



Ingeniería celular para implementar la biología estructural en células vivas

Oriol Gallego

Premio Joven Investigador SEBBM Biotoools

Determinar cómo se organizan las macromoléculas para ejecutar funciones celulares es imprescindible para entender su mecanismo de acción. La caracterización cuantitativa y a escala atómica de grandes complejos proteicos purificados es fundamental, pero en la célula los complejos proteicos no actúan de forma aislada. Para entender su mecanismo de acción de forma íntegra, debemos incorporar estudios de biología estructural en células vivas.

En exocitosis, distintos complejos proteicos y membranas biológicas interactúan para fusionar la vesícula de secreción con la membrana plasmática. A pesar de su importancia, el mecanismo molecular que ejecuta la exocitosis sigue siendo desconocido. El complejo encargado de fijar las vesículas a la membrana plasmática se denomina exocisto y está compuesto de ocho subunidades. Hemos usado el sistema de heterodimerización inducida por rapamicina para diseñar células de levadura portadoras de plataformas de anclaje a las que podemos reclutar el exocisto. Inducir el reclutamiento del exocisto a estas plataformas de anclaje nos permite controlar su orientación en el plano ecuatorial de la célula. Mediante nanoscopia en células vivas, hemos medido la distancia entre cada una de las subunidades y la plataforma de anclaje, de forma que esta actúa como marco de referencia espacial. En colaboración con los grupos del Dr. Marko Kaksonen (Universidad de Ginebra) y el Dr. Damien Devos (CABD, Sevilla), hemos reconstruido la arquitectura 3D del exocisto unido a la vesícula. Las subunidades del exocisto presentan una conformación alargada que les permite entrelazarse mediante numerosas interacciones por uno de sus extremos. Las subunidades Sec10 y Sec15 unen la vesícula mediante su otro extremo libre que sobresale del complejo. Nuestras medidas sugieren que unas 15 copias del exocisto se organizan para formar una estructura mayor en forma de anillo de 100 nm de diámetro. Así, la vesícula y la membrana plasmática esta-

blecen contacto a través del agujero central del anillo que las mantiene unidas.

También hemos diseñado células donde cuantificar las dinámicas de ensamblaje de complejos macromoleculares transitorios por microscopía de fluorescencia. Por ejemplo, en colaboración con los grupos del Dr. Carlos Fernández-Tornero (CIB-CSIC, Madrid) y la Dra. Olga Calvo (IBFG-CSIC, Salamanca), hemos descubierto un nuevo mecanismo de inactivación de la ARN Polimerasa I por dimerización. Siguiendo los cambios en los niveles de las formas activa e inactiva de la ARN Polimerasa I en respuesta a la falta de nutrientes, hemos observado que mientras los niveles del complejo activo bajan rápidamente y de forma exponencial, los niveles de dímero inactivo se incrementan más lentamente y siguiendo un comportamiento sigmoideo. Este es un nuevo mecanismo para inhibir la síntesis de ribosomas cuando la célula no dispone de nutrientes para crecer.

REFERENCIAS

Picco A, Irastorza-Azcarate I, Specht T, Böke D, Pazos I, Rivier-Cordey A-S, Devos DP, Kaksonen M and Gallego O. (2017). The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis. *Cell* 168, 400–412.e418.

Torreira E, Louro JA, Pazos I, González-Polo N, Gil-Carton D, Durán AG, Tosi S, Gallego O, Calvo O and Fernández-Tornero C. (2017). The dynamic assembly of distinct RNA polymerase I complexes modulates rDNA transcription. *Elife* 6.

AFILIACION

Oriol Gallego

Cell Biology and Biophysics Unit, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Alemania.