

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "IZTACALA".

PURIFICACION Y CARACTERIZACION QUIMICA DE LA FOSFOPROTEINA RIBOSOMAL
P1 DE Saccharomyces cerevisiae.

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO PRESENTA

FRANCISCO CAMPOS ALVAREZ

Los Reyes, Iztacala, 1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL BAJO LA DIRECCION
DEL DOCTOR SAMUEL ZINKER RUZAL AL CUAL AGRADEZCO SUS ENSEÑANZAS,
AMISTAD Y CONFIANZA.

DURANTE PARTE DE ESTE TRABAJO FUI BECARIO DE LA COMPAÑIA
AVON COSMETICS Co., A LA CUAL HAGO PATENTE MI AGRADECIMIENTO.

AGRADECIMENTOS.

Agradezco a mis Profesores por sus Enseñanzas y Amistad.

Agradezco a mis compañeros de Laboratorio por su colaboración y amistad en especial a la O.F.B. Matilde Corona por su gran ayuda al comienzo de este proyecto, a Francisco, a Silvia, a Sigifredo, a Camilo, y a todas las demás personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo y a mi formación, a todos ellos: GRACIAS.

Agradezco al Profesor Ross Nazar por las muestras de YL3 que amablemente me obsequio, también al Dr. Samuel Zinker por su amabilidad de permitirme usar parte de su trabajo (Fig. 3) para ilustrar esta tesis.

Por último, deseo agradecer a la Srita. Dolores Cuellar por su eficiente trabajo mecanografico.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION QUIMICA DE LA FOSFOPROTEINA
RIBOSOMAL P1 DE Saccharomyces cerevisiae.

CONTENIDO.

Lista de AbreviaturasII
Lista de FigurasIII
Lista de TablasIV
Resumen1
Introducción2
Material y Métodos13
Resultados32
Discusión43
Conclusiones49
Bibliografía64

ABREVIACIONES

AMP	- Ribonucleosido 5-fosfato de Adenina
ARNm	- Acido Ribonucleico mensajero
ARNr	- Acido Ribonucleico ribosomal
ARNm	- Acido Ribonucleico de transferencia.
Brij58	- Polioxietilen (20) cetil eter
D.O.	- Densidad Optica
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- Acido etilendiaminetetraacetido
EF	- Factor de elongación
GTP	- Guanosin 5-trifosfato
HEPES	- Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfonico
IF	- Factor de iniciación
nm	- nanómetros
PAGE	- Electroforesis en geles de poliacrilamida
RNasas	- Ribonucleasas
rpm	- Revoluciones por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sodio
TEMED	- N, N, N', N'-tetrametiletilediamina.

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Separación de las subunidades ribosomales de la levadura Saccharomyces cerevisiae50

Fig. 2. Patrón electroforetico de la proteína ribosomal de la levadura Saccharomyces cerevisiae en geles bidimensionales de poli-acrilamida de pH 3.2xSDS51

Fig. 3. Comparación de las proteínas ribosomales de recambio de levadura con las fosfoproteínas ribosomales en geles pH3.2xSDS..52

Fig 4. Patrón electroforetico de la proteína ribosomal de S. cerevisiae en geles pH 5.0xSDS53

Fig. 5. Análisis de las proteínas ribosomales fosforiladas de levadura en geles pH 5.0xSDS54

Fig. 6. Análisis densitometrico de la proteína ribosomal en un gel de poliacrilamida-SDS55

Fig. 7. Electroforetograma "Tridimensional" de P1/P1*, L1 y L2..56

Fig. 8. Separación de 10 mg de proteína ribosomal en un gel preparativo de urea a pH 3.257

Fig. 9. Segunda dimensión del gel preparativo de urea pH 3.2 ..57

Fig.10. Segunda dimensión del gel preparativo urea a pH 3.2xSDS de proteína ribosomal marcada con ³²P58

Fig.11. Aislamiento de P159

Fig.12. Análisis en gel de poliacrilamida del ARN atrapado en el borde superior de un gel de pH 3.260

Fig.13. Comparación entre la fosfoproteína ribosomal P1 y la proteína ribosomal YL361

Fig.14. Análisis de la proteína YL3 en un sistema bidimensional pH 3.2xSDS62

Fig.15. Análisis de las proteína liberadas al tratar el ribosoma (80s) con 25 mM de EDTA63

LISTA DE TABLAS.

TABLA I.

Composición Química y Coeficiente de Sedimentación de Ribosomas y ARN Ribosomales de Procariontes, células eucariontes y de organismos celulares 5

TABLA II.

Comparación de la composición de aminoácidos entre ribosomas de levadura, hígado de rata y la bacteria Escherichia coli..... 7

TABLA III

Número de proteínas ribosomales en S. cerevisiae 9

TABLA IV.

Recuperación de (¹⁴C)-adenina en los diversos pasos de la extracción de la proteína ribosomal 39

TABLA V.

Radioactividad presente en diversas regiones de un gel de pH 3.2, después de la electroforesis de la proteína ribosomal..... 40

TABLA VI.

Comparación de las características Químicas de la proteína ribosomal YL3 con la Fosfoproteína Ribosomal P1/P1* 47

RESUMEN.

En el ribosoma de la levadura Saccharomyces cerevisiae se han encontrado 5 proteínas fosforiladas in vivo. En el presente trabajo se caracterizó una de ellas: P1, fosfoproteína de recambio del ribosoma, localizada en la subunidad 60s, la tercera de mayor peso molecular del ribosoma con un peso de 40 kd, con un probable carácter ácido (Zinker y Warner, 1976).

En este trabajo se encontró que P1 sólo puede ser visualizada en un sistema de geles bidimensionales, de urea a pH 3.2 en la primera dimensión contra SDS en la segunda, resolviéndose como dos proteínas a las que designamos como P1/P1^{*}. Al tratar de determinar su localización en geles bidimensionales ya reportados para proteínas ribosomales (pH 5.0xSDS) se encontró que P1 se queda en el origen de la primera dimensión debido a lo cual probablemente esta proteína no haya sido descrita por otros autores o haya sido considerada una proteína no ribosomal y por lo tanto no se haya encontrado su equivalente en otros sistemas biológicos.

Otro hallazgo sorprendente fue que la proteína P1 tiene algunas características comunes con la proteína YL3 de S. cerevisiae. La proteína YL3 es una proteína que es liberada del ribosoma con EDTA junto con el ARN 5s formando un complejo ribonucleoprotéico de 7s (Nazar y cols., 1979). Al comparar el comportamiento electroforético entre muestras puras de P1 y YL3 se encontró que poseen un peso molecular semejante y un comportamiento homólogo en geles bidimensionales urea a pH 3.2xSDS. Al tratar al ribosoma con una solución de EDTA 25mM se obtuvieron fracciones muy enriquecidas para P1, lo cual se puede aprovechar como un método atractivo para su purificación a gran escala.

La proteína ribosomal P1 exhibe características que la hacen un modelo muy atractivo para estudiar el papel de la fosforilación en la modulación de algunas actividades ribosomales, en este caso la unión al ARN 5s, e indirectamente la unión de los ARNs de transferencia, por ejemplo, que afectarían la función del ribosoma.

INTRODUCCION.

El ribosoma es un organelo cuya función celular puede dividirse en dos etapas: la primera se caracteriza por la unión a un ARN mensajero, cuya secuencia de bases en grupos de tres en tres (codones), lleva la información para ordenar los aminoácidos en la secuencia correcta. La segunda es una tarea esencialmente catalizadora: une covalentemente a los aminoácidos en una cadena para formar una proteína (Lake, 1981). También el ribosoma puede ser visto como una enzima que cataliza la formación de uniones peptídicas. En contraste a muchas enzimas conocidas el ribosoma sería un tipo de enzima "programada por el ARN mensajero (Gassen, 1982).

I.A. FUNCION

La biosíntesis de polipéptidos (proceso de traducción) puede ser subdividida en: iniciación, elongación y terminación. Cada una de estas reacciones es específica con respecto a los compuestos participantes.

I.A.1. Iniciación.

La iniciación de la síntesis de proteínas en eucariontes se define como la secuencia de eventos que llevan a la formación de un complejo 80s-ARNt met-ARNm. Varias proteínas no ribosomales se requieren para la formación de este complejo; estas proteínas son denominadas factores eucarióticos de iniciación (eIF). Las proteínas eIF estimulan alguna de las reacciones que llevan a la formación del complejo de iniciación y son liberadas al terminar esta etapa, en contraste con las proteínas del ribosoma las cuales forman parte integral del ribosoma durante todos los estadios de síntesis de proteínas (Kozak, 1983; Thomas y cols., 1981). Desde este punto de vista las proteínas ribosomales son parte integral de esta "enzima programada", en tanto que los factores eucarióticos de iniciación

se le unen de manera catalítica y transitoria.

I.A.2. Elongación.

La elongación se define como la adición de aminoácidos a una cadena polipeptídica naciente en una secuencia dirigida por el ARN mensajero. Este proceso puede ser dividido para su estudio en tres pasos que involucran dos sitios ribosomales. El paso I ocurre después de que se ha formado el complejo de iniciación 80s, o durante el crecimiento de la cadena polipeptídica e involucra la unión, - codón dirigida, del aminoacil-ARNt a un sitio ribosomal vacante denominado sitio A (aminoacil), adyacente a un sitio ribosomal ocupado, el sitio P (peptidil). El paso II comprende la formación de la unión peptídica, concomitantemente a la expulsión del ARNt deaminado del sitio peptidil. El paso III se refiere a la transposición del peptidil ARNt hacia el sitio P, lo cual permite que otro aminoacil ARNt entre al sitio A. Esta transposición involucra el movimiento relativo del ribosoma con respecto al ARN mensajero y a los factores de elongación (EF) y GTP (Clarck, 1980).

I.A.3. Terminación.

La terminación de la traducción puede ser dirigida por alguno de los tres codones específicos UAA, UAG y UGA y da como resultado la liberación de un péptido completo del ribosoma. Un sólo factor protéico aislado de reticulocitos, (RF), funciona con cualquiera de los tres codones de terminación y requiere de GTP. Además del factor de terminación RF, interviene la enzima peptidil transferasa ribosomal para la hidrólisis del peptidil-ARNt, una vez terminada la síntesis de la cadena polipeptídica; el proceso de terminación difiere marcadamente de los procesos de iniciación y elongación en que las moléculas que reconocen los codones son proteínas y no ARNt (Caskey, 1980).

I.B. ESTRUCTURA DEL RIBOSOMA

El ribosoma eucariótico posee un coeficiente de sedimentación - de 80s en comparación con los de procariontes y ribosomas de organe los (cloroplasto y mitocondria) los cuales caen en la categoría de 70s (Tabla I). El monómero 80s puede ser disociado con bajas con-- centraciones de Mg⁺⁺ (10⁻⁵M en el caso de levadura; Russell y - - Wilkerson, 1980) en dos subunidades, una grande con un coeficiente de sedimentación de 60s y otra pequeña de 40s (Fig. 1), mientras la 70s puede disociarse en las subunidades ribosomales 50s y 30s.

Los ribosomas contienen de 70 a 80 proteínas y moléculas de - - polirribonucleótidos, las cuales son designadas de acuerdo a su coe-- ficiente de sedimentación; en eucariontes se han encontrado cuatro especies de ARN en el ribosoma; en el caso de la levadura - - Saccharomyces: 25s, 5.8s en la subunidad 60s, y 18s en la subunidad 40s. En los ribosomas de mamífero el ARNr de alto peso molecular, - 25s de levadura, posee un valor de sedimentación de 28s (Warner, -- 1982; Russell y Wilkerson, 1980; Wool, 1979).

En contraste los ribosomas procarióticos sólo contienen tres ti-- pos de ARN ribosomal designados en función de su coeficiente de se-- dimentación como 23s, 16s y 5s. La molécula 16s se encuentra en la subunidad pequeña, mientras los otros dos ARNr se encuentran conte-- nidos en la subunidad grande (Liljas, 1982). Algunas de las propie-- dades del ribosoma se resumen en la Tabla I.

I.B.1. Proteínas Ribosomales.

El ribosoma de la bacteria Escherichia coli posee alrededor de 55 proteínas, mientras los ribosomas de células eucarióticas pueden contener de 70 a 80 proteínas (Wittman, 1974; Sherton y Wool, 1974), aproximadamente la mitad de su masa total.

La mayoría de las proteínas ribosomales son de naturaleza básic-- a debido a la gran cantidad de residuos de lisina, histidina, argi-- ninina y una gran cantidad de residuos ácidos que se encuentran --

TABLA I.

Composición Química y Coeficiente de Sedimentación de Ribosomas y ARN Ribosomales de Procariontes, células eucariotas y de Organismos Celulares.

ORGANISMO	MONOMERO	SUBUNIDAD	ARNrs	PROTEINAS	PORCENTAJE		REFERENCIA
					PROTEINA	ARN	
<u>Escherichia coli</u>	70s	50s	23s, 5s	34	35%	65	a, b
		30s	16s	21	35%	65	
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	80s	60s	5s, 25s, 5.8s	40	50%	50%	c, f
		40s	18s	30	43%	57%	
Vegetales Superiores	80s	60s	5s, 28s, 5.8s				
		40s	18s				
Hígado de Rata	80s	60s	5s, 28s, 5.8s	45	41%	59%	d
		40s	18s	30	55.7%	44.3%	
Ribosomas de Cloroplasto	70s	46s	5s, 23s, 4.5s ¹	34			e
		30s	16s	24			
Mitorribosomas Vegetales	77s	60s	5s, 23s	70 ²			e
		40s	16s				
Mitorribosomas Animales	80s	45s	23s	100 ³			e, g
		35s	16s				

a. Van Holde y Hill, 1974.
 b. Nomura, 1969.
 c. Warner, 1982.
 d. Wool, 1979.
 e. Boynton y cols., 1978
 f. Bielka y Stahl, 1978.
 g. Vázquez, 1981.

1. En Chlamidomonas se ha reportado la existencia de RNAs ribosomales 7s, 5s y 3s.
 2. Determinado en levadura y Neurospora.
 3. Tal vez sea debido a proteínas adventicias no ribosomales.

amidados. Otra característica de las proteínas ribosomales es la baja cantidad de aminoácidos azufrados y triptofano (Tabla II). Es notable que la composición de aminoácidos en proteínas ribosomales en procariontes y eucariontes no es muy diferente (Tabla II) (Wool y Stoffler, 1974).

Mediante el análisis en geles bidimensionales, se ha determinado en las células de eucariontes la presencia de 40 proteínas en la subunidad 60s y cerca de 30 en la subunidad 40s (Woll, 1979) contra 34 proteínas en la subunidad 50s y 21 en la 30s en procariontes - - (Wittman, 1974). Cada proteína parece estar presente en una copia por ribosoma, con excepción de la proteína ácida L7/112 de E. coli y su equivalente estructural y funcional en eucariontes L44/145 - - (Zinker y Warner, 1976; Vidales, 1982).

Dos sistemas de geles bidimensionales se han usado principalmente para el análisis de las proteínas ribosomales: uno donde la primera dimensión consta de urea a pH básico, contra urea a pH ácido - en la segunda dimensión (Kaltschmidt y Wittman, 1970). y otro de - - urea a pH 5.0 en la primera dimensión contra SDS en la segunda - - (Mets y Bogorad, 1974). Una limitante de estos dos sistemas de geles bidimensionales es que algunas proteínas no pueden ser bien visualizadas dando la impresión de que no son proteínas ribosomales - como el caso de la proteína YL3 (kruiswijk y Planta, 1974; Nazar, - 1979) la cual es insoluble en urea 8M entre pH 9.0 a pH 5.0, pero - que sin embargo se encuentra unida al ARNr 5s en el ribosoma. La - fosfoproteína P1 de S. cerevisiae tampoco puede ser visualizada en ninguno de los dos sistemas descritos (Zinker y Warner, 1976).

Dependiendo del sistema de electroforesis bidimensional y de la técnica de extracción de la proteína ribosomal, en la levadura - - S. cerevisiae se han determinado de 31 a 47 proteínas en la subunidad 60s y de 21 a 37 en la 40s (Grant, 1976; Ishiguro, 1976; - - Grankowski y cols., 1976; Zinker y Warner, 1976; Faye y Sor, 1977; kruiswijk y cols., 1978a; Kruiswijk y cols., 1978b; Otaka y Osawa, - 1981; Bollen y cols., 1981; Warner, 1982; Michel y cols., 1983). Michel y cols. (1983) han determinado la existencia de proteínas ribosomales en un rango de peso molecular de 10,000 a 33,000 daltones

TABLA II.

Comparación de la composición de aminoácidos entre ribosomas de levadura, hígado de rata y la bacteria Escherichia coli.

Aminoácido ^a	<u>Escherichia coli</u> ^b			<u>S. cerevisiae</u> ^c		Hígado de Rata ^d	
	50s	30s	60	40s	60	80s	Monosoma 80s
Asp	8.4	9.4	7.56	7.99	7.56	7.99	8.06
Tre	5.0	6.1	5.58	5.09	5.58	5.09	5.06
Ser	4.1	5.2	6.12	5.56	6.12	5.56	4.86
Glu	9.7	10.7	9.66	10.26	9.66	10.26	8.87
Pro	3.2	3.3	4.50	4.78	4.50	4.78	4.93
Gli	8.8	8.3	7.8	6.97	7.8	6.97	7.72
Ala	12.1	12.5	11.0	8.54	11.0	8.54	8.58
Val	8.5	8.7	7.38	7.99	7.38	7.99	7.98
Met	2.1	1.7	0.81	0.81	0.81	0.81	2.14
Ile	4.7	4.8	4.5	4.78	4.5	4.78	4.92
Leu	7.8	8.0	7.75	7.83	7.75	7.83	8.78
Tir	1.7	1.9	3.21	2.58	3.21	2.58	2.93
Fe	3.1	2.9	3.54	3.21	3.54	3.21	3.86
Lis	11.2	7.2	10.69	10.81	10.69	10.81	9.63
His	2.0	2.1	2.30	3.29	2.30	3.29	2.38
Arg	7.5	6.5	8.17	9.40	8.17	9.40	7.53

a. Los valores son dados como por ciento relativo de moles.
 b. Matheson y cols., 1975.
 c. Faye y cols., 1979.
 d. Keller y cols., 1964.

en la subunidad 40s y de 10,000 a 51,500 en la subunidad 60s. Las variaciones en el número de proteínas en más notable para las proteínas ácidas (Tabla III).

Varios intentos para tener un sistema de nomenclatura estándar han sido realizados (Otaka y Osawa, 1981; Bollen y cols., 1981; -- Warner, 1982; Michel y cols., 1983), pero debido a los diferentes métodos de preparación de la proteína ribosomal y a modificaciones en los sistemas de electroforesis bidimensionales se ha dificultado esta tarea.

El análisis de las proteínas ribosomales por medio de electroforesis bidimensional opera bajo dos premisas. La primera es que cada mancha en el gel representa una sola proteína, suponiendo que es poco probable que dos proteínas diferentes tengan la misma movilidad electroforética. La segunda premisa es que la proteína analizada sea verdaderamente una proteína ribosomal.

Warner (1966) ha definido tres clases de proteínas ribosomales en eucariontes: (i) proteínas que son ensambladas con el ARNr, en el núcleo, (ii) proteínas bajo intercambio entre el ribosoma y la proteína soluble del citoplasma in vivo, designadas como proteínas de recambio, y (iii) proteínas que son extraídas del ribosoma por lavado riguroso con KCl. Sin embargo una definición más estricta de proteína ribosomal sería la de aquella proteína que es un componente ribosomal esencial. De acuerdo con este criterio, para determinar si una proteína es o no ribosomal se necesitaría de técnicas de reconstitución de ribosomas semejantes a las usadas en procariontes (Traub y Nomura, 1968) las cuales han fallado en el caso de eucariontes, probablemente debido a que el proceso de ensamble in vitro es iniciado sobre una gran molécula de ARNr precursor la cual posteriormente es procesada (Russell y Wilkerson, 1980).

TABLA III.
Número de Proteínas Ribosomales en S. cerevisiae.

	Proteínas de subunidad 60s		Proteínas de subunidad 40s		Ref.
	Básicas	Fosforiladas	Básicas	Fosforiladas	
37			25	6	a
33	4	2	24	6	b
40-41			28-30		c
44			32		d
39	3		28	6	e
45			28		f
37		1	24	5	g
39-41	1	4	24	6	h, i, 1
42	3	1	29	5	j
45	2		30	7	k
		11		9	l

a. Grant, 1976.
 b. Zinker y Warner, 1976.
 c. Ishiguro, 1976.
 d. Faye y Sor, 1977.
 e. Grankowski y cols., 1976.
 f. Otaka y Kobata, 1978.
 g. Hebert y cols., 1977.
 h. Kruiswijk y cols., 1978a.
 i. Kruiswijk y cols., 1978b.
 j. Warner, 1982.
 k. Michel y cols., 1983.
 l. Becker-Ursic y Davies, 1976.

1. En Saccharomyces carlsbergensis.

I.B.2. Fosfoproteínas Ribosomales.

Una característica de las células eucarióticas es la presencia in vivo de proteínas fosforiladas en el ribosoma (Krystosek y cols., 1974; Leader, 1980). En la mayoría de los eucariontes sólo 2 de las 70-90 proteínas ribosomales se encuentran fosforiladas (Leader, 1980). una de éstas es una pequeña proteína ácida de la subunidad 60s (Leader y Coia, 1977; Zinker y Warner, 1976) designada como L44/L45 en la levadura (Warner, 1982) y P1/P2 en el hígado de la rata; la otra es una proteína básica de la subunidad 40s denominada S6 (Gressner y Wool, 1974).

Se ha reportado la existencia de fosfoproteínas ribosomales en S. cerevisiae, aunque hay poca consistencia en el número e identidad pues se han descrito desde dos (Grankowski y cols., 1976) hasta 18 (Becker-Ursic y Davies, 1976), sugiriendo que el fenómeno de fosforilación en ribosomas no es altamente específico o que las muestras -- analizadas estaban contaminadas con proteínas no ribosomales (Tabla III).

Zinker y Warner (1976) han descrito 5 fosfoproteínas en la levadura Saccharomyces cerevisiae designándolas originalmente como P1, P2, P3, P4 y P5 (ver Fig. 11). P2 y P3 se localizan en la subunidad 40s, P4 sólo en polisomas y P1 y P5 en la subunidad 60s. En la nomenclatura propuesta por Kruiswijk y Planta (1974) P2 corresponde a la proteína S10 y parece ser análoga a la fosfoproteína ribosomal de mamífero S6 (Gressner y Wool, 1974); Warner, 1982), P3 corresponde a la proteína s2 y P5 a la proteína ácida L44/L45. A la fosfoproteína P1 no se le ha encontrado correspondencia en ningún sistema de nomenclatura propuesto. L44/L45 y P1 son proteínas de recambio, es decir se encuentran bajo intercambio entre el ribosoma y la proteína soluble del citoplasma in vivo, como se demostró por su aparición en -- los ribosomas cuando se inhibió la síntesis de éstos en cepas mutantes de la levadura termosensibles (Warner, 1966; Zinker y Warner, -- 1976).

Todos los intentos para discernir la función de las fosfoproteínas ribosomales, en especial S6, han sido infructuosos y contradictorios. Por ejemplo S6 ha sido encontrada fosforilada en respuesta a agentes que estimulan o que inhiben la síntesis de proteínas. También ha sido reportado que AMP cíclico puede estimular o no afectar la síntesis proteica, otras posibles funciones de la fosforilación de S6 han sido propuestas pero tienen poco apoyo experimental. Una de estas ideas -- es que la fosforilación de S6 debe ser un factor importante para el -- ensamblaje nuclear y el transporte extranuclear de los ribosomas, o -- que la fosforilación de S6 protege al ribosoma de la degradación -- (Leader, 1980).

La fosfoproteína L44/L45 parece ser equivalente estructural y funcionalmente a la proteína ribosomal L7/L12 de la bacteria E. coli. La extracción de L44/45 causa en el ribosoma la pérdida de la actividad de GTPasa EF2-dependiente (Sánchez-Madrid, 1979). Posiblemente -- la fosforilación de esta proteína no afecte la estructura ni la función del ribosoma, sino que el proceso de fosforilación module su función en eucariontes (Vidales, 1982).

Varios sistemas de regulación pro fosforilación reversible son -- bien conocidos: por ejemplo, el control del metabolismo de glucógeno en el músculo esquelético en mamíferos, y recientemente la fosforilación de la histona H1 como una señal para la mitosis y la activación de la ARN polimerasa I (Cohen, 1982). Como se mencionó en párrafos -- anteriores, la fosforilación de las proteínas ribosomales es una característica de los ribosomas eucarióticos. La significancia fisiológica de esta modificación postraducciona no es conocida, aunque parece probable que esté involucrada a algunos aspectos de la función del ribosoma, quizá la regulación de la síntesis de proteína o modulando otra actividad del ribosoma que aún no conocemos.

I.C. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DEL PRESENTE TRABAJO.

Los objetivos del presente trabajo son:

(i) Obtener un método de purificación de la fosfoproteína ribosomal P1 de Saccharomyces cerevisiae.

(ii) Determinar su identidad en los sistemas de geles bidimensionales y nomenclaturas ya existentes.

(iii) El estudio de posibles modificaciones químicas, diferentes a la fosforilación que sufra P1.

Estos estudios son la base para estudios posteriores orientados hacia la función de la fosfoproteína P1 en el ribosoma y el efecto de la fosforilación y la defosforilación sobre dicha función.

II.1. MATERIALES.

1. Organismos Empleados.

1.1 Cepa A364A.

En el presente estudio se trabajó con células de la levadura Saccharomyces cerevisiae. Para la obtención de proteína ribosomal total, subunidades ribosomales y ARN ribosomal, se utilizó la cepa haploide A364A (ATCC22244) aislada originalmente por Hartwell (1967) la cual tiene las características genotípicas: a, gal₁, -ade_{1,2}, ura₁, lis₂, tir₁, his₇. Las abreviaciones para los marcadores genéticos indican: tipo de apareamiento (a; Gooday, 1974), incapacidad para fermentar galactosa y de sintetizar adenina, uracilo, lisina, tirosina e histidina.

1.2. Cepa ts368.

Para la obtención de muestras marcadas de proteínas ribosomales de recambio (Warner, 1966) se usó la cepa termosensible ts368, derivada de la cepa A364A, por mutagénesis con nitrosoguanidina - (Hartwell, 1967; Hartwell y cols., 1970); en esta cepa no hay síntesis de ribosomas a temperaturas mayores de 33°C (Warner y Udem, 1972). Característica genotípica: rna2⁻, más las de la cepa parental.

2. Medios de Cultivo.

2.1. Medio Sintético Completo (SC).

(Hutchinson y Hartwell, 1967; Warner, 1971; Sripati y Warner, 1978).

	g/lit
Acido succínico	10.0
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	6.7
Glucosa	20.0
Hidróxido de sodio	6.0

	g/lit
Adenina	0.02
Lisina	0.05
Tirosina	0.05
Uracilo	0.02

2.2. Medio YM-1.
(Hartwell, 1967).

Acido succínico	10.0
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	6.7
Bactopeptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	10.0
Hidróxido de sodio	6.0

2.3 Medio libre de fosfatos inorgánicos.
(Rubin, 1973).

Bactopeptona	20.0
Extracto de levadura	10.0
Glucosa	20.0
NH ₄ OH (concentrado)	10 ml
MgSO ₄ (1 M)	10 ml

El medio se deja reposar por lo menos 30 minutos, se filtra a través de papel Whatman 3 MM y se ajusta a pH 5.8 con HCl.

Los medios de cultivo se esterilizaron dentro de un autoclave a 120°C, 20 libras por 20 minutos.

3. Soluciones.

3.1. Amortiguador LHB.

NaCl	0.1 M
MgCl ₂	0.03M
Tris-HCl	0.01M de pH 7.4

3.2. Amortiguador 10⁻⁵.

NaCl	0.1 M
MgCl ₂	0.01mM
HEPES	0.01 M

3.3. Amortiguador LETS.

EDTA	0.01 M
LiCl	0.1 M
SDS	0.2 %
Tris-HCl	0.01 de pH 7.4

3.4. Soluciones para electroforesis de proteínas en geles de poli-acrilamida.

Solución A.

Acrilamida	60.0 %
Bis-acrilamida	0.4 %

Esta solución es estable si se guarda en un frasco de vidrio ambar a 4°C.

Solución B.

Acido acético	0.72 M
TEMED	4.0 % (P/V)

Solución C.

Urea	10.0 M
Persulfato de amonio	0.2 %

Esta solución es inestable. Se debe usar recién preparada.

Solución D.

Urea	6.0 M
Acido acético	0.5 M
Sacarosa	20.0 %
2-Mercaptoetanol	1.0 %
Rojo de pironina	0.1 %

Solución E.	
Acrilamida	4.0 %
Bis-acrilamida	0.1 %
Bis-tris	0.057M
Urea	8.0 M
Solución F.	
Bis-tris	10.0 mM
pH 5.0 con ácido acético.	
Solución G.	
Acetato de potasio	0.179M
pH 5.0 con ácido acético.	
Solución H.	
Urea 10M	8.0 ml
2-mercaptoetanol	1.0 ml
Glicerol	1.0 ml
Fuchsin básica (0.1 mg/ml en acético glacial)	0.1 ml
Solución I.	
Acrilamida	30.0 %
Bis-acrilamida	0.8 %
Solución J.	
Tris-HCl	0.5 M de pH6.8
SDS	1.0 %
Solución K.	
Tris-HCl	1.0 M de pH8.8
Solución L.	
Tris-HCl	0.5 M de pH6.8
Solución M.	
SDS	10.0 %

Solución N.	
Glicina	0.2 M
Tris	0.02 M
SDS	0.1 %
Solución O.	
Solución L	1.0 ml
Solución M	1.0 ml
2-mercaptoetanol	0.1 ml
Glicerol	1.0 ml
H ₂ O	6.8 ml
Rojo de fenol (1%)	0.1 ml
3.5. Soluciones para electroforesis de ARN en geles de poliacrilamida.	
Amortiguador P (20xPD)	
Acido bórico	0.89 M
Na ₂ EDTA	0.024M
Tris-HCl	0.89 de pH 8.3
Amortiguador Q.	
Amortiguador P diluido	1/20
Sacarosa	5.0 %
SDS	0.1 %
Azul de bromofenol	0.005%
Amortiguador R.	
Solución N	75.0 ml
SDS	0.1 %

Aforar hasta 1 lt con agua bidestilada.

3.6. Soluciones de tinción.

3.6.1. Azul de Coomasie G.

Azul de Coomasie G al 0.25% disuelto en metanol al 50% y ácido acético al 7%.

3.6.2. Azul de Coomasie R-250.

Azul de Coomasie R-250 al 0.1% disuelto en metanol al 50%, ácido acético 7%.

Después de disuelto el colorante es aconsejable filtrarlo a través de papel Whattman 3 MM.

Amortiguador S.

DTT	5.0 mM
EDTA	0.1 mM
NaCl	0.175M
SDS	0.1 %
Tris-HCl	0.05 M de pH7.9

3.7. Líquido de centelleo.

Solución T.

Omnifluor	4.0 g
Tolueno	1.0 lt

Solución U.

Omnifluor	4.0 g
Tolueno	700.0 ml
Triton x-100	300.0 ml

4. Isótopos Radioactivos.

Acido Ortofosfórico (^{32}P)	Libre de acarreador	Amersham
L- ^{35}S Metionina	1400 Ci/mMol	Amersham
Adenina ($8\text{-}^3\text{H}$)	25 Ci/mMol	Amersham
Adenina ($U\text{-}^{14}\text{C}$)	296mCi/mMol	Amersham

5. Sustancias Químicas.

Las RNasas A y T_1 fueron obtenidas de Sigma. La acrilamida fué obtenida de LKB o recristalizada. La urea usada fué filtrada y desionizada. El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

II.2. METODOS.

1. Crecimiento de las células.

Para los experimentos de marcaje, con excepción de los de $^{32}\text{PO}_4^{-4}$, las levaduras se crecieron en medio SC (Hutchinson y Hartwell, 1967; Warner, 1971; Sripatí y Warner, 1978).

El medio se inoculó con un stock de células crecidas hasta fase estacionaria en medio rico YM-1 (Hartwell, 1967) a una dilución 1/200. Las células se dejaron crecer en matraces en agitación a 23°C . El crecimiento fué seguido por turbidez en un fotocolorímetro Klett-Summerson equipado con filtro rojo. Las levaduras se cosecharon por centrifugación en fase logarítmica, entre 40-80 U.K. equivalente a 0.9×10^7 - 1.4×10^7 células por mililitro (Waldrón y Lacroute, 1975).

Para la obtención de proteína ribosomal a gran escala las células se sembraron en medio YM-1 y se dejaron crecer en agitación a 30°C durante 16 horas.

2. Métodos de Marcaje.

2.1. Marcaje de las fosfoproteínas ribosomales.

Para el marcaje de las proteínas fosforiladas del ribosoma se siguió el método descrito por Zinker y Warner (1976). Las levaduras se crecieron en medio libre de fosfatos inorgánicos (Rubin, 1973); en este medio las células crecen usando fosfato orgánico. Se sembró a una dilución 1/200 y las células se dejaron crecer hasta fase logarítmica. Las levaduras se incubaron en presencia de 10 uCi de $^{32}\text{PO}_4$ por mililitro de cultivo, durante una hora. Debido a que el fosfato inorgánico es preferencialmente utilizado, las levaduras incorporan prácticamente el 100% del isótopo en una hora.

Al final de cada experimento, el metabolismo celular se detuvo adicionando cicloheximida (100 ug/ml) y agua bidestilada estéril congelada. Las células se cosecharon y se lavaron dos veces con

agua bidestilada estéril a 4°C e inmediatamente se aislaron los ribosomas o las subunidades ribosomales.

2.2. Marcaje de las proteínas ribosomales de recambio.

Para el marcaje de las proteínas ribosomales de recambio se creció la cepa ts368 en medio SC. Al llegar a la fase logarítmica, el cultivo se incubó a 36°C durante 90 minutos para asegurar la inhibición de la síntesis de ribosomas (Udem y Warner, 1972) y se le dió un pulso de L-(³⁵S) metionina (10 uCi/ml de cultivo) durante 15 minutos a 36°C. Al término de este tiempo el isótopo se diluyó agregando un exceso de metionina fría (0.5 mg/ml). El cultivo se incubó por cinco minutos más a 36°C. El metabolismo celular se detuvo como se describió en la sección anterior e inmediatamente se procesaron las células.

2.3. Marcaje con adenina radioactiva.

Para el marcaje de los ARN ribosomales, los experimentos de adenilación y la posible existencia de un complejo ARN-proteína, las levaduras se crecieron en medio SC suplementado sólo con 1/4 de la concentración normal de adenina. El isótopo (³H-adenina o ¹⁴C-adenina) se agregó al momento de inocular el cultivo para marcar uniformemente todas las especies de ARNs. El cultivo celular se dejó crecer a 23°C hasta llegar a la fase logarítmica.

3. Preparación de subunidades ribosomales.

Para la obtención de ribosomas y subunidades ribosomales de la levadura Saccharomyces cerevisiae se siguió el método descrito por Warner (1971).

3.1. Ribosomas.

Las células cosechadas y lavadas se resuspendieron en amortiguador LHB (de 1 a 2 g de células por cada 15 ml de LHB; Zinker, 1980). Esta suspensión se mezcló con perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro; 36 g/20 ml) y las células se rompieron en un homogenizador tipo Braun por 90-120 segundos o en un agitador Vortex cuando el paquete celular fué menor de 1 g. Se colectó el sobrenadante y las perlas de vidrio se lavaron con amortiguador LHB hasta obtener un

décimo del volumen del cultivo original. Para la liberación de ribosomas unidos a membranas, se agregó al lisado desoxicolato de sodio hasta una concentración final de 0.5%; después de cinco minutos en hielo se agregó Brij 58 hasta 0.5% y se dejó otros cinco minutos a 4°C. La suspensión se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos (rotor Sorvall SS34). El sobrenadante se estratificó sobre un colchón de sacarosa al 15% con (NH₄)₂SO₄ al 5% en amortiguador LHB y se centrifugó a 50,000 rpm por 3 horas a 4°C (rotor 60Ti Beckman) o a 40,000 rpm por 3 horas a 4°C (rotor 50Ti Beckman). La concentración de sulfato de amonio usada en el colchón de sacarosa libera las proteínas unidas debilmente unidas al ribosoma. El sobrenadante se drenó cuidadosamente y la pastilla de aspecto transparente y gelatinoso (paquete ribosomal) se enjuagó con 5 ml de amortiguador 10⁻⁵. Este paquete puede ser usado para la obtención de proteína ribosomal total o la preparación de subunidades ribosomales.

3.2. Subunidades ribosomales.

Para la preparación de subunidades ribosomales el paquete ribosomal se resuspendió en amortiguador 10⁻⁵ hasta un máximo de 40 D.O. a 260 nm/ml. Este amortiguador, con baja concentración de magnesio disocia al ribosoma en sus subunidades. La solución se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor SS34 Sorvall) para eliminar el material en suspensión. El sobrenadante se estratificó sobre un gradiente de sacarosa al 10% a 25% (p/p) en amortiguador 10⁻⁵ y se centrifugó a 23,000 rpm por 17 horas a 4°C (rotor SW28 Beckman). El gradiente se colectó en fracciones de 1.5 ml registrándose simultaneamente y en forma continúa la absorción a 260 nm (Colector de fracciones Isco, modelo 1200). Las fracciones correspondientes a las subunidades 40s y 60s se juntaron y se les agregó 0.7 volúmenes de etanol al 95% y MgCl₂ 1 M hasta una concentración final de 0.008 M. Las subunidades se dejaron precipitar a -20°C (Staehein y Falvey, 1974) y se colectaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (rotor SS34 Sorvall).

4. Extracción de proteína ribosomal.

Para la extracción de proteína ribosomal se siguió esencialmente el método desarrollado por Hardy y cols. (1969). Al paquete ribosomal o de subunidades ribosomales resuspendidos en amortiguador 10^{-5} mantenido en hielo-agua y agitación, se le agregó 0.1 volúmenes de $MgCl_2$ 1 M y 2 volúmenes de ácido acético glacial. El ácido acético solubiliza la proteína y el magnesio precipita, en forma de quelatos al ARN. Después de 30 minutos de agitación las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos a $4^{\circ}C$ (rotor SS34 Sorvall) y el sobrenadante se transfirió a un tubito de diálisis Spectrapor No. 3 (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, Calif., Inc.) Las muestras se dializaron contra ácido acético 0.5M y se liofilizaron.

5. Extracción de ARNs pequeños.

Para la extracción de los ARNs pequeños se utilizó el método de fenol caliente descrito por Girard (1967) modificado por Helser y McLaughlin (1975). Para la obtención de 3H -ARN, al cultivo se le agregó desde su incubación 1 uCi de 3H -adenina por ml de medio. Las células se cosecharon en fase logarítmica y se lavaron con agua bidestilada estéril. El paquete celular se resuspendió en 3 ml de amortiguador LETS y se transfirió a un tubo con tapón de rosca; se le agregó igual cantidad de cloroformo fenol (1: 1; fase orgánica) y se agitó en un Vortex. La suspensión formada se incubó a $45^{\circ}C$ durante 10 minutos evitando que se rompiera la emulsión; y se agitó otros 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 2,000 rpm en una centrífuga clínica por cinco minutos. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro tubo con tapón de rosca y se le agregaron 2 ml de fase acuosa fresca. Se agitó en el Vortex durante 10 minutos y se centrifugó como se acaba de describir. La fase orgánica (inferior) e interfase del primer tubo se lavaron con 1 ml de LETS por agitación en el Vortex y se centrifugó; se separó la fase acuosa y con ella se lavó la segunda fase orgánica e interfase. Las fases acuosas se juntaron en un solo tubo y se les agregó 0.1 volúmenes de LiCl 5M y 2 volúmenes de etanol al 95% a $-20^{\circ}C$ mezclando a homogeneidad. La solución se dejó a $-20^{\circ}C$ durante 12 a 16 horas y el precipitado se empastilló centrifugando a 10,000 rpm por 15 minutos a $4^{\circ}C$

(rotor SS34 Sorvall). El paquete obtenido es ARN pequeño (ARNt, ARNr 5s y - 5.8s). El ARN se volvió a disolver en LETS y a precipitar como se describió, con el fin de eliminar los residuos de fenol.

6. Métodos electroforéticos.

6.A. Analisis de la proteína ribosomal.

La proteína ribosomal fué analizada por tres sistemas diferentes de geles de poliacrilamida (PAGE). Se utilizó el sistema diseñado por Maizel (1971) para la separación de la proteína ribosomal en base a su peso molecular. Para una clara resolución de la fosfoproteína ribosomal P1 se usó un sistema bidimensional. En la primera dimensión, a pH 3.2, las proteínas fueron separadas en base a su carga y en la segunda dimensión, en presencia de SDS se separaron en base a su peso molecular. Un tercer sistema, fue el descrito por Mets y Bogorad (1974), en el cual la primera dimensión se lleva a cabo a pH 5.0 y la segunda en presencia de SDS.

6.A.1. Gel discontinuo de poliacrilamida-SDS.

Se usó el método descrito por Maizel (1971). La concentración de acrilamida del gel resolvidor fué del 12% y la del gel concentrador del 4%.

Preparación.

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml inmerso en hielo, se mezclan:

Sol. I 12 ml; sol. K 11.25 ml; sol. M 0.3 ml; agua bidestilada 6.25 ml; TEMED 25 ul; persulfato de amonio al 10% 0.12 ml. La mezcla se desgasifica al vacío (1-2 minutos) y se vierte entre placas de vidrio (125 mmx140mmx1 mm) de la cámara de electroforesis. Sobre el borde superior de la solución se estratifica una capa de SDS al 1%, evitando se mezclen ambas soluciones; esto se hace con el fin de que la superficie quede lisa. El gel se deja polimerizar a temperatura ambiente (15-30 minutos). Después de que ha polimerizado, el gel está listo para que sobre él se vierta la solución del gel concentrador.

Para la preparación del gel concentrador se mezclan las siguientes soluciones.

Sol. I 1.33 ml; sol. L 1.25 ml; sol. M 0.1 ml; agua 7.2 ml; TEMED 5 ul; persulfato de amonio al 10% 0.1 ml. La capa de SDS que está sobre el gel separador se elimina, se vierte la solución del gel concentrador e inmediatamente se coloca el peine (cuidando que no queden burbujas de aire atrapadas) que formará los pocillos donde se colocarán las muestras de forma que, entre el borde inferior del peine y el gel separador quede un espacio de 1 cm de gel concentrador. Después de la polimerización se quita el peine y se llenan las cámaras con solución amortiguadora N. El gel se precorre por 30 minutos a 100 voltios quedando el ánodo (+) en el reservorio inferior. La muestra de proteína ribosomal (50 a 150 ug) se disuelve en un volumen menor de 100 ul de solución amortiguadora O. Para evitar la formación de agregados la muestra en solución O se calienta en un baño a ebullición por 1-2 minutos y se deposita dentro de los pocillos del gel concentrador, con ayuda de una pipeta Pasteur o una microjeringa. La electroforesis se lleva a cabo hacia el ánodo, inicialmente a 50 voltios hasta que el colorante de la solución O empieza a penetrar al gel resolvidor; entonces el voltaje se cambia a 100 voltios hasta que el color café del marcador interno, citocromo C (10 ug), se encuentra a 1 cm del borde inferior del gel resolvidor.

6.A.2. PAGE en gel bidimensional: ácido acético, urea de pH 3.2xSDS.

Para la primera dimensión se usó el sistema descrito por Panyim y Chalkley (1969) para la separación de proteínas histónicas.

Preparación.

En un matraz inmerso en hielo-agua se mezclan:

Sol. A 1ml; sol. B 1 ml; sol. C 5 ml; agua 1 ml, la mezcla se desgasifica al vacío durante 1 a 2 minutos. En tubos de vidrio de 5 mm (D.I.) x 100 mm con el fondo sellado con Parafilm; se vacía esta mezcla hasta una altura de 80mm. La superficie superior del gel se aplanan estratificando ácido acético 0.9N. Los geles se dejan polimerizar a temperatura ambiente (30-45 minutos). Se colocan en el aparato de electroforesis y los reservorios superior e inferior se llenan con ácido acético 0.9N. Los geles se precorren hacia el cátodo (-) durante 12 a 15 horas a 40 voltios para eliminar los catalizadores y monómeros de acrilamida.. Después de precorridos los geles, se cambia el ácido

acético de los reservorios y se colocan las muestras de proteína ribosomal (200 a 400 ug de proteína por 50 ul de sol. D) sobre la superficie de los geles. La electroforesis se conduce a 100 voltios hasta que el colorante del amortiguador D empieza a salir por el extremo inferior.

Equilibrio para la segunda dimensión.

Los geles de la primera dimensión se sacan de los tubos de vidrio con ayuda de una jeringa conteniendo agua destilada. Cada gel se deposita dentro de un vaso de precipitados conteniendo 50 ml de sol. J con agitación por 45 a 60 minutos. Este procedimiento sube el pH del gel cilíndrico de la primera dimensión hasta un valor similar al del gel concentrador de la segunda dimensión (pH 6.8) e introduce, por difusión, el detergente SDS que se une a las proteínas ribosomales (Mets y Bogorad, 1974; Gorenstein y Warner, 1976).

Segunda Dimensión.

El gel de la segunda dimensión es idéntico al discontinuo de SDS que se describió en la sección 6.A.1.. Después de que ha polimerizado el gel resolvidor, se coloca el gel cilíndrico de la primera dimensión y se cubre con solución del gel concentrador, evitando queden burbujas atrapadas bajo el gel cilíndrico. En caso de que el gel cilíndrico no quede bien incluido en el gel concentrador, se puede cubrir con agarosa al 1% en solución amortiguadora N. Después de la polimerización, se realizó la electroforesis como se describió anteriormente, usando como marcador interno citocromo C.

6.A.3. PAGE en gel bidimensional: pH 5.0xSDS.

Se usó el método diseñado por Mets y Bogorad (1974). La concentración del gel resolvidor fué del 12%.

Preparación.

Primera dimensión.

En un matraz inmerso en hielo se mezclan:

5 ml de sol. E con 30 ul de persulfato de amonio al 10% y 10 ul de TEMED, la solución se desgasifica y se vierte en tubos de 150 mmx 5mm (D.I.) hasta una altura de 11 cm, sobre el borde superior se estratifica cuidadosamente agua bidestilada para aplanar la superficie de los geles. Los geles se dejaron polimerizar durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron

en el aparato de electroforesis. El reservorio superior se llenó de sol. G mientras el inferior de sol. F. Después se colocaron las muestras de proteína ribosomal (400 µg de proteína/50 µl de sol.H). La electroforesis de la proteína se llevó a cabo hacia el cátodo (-) a 100 voltios hasta que el colorante de la sol. H comenzó a salir por el extremo inferior del gel.

Equilibrio para la segunda dimensión.

Terminada la electroforesis los geles se sacaron de los tubos de vidrio y se equilibraron como se describió en la sección 6.A.2.

Segunda dimensión.

El gel de la segunda dimensión fue idéntico al descrito en la sección 6.A.2.

6.1. Tinción.

Se emplearon dos métodos de tinción. Terminada la electroforesis, el gel se sumergió durante una hora en una solución de Azul de Coomassie G (sección II.1.3.6.). Transcurrido este tiempo el gel se destiñó en una solución de metanol al 30%, ácido acético al 7%. El segundo método de tinción fue semejante al anterior excepto que la solución de tinción tenía Azul de Coomassie R-250. Esta solución es más sensible para la visualización de las manchas de proteína.

En caso de teñir geles de urea, pH 3.2 o pH 5.0 es preferible usar la solución de Coomassie G ya que la de Coomassie R-250 precipita.

6.B. Análisis del ARN en geles de Poliacrilamida.

Para el análisis del ARN se usó el método descrito por Kadowaki y Halvorson (1971). Para la detección de los ARNs pequeños (5s, 5.8s, y ARNt) la concentración final de acrilamida en los geles fue del 10%.

Preparación.

En un matraz Erlenmeyer inmerso en hielo-agua se mezclan:

Sol. I 6.6 ml; sol. P 1.0 ml; agua 10.2 ml; sol. M 0.2 ml; glicerol al 50% 2.0 ml; TEMED 10 µl; persulfato de amonio al 10% 0.1 ml. La mezcla se degasificó al vacío durante 1 minuto, los geles de 80 mm x 6 mm se prepararon en tubos de vidrio de 15 cm de largo. La superficie de los geles se aplanaron es-

tratificando SDS al 1%. Una vez que polimerizaron se colocaron en el aparato de electroforesis y los reservorios se llenaron con solución amortiguadora R. Los geles se precorrieron a 2.5 miliamperios por gel durante 30 minutos hacia el ánodo (+). Después se depositó la muestra sobre la superficie del gel en un volumen menor de 100 µl de solución Q, la electroforesis se llevó a cabo a 5 mA por gel durante 2.5 horas. Terminada la electroforesis los geles se sacaron de los tubos de vidrio con una jeringa y SDS al 0.1%. En los casos en que se analizó ARN radioactivo, el gel se congeló y se cortó transversalmente en rebanadas de 1.0 mm de espesor, con un rebanador de geles Mickle (Brinkman Instruments). Cada rebanada se colocó dentro de un vial de centelleo conteniendo 0.7 ml de NH_4OH 0.1 N. Los viales se incubaron a 70°C por tres horas para la hidrólisis y elución del ARN del gel. Después de enfriar, a cada vial se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo U. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo Packard Tri-Carb modelo C2425.

7. Purificación de la proteína P1.

Para la purificación de la proteína ribosomal P1 se siguió el método descrito por Hager y Burgess (1980). P1 se eluyó del gel en placa de la segunda dimensión, de un sistema bidimensional de urea de pH 3.2 x SDS.

Procedimiento.

Electroforesis.

La primera dimensión se llevó a cabo en un gel en placa, urea pH 3.2 (140 mm x 125 mm x 3 mm) aplanando el borde superior estratificando cuidadosamente ácido acético 0.9 N (sección II.2.6.A.2.). El gel se precorrió 14 horas a 50 voltios. La solución de los reservorios se sustituyó por otra recién preparada y 10.0 mg de proteína ribosomal total disuelta en 2 ml de la solución D se estratificó a lo largo de la superficie del gel. La electroforesis se condujo a 100 voltios hacia el cátodo, hasta que el colorante de la solución D se salió completamente. Terminada la corrida se recortaron 5 mm del borde superior del gel y se equilibraron por 30-45 minutos en solución J. La tira del gel se incluyó en un gel de poliacrilamida SDS (sección II.2.6.A.2.) donde la concentración final del gel resolvente fue del 8.75%. La electroforesis se llevó a cabo

a 100 voltios usando citocromo C como marcador interno.
Visualización.

Para la visualización de las bandas de proteína se utilizó el método de Hager y Burgess (1980). Terminada la electroforesis de la segunda dimensión, el gel se lavó con agua bidestilada, evitando el contacto con los dedos y el gel se "tiñó" por 5 minutos con una solución de KCl 0.25 M y DTT 1mM. Las bandas de proteína se pueden visualizar debido a que precipitan en el gel como un complejo dodecil sulfato de potasio-proteína (Higgins y Dahmus, 1979). Posteriormente el gel se lavó y se "destiñó" hasta por 60 minutos en una solución de DTT fría. Cada banda de proteína se recortó longitudinalmente y después en fragmentos de 1.5 cm. Cada fragmento se transfirió a tubos Pyrex silicinizados (10 mm x 75 mm) con emulsión de silicón al 2% (Siligal S.A.). Las piezas de gel se lavaron dos veces con 1 ml de DTT por 15 minutos.
Elución.

1 ml de amortiguador P se le agregó a cada tubo y el gel se machacó con un homogenizador de Teflón. La proteína se dejó eluir 4 horas a temperatura ambiente con agitación. La mezcla se centrifugó en una centrífuga clínica a máxima velocidad por un minuto para empastillar los fragmentos de gel. El sobrenadante se transfirió a tubos Corex de 30 ml silicinizados.
Extracción

A cada tubo se le agregaron cuatro volúmenes de acetona fría (-20°C) y la proteína se dejó precipitar por 30 minutos en un baño de hielo seco-etanol. - Transcurrido este tiempo las muestras se descongelaron rápidamente en un baño de agua fría. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000 rpm (rotor SS34 Sorvall); el sobrenadante se desechó y los tubos se invirtieron hasta que el interior quedó seco.

8. Purificación de la proteína YL3.

Para la obtención de la proteína ribosomal YL3 se usó el método descrito por Nazar y cols. (1979) con la modificación de que en lugar de usar subunidades 60s se usó todo el paquete ribosomal (80s).

Los ribosomas de Saccharomyces cerevisiae fueron aislados como se descri-

bió en la sección II.2.3.1, después de obtenido el paquete ribosomal, este se resuspendió en EDTA 25 mM de pH 7.0 (100 A₂₆₀ unidades/ ml). La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C (rotor SS34 Sorvall) para eliminar el material en suspensión. El sobrenadante se pasó a tubos del rotor 50 Ti Beckman y se centrifugó a 45,000 rpm durante 18 horas a 4°C. Posteriormente se tomó el sobrenadante y se extrajo la proteína por el método de Hardy y cols. (1969) (sec II.2.4) o se precipitó el complejo ribonucleoproteico YL3-ARN5s con etanol frío como lo describen Staehelin y Falvey (1971) (sec. II.2.3.2.) y después se extrajo la proteína por el método de Hardy y cols (1969).

Por otra parte, una muestra de la proteína YL3 con una pureza del 90% fué amablemente donada por el Dr. Ross N. Nazar del Departamento de Botánica y Genética de la Universidad de Guelph, Ontario, Canada.

9. ANALISIS DE LA PRESENCIA DE ARN EN LA PROTEINA RIBOSOMAL.

Para la detección de ARN en la proteína ribosomal, se creció la cepa A364A en medio SC suplementado con 1/4 de la concentración normal de adenina. Al cultivo se le añadió (¹⁴C)-adenina (1uCi/ml) desde el momento de la inoculación. La proteína ribosomal se obtuvo como se describió en la sección II.2.3.; 9,000 cpm de la proteína ribosomal así marcada, se sometieron a electroforesis en un gel cilíndrico de urea, de pH 3.2 (sec. II.6A.2.) del que se cortó el borde superior (5mm). Este pedazo de gel se equilibró en 20 ml de solución Q durante una hora a temperatura ambiente. El fragmento de gel se colocó encima de un gel cilíndrico de acrilamida de 6 mm x 100 mm para el análisis de ARN, preparado como se describió en la sección II.2.6.B. Encima del fragmento de gel se colocó una muestra de ARNs pequeños equivalentes a 20,000 cpm de tritio, que sirvieron como marcadores internos de referencia, para determinar el peso molecular aparente. La electroforesis se realizó a 5 miliamperios por tubo hasta que el colorante migró hasta la mitad del gel (aproximadamente 1 hr.). El gel se sacó del tubo y se cortó en rebanadas de 1 mm de grosor. La proporción de ¹⁴C/³H se cuantificó como se describió en la sección II.2.6.B.

Por otro lado se sometieron 1,000 cpm de proteína ¹⁴C-adenina, en un gel cilíndrico de urea, de pH 3.2. Terminada la electroforesis se recortaron 5 mm del borde superior y gel se incubó por 3 horas a 70°C con NH₄OH 0.1N para determinar la presencia de radioactividad

soluble en álcali.

10. DIGESTION CON RIBONUCLEASA DE LA PROTEINA RIBOSOMAL.

Para determinar una posible asociación de PI con algún tipo de ARN, la proteína ribosomal se incubó con ribonucleasas como lo describen Lambowitz y cols. (1979). La proteína ribosomal total - se disolvió en SDS al 0.5% (100 ug/100 ul). La proteína se incubó a 70° por cinco min y se enfrió rápidamente en hielo. Por cada - - 400 ug de proteína ribosomal se agregaron 0.8 U de ribonucleasa A y 24 U Kunitz (Kunitz, 1946) de ribonucleasa T₁; esta mezcla se dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregaron 8 volúmenes de acetona fría y se mantuvo a -20°C durante 14-16 hrs. La proteína precipitada se empastilló a 5,000 rpm por 15 min. a 4°C (rotor SS34, Sorvall); el sobrenadante se desechó y la pastilla se secó.

11. DETERMINACION DE PROTEINA.

Para determinar la concentración de proteína se utilizó el método de Lowry modificado por Eagle (1956) o en algunos casos por absorción a 230 nm (Marquadt y cols., 1979).

12. ESTIMACION DE MUESTRAS RADIOACTIVAS.

Cuando la radioactividad incorporada a macromoléculas se determinó como material TCA precipitable, la muestra se incubó 30 min. en TCA al 20% en hielo-agua añadiendo albúmina (100 ug) como aca--rreador. Esta mezcla se filtró a través de papel millipore; cada filtro se transfirió a un vial de centelleo líquido y se secaron a 80°C por 30 min; después de enfriar, a cada vial se le agregaron 5 ml de solución T. En caso de muestras líquidas se añadió solución U.

13. AUTORADIOGRAFIA.

Para visualizar la radioactividad incorporada a las proteínas, los geles se secaron en un secador de geles (Bio-Rad) y se expusieron a una placa para rayos X (Kodak X-Omat XS-5).

III. RESULTADOS.

(a). LOCALIZACION DE P1 EN GELES BIDIMENSIONALES pH 5.0 x SDS.

El propósito de este experimento fué localizar la fosfoproteína P1 en un sistema de electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida (PAGE) diferente al de pH 3.2x SDS, por uno más usado en la investigación de proteínas ribosomales.

La proteína obtenida a partir de ribosomas totales, fue analizada en un sistema de PAGE bidimensional, donde la primera dimensión consistía de ácido acético, urea de pH 3.2 (Panyim y Chalkley, 1969) por SDS en la segunda dimensión (Maizel, 1971). El patrón electroforético se muestra en la figura 2. Las dos proteínas de mayor peso molecular corresponden a L1 y L2, de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Warner (1980) y Kruiswijk y Planta (1974), estas dos proteínas se encuentran en la subunidad 60s. La proteína P1 se queda en el origen de la primera dimensión (Fig. 2). Además en la primera dimensión de este tipo de geles, se observa que penetra una proteína con un peso molecular semejante al de P1.

Tentativamente hemos denominado a esta segunda proteína como P1* y postulado la hipótesis que ésta es un derivado de P1. P1* se encuentra conectada a P1 por un barrido, visible al teñir con azul de Coomassie, el cual también ha sido observado por Zinker (datos no publicados) al marcar con (³⁵S)L-metionina en condiciones restrictivas usando la cepa ts368. Este barrido posee una movilidad electroforética semejante a la de P1 en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 3).

Debido a que el sistema de PAGE bidimensional de pH 3.2 x SDS no es el más utilizado, ni adecuado, para el análisis de las proteínas ribosomales se correlacionaron las tres proteínas de mayor peso molecular del ribosoma (L1, L2 y P1/P1*) en los sistemas de PAGE convencionales. Las técnicas principalmente usadas fueron - las descritas por Kaltschmidt y Wittman (pH 8.6 x pH 4.5) (1970) y la de Mets y Bogorad (pH 5.0 x SDS) (1974).

El método de Mets y Bogorad usa al detergente SDS en la segunda dimensión, eliminando la retención de proteínas en la primera dimensión, un problema que se presenta al usar la técnica de - - Kaltschmidt y Wittman, debido a esto, y a que el método de Mets y Bogorad da una mayor resolución y reproducibilidad se correlacionaron las proteínas L1, L2 y P1/P1* en este sistema. El patrón - - electroforético de la proteína ribosomal se muestra en la Fig. 4. Como anteriormente se explicó, este sistema muestra una mejor resolución que el de pH 3.2 x SDS. Usando las dos proteínas de mayor peso molecular (L1 y L20 como marcadores internos se trató de localizar P1/P1* en este tipo de geles). L1 y L2 son fácilmente identificables, no así P1, aunque algunas proteínas que se quedan en el origen del gel de la primera dimensión, poseen un peso molecular semejante al de P1.

Para determinar si el material que quedaba cerca del origen - en la primera dimensión correspondía realmente a la fosfoproteína P1, se marcó un cultivo de levaduras con (³²P) como se describió en la sección Métodos y se obtuvo la proteína ribosomal total. Aproximadamente 30,000 cpm de proteína marcada con fósforo fueron procesadas en un gel de pH 5.0 x SDS. En la autorradiografía (Fig. 5) se observa que en el origen de la primera dimensión, se queda material marcado con fósforo, con un peso molecular semejante al de P1. No fué posible distinguir P1* en este sistema. A partir de estos resultados concluimos que P1 se queda también - en el origen de la primera dimensión en el sistema de geles bidimensionales de pH 5.0 x SDS.

Aunque no se hizo la correlación de las tres proteínas (L1, L2 y P1/P1*) en el sistema bidimensional de Kaltschmidt y Wittman - (1970), Nazar y cols. (1979) han descrito que YL3, una proteína -- muy semejante a P1 (Ver sec. III. (e).), se queda en el origen de la primera y segunda dimensiones (ver también Zinker y Warner, - - 1976) razón por la que durante varios años no se le consideró como proteína ribosomal.

(b) PURIFICACION DE P1.

El aislamiento y la purificación de las proteínas ribosomales es un prerrequisito para el análisis de la estructura y función -- del ribosoma (Woll y Stoffler, 1974) aunque la naturaleza básica, el pequeño tamaño y la insolubilidad en soluciones amortiguadores, así como la carencia de actividades enzimáticas de las proteínas - ribosomales, han dificultado su purificación (Wool, 1979). En el caso de la fosfoproteína ribosomal P1, la obtención de muestras pu ras para una posterior determinación de una posible poza citoplas mática y la caracterización química y funcional, es facilitada por la capacidad de fosforilación de esta proteína ribosomal, haciendo más fácil su rastreo durante la purificación.

Un paso previo a la purificación de P1, fué determinar el por centaje que le corresponde a P1 con respecto a la proteína riboso mal total. Para ello se analizó por densitometría una muestra de proteína ribosomal total separada por PAGE-SDS y visualizada con - azul de Coomassie. Al integrar el área bajo de la curva del pico - correspondiente a P1 en el trazo densitográfico total (Fig. 6) obtuvimos que aproximadamente el 1.9% de la proteína ribosomal es -- P1, así como 2.2% para L2 y 3.3% para L1. Por medio de una electro foresis "tridimensional" (Fig. 7) demostramos que tanto P1* y P1, - así como el barrido que conecta a ambas tienen un peso molecular - semejante y que no eran artefactos del gel bidimensional.

Explotando el extraño comportamiento electroforético de P1, de quedarse atrapada en el origen de la primera dimensión de un siste ma bidimensional pH 3.2 x SDS y usando técnicas de elución de proteí nas en PAGE-SDS (Hagger y Burgess, 1980) se purificó una proteí na con las mismas características de P1. Como anteriormente se -- describió, la fosfoproteína P1 se queda en el origen de un gel de pH 3.2, por lo que al someter a electroforesis 10 mg de proteína - ribosomal en un gel en placa de pH 3.2 se esperaría que en el bor de superior quedara P1. Esta predicción se confirmó al teñir con azul de Coomassie el gel (Fig. 8)

El análisis del borde superior del gel en placa de pH 3.2 en - una segunda dimensión como se describió en Material y Métodos reve ló que el teñir con KCl 0.25 M ó azul de Coomassie había más de una proteína en el borde superior en este tipo de geles (Fig. 9 y 10). El objetivo de "teñir" la proteína con KCl es evitar teñir con - - azul de Coomassie, el cual posteriormente es difícil de remover - - (Hagger y Burgess, 1980).

Después de visualizar las bandas de proteína en el gel tratado con KCl 0.25 M se eluyeron como se describió en la sección II.2.7 de método. Las proteínas así obtenidas de diversas fracciones, se precipitaron con acetona; el precipitado fué disuelto en solución amortiguadora 0 y se sometió a electroforesis en PAGE-SDS para de terminar su semejanza con P1. Este tipo de análisis reveló que la fracción más pesada en el gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 9) tenía gran similitud con P1. Los intentos para cuantificar la cantidad de proteína recuperada, por el método de Lowry y por absorvencia - en U.V., fueron infructuosos debido tal vez a la contaminación de la proteína con acrilatos y SDS.

Para determinar si la proteína purificada correspondía realmen te a P1, un cultivo de 50 ml fué marcado con 32P en medio libre de fosfatos orgánicos (Rubin, 1973) como se describió en Material y - Métodos. Al analizar el gel de poliacrilamida-SDS confirmamos que la banda más abundante estaba marcada (Fig. 10) y al analizar la - proteína que se eluye encontramos que esta proteína además de es-- tar marcada comigraba con la proteína P1 al compararla con el pa-- trón de fosfoproteínas ribosomales totales de S. cerevisiae - -

El tratamiento de la proteína ribosomal con : (i) álcali;- (ii) solubilización en SDS al 0.5% en un baño en ebullición; e - (iii) incubación en TCA al 10%, no dió ningún cambio en el comportamiento electroforético de esta proteína en un gel bidimensional pH 3.2. x SDS, dado que en todos los casos se observaron barrido y P1/P1*.

Otra posible explicación del comportamiento de P1/P1* en el sistema de geles bidimensionales pH 3.2. x SDS es que sea debido al grado de fosforilación de P1; esto estaría de acuerdo con la movilidad electroforética esperada en la primera dimensión, es decir la forma fosforilada sería más ácida debido a la contribución de las cargas de los grupos fosfatos que la forma defosforilada P1*. Para la confirmación de esta hipótesis se necesitarían de experimentos donde se tratara P1 con fosfatasas y/o P1* con una proteína cinasa y observar el probable cambio en la movilidad electroforética de P1/P1*.

(d) PRESENCIA DE ARN EN LA PROTEINA RIBOSOMAL

Los experimentos descritos en el inciso anterior no descartan la posibilidad de que P1 esté unida y proteja a un fragmento pequeño de ARN.

Para determinar si la proteína ribosomal extraída de ribosomas de levadura contenía ARN, y si este ARN se quedaba atrapado en el origen de la primera dimensión del sistema de pH 3.2 x SDS se marcó un cultivo de levaduras con (¹⁴G)-adenina como se describió en la sección II.2.9. de métodos y se extrajo la proteína ribosomal total, (secc. II.2.4.) midiéndose la radioactividad incorporada en cada paso del aislamiento de la proteína (TABLA IV). Posteriormente el equivalente a 2,000 cpm presentes en la proteína ribosomal, se sometieron a electroforesis en el gel cilíndrico de la primera dimensión de pH3.2. Terminada la electroforesis se cortaron 0.5 cm del borde superior y de la parte media del gel y se cuantificó la radioactividad (secc II.2.6.B.) encontrándose -- que sólo se detectó marca en el borde superior (TABLA V) y que --

(Fig. 11). Aunque por este método se logra purificar P1, es muy laborioso y al parecer con una recuperación muy pobre. El método más adecuado para la purificación de P1 parece ser el que se describe en la sección II.8. de Métodos.

(c) TRATAMIENTO CON RIBONUCLEASAS

Una posible explicación al comportamiento electroforético de la proteína P1/P1* en geles bidimensionales de pH 3.2 x SDS, es que estuviera modificada. Dos posibles modificaciones fueron analizadas: (i) Adenilación; (ii) Unión a ARN.

Para determinar una posible adenilación de P1/P1*, se marcó un cultivo de levadura con ³H-adenina como describió en la -- sección de Materiales y Métodos. La proteína ribosomal fué aislada y procesada en un gel de poliacrilamida-SDS (Maizel, 1971); el gel se secó y se expuso a una placa de rayos X. Al analizar la autorradiografía no se observó incorporación de adenina a la proteína ribosomal, por lo cual la hipótesis de una posible adenilación se desechó.

En el segundo caso, unión de la proteína con ARN, - - - Lambowitz y cols. (1979) han reportado una proteína mitorribosomal de Neurospora crassa con un comportamiento análogo al de -- P1/P1*, ya que esa proteína se queda en el origen de un gel bidimensional de pH 5.0 x SDS pero al tratar los mitorribosomas con una mezcla de ribonucleasas la movilidad de la proteína en la -- primera dimensión cambia, concluyendo estos autores que su proteína se queda atrapada en el origen del gel bidimensional debido a que está unida a ARN. Basados en estos datos, supusimos -- que tal vez P1 sería la proteína que estaría unida al ARN y P1* la proteína no unida; el tratamiento con una mezcla de ribonucleasas nos llevaría a la transformación de P1 a P1*. Sin embargo al tratar la proteína ribosomal total con una mezcla de ribonucleasas, como se describió en Material y Métodos, y al hacer -- el gel bidimensional correspondiente, se obtuvo el mismo patrón electroforético que se describe en la figura 1.

ésta correspondía a menos de la mitad de la radioactividad que se depositó al inicio de la electroforesis.

Para caracterizar más detalladamente al ARN detectado, se procedió a determinar su tamaño. 9,000 cpm de proteína ribosomal marcada con (^{14}C) adenina se sometieron a electroforesis en un gel cilíndrico de pH 3.2 como se describió en la sección de Métodos y se cortó el borde superior. El pedazo de gel se equilibró para someterlo a una "segunda dimensión" en un gel específico para el análisis de ARN (sec. II.2.6.B.) usando además 20,000 cpm de ARNs pequeños (5.8 s, 5s, 4s) marcados con tritio como marcadores internos. Terminada la electroforesis se cuantificó la relación $^{14}\text{C}/^3\text{H}$, encontrándose que había dos fracciones marcadas con ^{14}C (Fig. 12); estas dos fracciones tienen un peso molecular aparente de 12,000 y 4,000 daltones, los cuales corresponden a fragmentos de ARN de 40 y 15 nucleótidos respectivamente.

TABLA IV

Recuperación de (^{14}C)-adenina en los diversos pasos de la extracción de la proteína ribosomal*.

Fracción.	cpm (^{14}C)-adenina
Cultivo	9,463 350
En solución LHB	7,507 250
En ribosomas	3,406 200
Extracción de proteína	77 248
Dializado	31 740
Proteína liofilizada	18 745

* Resultados de un experimento.

TABLA V

Radioactividad presente en diversas regiones de un gel de pH 3.2. Después de la electroforesis de la proteína ribosomal*

Fracción	cpm (¹⁴ C)-adenina
Borde superior ^a	708
Parte media ^a	128
Gel sin muestra	109
Sin gel	99

^aFragmento transversal de 0.5 cm.

* Resultados de un experimento.

(e) CORRELACION ENTRE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES YL3 y P1.

Un complejo ribonucleoprotéico entre el ARN ribosomal 5s y una proteína de la subunidad grande con un coeficiente de sedimentación de 7s puede ser liberado de los ribosomas de organismos eucariotes (Blobel, 1971; Peterman, 1974). Nazar y cols. (1979) han caracterizado el complejo ribonucleoprotéico liberado del ribosoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al tratar la subunidad 60s con EDTA 25 mM, denominado como YL3 (Yeast, large subunit) la proteína unida al ARN 5s. Esta proteína presenta varias características comunes a las de P1 (TABLA I); de entre ellas el peso molecular semejante y la insolubilidad en soluciones de pH 4.0 a 9.0 nos hicieron pensar que tal vez P1 y YL3 se trataban de la misma proteína.

Para determinar la semejanza de P1 y YL3, analizamos a YL3 junto con P1 en un gel de poliacrilamida-SDS y en un gel bidimensional de pH 3.2 x SDS. Al analizar el comportamiento de YL3 junto a P1 en un gel unidimensional (Fig. 13) se observó que YL3 tiene un peso molecular semejante al de P1, aunque hay una ligera variación, debida tal vez a la forma en que se aisló P1.

Sorprendentemente el comportamiento electroforético de YL3 en un sistema bidimensional de pH 3.2 x SDS es el mismo que el de P1. A pesar de que la muestra de YL3 tenía una pureza del 90% - - (Nazar, comunicación personal, 1983), una parte de la proteína se queda en el origen del gel de la primera dimensión mientras otra parte penetra (Fig. 14) e incluso se logra visualizar un barrido entre ambas manchas.

Es interesante hacer notar que al igual que P1 se resuelve en dos bandas en un gel de poliacrilamida-SDS (Maizel, 1971) la proteína del complejo ribonucleoprotéico 7s, obtenido de los ribosomas de la mosca *Drosophila melanogaster* (Nazar y cols., 1981) -- también se resuelve en dos bandas en dos bandas de 37.5 y 39 kilodaltones.

Para verificar si en nuestras manos la fosfoproteína de P1 de S. cerevisiae podía ser liberada al tratar el ribosoma con EDTA 25 mM, se siguió el método descrito por Nazar y cols., (1979), pero en lugar de usar la subunidad 60s se utilizó el paquete ribosomal completo. La proteína se extrajo del complejo tratándolo con ácido acético y magnesio como se describió (secc. II.2.4.). Al -- analizar la proteína, así obtenida, en un gel de poliacrilamida- - SDS (Fig. 15) se observó que la proteína correspondiente a P1 se - enriqueció drásticamente aunque no se logró purificar ya que aparecieron otras proteínas ribosomales; esto tal vez sea debido a que se usaron ribosomas completos en lugar de usar la subunidad mayor, o que hubo degradación del ribosoma durante el aislamiento, o que hubieron subunidades que no se lograron empastillar durante la cen- trifugación.

IV. DISCUSION

En un intento para poder asignarle una posible función a la fosfoproteína ribosomal P1 de la levadura, procedimos a determinar las características químicas de esta proteína y a encontrar algún método con el cual poder obtener muestras puras, aunque a pequeña escala, para posteriormente hacer un análisis más detallado (p. ej. análisis de -- aminoácidos, producción de anticuerpos, etc). La caracterización -- química nos dió indicios de cual puede ser el papel de la fosfoproteína P1.

La fosfoproteína ribosomal P1 fué visualizada por primera vez por -- Zinker S. (Datos no publicados), al analizar en geles bidimensionales de urea a pH 3.2 x SDS muestras de ribosomas de la levadura marcada con (³⁵S)L-metionina. Encontró que hay una proteína de 40 Kd - que se queda en el origen de la primera dimensión (Fig. 3), pero que se conecta con otra proteína del interior por medio de un barrido. - Sin embargo al marcar los ribosomas con (³²P) solo se marca la proteína del origen.

En el presente trabajo encontramos que al hacer esos mismos geles -- (pH3.2 x SDS) se puede visualizar el mismo patrón tiñendo con azul - de Coomasie (Fig. 2). Tentativamente hemos denominado a la proteína del origen como P1 y a la proteína del interior como P1*. A partir de estos datos suponemos que P1 y P1* son isoformas de la misma proteína, siendo P1 la forma fosforilada y P1* la forma defosforilada.

Una de las preguntas que nos formulamos fué ¿cuál es la naturaleza - del raro comportamiento de P1/P1* en este tipo de geles?. Este comportamiento parecía análogo al de proteínas que se unen a ARN y forman un barrido en geles bidimensionales (Lambowitz y cols., 1979), y que al ser tratados, antes de la electroforesis con RNasas forman -- manchas discretas en el gel. Pensando que esto podría estar sucediendo con P1/P1* tratamos la proteína con una mezcla de RNasas u -- otros tratamientos como incubar la proteína con alcalí ó TCA con el fin de degradar al ARN; sin embargo se siguió obteniendo, en todos - los casos, el mismo patrón; es decir el barrido parece ser independiente de la presencia de ARN unido a P1 y más bien asociado a otra actividad química.

Posiblemente el patrón que se obtiene sea debido a la defosforilación de P1, lo cual concordaría con la posición en el gel bidimensional; - así la forma fosforilada sería más negativa debido a la contribución de cargas negativas por los fosfatos y por lo tanto se quedaría en el origen, a diferencia de la forma defosforilada. De ser cierta esta hipótesis, el tratamiento con fosfatasas desplazaría la forma fosforilada P1, hacia la forma defosforilada P1*.

Aunque el sistema de geles bidimensionales de urea a pH 3.2 x SDS resulta muy útil para la resolución y visualización de las dos formas de P1 los resultados en este tipo de geles no pueden ser comparados con los dos sistemas de geles bidimensionales comunmente usados para el análisis de proteínas ribosomales (Kaltschmidt y Wittman, 1970; -- Met y Bogorad, 1974). Para nuestro trabajo como para cualquier otro es, es muy útil saber si se llevó o se está llevando a cabo trabajo con la misma proteína por otros grupos de investigación. Por esto -- fué necesario determinar la identidad de P1 en los sistemas de geles bidimensionales estadar.

Usando el sistema de Mets y Bogorad (1974) urea a pH 5.0 x SDS para analizar el patrón electroforético de las proteínas ribosomales - - (Fig. 4), no logramos determinar la localización de P1, por lo cual pensamos que esta proteína no entraba al gel y por lo tanto se quedaba en el origen de la primera dimensión. Para confirmar este supuesto, analizamos muestras marcadas con (³²P) y encontramos que algo de la marca se detectaba en el origen a la altura de 40 kd (Fig. 5). Posiblemente esta sea la razón por la cual P1 no haya sido tomada en -- cuenta en trabajos descriptivos de proteínas ribosomales de levadura (Kruiswijk y cols., 1978) y por lo tanto se haya pensado que es una proteína no ribosomal. Además P1 en el amortiguador de muestra de estos geles es parcialmente insoluble debido a que su pI es cercano a - 6.5 (Serrano, 1986).

Para el aislamiento de P1 tratamos de eluir directamente del gel a la proteína. Usando su comportamiento en geles bidimensionales (urea a pH 3.2 x SDS), separamos la forma fosforilada por medio de geles urea a pH 3.2 (Fig. 8) y por medio de una segunda dimensión (Fig. 9 y 10) y evolución de geles con SDS purificamos un poco de esta proteína - -

(Fig. 11). Aunque la muestra resulta muy pura, este procedimiento es muy largo y laborioso; como veremos después a partir de una de las características químicas de P1/P1* es posible obtener grandes cantidades de ella (Fig. 15) por medio de un proceso rápido y sencillo.

Durante el transcurso de la caracterización química de P1 encontramos reportes acerca de una proteína ribosomal de la subunidad grande de - ~~Saccharomyces~~ *cerevisiae* denominada YL3 (Nazar, 1974; Nazar y Cols., 1974; 1982) que comparte varias propiedades con la fosfoproteína ribosomal P1: la localización, un peso molecular semejante y su comportamiento electroforético análogos (Tabla VI). Estas similitudes nos hicieron suponer que YL3 y P1 fueran en realidad la misma proteína. Para corroborar esta idea comparamos una muestra de YL3 donada por el Dr. Ross N. Nazar, contra nuestra proteína en un gel de poli(acrilamida)-SDS (Fig. 13) comprobando que ambas proteínas tiene un peso molecular semejante.

Otro criterio para determinar el grado de semejanza de P1 con YL3, es el comportamiento de YL3 en geles bidimensionales urea a pH 3.2 x SDS. Al procesar YL3 en estos geles, da un patrón extraordinariamente parecido al de P1 (confrontar Fig. 2 vs. Fig. 14). Además sí YL3 y P1 -- son la misma proteína el método de purificación para el complejo 7s - (YL3 y ARN 5s) liberaría a P1; al hacer este experimento se observó que en efecto, se enriquece para una proteína semejante a P1 (Fig. 15). Otro dato a favor de dicha identidad, es el que la proteína liberada en el complejo 7s está marcada con (³²P) (Zinker y cols., 1986). De esta serie de experimentos se concluye que P1 y Y L3 son la misma proteína.

Como se mencionó al principio, un problema en el aislamiento de proteínas ribosomales y estudio del papel modulador de la fosforilación sea la carencia de actividades enzimáticas que seguir o estudiar. En el caso de P1, el que esta proteína esté unida al ARN 5s da pie a toda una serie de experimentos en el estudio del papel de la fosforilación debido a que para el complejo 7s sehan postulado algunas posibles funciones como son: interactuar con el ARN de transferencia - - (Erdmann, 1976), con el ARN18s (Azad y Lane, 1973), y actividad de hidrólisis de GTP (Benson y cols, 1975). Con los datos de estos trabajos, estas funciones podrían ser estudiadas desde otro punto de vista:

TABLA VI.

Comparación de las Características Químicas de la Proteína Ribosomal YL3 con la Fosfoproteína Ribosomal P1/P1*.

FOSFOPROTEÍNA RIBOSOMAL P1/P1* ^a	PROTEÍNA RIBOSOMAL YL3 ^b
Localizada en la subunidad 60s	Localizada en la subunidad 60s
Tercera de mayor peso molecular	Tercera de mayor peso molecular
Peso molecular 40,000	Peso molecular 36,000; 37,500
Fosforilada; Proteína de recambio	Unida al ARN 5s, con actividad de GTPasa
No migra en PAGE sin SDS	Insoluble entre pH 4.0 y 9.0
Probable carácter ácido	Proteína ácida
^c Se resuelve como dos proteínas en un gel bidimensional pH 3.2xSDS	^c Se resuelve como dos proteínas en un gel bidimensional pH 3.2xSDS
^c Se libera del ribosoma con EDTA	Se libera del ribosoma con EDTA
^c Se queda en el origen del sistema bidimensional pH 5.0xSDS	Se queda en el origen del sistema de Kaltschmidt y Wittman.

^aZinker y Warner (1976).

^bNazar y cols. (1979, 1981).

^cDatos del presente trabajo.

tomando en cuenta la fosforilación de la parte proteica del complejo 7s.

Al iniciar estas investigaciones pensamos que P1 era una fosfoproteína ribosomal particular a la levadura S. cerevisiae por lo cual los resultados obtenidos no podrían ser generalizados a otros eucariotes. Sin embargo el hallazgo de su unión al ARN 5s refutó esa idea. Al tratar ribosomas o subunidades grandes con EDTA se libera un complejo ribonucleo proteico. Estos complejos se han obtenido desde procariontes como E. coli (Garrett y cols., 1981), Halobacterium cutirubum (Smith y cols, 1978), hasta ribosomas de mamíferos (Blobel, - - 1971). Estos reportes indican que P1 parece ser una proteína muy -- conservada; además sería de esperar que esté también en otros eucariotes. El que no haya sido detectada probablemente se deba a los problemas que se tienen con esta proteína para ser visualizada en geles bidimensionales, según se discutió en párrafos anteriores. Por otra parte el marcaje con (³²P) para otros organismos es menos eficiente que para levadura.

Towbin y cols. (1982) usando anticuerpos monoclonales contra la fosfoproteína ribosomal P1/P2 de hígado de rata (Tsurugi y cols., 1978) análoga a la fosfoproteína de levadura L44/L45 (Sánchez-Madrid y - - cols, 1979) han encontrado que este anticuerpo también cruza con una proteína fosforilada de 38 kd de células 3T3, proponiendo que la fosfoproteína P1 de levadura es análoga a esta proteína y a la fosfoproteína L descrita por Rankine y cols. (1979) en células de tumor -- ascítico. Estos resultados han dado lugar a una controversia, ya -- que no hay evidencia de que haya alguna relación precursor-producto entre P1 y L44/L45.

Por último, la importancia de este trabajo radica en que por primera vez se cuenta con un modelo adecuado, la asociación de P1 con el - - ARN 5s, para estudiar la fosforilación de una proteína ribosomal y - correlacionarla con su función en lo particular y la repercusión sobre la actividad ribosomal en general.

CONCLUSIONES.

Las conclusiones del presente trabajo son:

- (i) P1 se resuelve como dos proteínas en geles bidimensionales urea a pH 3.2 x SDS.
- (ii) P1 se queda en el origen del sistema bidimensional pH 5.0 x SDS.
- (iii) P1 se libera del ribosoma con EDTA.
- (iv) P1 y YL3 son la misma proteína.

Estas conclusiones junto con datos obtenidos por otros autores se encuentran integrados en la Tabla VI.

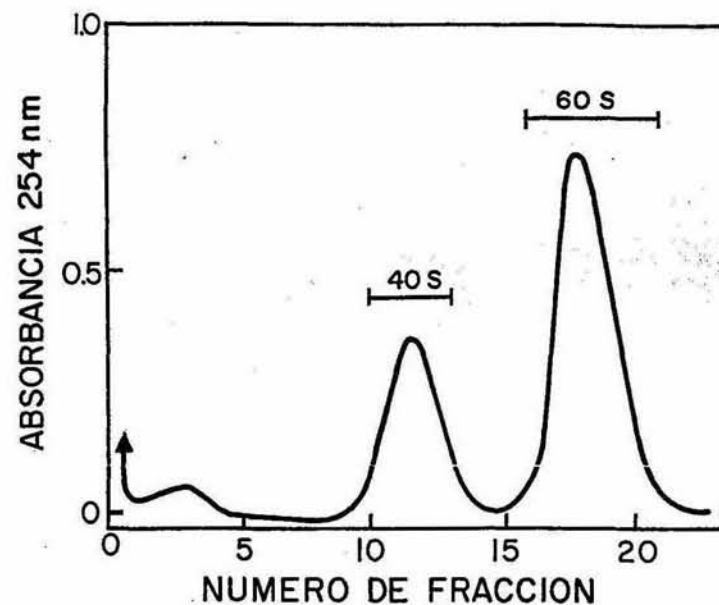


Figura 1. Separación de las Subunidades Ribosomales de la Levadura Saccharomyces cerevisiae.

Se empastillaron ribosomas de levadura, posteriormente el paquete ribosomal se resuspendió en amortiguador 10^{-5} hasta un máximo de 40 D.O. a 260 nm/ml, las subunidades se separaron a 23,000 rpm, 17 horas, en un gradiente de sacarosa 10% a 25%. El gradiente se colectó en fracciones de 1.5 ml registrándose simultáneamente y en forma continua la absorción a 260 nm.

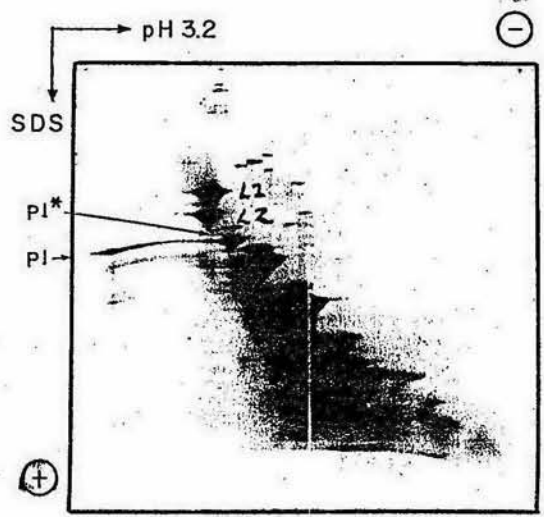


Figura 2. Patrón electroforetico de la Proteína Ribosomal de la Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en Geles Bidimensionales de poliacrilamida de pH 3.2xSDS. Se analizarón aproximadamente 300 ug de proteína ribosomal total, las proteínas se visualizarón con azul de Coomasie.

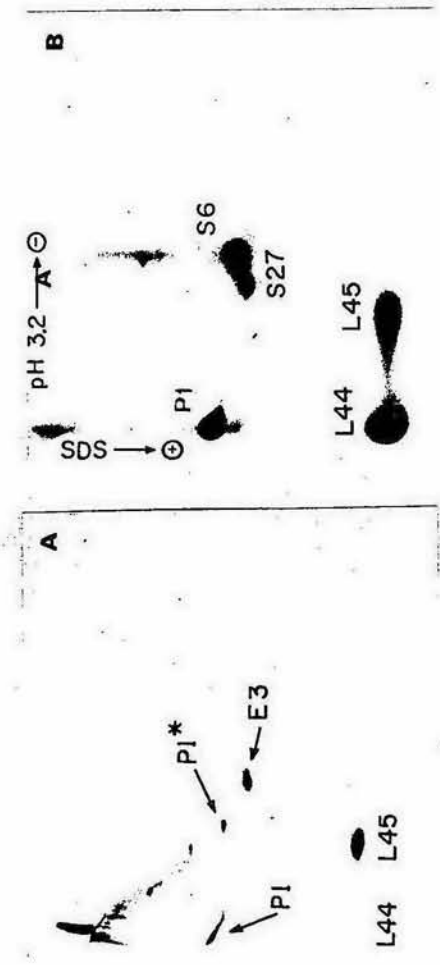


Figura 3. Comparación de las Proteínas Ribosomales de Recambio de Levadura con las Fosfoproteínas Ribosomales en Geles pH3.2xSDS.
 (a) Analisis de las proteínas de recambio al marcar con ^{35}S -metionina la cepa ts368 como se describió en Material y Métodos. (b). Analisis de las proteínas ribosomales fosforiladas in vivo de *S. cerevisiae*.

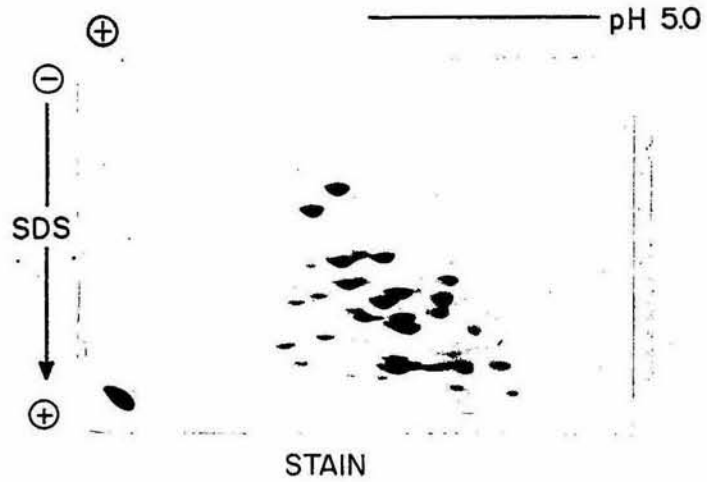


Figura 4. Patrón Electroforetico de la Proteína Ribosomal *S. cerevisiae* en Geles pH 5.0xSDS. Se utilizarón aproximadamente 300 ug de proteína ribosomal para la electroforesis. Las proteínas se visualizarón con azul de Coomasie.

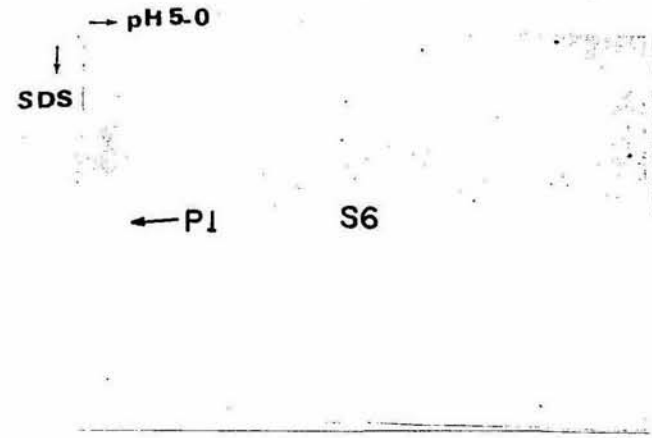


Figura 5. Análisis de las Proteínas Ribosomales Fosforiladas de Levadura en Geles pH 5.0xSDS. 30,000 cpm de proteína ribosomal marcada con ^{32}P se analizaron. En la autorradiografía se señala, además de P1, a la fosfoproteína básica s6 de la subunidad 40s.

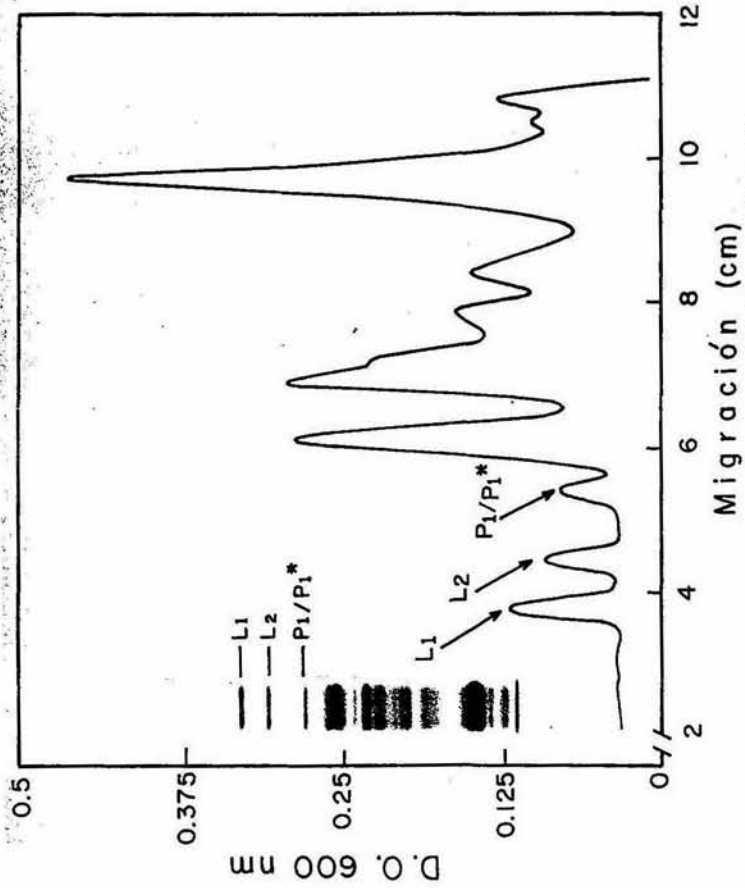


Figura 6. Análisis Densitométrico de la Proteína Ribosomal en un Gel de Poliacrilamida-SDS.

Se procesaron 150 ug de proteína ribosomal y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie. Se registro la absorción a 600 nm.

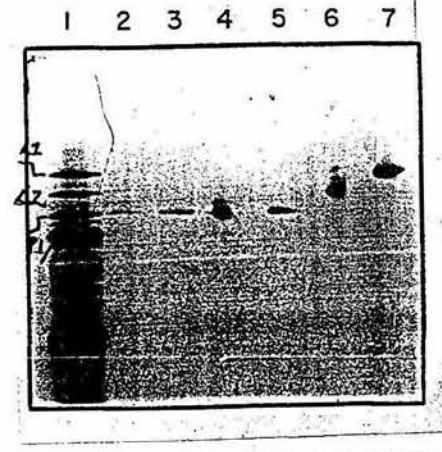


Figura 7. Electroforetograma "Tridimensional" de P1/P1*, L1 y L2. A partir de un gel bidimensional pH 3.2xSDS, preparado con 300 ug de proteína ribosomal. Se cortaron las manchas correspondientes a L1, L2, P1, P1 y parte del barrido que hay entre P1/P1, estas manchas se equilibraron como se describió en Material y Métodos; posteriormente se colocaron los trozos de gel en pocillos de un gel de poliacrilamida SDS, cubriendo con 20 ul de solución amortiguadora o el pedazo de gel. La electroforesis se llevo a cabo como se describió en Material y Métodos. (1) Proteína ribosomal total 150ug; (2) y (3) parte del barrido; (4) P1; (5) P1; (6) L2; (7) L1. Se señala la localización de L1, L2 y P1/P1.

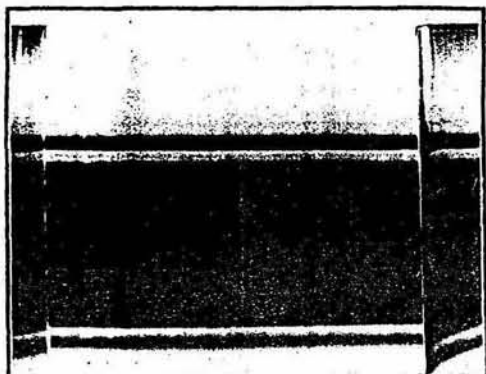


Figura 8. Separación de 10 mg de Proteína Ribosomal en un Gel Preparativo de Urea pH 3.2.

El gel se tiñó con azul de Coomasie y se cortó la parte superior (P1) para posteriormente equilibrarla y correr la segunda dimensión.

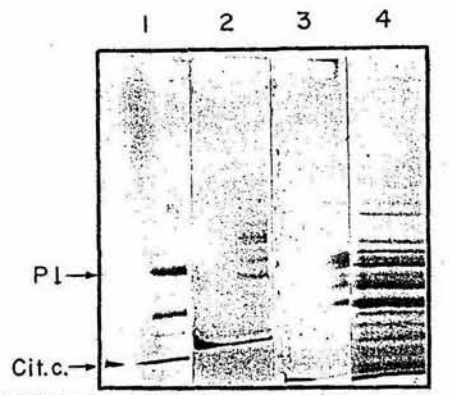


Figura 9. Segunda Dimensión del Gel Preparativo de Urea a pH 3.2

Después de cortar la parte superior, equilibrarla y correla, se tomó un borde de la segunda dimensión y se tiñó con azul de Coomasie. (1), (2) y (3) la muestra constó de 10 mg de proteína de la subunidad 60s; (4) la muestra que se procesó fué de 10 mg de proteína ribosomal total.

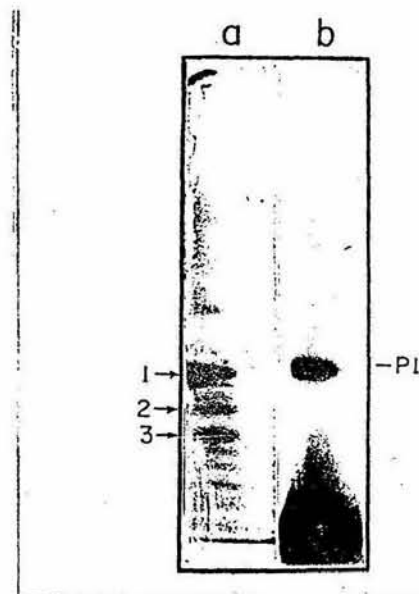


Figura 10. Segunda Dimensión del Preparativo Urea a pH 3.2xSDS de Proteína Ribosomal Marcada con ^{32}P .

Análisis de la segunda dimensión de un gel de urea a pH 3.2xSDS donde se procesó muestra marcada con ^{32}P de proteína ribosomal. (a) Patrón por tinción con azul de Coomasie; (b) Patrón obtenido al marcar con ^{32}P .



Figura 11. Aislamiento de P1.

Después de correr un gel preparativo de urea a pH 3.2 x SDS se eluyó la fracción correspondiente a P1 y posteriormente se corrió en otro gel junto con una muestra de proteína ribosomal total marcada con ^{32}P . En el primer carril se visualizan las cinco fosfoproteínas ribosomales de levadura.

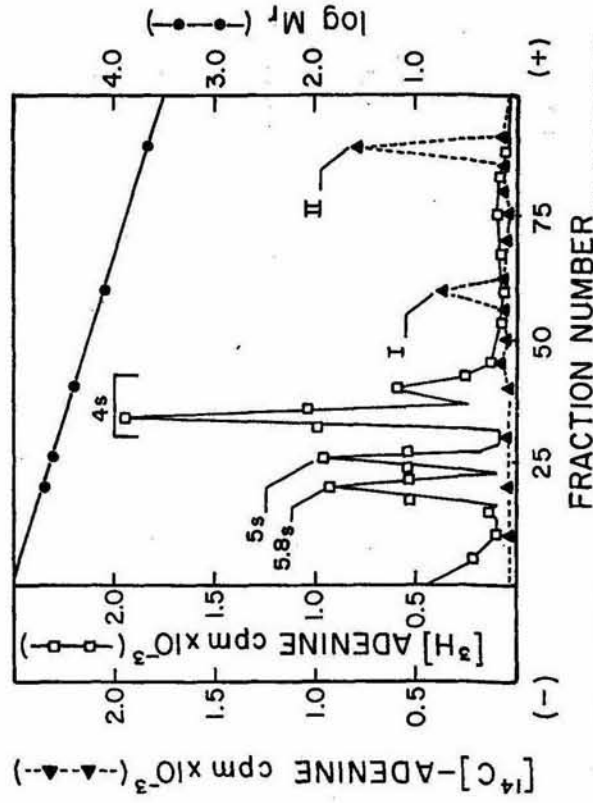


Figura 12. Análisis en Gel de Poliacrilamida del ARN Atrapado en el Borde Superior de un Gel de pH 3.2.

9,000 cpm de ^{14}C -adenina (\blacktriangle) se sometieron a electroforesis en un gel de pH 3.2 y posteriormente se caracterizó el ARN atrapado como se describe en Material y Métodos. Como marcadores internos se usaron ARNs pequeños marcados con tritio (\square). Los pesos moleculares de los marcadores son: 5.8s, 54,000 (Sy y McCarty, 1970; Udem, N. Col. 1971), 5.8s, 40,000 (Udem, N. Col. 1971).

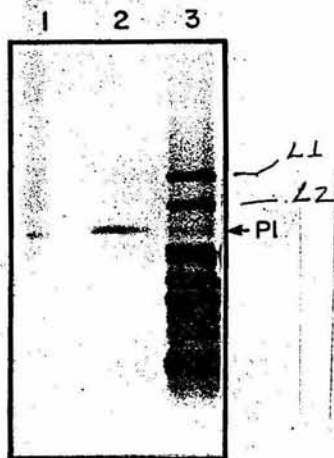


Figura 13. Comparación entre la Fosfoproteína Ribosomal P1 y la Proteína Ribosomal YL3.

Aproximadamente 5 ug de YL3 con una pureza del 90% fueron usados. (1) Proteína YL3; (2) "Tercera dimensión" de P1 (Ver Fig. 4); (3) 150 ug de proteína ribosomal. En el carril (3) se puede observar el patrón electroforetico de la proteína ribosomal total, además se puede ver que P1 corresponde a la tercera proteína de mayor peso molecular del ribosoma.

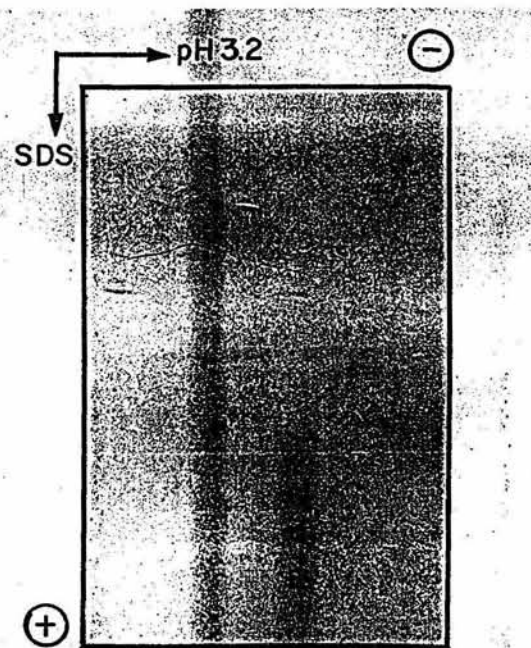


Figura 14. Análisis de la Proteína YL3 en un Sistema Bidimensional pH 3.2xSDS.

Aproximadamente 15 ug de YL3 con una pureza del 90% fueron procesados.

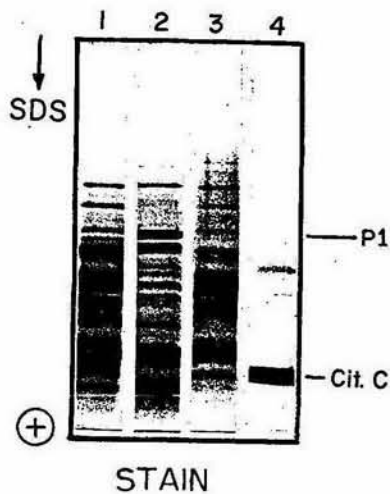


Figura 15. Análisis de las Proteínas Liberadas al Tratar el Ribosoma (80s) con 25 mM de EDTA.

- (1) 159 ug de proteína ribosomal total;
- (2) Proteínas liberadas con EDTA 25 mM;
- (3) Proteínas remanentes al tratar el ribosoma con EDTA 25 mM.
- (4) Citocromo C.

BIBLIOGRAFIA.

- Azad AA y Lane BG. (1973). *Can J Biochem*, 51: 1669.
- Becker-Ursic D y Davies J. (1976). *Biochemistry*, 15: 2289.
- Benson S, Olsnes S, y Alexander P. (1975). *Eur J Biochem* 59: 573.
- Blobel G. (1971). *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 1881.
- Bollen GH, Mager GH, Jenneskens WM, y Planta RJ. (1980). *Eur J Biochem*, 105:75.
- Caskey TC. (1980). *Trends Biochem Sci*, 5:234.
- Clark B. (1980). *Trends Biochem Sci*, 5:207.
- Erdman VA. (1976). *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 18:45.
- Eagle R. (1956). *Proc Soc Exptl Biol Med*, 91: 305.
- Faye G y Sor F. (1977). *Mol Gen Genet*, 155:27.
- Faye G, Dowthwaite S, y Noller HF. (1979). *Mol Gen Genet*, 108:101.
- Falvey AK, y Sor F. (1977). *Mol Gen Genet*, 155, 27.
- Garret RA, Dowthwaite S, y Noller HF. (1981). *Trends Biochem Sci*, 6:137
- Gorenstein C, y Warner JR. (1976). *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:547
- Grankowski N, Kudlicki W, Palen y Gasior E. (1976). *Acta Biochim Polon*, 23: 341.
- Grant PG. (1976). Mutants of ribosomes from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, USA.
- Gressner AM, y Wool IG. (1974). *Biochem Biophys Res Commun*, 60: 1482.
- Grummt F, Grummt Y y Ogata K. (1975). *Biochem Biophys Acta*, 402:230.
- Hartwell LH. (1967). *J Bacteriol* 93:1662.
- Hartwell LH, McLaughlin CS y Warner JR. (1970). *Mol Gen Genet*, 109:42.
- Hardy SJS, Kurland CG, Voynow P, y Mora G. (1969). *Biochemistry*, 8:2897.
- Hébert J, Pierre M y Loeb JE. (1972). *Eur J Biochem*, 72: 167.
- Ishiguro J. (1976). *Mol Gen Genet*, 145, 73.
- Hunt T. (1980). *Trends Biochem Sci* 5: 178.
- Kadowaki y Halvorson. (1971). *J Bacteriol*, 105: 826.
- Kaltschmidt E y Wittman HG. (1970). *Anal Biochem*, 36: 401.
- Kozak M. (1978). *Cell* 15, 1109.

Kruiswijk T y Planta RJ.(1974). Mol Biol Rep 1: 409.
Kruiswijk T, DeVey JT y Planta RJ.(1978). Biochem J 175: 213.
Krystosek A, Bitte LF, Cawthon LM, Y Kabat D.(1974). In: Ribosomes (Nomura M, Tissieres A, y Lengyel P eds). pp. 855-870. Cold Spring Harbor, New York.
Lambowitz AM, LaPolla RJ, Collins RA.(1979). J Cell Biol 82:17.
Lacroute F, Huet J y Exinger F.(1975).J Bacteriol 122, 847.
Lake JA.(1981). Investigaci3n y Ciencia (61):54.
Lastick SM y McConkey EH.(1980). Biochem Biophys Res Commun 95:917.
Leader DP.(1980). The control of phosphorylation of ribosomal proteins. In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (Cohen P. ed) Vol. 1 pp. 203-223. Elsevier North-Holland Biomedical press.
Leader DP y Coia AA.(1978). Biochem J 176: 564.
Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.(1951). J Biol Chem 193: 255.
Mets LJ y Bogorad L.(1974). Anal Biochem 57: 200.
Michel S, Traut RR y Lee JL.(1983). Mol Gen Genet 191: 251.
Maizel JV.(1971). Methods Virol 5: 179.
Nazar RN.(1979). J Biol Chem 254, 7724.
Nazar RN, Yaguchi M, Willick GE, Rullin CF y Roy.(1979). Eur J Biochem, 102: 573.
Nazar RN, Yaguchi M, y Willick GE.(1982). Can J Biochem 60: 490.
Ogata K, Terao K, y Ucholomli T.(1980). J Biochem 87: 517.
Otaka E y Osawa S.(1981). Mol Gen Genet 181: 176.
Panyim S, y Chalkey R.(1969). Arch Biochem Biophys 130: 337.
Peterman MC.(1974). Methods Enzymol 20, 433.
Rankine AD y Leader DP.(1975). FEBS Lett 52: 284.
Rubin GM.(1973). J Biol Chem 248: 3860.
Russell PJ y Wilkerson M.(1980). Exp Mycol 4, 281.
Sanchez-Madrid F y Ballesta JPG.(1979). Biochem Biophys Res Commun, 91, 643.
Sherton LC y Wool IG.(1974). J Biol Chem 249: 2258.
Smith N, Matheson AT, Yaguchi M, Willick GE, y Nazar RN.(1978). Eur J Biochem 89: 501.

Sripati CE y Warner JR.(1978). Isolationn characterization, and translation of mRNA from yeast. In: Methods en cell Biology V20 (Prescott DM, ed) Academic Press, NY pp 61.
Sy J y McCarty KS.(1970). Biochem Biophys Acta 199: 86.
Staehelin y Falvey.(1971). Methods Enzymol 20: 433.
Towbin H, Ramjue H, Kusti H, Liveran D y Gordon J.(1979). J Biol Chem 257: 12709.
Terao K, Takahashi Y y Ogata K.(1975). Biochem Biophys Acta 402: 230.
Udem SA y Warner JR.(1974). J Mol Biol 65: 227.
Warner JR.(1966). J Mol Biol 19: 383.
Warner JR y Udem SA.(1972). J Mol Biol 65: 243.
Warner JR.(1971). J Biol Chem 246, 447.
Wittmann HG.(1974). Methods Enzymol 30: 447.
Zinker S y Warner JR.(1976). J Biol Chem 251: 1799.
Zinker S.(1980). Biochem Biophys Acta 606: 76.
Vidales FJ.(1981). Estudio de la estructura y funci3n de prote3nas ribosomicas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado. Universidad Aut3noma de Madrid, Espa1a.
Wool IG y Stoffer G.(1974). In: Ribosomes (NomuraM, Tissieres A y Lengyel P eds.) pp. 417-460. Cold Spring Harbor, NY.
Wool IG.(1979). In: Ribosomes, structure, function and genetics. Chambliss G, Craven GR, Davies J, Davis K, Kahan L, Nomura M eds, University Park Press, Baltimore, USA.