



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

ESTUDIO DE LAS FOSFOPROTEINAS  
RIBOSOMALES ACIDAS DE LA  
LEVADURA Saccharomyces cerevisiae.

T E S I S  
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ESTANISLAO ESCOBAR ISLAS



LOS REYES, IZTACALA, EDO. DE MEX.

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, I.P.N. en el laboratorio del Dr. Samuel Zinker Ruzal.

La terminación de este trabajo ha sido el producto de un esfuerzo  
que tuvo como respaldo primordial el aliento y apoyo de

mis padres y

mis hermanos

a quienes, con todo cariño y respeto, dedico esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud :

al Dr. Samuel Zinker Ruzal por su asesoría y dirección,

al Q.B.P. Francisco Depardón Benitez por su valiosa coasesoría,

al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ( proyecto clave PCEX-QNA 050570 ) por haberme brindado su apoyo económico durante gran parte del desarrollo de este trabajo,

al Sr. Ignacio Cruz por la elaboración de los dibujos,

y a todas aquellas personas que con su ayuda contribuyeron a que esta tesis llegara a su terminación.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	IX
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
1.1 La Estructura del Ribosoma Procariótico	7
1.2 El Ribosoma Eucariótico	13
1.2.1 Biogénesis	
1.2.2 Estructura	
1.2.3 Función	
1.3 Proteínas Ribosomales Eucarióticas	19
1.3.1 Fosfoproteínas Ribosomales	
1.4 Proteínas Ribosomales de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	23
1.4.1 Fosfoproteínas Ribosomales Acidas de <u>S. cerevisiae</u>	
1.5 Objetivos de Trabajo	
MATERIALES	30
2.1 Organismo empleado	32

2.2	Medios de Cultivo	32
2.2.1	YPAD	
2.2.2	YNB	33
2.2.3	Medio libre de Fosfatos Inorgánicos	
2.2.4	YM-1	
2.3	Soluciones para el Fraccionamiento Celular	35
2.4	Soluciones para Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	37
2.5	Soluciones de Tinción	39
2.6	Resinas para Cromatografía de Intercambio Iónico en columna	
2.7	Isótopos Radioactivos	
	MÉTODOS	40
3.1	Esterilización de los Medios de Cultivo	
3.2	Condiciones de Crecimiento de las Células de <u>S. cerevisiae</u>	
3.3	Proteína Celular Total	41
3.4	Extracción de la Proteína Ribosomal SP 1,0 pH 8.6	42
3.5	Isoelectroenfoque de Proteínas en Geles de Poliacrilamida	
3.6	Tinción de Geles de Poliacrilamida	
3.7	Determinación de Proteína	

RESULTADOS

46

4.1 Separación de las Proteínas Acidas por  
medio de un Sistema de Cromatografía de  
Intercambio Iónico

4.1.1 Ensayo 1

4.1.2 Ensayo 2

4.1.3 Ensayo 3

4.1.4 Ensayo 4

4.1.5 Ensayo 5

4.1.6 Ensayo 6

4.1.7 Ensayo 7

4.2 Autorradiografía de las Proteínas Ribosomales  
Acidas

63

DISCUSION

70

CONCLUSIONES

75

GLOSARIO

76

BIBLIOGRAFIA

84

## ABREVIATURAS

AMP	:	Ribonucleósido 5-fosfato de adenina
ARNm	:	Acido Ribonucleico mensajero
ARNr	:	Acido Ribonucleico ribosomal
ARNt	:	Acido Ribonucleico de transferencia
°C	:	Grados Centígrados
CMC	:	Carboxi Metil Celulosa
D	:	Daltones
DEAE	:	Dietil Amino Etil
D. O.	:	Densidad Optica
EF	:	Factor de Elongación
g	:	gramos
GTP	:	Guanosin 5-Trifosfato
HEPES	:	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanol sulfónico.
IEE	:	Isoelectroenfoque
IF	:	Factor de Iniciación
M	:	Molar
mA	:	miliampere
nm	:	nanómetro
PACME	:	Proteínas eluidas a través de la columna de CMC

PADEAE	:	Proteínas eluidas a través de la columna de DEAE
PCT	:	Proteína Celular Total
PI	:	Punto Isoeléctrico
PM	:	Peso Molecular
PMSF	:	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	:	revoluciones por minuto
SDS	:	Sodio duodecil sulfato
SP 1.0	:	extracto proteínico obtenido por precipitación de los ribosomas con 50 % de etanol en presencia de $\text{NH}_4\text{Cl}$ 1.0 M
TCA	:	Acido tricloracético
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina
Tris	:	Tris-(hidroximetil)aminometano
U.K.	:	Unidades Klett
V	:	Voltios

## FIGURAS

Figura No.		Página
1.	Organización celular de la levadura <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	4
2.	Ciclo Reproductivo de la levadura <u>S. cerevisiae</u> .	6
3.	Modelo Tridimensional del ribosoma de <u>E. coli</u> .	10
4.	Esquema de la Biosíntesis Proteínica en organismos Procariotas.	12
5.	Esquema de la Biosíntesis Ribosomal en células Eucariotas.	15
6.	Modelo Tridimensional del Ribosoma Eucariótico de Hígado de Rata.	17
7.	Esquema del mecanismo de Síntesis Proteínica en Ribosomas Eucarióticos	18
8.	Proteínas Ribosomales Totales de <u>S. cerevisiae</u> .	24
9.	Esquema del Proceso de Aislamiento de las Proteínas Ácidas L44', L44 y L45 del ribosoma de <u>S. cerevisiae</u> .	45
10.	Perfil del Registro de las Proteínas Ácidas obtenidas en columna de QMC a pH de 4,5	47
11.	Perfil registrado de las Proteínas Ácidas eluidas en columna de DEAE con pH de 4,5 y gradiente de Acetato de amonio de 50 a 200 mM. Ensayo 1.	49

Figura No.	Página
12. Análisis de la fracción PADEA mediante IEE. Ensayo 1.	50
13. Registro de filtración en columna de DEAE de una fracción PACME eluída con un gradiente mixto de fuerza iónica creciente y pH decreciente. Ensayo 2.	52
14. Análisis de la fracción PADEAE mediante IEE. Ensayo 2.	53
15. Registro de la filtración en columna de una fracción PACME eluída con un gradiente mixto formado por Acetato de amonio de 0 a 200 mM y un pH de 6.0 a 4.5 ; ensayo 3.	54
16. Filtración en columna de DEAE de las fracciones PADEAE mostradas en la figura 15.	56
17. Análisis en columna de DEAE de una fracción PACME eluída con un gradiente mixto formado por Acetato de amonio ( 5-400 mM ) y un pH de 6.0 a 4.5 ; ensayo 4.	57
18. Análisis de la fracción PADEAE mediante IEE. Ensayo 4.	58
19. Perfil del Registro de una fracción PACME eluída en columna de DEAE con gradiente de Acetato de amonio ( 5-600 mM ) y pH ( 6.0-4.5 ). Ensayo 5.	60
20. Registro de una fracción PACME eluída bajo las mismas condiciones que el ensayo 5.	61
21. Análisis de una muestra PACME eluída con un gradiente formado con Acetato de amonio ( 5-400 mM ) y un pH de 6.0 a 4.5 ; ensayo 6.	62

Figura No.	Página
22. Análisis de la fracción PADEAE mediante IEE. Ensayo 6.	64
23. Fraccionamiento de una muestra PACME en columna DEAE bajo las mismas condiciones que el ensayo 6. Ensayo 7.	65
24. Análisis electroforético de la fracción PADEAE mediante IEE. Ensayo 7.	66
25. Perfil del Registro de una muestra de Proteína SP 1.0 pH 8.6 marcada con $^{32}\text{P}$ eluída en columna CMC a pH 4.5	68
26. Patrón electroforético de las proteínas L44 <sup>1</sup> , L44 y L45 marcadas con $^{32}\text{P}$ mediante IEE.	69
27. Estructura química de la resina CMC.	71
28. Estructura química de la resina DEAE.	71

## TABLAS

Tabla No.		Página
1.-	Componentes del Ribosoma Procariota en <u>E. coli</u> .	11
2.-	Propiedades generales del Ribosoma Eucariótico de hígado de rata.	14
3.-	Factores de Iniciación Eucarióticos de Reticulocitos de Conejo.	20
4.-	Subunidades componentes del Factor de Iniciación eIF-2.	21
5.-	Composición de Aminoácidos de las proteínas L44', L44 y L45.	27

**Faltan páginas**

**N° 1-13**

TABLA 2. ALGUNAS PROPIEDADES GENERALES DEL RIBOSOMA EUCARIOTICO  
DE HIGADO DE RATA.

	RIBOSOMA	SUBUNIDAD PEQUEÑA	SUBUNIDAD GRANDE
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	80 s	40 s	60 s
MASA ( DALTONES )	4 420 000	1 400 000	2 820 000
ARN :			
MAYOR		18 s = 1 900 bases	1) 28 s = 4 700 bases
MENOR			2) 5.8 s = 160 bases
			3) 5 s = 120 bases
MASA		700 000 <sup>a</sup>	1) 1 700 000 <sup>a</sup>
			2) 51 000 <sup>b</sup>
			3) 39 000 <sup>b</sup>
PROPORCION	60 %	50 %	65 %
PROTEINAS :			
NUMERO	82	33	49
MASA		700 000	1 000 000
PROPORCION	40 %	50 %	35 %

REFERENCIAS : 33,

a ; 34,35

b ; 36,37.

b. Pesos moleculares calculados a partir de sus secuencias.

La síntesis del ARN 5 s tiene lugar fuera del nucléolo y las proteínas ribosomales se sintetizan en el citoplasma. Se sabe que algunas proteínas ribosomales migran al nucléolo y se ensamblan al precursor inmediatamente después de su transcripción ( 38,39 ), la unión de las primeras proteínas facilita la unión de las demás. Mediante el análisis de geles bidimensionales se ha demostrado que el precursor nucleolar contiene aproximadamente 30 proteínas de la subunidad ribosomal mayor ( 40 ).

El proceso de la síntesis del ribosoma en eucariotes se esquematiza en la siguiente figura:

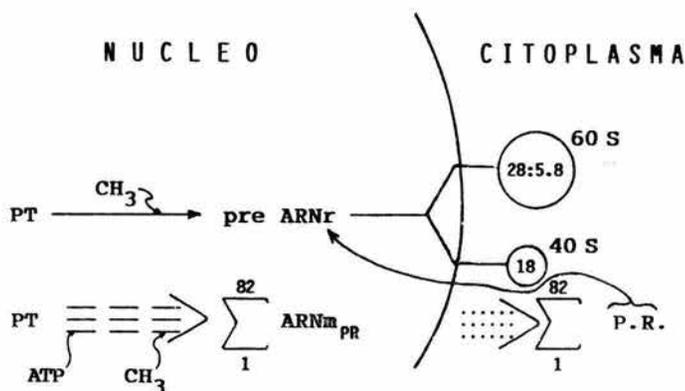


Figura 5. Representación esquemática de la biosíntesis del ribosoma en una célula eucariótica ( 41 ).

PT Precursor Transcrito

PR Proteínas Ribosomales.



La síntesis del ARN 5 s tiene lugar fuera del nucléolo y las proteínas ribosomales se sintetizan en el citoplasma. Se sabe que algunas proteínas ribosomales migran al nucléolo y se ensamblan al precursor inmediatamente después de su transcripción ( 38,39 ), la unión de las primeras proteínas facilita la unión de las demás. Mediante el análisis de geles bidimensionales se ha demostrado que el precursor nucleolar contiene aproximadamente 30 proteínas de la subunidad ribosomal mayor ( 40 ).

El proceso de la síntesis del ribosoma en eucariotes se esquematiza en la siguiente figura:

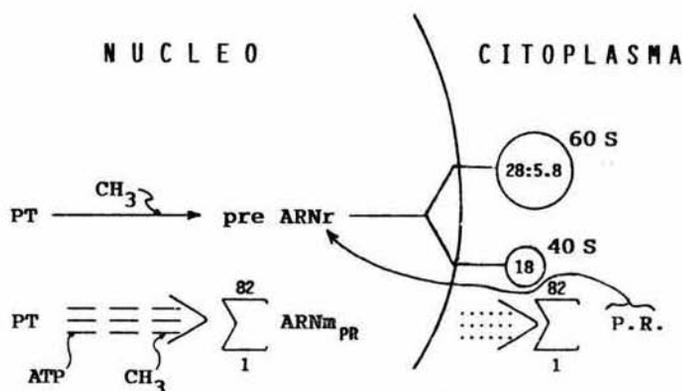


Figura 5. Representación esquemática de la biosíntesis del ribosoma en una célula eucariótica ( 41 ).

PT Precursor Transcrito  
PR Proteínas Ribosomales.

### 1.2.2 Estructura.

Los estudios realizados sobre el ribosoma eucariótico ( de Artemia salina, embrión de pollo, hígado de rata y reticulocitos de cone - jo ) y procariótico ( de E. coli ) mediante microscopía electrónica ( 42,45 ) han permitido observar una gran similitud en cuanto a su morfología a pesar de sus diferencias relacionadas con el tamaño y proporción del ARN.

En el ribosoma de hígado de rata se observa a la subunidad pe - queña como un elipsoide alargado ligeramente curvado y aplanado cuyas dimensiones son  $230 \text{ \AA} \times 140 \text{ \AA} \times 115 \text{ \AA}$ , pudiéndose apreciar una ranura a  $80 \text{ \AA}$  de un extremo de la subpartícula que la divide en dos partes. La subunidad mayor se percibe como una imagen redondeada de  $220 \text{ \AA}$  aproxima - damente, o bién, como una forma asimétrica triangular con un extremo pun - tal y el otro convexo. Presenta una hendidura a  $80 \text{ \AA}$  del extremo puntal ( figura 6 ).

### 1.2.3 Función.

La función esencial del ribosoma eucariótico consiste, al igual que el ribosoma procariótico, en sintetizar proteínas de acuerdo con las instrucciones del ARNm mediante una serie de etapas que implican a dife - rentes componentes celulares. A pesar de la dificultad que presenta el estudio del mecanismo de síntesis proteínica debido al mayor tamaño y nú - mero de las proteínas ribosomales así como de los ácidos nucleicos, se sabe bastante sobre este proceso, si bien algunos detalles a nivel de reac - ciones intermedias, permanecen sin aclararse. La traducción del ARNm a proteínas por el ribosoma comprende tres etapas denominadas Iniciación, Elongación y Terminación ( figura 7 ).



### 1.2.2 Estructura.

Los estudios realizados sobre el ribosoma eucariótico ( de Artemia salina, embrión de pollo, hígado de rata y reticulocitos de cone - jo ) y procariótico ( de E. coli ) mediante microscopía electrónica ( 42,45 ) han permitido observar una gran similitud en cuanto a su morfología a pesar de sus diferencias relacionadas con el tamaño y proporción del ARN.

En el ribosoma de hígado de rata se observa a la subunidad pe -- queña como un elipsoide alargado ligeramente curvado y aplanado cuyas dimensiones son  $230 \text{ \AA} \times 140 \text{ \AA} \times 115 \text{ \AA}$ , pudiéndose apreciar una ranura a  $80 \text{ \AA}$  de un extremo de la subpartícula que la divide en dos partes. La subunidad mayor se percibe como una imagen redondeada de  $220 \text{ \AA}$  aproximadamente, o bien, como una forma asimétrica triangular con un extremo pun - tal y el otro convexo. Presenta una hendidura a  $80 \text{ \AA}$  del extremo puntal ( figura 6 ).

### 1.2.3 Función.

La función esencial del ribosoma eucariótico consiste, al igual que el ribosoma procariótico, en sintetizar proteínas de acuerdo con las instrucciones del ARNm mediante una serie de etapas que implican a dife - rentes componentes celulares. A pesar de la dificultad que presenta el estudio del mecanismo de síntesis proteínica debido al mayor tamaño y nú - mero de las proteínas ribosomales así como de los ácidos nucleicos, se sabe bastante sobre este proceso, si bien algunos detalles a nivel de reac - ciones intermedias, permanecen sin aclararse. La traducción del ARNm a proteínas por el ribosoma comprende tres etapas denominadas Iniciación, Elongación y Terminación ( figura 7 ).

Figura 6. Modelo tridimensional del ribosoma eucariótico de hígado de rata. La subunidad pequeña esta señalada por la letra S y la subunidad grande por la letra L.

Según J. A. Lake, D.D. Sabatini y Y. Nomura ( 43 ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Modelo tridimensional del ribosoma eucariótico de hígado de rata. La subunidad pequeña esta señalada por la letra S y la subunidad grande por la letra L.

Según J. A. Lake, D.D. Sabatini y Y. Nomura ( 43 ).

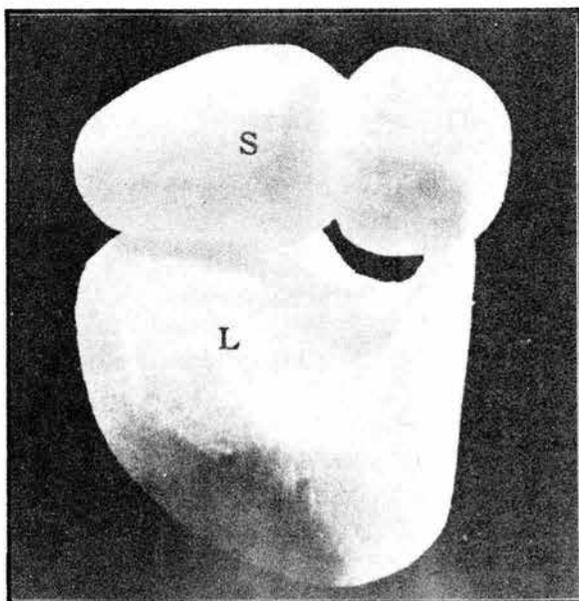


Figura No 6

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

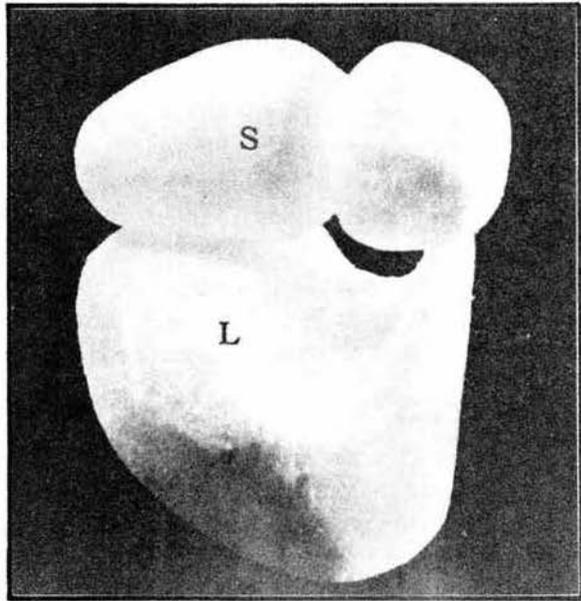


Figura No 6

Las principales características del sistema eucariótico que lo diferencian del procariótico son las siguientes :

- 1.- Los ribosomas presentan proteínas con un mayor P. M. y ácidos nucleicos con coeficiente de sedimentación más elevado.
- 2.- Intervienen un mayor número de factores de iniciación.
- 3.- El metionil-ARNt no está formilado.
- 4.- Existe un residuo nucleosídico llamado "cap" que está presente en la mayoría de los ARNm eucarióticos.
- 5.- Los ARNm son monocistrónicos.

Se ha descubierto, hasta ahora, un total de 8 factores de iniciación en reticulocitos de conejo y uno, tanto en germen de trigo como en extracto de hígado de ternera ( Tablas 3 y 4 ), de los cuales dos constan de varias cadenas polipeptídicas mientras que los restantes están formados por una sola cadena ( 30-33 ). Los resultados obtenidos, indican que los factores eIF-2, eIF-3 y eIF-5 son absolutamente necesarios para la formación del complejo de iniciación 80 S. En tanto que los factores eIF-1, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C y, probablemente, eIF-4D elevan dos o tres veces el estímulo para la formación del complejo. Las etapas de elongación y terminación involucran factores que, funcionalmente, son similares a los que actúan en el sistema procariótico de síntesis proteínica.

### 1.3 Proteínas Ribosomales Eucarióticas.

Numerosos grupos de trabajo se han avocado al estudio de las proteínas ribosomales eucarióticas, principalmente en hígado de rata, con el fin de dilucidar primeramente, su aislamiento y purificación ( 64 ) y posteriormente su caracterización ( 52-63 ). El número y pesos moleculares se ha determinado mediante técnicas de electroforesis en geles de



Las principales características del sistema eucariótico que lo diferencian del procariótico son las siguientes :

- 1.- Los ribosomas presentan proteínas con un mayor P. M. y ácidos nucleicos con coeficiente de sedimentación más elevado.
- 2.- Intervienen un mayor número de factores de iniciación.
- 3.- El metionil-ARNt no está formilado.
- 4.- Existe un residuo nucleosídico llamado "cap" que está presente en la mayoría de los ARNm eucarióticos.
- 5.- Los ARNm son monocistrónicos.

Se ha descubierto, hasta ahora, un total de 8 factores de iniciación en reticulocitos de conejo y uno, tanto en germen de trigo como en extracto de hígado de ternera ( Tablas 3 y 4 ), de los cuales dos constan de varias cadenas polipeptídicas mientras que los restantes están formados por una sola cadena ( 30-33 ). Los resultados obtenidos, indican que los factores eIF-2, eIF-3 y eIF-5 son absolutamente necesarios para la formación del complejo de iniciación 80 S. En tanto que los factores eIF-1, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C y, probablemente, eIF-4D elevan dos o tres veces el estímulo para la formación del complejo. Las etapas de elongación y terminación involucran factores que, funcionalmente, son similares a los que actúan en el sistema procariótico de síntesis proteínica.

### 1.3 Proteínas Ribosomales Eucarióticas.

Numerosos grupos de trabajo se han avocado al estudio de las proteínas ribosomales eucarióticas, principalmente en hígado de rata, con el fin de dilucidar primeramente, su aislamiento y purificación ( 64 ) y posteriormente su caracterización ( 52-63 ). El número y pesos moleculares se ha determinado mediante técnicas de electroforesis en geles de

TABLA 3. FACTORES DE INICIACION EUCARIOTICOS DE RETICULOCITOS DE CONEJO.

FACTOR	PESO MOLECULAR	ESTRUCTURA	FUNCION
eIF-1	15 000	1 polipéptido	estimula la función del eIF-3.
eIF-2	128 000	3 polipéptidos	se une al Met-ARnt en presencia de GTP.
eIF-3	500 000	varios polipéptidos	une el complejo trenario 40 s al ARNm.
eIF-4A	50 000	1 polipéptido	estimula la función del eIF-3 y une ATP ( 46 ).
eIF-4B	80 000	1 polipéptido	estimula la función del eIF-3.
eIF-4C	17 000	1 polipéptido	une la subunidad 60 s con el complejo Met-ARnt-40 s.
eIF-4D	=====	1 polipéptido	desconocida
eIF-5	de 125 000 a 160 000	1 polipéptido	libera el eIF-2 y el eIF-3 del complejo de iniciación 40 s ( 47,48,49 ).
eIF-6	23 000	1 polipéptido	evita la unión de las subunidades 40s-60 s en gérmen de trigo e hígado de ternera ( 50,51 ).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TABLA 3. FACTORES DE INICIACION EUCARIOTICOS DE RETICULOCITOS DE CONEJO.

FACTOR	PESO MOLECULAR	ESTRUCTURA	FUNCION
eIF-1	15 000	1 polipéptido	estimula la función del eIF-3.
eIF-2	128 000	3 polipéptidos	se une al Met-ARnt en presencia de GTP.
eIF-3	500 000	varios polipéptidos	une el complejo trenario 40 s al ARNm.
eIF-4A	50 000	1 polipéptido	estimula la función del eIF-3 y une ATP ( 46 ).
eIF-4B	80 000	1 polipéptido	estimula la función del eIF-3.
eIF-4C	17 000	1 polipéptido	une la subunidad 60 s con el complejo Met-ARnt-40 s.
eIF-4D	=====	1 polipéptido	desconocida
eIF-5	de 125 000 a 160 000	1 polipéptido	libera el eIF-2 y el eIF-3 del complejo de iniciación 40 s ( 47,48,49 ).
eIF-6	23 000	1 polipéptido	evita la unión de las subunidades 40s-60 s en gérmen de trigo e hígado de ternera ( 50,51 ).

poliacrilamida bidimensionales ( 65,66,67 ). El procedimiento para la purificación de las proteínas ribosomales se sirvió de aquél empleado para aislar las proteínas ribosómicas procarióticas ( 68-71 ), a grandes rasgos es como sigue ; separación de la partícula 80 s en sus subunidades, extracción de las proteínas de cada subunidad con ácido acético al 67 % en  $MgCl_2$  100 mM ó bien LiCl 2 M y urea 4 M. Las proteínas ribosomales ácidas se separan de las básicas por medio de cromatografía de intercambio iónico en CMC o en fosfocelulosa, las proteínas ácidas, en DEAE celulosa ( 72-77 ), de esta manera se han separado 33 proteínas de la subunidad pequeña y 49 de la mayor.

TABLA 4. SUBUNIDADES COMPONENTES DEL FACTOR DE INICIACION  
eIF-2.

SUBUNIDAD	MASA	FUNCION
$\alpha$	35 000	se une al GDP, esta unión es controlada por fosforilación.
$\beta$	38 000	posiblemente presenta actividad recicladora.
$\gamma$	55 000	se une al Met-ARNt y al ARNm.

El peso molecular de las proteínas purificadas ha sido determinado por medio de electroforesis en geles de SDS y va de 11 200 hasta 31 100 para la subunidad menor con un promedio de 21 400, en tanto que para la subunidad 60 s, el PM mínimo es de 11 500 y un máximo de 41 800 con un promedio de 21 200 ( 78 ). Es probable que estos valores sean sólo una aproximación de los valores reales debido a que se encuentran influenciados por el método analítico empleado así como las propiedades físicas de la proteína ( 73 ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

poliacrilamida bidimensionales ( 65,66,67 ). El procedimiento para la purificación de las proteínas ribosomales se sirvió de aquél empleado para aislar las proteínas ribosómicas procarióticas ( 68-71 ), a grandes rasgos es como sigue ; separación de la partícula 80 s en sus subunidades, extracción de las proteínas de cada subunidad con ácido acético al 67 % en  $MgCl_2$  100 mM ó bien LiCl 2 M y urea 4 M. Las proteínas ribosomales ácidas se separan de las básicas por medio de cromatografía de intercambio iónico en CMC o en fosfocelulosa, las proteínas ácidas, en DEAE celulosa ( 72-77 ), de esta manera se han separado 33 proteínas de la subunidad pequeña y 49 de la mayor.

TABLA 4. SUBUNIDADES COMPONENTES DEL FACTOR DE INICIACION  
eIF-2.

SUBUNIDAD	MASA	FUNCION
$\alpha$	35 000	se une al GDP, esta unión es controlada por fosforilación.
$\beta$	38 000	posiblemente presenta actividad recicladora.
$\gamma$	55 000	se une al Met-ARNt y al ARNm.

El peso molecular de las proteínas purificadas ha sido determinado por medio de electroforesis en geles de SDS y va de 11 200 hasta 31 100 para la subunidad menor con un promedio de 21 400, en tanto que para la subunidad 60 s, el PM mínimo es de 11 500 y un máximo de 41 800 con un promedio de 21 200 ( 78 ). Es probable que estos valores sean sólo una aproximación de los valores reales debido a que se encuentran influenciados por el método analítico empleado así como las propiedades físicas de la proteína ( 73 ).

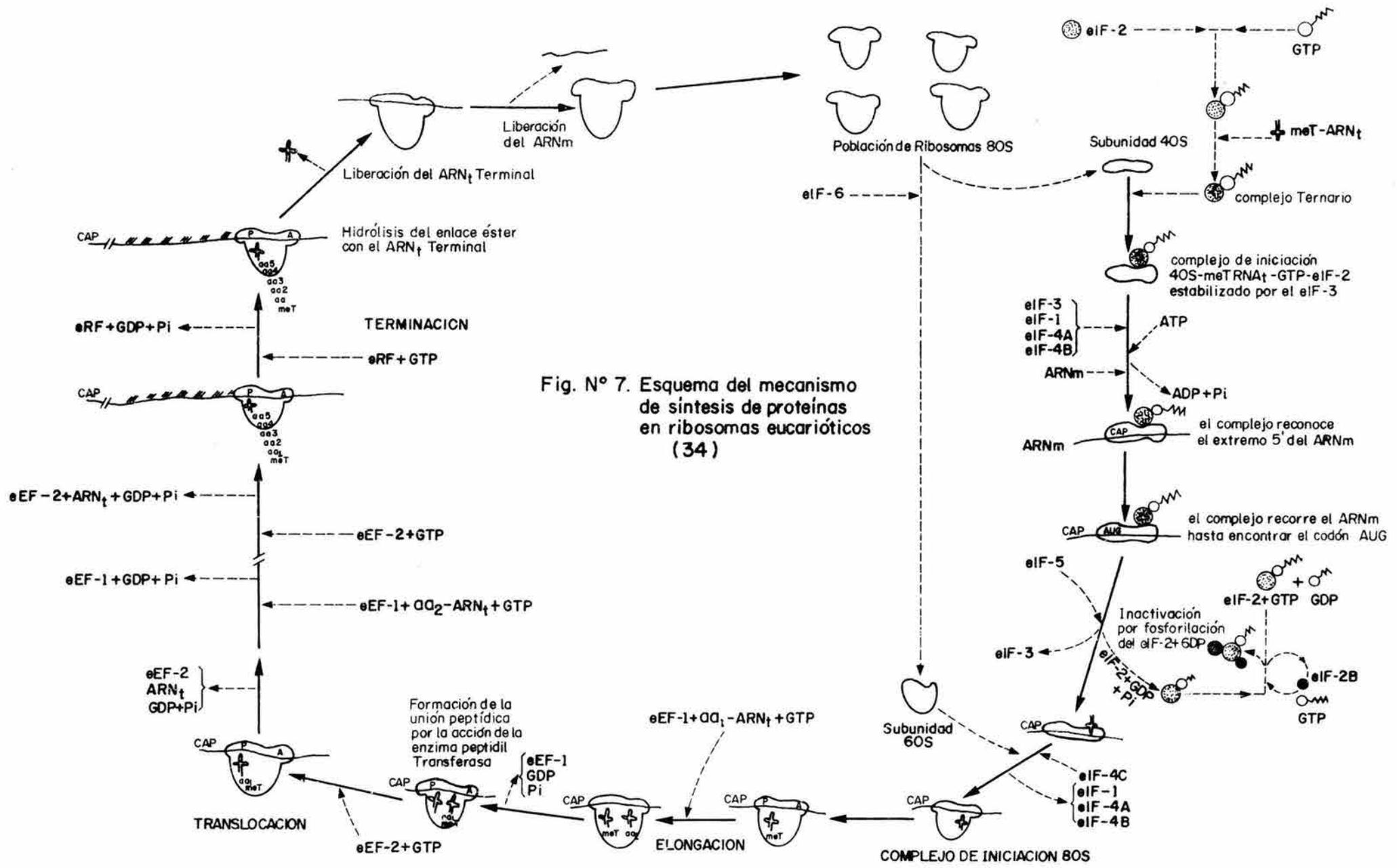
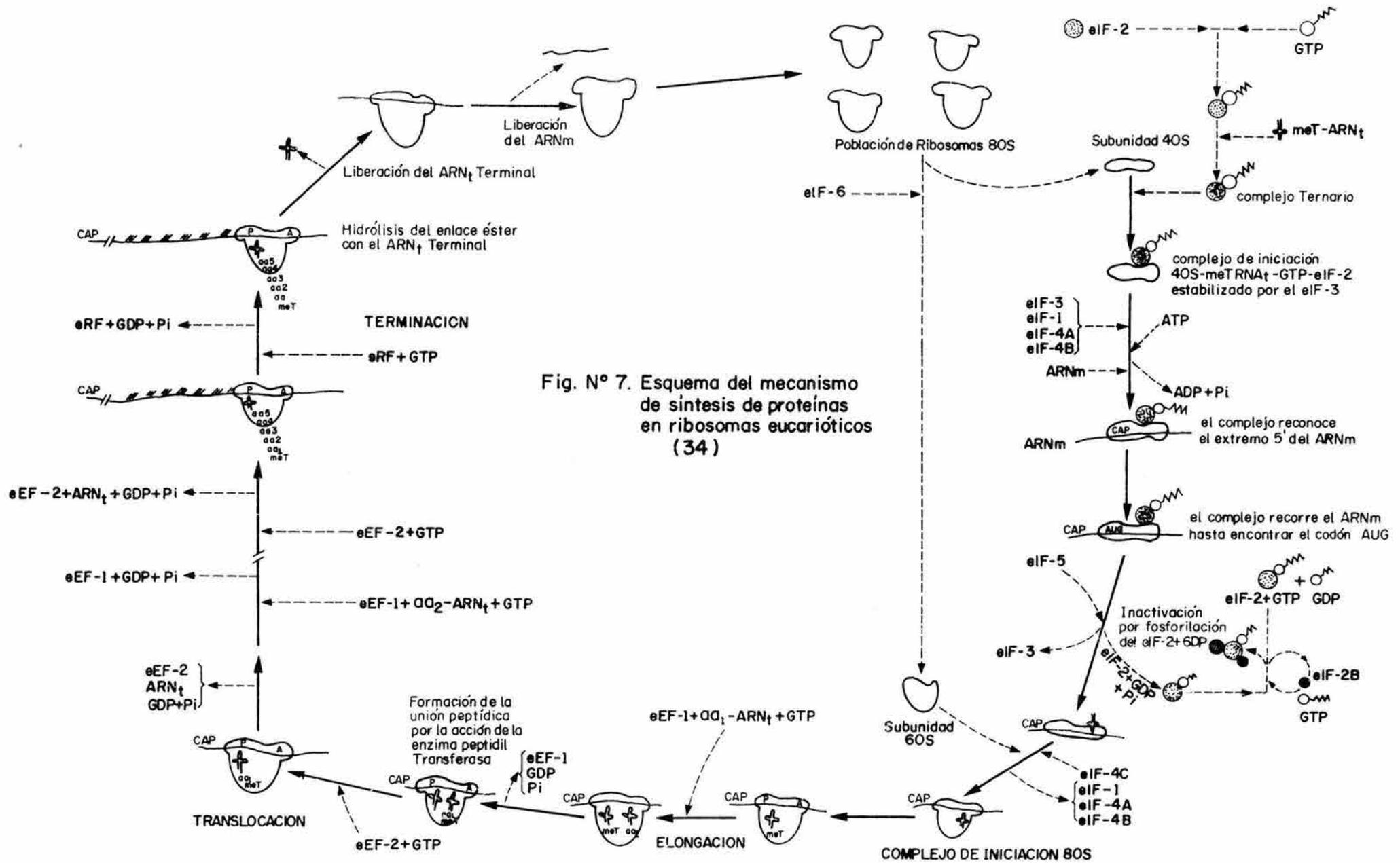


Fig. N° 7. Esquema del mecanismo de síntesis de proteínas en ribosomas eucarióticos (34)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

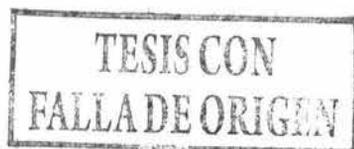


El estudio de las proteínas ribosómicas ha tropezado con diversos problemas, como el causado por la modificación química que puede ser fisiológica como la metilación, acetilación o fosforilación o bien adventicia producida durante el proceso de aislamiento ( la acción de una enzima específica o una carbamilación ). Generalmente se considera que una proteína ribosomal es única después de considerar su secuencia y composición de aminoácidos, su peso molecular y su comportamiento electroforético.

### 1.3.1 Fosfoproteínas Ribosomales.

En 1970, Kabat ( 79 ) y Loeb ( 80 ) descubrieron que algunas proteínas ribosomales están fosforiladas. Más tarde, se averiguó que ésta se puede producir "in vitro" por proteincinasas asociadas al ribosoma o por proteincinasas exógenas. Pensar que las fosfoproteínas puedan desempeñar una función esencial sobre la síntesis de proteínas, ha sido una idea muy atrayente, sin embargo, aunque se ha encontrado que la fosforilación está condicionada por ciertos estímulos fisiológicos como hormonas, AMPc, infecciones virales, cambio de las condiciones del crecimiento de las células en cultivo, etc. ( 78 ), aún no se ha podido detectar cambio alguno en la actividad ribosomal cuando se fosforilan "in vitro" ( 81 ), así mismo, se ha reportado que los ribosomas traducen al ARN mensajero aún en estado desfosforilado ( 82 ). Lo anterior sugiere que esta fosforilación no produce cambios drásticos en la actividad ribosomal sino sólo modificaciones sutiles que tienen que ver con una modulación más fina de su complicado aparato sintético o alguna otra función no ensayada "in vitro" todavía. Por otra parte, se sabe que algunos factores de iniciación se fosforilan ( 83 ).

Es sorprendente que sólo una pequeña fracción de las proteínas ribosomales esté fosforilada y que ésta se haya conservado evolutivamente



El estudio de las proteínas ribosómicas ha tropezado con diversos problemas, como el causado por la modificación química que puede ser fisiológica como la metilación, acetilación o fosforilación o bien adventicia producida durante el proceso de aislamiento ( la acción de una enzima específica o una carbamilación ). Generalmente se considera que una proteína ribosomal es única después de considerar su secuencia y composición de aminoácidos, su peso molecular y su comportamiento electroforético.

### 1.3.1 Fosfoproteínas Ribosomales.

En 1970, Kabat ( 79 ) y Loeb ( 80 ) descubrieron que algunas proteínas ribosomales están fosforiladas. Más tarde, se averiguó que ésta se puede producir "in vitro" por proteincinasas asociadas al ribosoma o por proteincinasas exógenas. Pensar que las fosfoproteínas puedan desempeñar una función esencial sobre la síntesis de proteínas, ha sido una idea muy atrayente, sin embargo, aunque se ha encontrado que la fosforilación está condicionada por ciertos estímulos fisiológicos como hormonas, AMPc, infecciones virales, cambio de las condiciones del crecimiento de las células en cultivo, etc. ( 78 ), aún no se ha podido detectar cambio alguno en la actividad ribosomal cuando se fosforilan "in vitro" ( 81 ), así mismo, se ha reportado que los ribosomas traducen al ARN mensajero aún en estado desfosforilado ( 82 ). Lo anterior sugiere que esta fosforilación no produce cambios drásticos en la actividad ribosomal sino sólo modificaciones sutiles que tienen que ver con una modulación más fina de su complicado aparato sintético o alguna otra función no ensayada "in vitro" todavía. Por otra parte, se sabe que algunos factores de iniciación se fosforilan ( 83 ).

Es sorprendente que sólo una pequeña fracción de las proteínas ribosomales esté fosforilada y que ésta se haya conservado evolutivamente

hablando, en organismos como hongos ( 84,85 ), levaduras ( 86, 87 ), protozoarios ( 88 ), Artemia salina ( 89,90 ), plantas como Lemna minor ( 91 ), en células de hígado de rata ( 92 ) y en células HeLa ( 93 ). Es muy probable que esto sea un reflejo de la importancia del papel que desempeñan estas proteínas fosforiladas en la función del ribosoma.

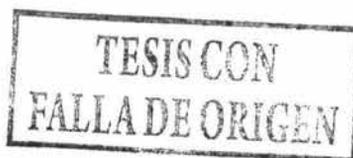
#### 1.4 Proteínas Ribosomales de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

Las proteínas ribosomales se han analizado mediante sistemas de geles bidimensionales urea ácida-urea básica ( 67 ) y urea ácida-SDS ( 94-96 ) que han permitido separar entre 70 y 80 proteínas,  $30 \pm 5$  de la subunidad 40 s y  $40 \pm 5$  de la subunidad 60 s ( figura 8 ). Estas proteínas migran hacia el cátodo a un pH de 8.6 y la mayoría presenta un carácter fuertemente básico (  $PI > 8.6$  ). Su aislamiento ha tenido que sortear diversos problemas debido a su número tan elevado, su insolubilidad en ausencia de agentes desnaturalizantes, a cierta agregación inespecífica y un peso molecular muy semejante. Todo esto complicó la obtención de proteínas puras en cantidad suficiente ( 98 ).

##### 1.4.1 Fosfoproteínas Ribosomales Acidas.

Dentro de las proteínas ribosomales de S. cerevisiae, se encuentran algunas que son ácidas, migran hacia el ánodo en la primera dimensión de un gel en un sistema electroforético bidimensional pH 8.6 X pH 4.5 ( 99 ) y presentan características distintivas como son las siguientes :

- 1.- presentan un PI entre 3 y 5



hablando, en organismos como hongos ( 84,85 ), levaduras ( 86, 87 ), protozoarios ( 88 ), Artemia salina ( 89,90 ), plantas como Lemna minor ( 91 ), en células de hígado de rata ( 92 ) y en células HeLa ( 93 ). Es muy probable que esto sea un reflejo de la importancia del papel que desempeñan estas proteínas fosforiladas en la función del ribosoma.

#### 1.4 Proteínas Ribosomales de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

Las proteínas ribosomales se han analizado mediante sistemas de geles bidimensionales urea ácida-urea básica ( 67 ) y urea ácida-SDS ( 94-96 ) que han permitido separar entre 70 y 80 proteínas,  $30 \pm 5$  de la subunidad 40 s y  $40 \pm 5$  de la subunidad 60 s ( figura 8 ). Estas proteínas migran hacia el cátodo a un pH de 8.6 y la mayoría presenta un carácter fuertemente básico (  $PI > 8.6$  ). Su aislamiento ha tenido que sortear diversos problemas debido a su número tan elevado, su insolubilidad en ausencia de agentes desnaturalizantes, a cierta agregación inespecífica y un peso molecular muy semejante. Todo esto complicó la obtención de proteínas puras en cantidad suficiente ( 98 ).

##### 1.4.1 Fosfoproteínas Ribosomales Acidas.

Dentro de las proteínas ribosomales de S. cerevisiae, se encuentran algunas que son ácidas, migran hacia el ánodo en la primera dimensión de un gel en un sistema electroforético bidimensional pH 8.6 X pH 4.5 ( 99 ) y presentan características distintivas como son las siguientes :

- 1.- presentan un PI entre 3 y 5

Figura 8. Proteínas ribosomales totales obtenidas por Gorenstein y Warner ( 96,97 ) quienes colocaron las proteínas de las subunidades 40 s y 60 s en un gel bidimensional, la primera dimensión se corrió a un pH de 5 y la segunda, en presencia de SDS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 8. Proteínas ribosomales totales obtenidas por Gorenstein y Warner ( 96,97 ) quienes colocaron las proteínas de las subunidades 40 s y 60 s en un gel bidimensional, la primera dimensión se corrió a un pH de 5 y la segunda, en presencia de SDS.

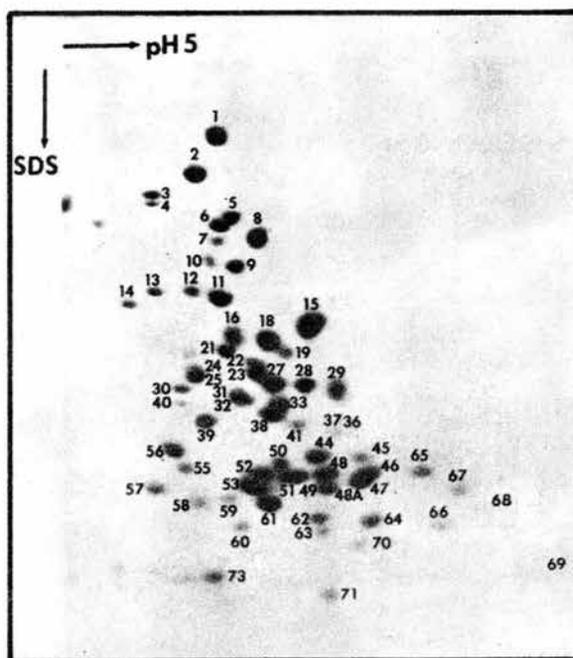


Figura No 8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

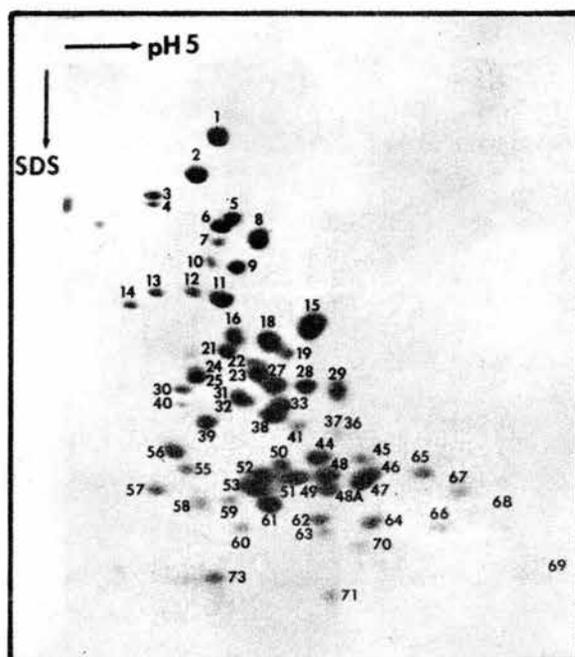


Figura No 8

- 2.- se extraen selectivamente del ribosoma con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 M ó 1 M y 50 % de etanol.
- 3.- poseen pesos moleculares bajos ( de 11 092 a 22 000 Daltones ).
- 4.- presentan modificaciones químicas como la acetilación y la fosforilación.

Cuando estas proteínas han sido sintetizadas, sufren los cambios químicos arriba mencionados cuyo significado funcional aún no esta del todo claro. En 1976, Zinker y Warner ( 100 ) observaron que cinco ( designadas de P1 a P5 ) de un total de 67 se encontraban fosforiladas "in vivo" pues el tratamiento de las fosfoproteínas con elevadas concentraciones de RNasa A y T2 no afecta al fosfato unido a la proteína y la hidrólisis ácida de éstas produce residuos de fosfoserina y fosfotreonina.

La fosfoproteína P1, con un peso molecular de 40 000, se encuentra en la subunidad 60 s del ribosoma ; se resuelve como dos proteínas ( P1/P1\* ) en geles bidimensionales de urea pH 3.2 X SDS ( 101 ), no se desplaza en la primera dimensión de geles de poliacrilamida a pH 8.6, pH 5.0 y pH 3.0 en ausencia de SDS. Presenta una actividad proteolítica en estado desfosforilado ( 102 ) y un carácter electroforético neutro, es una proteína de recambio entre el ribosoma y el citoplasma y se ha encontrado que forma un complejo ribonucleoprotéico 7 s al asociarse con el ARN 5 s, del cual es probable que exista una poza citoplasmica ( 103 ).

P2 es una proteína básica de P.M. 31 000 que corresponde a la S 10 en la nomenclatura de Kruiswijk y Planta ( 96 ), lo interesante de esta proteína radica en la gran similitud con la S 6 de ribosomas de hígado de rata ( 92 ). P3, que presenta un comportamiento electroforético similar al de la S 27, corresponde a la S 2 en la nomenclatura establecida por Kruiswijk y Planta en 1974. P2 y P3 se encuentran solamente en la subunidad 40 s cuando son extraídas con soluciones amortiguadoras

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 2.- se extraen selectivamente del ribosoma con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 M ó 1 M y 50 % de etanol.
- 3.- poseen pesos moleculares bajos ( de 11 092 a 22 000 Daltones ).
- 4.- presentan modificaciones químicas como la acetilación y la fosforilación.

Cuando estas proteínas han sido sintetizadas, sufren los cambios químicos arriba mencionados cuyo significado funcional aún no esta del todo claro. En 1976, Zinker y Warner ( 100 ) observaron que cinco ( designadas de P1 a P5 ) de un total de 67 se encontraban fosforiladas "in vivo" pues el tratamiento de las fosfoproteínas con elevadas concentraciones de RNasa A y T2 no afecta al fosfato unido a la proteína y la hidrólisis ácida de éstas produce residuos de fosfoserina y fosfotreonina.

La fosfoproteína P1, con un peso molecular de 40 000, se encuentra en la subunidad 60 s del ribosoma ; se resuelve como dos proteínas ( P1/P1\* ) en geles bidimensionales de urea pH 3.2 X SDS ( 101 ), no se desplaza en la primera dimensión de geles de poliacrilamida a pH 8.6, pH 5.0 y pH 3.0 en ausencia de SDS. Presenta una actividad proteolítica en estado desfosforilado ( 102 ) y un carácter electroforético neutro, es una proteína de recambio entre el ribosoma y el citoplasma y se ha encontrado que forma un complejo ribonucleoprotéico 7 s al asociarse con el ARN 5 s, del cual es probable que exista una poza citoplasmica ( 103 ).

P2 es una proteína básica de P.M. 31 000 que corresponde a la S 10 en la nomenclatura de Kruiswijk y Planta ( 96 ), lo interesante de esta proteína radica en la gran similitud con la S 6 de ribosomas de hígado de rata ( 92 ). P3, que presenta un comportamiento electroforético similar al de la S 27, corresponde a la S 2 en la nomenclatura establecida por Kruiswijk y Planta en 1974. P2 y P3 se encuentran solamente en la subunidad 40 s cuando son extraídas con soluciones amortiguadoras

de elevada fuerza iónica ( KCl 0.5 M ) y en las dos subunidades cuando son extraídas con bajas concentraciones del ión Mg (  $10^{-5}$  M ), por lo que se ha sugerido que se localizan en la interfase de las subunidades 60 y 40 s ( 100 ). P4 es una fosfoproteína ácida presente en los polisomas con PM de 15 500.

P5 esta constituida por dos o más especies denominadas L35/L36 ( 100 ) ó L44/L45 ( 96 ), Ax reportada por Sánchez-Madrid en 1979 ( 104,105 ) y L44' observada por Vidales en 1982 ( 98 ). Las proteínas L44', L44 y L45 presentan un PM que oscila entre 11 092 y 14 000, un sólo estado de fosforilación, una reacción inmunológica total, un PI entre 3 y 3.5, un promedio de 3.2 copias por ribosoma ( 106 ), cuando se someten a electroforesis en geles de SDS no se separan, obteniéndose una sola banda de aproximadamente 13 500 D, observaciones mediante técnicas de ultracentrifugación y filtración en columna han demostrado que las proteínas L44/L45 forman dímeros estables en solución, su semejanza en la composición de aminoácidos es muy grande ( Tabla 5 ) pero el análisis de los mapas de digestión tróptica revelan diferencias muy claras por lo que ha surgido la duda de si se originan a partir de genes diferentes o son producto de modificaciones postranscripcionales.

Por otra parte, las proteínas L 7/L 12 del ribosoma de E. coli, con un PM de 12 207 y 12 165 respectivamente ( 107 ), presentan un carácter muy ácido, se fosforilan "in vitro" por cinasas de células superiores, existen cuatro copias presentes como un par de dímeros sumamente estables por cada ribosoma ( 108 ) y L 7 se encuentra acetilada en su extremo amino terminal. Las evidencias existentes sugieren que uno de estos dímeros esta implicado en la unión del GTP y el otro en su hidrólisis ( 109 ), aunque parece ser que no están relacionados directamente con el centro activo de hidrólisis de GTP. Otros reportes proponen que estas proteínas sólo inducen un cambio estructural que facilita la interacción entre los factores de elongación y la partícula ribosomal. Esto encuentra su base en el trabajo de Michalski y Sells quienes detec -

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de elevada fuerza iónica ( KCl 0.5 M ) y en las dos subunidades cuando son extraídas con bajas concentraciones del ión Mg (  $10^{-5}$  M ), por lo que se ha sugerido que se localizan en la interfase de las subunidades 60 y 40 s ( 100 ). P4 es una fosfoproteína ácida presente en los polisomas con PM de 15 500.

P5 esta constituida por dos o más especies denominadas L35/L36 ( 100 ) ó L44/L45 ( 96 ), Ax reportada por Sánchez-Madrid en 1979 ( 104,105 ) y L44' observada por Vidales en 1982 ( 98 ). Las proteínas L44', L44 y L45 presentan un PM que oscila entre 11 092 y 14 000, un sólo estado de fosforilación, una reacción inmunológica total, un PI entre 3 y 3.5, un promedio de 3.2 copias por ribosoma ( 106 ), cuando se someten a electroforesis en geles de SDS no se separan, obteniéndose una sola banda de aproximadamente 13 500 D, observaciones mediante técnicas de ultracentrifugación y filtración en columna han demostrado que las proteínas L44/L45 forman dímeros estables en solución, su semejanza en la composición de aminoácidos es muy grande ( Tabla 5 ) pero el análisis de los mapas de digestión tróptica revelan diferencias muy claras por lo que ha surgido la duda de si se originan a partir de genes diferentes o son producto de modificaciones postranscripcionales.

Por otra parte, las proteínas L 7/L 12 del ribosoma de E. coli, con un PM de 12 207 y 12 165 respectivamente ( 107 ), presentan un carácter muy ácido, se fosforilan "in vitro" por cinasas de células superiores, existen cuatro copias presentes como un par de dímeros sumamente estables por cada ribosoma ( 108 ) y L 7 se encuentra acetilada en su extremo amino terminal. Las evidencias existentes sugieren que uno de estos dímeros esta implicado en la unión del GTP y el otro en su hidrólisis ( 109 ), aunque parece ser que no están relacionados directamente con el centro activo de hidrólisis de GTP. Otros reportes proponen que estas proteínas sólo inducen un cambio estructural que facilita la interacción entre los factores de elongación y la partícula ribosomal. Esto encuentra su base en el trabajo de Michalski y Sells quienes detec -

TABLA 5. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS L44', L44 y L45  
REPORTADA POR VIDALES ( 98 ).

AMINOACIDO	% MOLAR		
	L 44'	L 44	L 45
Asp + Asn	12.9	10.4	8.1
Tre	2.2	2.4	2.0
Ser	4.8	5.5	5.5
Glu + Gln	14.4	16.2	12.4
Pro	0.7	2.5	2.3
Gli	13.4	10.0	13.4
Ala	24.3	21.1	24.2
Val	3.9	4.9	5.5
Met	1.0	0.9	1.0
Ileu	3.3	4.5	3.8
Leu	8.0	9.9	9.5
Tir	1.3	1.6	1.6
Fen	2.5	2.2	3.0
Lis	6.5	7.6	7.1
His	0.5	====	===
Arg	====	====	0.8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS L44', L44 y L45  
REPORTADA POR VIDALES ( 98 ).

AMINOACIDO	% MOLAR		
	L 44'	L 44	L 45
Asp + Asn	12.9	10.4	8.1
Tre	2.2	2.4	2.0
Ser	4.8	5.5	5.5
Glu + Gln	14.4	16.2	12.4
Pro	0.7	2.5	2.3
Gli	13.4	10.0	13.4
Ala	24.3	21.1	24.2
Val	3.9	4.9	5.5
Met	1.0	0.9	1.0
Ileu	3.3	4.5	3.8
Leu	8.0	9.9	9.5
Tir	1.3	1.6	1.6
Fen	2.5	2.2	3.0
Lis	6.5	7.6	7.1
His	0.5	====	===
Arg	====	====	0.8

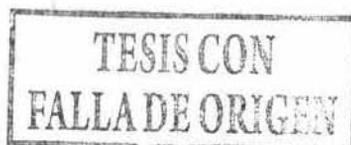
taron un cambio estructural en presencia de L 7 y L 12 ( 111 ). Algo que ha quedado claramente establecido, es que aumentan la eficiencia en la fidelidad de la traducción y en la velocidad de síntesis ( 112 ).

Es evidente que existe una gran similitud estructural y funcional entre las proteínas ribosomales L 7/L 12 de E. coli y L44/L45 de S. cerevisiae, hecho que seguramente se deba a una conservación evolutiva de sus características fisicoquímicas.

Según datos obtenidos mediante métodos inmunoquímicos ( 98 ), marcaje radioactivo y análisis en geles de poliacrilamida ( 105 ), los ribosomas de S. cerevisiae tratados con cloruro de amonio 0.5 y 1 M y etanol pierden aproximadamente el 76 % y el 83 % respectivamente de sus proteínas ácidas, lo que trae como consecuencia una disminución del 50 y 95 % respectivamente, de la actividad de hidrólisis del GTP dependiente de los factores de elongación. Los ribosomas carentes de las proteínas ácidas ( tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 M ) conservan una actividad de síntesis prácticamente inalterada, mientras que aquellos tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M casi pierden su capacidad polimerizadora.

Se ha sugerido que estas fosfoproteínas estimulan la actividad de los factores de elongación ejerciendo una función auxiliadora en la fijación de éstos al ribosoma, función que se le ha adjudicado también a las proteínas ácidas L 7/L 12 de E. coli ( 110,113 ). También se ha postulado su requerimiento por parte del ribosoma para aumentar su eficiencia tanto en velocidad de síntesis como en la fidelidad de la traducción, como ocurre en E. coli ( 112 ).

El hecho de que las proteínas ácidas se encuentran fosforiladas cuando se separan del ribosoma ( 98 ) y desfosforiladas cuando se encuentran libres en el citoplasma ( 114 ) ha permitido suponer que la fosforilación ejerce un papel regulador en la incorporación de las proteínas al ribosoma ( 106 ).



taron un cambio estructural en presencia de L 7 y L 12 ( 111 ). Algo que ha quedado claramente establecido, es que aumentan la eficiencia en la fidelidad de la traducción y en la velocidad de síntesis ( 112 ).

Es evidente que existe una gran similitud estructural y funcional entre las proteínas ribosomales L 7/L 12 de E. coli y L44/L45 de S. cerevisiae, hecho que seguramente se deba a una conservación evolutiva de sus características fisicoquímicas.

Según datos obtenidos mediante métodos inmunoquímicos ( 98 ), marcaje radioactivo y análisis en geles de poliacrilamida ( 105 ), los ribosomas de S. cerevisiae tratados con cloruro de amonio 0.5 y 1 M y etanol pierden aproximadamente el 76 % y el 83 % respectivamente de sus proteínas ácidas, lo que trae como consecuencia una disminución del 50 y 95 % respectivamente, de la actividad de hidrólisis del GTP dependiente de los factores de elongación. Los ribosomas carentes de las proteínas ácidas ( tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 M ) conservan una actividad de síntesis prácticamente inalterada, mientras que aquellos tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M casi pierden su capacidad polimerizadora.

Se ha sugerido que estas fosfoproteínas estimulan la actividad de los factores de elongación ejerciendo una función auxiliadora en la fijación de éstos al ribosoma, función que se le ha adjudicado también a las proteínas ácidas L 7/L 12 de E. coli ( 110,113 ). También se ha postulado su requerimiento por parte del ribosoma para aumentar su eficiencia tanto en velocidad de síntesis como en la fidelidad de la traducción, como ocurre en E. coli ( 112 ).

El hecho de que las proteínas ácidas se encuentran fosforiladas cuando se separan del ribosoma ( 98 ) y desfosforiladas cuando se encuentran libres en el citoplasma ( 114 ) ha permitido suponer que la fosforilación ejerce un papel regulador en la incorporación de las proteínas al ribosoma ( 106 ).

Los trabajos de los diferentes grupos de investigación que se han avocado al estudio de las fosfoproteínas ribosomales ácidas, han permitido observar diferencias, aunque no muy marcadas, si significativas en el número y tamaño ( PM ) de las proteínas ribosomales, así como en la existencia de diferentes grados de fosforilación de los organismos estudiados que muestran un desarrollo gradual en concordancia con la escala evolutiva. En los procariotes como E. coli, las proteínas no están fosforiladas ; en levaduras ( 100 ), plantas como el germen de trigo e insectos como A. salina ( 90 ), se encuentran monofosforiladas ; en mamíferos, como células de hígado de rata ( 76 ) y reticulocitos de conejo ( 115 ), presentan estados multifosforilados. Así mismo, se ha descubierto que existen grandes similitudes funcionales entre las proteínas de organismos tan alejados uno de otro en la escala evolutiva como lo demuestra el reconocimiento inmunológico resultante al enfrentar un suero con --tra las proteínas de S. cerevisiae con proteínas de E. coli e hígado de rata hecho éste apoyado por el descubrimiento de la existencia de homología de secuencia ( 116 ). También se ha reportado que todas las fosfoproteínas ribosomales ácidas de los organismos eucarióticos mencionados arriba ( excepto A. salina ) son capaces de reconstituir la actividad de hidrólisis de GTP dependiente del factor de elongación eIF-2 ( 98 ).

La importancia fisiológica de la fosforilación aún no se ha aclarado del todo, sin embargo, hay reportes que indican que ésta puede tener el control de la afinidad de las proteínas ácidas por el ribosoma de S. cerevisiae ( 106 ), como ya se mencionó en la página anterior. Independientemente de ello, se cree que el aumento en el grado de la fosforilación y en la complejidad de la organización celular que se ha producido en estos organismos en el curso de la evolución, es una respuesta a la necesidad de regular con mayor precisión esta función tan compleja como es la del ribosoma.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los trabajos de los diferentes grupos de investigación que se han avocado al estudio de las fosfoproteínas ribosomales ácidas, han permitido observar diferencias, aunque no muy marcadas, si significativas en el número y tamaño ( PM ) de las proteínas ribosomales, así como en la existencia de diferentes grados de fosforilación de los organismos estudiados que muestran un desarrollo gradual en concordancia con la escala evolutiva. En los procariotes como E. coli, las proteínas no están fosforiladas ; en levaduras ( 100 ), plantas como el germen de trigo e insectos como A. salina ( 90 ), se encuentran monofosforiladas ; en mamíferos, como células de hígado de rata ( 76 ) y reticulocitos de conejo ( 115 ), presentan estados multifosforilados. Así mismo, se ha descubierto que existen grandes similitudes funcionales entre las proteínas de organismos tan alejados uno de otro en la escala evolutiva como lo demuestra el reconocimiento inmunológico resultante al enfrentar un suero con --tra las proteínas de S. cerevisiae con proteínas de E. coli e hígado de rata hecho éste apoyado por el descubrimiento de la existencia de homología de secuencia ( 116 ). También se ha reportado que todas las fosfoproteínas ribosomales ácidas de los organismos eucarióticos mencionados arriba ( excepto A. salina ) son capaces de reconstituir la actividad de hidrólisis de GTP dependiente del factor de elongación eIF-2 ( 98 ).

La importancia fisiológica de la fosforilación aún no se ha aclarado del todo, sin embargo, hay reportes que indican que ésta puede tener el control de la afinidad de las proteínas ácidas por el ribosoma de S. cerevisiae ( 106 ), como ya se mencionó en la página anterior. Independientemente de ello, se cree que el aumento en el grado de la fosforilación y en la complejidad de la organización celular que se ha producido en estos organismos en el curso de la evolución, es una respuesta a la necesidad de regular con mayor precisión esta función tan compleja como es la del ribosoma.

## 1.5           Objetivos del Trabajo.

No todas las etapas del proceso de síntesis de proteínas llevado a cabo por los ribosomas eucarióticos, se conocen en detalle. La purificación, aislamiento y caracterización de cada uno de los componentes ribosomales es requisito fundamental para el posterior análisis de la estructura y función del ribosoma. Se ha logrado aislar a los componentes ribonucleicos del ribosoma, pero la preparación de proteínas puras en cantidad suficiente para su estudio, ha tropezado con innumerables dificultades debido a las características tan especiales que presentan, pues la mayor complejidad del sistema de proteínas trae como consecuencia un incremento en el número de etapas intermedias del método de purificación y mayores dificultades en el aislamiento.

Las proteínas ribosomales puras son necesarias para aclarar algunos puntos oscuros existentes inmediatos como los siguientes ; para dilucidar, en primer término, su secuencia primaria y, consecuentemente, ampliar y profundizar los estudios comparativos a nivel de composición de aminoácidos, entre organismos diversos a fin de establecer sus analogías y diferencias ; para la obtención de anticuerpos necesarios para el estudio del ribosoma mediante la técnica de inmunomicroscopía electrónica ; para averiguar si las proteínas ácidas L44', L44 y L45 son producto de un sólo gen o de genes distintos ; para estudios con relación al tiempo en el cual se sintetizan estas proteínas ; para tratar de estudiar la función de las proteínas L44', L44 y L45 durante la traducción, su función en la fosforilación y el fenómeno de recambio, etc.

El objetivo del trabajo experimental que se describe más adelante esta enfocado a optimizar las condiciones de extracción de las proteínas ribosomales ácidas L44', L44 y L45 de la levadura

S. cerevisiae : para llevarlo a cabo, hemos implementado una modificación del trabajo de Vidales ( 98 ) el cual esta basado principalmente en el trabajo de Hamel y cols. en el que describe un método para la separación de proteínas ribosomales de E. coli mediante cloruro de amonio a concentraciones elevadas y la precipitación con etanol ( 117 ).

## MATERIALES

## 2.1 Organismo empleado.

En todos los ensayos llevados a cabo en este trabajo se utilizaron células de la cepa haploide de la levadura *S. cerevisiae* A364A ( ATCC22244 ), obtenida por primera vez en el laboratorio de Dr. Leeland Hartwell en 1967 y que presenta los siguientes distintivos genotípicos ; a, gal<sub>1</sub>, ade<sub>1,2</sub>, ura<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>, tir<sub>1</sub>, his<sub>7</sub>. El significado de estas abreviaciones para los marcadores genéticos nos señalan el tipo de apareamiento ( a ; Gooday, 1974 ), incapacidad para fermentar galactosa y para sintetizar adenina, uracilo, lisina, tirosina e histidina.

## 2.2 Medios de Cultivo.

## 2.2.1 Medio YPAD ( 1 litro )

	<u>gramos</u>	<u>ml</u>
Adenina	0.03	
Bactopeptona	20	
Bacto-Agar	20	
Glucosa al 50 %		40
Extracto de levadura	10	

## 2.2.2 Medio YNB ( Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos ).

## Soluciones Stock :

## A. Vitaminas ( 100 x ) para 400 ml

Biotina	200	µg
Pentotenato de calcio	40	mg
Acido fólico	200	µg
Inositol	200	µg
Niacina	40	mg
Acido P-aminobenzóico	20	mg
Clorhidrato de piridoxina	40	mg
Riboflavina	20	mg
Clorhidrato de tiamina	40	mg

## B. Elementos traza ( 100 x )

Acido bórico	50	mg
Sulfato de cobre	4	mg
Ioduro de potasio	10	mg
Cloruro férrico	20	mg
Sulfato de manganeso	40	mg
Molibdato de sodio	20	µg
Sulfato de zinc	40	mg

Se disuelven por separado en 10 ml de agua destilada.

## C. Sales ( 50 x ) por litro

Fosfato de potasio monobásico	50	g
Sulfato de magnesio	25	g

Cloruro de sodio	5	g
Cloruro de calcio	1	g

## Preparación :

Sulfato de amonio	50	g
Mezcla de sales ( 50 x )	200	ml
Mezcla de vitaminas	40	ml
Elementos traza	0.1	ml

## 2.2.3 Medio libre de Fosfatos Inorgánicos. ( para 1 litro )

Bactopeptona	20	g
Extracto de levadura	10	g
Glucosa	20	g
Hidróxido de amonio concentrado	10	ml
Sulfato de magnesio	10	ml

El medio se deja reposar 30 minutos, se filtra a través de papel whatman 3 y se ajusta a pH 5.8 con HCl.

## 2.2.4 Medio YM-1 ( 1 litro )

Acido succínico	10	g
Bactopeptona	10	g
Extracto de levadura	5	g
Dextrosa al 50 %	20	ml
Hidróxido de sodio	6	g

Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ( YNB )	100	ml
---	-----	----

### 2.3 Soluciones para el fraccionamiento celular.

#### 2.3.1 Soluciones stock.

2- mercaptoetanol	1	M
Tris-HCl pH 7.4	1	M
MgCl <sub>2</sub>	1	M
NaCl	5	M
NH <sub>4</sub> Cl	5	M
NH <sub>4</sub> Ac	5	M
PMSF en etanol	200	mM
Etanol al 95 % con PMSF a	1	mM
MgSO <sub>4</sub>	1	M

#### 2.3.2 Solución Amortiguadora 10<sup>-5</sup>

NaCl	0.1	M
HEPES	0.01	M
PMSF	0.001	M
MgCl <sub>2</sub>	0.00001	M

#### 2.3.3 Amortiguador I CMC pH 4.5

NH <sub>4</sub> Ac	50	mM
Urea	6	M
2- mercaptoetanol	2	mM

2.3.4	Amortiguador II DEAE pH 4.5		
	NH <sub>4</sub> Ac	50	mM
	Urea	6	M
	2- mercaptoetanol	2	mM
2.3.5	Amortiguador II DEAEa pH. 6.0		
	Urea	6	M
	2- mercaptoetanol	2	mM
2.3.6	Amortiguador II DEAEb pH 6.0		
	NH <sub>4</sub> Ac	5	mM
	Urea	6	M
	2- mercaptoetanol	2	mM
2.3.7	Amortiguador III DEAE pH 4.5		
	NH <sub>4</sub> Ac	200	mM
	Urea	6	M
	2- mercaptoetanol	2	mM
2.3.8	Amortiguador III DEAEa pH 3.0		
	NH <sub>4</sub> Ac	200	mM
	Urea	6	M
	2- mercaptoetanol	2	mM

## 2.3.9 Amortiguador III DEAEb pH 4.5

NH <sub>4</sub> Ac	600	mM
Urea	6	M
2- mercaptoetanol	2	mM

## 2.3.10 Amortiguador IV DEAE pH 4.5

NH <sub>4</sub> Ac	400	mM
Urea	6	M
2- mercaptoetanol	2	mM

NOTA : Ajustar el pH de las soluciones amortiguadoras  
CMC y DEAE con ácido acético.

## 2.3.11 Solución SP 1.0 pH 8.6

Tris-HCl	10	mM
MgCl <sub>2</sub>	20	mM
NH <sub>4</sub> Cl	1	M
2- mercaptoetanol	3	mM
PMSF	1	mM

## 2.4 Soluciones para Electroforesis en geles de Poliacrilamida.

## 2.4.1 Geles para Isoelectroenfoque.

Para 8 ml :

Acrilamida	0.4	g
Anfolinas ( pH 2.5 - 5 )	0.52	ml
N,N' metilenbisacrilamida	0.16	mg
Urea 6 M	2.88	g
Persulfato de amonio al 10 %	40	$\mu$ l
TEMED	24	$\mu$ l

2.4.2 Solución para disolver las muestras de proteína.

Urea 8 M	2.5	ml
Anfolinas	150	$\mu$ l
Fuczina básica al 1 % en agua destilada	50	$\mu$ l

2.4.3 Solución del ánodo

Acido sulfúrico	1 %
-----------------	-----

2.4.4 Solución del cátodo

Hidróxido de sodio	0.03 N
--------------------	--------

2.4.5 Solución de fijado

Acido tricloracético ( TCA ) al 12.5 % y azul de  
coomassie al 0.25 %.

Preparación :

Solución A. TCA al 12.5 %

Solución B. Azúl de coomassie al 0.25 % en agua destilada.

Agregar 2 ml de solución B por cada 40 ml de solución A.

## 2.5 Soluciones de tinción

a).- Azúl de coomassie G al 0.2 % disuelto en metanol al 25 % y ácido acético al 10 %.

b).- Azúl de coomassie R-250 al 0.2 % disuelto en metanol al 25 % y ácido acético al 10 %.

Filtrar a través de papel whatman 3

## 2.6 Resinas para Cromatografía de Intercambio Iónico en Columna.

2.6.1 Resina de Carboximetil Celulosa W 23 ; resina catiónica que presenta grupos funcionales ácidos. Intercambiadora de cationes.

2.6.2 Resina de Dietil aminoetil-Tris acril, LKB 2205-300 ; resina intercambiadora de aniones, con grupos funcionales básicos.

## 2.7 Isótopos radioactivos

2.7.1 Acido ortofosfórico ( $^{32}\text{P}$ ).

## METODOS

## 3.1 Esterilización de los Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo YM-1 y YPAD se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120 °C, 15 lb/in<sup>2</sup> durante 20 minutos con excepción de la glucosa al 50 % y el YNB, los cuales se esterilizaron por filtración en papel filtro millipore HA con poro de 0.45  $\mu$  de diámetro.

3.2 Condiciones de crecimiento de las células de S. cerevisiae.

La cepa se creció en medio YPAD en el que se conservó a una temperatura de 4 °C. Una asada de la cepa crecida en medio YPAD se resuspendió en 500 ml de medio YM-1 y se incubó durante 48 horas a 23 °C en un agitador rotatorio New Brunswick modelo G76 hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria tardía ( stock ). El stock se conservó a 4 °C renovándose cada cuatro semanas.

Las levaduras se dejaron crecer en un fermentador de New Brunswick modelo MF 114 con 10 litros de medio de cultivo YM-1, inoculado con un stock de células en una dilución con proporción 1 : 200, a 30 °C en condiciones de aereación constante. El crecimiento de las células se detuvo por enfriamiento rápido cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria entre las 18 y las 20 horas.

### 3.3 Proteína Celular Total.

Las células se cosecharon por centrifugación a 5 000 rpm, en una centrífuga Sorvall modelo RC2-B, por cinco minutos en el rotor GS-3 de Sorvall Instruments y se lavaron con 500 ml de agua destilada centrifugándose nuevamente a 5 000 rpm por cinco minutos en el mismo rotor.

El paquete celular se resuspendió en un volumen suficiente de solución amortiguadora  $10^{-5}$  para aforar a 20 ml ó múltiplos de 20, la suspensión se transfirió a botellas del homogenizador tipo Braun conteniendo 35 gramos de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Las células se lisaron en un agitador tipo B. Braun modelo 7853030 con pulsos de 30 segundos de agitación por 15 segundos de reposo, se hicieron observaciones al microscopio óptico para verificar que el rompimiento mínimo fuese del 95 % aproximadamente. El lisado se colectó por succión y las perlas de vidrio se lavaron con solución amortiguadora  $10^{-5}$  hasta la transparencia total del líquido de lavado, al final se juntaron las soluciones de lavado y lisado.

Posteriormente se agregaron dos volúmenes de ácido acético glacial y 0.1 volúmenes de  $MgCl_2$  1 M ( 71 ). Después de 30 minutos de agitación constante, se centrifuga a 5 000 rpm durante diez minutos en el rotor GS-3. Se desechó la pastilla y el sobrenadante se filtró a través de un embudo Buckner con papel filtro whatman 1 transfiriéndose después al matraz balón del rotoevaporador Buschler modelo 83275 para concentrarlo, por evaporación en frío, del ácido acético. El proceso de extracción de la PCT se lleva a cabo a una temperatura de 4 °C.

El concentrado se dializó, en una membrana de diálisis con poro de exclusión máximo de 3 500 D, contra cuatro litros de agua destilada

durante 24 horas a 4 °C con cambio del líquido cada ocho horas. Al término de la diálisis, se liofilizó ( liofilizadora Virtis modelo 62110 - 075 ) y conservó en refrigeración a 4 °C. En promedio se obtuvieron 6.39 g en peso húmedo de células por litro y 0.39 g de PCT por litro de cultivo.

### 3.4 Extracción de la Proteína Ribosomal SP 1.0 pH 8.6

La muestra de PCT liofilizada se resuspendió en un volumen suficiente de solución SP 1.0 pH 8.6, para ajustar aproximadamente hasta 200 D.O. por mililitro ( espectrofotómetro Carl Zeiss PM Q II ) a 260 nm, agitando en hielo durante 20 minutos para permitir la liberación y solubilización en el sobrenadante de las proteínas ácidas ribosomales. En seguida se agregó medio volumen de etanol al 95 % y PMSF hasta 1 mM agitando durante diez minutos. Sin dejar de agitar se agregó otro medio volumen de etanol al 95 % y PMSF hasta 1 mM ; cinco minutos después se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4 °C en el rotor SS-34 de Sorvall. Se desechó la pastilla y al sobrenadante se le agregó 2.5 volúmenes de acetona a - 20 °C ; se dejó reposando en el refrigerador a - 20 °C hasta que se formaron los grumos de proteína. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 30 minutos a 4 °C en el rotor SS-34. La pastilla obtenida se secó por evaporación de la acetona y se guardó a una temperatura de 4 °C. Por cada litro de cultivo se obtienen en promedio 5 mg de proteína SP 1.0 pH 8.6 .

### 3.5 Isoelectroenfoco de proteínas en geles de Poliacrilamida.

La separación de las proteínas mediante esta técnica esta basada en su PI que es diferente para cada una de ellas. En este gel se forma

un gradiente de pH de 2.5 a 5 establecido por anfolinas, que son una mezcla de ácidos poliamino-policarboxílicos ; las proteínas se mueven a través del gel hasta el punto en que su PI coincide con el pH del gel en donde forman una banda característica. El gel se preparó a una concentración del 4 % de acuerdo con las especificaciones marcadas en la sección 2.4.1 ; la urea, acrilamida y bisacrilamida se disolvieron en 5 ml de agua destilada, después se agregaron las anfolinas y TEMED. Se desgasificó al vacío durante dos minutos para evitar la formación de burbujas de aire, en seguida se agregó el persulfato de amonio al 10 % ( para polimerizar el gel ), se agitó cuidadosamente y se vació al molde cuyas medidas son de 13 X 8 X 0.1 cm. Una vez que el gel solidificó se colocó horizontalmente en una cámara refrigerada cerrada con el fin de mantener una temperatura constante de 10 °C. Las soluciones de los electrodos ( secciones 2.4.3 y 2.4.4 ) hacen contacto con el gel a través de tiras de papel whatman 3. Los primeros quince minutos se sometió al gel a una diferencia de potencial de 50 V, después se hicieron los siguientes cambios de voltaje a intervalos de 30 minutos cada uno ; 100, 200, 300, 400, 500 y 600 V para preformar el gradiente. Las proteínas liofilizadas, se resuspendieron en 50 µl de buffer de corrida ( 2.4.2 ) antes de colocarlas en el gel, después de lo cual, se sometieron a un voltaje de 250 V durante 18 horas.

### 3.6 Tinción de los geles de Poliacrilamida.

Terminada la electroforesis, se fijaron las bandas de proteínas al gel con la solución de fijado mencionada en la sección 2.4.5 y después se sometió a múltiples lavados con agua destilada durante una hora y media. En seguida, el gel se tiñó, sumergiéndolo en una solución de azul de coomassie G ( 2.5.a ) por 60 minutos ; posteriormente se destiñó en una solución de etanol al 50 % por diez minutos pasándolo después a una solución de etanol al 30 % y ácido acético al 7 % durante 30 minutos.

### 3.7 Determinación de Proteína.

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry ( 118 ).

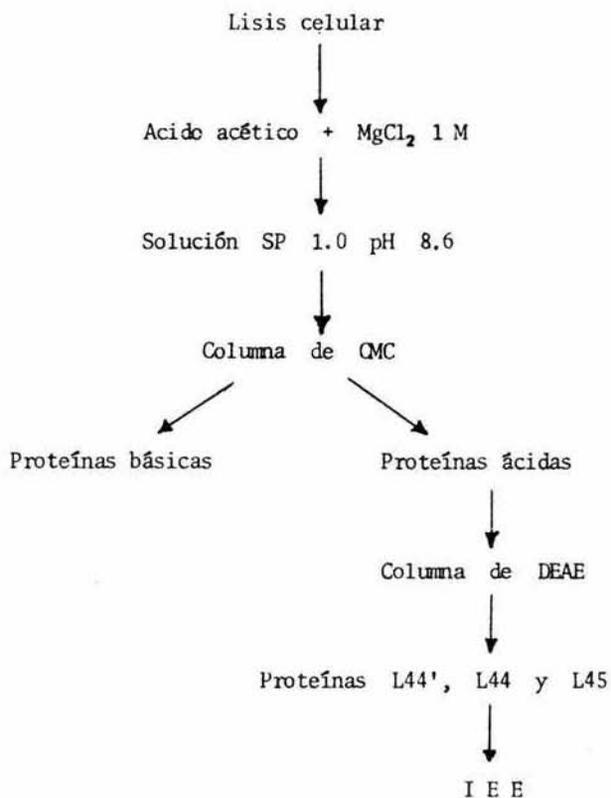


Figura 9. Esquema del proceso seguido para el aislamiento de las proteínas ácidas L44', L44 y L45 del ribosoma de S. cerevisiae.

## RESULTADOS

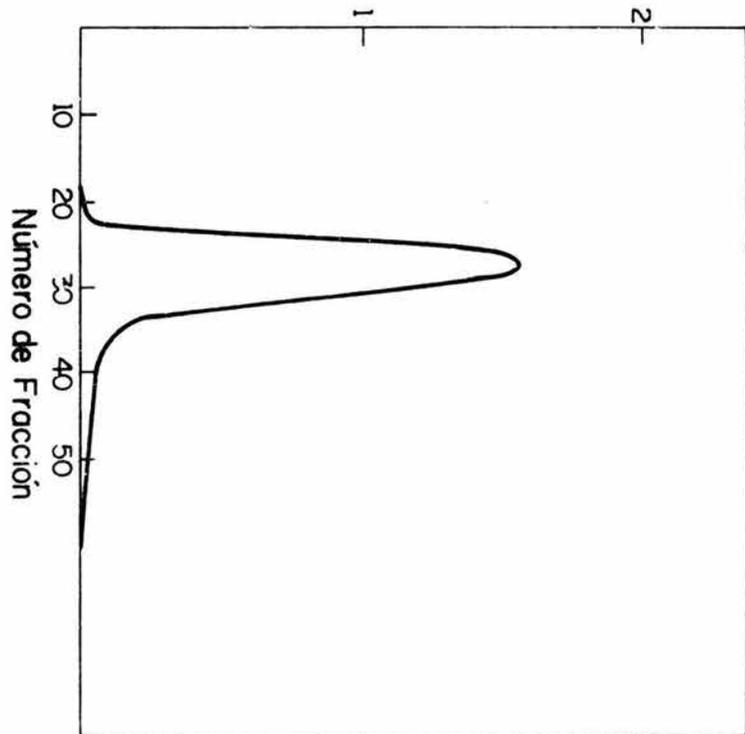
## 4.1 Separación de las Proteínas Ácidas por medio de un Sistema de Cromatografía de Intercambio Iónico.

Una muestra de proteínas ribosomales SP 1.0 pH 8.6 ( 50 mg ) se resuspendió en 2 ml de solución I CMC. De esta pastilla resuspendida, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l para determinar proteína y el resto se eluyó por una columna de CMC de 2.5 cm de diámetro por 20 cm de altura, con el objeto de separar las proteínas básicas de las ácidas gracias a la propiedad anfotérica de las proteínas, el pH del medio y a la capacidad intercambiadora de cationes de la resina. En presencia de un pH de 4.5, todas las proteínas con un PI superior a 4.5 presentan carga eléctrica positiva por lo que se unen a la columna. La muestra eluída, se colectó en fracciones de 50 gotas cada una en tubos de ensayo por medio de un iraccionador ISCO modelo 328. La figura 10 nos muestra el perfil registrado a 280 nm ( monitor ISCO modelo UA5 con unidad óptica tipo 6 ). Las fracciones con las muestras de proteína se dializaron contra cuatro litros de agua destilada durante 24 horas a una temperatura de 4 °C, haciendo tres cambios del líquido cuando menos. La diálisis se hizo con la finalidad de eliminar restos de urea, acetato de amonio y 2-mercaptoetanol. Posteriormente se liofilizó y se tomó una muestra para determinar proteínas. De acuerdo a estas determinaciones de concentración de proteínas, del 100 % que entra a la columna de CMC, se recupera el 45 % como proteínas ácidas, mientras que el resto, se unen en la columna.

Con el propósito de separar las proteínas L44', L44 y L45, se sometió a las proteínas ácidas a una cromatografía de intercambio iónico en una resina de DEAE, la cual permite la separación de las proteínas por

Figura 10. Perfil del registro de las proteínas ácidas obtenidas de la columna de CMC a un pH de 4.5 y 2 D.O.

Absorbancia a 280 nm



adsorción reversible a una matriz sólida cargada eléctricamente. Aquí, las proteínas compiten con los iones de la solución por los sitios activos de carga opuesta presentes en la matriz de la resina. La desadsorción se realiza gradualmente aumentando la molaridad de la solución eluyente, la fuerza iónica creciente remueve a las proteínas adheridas a los grupos intercambiadores de iones.

#### 4.1.1 Ensayo 1

La muestra de proteínas ácidas se resuspendió en cinco ml de solución amortiguadora II DEAE y se pasó a través de una columna de DEAE de 2.5 cm de diámetro por 20 cm de altura eluyéndose con un gradiente de fuerza iónica formado por 100 ml de solución II DEAE y 100 ml de solución III DEAE a un pH de 4.5. Se colectó en fracciones de 100 gotas cada una y las muestras contenidas en las fracciones 1 a 5, se dializaron y liofilizaron. La figura 11 muestra el perfil registrado a 280 nm de la columna de DEAE. El liofilizado se corrió en un gel de poliacrilamida para isoelectroenfoque, se tiñó y fijó como se especificó en las secciones 3.5 y 3.6.

La figura 12 nos muestra que las proteínas ácidas L44', L44 y L45 han sido separadas habiéndose colectado en las fracciones 2 y 3, sin embargo, notamos también que una parte de la proteína L45 se encuentra en la fracción 1 con otras ácidas y básicas.

Con la finalidad de producir un desprendimiento gradual con mayor efectividad, decidimos afectar la carga eléctrica de las proteínas mediante un gradiente decreciente de pH ( desde 4.5 hasta 3.0 ), disminuyendo así, paulatinamente, su afinidad por la resina.

Figura 11. Perfil registrado de las proteínas ácidas eluídas de la columna de DEAE, con un gradiente de Acetato de amonio de 50 mM a 200 mM, un pH de 4.5 y 1 D.O. ( ensayo 1 ).

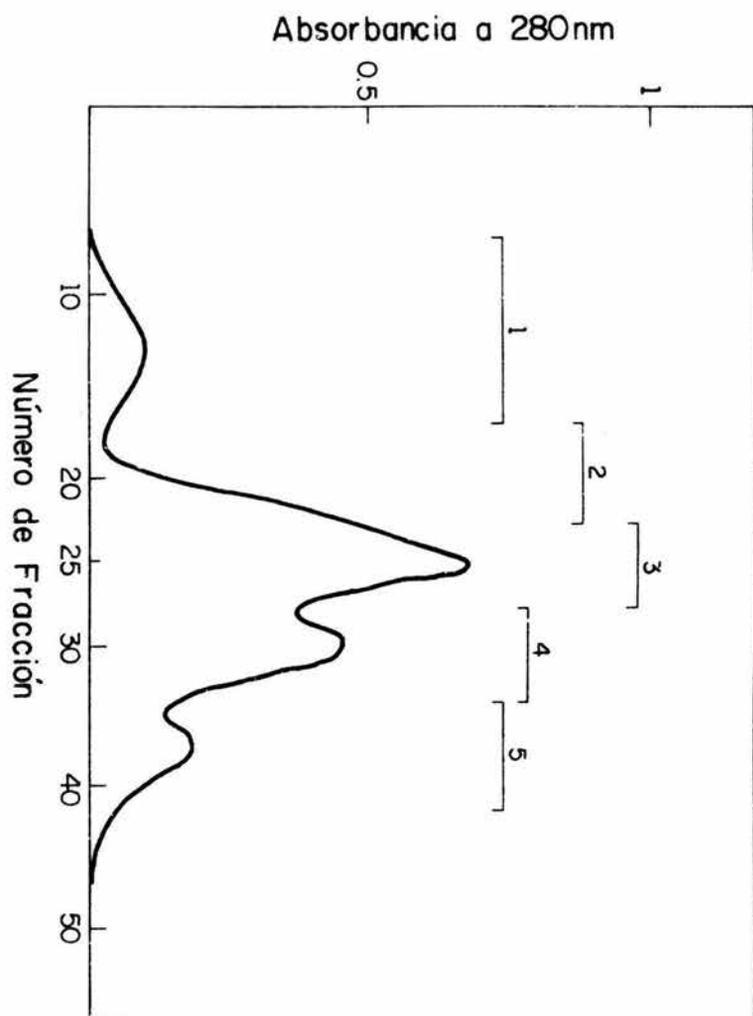


Figura 12. Análisis de las proteínas eluídas de la resina DEAE mediante IEE en placas de gel de poli - acrilamida, ensayo 1.

- 1) marcador
- 2) fracción 1
- 3) fracción 2
- 4) fracción 3
- 5) fracción 4
- 6) fracción 5 y
- 7) tinción inespecífica del gel.

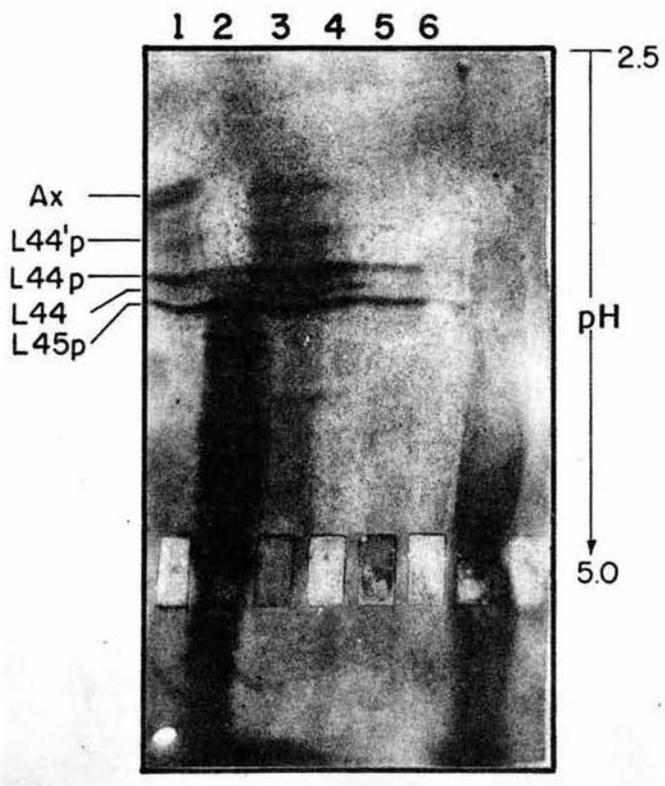


Figura No 12

#### 4.1.2 Ensayo 2

En el segundo ensayo, se resuspendió una muestra de proteínas ácidas eluídas de la columna de CMC ( PACME ) en dos ml de solución II DEAE y se pasaron por una columna de DEAE eluyéndose con un gradiente mixto de pH decreciente y fuerza iónica creciente formado por 100 ml de solución II DEAE y 100 ml de solución III DEAEa.

La figura 13 muestra el perfil del registro de las proteínas separadas en la columna de DEAE ( PADEAE ). Las fracciones que contenían la proteína, se dializaron y liofilizaron. Posteriormente, la muestra de PADEAE liofilizada, se resuspendió en 50  $\mu$ l de solución de corrida ( sección 2.4.2 ) y se sometió a una electroforesis tipo isoelectroenfoque ( sección 3.5 ). Los resultados se pueden observar en la figura 14. La tinción del gel se realizó como se menciona en la sección 3.6 . Las proteínas L44 y L45 se pueden visualizar en los carriles 3 y 4 aunque también en el 2 donde se encuentran formando parte de un barrido en el que se han separado casi todas las proteínas básicas.

La posibilidad de que las proteínas no se estuvieran uniendo totalmente al grupo intercambiador de iones, era algo muy factible, por lo que decidimos ampliar el gradiente de molaridad y el de pH para tratar de mejorar la adsorción y desadsorción gradual de las proteínas en la matriz de la resina.

#### 4.1.3 Ensayo 3

En este tercer ensayo, una muestra de PACME se pasó a través de la columna de DEAE eluyéndose con un gradiente formado por 100 ml de solución II DEAEa y 100 ml de solución III DEAE. Las muestras colectadas se dializaron y liofilizaron. En la figura 15 se ha registrado solamente

Figura 13. Registro de la filtración en columna de DEAE de las proteínas ácidas con un gradiente mixto formado con Acetato de amonio ( de 50 a 200 mM ) y por un gradiente de pH de 4.5 a 3 ( ensayo 2 ).

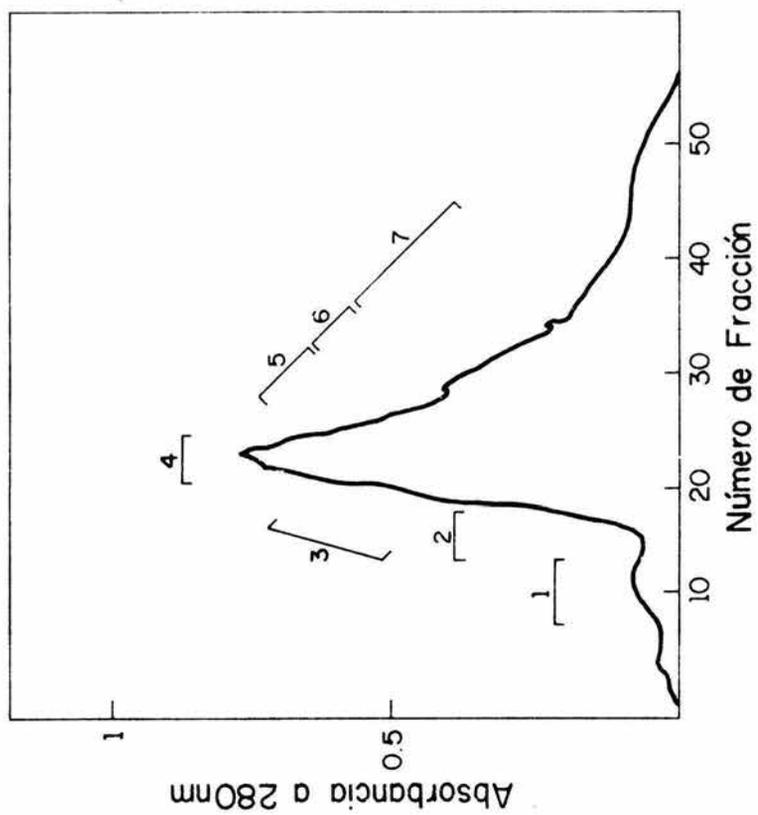


Figura 14. Análisis de las proteínas eluídas por la resina DEAE, mediante IEE en placas de gel de poliacrilamida. Ensayo 2.

- 1) marcador
- 2) fracción 1
- 3) fracción 2
- 4) fracción 3
- 5) fracción 4
- 6) fracción 5
- 7) fracción 6
- 8) fracción 7
- 9) marcador

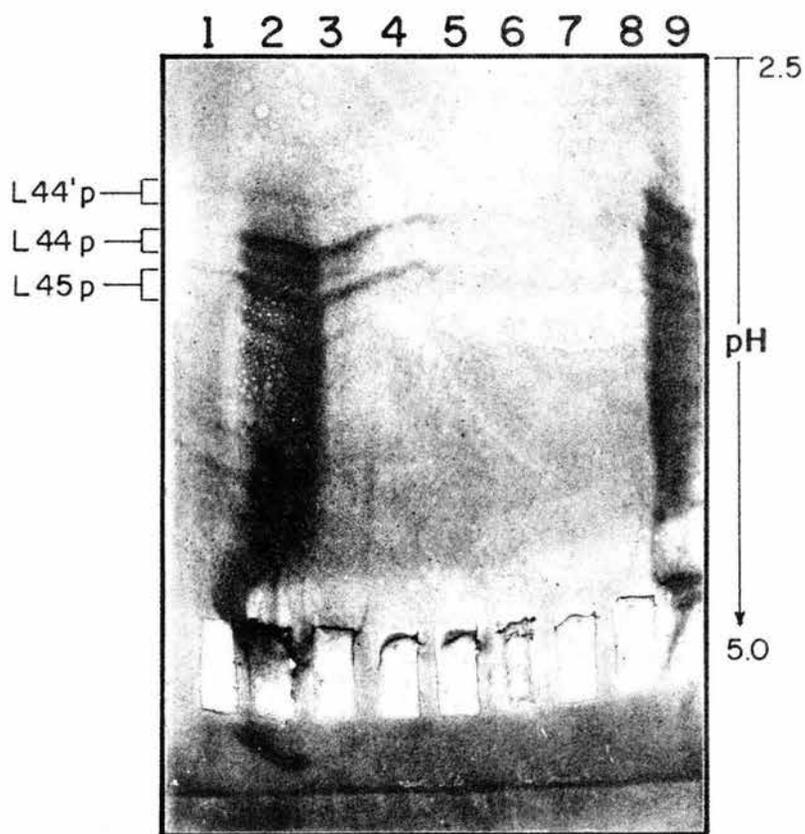
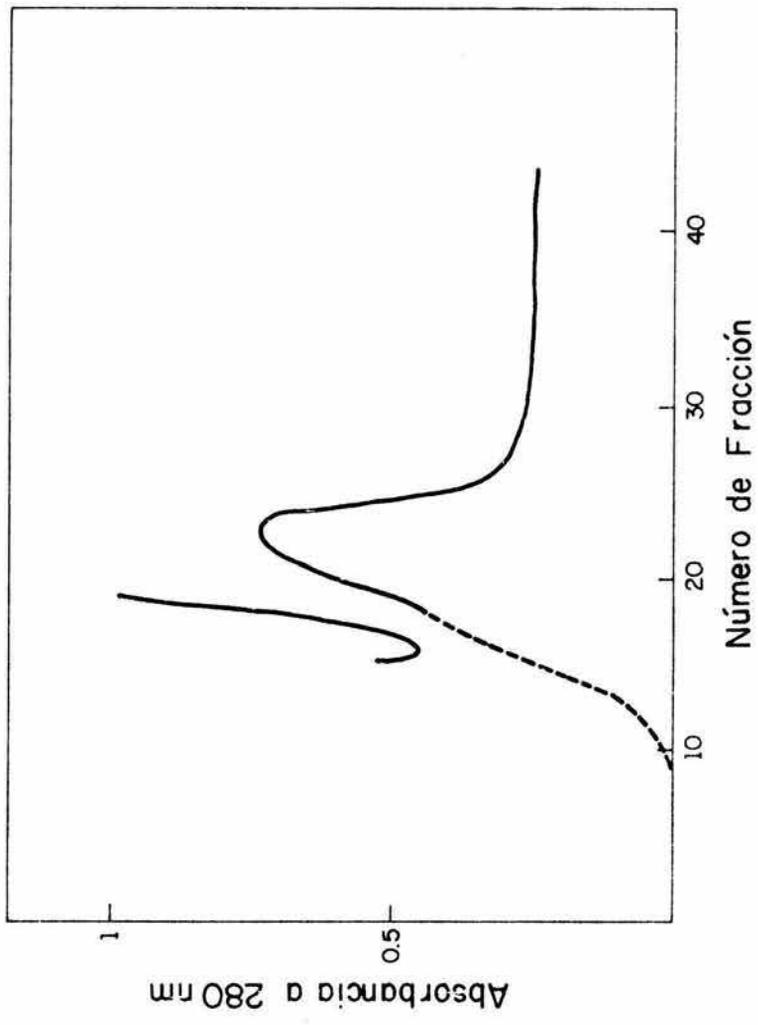


Figura No 14

Figura 15. Filtración en columna de DEAE de las fracciones PACME con un gradiente mixto formado por Acetato de amonio ( 0 - 200 mM ) y un pH de 6.0 a 4.5 ( ensayo 3 ).



una cresta lo que significa que las proteínas eluyeron al mismo tiempo.

Se midió el pH de las soluciones colectadas y nos encontramos con una alcalinización de la solución eluyente, pues oscilaba entre 7.2 y 6.0. Para evitar esto, en los ensayos siguientes, las soluciones de elución se prepararon momentos antes de usarse.

Las proteínas PADEAE liofilizadas obtenidas en el ensayo anterior, se resuspendieron en dos ml de solución II DEAEb y se eluyó en una resina de DEAE con 100 ml de solución II DEAEb y 100 ml de solución III DEAE. En esta ocasión, percibimos una separación de proteínas ( figura 16 ) cuyas fracciones colectadas, dializadas y liofilizadas, se sometieron a electroforesis en geles para isoelectroenfoque. Desgraciadamente no fué posible conservar el gel pero las bandas que presentó fueron prácticamente iguales a las de la figura 14.

#### 4.1.4 Ensayo 4

En el ensayo cuatro, decidimos aplicar el mismo gradiente mixto de pH y molaridad, pero además, con el propósito de averiguar si quedaban aún algunas proteínas sin desprenderse de la resina de DEAE, decidimos aplicar una solución elevando el gradiente de fuerza iónica hasta 400 mM. En primer término, la muestra se eluyó con un gradiente mixto formado con 100 ml de solución II DEAEb y 100 ml de solución III DEAE ; en seguida, se pasó una solución formada por 100 ml de III DEAE y 100 ml de IV DEAE, finalmente aplicamos 200 ml de solución IV DEAE. Los resultados se muestran en la figura 17. Las muestras PADEAE se dializaron, liofilizaron y resuspendieron en solución amortiguadora de corrida para someterlas a electroforesis en gel de isoelectroenfoque. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó en solución de azul de coomassie G ( sección 2.5.a ) y los resultados se muestran en la figura 18. Estos geles muestran una mayor efectividad de separación en la columna de DEAE al grado de obtener

Figura 16. Filtración en columna de DEAE, de las fracciones PADEAE mostradas en la figura 15, con el siguiente gradiente mixto :

Acetato de amonio, desde 5 hasta 200 mM y  
pH de 6.0 a 4.5

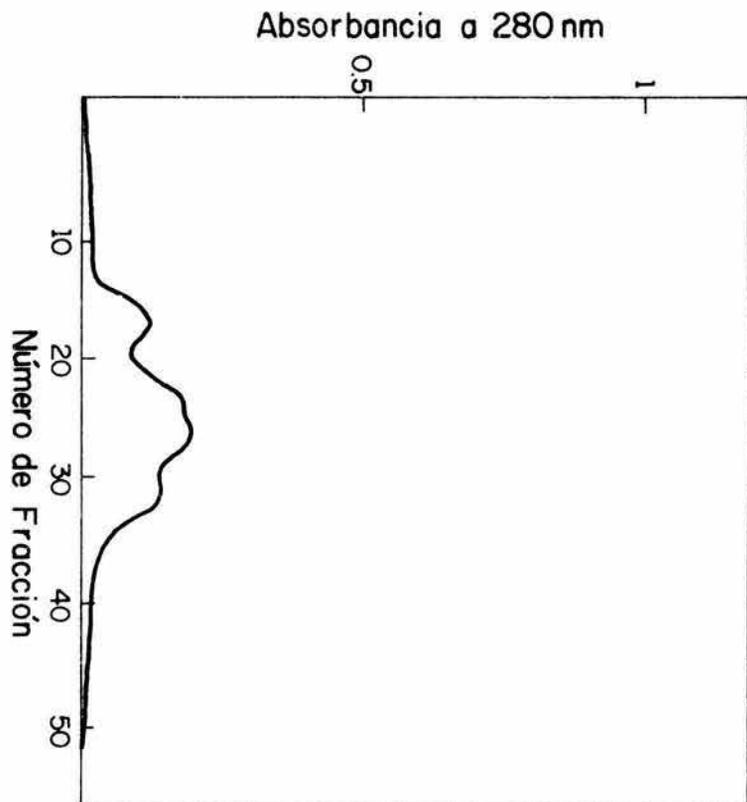


Figura 17. Filtración en columna de DEAE con un gradiente mixto formado por Acetato de amonio en una concentración de 5 a 400 mM y un pH desde 6.0 hasta 4.5 ( ver texto para detalles ), ensayo 4.

Absorbancia a 280 nm

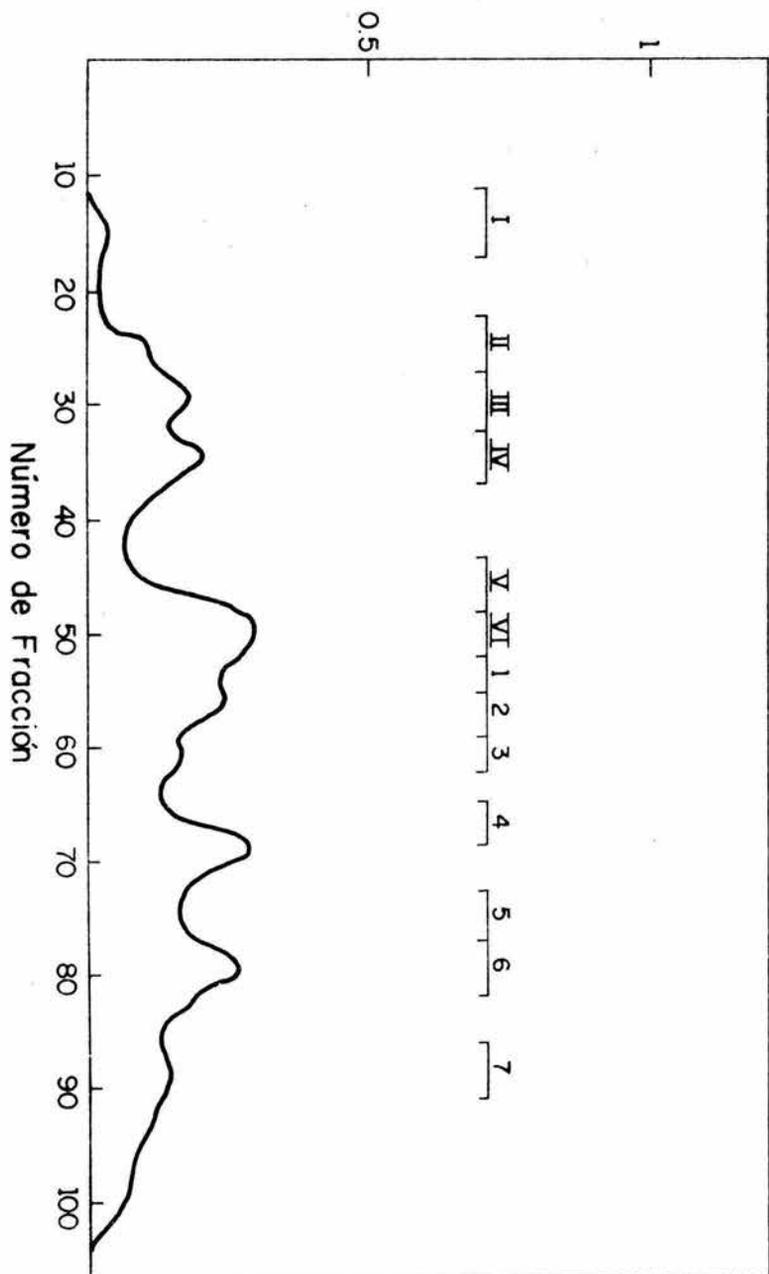


Figura 18a. Análisis de la muestra PADEAE por IEE en geles de poliacrilamida. Ensayo 4.

- 1) marcador
- 2) fracción I
- 3) fracción II
- 4) fracción III
- 5) fracción IV
- 6) fracción V
- 7) fracción VI

Figura 18b.

- 8) fracción 1
- 9) fracción 2
- 10) fracción 3
- 11) fracción 4
- 12) fracción 5
- 13) fracción 6
- 14) fracción 7

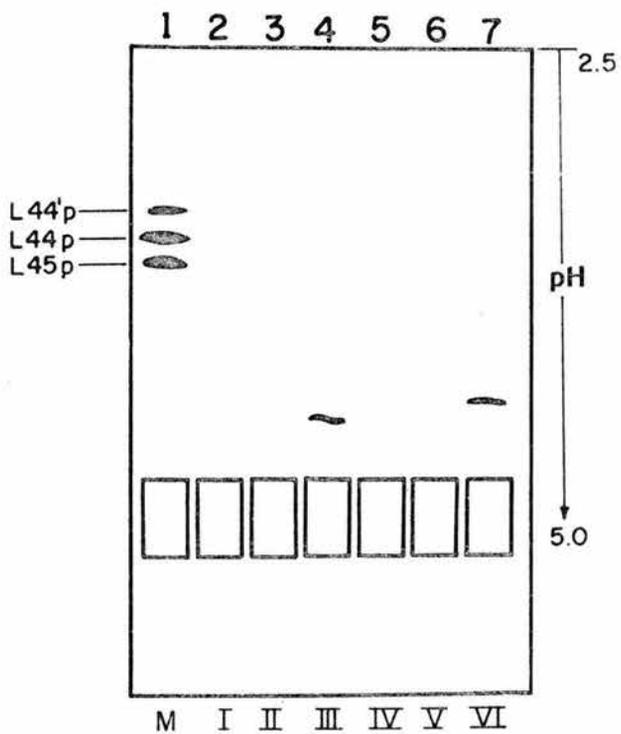


Figura No 18a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

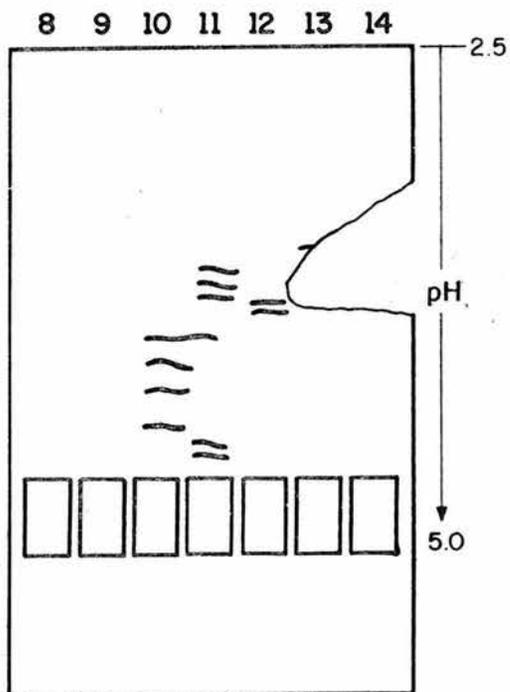


Figura No 18b

bandas bien definidas de proteínas ácidas ; en el carril 13 podemos observar lo que parece ser la banda correspondiente a L45, desafortunadamente no fué posible conservar el gel.

Este ensayo nos mostró que se requiere una fuerza iónica mucho más elevada que la aplicada en los primeros experimentos, para separar las proteínas en forma gradual, por tanto, decidimos elevar la molaridad hasta 600 mM conservando el mismo gradiente de pH.

#### 4.1.5            Ensayo 5

En el ensayo cinco, una muestra de PACME, se eluyó con un gradiente mixto de pH decreciente y fuerza iónica creciente formado con 300 ml de solución II DEAEb y 300 ml de solución III DEAEb. La muestra PADEAE se dializó, liofilizó y se sometió a electroforesis en un gel de isoelectroenfoque ( IEE ), ver figuras 19 y 20. Los geles se tiñeron como se menciona en la sección 3.6 mostrando bandas semejantes a las que se observan en la figura 18 pero sin rastro alguno de las proteínas L44', L44 y L45 ( no se muestran los geles ).

#### 4.1.6            Ensayo 6

De acuerdo con estos resultados, el gradiente mixto continuo formado en este volumen ( 600 ml ) separa a las proteínas ácidas con excepción de las que son nuestro objetivo en este trabajo. Considerando la posibilidad de que el gradiente de pH y molaridad, en este volumen produzca un efecto disminuido en la carga eléctrica y en la fuerza iónica necesarias para la separación de las proteínas que nos interesan, consideramos conveniente desarrollar el siguiente experimento ( ensayo 6 ) bajo las mismas condiciones que el ensayo 4. La figura 21 muestra el perfil del registro a 280 nm de la elución de las proteínas de la columna de DEAE

Figura 19. Fraccionamiento de las proteínas ácidas realizado en columna de DEAE bajo las siguientes condiciones de filtración :

Gradiente de Acetato de amonio de 5 a 600 mM

Gradiente de pH desde 6.0 hasta 4.5

( ensayo 5 ).

Absorbancia a 280 nm

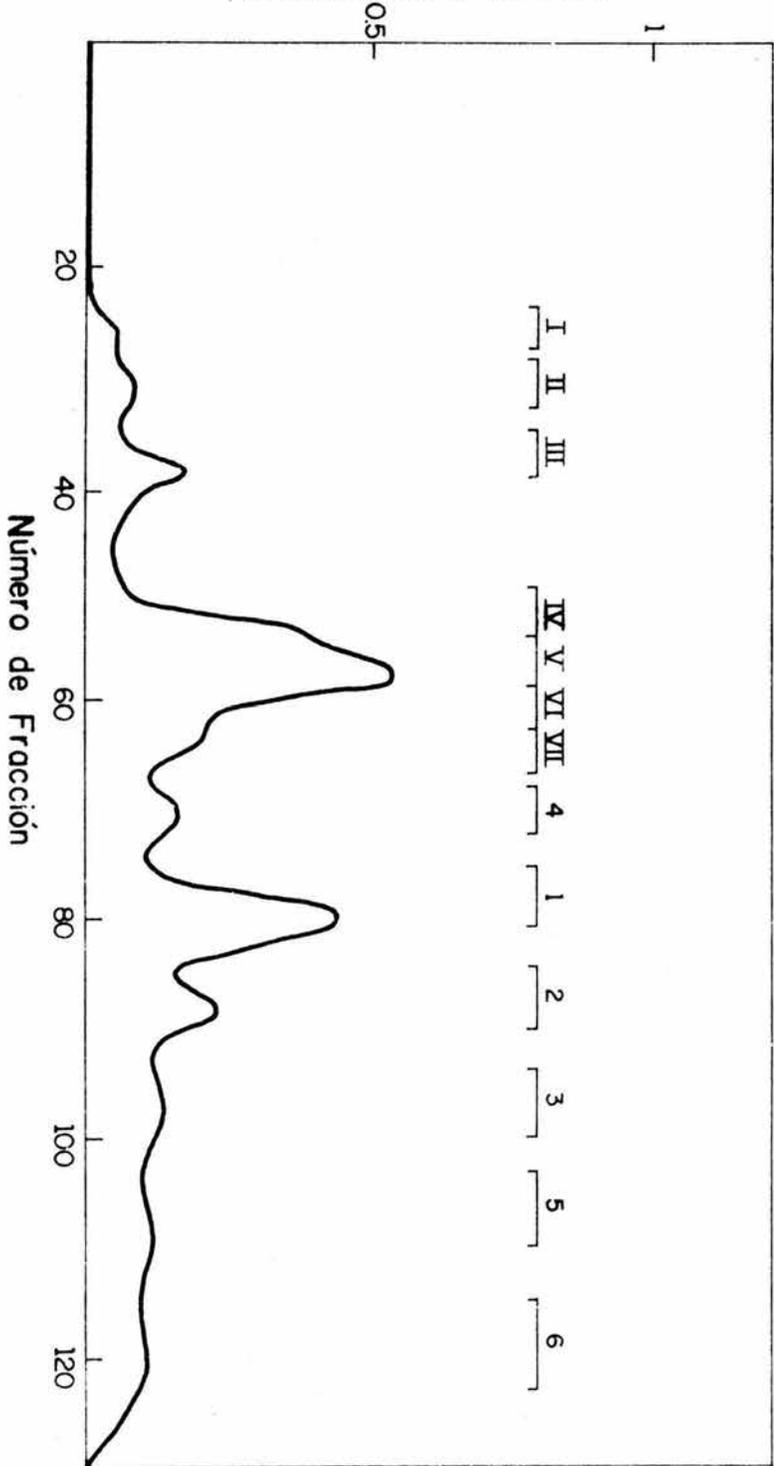


Figura 20. Fraccionamiento de las proteínas ácidas en columna de DEAE bajo las mismas condiciones de filtración que el experimento de la figura 19.

Absorbancia a 280 nm

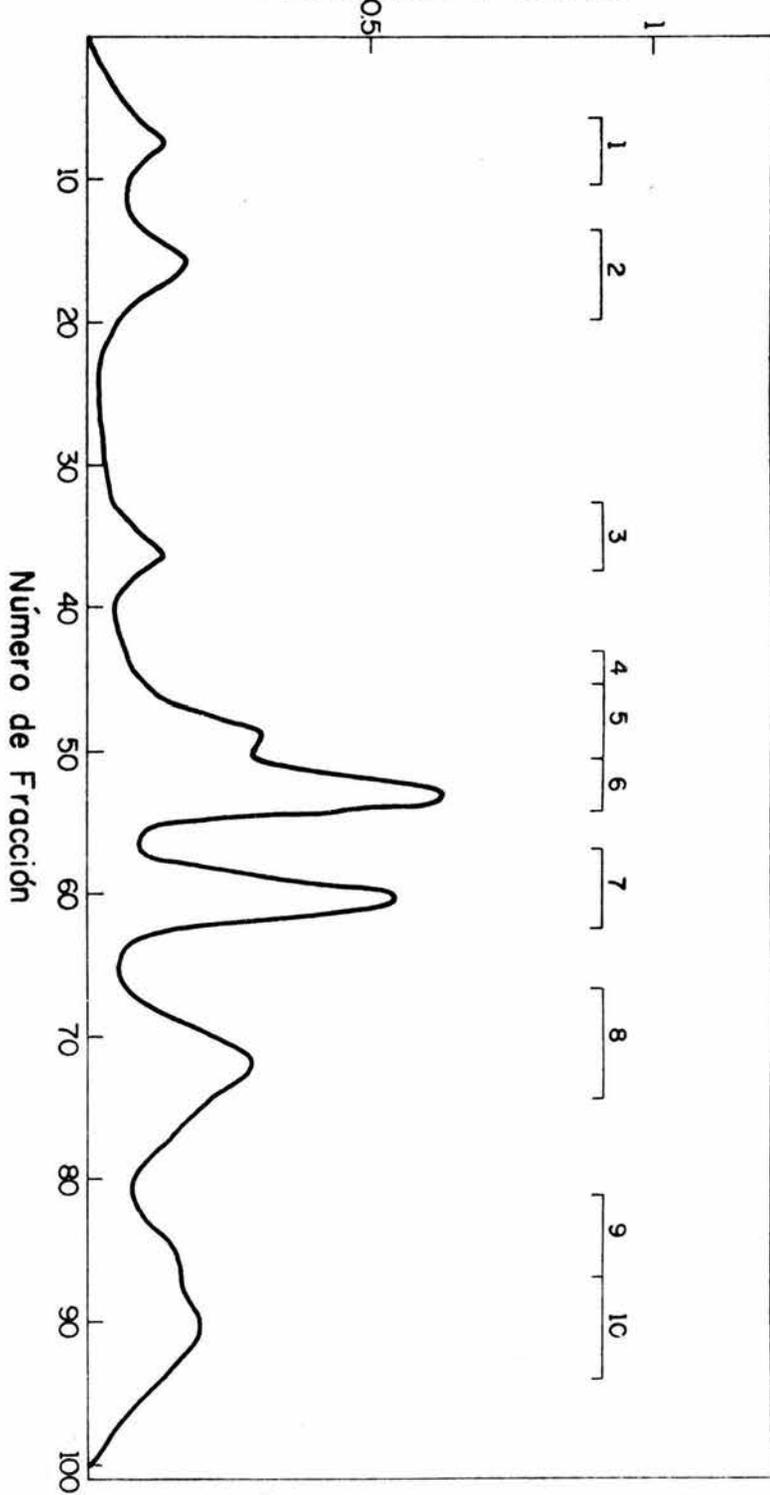
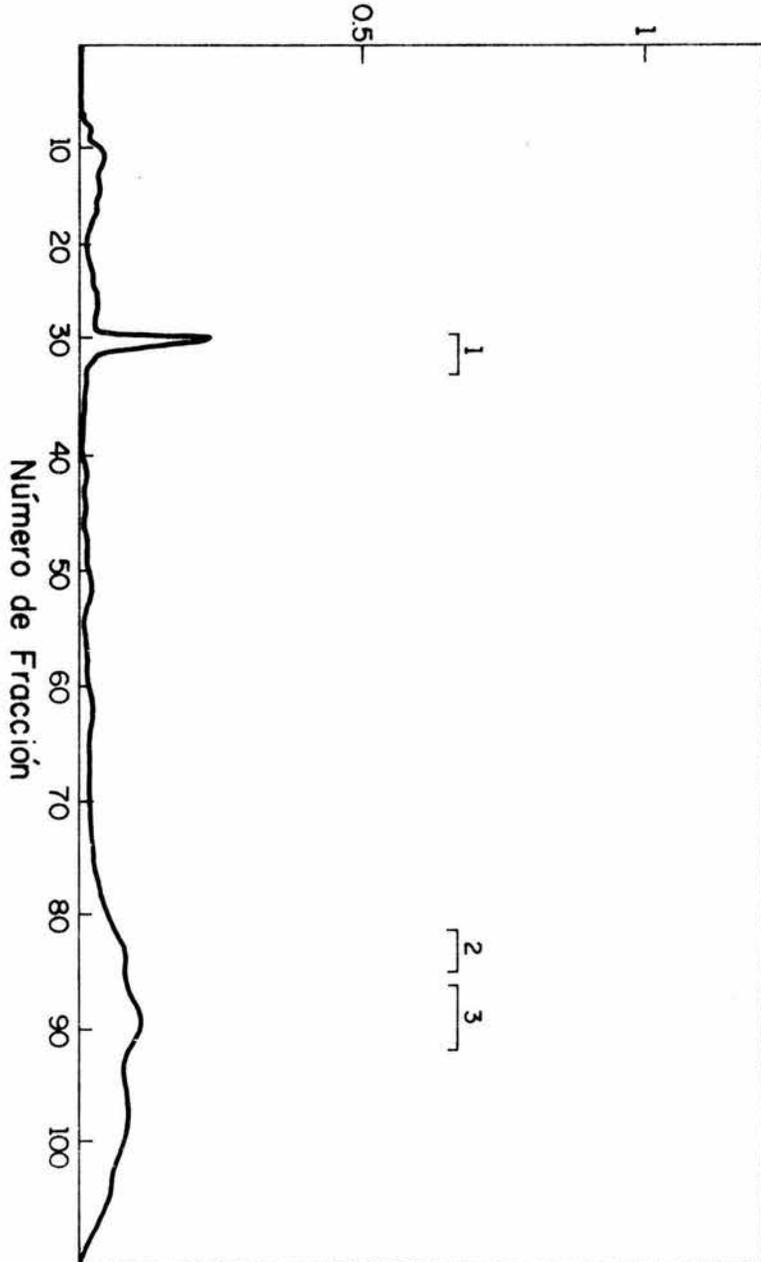


Figura 21. Filtración en columna de las proteínas PACME bajo las siguientes condiciones de filtración :

200 ml de solución de Acetato de amonio de 5 a 200 mM con un gradiente de pH de 6.0 a 4.5, en seguida, 200 ml de Acetato de amonio de 200 a 400 mM a pH de 4.5 y finalmente, 200 ml de solución de Acetato de amonio hasta 400 mM y un pH de 4.5 ( ensayo 6 ).

Absorbancia a 280 nm



y la figura 22 revela el análisis de las proteínas PADEAE en un gel de poliacrilamida por IEE. En esta figura observamos una serie de bandas, entre ellas, la correspondiente a la proteína L45.

#### 4.1.7 Ensayo 7

En el ensayo siete eluimos una muestra de PACME en la columna de DEAE bajo las mismas condiciones de elución que el experimento inmediato anterior. De esta manera, obtuvimos los diferentes picos que se observan en la figura 23. Posteriormente las fracciones correspondientes recibieron el tratamiento ya señalado como es el dializado, liofilizado y el análisis mediante electroforesis en gel de IEE. Una vez que ésta terminó, se tiñeron los geles con una solución de azul de coomassie R-250 ( sección 2.5.b ) que es más sensible para la observación de las bandas de proteína. Los geles se sumergieron en este colorante durante dos horas, al cabo de las cuales se destiñeron en una solución de metanol al 25 % y ácido acético al 10 % durante dos horas pasandolos después a una solución de metanol al 5 % y ácido acético al 5 % ( ver figuras 24a y b ). En la figura 24a se pueden ver las bandas correspondientes a las proteínas L44', L44 y L45, en tanto que en la figura 24b se observa una banda de otras proteínas ácidas

#### 4.2 Autorradiografía de las Proteínas Ribosomales Ácidas.

El marcaje de estas proteínas se realizó dejando crecer las levaduras en 250 ml de medio libre de fosfatos inorgánicos ( 119 ), aquí las células consumen fosfato orgánico, en dilución 1 : 200 durante 24 horas a 30 °C con movimiento rotatorio continuo. Posteriormente se agregaron 8  $\mu$ Ci de  $^{32}\text{P}_4$  y se incubaron durante 15 minutos con agitación constante. Debido a que las células utilizan preferentemente el fósforo inorgánico, éste es consumido rápidamente.

Figura 22. Análisis por IEE en gel de poliacrilamida de las proteínas PADEAE de la figura 21.

1) fracción 3

2) fracción 2

3) fracción 1

Ensayo 6.

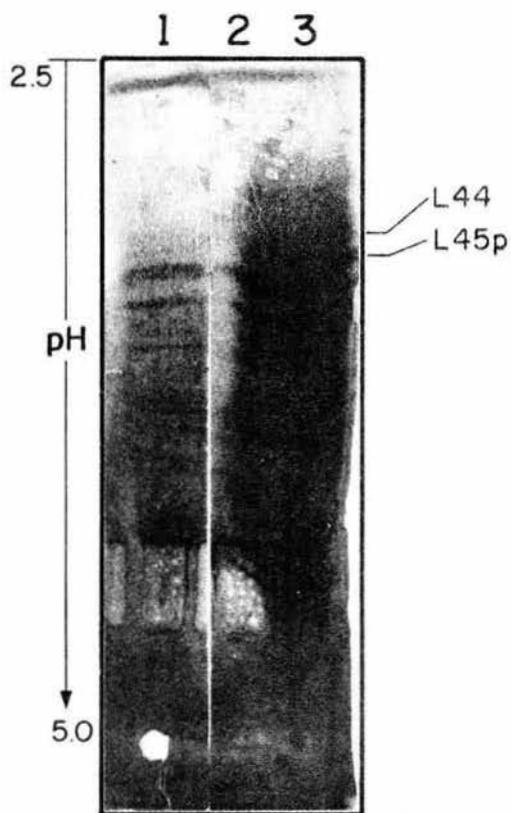


Figura No22

Figura 23. Fraccionamiento de una muestra de proteínas ácidas PACME en columna de DEAE ( ensayo 7 ) con las mismas condiciones de pH y molaridad que el ensayo 6.

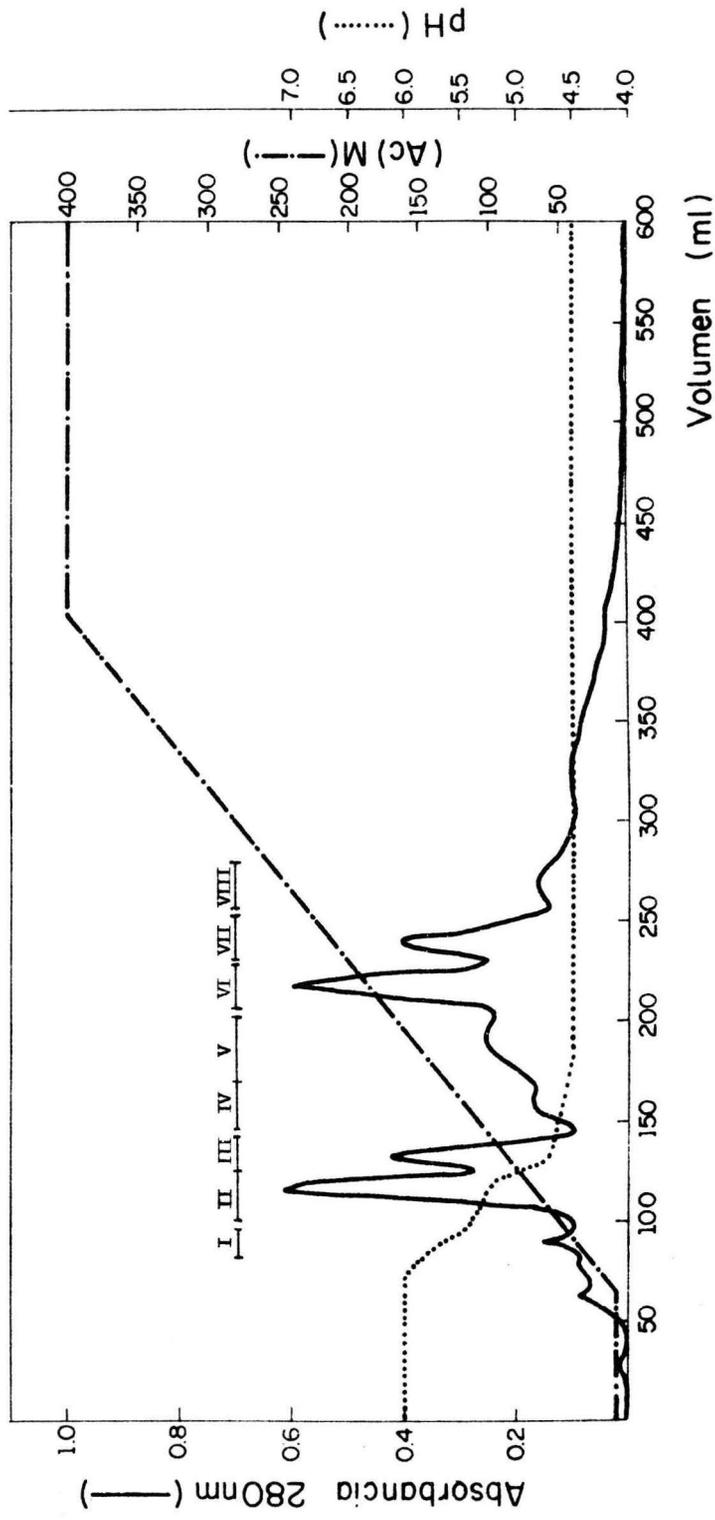


Figura 24. Análisis electroforético en geles de poli-acrilamida para IEE de las muestras PADEAE de la figura 23.

Figura 24a. 1) fracción I  
2) fracción II  
3) fracción II  
4) fracción III  
5) fracción III  
6) fracción IV  
7) fracción IV

Figura 24b. 1) fracción V  
2) fracción VI  
4) fracción VII  
6) fracción VIII

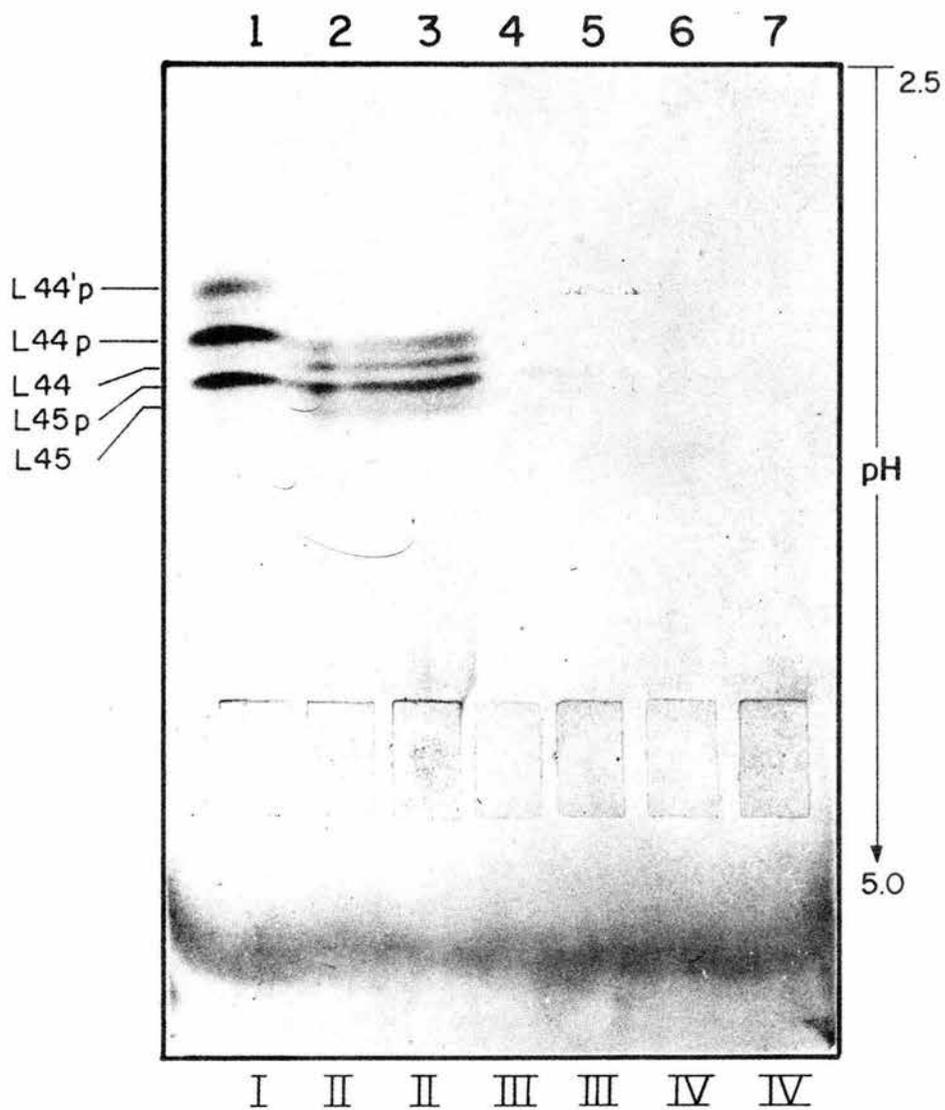


Figura No 24a

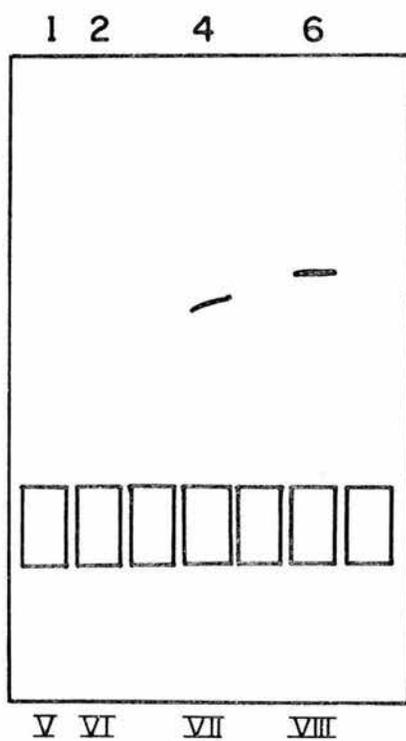


Figura № 24b

Las células se cosecharon como se indica en la sección 3.3 . La pastilla se resuspendió en solución amortiguadora  $10^{-5}$  y se procedió a romper las células mecánicamente con perlas de vidrio en un agitador Vortex. El lisado celular se colectó como se menciona en la sección 3.3 . Se agregaron dos volúmenes de ácido acético glacial y 0.1 volúmenes de  $MgCl_2$  , después de media hora de agitación constante se centrifugó a 5 000 rpm durante diez minutos en el rotor SS-34 el sobrenadante se dializó y liofilizó ( sección 2.3 ). La PCT así obtenida se procesa para separar las proteínas ribosomales ( SP 1.0 pH 8.6 ) en presencia de  $NH_4Cl$  1 M y 50 % de etanol como se describe en la sección 3.4 .

La pastilla SP 1.0 pH 8.6 se resuspende en dos ml de solución amortiguadora I CMC y se eluyó en la columna de resina CMC ( figura 25 ), las fracciones obtenidas se dializan y liofilizan como se especifica en el apartado 3.3 .La muestra liofilizada se resuspendió en urea 8 M y se corrió en un gel para IEE bajo las condiciones establecidas en la sección 3.5 .El gel se tiñó como se señaló en el apartado 3.6 y en seguida se secó en un secador de geles Bio-rad y se expuso a una placa para rayos X ( Kodak X-Omat xs-5 ). Los resultados se muestran en la figura 26 y nos permiten observar a las proteínas ácidas L44', L44 y L45 en su estado fosforilado.

Figura 25. Protefna SP 1.0 pH 8.6 marcada con fósforo inorgánico eluída a través de la resina CMC a una densidad óptica de 0.5 y un pH de 4.5

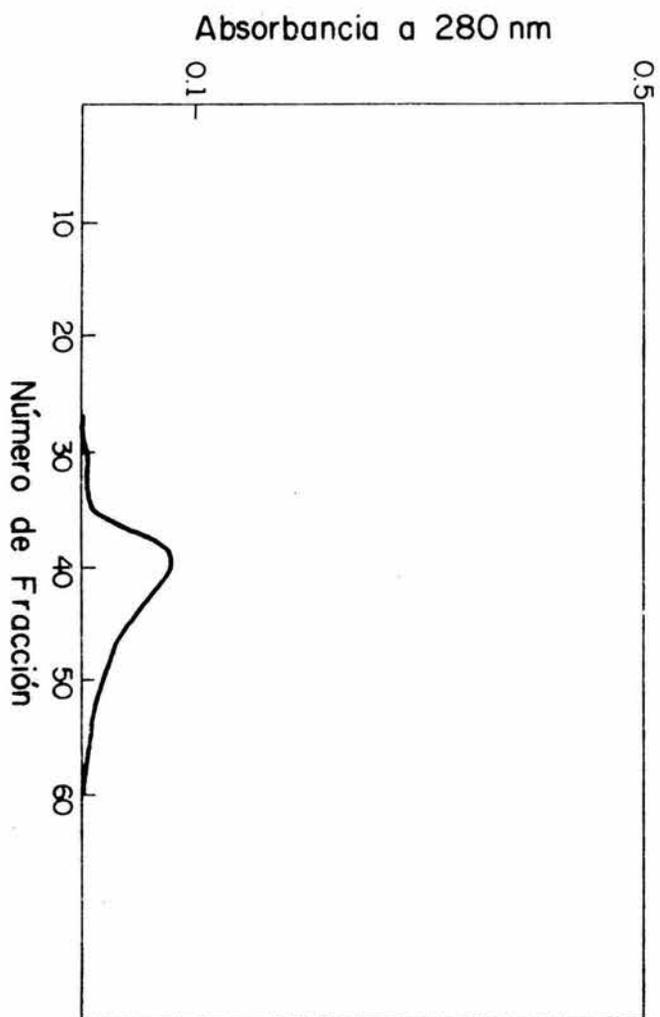


Figura 26. Autorradiografía de las proteínas ácidas fosforiladas de una muestra PACME marcada con  $^{32}\text{PO}_4$  ( ver texto para detalles ).

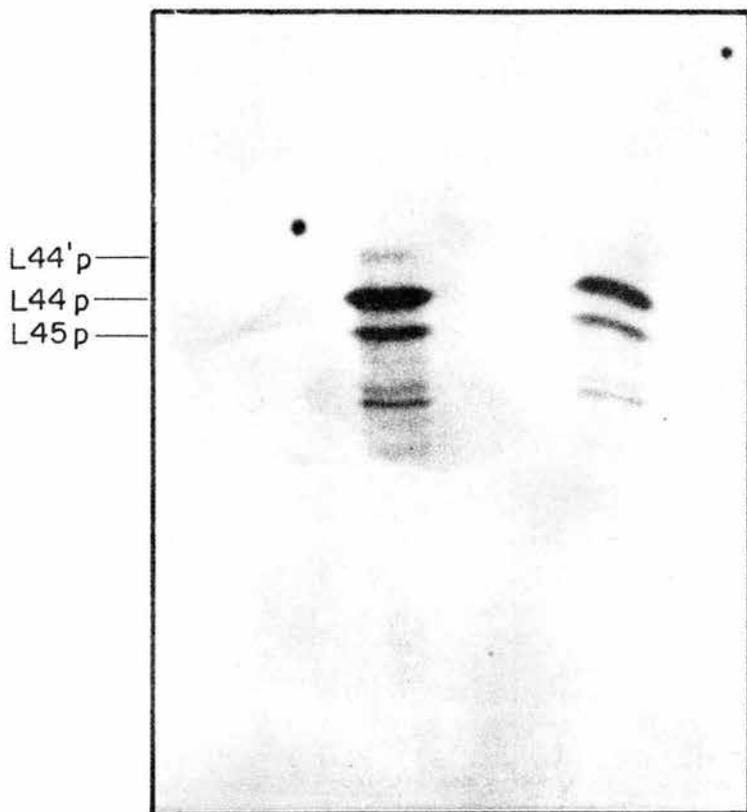


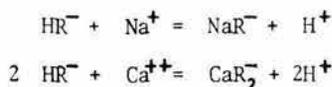
Figura No 26

## DISCUSION

Los diferentes grupos de investigación que se han avocado al estudio de la estructura y función del ribosoma eucariótico, han tropezado con grandes dificultades al intentar aislar y purificar las proteínas ribosomales debido a las características tan especiales que las distinguen. De ahí la importancia de contar con un método de extracción sencillo capaz de proporcionar cantidades suficientes de proteínas aisladas del resto de los componentes celulares.

En el método aquí expuesto, separamos las proteínas ácidas del ribosoma a partir de un lisado celular total por tratamiento con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M y 50 % de etanol, que también produce la liberación de algunas proteínas básicas y pequeñas cantidades de algunas proteínas no ribosomales. También obtenemos aquellas proteínas ácidas que se encuentran libres en el citoplasma. Mediante métodos inmunoquímicos se ha averiguado que la partícula ribosomal pierde un 83 %, aproximadamente, de sus proteínas ácidas ( 98 ).

Para separar las proteínas básicas de la mezcla mencionada en el párrafo anterior, ésta se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en columna de CMC. Esta resina intercambiadora de cationes ( figura 27 ) presenta un principio de acción que se puede expresar como una substitución de cantidades equimolares de iones de carga iguales :



En donde  $\text{R}^-$  representa la matriz de la resina.

De esta manera, todas las proteínas con carga eléctrica positiva se unen al grupo carboximetil, mientras que las proteínas ácidas eluyen libremente.

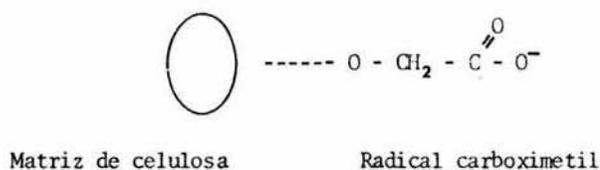


Figura 27. Estructura química de la resina CMC.

Las proteínas L44', L44 y L45 fueron separadas de la mezcla de proteínas ácidas por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE. La reacción de intercambio aniónico que tiene lugar en esta resina ( figura 28 ) se puede representar de la siguiente forma :



donde  $R^+$  representa la matriz de la resina.

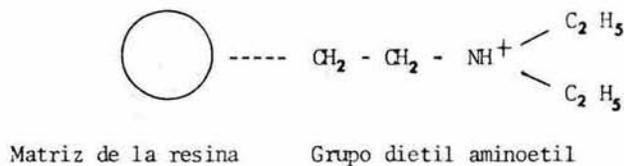


Figura 28. Estructura química de la resina DEAE.

Cuando la resina se encuentra en equilibrio, las cargas positivas de la resina y las del ión acetato ( $Ac^-$ ) se encuentran neutralizadas, al empezar a eluir la solución con las proteínas ácidas, éstas se adhieren al grupo intercambiador de iones ( DEAE ) desplazando a los iones de  $Ac^-$ . Al mismo tiempo la fuerza iónica proporcionada por el gradiente de molaridad aumenta gradualmente en tanto que el gradiente de pH modifica cada vez más la afinidad de las proteínas por el grupo DEAE. El gradiente de molaridad tendrá como función el aumentar la cantidad de aniones para crear una fuerza iónica que les permita competir ventajosamente contra las proteínas por el grupo DEAE ; en tanto que el pH, al ir aumentando los iones  $H^+$ , modifica la carga de las proteínas disminuyendo así su afinidad por el grupo DEAE facilitando así su desprendimiento del grupo intercambiador de iones. De esta manera, por efecto del gradiente mixto aplicado, las proteínas L44', L44 y L45, eluyen a un pH de 5 y a una molaridad de 75 mM aproximada -- mente ( ver figura 23 ).

El método desarrollado en el presente trabajo se puede resumir de la siguiente manera :

- 1.- Inocular la cepa de la levadura en medio YM-1 en dilución 1 : 200 e incubar en agitación constante a 30 °C durante 20 horas.
- 2.- Cosechar el cultivo por centrifugación a 5 000 rpm durante 5 minutos.
- 3.- Lavar las células con agua bidestilada y centrifugar a 5 000 rpm por 5 minutos.
- 4.- Resuspender el paquete celular en solución amortiguadora  $10^{-5}$  hasta una concentración de 5 a 6 g de células, en peso húmedo, por ml de solución.
- 5.- Romper las células en el homogenizador tipo Braun con pulsos de 30 segundos de agitación por 15 segundos de reposo.

- 6.- Colectar el lisado por succión y lavar las perlas de vidrio con solución amortiguadora  $10^{-5}$  hasta que el líquido de lavado sea transparente.
- 7.- Agregar dos volúmenes de ácido acético y 0.1 volúmenes de  $MgCl_2$  1 M, mantener en agitación constante durante 30 minutos.
- 8.- Centrifugar a 5 000 rpm por 10 minutos.
- 9.- Si el volumen del sobrenadante lo requiere, concentrar las proteínas por evaporación en frío, del ácido acético en el rotoevaporador.
- 10.- Dializar el concentrado contra cuatro litros de agua destilada durante 24 horas con tres cambios del líquido como mínimo.  
Nota : El proceso, a partir del punto 2, se realiza a una temperatura de 4 °C.
- 11.- Liofilizar las proteínas.
- 12.- Resuspender las proteínas liofilizadas en un volumen suficiente de solución SP 1.0 pH 8.6 para ajustar entre 150 y 200 D. O. a 260 nm por ml y agitar en hielo durante 20 minutos.
- 13.- Agregar medio volumen de etanol al 95 % agitando durante diez minutos. Al término de éstos, agregar otro medio volumen de etanol al 95 % y dejar agitando cinco minutos.
- 14.- Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos.
- 15.- Agregar al sobrenadante 2.5 volúmenes de acetona a - 20 °C, dejar reposar en el congelador de - 20 °C hasta la formación de los grumos de proteína.
- 16.- Centrifugar a 10 000 rpm durante 20 minutos a temperatura de 4 °C.
- 17.- La pastilla se seca por evaporación de la acetona y se resuspende en solución amortiguadora 1 M.

- 18.- La pastilla resuspendida se pasa a través de una columna de CMC, eluyéndose con solución I CMC.
- 19.- Las fracciones colectadas se dializan contra 4 litros de agua destilada durante 24 horas con tres cambios del líquido.
- 20.- Se liofilizan las muestras de proteína dializada.
- 21.- Las proteínas liofilizadas se resuspenden en solución amortiguadora II DEAEb ( sección 2.3.6 ).
- 22.- La muestra se pasa a través de una columna de DEAE eluyendo con un gradiente mixto de pH decreciente y fuerza iónica creciente formado con 100 ml de solución amortiguadora II DEAEb y 100 ml de solución III DEAE ( apartado 2.3.7 ). En seguida se pasa un gradiente de fuerza iónica formado por 100 ml de solución III DEAE y 100 ml de solución IV DEAE ( sección 2.3.10 ), finalmente, se pasan 200 ml de solución IV DEAE.
- 23.- Igual que el punto 19.
- 24.- Las fracciones eluidas por la columna de DEAE se analizan mediante isoelectroenfoque en placas de gel de poliacrilamida.

Es pertinente hacer notar que la aplicación de este método evita el uso de ultracentrífugas y rotores zonales al no haber necesidad de bajar los ribosomas ni separar éstos en sus subunidades así como el hecho de poderlo utilizar para obtener grandes cantidades de proteínas ribosomales.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes puntos :

- 1.- Las proteínas ribosomales se pueden extraer a partir de extractos celulares totales sin necesidad de separar y fraccionar los ribosomas.
- 2.- El tratamiento con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M y 50 % de etanol produce la separación de las proteínas ribosomales ácidas junto con otras proteínas.
- 3.- Las formas fosforiladas de las proteínas ácidas no se pueden separar entre sí.
- 4.- El método empleado no desfosforila las proteínas. En este aspecto, el proceso de extracción es confiable porque la forma mayoritaria de las proteínas se extrae en forma fosforilada.
- 5.- Este método de extracción obtiene las siguientes cantidades de material en promedio por litro de cultivo :
 

6.39	g	de células en peso húmedo.
0.39	g	de proteína celular total ( PCT ) en peso seco.
5	mg	de proteína SP 1.0 pH 8.6 y
2.25	mg	de proteínas ácidas semipurificadas eluidas a través de la columna de CMC.

## GLOSARIO

- Acetilación                    Introducción de un radical acetilo (un radical monovalente  $\text{CH}_3\text{O}^-$  que resulta cuando el ácido acético pierde un grupo OH) en la molécula de un compuesto que tenga un grupo  $\text{OH}^-$  ó  $\text{NH}_2^-$ .
- AMPc                              AMP cíclico (3',5'-adenosin monofosfato), molécula cuyo grupo fosfato esta ligado internamente por medio de un enlace fosfodiéster entre los átomos 3,5 para formar una molécula cíclica. Es activo en la regulación de la expresión génica en células bacterianas y eucarióticas. El AMPc se forma a partir del ATP por medio de la enzima adenilciclase.
- ARN                                Acido nucleico formado a partir de ADN cromosómico que interviene en la síntesis de proteínas ; esta compuesto por cadenas de fosfato, purinas y pirimidinas. Es el material genético de muchos virus. Se conocen tres clases :
- ARNr    : Acido Ribonucleico Ribosomal.
- ARNt    : Acido Ribonucleico de Transferencia o Adaptador.
- ARNm    : Acido Ribonucleico Mensajero

ARNm	Molécula compleja de una sola cadena formada de nucleótidos repetitivos, esta relacionado con el proceso de la transcripción del código genético en una estructura molecular proteínica.
ARNm monocistrónico	Moléculas que presentan un sólo sitio de iniciación y uno de terminación por lo que codifican para un sólo producto polipeptídico primario. Es característico de organismos eucarióticos.
ARNr	ARN que se encuentra en los ribosomas, constituye hasta el 65 % de la masa de los ribosomas. En <u>E. coli</u> se encuentran tres clases con un coeficiente de sedimentación de 23 s, 16 s y 5 s. En eucariotes existen generalmente cuatro tipos de ARN : 5s, 5.8 s, 18 s y 28 s.
ARNt	Un tipo de ARN que se encuentra en el citoplasma del cual hay por lo menos sesenta variedades, más de uno para cada aminoácido. Este ARN se une con su aminoácido específico y lo lleva al ribosoma durante la síntesis de proteínas.
ATP	Trifosfato de adenosina, es una molécula que consta de una purina, un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfato. Gran cantidad de energía para las funciones biológicas se almacena en los enlaces de alta energía que une los grupos fosfato y se libera cuando uno o dos fosfatos se separan de la molécula de ATP.
Autorradiografía	Método gráfico para reproducir un compuesto que contiene radioelementos cuyas radiaciones

impresionan la placa fotográfica, dando un reparto de la sustancia radioactiva.

Carbamilación	Introducción de un radical carbamilo (un radical $\text{NH}_2\text{CO}^-$ derivado del ácido carbámico $\text{NH}_2\text{COOH}$ ) en la molécula de un compuesto que tenga un grupo $\text{NH}_2^-$ .
Celulosa	Polímero formado por moléculas de glucosa (B-D-glucopiranosas) unidas por enlaces $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) para formar cadenas no ramificadas reforzadas por enlaces cruzados de puente de hidrógeno. Su fórmula general es $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ en la que n es un número muy elevado que llega a varios miles.
Coefficiente de sedimentación	Unidad Svedberg (s), la medida de la rapidez a la que una molécula sedimenta en un campo centrífugo determinado.
Dehiscencia	Fenómeno a favor del cual una cápsula se abre en forma natural al llegar a su madurez liberando o exponiendo su contenido.
Diálisis	Paso de sustancias disueltas a través de membranas semipermeables, lo que permite separarlas de las sustancias que las acompañan en estado coloidal.
Diploide	Término aplicado a la célula que contiene un par de cada tipo de cromosomas.
Electroforesis	Técnica mediante la cual las moléculas orgánicas cargadas iónicamente se pueden separar e identificar de acuerdo con sus movimientos característicos en un campo eléctrico. Especialmente útil

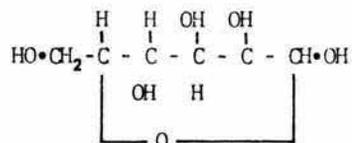
para separar un aminoácido de otro o una base de otra en un hidrolizado de proteínas o ácidos nucleicos.

Eucariótico	Aplicado a células que tienen núcleo con membrana; presentan características muy particulares que las distinguen de las procariotas, algunas de estas características se encuentran esbozadas en la Tabla que se presenta al final del glosario.
Factores de elongación	Proteínas específicas necesarias para la formación de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos durante la síntesis proteínica. En procariotes se conocen tres ; EF-TU, EF-Ts y EF-G, mientras que en eucariotes dos ; eEF-1 y eEF-2.
Factores de iniciación	Se les conoce así a las proteínas necesarias para iniciar el proceso de síntesis de proteínas.
Factores de liberación	Proteínas específicas que actúan durante la terminación de la síntesis proteínica mediante la interpretación de señales genéticas de detención.
Fosforilación	Reacción química mediante la cual se añade fosfato a un compuesto, por ejemplo, la formación de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico.
GDP	Difosfato de guanosina, se origina a partir de GMP cuando éste capta un fosfato por medio de una reacción de fosforilación o por hidrólisis del GTP.

Gel	Una de las formas en que puede presentarse un coloide. En el gel predomina la fase sólida sobre la líquida y se llega a él a partir de una solución por coagulación.
Glucanas	Nombre dado a los polisacáridos formados exclusivamente por la glucosa como sucede con la celulosa o el almidón.
GTP	Trifosfato de guanosina que se forma a partir de GDP por medio de una transferencia de fosfato. Sirve como fuente energética para la síntesis de proteínas en los ribosomas y en diversos sistemas que requieren energía.
Haploide	Condición en la cual una célula tiene solamente una copia de cada gen. La mayoría de los organismos superiores tienen dos copias de genes para cualquier característica. Sin embargo, muchos organismos como las bacterias, paramecium y la mayoría de las algas son haploides durante la mayor parte de su periodo de vida.
Heterotrófico	Un organismo que depende de su ambiente para suplirse de materiales nutritivos para construir sus propios constituyentes orgánicos y también sus necesidades generales de energía.
Liofilización	Desecación de un material, enfriado a muy baja temperatura, mediante elevado vacío, que origina la sublimación del disolvente. Así se conservan alimentos, productos farmacéuticos y materiales biológicos.

Mananas

Polímero de manosa,  $C_6H_{12}O_6$ , son polisacáridos de reserva que se encuentran muy generalizados en el reino vegetal. Estan constituidos por la D-manosa mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  glucosídicos, su forma estructural es la siguiente :



Meiosis

Un proceso de división celular sin duplicación de cromosomas, de tal manera que cada una de las células hijas, contiene la mitad de los cromosomas que tenía la célula madre.

pH

Es el número que describe la acidez o alcalinidad de una solución acuosa. El intervalo habitual de pH es aproximadamente desde 1 para el HCl 0.1 N hasta 13 para el NaOH 0.1 N .El pH fué definido como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno.

Poliacrilamida

Macromolécula que contiene el grupo  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CONH}_2)-$ , la poliacrilamida es una resina soluble en agua, utilizada como floculante de líquidos turbios.

Proteína

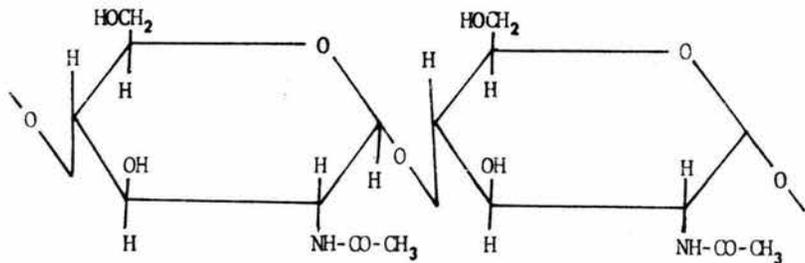
Polímero complejo que contiene carbono, hidrógeno, nitrógeno y generalmente azufre, formado por cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos  $(-\text{CO}-\text{NH}-)$ . Su peso molecular oscila entre 6 000 (insulina) y más de 40 millones (virus del mosaico del tabaco).

Punto isoeléctrico

Aquel valor de pH al cual una molécula no posee carga eléctrica y por lo tanto, es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico. A este pH una molécula de proteína muestra un mínimo de solubilidad.

Quitina

Polímero formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  glucosídicos. Es un polisacárido estructural de muchos organismos. Se encuentra en mayor abundancia en las caparazones de los crustáceos y en los exoesqueletos de los insectos.



N-Acetilglucosamina

N-Acetilglucosamina

Ribonucleasa (RNasa)

Enzima capaz de romper los enlaces fosfodiéster del ARN.

RNasa A : rompe después del nucleótido Uridina-5-fosfato o Citidina-5-fosfato.

RNasa T2 : rompe a nivel del nucleótido Adenina-5-fosfato.

Ribosoma

Pequeñas partículas intracelulares compuestas por proteínas y altas concentraciones de ARN. Se encuentran ya sea libres en el citoplasma o adheridas a

la superficie del retículo endoplásmico rugoso y son los centros de la síntesis de proteínas.

- Saprófito** Organismo vegetal heterótrofo que se nutre a expensas de animales o plantas muertos y de toda suerte de restos orgánicos en descomposición o descompuestos.
- SDS** Duodecil sulfato de sodio, detergente aniónico que confiere cargas negativas a las proteínas. El SDS disocia las proteínas en sus cadenas polipeptídicas constituyentes. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS separa las cadenas polipeptídicas de acuerdo a su P.M.
- Transcripción** Procesamiento de la información genética contenida en una molécula de ADN durante el cual los genes son copiados en ARN para producir ARN mensajeros, ribosomales y de transferencia.

Tabla conteniendo algunas características esenciales de células procariotas y eucariotas.

	CELULA PROCARIOTA	CELULA EUCARIOTA
	Bacterias, algas verde-azúles (cianofíceas)	La mayoría de las algas, plantas y animales superiores.
Membrana nuclear	-	+
División mitótica	-	+
Dimensión aproximada	de 1 a 10 u	de 10 a 100 u
Cromosomas con histonas	-	+
Mitocondrias	-	+
Ribosomas	70 s	80 s (citoplasmáticos) 70 s (orgánulos)
Presencia +	Ausencia -	

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Laskin, Allen I. 1977. CRC Handbook of Microbiology. Eds. H. A. Lechevalier & A. I. Laskin. 2nd. Ed. Vol. II. West Palm Beach, Fla.
- 2.- Zimmermann W. 1976. Evolución Vegetal. Editorial Omega. 2a. Edición. pp. 49-50. Barcelona, España.
- 3.- Cabid E. , Roberts R. y B. Bowers. 1982. Synthesis of the Yeast Cell Wall and Its Regulation. Ann. Rev. Biochem. 51 : 763.
- 4.- Bold H. C. , Alexopoulos C. y T. Delevoras. 1980. Morphology of Plants and Fungi. 4th. Ed. Harper & Row Edit. pp. 613,667. New York, USA.
- 5.- Duntze W. , Mackay V. y R. Manney. 1970. "Saccharomyces cerevisiae": A Diffusible Sex Factor. Science. 168 : 1 472.
- 6.- Duntze W. , Stötzler D. , Bücking-Throm E. y S. Kalbitzer. 1973. Purification and Partial Characterization of  $\alpha$ -Factor, a Mating-Type Specific Inhibitor of Cell Reproduction from "Saccharomyces cerevisiae". Eur. J. Biochem. 35 : 357.
- 7.- Palade G. E. 1955. A Small Particulate Component of the Cytoplasm. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 1 : 59.
- 8.- Chao F. C. 1957. Dissociation of Macromolecular Ribonucleoprotein of Yeast. Arch. Biochem. Biophys. 70 : 426.
- 9.- Waller J. P. y J. I. Harris. 1961. Studies on the Composition of the Protein from "Escherichia coli" Ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 47 : 18.

- 10.- Kaltschmidt E. , Dzionara M. y H. G. Wittmann. 1970. Ribosomal Proteins. XV. Amino Acid Compositions of Isolated Ribosomal Proteins from 30 s and 50 s Subunits of "Escherichia coli". Molec. Gen. Genetics. 109 : 292.
- 11.- Kaltschmidt E. y H. G. Wittmann. 1970. Ribosomal Proteins. XII. Number of Proteins in Small and Large Ribosomal Subunits of "Escherichia coli" as Determined by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67 : 1 276.
- 12.- Wittmann H. G. y cols. 1971. Correlation of 30 s Ribosomal Proteins of "Escherichia coli" Isolated in Different Laboratories. Molec. Gen. Genetics. 111 : 327.
- 13.- Traub P. y M. Nomura. 1968. Structure and Function of "E. coli" Ribosomes. V. Reconstitution of Functionally Active 30 s Ribosomal Particles from ARN and Proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 59 : 777.
- 14.- Nomura M. y V. A. Erdmann. 1970. Reconstitution of 50 s Ribosomal Subunits from Dissociated Molecular Components. Nature. 228 : 744.
- 15.- Fahnestock S. , Erdmann V. y M. Nomura. 1973. Reconstitution of 50 s Ribosomal Subunits from Protein-Free Ribonucleic Acid. Biochemistry. 12 : 220.
- 16.- Nomura M. 1970. Bacterial Ribosome. Bacteriol. Rev. 34 : 228.
- 17.- Nomura M. 1973. Assembly of Bacterial Ribosomes. Science. 179 : 864.
- 18.- Tischendorf G. W. , Zeichhart H. y G. Stöffler. 1975. Architecture of the "Escherichia coli" Ribosome as Determined by Immune Electron Microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 4 820.
- 19.- Boublik M. , Hellmann W. y H. E. Roth. 1976. Localization of Ribosomal Proteins L7/L12 in the 50 s Subunit of "Escherichia coli" Ribosomes by Electron Microscopy. J. Mol. Biol. 107 : 479.

- 20.- Lake J. A. 1976. Ribosome Structure Determined by Electron Microscopy of "Escherichia coli" Small Subunits, Large Subunits and Monomeric Ribosomes. J. Mol. Biol. 105 : 131.
- 21.- Boublik M. , Hellmann W. y Kleinschmidt A. K. 1977. Size and Structure of "E. coli" Ribosomes by Electron Microscopy. Cytobiologie. 14 : 293.
- 22.- Wittmann H. G. 1983. Architecture of Prokaryotic Ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 52 : 35
- 23.- Nomura M. , Gourse R. y G. Baughman. 1984. Regulation of the Synthesis of Ribosomes and Ribosomal Components. Ann. Rev. Biochem. 53 : 75.
- 24.- Brosius J. , Palmer M. L. ,Kennedy P. J. y H. F. Noller. 1978. Complete Nucleotide Sequence of a 16 s Ribosomal RNA Gene from "Escherichia coli". Proc. Natl. Sci. USA. 75 : 4 801.
- 25.- Brownlee G. C. , Sanger F. y B. G. Barrell. 1967. Molecular Structure. Nature. 215 : 735.
- 26.- Brosius J. , Dull T. J. y H. F. Noller. 1980. Complete Nucleotide Sequence of a 23 s Ribosomal RNA Gene from "Escherichia coli". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 201.
- 27.- Zamecnik P. C. y E. B. Keller. 1954. Relation between Phosphate Energy Donors and Incorporation of Labeled Amino Acids into Proteins. J. Biol. Chem. 209 : 337.
- 28.- Littlefield J. W. , Keller E. B. y cols. 1955. Studies on Cytoplasmic Ribonucleoprotein Particles from the Liver of the Rat. J. Biol. Chem. 217 : 111.
- 29.- McQuillen K. , R. B. Roberts y R. J. Britten. 1959. Synthesis of Nascent Protein by Ribosomes in "Escherichia coli" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 45 : 1 437.

- 30.- Maitra U. , Stringer E. A. y A. Chaudhuri. 1982. Initiation Factors in Protein Biosynthesis. Ann. Rev. Biochem. 51 : 869.
- 31.- Safer B. 1983. 2B or Not 2B : Regulation of the Catalytic Utilization of eIF-2. 33 : 7.
- 32.- Zinker R. 1986. El Proceso de la Traducción. en "Temas Selectos de Biología Celular". Lopéz Revilla R. , Tsutsumi V. y Frixione E. Eds. SEP/COSNET/CINVESTAV. pp. 351-367. México.
- 33.- Lewin Benjamin M. 1985. Genes II. John Wiley & Sons Eds. 2nd. Ed. New York, USA.
- 34.- Weinberg R. A. y S. Penman. 1970. Processing of 45 s Nucleolar ARN. J. Mol. Biol. 47 : 169.
- 35.- Loening U. 1968. Molecular Weights of Ribosomal ARN in Relation to Evolution. J. Mol. Biol. 38 : 355.
- 36.- Ira G. Wool. 1980. The Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes. en "Ribosomes : Structure, Function and Genetics". G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, L. Kahan y M. Nomura Eds. pp. 797-823. University Park Press, Baltimore.
- 37.- Nazar R. N. , Sitz T. O. y Bush H. 1975. Structural Analyses of Mammalian Ribosomal Ribonucleic Acid and Its Precursors. J. Biol. Chem. 250 : 8 591.
- 38.- Warner J. R. y R. Soeiro. 1967. Nascent Ribosomes from HeLa Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58 : 1 984.
- 39.- Liau M. C. y R. P. Perry. 1969. Ribosome Precursor Particles in Nucleoli. J. Cell Biol. 42 : 272.
- 40.- Kumar A. y Subramanian A. R. 1975. Ribosome Assembly in HeLa Cells : Labeling Pattern of Ribosomal Proteins by Two-Dimensional Resolution. J. Mol. Biol. 94 : 409.
- 41.- Warner J. R. , Tushinski R. J. y P. J. Wejksnora. 1980. Coordination of RNA and Proteins in Eukaryotic Ribosome Production. Ver referencia 36. pp. 889.

- 42.- Nomura Y. , Blobel G. y D. Sabatini. 1971. Structure of Liver Ribosomes Studied by Negative Staining. J. Mol. Biol. 60 : 303.
- 43.- Lake J. A. , Sabatini D.D. y Nomura Y. 1974. Ribosome Structure as Studied by Electron Microscopy. en "Ribosomes". Nomura M. , Tisieres A. y Lengyel P. Eds. pp. 543-557. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York.
- 44.- Emanuilov I. , Sabatini D. D. , Lake J. A. y Freienstein C. 1978. Localization of Eukaryotic Initiation Factor 3 on Native Small Ribosomal Subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 1 389.
- 45.- Boublik M. y Hellmann W. 1978. Comparison of "Artemia salina" and "Escherichia coli Ribosome Structure by Electron Microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 2 829.
- 46.- Trachsel H. , Erni B. , Schreier M. H. y Staehelin T. 1977. Initiation of Mammalian Protein Synthesis. II. The Assembly of the Initiation Complex with Purified Initiation Factors. J. Mol. Biol. 116 : 755.
- 47.- Jagus R. , Anderson W. F. y B. Safer. 1981. The Regulation of Initiation of Mammalian Protein Synthesis. Prog. Nucleic. Acids. Res. and Mol. Biol. 25 : 127.
- 48.- Benne R. , Brown-Luedi M. L. y Hershey J. B. 1978. Purification and Characterization of Protein Synthesis Initiation Factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D and eIF-5 from Rabbit Reticulocytes. J. Biol. Chem. 253 : 3 070.
- 49.- Peterson D. T. , Safer B. y Merrick W. C. 1979. Role of Eukaryotic Initiation Factor 5 in the Formation of 80 s Initiation Complex. J. Biol. Chem. 254 : 7 730.
- 50.- Russell D. W. y Spremulli L. L. 1979. Purification and Characterization of a Ribosome Dissociation Factor (Eukaryotic Initiation Factor 6) from Wheat Germ. J. Biol. Chem. 254 : 8 796.

- 51.- Russell D. W. y Spremulli L. L. 1980. Mechanism of Action of the Wheat Germ Ribosome Dissociation Factor : Interaction with the 60 s Subunit. Arch. Biochem. Biophys. 201 : 518.
- 52.- Cohn P. y Simson P. 1963. Basic and the Other Proteins in Microsomes of Rat Liver. Biochem. J. 88 : 206.
- 53.- Low R. B. y Wool I. G. 1967. Mammalian Ribosomal Protein : Analysis by Electrophoresis on Polyacrylamide Gel. Science. 155 : 330.
- 54.- Cohn P. 1967. Properties of Ribosomal Proteins from Two Mammalian Sources. J. Biochem. 102 : 735.
- 55.- Bielka H. y Welfle H. 1968. Characterization of Ribosomal Proteins from Different Tissues and Species of Animals by Electrophoresis on Polyacrylamide Gel. Molec. Gen. Genetics. 102 : 128.
- 56.- Kanai K. , Castles J. J., Wool I. G. y cols. 1969. The Proteins of Liver and Muscle Ribosomal Subunits : Partial Separation by Carboxymethyl-Celulose Column Chromatography. FEBS Letters. 5 : 68.
- 57.- Westermann P. H. , Bielka H. y Böttger M. 1969. Studies on Proteins of Animal Ribosomes. I. Separation of Ribosomal Proteins from Rat Liver by Chromatography on CM-Cellulose and Some Protein Components. Molec. Gen. Genetics. 104 : 157.
- 58.- Westermann P. H. , Bielka H. y Böttger M. 1971. Studies on Proteins of Animal Ribosomes. VII. Isolation of Proteins from Rat Liver Ribosomes, their Molecular Weights, Amino Acid Compositions and Secondary Structure. Molec. Gen. Genetics. 111 : 224.
- 59.- Welfle H. , Bielka H. y Böttger M. 1969. Studies on Proteins of Animal Ribosomes. II. Separation of Ribosomal Proteins from Rat Liver by Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Some Properties of the Protein Fractions. Molec. Gen. Genetics. 104 : 165.
- 60.- Gould H. J. 1970. Proteins of Rabbit Reticulocyte Ribosomal Subunits. Nature. 227 : 1 145.

- 61.- Warner J. R. 1971. The Assembly of Ribosomes in Yeast. J. Biol. Chem. 246 : 447.
- 62.- Westermann P. y Bielka H. 1973. Studies on Proteins of Animal Ribosomes. XV. Proteins of the Small Subunit of Rat Liver Ribosomes : Isolation, Amino Acid Composition, Tryptic Peptides and Molecular Weights. Molec. Gen. Genet. 126 : 349.
- 63.- Terao K. y Ogata K. 1972. Characterization of the Proteins of the Small Subunits of Rat Liver Ribosomes. Biochim. Biophys. Acta. 285 : 473.
- 64.- Collatz E. , Lin A. , Stoffler G. y Wool I. G. 1976. Group Fractionation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. J. Mol. Chem. 251 : 1 808.
- 65.- Wool I. G. y Stoffler G. 1974. Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes. Ver referencia 43. pp. 417-460.
- 66.- Lin A. , Collatz E. y Wool I. G. 1976. Micro-Scale Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Ribosomal Proteins. Molec. Gen. Genet. 144 : 1.
- 67.- Kaltschmidt E. y Wittmann H. G. 1970. Ribosomal Proteins. VII. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins. Anal. Biochem. 36 : 401.
- 68.- Hardy S. J. S. , Kurland C. G. y cols. 1969. The Ribosomal Proteins of "Escherichia coli". I. Purification of the 30 s Ribosomal Proteins. Biochemistry. 8 : 2 897.
- 69.- Mora G. , Donner D. y cols. 1971. Purification and Characterization of 50 s Ribosomal Proteins of "Escherichia coli". Molec. Gen. Genetics. 112 : 229.
- 70.- Hindennach I. , Stöffler G. y Wittmann H. G. 1971. Ribosomal Proteins. Isolation of the Proteins from 30 s Ribosomal Subunits of "Escherichia coli". Eur. J. Biochem. 23 : 7.

- 71.- Hindennach L. , Kaltschmidt E. y Wittmann H. G. 1971. Ribosomal Proteins. Isolation of Proteins from 50 s Ribosomal Subunits of "Escherichia coli". Eur. J. Biochem. 23 : 12.
- 72.- Collatz E. , Wool I.G. , Lin A. y Stöffler G. 1976. The Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. J. Biol. Chem. 251 : 4 666.
- 73.- Tsurugi K. , Collatz E. , Wool I. G. y Lin A. 1976. Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. J. Biol. Chem. 251 : 7 940.
- 74.- Tsurugi K. , Collatz E. , Todokoro K. y Wool I. G. 1977. Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. J. Biol. Chem. 252 : 3 961.
- 75.- Collatz E. , Ulbrich y cols. 1977. Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. J. Biol. Chem. 252 : 9 071.
- 76.- Tsurugi K. , Collatz E. , Todokoro K. y cols. 1978. Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. J. Biol. Chem. 253 : 946.
- 77.- Lin A. , Tanaka T. y Wool I. G. 1979. Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins : Purification and Characterization of S25 and L16. Biochemistry. 18 : 1 634.
- 78.- Wool I. G. 1979. The Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 48 : 719.
- 79.- Kabat D. 1970. Phosphorylation of Ribosomal Proteins in Rabbit Reticulocytes. Characterization and Regulatory Aspects. Biochemistry. 9 : 4 160.
- 80.- Loeb J. E. y Blat C. 1970. Phosphorylation of some Rat Liver Ribosomal Proteins and Its Activation by Cyclic AMP. FEBS Letters. 10 : 105.
- 81.- Eil Charles y Wool I. G. 1973. Function of Phosphorylated Ribosomes. J. Biol. Chem. 248 : 5 130.
- 82.- Krytosek D. y cols. 1974. Phosphorylation of Ribosomal Proteins in Eukaryotes. en "Ribosomes". Ver referencia 43. pp. 855-870.

- 83.- Ochoa S. y De Haro C. 1979. Regulation of Protein Synthesis in Eukaryotes. Ann. Rev. Biochem. 48 : 549.
- 84.- BÉlanger G. , Bellemare G. y Lemieux G. 1979. Ribosomal Phospho - proteins in "Physarum polycephalum". Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 : 862.
- 85.- Larsen A. y Sypherd P. S. 1980. Physiological Control of Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 in "Mucor racemosus". J. Bacteriol. 141 : 20.
- 86.- Becker-Ursic D. y Davies J. 1976. "In vivo" and "In vitro" Phosphorylation of Ribosomal Proteins by Protein Kinases from "Saccharomyces cerevisiae". Biochemistry. 15 : 2 289.
- 87.- Hebert J. , Pierre M. y Loeb J. E. 1977. Phosphorylation "in vitro" and "in vivo" of Ribosomal Proteins from "Saccharomyces cerevisiae". Eur. J. Biochem. 72 : 167.
- 88.- Kristiansen K. , Plesner P. y Kruger A. 1978. Phosphorylation "in vivo" of Ribosomes in "Tetrahymena pyriformis". Eur. J. Biochem. 83 : 395.
- 89.- Van Agthoven A. J. , Maasen J. A. y Møller W. 1977. Structure and Phosphorylation of an Acidic Protein from 60 s Ribosomes and Its Involvement in Elongation Factor-2 Dependent GTP Hydrolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77 : 989.
- 90.- Van Agthoven A. J. , Kriek J. , Amons R. y Møller W. 1978. Isolation and Characterization of the Acidic Phosphoproteins of 60 s Ribosomes from "Artemia salina" and Rat Liver. Eur. J. Biochem. 91 : 553.
- 91.- Trewavas A. 1973. The Phosphorylation of Ribosomal Protein in "Lemna minor". Plant Physiol. 51 : 760.
- 92.- Gressner A. M. y Wool I. G. 1974. The Stimulation of the Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 by Cycloheximide and Puromycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60 : 1 482.

- 93.- Kaerlin M. y Horak I. 1976. Phosphorylation of Ribosomal Proteins in HeLa Cells Infected with Vaccinia Virus. Nature. 259 : 150.
- 94.- Mets L. J. y Bogorad L. 1974. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis : An Improved Method for Ribosomal Proteins. Anal. Biochem. 57 : 200.
- 95.- Otaka E. y Kobata K. 1978. Yeast Ribosomal Proteins. Molec. Gen. Genet. 162 : 259.
- 96.- Warner J. R. 1982. The Yeast Ribosome : Structure, Function and Synthesis. en "Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Metabolism and Gene Expression". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold. Spring Harbor, New York. USA.
- 97.- Gorenstein Charles y Warner J. R. 1976. Coordinate Regulation of the Synthesis of Eukaryotic Ribosomal Proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 : 1 547.
- 98.- Vidales J. F. 1982. Estudio de la Estructura y Función de Proteínas Ribosómicas de "*Saccharomyces cerevisiae*". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- 99.- Wittmann H. G. 1974. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Separation of Ribosomal Proteins. Methods Enzimol. 30 : 497.
- 100.- Zinker S. y Warner J. R. 1976. The Ribosomal Proteins of "*Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem. 251 : 1 799.
- 101.- Campos F. 1983. Purificación y Caracterización Química de la Fosfoproteína Ribosomal P1 de "*Saccharomyces cerevisiae*". Tesis de Licenciatura. Biología. ENEPI. UNAM. México.
- 102.- Serrano H. J. 1986. Caracterización Electroforética de la Fosfoproteína Ribosomal P1 de "*Saccharomyces cerevisiae*". Tesis de Licenciatura. Biología. ENEPI. UNAM. México.

- 103.- Martínez M. N. 1988. Comunicación personal.
- 104.- Sanchez-Madrid y Ballesta J. P. G. 1979. An Acidic Protein Associated to Ribosomes of "Saccharomyces cerevisiae". Changes During Cell Cycle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91 : 643.
- 105.- Sánchez-Madrid F. , Reyes R. , Conde P. y Ballesta J. P. G. 1979. Acidic Ribosomal Proteins from Eukariotic Cells. Effect on Ribosomal Functions. Eur. J. Biochem. 98 : 409.
- 106.- Vidales F. J. , Saenz Robles M. T. y Ballesta J. P. G. 1984. Acidic Proteins of the Large Ribosomal Subunit in "Saccharomyces cerevisiae" Effect of Phosphorylation. Biochemistry. 23 : 390.
- 107.- Terhorst C. , Möller W. , Laursen R. y Wittmann-Liebold B. 1973. The Primary Structure of an Acidic Protein from 50 s Ribosomes of "Escherichia coli" which is Involved in GTP Hydrolysis Dependent on Elongation Factors G and T. Eur. J. Biochem. 34 : 138.
- 108.- Liljas A. 1982. Structural Studies of Ribosomes. Prog. Biophys. Molec. Biol. 40 : 161.
- 109.- Sánchez-Madrid F. , Vidales F. J. y Ballesta J. P. G. 1981. Functional Role of Acidic Ribosomal Proteins. Interchangeability of Proteins from Bacterial and Eukaryotic Cells. Biochemistry. 20.: 3 263.
- 110.- Ballesta J. P. G. y Vazquez D. 1972. Reconstitution of the 50 s Ribosome Subunit. Role of Proteins L 7 and L 12 in the GTPase Activities. Site of Action of Thiostrepton. FEBS Letters. 28 : 337.
- 111.- Michalski C. J. y Sells B. H. 1975. Molecular Morphology of Ribosomes : Structural Alteration of 50 s Subunits Following the Removal of Proteins L7 and L12. FEBS Letters. 58 : 85.
- 112.- Pettersson I. y Kurland C. G. 1980. Ribosomal Protein L7/L12 is Required for Optimal Translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 4 007.
- 113.- Glick B. R. 1977. The Role of "Escherichia coli" Ribosomal Proteins L7 and L12 in Peptide Chain Propagation. FEBS Letters. 73 : 1.

- 114.- Zinker R. S. 1980. P5/P5' the Acidic Ribosomal Phosphoproteins from "Saccharomyces cerevisiae". Biochim. Biophys. Acta. 606 : 76.
- 115.- Issinger Olaf-Georg. 1977. Phosphorylation of Acidic Ribosomal Proteins from Rabbit Reticulocytes by a Ribosome-Associated Casein Kinase. Biochim. Biophys. Acta. 477 : 185.
- 116.- Matheson A. T. , Möller W. , Amons R. y Yaguchi M. 1980. Comparative Studies on the Structure of Ribosomal Proteins, with Emphasis on the Alanine-Rich, Acidic Ribosomal, 'A' Protein. en "Ribosomes". Ver referencia 36. pp. 297.
- 117.- Hamel E. , Koka M. y Nakamoto T. 1972. Requirement of an "Escherichia coli" 50 s Ribosomal Protein Component for Effective Interaction of the Ribosome with T and G Factors and with Guanosine Triphosphate. J. Biol. Chem. 247 : 805.
- 118.- Lowry O. H. , Rosebroogh N. J. y cols. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.J. Biol. Chem. 193 : 265.
- 119.- Rubin G. M. 1973. The Nucleotide Sequence of "Saccharomyces cerevisiae" 5.8 s Ribosomal Ribonucleic Acid. J. Biol. Chem. 248 : 3 860.