact (Figure 6C) and stretched structures (Figure 7C). For this purpose, DII domains were split in half corresponding to the external and internal regions, and each region was fitted independently into the EM density. The positions of the manually placed DII domains were refined using Chimera (30) to optimize the

correlation between the crystal structure and the EM density while minimizing the movement of DII compared with the crystal structure of RuvBL1 (16) and maintaining the connectivity between the external and internal regions of DII. In the compact structure, the internal regions of the DII domains from opposite subunits were found in close proximity. This conformation is compatible with the interaction between internal regions of DII domains proposed in the atomic structure of the truncated RuvBL1–RuvBL2 complex (17) (Figure 6C).

Our structural model of the RuvBL1–RuvBL2 dodecamer builds on the observation in the crystal structure that each RuvBL1 subunit from one ring contacts a RuvBL2 subunit from the opposite ring (17), and suggests that the external regions of DII domains from these subunits are in intimate contact in the compact conformation. Such a model implies that DII domains are competent for protein–protein interactions, and a major driving force in the interaction between the two rings. Others (16) hypothesized that the DII domains are involved in nucleic acid binding based on the structural alignment of DII and RPA bound to a ssDNA (PDB code: 1JMC) (34). Residues 183–233 of RPA were superposed onto residues 127–233 of the DII domain from RuvBL1, and the comparison between the two structures pointed at the putative DNA/RNA binding region in DII (Figure 6C, labelled with an asterisk in RuvBL1).

Fitting experiments performed in the stretched conformation (Figure 7C) revealed that DII domains are pulled upwards and slightly rotated, driving the two AAA+ rings further apart. Such conformational



**Figure 5.** Cryo-EM structures of the human RuvBL1-RuvBL2 complex. (A) Typical field of frozen-hydrated RuvBL1-RuvBL2 dodecamers. Representative particles are highlighted within circles. For better visualization, we selected a micrograph taken at  $\sim 4\text{-}\mu\text{m}$  defocus, and the protein density is shown in black. Scale bar, 100 nm. (B) Resolution estimate for the compact and stretched RuvBL1-RuvBL2 structures using the FSC method. (C) Compact conformation: raw particles, reference-free averages and pairs of projections (Proj) and averages (Aver) obtained after angular refinement. Scale bar, 10 nm. (D) Stretched conformation: raw particles, reference-free averages and pairs of projections (Proj) and averages (Aver) obtained after angular refinement. Scale bar, 10 nm. (E) Two views of the RuvBL1-RuvBL2 complex (compact conformation). Scale bar, 2.5 nm. (F) Two views of the RuvBL1-RuvBL2 complex (stretched conformation). Scale bar, 2.5 nm.

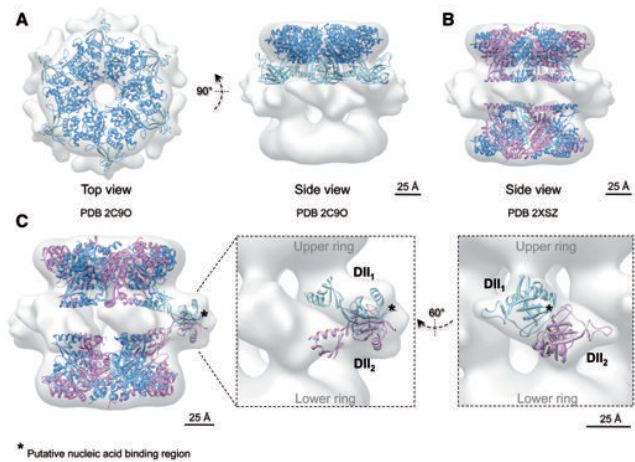
transitions drive the putative nucleic acid binding regions of the DII domains from a tight contact in the compact structure (Figure 6C, labelled with an asterisk in RuvBL1) to a looser interface in the stretched structure (Figure 7C, labelled with an asterisk in RuvBL1; Supplementary Movie S1).

## DISCUSSION

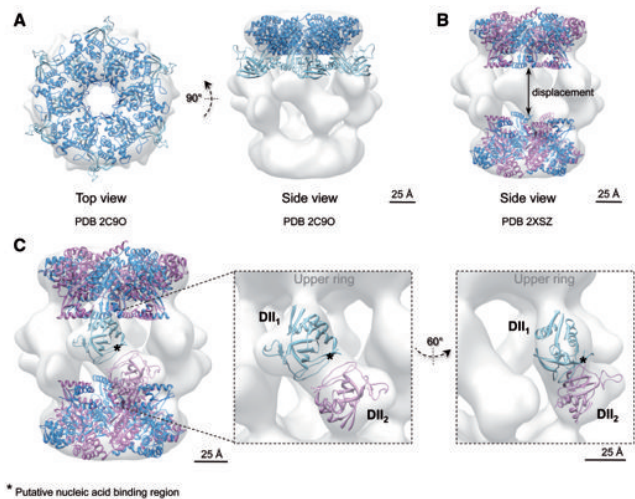
RuvBL1 and RuvBL2, two AAA+ ATPases related to prokaryotic RuvB, have been implicated in essential cellular processes as diverse as DNA repair, transcription, chromatin remodelling, NMD and telomerase assembly, among others (1,3). Such functional diversity arises from

their contribution to several large macromolecular complexes, including SWR1 and related chromatin remodelling complexes, association and regulation of transcription factors, such as c-myc and  $\beta$ -catenin, complexes in the maturation of snoRNPs and in telomerase assembly (1,3). Despite their profound biological importance, substantial controversy surrounds the structures of RuvBL1 and RuvBL2 (17,20,23,24). As a result, the molecular bases of their essential functions remain poorly understood. Together, our biochemical and structural data characterizing the human RuvBL1-RuvBL2 complex has clarified many of these outstanding issues.

There has been some discussion of the role that affinity tags used for the purification of the RuvBL1-RuvBL2



**Figure 6.** Cryo-EM structure and pseudo-atomic model of the compact conformation of human RuvBL1-RuvBL2. (A) Top and side views showing the fitting of the atomic structure of RuvBL1 (PDB code: 2C9O) (16) in the top ring. (B) Fitting of the atomic structure of the truncated human RuvBL1-RuvBL2 complex (PDB code: 2XSZ) (17). RuvBL1 is shown in blue and RuvBL2 in pink. Scale bar, 2.5 nm. (C) DII domains were fitted into the density of the cryo-EM map assigned to these domains after splitting external and internal regions. An asterisk points to putative regions of DII domains involved in the interaction with nucleic acids, hypothesized based on the comparison with RPA (see text). Scale bar, 2.5 nm.



**Figure 7.** Cryo-EM structure and pseudo-atomic model of the stretched conformation of human RuvBL1-RuvBL2. (A) Top and side views showing the fitting of the atomic structure of RuvBL1 (PDB code: 2C9O) (16) in the top ring. (B) Fitting of the atomic structure of the truncated human RuvBL1-RuvBL2 complex (PDB code: 2XSZ) (17). RuvBL1 is shown in blue and RuvBL2 in pink. The two rings were moved apart to accommodate the distance between rings in the crystal structure to that observed in the stretched conformation. Scale bar, 2.5 nm. (C) DII domains were fitted into the density of the cryo-EM map assigned to these domains after splitting external and internal regions. An asterisk points to putative regions of DII domains involved in the interaction with nucleic acids, hypothesized based on the comparison with RPA (see text). Scale bar, 2.5 nm.

complex play in the stability of the dodecameric complex. Cheung *et al.* (23) have reported that yeast double-rings were present only when the recombinant proteins contained an N-terminal histidine tag. In contrast, the approximate 1:6:6 ratio for Arp5:Rvb1:Rvb2 estimated in yeast complexes would be consistent with one Arp5 molecule per double ring in yeast (14). The human RuvBL1–RuvBL2 double-ring complex with truncated DII domains was stable after removing the histidine tag (17). In addition, double-ring complexes have been observed for proteins tagged either at the subunit's N-terminus (16,24) or C-terminus (19,21). N- and C-terminal ends of RuvBL1 and RuvBL2 are facing opposite sides of the hexamer (17). The C-terminal end is projecting outwards from the top of the ring (Figure 1A) precluding a role of the tag in the conformation of the DII domains. We now show that the human RuvBL1–RuvBL2 double-ring complex is maintained as a dodecameric assembly after removing the histidine tag. However, the tag seems to influence the stability of the dodecamer, as double-ring complexes are more prone to disassembly in a SEC experiment after tag removal. Taken all available evidence as a whole, double rings are one of the forms of the RuvBL1–RuvBL2 complex, at least in humans. The tag seems to influence the single- to double-ring transition when assembled *in vitro*. However, this effect is probably indirect in combination with other factors, including protein concentration and the presence of nucleotides. In addition, the relevant oligomeric state is likely dependent on the interaction with other proteins as part of larger macromolecular complexes.

The ~15 Å structure of the human RuvBL1–RuvBL2 double-ring complex (compact conformation) is compatible with the high-resolution structures solved by X-ray crystallography (16,17). The AAA+ core is a compact ring, identical at this resolution to the crystal structure of RuvBL1 hexamers (16). The central channel shows comparable dimensions in the structures solved by cryo-EM (this work) and X-ray crystallography (16,17). It has been speculated that this channel could bind RNA/DNA, as it is the case in other AAA+ proteins; however, these dimensions would restrict binding to ssDNA or ssRNA (16). The DII domains project towards the interface between the two rings, stabilizing their interaction. The distance between the AAA+ rings at both ends of the complex is similar to that found in the truncated RuvBL1–RuvBL2 double ring (17). In addition, we now resolve the DII domains previously missing in the crystal structure. Our structural model implies that DII domains are involved in protein–protein interactions between the two rings and suggests that these domains could also interact with other proteins as part of larger assemblies.

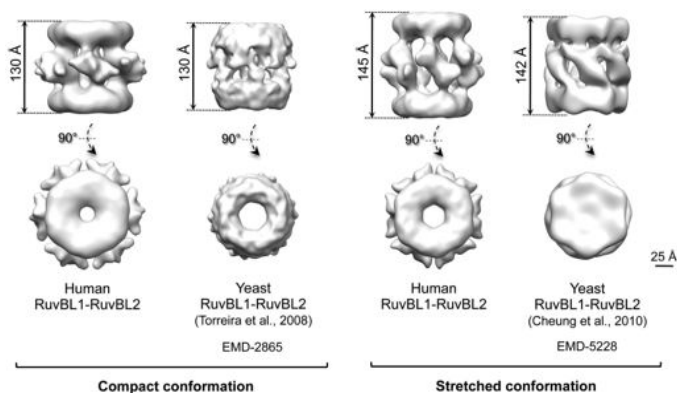
Although consistent with X-ray structures of RuvBL1 (16) and the truncated RuvBL1–RuvBL2 complex (17), our cryo-EM reconstruction of human RuvBL1–RuvBL2 differs significantly from the previously reported negative stain EM map (19). In contrast to the structure reported by Puri *et al.*, the AAA+ ring of RuvBL1 is compact, without spacing between subunits [this study, (16)]. Furthermore, the raw data presented

by Puri *et al.* cannot be rationalized based on the structure of the human complex we reconstructed. They show images that differ significantly from the typical side views we observe (19). Importantly, we do not detect a significant number of cryo-EM images that cannot be assigned to either typical top or side views. Thus, our data are not compatible with alternative structural models. A potential source of errors in their analysis could arise from the lack of perfect side views in their data set and/or a mixture of conformations. Alternatively, they could have solved a completely different conformation of the complex as suggested by Niewiarowski *et al.* (21). Nevertheless, we claim that the close agreement between our cryo-EM structure and the atomic structures for RuvBL1 and RuvBL1–RuvBL2 is a strong support for the validity of our structural analysis reported here.

In this work, rotational symmetry is assumed during refinement; thus, we cannot formally rule out that each DII domain could potentially display a different conformation. We evaluated this possibility by first applying rotational symmetry during refinement until convergence. Then, the structures were refined further without imposing any symmetry, and we found that the structure of the complex remained unchanged. This suggests that any fluctuations of the 6-fold symmetry and/or the symmetry between the two rings were not detected at the resolution of these images. A recent work modelled extensive flexibility of the DII domains within hexameric complexes (35). We predict that the conformational flexibility of DII domains within the double-ring RuvBL1–RuvBL2 complex is possibly more restricted than in the single-ring complex, as these domains are involved in inter-ring interactions.

A key finding in this study is that the RuvBL1–RuvBL2 dodecamer is present in two coexisting conformations, compact and stretched. Interestingly, these conformational changes are not directly related to a certain nucleotide state in the AAA+ ring, as both conformations are found in the presence of different nucleotides. We propose that this is the major reason behind the divergent structural models previously put forth (Figure 8). In yeast, double-ring complexes have been described as either stretched (23) or compact (24), whereas here, we show that these states can coexist simultaneously in the human system, strongly suggesting that the complex alternates between the two conformations. It is likely that the different yeast structures reflect an enrichment of one or the other transition states. This raises the possibility of artifacts in those reconstructions derived from samples containing a mixture of conformations, if this heterogeneity is not taken account. In this work, we have addressed this issue by processing only homogenous subsets of particles exhaustively classified in 2D. This heterogeneity might also partly explain some of the difficulties in crystallizing the full-length complex (17).

We model the conformational changes in the DII domain accounting for these transitions (Figures 6 and 7). In the compact conformation, the external regions of the DII domains are intimately inter-connected at the centre of the molecule, which results in a significant shortening



**Figure 8.** Comparison between the compact and stretched conformations of the human and yeast RuvBL1-RuvBL2 complexes solved by EM. Scale bar, 2.5 nm.

of the length of the complex. Meanwhile, the internal regions of DII are sufficiently close to account for the contacts described in the structure of the truncated RuvBL1-RuvBL2 dodecamer (17). In the stretched conformation, DII domains are tilted upwards and rotate slightly, moving the AAA+ rings apart. Concurrently, the internal regions of the DII domains are displaced, making the contact between these regions from opposite rings unlikely. We find that most of the RuvBL1-RuvBL2 images in our data set accommodate these two structures, and we do not detect intermediate conformations. This suggests that these conformations are stabilized by a certain arrangement of the DII domains, and intermediates between these extremes are less abundant. Nonetheless, we cannot discard that a wider range of conformations might be potentially possible. In fact, the compact conformation of the yeast complex described by Torreira *et al.* (24) shows a wider central opening of the AAA+ ring (Figure 6), suggesting other conformations are also plausible.

What is the functional significance of these conformational transitions? The DII domain is structurally similar to the ssDNA-binding domain in RPA. In addition, the isolated DII domain from RuvBL1 has been shown to bind ssDNA, dsDNA and ssRNA *in vitro* (16). We find that the putative regions involved in nucleic acid binding seem more exposed in the stretched conformation compared with the compact conformation. Hence, we propose that these conformational changes might regulate the interaction with nucleic acids. Alternatively, the interaction between DII domains and DNA or RNA might shift the equilibrium of the conformations to favour one state, regulating the functions of the complex. In addition, DII domains are implicated in protein-protein interactions between the two rings; thus, a more general role of these domains as

protein-binding modules within larger macromolecular complexes could be possible. Each DII domain is directly connected to the ATPase core of each monomer, and it is reasonable to hypothesize that there is a link between the conformation of the AAA+ core and the DII domains. Conformational changes in DII domains could regulate the ATPase activity and/or *vice versa*. Some evidence suggests that DII domains modulate the ATPase and helicase activity of the RuvBL1-RuvBL2 complex (16,17), and this could indicate that large conformational changes within the dodecamer could have a wider impact on the functionality of the RuvBL1-RuvBL2 complex.

In this work, we reveal the structure of the full-length human RuvBL1-RuvBL2 double-ring complex, and we resolve the discrepancy for the different structures described. We show that RuvBL1-RuvBL2 displays two distinct conformations and propose that these conformational changes can have a functional impact in the context of the large complexes containing RuvBL1-RuvBL2. These conformational transitions could be part of the mechanism of 'remodelling' by converting the complex from one state to another, and all these changes could be somehow interconnected with a modulation of the ATPase activity, thanks to the connection between the DII domains and the AAA+ core.

#### ACCESSION NUMBERS

The cryo-EM structures of the compact and stretched conformations of the RuvBL1-RuvBL2 complex have been deposited in the Electron Microscopy Data Bank (EMDB) (<http://www.emdatabank.org>) with accession codes EMD-2163 and EMD-2164, respectively.

**SUPPLEMENTARY DATA**

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Figure 1 and Supplementary Movie 1.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Jasminka Boskovic at the Spanish National Cancer Institute (CNIO, Madrid, Spain) for critical reading of the manuscript and suggestions. They are particularly thankful to Doryen Bubeck (Imperial College, London, UK) for editing the final version of the manuscript. They thank Eva Torreira (CIB, Madrid, Spain) for her contributions in the early stages of this project.

**FUNDING**

Spanish Government [SAF2008-00451 to O.L., SAF2011-22988 to O.L.]; [BES-2009-014133 to A.L.-P.]; 'Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC)' [RD06/0020/1001]; Human Frontiers Science Program [RGP39/2008]; 'Ramón Arcecs' Foundation. Funding for open access charge: Spanish Government [SAF2011-22988 to O.L.].

*Conflict of interest statement.* None declared.

**REFERENCES**

- Jha,S. and Dutta,A. (2009) RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Mol. Cell*, **34**, 521–533.
- Yamada,K., Miyata,T., Tsuchiya,D., Oyama,T., Fujiwara,Y., Ohnishi,T., Iwasaki,H., Shinagawa,H., Ariyoshi,M., Mayanagi,K. et al. (2002) Crystal structure of the RuvA-RuvB complex: a structural basis for the Holliday junction migrating motor machinery. *Mol. Cell*, **10**, 671–681.
- Huen,J., Kakiyama,Y., Ugwu,F., Cheung,K.L., Ortega,J. and Houry,W.A. (2010) Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem. Cell Biol.*, **88**, 29–40.
- Bao,Y. and Shen,X. (2011) SnapShot: chromatin remodeling: INO80 and SWR1. *Cell*, **144**, 158–158, e152.
- Jha,S., Shibata,E. and Dutta,A. (2008) Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2690–2700.
- Kakiyama,Y. and Houry,W.A. (2012) The R2TP complex: discovery and functions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 101–107.
- McKeegan,K.S., Debieux,C.M. and Watkins,N.J. (2009) Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **29**, 4971–4981.
- Izumi,N., Yamashita,A., Iwamatsu,A., Kurata,R., Nakamura,H., Saari,B., Hirano,H., Anderson,P. and Ohno,S. (2010) AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci. Signal.*, **3**, ra27.
- Gallant,P. (2007) Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol.*, **17**, 187–192.
- Venteicher,A.S., Meng,Z., Mason,P.J., Voenstra,T.D. and Artandi,S.E. (2008) Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*, **132**, 945–957.
- Grigoletto,A., Lestienne,P. and Rosenbaum,J. (2011) The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1815**, 147–157.
- Huber,O., Menard,L., Haurie,V., Nicou,A., Taras,D. and Rosenbaum,J. (2008) Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res.*, **68**, 6873–6876.
- Menard,L., Taras,D., Grigoletto,A., Haurie,V., Nicou,A., Dugot-Senart,N., Costet,P., Rousseau,B. and Rosenbaum,J. (2010) In vivo silencing of Reptin blocks the progression of human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence. *J. Hepatol.*, **52**, 681–689.
- Jonsson,Z.O., Jha,S., Wohlschlegel,J.A. and Dutta,A. (2004) Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell*, **16**, 465–477.
- Izumi,N., Yamashita,A. and Ohno,S. (2012) Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. *Nucleus*, **3**, 29–43.
- Matias,P.M., Gorynia,S., Donner,P. and Carrondo,M.A. (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.*, **281**, 38918–38929.
- Gorynia,S., Bandejas,T.M., Pinho,F.G., McVey,C.E., Vonrhein,C., Round,A., Svergun,D.I., Donner,P., Matias,P.M. and Carrondo,M.A. (2011) Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine—the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J. Struct. Biol.*, **176**, 279–291.
- Wood,M.A., McMahon,S.B. and Cole,M.D. (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell*, **5**, 321–330.
- Puri,T., Wendler,P., Sigala,B., Saibil,H. and Tsaneva,I.R. (2007) Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J. Mol. Biol.*, **366**, 179–192.
- Cheung,K.L., Huen,J., Houry,W.A. and Ortega,J. (2010) Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. *Biochem. Cell Biol.*, **88**, 77–88.
- Niewiarowski,A., Bradley,A.S., Gor,J., McKay,A.R., Perkins,S.J. and Tsaneva,I.R. (2010) Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *Biochem. J.*, **429**, 113–125.
- Gribun,A., Cheung,K.L., Huen,J., Ortega,J. and Houry,W.A. (2008) Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J. Mol. Biol.*, **376**, 1320–1333.
- Cheung,K.L., Huen,J., Kakiyama,Y., Houry,W.A. and Ortega,J. (2010) Alternative oligomeric states of the yeast Rvb1/Rvb2 complex induced by histidine tags. *J. Mol. Biol.*, **404**, 478–492.
- Torreira,E., Jha,S., Lopez-Blanco,J.R., Arias-Palomo,E., Chacon,P., Canas,C., Ayora,S., Dutta,A. and Llorca,O. (2008) Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. *Structure*, **16**, 1511–1520.
- Mindell,J.A. and Grigorieff,N. (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **142**, 334–347.
- Heymann,J.B. and Belpaep,D.M. (2007) Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **157**, 3–18.
- Tang,G., Peng,L., Baldwin,P.R., Mann,D.S., Jiang,W., Rees,I. and Ludtke,S.J. (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **157**, 38–46.
- Ludtke,S.J., Baldwin,P.R. and Chiu,W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.*, **128**, 82–97.
- Radermacher,M., Wagenknecht,T., Verschoor,A. and Frank,J. (1987) Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *J. Microsc.*, **146**, 113–136.
- Petersen,E.F., Goddard,T.D., Huang,C.C., Couch,G.S., Greenblatt,D.M., Meng,E.C. and Ferrin,T.E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605–1612.
- Scheres,S.H., Nunez-Ramirez,R., Sorzano,C.O., Carazo,J.M. and Marabini,R. (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat. Protoc.*, **3**, 977–990.
- Sorzano,C.O., Bilbao-Castro,J.R., Shkolnisky,Y., Alcorlo,M., Melero,R., Caffarena-Fernandez,G., Li,M., Xu,G., Marabini,R. and Carazo,J.M. (2010) A clustering approach to multireference

- alignment of single-particle projections in electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **171**, 197–206.
33. Scheres, S.H., Gao, H., Valle, M., Herman, G.T., Eggermont, P.P., Frank, J. and Carazo, J.M. (2007) Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat. Methods*, **4**, 27–29.
34. Bochkarev, A., Pfuetzner, R.A., Edwards, A.M. and Frappier, L. (1997) Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature*, **385**, 176–181.
35. Petukhov, M., Dagkessamanskaja, A., Bommer, M., Barrett, T., Tsaneva, I., Yakimov, A., Queval, R., Shvetsov, A., Khodorkovskiy, M., Kas, E. *et al.* (2012) Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases. *Structure*, **20**, 1321–1331.

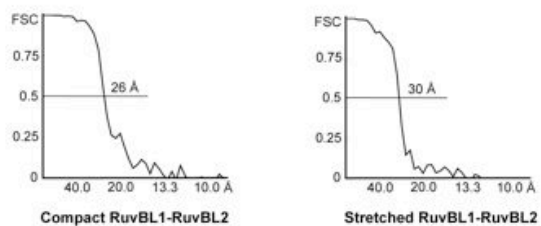
## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Conformational transitions regulate the exposure of a DNA binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex

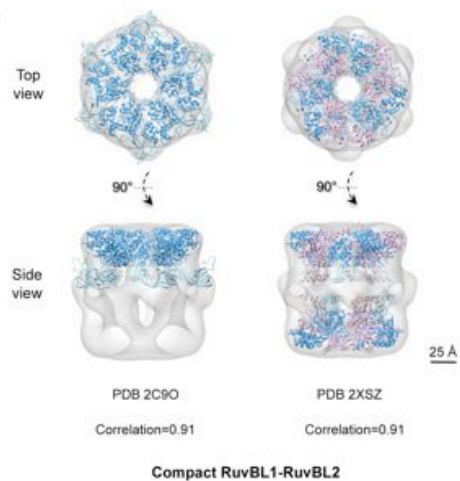
Andrés López-Perrote, Hugo Muñoz-Hernández, David Gil and Oscar Llorca

**Supplementary Figure 1.** Electron microscopy of two conformations of the human RuvBL1-RuvBL2 complex. **(A)** The resolution of the 3D reconstructions for the compact and stretched conformations obtained after negative stain was evaluated using the Fourier Shell Correlation (FSC) method, and estimated using a 0.5 FSC cutoff as 26 Å and 30 Å respectively. **(B)** Fitting of the atomic structure of RuvBL1 (PDB 2C9O) and the truncated RuvBL1-RuvBL2 dodecamer (PDB 2XSZ) into the EM map of the compact conformation. Correlation values between the EM reconstruction and the crystal structures are indicated. Scale bar represents 2.5 nm. **(C)** Fitting of the atomic structure of the truncated RuvBL1-RuvBL2 dodecamer (PDB 2XSZ) into the EM map of the stretched conformation. The correlation value between the EM reconstruction and the crystal structure is indicated. Scale bar, 2.5 nm.

A



B



C

