



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DE IZTACALA

**EXPRESION DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS
RIBOSOMALES ACIDAS EN LAS CELULAS PETITE
DE S. cerevisiae**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O**

P R E S E N T A :

ANA LILIA PALMA CISNEROS

DIRECTOR DE TESIS :

DR. SAMUEL SINKER RUZAL

CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN.



MEXICO, 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES:

LIC. ERNESTO RENE PALMA GALLEGOS
SRA. MA. DOLORES CISNEROS DE PALMA

Les dedico este trabajo en mínima
recompensa a su confianza, desvelos,
esfuerzos y sobre todo por haberme
transmitido una gran fortaleza.

A MI HERMANA PATY:

Por haberme estimulado
siempre a buscar la superación.

A MI HERMANA CLAUDIA, A ROBERTO Y
AL BEBE.

Por su ejemplo a seguir y el
apoyo brindado.

AL DR. SAMUEL ZINKER RUZAL:

**Agradezco su valiosa ayuda,
sabios consejos y el apoyo
constante en la elaboración
de esta tesis y sobre todo
agradezco su amistad y su
gran calidad humana.**

A MIS ABUELOS,
TIOS Y
PRIMOS.

A MIS MAESTROS, AMIGOS Y COMPAÑEROS
DE LABORATORIO Y TODAS AQUELLAS
PERSONAS QUE EN UNA U OTRA FORMA ME
PROPORCIONARON SU AYUDA PARA LA
ELABORACION DEL PRESENTE TRABAJO.

I N D I C E

INDICE	i
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	v
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xii
ANTECEDENTES	1
Las levaduras	1
El Ribosoma	4
Componentes del Ribosoma	6
Biogénesis del ribosoma en <u>S. cerevisiae</u>	9
Proteínas híbridas como resultado de fusiones génicas	9
ELISA	12
INTRODUCCION	15
Proteínas ribosomales	15
Proteínas ribosomales ácidas de <u>E. coli</u>	15
Proteínas ribosomales ácidas eucarióticas	17
Proteínas ribosomales ácidas de <u>S. cerevisiae</u> ...	24
Objetivo del trabajo	28
MATERIAL BIOLÓGICO	29
1.1 Cepas de <u>E. coli</u>	29

INDICE

1.2 Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	31
1.3 Conejos	31
MEDIOS DE CULTIVO	32
2.1 YPD.- Medio rico para crecer levaduras	32
2.2 YPD-AGAR.- Medio rico para crecer colonias aisladas de levadura	34
2.3 YPG-AGAR.- Medio rico sólido para la selección de colonias petite	34
2.4 SD.- Medio mínimo de composición definida suplementado con aminoácidos y bases nitrogenadas para el crecimiento de levaduras	35
2.5 SD-AGAR.- Medio mínimo para crecer colonias de levadura aisladas	36
2.6 LB AMPICILINA.- Medio para crecer cepas bacterianas	36
2.7 DROPOUT SOLIDO.- Medio mínimo para aislar clonas de levaduras transformadas	37
2.8 M63 SOLIDO.- Medio para seleccionar clonas de levadura transformadas que expresan al gen Lac Z	38

INDICE

MÉTODOS	40
3. Mini-preparaciones para la obtención de plásmidos	40
4. Gel de agarosa para la electroforesis de los plásmidos	44
5. Uso de enzimas de restricción	45
6. Obtención de levaduras deficientes respiratorias " Petite "	46
7. Método para transformar a las levaduras	48
8. Purificación de ribosomas	50
9. Cuantificación de la beta-galactosidasa	51
10. Determinación de proteínas	54
11. Inmunización de conejos	56
12. Obtención del suero	58
13. Inmunodifusión	58
14. ELISA	63
ELISA indirecto	64
ELISA de inhibición	66
RESULTADOS	69
Cuantificación y caracterización de los plásmidos	69
Fenotipo de las células petite	70
Transformación de las levaduras grandes y petite	76

INDICE

iv

Cantidad de ribosomas en función del estadio de crecimiento de las levaduras	82
Cuantificación de la beta-galactosidasa en las fracciones ribosomal y S100	84
Prueba de inmunodifusión para detectar anticuerpos de conejo contra la beta-galactosidasa	89
Ensayo de ELISA indirecto	95
Cuantificación de beta-galactosidasa en las fracciones ribosomal y S100 mediante ELISA de inhibición	95
DISCUSION	106
CONCLUSIONES	115
GLOSARIO	117
REACTIVOS	122
BIBLIOGRAFIA	125

F I G U R A S

FIGURA 1 .- Ciclo reproductivo <u>de S. cerevisiae</u>	3
FIGURA 2.- Microscopia electronica de <u>S. cerevisiae</u>	5
FIGURA 3.- Electromicrografia de los ribosomas de eubacteria, arqueobacteria, eocitos y eucariotes tipicos	7
FIGURA 4.- Ribosoma de <u>S.cerevisiae</u>	8
FIGURA 5.- Proceso de biogénesis del ribosoma de un eucariote tipico	10
FIGURA 6.- Esquema de la selección directa de recombinantes	13
FIGURA 7.- Proteínas ribosomales básicas, separadas mediante electroforesis bidimensional	16
FIGURA 8.- Ribosoma de <u>E. coli</u>	18
FIGURA 9.- Secuencia primaria de las proteínas ácidas ribosomales de tipo P1	22
FIGURA 10.- Secuencia primaria de las proteínas ácidas ribosomales de tipo P2	23
FIGURA 11.- Secuencia de aminoácidos de las proteínas ácidas del ribosoma de <u>S. cerevisiae</u>	26
FIGURA 12.- Crecimiento de las cepas de E. coli en medio de ampicilina suplementado con x-gal	30
FIGURA 13.- Inmunización de conejos	57

FIGURAS

FIGURA 14.- Obtención del suero	59
FIGURA 15.- Esquema de la inmunodifusión	62
FIGURA 16.- Patrón de migración del fago lambda digerido con la enzima Hind III	71
FIGURA 17 .- Crecimiento de las levaduras grandes y petite en medio YPD	75
FIGURA 18 .- Crecimiento de las levaduras grandes y petite en medio YPG	77
FIGURA 19.- Crecimiento en medio M63-x-gal de las levaduras transformadas	80
FIGURA 20.- Crecimiento de la transformante TYG 44 y TYP 44 en medio SD URA ⁻	83
FIGURA 21.- Curva de crecimiento de la levadura W303 1B grande y petite en medio mínimo SD	87
FIGURA 22.- Curva tipo para la cuantificación de proteína	90
FIGURA 23 .- Detección de anticuerpos contra beta-gal por inmunodifusión (conejo I)	93
FIGURA 24.- Detección de anticuerpos contra beta-gal por inmunodifusión (conejo II)	94
FIGURA 25.- Esquema de la placa de ELISA indirecto	96
FIGURA 26.- Representación grafica del ensayo de ELISA indirecto	98
FIGURA 27.- Esquema de la placa de ELISA de inhibición..	99

T A B L A S

TABLA I. Esquema del patrón de migración de los fragmentos de DNA del fago lambda digerido con la enzima Hind III	72
TABLA II. Plásmidos y enzimas de restricción con las que fueron digeridos.....	73
TABLA III. Fragmentos de DNA obtenidos después de digerir a los plásmidos con las enzimas de restricción	74
TABLA IV. Verificación de las auxotrofías de la levadura petite	78
TABLA V. Levaduras transformadas con los diferentes plásmidos	81
TABLA VI. Tiempo de duplicación de las transformantes grandes en medio mínimo SD URA ⁻	85
TABLA VII. Tiempo de duplicación de la transformantes petite en medio mínimo SD URA ⁻	86
TABLA VIII. Cantidad de ribosomas de las levaduras transformadas	88
TABLA IX. Actividad específica de beta-galactosidasa ...	91
TABLA X. Curva patrón de ELISA indirecto	97
TABLA XI. Cuantificación de las proteínas híbridas de las levaduras grandes mediante ELISA de	

inhibición 101

TABLA XII. Cuantificación de las proteínas híbridas de
las levaduras grandes mediante ELISA de

inhibición 103

ABREVIATURAS

A	Amstrong
A.E.	Actividad específica
BrEt	Bromo de etidio
°C	Grados centígrados
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
D.O.	Densidad óptica
EF	Factor de alargamiento
eIF	Factores de iniciación de la traducción eucariótica
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay
g	Fuerza de gravedad
gr	Gramos
ig	Inmunoglobulina
in	Pulgada
hrs	Horas
lb	Libra
lt	Litro
M	Molar
Mr	Masa relativa

ABREVIATURAS

mg	Miligramos
ml	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanómetro
mm	Milímetro
OPD	Orto-fenilendiamina
DNPG	Ortonitro fenil beta D-galactopiranosido
pI	Punto isoeléctrico
PBS	Amortiguador fosfato-salino
PBST	Amortiguador Fosfato-salino Tween
RNA	Acido ribonucléico
mRNA	Acido ribonucléico mensajero
rRNA	Acido ribonucléico ribosomal
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Unidad Svedberg
SDS	Lauryl sulfato de sodio
t	Tiempo
TCA	Acido tricloroacético
TYG	Transformante levadura grande (competente respiratoria)
TYP	Transformante levadura petite (deficiente respiratoria)
ug	Microgramos
UV	Ultravioleta

ABREVIATURAS

V Voltios

Vol Volumen

R E S U M E N

En el presente trabajo, se indujo la mutación de levaduras grandes_ (competentes respiratorias) para obtener colonias petite (deficientes respiratorias), creciéndolas en medio YPD suplementado con bromuro de etidio a una concentración de 50 ug/ml. Las levaduras grandes y petite se transformaron con plásmidos quiméricos cuyo extremo 5' codifica a un fragmento de longitud variable de las proteínas ribosomales ácidas de la levadura *S. cerevisiae* unido covalentemente, hacia el extremo 3', con el gen Lac Z que codifica a la enzima beta-galactosidasa.

Se demostró por primera vez que las levaduras petite se pueden transformar sin que se afecte esta condición y sin que se pierdan los marcadores nutricionales de la cepa parental de la que se originaron.

Se inmunizaron conejos para obtener anticuerpos policlonales contra la beta-galactosidasa para cuantificar a las proteínas híbridas tanto en la fracción ribosomal como en la fracción S100, de las levaduras grandes y petite empleando el método de ELISA. Los resultados muestran que en ambas cepas la concentración de las proteínas híbridas: TYG 44, TYG 45-1, TYG 45-2, TYG 46, TYG 47 Hp, TYP 45-2 y TYP 46 unidas al ribosoma aumentó cuando las células pasaron de la fase media logarítmica a la fase estacionaria. El aumento pudo deberse a que, a diferencia del resto, siguieron sintetizándose por un lapso de tiempo, a pesar de que los cultivos celulares hayan llegado a la fase estacionaria. La concentración de las proteínas híbridas: TYG 47 Pv, TYP 44, TYP 45-1, TYP 47 Pv y TYP 47 Hp disminuyó posiblemente a causa de un mecanismo activo propio de la fase estacionaria.

En la fracción S100 de las levaduras grandes, la concentración de proteína híbrida aumentó cuando las células pasaron de la fase media logarítmica a la fase estacionaria. Este aumento no fué proporcional a la incremento observado en la fracción ribosomal indicando que la síntesis de las proteínas ribosomales ácidas y su fosforilación y desfosforilación se regulan, probablemente por mecanismos diferentes.

En el caso de la fracción S100, de las levaduras petite la cantidad de proteína híbrida también aumentó al pasar a la fase estacionaria, pero como la cantidad de ribosomas disminuyó en todos los casos esto indica que necesariamente debieron sintetizarse de " novo " .

A N T E C E D E N T E S

Las Levaduras

Las Sacaromicetes, son levaduras que se destacan por su capacidad de fermentación de glúcidos, de ahí su nombre. Los productos principales de la fermentación son el etanol y el bióxido de carbono. Debido a esta propiedad, las levaduras tienen mucha demanda en las industrias panificadora, vinícola y cervecera (1). Además del uso industrial las levaduras han contribuido al progreso científico ya que el hombre las ha empleado como organismo modelo para la elucidación de procesos bioquímicos básicos del metabolismo de las células eucarióticas (61). Desde el punto de vista experimental, algunas ventajas de la levadura son: la unicelularidad; el que cada célula tiene márgenes metabólicos más altos, peso a peso, que otros hongos con micelio u otros organismos más complejos; el que crecen en medio de cultivo de composición definida; el que su genoma está organizado en nucleosomas y cromosomas y es dos órdenes de magnitud menor (1×10^{10} daltones) que el de las células de mamífero ; el que la duplicación celular tarda de 90 a 180 min dependiendo de la composición del medio de cultivo y la temperatura de incubación; el que se las puede mantener en forma haploide o

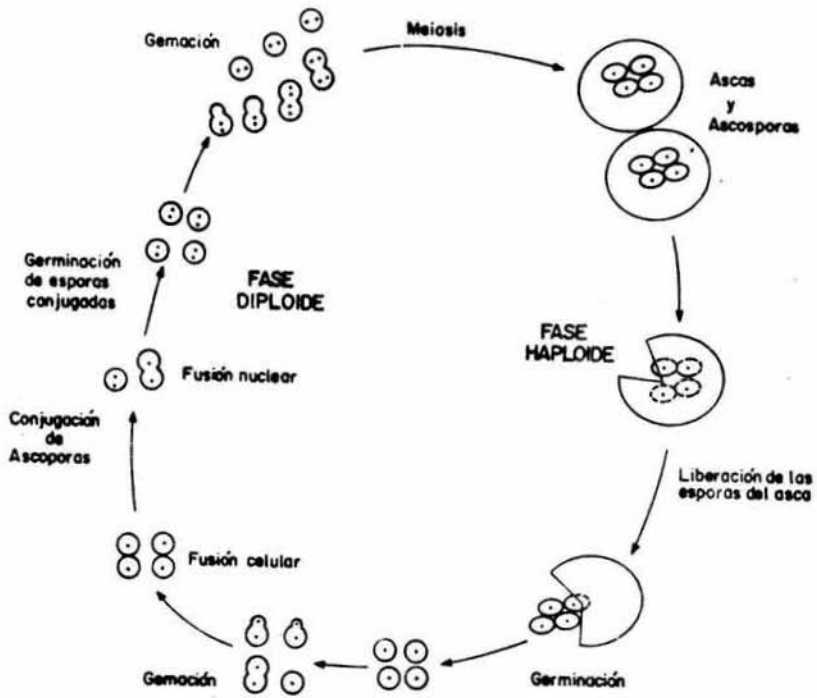
ANTECEDENTES

diploide estables (Fig. 1); y el que se las puede manipular con la tecnología de la Biología y Genética Moleculares y de la Ingeniería Genética. (61). Algunas características son típicas de un grupo de levaduras, por ejemplo, la capacidad de originar, con alta frecuencia, mutantes espontáneas con deficiencia respiratoria (DR), conocidas como " Petite ", porque las colonias son significativamente más pequeñas que las de la cepa parental. Esta propiedad se ha encontrado en la mayoría de las especies de *Saccharomices* (11, 13).

La inducción masiva de petite se logra tratando a las células grandes con una variedad de agentes químicos como la acriflavina, la cafeína, el sulfato de cobre, el cloruro de magnesio y el cloruro de tetrazolio (11, 46). Las células madre e hijas se convierten en petite cuando los cultivos son tratados con 5-fluorouracilo (45) o con bromuro de etidio (46, 71). El bromuro de etidio es altamente efectivo para inducir petites sin afectar significativamente la viabilidad celular, incluso en células que no están creciendo (61).

Al examinar a las levaduras petite se observan las siguientes características: I) el evento mutacional es irreversible, II) existe una pérdida simultánea de varias enzimas asociadas a la mitocondria, principalmente la citocromo c oxidasa y los citocromos a, a₃ y b (44). Sin embargo la pérdida de un factor citoplásmico en las petite no

Figura 1 .- Ciclo reproductivo de la levadura Saccharomyces cerevisiae (Escobar, 1990).



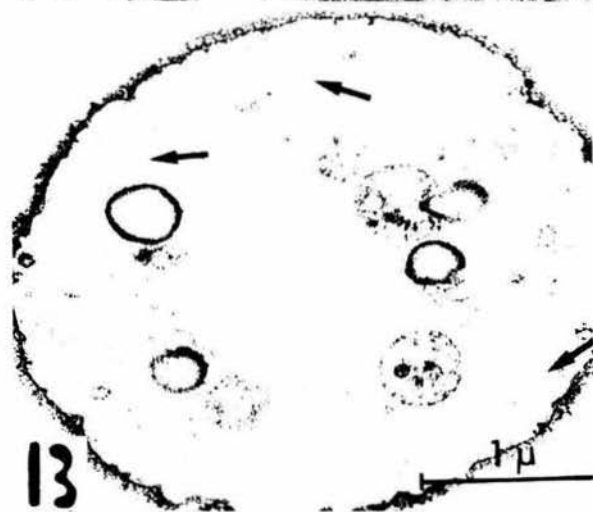
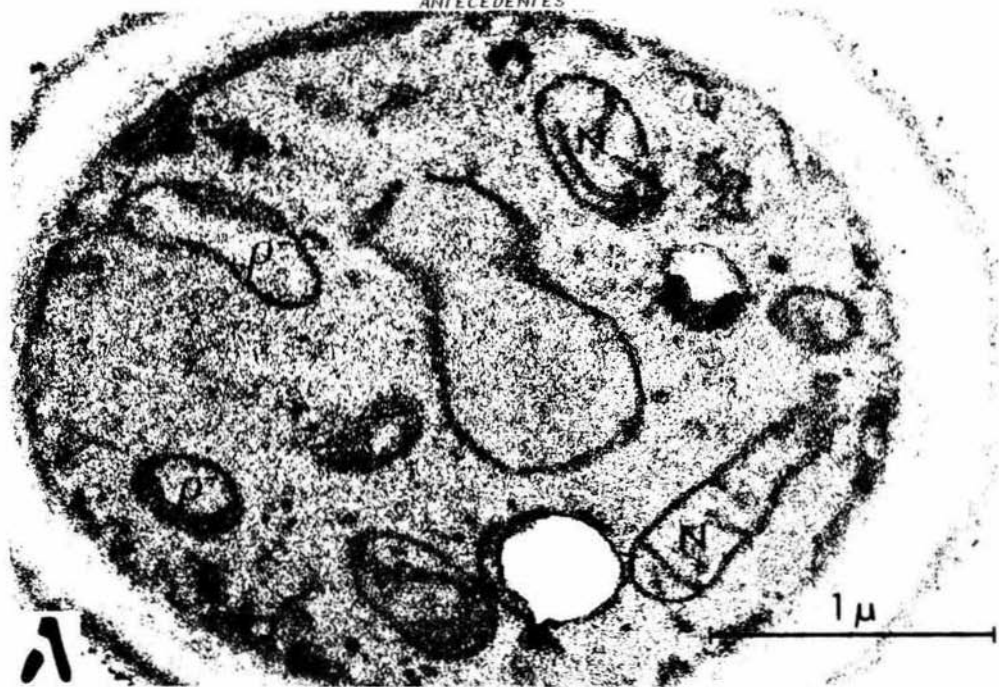
significa que las mitocondrias desaparezcan como organelo, aunque se deforman a juzgar, por las observaciones al microscopio electrónico (Fig. 2) III) La deficiencia respiratoria en Saccharomyces cerevisiae da como resultado la incapacidad para crecer en sustratos no fermentables, debido a las alteraciones mitocondriales (10).

La naturaleza irreversible de la condición petite se debe a una mutación por deleción, según lo demuestran los descubrimientos de que el DNA mitocondrial de las células petite tiene menor contenido de GC y menor tamaño. Esto indica probablemente un desperfecto en el sistema de replicación mitocondrial (87).

El Ribosoma

El ribosoma es una partícula ribonucleoprotéica de aproximadamente 250 Å que se puede encontrar libre o adherida a la membrana del retículo endoplásmico. La síntesis del ribosoma eucariótico requiere de interacciones coordinadas entre el núcleo y el citoplasma. El ribosoma juega un papel central en el crecimiento y mantenimiento de la célula porque es el catalizador de la síntesis de las proteínas (24).

Figura 2.- Fotografías al microscopio electrónico de la cepa 72 (ivs) de S. cerevisiae crecida en medio YEP hasta la fase estacionaria. A) Mitochondria normal (N), mitochondria tipo petite⁻ (p⁻). B) Demostración de la actividad de la citocromo oxidasa y la citocromo c peroxidasa por la reacción de la 3,3'-diaminobenzidina (DAB). La mayoría de las mitochondrias presentan lamelas (Flecha). C) Tinción con periodato de plata y tiosemicarbazida. Las lamelas paralelas indican mitochondrias tipo petite⁻ (p⁻) y las otras son normales (N). (Stevens, 1975).



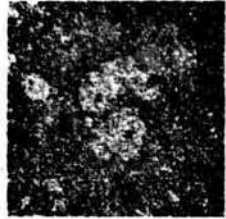
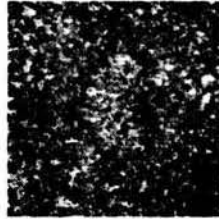
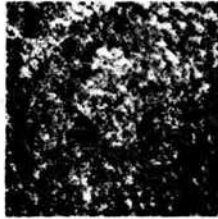
Componentes del Ribosoma.

Los ribosomas comparten características morfológicas en los tres reinos: arqueobacterias, eubacterias y eucariotes (Fig. 3) (24). Están constituidos por dos subunidades de distinto tamaño. Estas diferencias en tamaño se reflejan en el coeficiente de sedimentación que varía en función del número y la masa relativa (Mr) de las proteínas y el RNA ribosomal (rRNA) que componen a las subunidades ribosomales. Por ejemplo, el ribosoma de *Saccharomyces*, un eucariote típico, está compuesto por dos subunidades: la mayor 60S y la menor 40S. La subunidad 60S posee 3 moléculas de rRNA: la 25S, la 5.8S y la 5S; la especie 5.8S es exclusiva de los eucariotes. La subunidad 40S tiene una molécula de rRNA con un coeficiente de sedimentación de 18S (62). Numerosos grupos de investigadores han analizado a las proteínas ribosomales de la levadura y la mayoría están de acuerdo en que la subunidad 40S contiene 30 ± 5 proteínas y la subunidad 60S contiene 40 ± 5 (Fig. 4) (86).

Figura 3.— Electromicrografía de los ribosomas de eubacteria, arqueobacteria, eocitos y eucariotes típicos. De izquierda a derecha los organismos son: Synechocystis 6701, una cianobacteria (eubacteria); Halobacterium cutirubrum, un halófilo extremo (arqueobacteria); Thermoproteus tenax, un anaerobio facultativo (eocitos); y S. cerevisiae, una levadura (eucariote). (X250,000). Las subunidades pequeñas se muestran en la línea A, las subunidades grandes se muestran en la línea C, y los diagramas de sus perfiles se muestran a bajo de cada micrografía (líneas B y D). (Lake,1984).

ANTECEDENTES

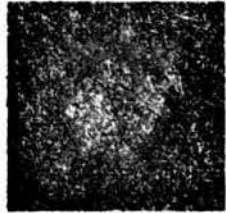
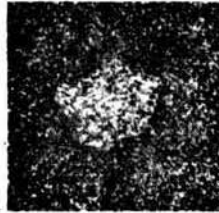
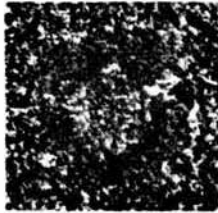
7



B



C



D

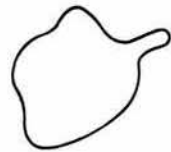
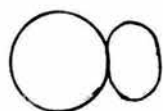
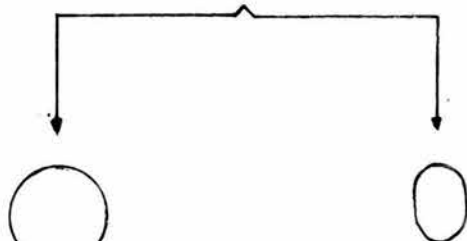


Figura 4.— Ribosoma de *S. cerevisiae* (un eucariote típico) está compuesto por dos subunidades: la mayor 60S y la menor 40S. Cada subunidad posee moléculas de rRNA designadas por su coeficiente S de diferente tamaño que se asocia con proteínas para formar los ribosomas.

RIBOSOMA



80 S

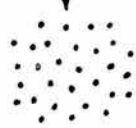


60 S

40 S

RNA_r

RNA_r



40 ± 5 PROTEINAS

30 ± 5 PROTEINAS

ANTECEDENTES

Biogénesis del ribosoma en *S. cerevisiae*.

La formación de los ribosomas requiere de la síntesis coordinada de todos sus constituyentes: rRNAs y proteínas. Las proteínas ribosomales, sintetizadas en el citoplasma, se transportan al interior del núcleo donde se asocian con el rRNA precursor en el nucleolo. El posterior ensamblaje del ribosoma implica una serie de interacciones, modificaciones y procesamientos de los rRNAs para sintetizar las subunidades 40S y 60S nativas (Fig. 5) (52, 86).

Proteínas híbridas como resultado de fusiones génicas.

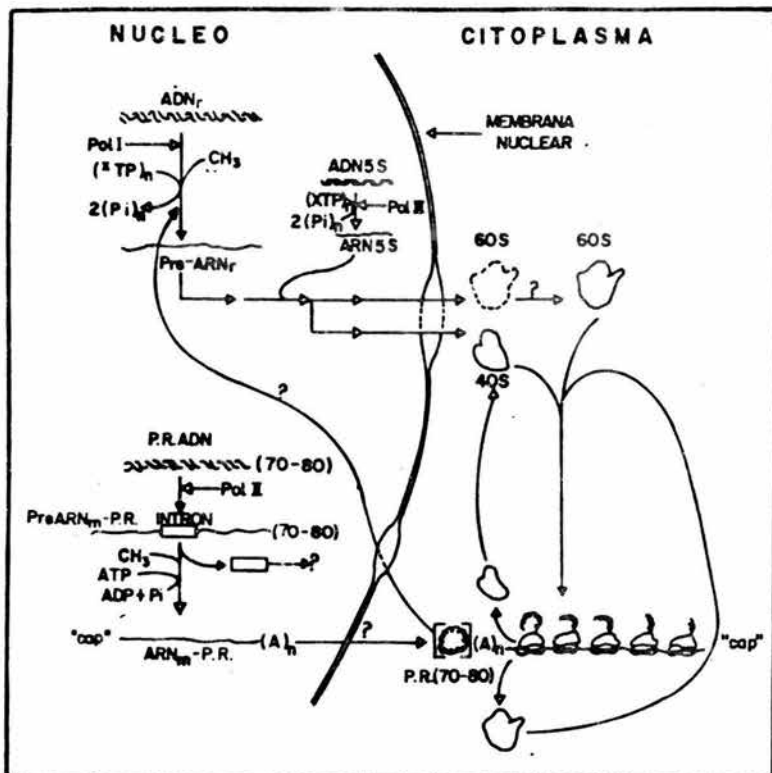
Una estrategia experimental para estudiar los sistemas de regulación multigénicos es crear situaciones donde sea posible identificar y medir con facilidad los productos de expresión. Como ejemplo está la fusión entre los genes del operón Lac (lac Z y lac Y) y los genes de interés cuyo nivel de expresión se cuantifica como actividad enzimática de beta-galactosidasa por métodos colorimétricos.

El concepto de fusión génica como herramienta para el análisis de la expresión genética, apareció por primera vez en 1965 cuando Jacob y colaboradores describieron la fusión del gen Lac y el coberón pur E de *E. coli*. Estas fusiones se

Figura 5.- Esquema del proceso de biogénesis del ribosoma de un eucariote típico. Pol I= RNA polimerasa dependiente de DNA que transcribe exclusivamente a los genes que codifican para el pre-rRNA; Pol II= RNA polimerasa dependiente de DNA que transcribe exclusivamente a los genes que codifican para las proteínas; Pol III= RNA polimerasa dependiente de DNA que transcribe a los genes que codifican para el rRNA 5S; XTP= ribonucleótidos trifosfatos; CH₃ S-adenosilmetionina; Pi= fosfato inorgánico; P.R.= proteína ribosomal; ATP= adenosín trifosfato; ADP= adenosín difosfato; " Cap " = 7 metilguanidilato; (A)n= poliadenilato; ?= se ignora cómo se lleva a cabo el proceso. En los eucariotes la transcripción se lleva a cabo sólo en el núcleo y la traducción sólo en el citoplasma. (Zinker,1986).

ANTECEDENTES

EUCARIONTES



ANTECEDENTES

obtuvieron por recombinación entre un plásmido F' que acarreaba ambos genes, el de Lac y el de pur E, localizados cerca uno del otro en el cromosoma de E. coli. Al principio, la posibilidad de generar fusiones entre Lac y otros genes se limitaba a aquellos genes cercanos al operón Lac. Esta limitación se superó con el desarrollo de una técnica para transponer al gen Lac hacia otras regiones en el cromosoma bacteriano. Otro paso importante en la fusión génica fue el desarrollo de técnicas que permitieron su detección en cepas en donde todos los genes estructurales del operón Lac (Z, Y y A) se encontraban intactos y fusionados al operón trp. Estas cepas presentaban un fenotipo Lac⁺ cuando el operón trp se expresaba constitutivamente debido a una mutación en el gen represor del operón denominado trp R.

Las fusiones génicas también han probado ser útiles en el estudio del bacteriófago lambda ya que los genes bacterianos pueden incorporarse al cromosoma de lambda por mecanismos de recombinación después de transducido el fago. Por ejemplo, la fusión del operón de trp de E. coli con el genoma de lambda permitió entender la fusión del producto del gen-N de lambda. En otro ejemplo, la fusión del operón Lac bacteriano al operón del gen N de lambda, controlado por el gen N del fago permitió la detección " in vitro " del producto

ANTECEDENTES

del gen N, midiendo la síntesis de la beta-galactosidasa como marcador de esa actividad (Fig. 6) (9).

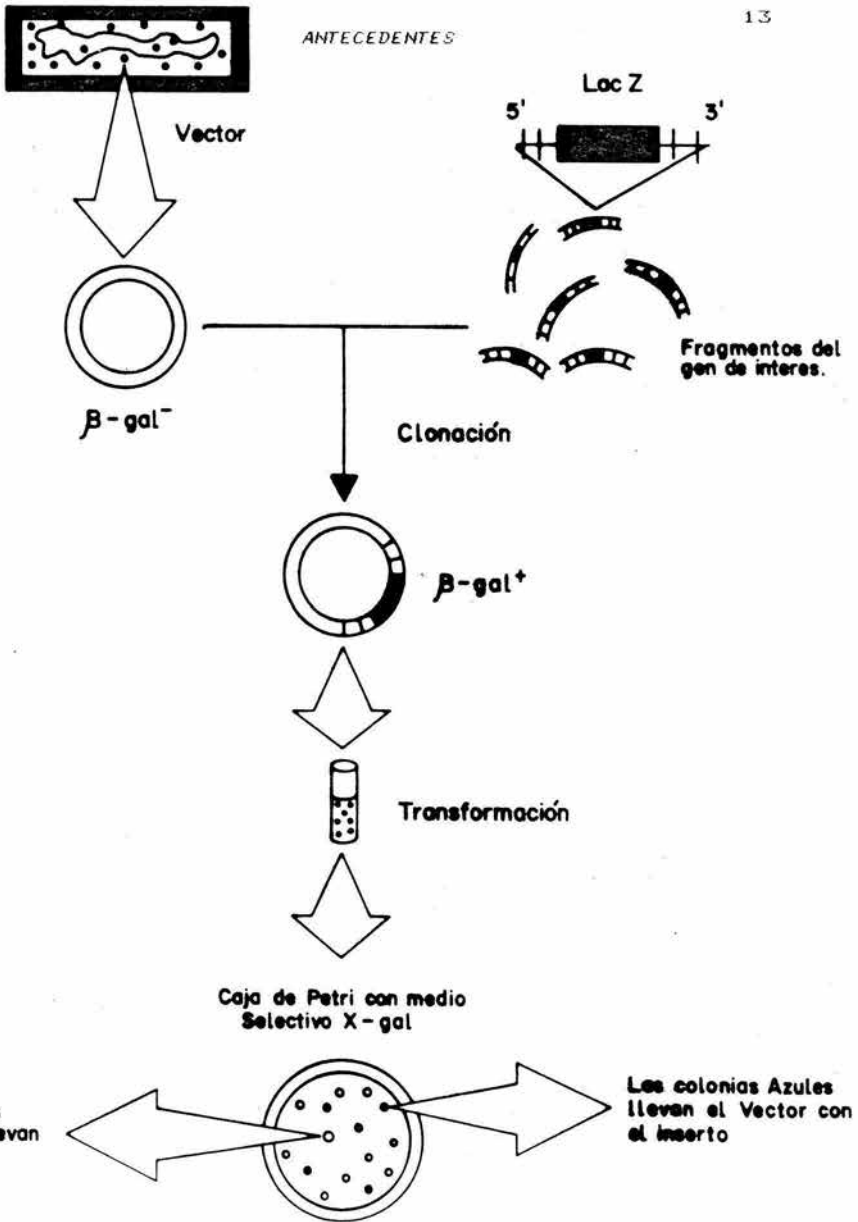
ELISA

Las pruebas inmunológicas son métodos usados para detectar sustancias con importancia biológica o propiedades farmacológicas. Los altos niveles de sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas son el resultado de la especificidad y la afinidad de la unión antígeno-anticuerpo, y de la existencia de métodos de detección sensibles, (Isótopos, fluorescencia, radicales libres, ferritinas, bacteriófagos y enzimas) marcando ya sea al antígeno ó al anticuerpo.

El ELISA (por las siglas del inglés: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) es un prueba inmunológica enzimática heterogénea basada en el mismo principio que las radioinmuno-pruebas (RIA). La única diferencia entre un ELISA y un RIA es el uso de una enzima, en vez de un isótopo radioactivo, para marcar al antígeno ó al anticuerpo. Al igual que un RIA donde la marca radioactiva ya sea en el antígeno ó en el anticuerpo libres se separa del total de la radioactividad al formarse el complejo antígeno-anticuerpo (límite radioactivo), el ELISA separa a una porción de la

Figura 6.- Esquema que ilustra la selección directa de recombinantes. Sólo aquellas colonias que llevan el inserto son capaces de crecer en el medio dando una coloración azul.

ANTECEDENTES



Las colonias Blancas no llevan el Vector

Las colonias Azules llevan el Vector con el inserto

ANTECEDENTES

"enzima marca" en forma de complejo antígeno-anticuerpo (límite enzimático) quedando un remanente de la "enzima marca " unida ya sea al antígeno ó al anticuerpo libres (soluble). La actividad enzimática en el límite o fracción libre se cuantifica por la conversión de un sustrato incoloro o no fluorescente a un producto altamente coloreado ó fluorescente. (32).

I N T R O D U C C I O N

Proteínas ribosomales

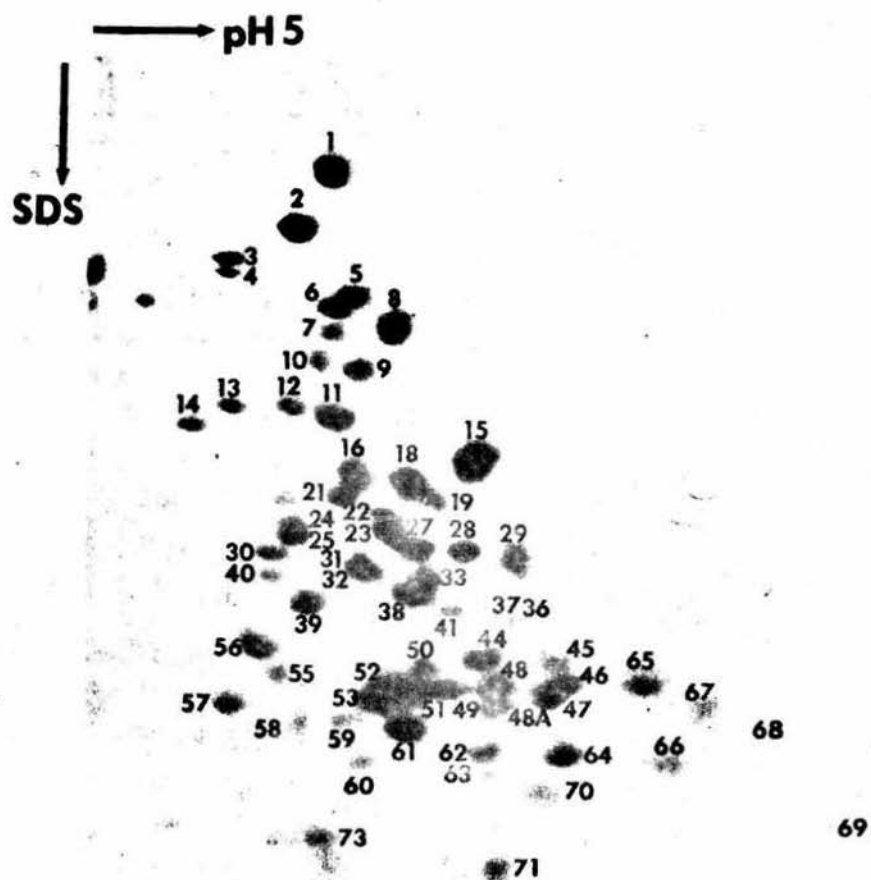
Mediante técnicas de electroforesis bidimensional es posible separar todas las proteínas constituyentes del ribosoma (55). La mayor parte de las proteínas ribosomales son pequeñas, con pesos moleculares que oscilan entre 8000 y 45000 daltones, y muy básicas, con puntos isoeléctricos (pI) superiores a 8.6 (Fig. 7) (94).

Entre las diferentes proteínas del ribosoma, existe un grupo de carácter marcadamente ácido (pI alrededor de 3.0) y localizado en la subunidad ribosomal mayor; son las denominadas proteínas ribosomales ácidas.

Proteínas ribosomales ácidas de *E. coli*

Las primeras proteínas ribosomales ácidas que se caracterizaron fueron las de los ribosomas de *E. coli*. Se localizaron en la subunidad ribosomal mayor 50S, y se denominaron L7/L12. De éstas hay cuatro copias, probablemente como pares de dímeros en la partícula ribosomal (54); forman un complejo con la proteína L10, y en conjunto constituyen a una de las tres protuberancias de la subunidad mayor de

Figura 7.- Proteínas ribosomales básicas, separadas mediante electroforesis bidimensional. (Warner, 1982).



INTRODUCCION

acuerdo con las observaciones a través del microscopio electrónico (Fig. 8) (28, 73). Estas dos proteínas son el mismo polipéptido con el amino terminal libre (L12) ó acetilado (L7) (56). Se ha establecido que L7/L12 están involucradas con la función de los factores de elongación dependientes de la hidrólisis de GTP (79) en donde los dos dímeros de L7 y L12 bacterianos juegan un papel diferente; posiblemente, uno está directamente involucrado en la unión al sustrato y el otro en la hidrólisis del GTP y el reciclaje de los factores de elongación (15, 70, 79). Una función similar ha sido sugerida para las proteínas ácidas ribosomales eucarióticas (42, 68, 72, 80).

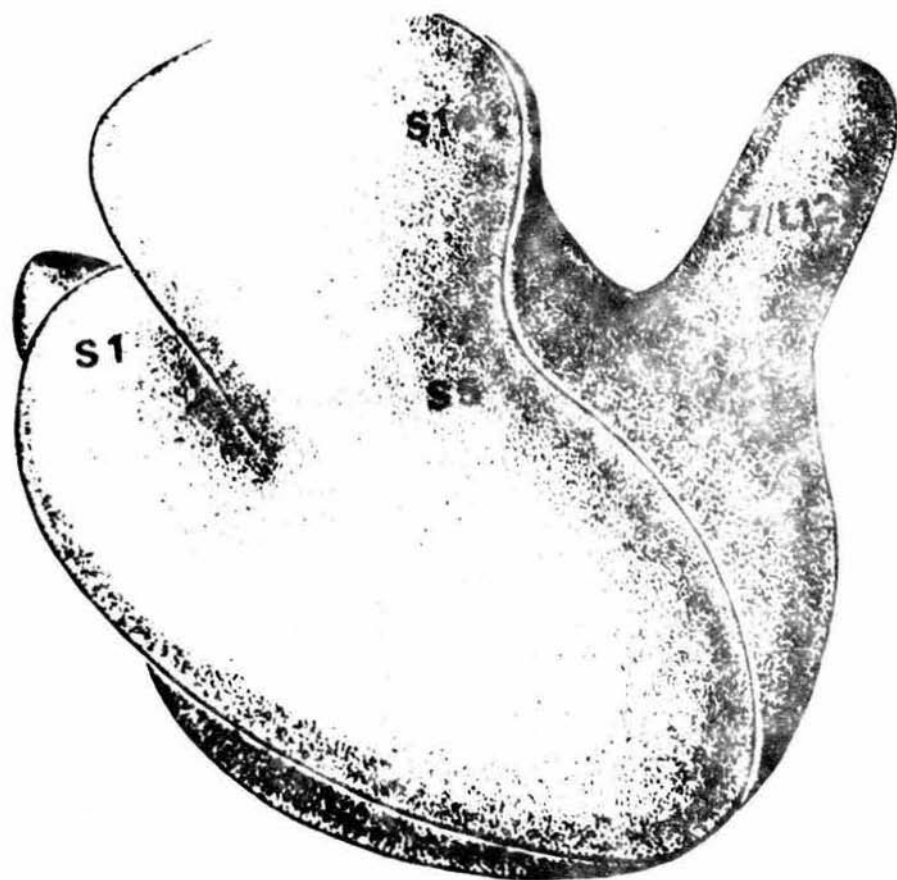
Proteínas ribosomales ácidas eucarióticas

Además del carácter marcadamente ácido, comparten con sus equivalentes bacterianas otras características como son: peso molecular bajo (11000 a 13000 daltones), elevada hidrofobicidad, gran contenido relativo en alanina, alto contenido en α -helice, formación de dímeros de alta estabilidad, fácil separación y reconstitución del ribosoma (55, 84).

En organismos eucarióticos, las proteínas ácidas se encuentran como una familia de polipéptidos que tienen

Figura 8.- Localización de las proteínas ribosomales ácidas L7 y L12 en el ribosoma de *E. coli*. Constituyen una de las tres protuberancias de la subunidad mayor. (Lake, 1980).

INTRODUCCION



INTRODUCCION

propiedades fisicoquímicas similares, pero diferente composición de aminoácidos (75, 80, 83,), y son codificadas por genes independientes (6, 29, 38, 39, 40, 53, 56, 60). Proteínas de este tipo han sido descritas y caracterizadas en numerosos organismos eucariotas, a saber: el hígado de la rata, el hígado humano, Artemia salina, Neurospora crassa, las células HeLa, Drosophila melanogaster, los reticulitos de conejo, el germen de trigo, Saccharomices cerevisiae, y Scizosaccharomyces pombe (6, 25, 29, 53, 60, 76, 80, 83, 88).

No obstante las proteínas ribosomales ácidas eucarióticas tienen algunas características claramente distinguibles de sus equivalentes procarióticos. Aunque existen también dos formas de proteínas, la diferencia entre ellas no es debida a la acetilación sino más bien a la fosforilación (90). La presencia de estas fosfoproteínas demuestra que la fosforilación es una característica general de las proteínas equivalentes a las de E. coli (L7/L12) en células eucariotas. Sin embargo, el número de residuos de fosfato incorporados en estas proteínas difiere de un organismo a otro. Estas modificaciones parecen estar relacionadas con los cambios metabólicos de la célula (67, 80). Cuando se realizan preparaciones cuidadosas de ribosomas, solo las formas fosforiladas se detectan en la partícula; por

INTRODUCCION

el contrario en el sobrenadante aparecen desfosforiladas (69, 91).

Warner y Zinker 1976 clasificaron las proteínas ácidas ribosomales de la levadura como proteínas de recambio, porque las proteínas ácidas recién sintetizadas se encontraron en ribosomas previamente sintetizados (76, 90). Es decir, existe un recambio entre las proteínas ácidas del ribosoma con aquellas del citoplasma, en ausencia de biosíntesis de ribosomas " de novo ".

Van Agthoven 1978 reportó, usando radioinmuno pruebas, la presencia de una poza citoplásmica en *A. salina*. De acuerdo con estos resultados Zinker 1980 detectó la presencia de una gran poza de L44/L45 libre (desfosforiladas) en el citosol de la levadura a través de la inmunoprecipitación.

Estos datos sugieren que el recambio y la fosforilación de las proteínas son procesos relacionados a mecanismos específicos durante la síntesis protéica ; es decir las fosfoproteínas ácidas probablemente están involucradas en un mecanismo que controla la actividad del ribosoma a través de un proceso de fosforilación/desfosforilación. Se piensa que este proceso de regulación esté mediado por actividades del tipo de las protein cinasas y las protein fosfatasas, que pueden controlar la unión de las proteínas a la partícula

INTRODUCCION

ribosomal y consecuentemente, el nivel de actividad de los ribosomas.

Actualmente se conoce la secuencia de las proteínas ribosomales ácidas de 5 diferentes organismos incluyendo: A. salina (29) D. melanogaster (53) el hígado de la rata (25) el hígado humano (60) y S. cerevisiae (56). En el caso de S. pombe, sólo una proteína ha sido reportada (6). Cuando la secuencia primaria de todas ellas se compara, se pueden clasificar en dos grupos que tienen, en promedio, alrededor del 70% de similitud. Esta, disminuye hasta 50% cuando se comparan ambos grupos entre si. Un grupo está integrado por: la proteína de mamífero P₂, la de A. salina el12, de la D. melanogaster A₁, de la S. pombe A₁ y de la S. cerevisiae L44 y L45; El otro grupo esta formado por la proteína de mamífero P₁, de la A. salina el12', de la D. melanogaster rp21c y de la S. cerevisiae L46 y L47. Ambos grupos de proteínas presentan la misma secuencia primaria en los últimos 10 aminoácidos hacia el carboxilo terminal, pero difieren en la secuencia del amino terminal, la cual se conserva entre los miembros de cada grupo. (Figuras 9 y 10). S. cerevisiae es el único eucariote que tiene dos diferentes proteínas, L44 y L45, y L46 y L47 en cada grupo; datos preliminares indican que otras levaduras y hongos filamentosos tienen, al igual que S. cerevisiae, más de dos proteínas ácidas ribosomales, lo que

Figura 9.- Secuencia primaria de las proteínas ácidas ribosomales de tipo P1 de S. cerevisiae y otros organismos. (:) secuencia de residuos aminoácidos altamente conservadas y (*) moderadamente conservadas. La región con conservación significativa esta en los recuadros. El número en paréntesis indica el total de residuos de aminoácidos.

INTRODUCCION

Tipo P1

		10	20	30	40
L47 (S.cer. 106)	M-S-TESALSVA	ALILADSEIE	ISSERKLLTLT	NAANMPDENI	
L46 (S.cer. 106)	M-S--DSIISEA	AFILADABLE	ITSDNLLTIT	KAAGANVDNV	
rp21c (D.mel.112)	MSTKAELASVYA	SLILVDDDDVA	VTGKINTIL	KAANVEVEPY	
el12' (A.sal.110)	MASKDELACVYA	ALILLDDDDVD	ITTEKVNITL	RAAGVSEVEPY	
P1 (pollo 114)	MASVSELACIYS	ALILHDDEVT	VTEDKINALI	KAAGVNVEPF	
P1 (humano 114)	MASVSELACIYS	ALILHDDEVT	VTEDKINLI	KAAGVNVEPF	
	: : * :	: : : : :	* * * :	* : * * :	* : * : * :

	50	60	70	80
WADIFAKALD	GKNLKDLLVN	FSAGAAAPAG	VAGGVAGG---	EA
WADVAKALE	GKDLKEILSG	FHNAGPVAGA	GAASGAAAAGGDA	
WPGLFAKALE	AINVKDLITN	IGSGVGAAPA	GGAAPAAAA--A	
WPGLFTKALE	GLDLKSMITN	VSGVGAAPA	AGGAAAA---TEA	
WPGLFAKALA	NIDIGSLICN	VGAGGGAPAA	AAPAGGAAPAGGG	
WPGLFAKALA	NVNIGSLICN	VGAGGPAPAA	GAAPAGGPAPSTA	
	: * * : * :	* * * * :	* : * * * * :	* : * * * * :

	90	100	106
GEAEAEKEEE	EAKES---	DDDM	GFGLFD
-AAEEEEKEEE	AA-EES---	DDDM	GFGLFD
PAAESKKEEK	KHEEESDQSD	DDDM	GFGLFD
PAAKEEKK-E	EKKEESEEE	EDDM	GFGLFD
AAPAEKKKEE	EKKEESEES	DDDM	GFGLFD
AAPAEKKKVE	AKKEESEES	DDDM	GFGLFD
	* * : : :	* : : :	: : : : :

Figura 10.- Secuencia primaria de las proteínas ácidas ribosomales de tipo P2 de *S. cerevisiae* y otros organismos. (:) secuencia de residuos aminoácidos altamente conservadas y (*) moderadamente conservadas. La región con conservación significativa esta en los recuadros. El número en paréntesis indica el total de residuos de aminoácidos

INTRODUCCION

Tipo P2

	10	20	30	40
L44 (S.cer. 106)	MKYLAAYLLL	NAAGNT-PDAT	KIKAILLESV6	TEIEDEK-VSS
L45 (S.cer. 106)	MKYLAAYLLL	VQGGNAAPSAA	DIKAVVASV6	AEVDEAR-INE
Al(Schizp.p. 110)	MKYLAAYLLL	TVGGKDSPSAS	DIESVLSTV6	IEAESER-IET
rpA1 (D.mel.113)	MRYVAAYLLA	VLGGKDSPANS	DLEKILSSV6	VEVDAER-LTK
eL12 (A.sal.111)	MRYVAAYLLA	ALSGNADPSTA	DIEKILSSV6	IECNPSQ-LQK
P2 (rata 111)	MRYVASYLLA	ALGGNSSPSAK	DIAKILDSV6	IEADDDR-LNK
P2 (Humano 115)	MRYVASYLLA	ALGGNSSPSAK	DIKKILDSV6	IEADDDR-LNK

***** ** * : : : : * * * *

	50	60	70	80
VLSALEGR	-SV DELITEGNEK	LAAVPAAG----	PA SAGGAAAASG	
LLSSLEGR	GSL EEIIAEGQKK	FATVPTGGA--SSAAA	GAAGAAA-BG	
LINELNGK	-DI DELIAAGNEK	LATVPTGGA--SAA	PAAAAGGA--	
VIKELAGK	-SL DDLIKEGREK	LSSMPVGGGGAVAAA	DAAPAAAAGG	
VMNELKGR	-DL EALIAEGQTK	LASMPPTGGA----	PA AAAGGAAAAP	
VISELNGK	-NL EDVIAQGVGK	LASVPAGGAVAVSAA	PGAAAPAAGS	
VISELNGK	-NI EDVIAQGIGK	LASVPAGGAVAVSAA	PGSAPAAGS	

**** : : * : * : : : ***** * : *****

	90	100	106
DAAEEEEKEE	EAAEES---DDDM	GFGLFD	
D-AAEEEEKEE	EAKEES---DDDM	GFGLFD	
APAAEEAAKE	EAKEE-EESDEDM	GFGLFD	
D--KKEAKKE	EKKEESESEDDDM	GFALFE	
AAEAKKEAKKE	EKKEESEEEDEDM	GFGLFD	
APAAA-----	EEKEESEEEKKDEM	GFGLFD	
APAAAEKKD	EKKEESEESDDDM	GFGLFD	

* : : : : : : : : : : : : : : : *

INTRODUCCION

sugiere que puede ser una característica de los eucariotes inferiores (56). A través de estudios de las proteínas ribosomales de la rata, se sabe que ningún eucariote superior contiene más de dos especies protéicas (77), pero la levadura es excepcional teniendo a dos miembros en cada grupo (57).

Proteínas ribosomales ácidas de *S. cerevisiae*

La existencia de proteínas ribosomales ácidas en *S. cerevisiae* ha sido reportada por varios grupos (34, 40, 50, 68, 90, 91). Se ha reportado la existencia de 4 proteínas ácidas denominadas YP1-alfa, YP1-beta, YP2-alfa y YP2-beta según la reciente nomenclatura unificada (89, 58,) ó L47, L46, L44 y L45 respectivamente de acuerdo con la nomenclatura de Kruiswijk y Planta 1975 (22), y que se localizan en la subunidad ribosomal mayor 60S. A pesar de que estas proteínas ácidas poseen características fisicoquímicas muy similares (igual peso molecular, parecida movilidad electroforética, poca afinidad por el colorante azul de Coomassie, formas fosforiladas y desfosforiladas, presencia de un sólo grupo fosfato) hay datos que las distinguen entre sí. Mediante el análisis por ultracentrifugación, se confirmó que L44 y L45 forman dímeros cuando están en solución, lo que no sucede con L46 que se comporta como monómero en las mismas condiciones.

INTRODUCCION

El gen de L46 se diferencia de los genes que codifican a L44, L45 y L47 en que posee un intrón, además posee las secuencias conservadas UASrpg en el extremo 5' del DNA que actúan como activadores de la transcripción de los genes que codifican para las proteínas ribosomales básicas y que van asociados a la presencia de intrones (84).

Las secuencias de aminoácidos de las cuatro proteínas presentan diferencias (fig. 11). La homología observada entre L44 y L45 es del 80% mientras que entre éstas y L46 sólo hay una similitud del 63%. Se observa que L44 y L45 poseen una región común muy conservada en el extremo carboxilo (30 aminoácidos) y otra región idéntica que comprende los diez primeros aminoácidos del extremo amino terminal. Las proteínas L47 y L46 comparten con las otras dos el extremo carboxilo pero no así el extremo amino, el cual es diferente (55, 56, 85).

En cuanto a la composición de aminoácidos se observa que L46 posee triptofano e histidina mientras que estos aminoácidos no se hallan presentes en las otras dos proteínas (38, 39, 84). La arginina sólo está presente en L45; la prolina disminuye drásticamente en L46 (83).

La presencia de un carboxilo terminal idéntico, sugiere la existencia de un sitio de interacción común en el ribosoma

INTRODUCCION

para los diferentes polipéptidos solubles involucrados en la traducción (56).

Figura 11: Secuencia de aminoácidos de las proteínas ácidas L47, L46, L44 y L45 de la subunidad mayor del ribosoma de *S. cerevisiae*.

L47	Met Ser Thr Glu Ser Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Leu Ile Leu Ala Asp Ser Glu Ile Glu Ile Ser Ser Glu Lys Leu Leu Thr Leu Thr Asn Ala Ala Asn Val Pro Asp Glu Asn Ile Trp Ala Asp Ile Phe Ala Lys Ala Leu Asp Gly Gln Asn Leu Lys Asp Leu Leu Val Asn Phe Ser Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Gly Val Ala Gly Gly Val Ala Gly Gly Glu Ala Gly Glu Ala Glu Ala Glu Lys Glu Glu Glu Glu Ala Lys Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp
L46	Met Ser Asp Ser Ile Ile Ser Phe Ala Ala Phe Ile Leu Ala Asp Ala Gly Leu Glu Ile Thr Ser Asp Asn Leu Leu Thr Ile Thr Lys Ala Ala Gly Ala Asn Val Asp Asn Val Trp Ala Asp Val Try Ala Lys Ala Leu Glu Gly Lys Asp Leu Lys Glu Ile Leu Ser Gly Phe His Asn Ala Gly Pro Val Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ala Ala Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Ala Ala Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp.
L44	Met Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Leu Leu Leu Asn Ala Ala Gly Asn Thr Pro Asp Ala Thr Lys Ile Lys Ala Ile Leu Glu Ser Val Gly Ile Glu Ile Glu Asp Glu Lys Val Ser Ser Val Leu Ser Ala Leu Glu Gly Lys Ser Val Asp Glu Leu Ile Thr Glu Gly Asn Glu Lys Leu Ala Ala Val Pro Ala Ala Gly Pro Ala Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ser Gly Asp Ala Ala Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Ala Ala Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp.
L45	Met Lys Try Leu Ala Ala Tyr Leu Leu Leu Val Gln Gly Gly Asn Ala Ala Pro Ser Ala Ala Asp Ile Lys Ala Val Val Glu Ser Val Gly Ala Glu Val Asp Glu Ala Arg Ile Asn Glu Leu Leu Ser Ser Leu Glu Gly

INTRODUCCION

Lys Gly Ser Leu Glu Glu Ile Ile Ala Glu Gly Gln
 Lys Lys Phe Ala Thr Val Pro Thr Gly Gly Ala Ser
 Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly
 Gly Asp Ala Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Ala
 Lys Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu
 Phe Asp.

Por las características mencionadas anteriormente las proteínas ácidas de la levadura pueden ser agrupadas en dos pares: L47 / L46 y L44 / L45 que parecen tener un papel complementario en la función ribosomal (57, 78). Dos de estas fosfoproteínas de la levadura L44 y L45 son análogas a las proteínas L7 / L12 de *E. coli* (las cuales están implicadas en la interacción de los factores de alargamiento con el ribosoma) (41) y están involucradas, al menos parcialmente, en la interacción del factor EF-2 con el ribosoma (67). L46 no es una proteína ribosomal típica ya que no está presente en la poza citoplásmica, y no forma dímeros en solución (66, 83,) lo que sugiere que L46 no toma parte en el recambio de las proteínas (85).

La equivalencia de las proteínas de la levadura con las bacterianas L7 y L12 se demostró en sistemas híbridos, en donde las proteínas de *E. coli* son capaces de restituir las funciones del ribosoma de la levadura en al menos algunas de las reacciones parciales de la síntesis protéica (15, 70, 72, 79).

Como ya se mencionó , las proteínas ribosomales ácidas pueden detectarse en el citoplasma celular pero sólo en su

INTRODUCCION

forma desfosforilada lo cual sugiere que la fosforilación y el recambio " in vivo " son parte del ciclo ribosomal (69, 90, 91). Estos datos sugieren que el recambio y la fosforilación de las proteínas en cuestión son procesos relacionados ente si y probablemente con mecanismos específicos en la síntesis protéica en eucariontes. Si esto es cierto, entonces el total de proteína ribosomal ácida unida al ribosoma puede cambiar en función a la condición metabólica de la célula. (65).

O B J E T I V O

Comparar la eficiencia de expresión de los genes que codifican para las proteínas ribosomales acidas, fusionados al gen de Lac Z, entre células petite y células grandes (competentes - respiratorias) de S. cerevisiae en diferentes fases de crecimiento.

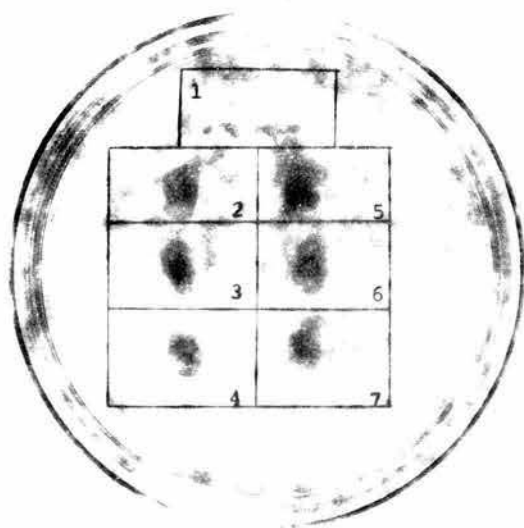
MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.1 Cepas de *E. coli*. Todas derivan de la transformación de la cepa C600 (F⁻, thi-1, the-1, leu B6, lac Y1) (Fig. 12).
- 1.1.a. YEp 44 que contiene al plásmido YEp 357 en el que está insertada la secuencia del gen que codifica para los primeros 65 aminoácidos de la proteína YP2-alfa.
- 1.1.b. YEp 45-1 que contiene al plásmido YEp 357 en el que está insertada la secuencia del gen que codifica para los primeros 75 aminoácidos de la proteína YP2-beta.
- 1.1.c. YEp 45-2 que contiene al plásmido YEp 357 en el que está insertada la secuencia del gen que codifica para los primeros 50 aminoácidos de la proteína YP2-beta.
- 1.1.d. YEp 46 que contiene al plásmido YEp 357 en el que está insertada la secuencia del gen que codifica para los primeros 36 aminoácidos de la proteína YP1-beta.

Figura 12.- Crecimiento de las cepas de *E. coli* en medio LB
ampicilina suplementado con X-gal.

- | | |
|-------------------------------------|---------------|
| 1.- YEp 357 sin inserto (Control) | |
| 2.- YEp 44 | 5.- YEp 46 |
| 3.- YEp 45-1 | 6.- YEp 47 Hp |
| 4.- YEp 45-2 | 7.- YEp 47 Pv |

LB + X- GAL



MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.e.YEp 47 Hp que contiene al plásmido YEp 357 en el que está insertada la secuencia del gen que codifica para los primeros 80 aminoácidos de la proteína YP1-alfa.

1.1.f.YEP 47 Pv que contiene al plásmido YEp 357 en el que está insertada la secuencia del gene que codifica para los primeros 69 aminoácidos de la proteína YP1-alfa.

1.2. Ceba de S. cerevisiae.

S. cerevisiae W303 1B, es una cepa de tipo de apareamiento alfa (MAT-alfa), grande, haploide, con los siguientes marcadores genéticos: ade 2, can 1, his 3, leu 2, trip 1 y ura 3.

1.3. Conejos.

Dos conejos de raza Nueva Zelanda de 1.4 a 2 Kg de peso y de 3-5 a meses.

MEDIOS DE CULTIVO

2.1. YPD.- Medio rico para crecer levaduras.

Sustancias necesaria:

Sulfato de amonio	Acido bórico
Biotina	Sulfato de cobre
Pantotenato de calcio	Yoduro de potasio
Acido fólico	Cloruro férrico
Inositol	Sulfato de manganeso
Niacina	Molibdato de sodio
Acido para-amino benzóico	Sulfato de zinc
Clorhidrato de piridoxina	Fosfato de potasio monobásico
Rivoflavina	Sulfato de magnesio
Clorhidrato de tiamina	Cloruro de calcio
Cloruro de sodio	Peptona
Extracto de levadura	Hidróxido de sodio
Acido succínico	
D-glucosa en solución acuosa al 50%.	

2.1.a. Base nitrogenada de levadura (YNE 10X).

Se disuelven 50 gr de sulfato de amonio en 500 ml. de agua bidestilada y se le agregan: 40 ml. de una mezcla de vitaminas preparadas 250X en solución acuosa, 1 ml. de cada uno de los elementos traza preparados 100X en solución acuosa, 200 ml. de mezcla de sales preparadas 50X en solución acuosa.

MEDIOS DE CULTIVO

Se afora a 1 lt con agua bidestilada, se mezcla bien y se esteriliza por filtración. Se conserva a 4°C.

2.1.b. Mezcla de vitaminas 250X.

Biotina 2000 ug, pantotenato de calcio 4000 ug, ácido fólico 2000 ug, inositol 2000 ug, niacina 40 ug, ácido para-amino benzóico 20ug, clorhidrato de piridoxina 400 ug, rivo flavina 200 ug, clorhidrato de tiamina 400 ug; todas ellas se disuelven juntas en agua bidestilada. Se afora a 400 ml. y se esteriliza por filtración. Se guarda en fracciones de 40 ml. a -20°C.

2.1.c. Elementos traza 100X.

Acido bórico 50 mg, sulfato de cobre 4 mg, yoduro de potasio 10 mg, cloruro férrico 20 mg, sulfato de magnesio 40 mg, molibdato de sodio 20 mg, sulfato de zinc 40 mg; se disuelve cada una por separado en 10 ml. de agua bidestilada. Se conserva a temperatura ambiente.

2.1.d. Mezcla de sales 50X.

Fosfato de potasio monobásico 50 gr, sulfato de magnesio 25 gr, cloruro de sodio 5 gr, cloruro de calcio 5 gr, éste último se disuelve aparte y se agrega al resto de la mezcla previamente disuelta en agua bidestilada. Se afora al final a 1 lt. Se almacena en frascos de vidrio a 4°C.

MEDIOS DE CULTIVO**2.1.e. YPD contiene por litro:**

5 gr de extracto de levadura, 10 gr de peptona, 10 gr de ácido succínico y 6 gr de NaOH. Se esteriliza en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² de presión durante 15 min. Se deja enfriar y se complementa con 100 ml. de YNB (2.1.a.) y 40 ml. de glucosa al 50% (para una concentración final del 2%) previamente esterilizada en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² durante 15 min. Se almacena a 4°C.

2.2 YPD-AGAR.- Medio rico para crecer colonias aisladas de levaduras.

Se prepara igual que el medio YPD (2.1.e.) y se le agrega 2% de agar. Se esteriliza en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² de presión durante 15 min. Se equilibra a 50°C en un baño de incubación con agua. Se le agregan 100 ml. de YNB 10X (2.1.a.). Se vacía a cajas petri estériles y se deja solidificar a temperatura ambiente. Las cajas con el medio se incuban 24 hrs a 37°C para prueba de esterilidad. Se conservan a 4°C selladas con parafilm.

2.3. YPG-AGAR.- Medio rico solido para la selección de colonias petite.

Se prepara igual que el medio YPD-Agar (2.2), pero en vez de glucosa se agregan 40 ml. de glicerol por litro.

MEDIOS DE CULTIVO

2.4 SD.- Medio mínimo de composición definida suplementado con aminoácidos y bases nitrogenadas para el crecimiento de levaduras.

Sustancias necesarias:

Acido succínico

NaOH

D-glucosa en solución acuosa al 50% *

YNB 10X (2.1.a.)

Sulfato o clorhidrato de adenina 50mg/ml en solución acuosa. *

Uracilo 50 mg/ml en solución acuosa *

L-histidina 50 mg/ml en solución acuosa *

L-leucina 50 mg/ml en solución acuosa *

L-triptofano 50 mg/ml en solución acuosa **

* Se esterilizan en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² de presión durante 15 min.

** se esteriliza por filtración.

2.4.a. SD contiene por litro:

10 gr de ácido succínico, 6 gr de NaOH y 40 ml. de glucosa al 50% (para una concentración final de 2%). Se esteriliza en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² de presión durante 15 min. Se deja equilibrar la temperatura del medio a la temperatura ambiente y se le agregan 100 ml. de YNB 10X (2.1.a.) y 0.8 ml. de cada uno de los

MEDIOS DE CULTIVO

aminoácidos y bases nitrogenadas (concentración final de 40 ug/ml) para los cuales la cepa es auxótrofa.

- 2.5 **SD-AGAR.**-Medio mínimo para crecer colonias de levadura aisladas.

Se prepara igual que el medio SD (2.4.a.) y se le agrega agar al 2%. Después de esterilizar en el autoclave se equilibra a 50°C en un baño de incubación con agua. Se le agregan 100 ml. de YNB 10X (2.1.a.) y los aminoácidos y bases nitrogenadas a una concentración final de 40 ug/ml (2.4). Se vacía a cajas petri estériles y se dejan solidificar a temperatura ambiente. Las cajas con el medio se incuban 24 hrs a 37°C para prueba de esterilidad. Se conservan a 4°C selladas con parafilm.

- 2.6. **LB AMPICILINA.**-Para crecer cepas bacterianas transformadas con el plásmido YEp 357.

Sustancias necesarias:

Bacto triptona

Extracto de levadura

NaCl

D-glucosa

Ampicilina 25 mg/ml en solución acuosa *

* Se esteriliza por filtración. Se conserva en porciones de 1 ml. a -20°C.

MEDIOS DE CULTIVO**2.6.a. LB ampicilina** contiene por litro:

10 gr de bacto triptona, 5 gr de extracto de levadura, 5 gr de NaCl y 0.2% de glucosa. Se esteriliza en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² de presión durante 15 min. Una vez que la temperatura del medio se equilibra con la del medio ambiente se agregan 2 ml. de ampicilina 25 mg/ml (concentración final de 50 ug/ml). Se conserva a 4°C por un máximo de 4 días; la ampicilina es inestable.

2.7. Dropout sólido.- Medio mínimo para aislar clones de levaduras transformadas con plásmidos que tienen integrado el gen URA3.

Sustancias necesarias:

0.72 gr de mezcla Dropout /lt

D-glucosa

YNB 10X (2.1.a.)

Agar

2.7.a. Mezcla Dropout sin uracilo:

Se mezclan en el mortero los aminoácidos y bases nitrogenadas en las proporciones siguientes: 720 mg de adenina, L-arginina, L-histidina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-triptofano, L-tirosina y 540 mg de L-treonina, teniendo cuidado de mezclarlos perfectamente. Se usan 0.72 gr de esta mezcla por litro de cultivo. Se conserva a temperatura

MEDIOS DE CULTIVO

ambiente. Favorece la eficiencia de recuperación de las células transformadas.

2.7.b. Dropout sólido contiene por litro:

20 gr de glucosa, 2% de agar, 0.72 gr de la mezcla Dropout. Se esteriliza en el autoclave a 120°C, 20 lb/in² de presión durante 15 min. Antes de que solidifique se le agregan 100 ml. de YNB 10X (2.1.a.) y se vacía en cajas petri estériles. Las cajas con el medio se incuban 24 hrs a 37°C para prueba de esterilidad y se sellan con parafilm. Se conservan a 4°C.

2.8. M63-sólido suplementado con x-gal: Medio para seleccionar clonas de levadura transformadas que expresan al gen Lac Z.

Sustancias necesarias:

(NH₄)₂SO₄

FeSO₄ · 7 H₂O KH₂PO₄

MgSO₄ · 7 H₂O KOH

Agar

D-glucosa en solución acuosa al 50% (2.4)

YNB (10X) (2.1.a.)

Aminoácidos y bases nitrogenadas (2.4)

X-gal

Dimetilformamida

MEDIOS DE CULTIVO**2.8.1. X-gal :**

El x-gal se disuelve en dimetilformamida a una concentración de 20 mg/ml. Se conserva a 4°C en un frasco ámbar o cubierto con papel de estaño.

2.8.2. M63-sólido contiene por litro:

13.6 gr de KH_2PO_4 , 2 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.2 gr de KOH, 0.2 gr de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ los cuales se disuelven por separado, 2% de agar, se esterilizan en el autoclave, antes de que solidifique se agregan 40 ml de glucosa al 50% (2.4), 100 ml de YNB 10X (2.1.a.) y los aminoácidos y bases nitrogenadas para los cuales la cepa es auxótrofa (2.4). Se vacía a cajas petri estériles. Una vez que el medio solidifica se depositan en el centro de la caja 20 microlitros de x-gal y se espátula hasta que queda uniformemente distribuido en toda la superficie de la caja (concentración final del x-gal 40 ug/ml). Se incuban 24 hrs a 37°C para prueba de esterilidad. Se conservan a 4°C selladas con parafilm.

M E T O D O S

3.- MINI- PREPARACIONES PARA LA OBTENCION DE PLASMIDOS.

Método de lisis alcalina; modificación del descrito en el manual editado por Maniatis. (33).

3.1 Soluciones:

Solución de lisis:

D-glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl de pH 8.0	25 mM

Se conserva a temperatura ambiente.

Solución de lisis + lisozima:

Lisozima 5 mg/ml en solución de lisis

Se prepara al momento de usarse.

Solución fresca de SDS alcalina:

NaOH	2N	1 vol.
Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%		1 vol.
Agua bidestilada		8 vol.

Se prepara al momento de usarse.

Solución de Sales:

Acetato de potasio	5M	60 ml
Acido acético glacial		11.5 ml
Agua bidestilada		20 ml

METODOS

recubierto con papel de estaño, porque es fotosensible, y a 4°C. PRECAUCION: el bromuro de etidio es cancerígeno; se debe evitar el contacto con la piel, las mucosas y la ingestión.

Colorante: Gilencianol-azul de bromofenol:

Gilencianol	0.25 %
Azul de bromofenol	0.25 %
Sacarosa	40 %

Se prepara en solución acuosa. Se guarda en un frasco ámbar a temperatura ambiente o a 4°C indistintamente.

Cloroformo-fenol

Cloroformo	1 vol
Fenol	1 vol

TE de pH 8.0 para saturar la solución, se guarda en un frasco ámbar a 4°C.

Otras:

Etanol al 75 % a -20°C. Agarosa tipo II

Isopropanol

Se inocularon 25 ml de medio LB ampicilina (2.6) en matraces de 125 ml, con la cepa E. coli a trabajar (1.1). El cultivo se incubó durante 16

MÉTODOS

hrs a 37°C con agitación rotatoria (200 rpm) y se distribuyó en tubos tipo eppendorf (aproximadamente 1.5 ml por tubo) que se centrifugaron durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta equipada con puntas desechables con capacidad de 0.2 ml. El paquete celular se resuspendió en 0.1 ml de solución de lisis más lisozima (a una concentración final de 5 mg/ml) Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0.2 ml de solución de SDS alcalina, se mezcló por inversión, se dejó reposar 5 min a 4°C, se añadieron 0.150 ml de solución de sales, se mezcló suavemente por inversión, se dejó reposar 5 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a tubos eppendorf, cuidando de no llevarse restos celulares; se añadió un volumen de cloroformo fenol saturado con solución amortiguadora TE de pH 8.0, se mezcló con un agitador de vórtice, se centrifugó por 5 min a temperatura ambiente y se pasó la fase acuosa a otro eppendorf (descartando los 0.03 a 0.05 ml cercanos a la interfase). Se añadió un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión. Se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el sobrenadante

MÉTODOS

succionándolo con una pipeta pasteur de punta alargada (se fabricó calentando al rojo con la llama del mechero la porción capilar de la pipeta y estirándola bruscamente) se agregaron 0.5 ml de etanol al 75% a -20°C , se centrifugó durante 10 min a 4°C , se succionó el etanol con una pipeta pasteur de punta alargada y se secó el sedimento al vacío en un desecador, teniendo cuidado cuando se rompe el vacío para no perder la muestra. Una vez seca, la muestra se resuspendió en 0.05 ml de TE de pH 8.0. Se añadió RNasa (libre de DNasas) a una concentración final de 50 ug/ml. Se incubó durante 30 min a 37°C y la solución de plásmido así obtenida se conserva a -20°C .

4.- GEL DE AGAROSA PARA LA ELECTROFORESIS DE LOS PLASMIDOS.

Se pesaron 0.2 gr. de agarosa y se disolvieron en 20 ml de solución amortiguadora TBE 0.5X calentando a punto de ebullición. Esta solución se dejó enfriar hasta una temperatura de 40°C aproximadamente. Se depositó dentro del recipiente para moldear el gel equipado con el peine formador de pocillos y se esperó a que gelificara a temperatura ambiente. Se retiró el peine y el gel se colocó dentro de la cámara horizontal de corrida. La cámara se llenó con

MÉTODOS

solución TBE 0.5X suplementada con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml hasta 3 mm por encima de la superficie del gel. Las muestras a probar se mezclaron con 0.003 ml de solución colorante gilencianol-azul de bromofenol y se colocaron dentro de los pocillos del gel. La electrofóresis se desarrolló a 80 V hasta que el gilencianol migró hasta el borde del gel. Finalmente las muestras se observaron en un transiluminador con lámpara de luz ultravioleta.

5.- USO DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas se seleccionaron de acuerdo con el mapa de restricción de cada plásmido, de tal manera que se obtuvieran fragmentos específicos que permitieran identificarlo. Por otro lado se prepararon los tubos eppendorf con el plásmido que se iba a restringir. Primero se agregó la solución amortiguadora para la enzima que se usó, después el plásmido, en seguida el agua hasta completar un volumen de 0.02 ml totales y finalmente la enzima (1 a 10 unidades). Esta mezcla se incubó a 37°C durante un lapso mínimo de 90 min. Finalmente el patrón de restricción se verificó mediante electrofóresis en un gel de agarosa al 1%.

METODOS

6.-OBTENCION DE LEVADURAS DEFICIENTES RESPIRATORIAS
"PETITE"

Se inocularon 20 ml del medio YPD (2.1) en matraces de 125 ml, con una colonia de la cepa W303 1B (1.2). Se incubó a 30°C durante 24 hrs con agitación rotatoria para obtener un cultivo en fase estacionaria que fue usado como "stock".

Posteriormente se preparó un inóculo de 5 ml del medio YPD (2.1), diluyendo 1:250 del "stock", en un matraz erlenmeyer de 125 ml estéril, al cual se le agregó bromuro de etidio a una concentración de 50 ug/ml. El cultivo se dejó crecer hasta la fase media logarítmica.

Por otro lado se prepararon cajas de medio YPD sólido (2.2). Se estirió la mitad de la caja con una asada del cultivo una vez que alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 0.8 a 660 nm y la otra mitad de la caja se estirió con una asada del mismo cultivo pero " lavado " para quitar el exceso de bromuro de etidio. El lavado se realizó de la siguiente manera: se centrifugó el cultivo en tubos corex de 30 ml estériles, durante 5 min a 15000xg, a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla, que corresponde al paquete celular, se resuspendió en 5 ml de medio YPD (2.1). La suspensión

MÉTODOS

celular, se centrifugó nuevamente durante 5 min a 15000xg, a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió y centrifugó una segunda vez como en el paso anterior. Finalmente la pastilla se resuspendió en 1 ml de medio YPD (2.1) y se estiró en la otra mitad de la caja con medio YPD-sólido (2.2). La caja se incubó a 30°C para obtener las colonias de la levadura tratadas con bromuro de etidio.

Para la selección de las levaduras petite se preparó medio YPG-sólido (2.3) . Y parte de las colonias obtenidas tratadas con bromuro etidio se transfirieron a este medio, ya que las petite son aquellas clonas que crecen en medio YPD (2.2) pero no así en el YPG (2.3) .

Las colonias petite que se obtuvieron debían conservar las mismas auxotrofias de la cepa parental W303-1B (1.2). Por lo tanto se prepararon una serie de cajas de medio SD (2.4) de composición definida suplementado con todos los aminoácidos y bases nitrogenadas, o menos uno de ellos para los cuales la cepa parental es auxótrofa.

METODOS

7.- METODO PARA TRANSFORMAR A LAS LEVADURAS. (17)

7.1 Soluciones:

Solución amortiguadora TE de pH 8.0:

Tris-Hcl 10 mM

EDTA 1 mM

El pH se ajusta a 8.0 con HCl. Se conserva a temperatura ambiente.

Acetato de Litio de pH 7.9:

Acetato de litio 0.1 M

Se disuelve en TE. El pH se ajusta a 7.9 con ácido acético glacial. Se conserva a temperatura ambiente.

Polietylén glycol (PEG 4000):

Se prepara al 60% (peso/volumen) en agua y se esteriliza en el autoclave. Se conserva a temperatura ambiente.

Se inocularon 100 ml de medio YPD (2.1) en matraces de 250 ml, con la levadura que se transformó y se dejó crecer hasta que alcanzara la fase logarítmica tardía. Se cosecharon las células por centrifugación durante 5 min a 10,000xg en corex de 150 ml previamente esterilizados, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se

METODOS

lavo una vez con agua estéril a temperatura ambiente . La pastilla se resuspendió, en 20 ml de Acetato de litio. Se incubó durante 30 min a 30°C con agitación rotatoria suave (3,000xg). Se centrifugó durante 5 min a 10,000xg y a 4°C. La pastilla celular se resuspendió en 3 ml de acetato de litio y se distribuyó la suspensión colocando 0.2 ml en tubos eppendorf. A cada tubo se le agregó un volumen máximo de 0.025 ml (entre 0.2 y 1.0 ug) del DNA con el que se transformó la levadura, se incubó sin agitación durante 35 min a 30°C. Se resuspendieron las células por inversión y se les adicionó 0.220 ml de PEG. Se mezclaron las células por inversión, se incubaron durante 1 hr a 30°C sin agitación, se les dió un choque térmico durante 5 min, a 42°C y se centrifugaron durante 30 seg en la microfuga a temperatura ambiente. Se lavó la pastilla celular una vez con 0.5 ml de agua estéril y se resuspendió en 0.5 ml de YPD (2.1). Las células se sembraron en el medio mínimo dropout sólido sin uracilo (2.7). Las cajas se incubaron a 30°C hasta que crecieron las colonias.

Se tomó parte de las colonias que crecieron en el medio dropout sin uracilo para sembrarlas en medio M-63 sólido (2.8); ya que las levaduras

MÉTODOS

transformadas expresan el gen de LacZ, las colonias una tonalidad azul lo que permitió su selección.

8.- PURIFICACION DE LOS RIBOSOMAS (15)**8.1 Soluciones:****Amortiguador I:**

Tris-HCl de pH 7.4	100 mM
MgCl ₂	12 mM
KCl	80 mM
Beta-mercaptoetanol	5 mM

Se conserva a 4°C.

Amortiguador II:

Tris-HCl de pH 7.4	20 mM
MgCl ₂	100 mM
Acetato de amonio	500 mM
Beta-mercaptoetanol	5 mM

Se conserva a 4°C.

Se inocularon 200 ml del medio SD ura⁻, en matraces de 500 ml con las cepas de levadura que se trabajaron, se incubaron con agitación rotatoria vigorosa a 30°C, hasta que llegaron a la fase media logarítmica. Las células se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 10,000xg a 4°C. Las células se lavaron con 40 ml de agua bidestilada y

METODOS

se centrifugaron durante 5 min a 10,000xg a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador I, y las células se rompieron con perlas de vidrio (de 0.4 a 0.5 mm de diámetro), Las perlas de vidrio se lavaron con 1 ml de amortiguador I y la solución (2 ml) se transfirió a tubos corex de 30 ml para ser centrifugados durante 10 min a 22,000xg a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 45000 rpm en el rotor 50 Ti (Beckman) durante 4 hrs a 4°C, a través de un colchón de 12 ml de sacarosa al 40% en solución de amortiguador II. El sobrenadante se conservó ya que corresponde a la fracción S100 (citosol) y la pastilla ribosomal se lavó con 1.0 ml de amortiguador I. Finalmente la pastilla ribosomal se resuspendió en 1.0 ml de amortiguador I. Las muestras obtenidas se conservaron a -20°C.

9.- CUANTIFICACION DE LA BETA-GALACTOSIDASA. (35, 63)

(Beta-Gal)

9.1 Soluciones:

Amortiguador de Fosfatos

0.1 M de pH 7.0

K₂HPO₄ , 3 H₂O 100 ml 0.5 M

MÉTODOS

KH_2PO_4 100 ml 0.5 M

Se mezclan 40 ml de la solución de K_2HPO_4 y 3 H_2O con 15 ml de KH_2PO_4 mas 165 ml de agua bidestilada. Se conserva a temperatura ambiente.

Ortonitrofenil**beta-D-galactopiranosido**

(O N P G):

Se disuelve el ONPG en amortiguador de fosfatos 0.1 M a una concentración de 4 mg/ml. Se prepara al momento de usarse.

Amortiguador Z de pH 7.0:

Na_2HPO_4 65 mM

NaH_2PO_4 40 mM

KCl 10 mM

MgSO_4 1 mM

2-mercaptoetanol 40 mM

Se conserva a temperatura ambiente.

Carbonato de sodio:

Na_2CO_3 1 M

Se conserva a temperatura ambiente.

MÉTODOS

Se dejaron varios inóculos de 100 ml de cada cultivo a probar durante 16 hrs a 30°C y se agitaron vigorosamente hasta que alcanzaron las densidades ópticas deseadas (fase inicial, fase media logarítmica y fase estacionaria). Se centrifugaron durante 10 min a 10,000xg a 4°C en tubos corex de 150 ml. La pastilla celular de cada cultivo se resuspendió en 20 ml de agua estéril y se pasaron a tubos corex de 30 ml. Se centrifugaron durante 5 min a 22,000xg a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las pastillas celulares se resuspendieron en 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 mM de pH 7.0 cada una. Se agregaron perlas de vidrio de 0.4 a 0.5 mm de diámetro y las células se rompieron por agitación vigorosa en el vortex. Estos extractos celulares crudos se traspasaron a otros corex de 30 ml, cuidando de no llevarse perlas de vidrio, y se centrifugaron durante 15 minutos a 22,000xg a 4°C. El sobrenadante se distribuyó en tubos de ensayo en diferentes volúmenes a probar: 0.01 ml, 0.02 ml, 0.03 ml, etc. (se puso un blanco con agua), se llevaron a un volumen constante de 0.4 ml con el amortiguador de fosfatos 0.05 mM, se agregó 0.4 ml de amortiguador Z, se agitaron en el vortex, y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura

METODOS

ambiente. En seguida las muestras se agitaron de nuevo en el vortex y se incubaron a 28°C durante 10 min. Se les agregó 0.2 ml de ONPG, se mezcló en el vortex y se incubó de nuevo a 28°C; se comenzó a tomar el tiempo (en minutos) hasta que las muestras tomaron color amarillo. La reacción se detuvo con 0.5 ml de Na₂CO₃ 1.0 M. El color desarrollado se cuantificó en un espectrofotómetro a 420 nm y la actividad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de beta-gal: } \frac{(\text{D.O. } 420 \text{ nm})(1000)}{(\text{Vol})(t \text{ en minutos})}$$

Para expresarla como actividad específica (A.E.), la cifra que se obtuvo se dividió entre la concentración de proteína.

10.-DETERMINACION DE PROTEINAS (27).

10.1 Soluciones:

Solución A:

Na ₂ CO ₃	10 gr
NaOH	2 gr
NaK tartrato	0.1 gr
Aforar a 500 ml	

Se conserva a 4°C.

MÉTODOS**Solución B:**

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 gr/ lt.

Se conserva a 4°C.

Solución C:

50 partes de la solución A más 1 partes de la solución B, se prepara al momento de usarse.

Solución D:

Reactivo de Folin, diluido 1:1 con agua bidestilada; se prepara al momento de usarse.

En el interior de tubos de ensayo, higienizados con ácido clorhídrico 1N durante toda la noche a 70°C, y por duplicado, se colocan 0.2 ml de seroalbúmina de bovino a concentraciones crecientes conocidas para obtener una curva patrón, y las muestras problema. Se agregó 1 ml de solución C. Se mezcló por agitación vigorosa y se dejó reposar durante 10 min; se adicionó 0.1 ml del reactivo de Folin previamente diluido 1:1 con agua bidestilada estéril, se mezcló por agitación vigorosa y las muestras se dejaron reposar durante 45 min. a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro (

METODOS

Beckman DU-7) usando como blanco una muestra sólo con agua.

11.- INMUNIZACION DE CONEJOS CONTRA BETA-GALACTOSIDASA.

11.1 Soluciones:

**Amortiguador Fosfato-Salino
de pH 7.4 (PBS).**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	8 mM
KHPO_4	1.5 mM
NaCl	0.137 mM
KCl	3 mM

Se esteriliza en el autoclave a 120 lb/in² de presión durante 15 min y se conserva a temperatura ambiente.

Se prepararon 0.5 ml de beta-galactosidasa disuelta en PBS a una concentración de 500 ug/ml, más 0.5 ml de adyuvante completo de Freund de tal manera que quedara 1 ml de solución la cual se inyectó subcutáneamente a cada conejo (1.3) (Fig. 13). Los conejos se reinmunizaron en dos ocasiones más, a intervalos de 15 días con 100 ug/ml de beta-galactosidasa, preparada como se acaba de describir anteriormente. 10 días después de cada reinmunización, los dos conejos se sangraron para obtener el suero.

Figura 13.- Inmunización de conejos contra beta-galactosidasa. A y B) conejos de raza Nueva Zelanda de 1.5 a 2 kg. de peso y de 3 a 5 meses de edad. C) Se inyectaron subcutáneamente (Dunbar,1988)

METODOS



A

B



C

MÉTODOS**12.- OBTENCION DEL SUERO.**

Para sangrar a los conejos, se les frotó la parte posterior de la oreja con un algodón humedecido con xilol para dilatar las venas. Se hizo una incisión pequeña en una de las venas con una navaja de bisturí. Se colectaron 20 ml de la sangre en tubos conéx de 30 ml estériles. Se presionó un poco sobre la herida para evitar que siguiera sangrando y se le aplicó Topazone para evitar una infección (Fig. 14).

La sangre se puso a incubar durante 1 hr a 37°C para que coagulara. Se separó el coágulo de la pared de los tubos y se centrifugó durante 5 min a 10,000xg. Con una pipeta pasteur se succionó el suero el cual se guardó a -20°C .

13.- INMUNODIFUSION.**13.1 Soluciones:**

Solución "Stock" de

beta-galactosidasa:

beta-galactosidasa 2080 ug/ml

Amortiguador fosfato-salino (PBS)

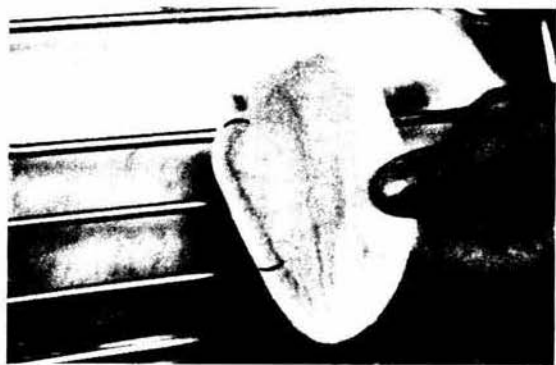
La beta-galactosidasa se disuelve en el amortiguador fosfato-salino y se conserva a -20°C.

Figura 14.— Obtención de la sangre del conejo. D y E) Se les frotó la parte posterior de la oreja con xilol para dilatar las venas. F) Se hizo una incisión pequeña en una de las venas con una navaja de bisturi. G) Se colectaron 20 ml de la sangre en tubos corex de 30 ml. H) Se presionó un poco sobre la herida para evitar que siguiera sangrando y se le aplicó topazone para evitar una infección (Dunbar,1988).

D



E



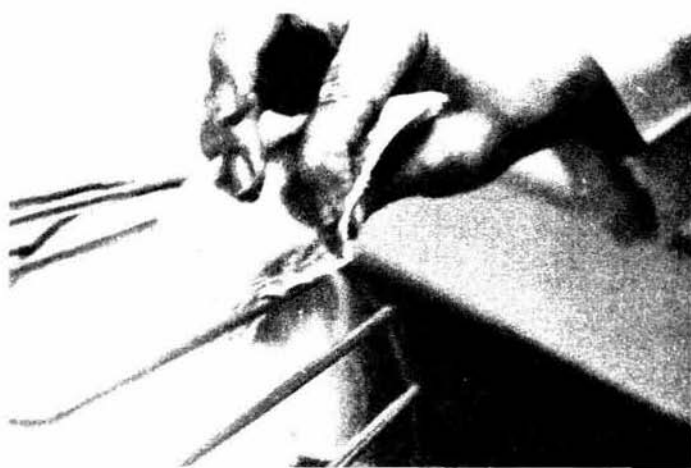
F



G



H



METODOS

Colorante TCA más Azul de Coomassie:

TCA	12.5%	40 ml
Azul de Coomassie G	2%	2 ml

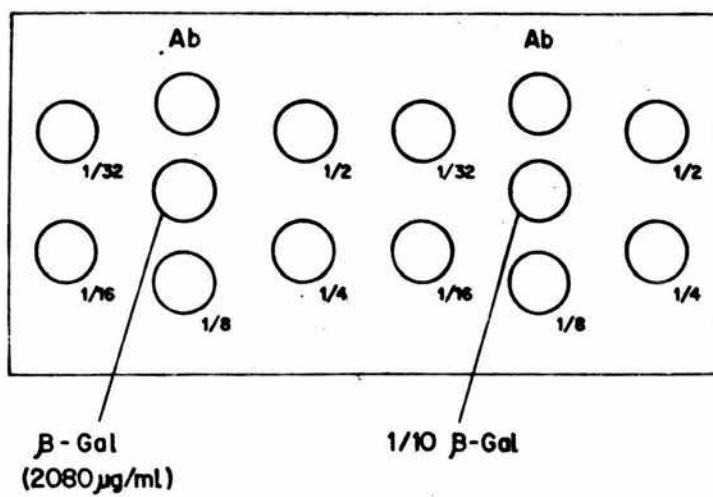
Se conserva a temperatura ambiente

Se disolvió agarosa hasta 2% en 5 ml de PBS, calentándola a punto de ebullición. Esta solución se colocó sobre un portaobjetos para formar un gel al cual se le hicieron una serie de perforaciones. Las muestras se distribuyeron como se indica en la Fig. 15.

Una vez colocadas las muestras dentro de los pocillos del gel, el portaobjetos que las contenía se colocó dentro de una cámara que contenía algodón humedecido, para evitar que el gel se deshidratara, y se conservó a 4°C. Cuando aparecieron las bandas de precipitación en el gel (aproximadamente en 2 días) éste se lavó 3 veces con PBS más 0.05% de azida de sodio a lo largo del día. Para teñir el gel se retiró el PBS más la azida de sodio y se colocó dentro de una cámara con la solución colorante de TCA azul de coomassie de manera que lo cubriera. Se dejó actuar al colorante durante 20 min: el gel se enjuagó con agua y finalmente se fotografió húmedo.

Figura 15.- Esquema de la inmunodifusión. El antisuero y sus diluciones seriadas se depositaron en los pocillos de la periferia. Al centro se colocó la beta-galactosidasa.

METODOS



14.- ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay).

(32, 84).

14.1 Soluciones:

Amortiguador Carbonato 0.05 M**de pH 9.6:**Na₂CO₃ 15 mMNaHCO₃ 35 mM

Se conserva a temperatura ambiente.

Amortiguador Fosfato-salino-Tween**de pH 6.5 (PBST):**NaH₂PO₄ . H₂O 4 mMNa₂HPO₄ 2 mM

NaCl 145 mM

Tween 20 0.5 ml

Agua destilada 1 lt.

Se conserva a temperatura ambiente.

Amortiguador fosfato-citrato**de pH 5.0, 0.175 M:**

Acido cítrico anhidro 0.1 M 100 ml

Na₂PO₄ anhidro 0.24 M 100 ml

Agua destilada 200 ml

Se conserva a temperatura a ambiente.

MÉTODOS**Solución colorante-sustrato:**

Tampón fosfato citrato pH 5.0	10 ml
Orto-fenilendiamina (OPD)	10 mg
Agua oxigenada (30%)	0.04 ml

Se prepara al momento de usarse.

Amortiguador Fosfato-salino (PBS):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	8 mM
KHPO_4	1.5 mM
NaCl	0.137 M
KCl	3 mM

Se conserva a temperatura ambiente.

14.2 **ELISA indirecto** (para la determinación de la cantidad óptima de proteínas a fijar en las placas para ELISA).

Se disolvió beta-galactosidasa a una concentración de 0.5 mg/ml en PBS. Se mezclaron 0.040 ml de beta-galactosidasa 0.5 mg/ml con 1.96 ml de amortiguador de carbonatos de pH 9.6 y se preparó una placa especial para ELISA como sigue: se colocaron 0.2 ml de beta-galactosidasa (5 ug/ml) en los pocillos de la fila 3 y en las filas 4 a la 12 se colocaron 0.1 ml del amortiguador de carbonatos de pH 9.6. A continuación se tomó 0.1

METODOS

ml, con una micropipeta multicanal de la fila 3 y se mezclaron con los 0.1 ml del amortiguador de carbonatos de la fila 4 y así sucesivamente hasta la fila 12, para obtener diluciones seriadas a un medio y un volumen final de 0.1 ml en cada pocillo. La fila 1 se usó como control negativo colocándose en cada pocillo 0.1 ml del amortiguador de carbonatos de pH 9.6. La fila 2 se usó como control positivo colocándose en cada pocillo 0.1 ml del suero anti-beta-gal. La placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se selló con papel autoadherible para evitar la evaporación. Se dejó durante 18 hrs a 4°C y en seguida se dejó equilibrar hasta la temperatura ambiente. El contenido de la placa se eliminó por decantación y todos los pocillos se lavaron tres veces con el amortiguador de lavado (PBST) sacudiendo bien la placa entre cada lavado. Se agregaron 0.1 ml del suero anti-beta-galactosidasa diluido en amortiguador de lavado de la siguiente manera: en A y B 1:8000; C y D 1:10000; E y F 1:14000; G y H 1:16000. Se incubó la placa durante 30 min a temperatura ambiente; se lavó tres veces con el amortiguador de lavado (PBST) y a cada pocillo se le agregó 0.1 ml de antisuero de chivo anti-conejo conjugado con peroxidasa (IgG-peroxidasa) por

MÉTODOS

pocillo, a una dilución 1:2000 en amortiguador de lavado (PBST). La placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces con amortiguador de lavado (PBST), se le agregó 0.1 ml de la solución colorante sustrato por pocillo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 0.1 ml de H_2SO_4 4N por pocillo. Finalmente la absorbencia de luz por la mezcla de reacción se cuantificó a 490 nm.

14.3 ELISA de inhibición (para valorar soluciones proteicas).

En este ensayo se utilizaron dos placas. La primera, llamada placa de pegado, se sensibilizó depositando 0.1 ml por pocillo de beta-galactosidasa (5 ug/ml). En seguida se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, se selló con papel autoadherible y se incubó durante 18 hrs a 4°C. La segunda placa, llamada placa de transferencia, se utilizó para incubar el anticuerpo específico con diluciones seriadas de la beta-galactosidasa a concentraciones conocidas, usada como patrón de referencia y de las soluciones proteicas a valorar: en este caso, de la pastilla ribosomal y de la fracción celular S100. La placa se preparo de la siguiente manera: se colocaron 0.2

METODOS

ml de beta-gal (5 ug/ml) en los pocillos de la 3ª columna de las líneas A y B y se realizaron diluciones, seriadas a un medio, con amortiguador de lavado (PBST) de las muestras de los pocillos 3 al 12 de las línea A y B, para la curva patrón. Como control positivo, en los pocillos de la columna 2 de las líneas A y B, se colocaron 0.1 ml del amortiguador de lavado (PBST) más antisuero. Como control negativo, en los pocillos de la columna 1 de las líneas A y B se colocaron 0.1 ml del amortiguador de lavado (PBST) sin antisuero. En el resto de los pocillos se colocaron 0.1 ml de las muestras problema. Se agregó 0.1 ml por pocillo del anti-suero contra beta-galactosidasa a una dilución de 1:10000 y también 0.1 ml por pocillo del amortiguador de lavado, de tal manera que todos los pocillos de la placa tuvieron un volumen final de 0.3 ml. Finalmente la placa se selló como se describió en el párrafo anterior y se dejó incubando durante 18 hrs a la temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se transfirieron 0.2 ml de esta placa a la placa de pegado, previamente equilibrada a la temperatura ambiente y lavada tres veces con amortiguador de lavado (PBST), y se incubó a la temperatura ambiente durante una hora.

MÉTODOS

El resto del ensayo se realizó como se describió en el método de ELISA indirecto (14.2).

R E S U L T A D O S

CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS PLASMIDOS

Uno de los requisitos para el presente trabajo fue obtener una cantidad suficiente de plásmidos con los que se transformaría a la levadura *S. cerevisiae* (1.2). Para ello, las cepas de *E. coli* (1.1) se inocularon en medio LB ampicilina (2.6) y las células obtenidas se procesaron como se describió (Métodos; sección 3). La integridad de los plásmidos se verificó sometiéndolos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% seguida de la visualización del patrón de bandas en un transiluminador con lampara de luz UV (Métodos; sección 4). En todas las preparaciones de los plásmidos utilizados, se observaron las 3 bandas distintivas de las formas superenrollada, circular y circular abierta. Las muestras de plásmidos con patrones electroforéticos aberrantes se desecharon.

La cantidad total de plásmido que se obtuvo por cada mililitro de cultivo fue aproximadamente de 1.3 ug. Este rendimiento está por debajo de los límites teóricos situado entre 3 a 5 ug de DNA por mililitro (33). No se pudo encontrar la (s) causa (s) que explicara (n) el rendimiento bajo.

RESULTADOS

Los plásmidos se identificaron por el patrón electroforético de bandas característico de cada uno de ellos, después de hidrolizarlos con diferentes enzimas de restricción (Fig. 16, Tabla I y Tabla II) (Métodos; sección 5). El desplazamiento electroforético de los fragmentos de cada plásmido digerido se muestra en la Tabla III. El tamaño de los fragmentos obtenidos experimentalmente coincide con los tamaños teóricos esperados.

FENOTIPO DE LAS CELULAS PETITE

La cepa W303 1B (1.2) de S. cerevisiae se trató con bromuro de etidio (Métodos; sección 6), para obtener una mutante deficiente respiratoria y así poder comparar la expresión de los genes de las proteínas ácidas ribosomales entre una levadura grande (competente respiratoria) y una levadura que sólo dispone de la energía derivada de la glucólisis (petite). No se cuantificó la eficiencia de la mutagénesis porque con una sola clona petite que se obtuviera sería suficiente para los propósitos de este trabajo.

En el recuadro 1 de la Fig. 17 se muestra el crecimiento de la levadura W303 1B parental y el crecimiento de la levadura tratada con bromuro de etidio en medio YPD agar (2.1). De las colonias que crecieron, una parte se sembró en

FIGURA 16.— Patrón de migración de los fragmentos de DNA del fago lambda digerido con la enzima Hind III. La electrofóresis se desarrolló en buffer TBE; 80 V en un gel de agarosa tipo II.

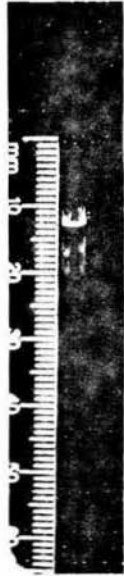


TABLA I

Esquema del patrón de migración de los fragmentos de DNA del fago lambda digerido con la enzima Hind III.

Kb
--- 23.13
--- 9.42
--- 6.56

--- 4.36

--- 2.32
--- 2.03

--- 0.56

--- 0.13

La electroforesis se desarrolló como se describió en Materiales y Métodos.

TABLA I I

Plásmidos y enzimas de restricción con las que fueron digeridos.

PLASMIDO	ENZIMA
YEp 44	EcoRI, Pst I, Hind III, Sal I
YEp 45-1	ECoRI, Hind III
YEp 45-2	EcoRI/Pst I, Hind III
YEp 46	EcoRI/Pst I
YEp 47 Hp	EcoRI/Pst I
YEp 47 Pv	EcoRI/Pst I
YEp 357	EcoRI, Pvu II

TABLA III

Fragmentos de DNA obtenidos después de digerir a los plásmidos con las enzimas de restricción.

Plásmido	Enzima	Fragmento ^a (Kb)
YEp 44	EcoRI Pst I Hind III Sal I	8 kb, 2.3 Kb 10.3 Kb 9.44 Kb, 0.86 Kb 10.3 Kb
YEp 45-1	EcoRI Hind III	8.6 Kb 11.29 Kb
YEp 45-2	EcoRI/Pst I Hind III	8.5 Kb 8.5 Kb
YEp 46	EcoRI/Pst I	8.6 Kb
YEp 47 Hp	EcoRI/Pst I	8.73 Kb
YEp 47 Pv	EcoRI/Pst I	8.7 Kb
YEp 357	EcoRI Pvu II	7.66 Kb 5.046 Kb, 2.557 Kb, 0.363 Kb

* El tamaño de los fragmentos se calculó por comparación contra el patrón de Lambda Hind III (Tabla I).

Figura 17.- Crecimiento en medio YPD (contiene glucosa como fuente de carbono) de las levaduras grandes antes (recuadro numerado) y después (recuadro contiguo a la derecha) tratadas con bromuro de etidio.

1.- W303 1B

5.- TYG 46

2.- TYG 44

6.- TYG 47 Hp

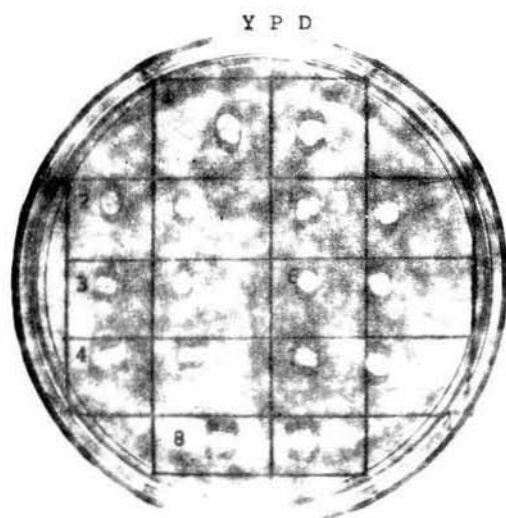
3.- TYG 45-1

7.- TYG 47 Pv

4.- TYG 45-2

8.- TYG 357

RESULTADOS



RESULTADOS

medio YPG agar (2.3) para seleccionar a las levaduras que fueran incapaces de crecer en él. En el recuadro 1 de la Fig. 18 se muestra que, en este medio, la levadura parental W303 1B sí creció, en contraste con la levadura tratada con bromuro de etidio que no creció. Este resultado demuestra que esta última se convirtió en deficiente respiratoria, incapaz de utilizar sustratos no fermentables, en este caso el glicerol, que es una de las características que definen al fenotipo petite (10).

Para probar que las levaduras petite obtenidas conservaban las mismas auxotrofias que la cepa parental W303 1B (1.2), se prepararon cajas de medio SD agar (2.5) suplementado con los aminoácidos y bases nitrogenadas como se describe en la Tabla IV. El resultado de este experimento fue que sólo hubo crecimiento en el medio suplementado con todos los requerimientos nutricionales de la cepa W303 1B, lo que demuestra que las cepas petite derivaron de ella.

TRANSFORMACION DE LAS LEVADURAS GRANDES Y PETITE

Los genes eucarióticos fusionados al gen de Lac Z (beta-galactosidasa) de *E. coli* se expresan en la levadura. Este tipo de fusiones son útiles en el estudio de la expresión de los genes, ya que los productos proteicos de éstos, se

Figura 18.— Crecimiento en medio YPG (contiene glicerol como fuente de carbono)de las levaduras grandes antes (recuadro numerado) y después (recuadro contiguo a la derecha) tratadas con bromuro de etidio.

1.— W303 1B

5.— TYG 46

2.— TYG 44

6.— TYG 47 Hp

3.— TYG 45-1

7.— TYG 47Pv

4.— TYG 45-2

8.— TYG 357

Y P G

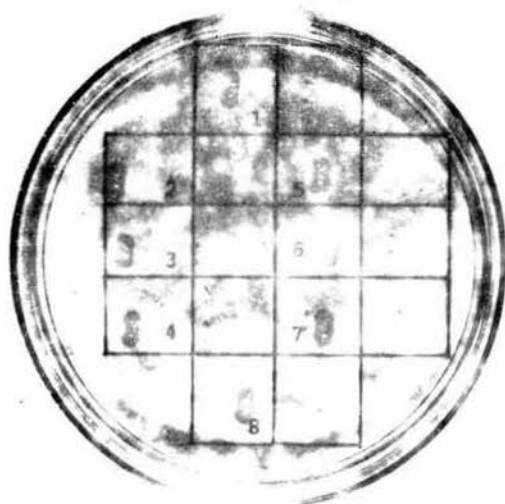


TABLA IV

Verificación de las auxotrofías de la levadura petite.

Ade	His	Leu	Trip	Ura	Crecimiento
-	+	+	+	+	Negativo
+	-	+	+	+	Negativo
+	+	-	+	+	Negativo
+	+	+	-	+	Negativo
+	+	+	+	-	Negativo
+	+	+	+	+	Positivo

- no se adicionó al medio SD.

+ si se adicionó al medio SD.

RESULTADOS

puede detectar fácilmente como actividad de beta-galactosidasa.

Con base en lo descrito en el párrafo anterior, se transformaron las levaduras grandes y las petite (Métodos; sección 7) con cada uno de los plásmidos listados en la Tabla II, a los cuales tienen insertada la secuencia del gen que codifica para las diferentes proteínas ribosomales ácidas (Sección de Material Biológico) las levaduras así tratadas se sembraron en medio dropout sólido sin uracilo (2.7.b.) para seleccionar sólo clonas transformadas, ya que el plásmido les proporciona el producto del gen URA 3. De cada una de las transformantes, se tomó una parte y se sembró en medio M 63-x-gal sólido (2.8) para realizar una segunda selección, ya que en este medio las levaduras transformadas adquieren una coloración azul (Fig. 19). Como control de este experimento, la cepa parental se transformó con el vector YEp 357, sin ningún inserto; el resultado fué que creció en ambos medios debido a que el vector le proporcionó el producto del gen URA 3, pero en el medio M 63-x-gal sólido el color de la clona fue blanco debido a que no tuvo actividad de beta-galactosidasa, porque la expresión del gen Lac Z requiere que se le anteponga un promotor eucarionte (97, 98). Las levaduras transformadas obtenidas se enlistan en la Tabla V.

Figura 19.- Crecimiento en medio M63-X-gal de las levaduras transformadas.

- | | |
|---------------|----------------|
| 1.- TYG 357 | 8.- TYP 44 |
| 2.- TYG 44 | 9.- TYP 45-1 |
| 3.- TYG 45-1 | 10.- TYP 45-2 |
| 4.- TYG 45-2 | 11.- TYP 46 |
| 5.- TYG 46 | 12.- TYP 47 Hp |
| 7.- TYG 47 Hp | 13.- TYP 47 Pv |
| 8.- TYG 47 Pv | |

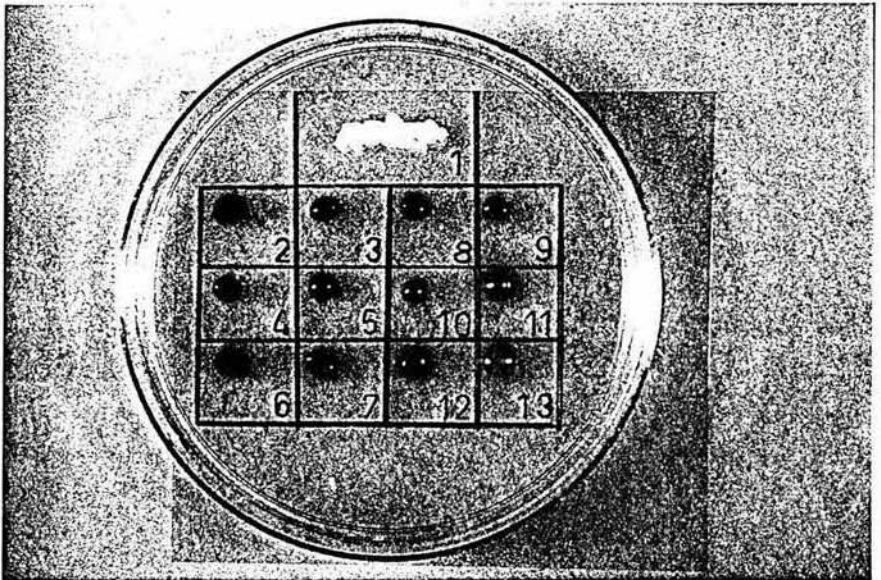


TABLA V

Levaduras transformadas con los diferentes plásmidos

a

TYG 44 : Fusión YP2-alfa (65 aa) Lac Z
 TYG 45-1: Fusión YP2-beta (75 aa) Lac Z
 TYG 45-2: Fusión YP2-beta (50 aa) Lac Z
 TYG 46 : Fusión YP1-beta (36 aa) Lac Z
 TYG 47 Hp: Fusión YP1-alfa (60 aa) Lac Z
 TYG 47 Pv: Fusión YP1-alfa (65 aa) Lac Z
 TYG 357 : Vector sin inserto [⊖]

b

TYP 44 : Fusión YP2-alfa (65 aa) Lac Z
 TYP 45-1 : Fusión YP2-beta (75 aa) Lac Z
 TYP 45-2 : Fusión YP2-beta (50 aa) Lac Z
 TYP 46 : Fusión YP1-beta (36 aa) Lac Z
 TYP 47 Hp: Fusión YP1-alfa (80 aa) Lac Z
 TYP 47 Pv: Fusión YP1-alfa (69 aa) Lac z
 TYP 357 : Vector sin inserto [⊖]

- TYG = W303 1B grande
- TYP = W303 1B petite
- ⊖ Control

RESULTADOS

De las clonas de las levaduras transformadas se tomó una parte y se sembró en medio YPD agar (2.2) en el que todas crecieron. Posteriormente se pasaron a medio YPG agar (2.3) en el que ninguna creció, comprobándose que la transformación no alteró a la condición petite (Figs. 17 y 18).

A continuación las transformantes se estriaron en medio mínimo SD URA⁻ para su conservación; en la Fig. 20 se ejemplifica la manera en que se conservaron las cepas TYG 44 y TYP 44, en este medio.

CANTIDAD DE RIBOSOMAS EN FUNCION DEL ESTADIO DE CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS

De cada una de las levaduras transformadas (Tabla V) se obtuvo la pastilla ribosomal y la fracción S100 (citosol), con el fin de cuantificar la cantidad de proteína híbrida que queda unida a la pastilla ribosomal y la que queda en la fracción del citosol a través del ensayo de Beta-galactosidasa y el método de ELISA. Además se obtuvieron en fase media logarítmica y en la fase estacionaria para observar si existían diferencia entre un estadio y el otro.

Para saber cuando se alcanzaban estas fases, se realizaron las curvas de crecimiento de cada una de las

Figura 20.— Crecimiento de la transformante TYG 44 (grande)
y TYP 44 (petite) en medio SD URA⁻ en el cual se conservaron
esta y las demás transformantes.

SD URA⁻

GRANDE

PETITE



RESULTADOS

transformantes. Los valores obtenidos de tiempo de duplicación y las densidades ópticas como medida de las diferentes fase, se muestran en las Tablas VI y VII. En las tablas anteriores se observa, que no hay diferencia significativa en el crecimiento de las levaduras transformadas con respecto a la levadura sin transformar, lo que significa que el plásmido no afecta al tiempo de duplicación celular. La Fig. 21 es la representación gráfica de la curva de crecimiento de las levaduras grande W303 1B y petite en medio SD. El tiempo de duplicación de la levadura petite fué de 4 hrs, una hora y media más con respecto al de la levadura grande (2 :30 hrs), esto se debe a que, como ya se explicó antes, las células petite sólo cuentan con la glucólisis como fuente de ATP y por lo tanto crecen más lentamente.

La cantidad de ribosomas obtenidos de cada una de las levaduras transformadas se muestra en la Tabla VIII.

**CUANTIFICACION DE LA BETA-GALACTOSIDASA (BETA-GAL)
EN LAS FRACCIONES RIBOSOMAL Y S100**

Se realizó el ensayo de beta-galactosidasa (Métodos; sección 9) en las fracciones ribosomal y S100 de cada una de las cepas cosechada tanto en la fase media logaritmica como en la fase estacionaria y también se determinó la cantidad de

TABLA VI

Tiempo de duplicación de las transformantes grandes en medio mínimo SD URA⁻.

	^b T.D. (Hrs)	Pendiente	Fase Media Logaritmica ^c	D.O. Fase Estacionaria ^c
^a W303 1B	2:30	0.2773	0.8 - 0.9	1.8
TYG 44	2:30	0.2248	0.8 - 0.9	1.7
TYG 45-1	2:30	0.2392	0.8 - 0.9	1.6
TYG 45-2	2:30	0.2686	0.8 - 0.9	1.65
TYG 46	2:30	0.2314	0.8 - 0.9	1.55
TYG 47Hp	2:40	0.2373	0.9 - 1.0	1.6
TYG 47Pv	2:30	0.2465	0.8 - 0.9	1.6
TYG 357	2:40	0.2048	0.7 - 0.8	1.5

^a Control

^b Tiempo de duplicación. Se calculó con la formula $N = N_0 e^{mt}$ en donde m = velocidad específica de crecimiento (pendiente); N = tamaño de la población ; N_0 = población inicial; t = tiempo (Hrs); e = logaritmo . Despejando $T_d = \frac{\ln 2}{m}$, en donde T_d = tiempo de duplicación.

^c Se midió por nefelometría a 660 nm.

TABLA VII

Tiempo de duplicación de las transformantes petite en medio mínimo SD URA⁻

	^b T.D. (Hrs)	Pendiente	Fase Media Logaritmica ^c	Fase Estacionaria ^c
^a Petite	4:00	0.2015	0.9	1.6
TYP 44	4:12	0.1901	0.6 - 0.7	1.3
TYP 45-1	4:00	0.1510	0.7	1.35
TYP 45-2	4:00	0.1469	0.6 - 0.7	1.4
TYP 46	3:50	0.1262	0.5 - 0.6	1.1
TYP 47 Hp	4:00	0.1368	0.5 - 0.6	1.2
TYP 47 Pv	4:15	0.1712	0.6 - 0.7	1.3
TYP 357	4:00	0.1888	0.6 - 0.7	1.1

^a Control

^b El tiempo de duplicación se calculó como se detalló en la Tabla VI.

^c Se midieron por nefelometría a 660 nm.

Figura 21.- Curva de crecimiento de la levadura W303 1B grande (●) y petite (○) en medio mínimo SD URA*.

RESULTADOS

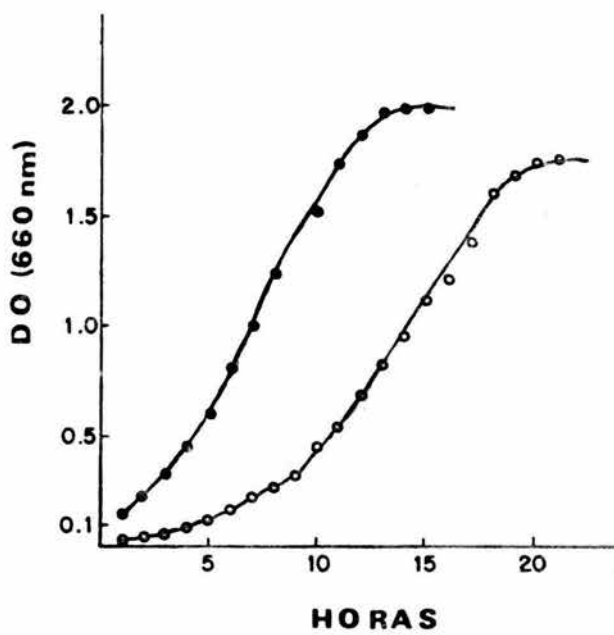


TABLA VIII

Cantidad de ribosomas de las levaduras transformadas

	LEVADURA ^a	D.O. _{260nm}	p moles de ribosoma ^b
Fase Media Logarítmica	TYG 44	64.48	741.33
	TYG 45-1	72.30	1205.00
	TYG 45-2	45.26	754.33
	TYG 46	42.67	711.16
	TYG 47 Hp	71.66	1194.33
	TYG 47 Pv	61.33	1022.16
	TYG 357	62.49	1041.50
Fase Estacionaria	TYG 44	30.49	508.16
	TYG 45-1	118.71	1978.50
	TYG 45-2	68.73	1145.50
	TYG 46	30.51	508.50
	TYG 47 Hp	50.24	837.33
	TYG 47 Pv	54.38	573.00
	TYG 357	43.11	718.50
Fase Media Logarítmica	TYP 44	77.16	1286.00
	TYP 45-1	31.83	530.50
	TYP 45-2	32.82	547.00
	TYP 46	43.16	719.33
	TYP 47 Hp	37.83	630.50
	TYP 47 Pv	80.99	1349.83
	TYP 357	34.16	569.33
Fase Estacionaria	TYP 44	32.66	544.33
	TYP 45-1	33.93	565.50
	TYP 45-2	17.28	288.00
	TYP 46	117.89	1964.83
	TYP 47 Hp	110.66	1844.33
	TYP 47 Pv	46.83	780.50
	TYP 357	49.664	827.66

^a TYG= levaduras grandes.
TYP= levaduras petite.

^b Se calcularon tomando en cuenta las siguientes equivalencias: 1 D.O.₂₆₀ = 40 μ g de rRNA; el P.M. del ribosoma 80S = 4×10^6 daltones; el rRNA representa el 60% de la masa total.

RESULTADOS

proteína de las muestras (Fig. 22) (Métodos: sección 10) para calcular, con ambos datos, la actividad específica. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla IX.

PRUEBA DE INMUNODIFUSION PARA DETECTAR ANTICUERPOS DE CONEJO CONTRA LA BETA-GALACTOSIDASA

Para poder llevar a cabo el ensayo de ELISA primero fue necesario obtener anticuerpos contra beta-galactosidasa: de tal manera que se inmunizaron dos conejos (1.3) con beta-galactosidasa (Métodos: sección 11) y se sangraron después de cada inmunización. Con el suero que se obtuvo se realizaron pruebas de inmunodifusión, colocándose el suero (Ab) y la beta-galactosidasa como se muestra en la Fig. 15. el observar bandas de precipitación en el gel, significa que hubo respuesta inmune hacia el antígeno en ambos conejos: en el conejo N^o I la reacción antígeno-anticuerpo fue positiva hasta una dilución de 1:4 del suero (Ab) y con la beta-galactosidasa diluida 1:10 en el 3^{er} sangrado (Fig. 23), para el conejo N^o II fue positiva hasta 1:8 del suero (Ab), con la beta-galactosidasa diluida 1:10 en el 3^{er} (Fig. 24) por lo tanto el suero que se usó para hacer las pruebas de ELISA fue el del conejo N^o II, ya que fue éste quien presentó una mejor respuesta.

Figura 22.- Curva tipo para la cuantificación de proteína. Se utilizó albúmina de suero de bovino. La curva tipo sólo es confiable, por ser proporcional, para medir valores entre 10 y 70 μg de proteína.

RESULTADOS

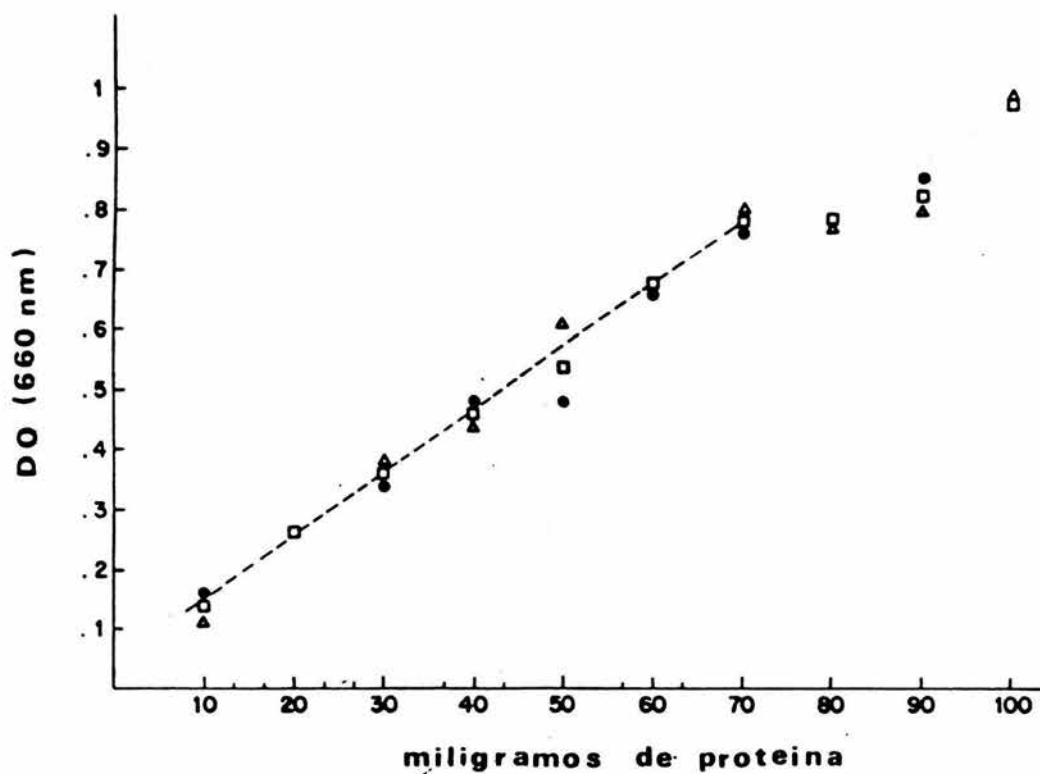


TABLA IX

Unidades de Actividad de Beta-galactosidasa

	Fase Media Log.		Fase Estacionaria	
	Fracción Ribosomal	Fracción S100	Fracción Ribosomal	Fracción S100
TYP 44	81.02	16.73	202.36	15.76
TYP 45-1	191.66	99.95	113.56	30.24
TYP 45-2	0.4792	43.07	7.02	20.87
TYP 46	0.0095	0.316	7.86	1.12
TYP 47 Hp	88.28	7.79	167.66	3.31
TYP 47 Pv	135.92	10.02	148.00	6.22
TYP 357 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00

Concentración de proteínas (ug)

TYP 44	3.5	2.8	5.0	4.6
TYP 45-1	4.5	6.8	4.0	4.8
TYP 45-2	4.0	10.4	3.0	4.4
TYP 46	2.0	3.0	5.5	3.8
TYP 47 Hp	3.5	4.6	3.75	4.2
TYP 47 Pv	4.0	4.0	4.5	4.8
TYP 357 ^a	-	-	-	-

Actividad específica de beta-galactosidasa^b

TYP 44	23.148	5.97	40.47	3.42
TYP 45-1	42.59	14.69	28.39	6.30
TYP 45-2	0.1198	4.14	2.34	4.74
TYP 46	0.0047	0.1056	1.42	0.294
TYP 47 Hp	25.22	1.694	44.70	0.788
TYP 47 Pv	33.98	2.505	32.88	1.245
TYP 357 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00

^a Control

^b Actividad específica = $\frac{\text{Unidades de actividad}}{\text{concentración de proteínas}}$

TABLA IX (continuación)

Unidades de Actividad de Beta-galactosidasa				
	Fase Media Log.		Fase Estacionaria	
	Fracción Ribosomal	Fracción S100	Fracción Ribosomal	Fracción S100
TYG 44	93.42	32.7	189.28	28.46
TYG 45-1	154.86	49.5	100.62	40.65
TYG 45-2	1.927	28.4	23.68	67.02
TYG 46	0.524	1.35	4.27	0.963
TYG 47 Hp	56.47	6.25	89.48	15.48
TYG 47Pv	128.64	26.48	136.78	12.49
TYG 357 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00
Concentración de proteínas (ug)				
TYG 44	2.0	2.2	5.2	6.5
TYG 45-1	4.3	5.6	3.8	3.7
TYG 45-2	4.0	3.2	4.0	4.6
TYG 46	2.0	2.0	4.5	4.0
TYG 47 Hp	4.4	3.5	5.0	3.7
TYG 47 Pv	4.6	4.0	4.8	4.2
TYG 357 ^a	-	-	-	-
Actividad especifica de Beta-galactosidasa ^b				
TYG 44	46.71	14.86	36.4	4.37
TYG 45-1	36.01	8.83	26.47	10.986
TYG 45-2	0.481	8.87	5.92	14.56
TYG 46	0.262	0.675	0.94	0.2407
TYG 47 Hp	12.83	1.78	17.89	4.18
TYG 47 Pv	27.96	6.62	28.49	2.973
TYG 357 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00

^a Control.

^b Actividad especifica= $\frac{\text{Unidades de actividad}}{\text{concentración de proteínas}}$.

Figura 23.- Detección de anticuerpos contra beta-galactosidasa por inmunodifusión; Conejo I.- Se inyectó 1 ml de beta-galactosidasa (500 ug/ml) por vía subcutánea en la región dorsal (Ver Fig. 13) a intervalos de 15 días. Las sangrías (1, 2, 3) se hicieron 10 días después de cada inmunización. El suero se depositó en los pocillos externos a dilución geométrica (en el sentido de las manecillas de un reloj). La beta-galactosidasa se depositó en el pocillo central a una concentración de 2080 ug/ml (A) y diluida 10 veces 208 ug/ml (B) (Ver Fig. 15).

RESULTADOS

I

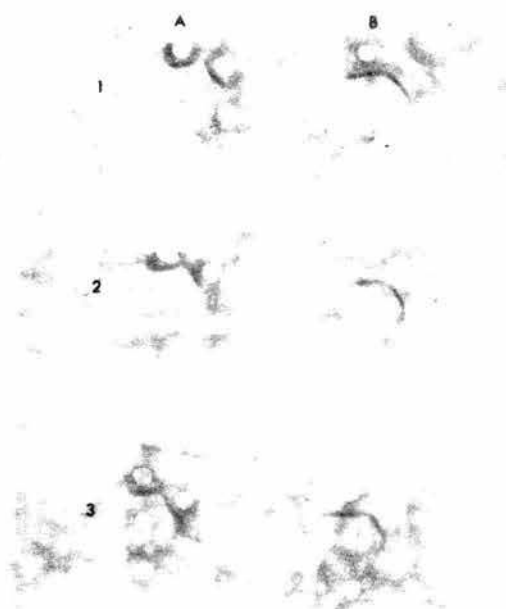


2



Figura 24.- Detección de anticuerpos contra beta-galactosidasa por inmunodifusión; Conejo II, el cual se trato igual que el conejo I (Ver Fig. 23).

II



ENSAYO DE ELISA INDIRECTO

Se realizó una prueba de ELISA indirecto para determinar la cantidad óptima de proteína que se debía fijar a las placas. El suero anti-beta-galactosidasa de conejo se usó en las siguientes diluciones 1:8000, 1:10000, 1:14000 y 1:16000 colocándose en la placa de ELISA como se muestra en la Fig. 25.

La absorbencia de luz por la mezcla de reacción se cuantificó a 490 nm en un mini-reader II (Tabla X y Fig. 26). Después de analizar los datos: la dilución de el suero anti-beta-galactosidasa que se eligió fue la de 1:10000 debido a que la curva que se obtiene con ella es confiable para calcular valores de beta-galactosidasa entre 5 y 0.0195 $\mu\text{g/ml}$ y con densidades ópticas a 490 nm a partir de 0.3 hasta 1.9.

**CUANTIFICACION DE BETA-GALACTOSIDASA EN LAS
FRACCIONES RIBOSOMAL Y S100 MEDIANTE ELISA DE
INHIBICION**

Se realizó ésta prueba para valorar las muestras de las fracciones ribosomal y S100 de cada una de las levaduras transformadas (Tablas VI y VII) tanto en la fase media

Figura 25.- ELISA Indirecto.- En las líneas A y B, C y D, E y F, G y H , se colocó el anti-suero-Beta-galactosidasa a diluciones de 1:8000, 1:10000, 1:14000 y 1: 16000 respectivamente. El antisuero de chivo anticonejo conjugado con peroxidasa (IgG-peroxidasa) a dilución 1:2000. La fila 1 se usó como control negativo (sólo tampón de lavado); la fila 2 se usó como control positivo (tampón de lavado + anti-suero-Beta-galactosidasa). Se colocaron 0.2 ml de Beta-galactosidasa a 5 ug/ml en la fila 3 y de la fila 4 a la 12 0.1 ml de tampón de carbonatos de pH 9.6 a continuación se tomaron 0.1 ml de la fila 3 y se mezclaron con la fila 4 y así sucesivamente hasta la fila 12, obteniéndose diluciones seriadas.

RESULTADOS

96

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	α - β -Gal
A													1: 8000
B													1: 10000
C													1: 14000
D													1: 16000
E													
F													
G													
H													

5 μ g/ml (β -Gal)

→ Control positivo

→ Control negativo

TABLA X
Curva patrón de ELISA indirecto^{a,b}

	AB	CD	EF	GH ^c
1 ^d	0.035	-0.034	-0.020	-0.011
2 ^e	*.***	*.***	*.***	*.***
3	0.000	0.3290	0.258	0.000
4	0.3165	0.626	0.435	0.000
5	0.455	0.854	0.759	0.0005
6	0.6450	1.061	0.946	0.0695
7	0.7515	1.355	1.095	0.1850
8	0.970	1.396	1.289	0.280
9	1.165	1.700	1.545	0.314
10	1.331	1.669	1.595	0.437
11	1.324	1.829	1.621	0.391
12	1.414	1.953	1.744	0.488
	1:8000	1:10000	1:14000	1:16000 ^f

▪ Los detalles técnicos se describen en la sección de Material y Métodos.

▫ La dilución de la IgG-peroxidasa fué de 1:2000

◦ AB, CD, EF y GH son el promedio de dos determinaciones.

◊ Control negativo. No se añadió el antígeno.

◈ Control positivo. Se añadió el antígeno.

◉ Dilución del antisuero.

Figura 26.- Representación grafica del ensayo de ELISA Indirecto, donde se muestra la curva de cada una de las diluciones del antisuero-beta-galactosidasa:

- 1:8000
- 1:10000
- 1:14000
- 1:16000

RESULTADOS

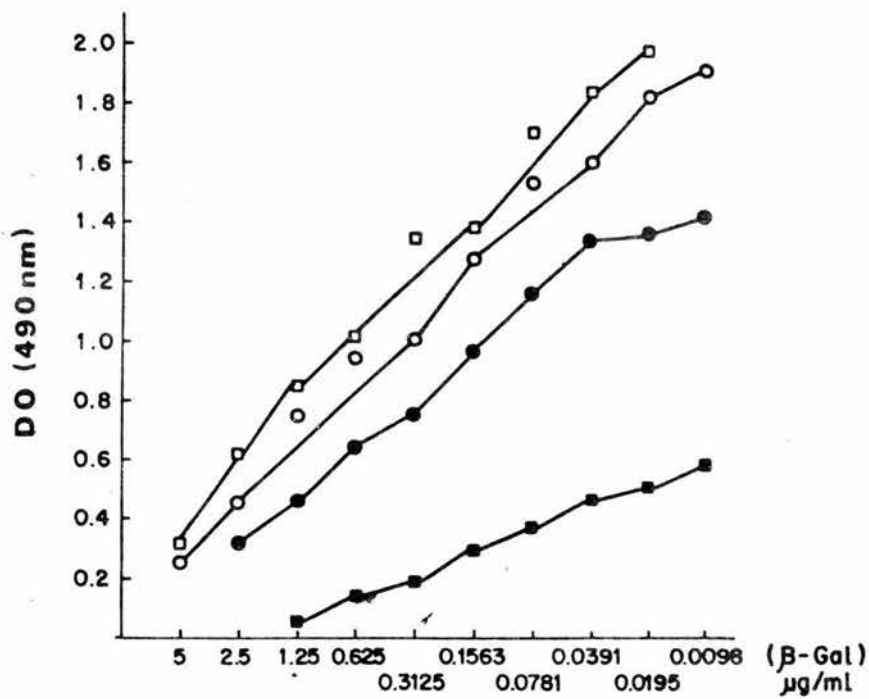


Figura 27.- ELISA de inhibición. La placa de pegado se preparó, colocando 100 microlitros de Beta-galactosidasa a una concentración de 5ug/ml por pocillo, la placa, se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. En la placa de transferencia las líneas A y B se usaron para obtener una curva patrón, por lo que se hicieron diluciones seriadas 1:2 de la Beta-galactosidasa a partir de la fila 3 hasta la 12. Las filas 1 y 2 de la línea A y B se usaron como control negativo (tampón de lavado) y control positivo (tampón de lavado + antisuero Beta-galactosidasa) respectivamente. En los pocillos del resto de la placa se distribuyeron las muestras problema.

RESULTADOS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<p style="text-align: center;">"Placa de Pegado"</p> <p style="text-align: center;">vol. final 100 λ por pocillo</p> <p style="text-align: center;">de β-Gal 5 μg/ml</p>											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	I	II	β -Gal Susp. Ant.										α - β -Gal 1:10000
B													
C	<p style="text-align: center;">Muestras problema</p> <p style="text-align: center;">vol. final 300 λ por pocillo</p> <p style="text-align: center;">"Placa de transferencia"</p>												
D													
E													
F													
G													
H													

I control negativo

II control positivo

IgG-Peroxidasa 1:2000

RESULTADOS

logarítmica como en fase estacionaria. Para ésta prueba se usaron dos placas: la de pegado y la de transferencia, las cuales se prepararon como se describe en la Fig. 27 (Métodos: sección 14.3).

La absorbencia de luz por la mezcla de reacción se midió a 490 nm en un mini-reader II. En la Tabla XI se muestran los resultados de la cuantificación, mediante el método de ELISA, de las proteínas híbridas unidas, al ribosoma y libres en el citosol de las levaduras grandes transformadas y crecidas hasta las fases media logarítmica y estacionaria. Al comparar los valores para la fracción ribosomal de la fase media logarítmica contra los de la fase estacionaria se observa que en esta última, excepto TYG 47 Pv, la cantidad de proteína híbrida aumentó. La proporción en la que aumentaron dependió tanto de que derivaran de YP1-alfa o de YP1-beta, así como de la longitud del polipéptido de la proteína ácida correspondiente. Así, la proteína híbrida que más aumento al pasar a la fase estacionaria fue TYG 46 (YP1-beta) con casi 26 veces. Este resultado llama la atención porque TYG 46 es la menos abundante en los ribosomas de la fase media logarítmica y la proteína híbrida que menos aumentó, con sólo el 33 % fue 47 Hp (YP1-alfa). Las demás aumentaron en proporciones intermedias, y TYG 47 Pv fue la única que disminuyó en un 10%.

TABLA XI

Quantificación de las proteínas híbridas mediante ELISA de inhibición

FASE MEDIA LOGARITMICA

pmoles de beta-galactosidasa
pmoles de ribosoma^b

LEVADURA ^a	FRACCION RIBOSOMAL			FRACCION S100 (CITOSOL)		
	1	2	PROMEDIO	1	2	PROMEDIO
TYG 44	0.1425	0.1855	0.1640	0.486	0.345	0.4155
TYG 45-1	0.0857	0.0371	0.0614	0.334	0.3714	0.3527
TYG 45-2	0.0396	0.0496	0.0446	0.1627	0.1297	0.1462
TYG 46	0.031	0.028	0.0295	0.1384	0.156	0.1472
TYG 47 Hp	0.2763	0.3231	0.2997	0.2851	0.2569	0.2710
TYG 357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

FASE ESTACIONARIA

LEVADURA ^a	FRACCION RIBOSOMAL			FRACCION S100 (CITOSOL)		
	1	2	PROMEDIO	1	2	PROMEDIO
TYG 44	1.793	1.036	1.4148	4.8998	3.589	4.2444
TYG 45-1	0.1608	0.1536	0.1572	0.4963	0.5695	0.5329
TYG 45-2	0.1598	0.1694	0.1646	1.3126	1.3824	1.3475
TYG 46	0.6404	0.8852	0.7628	1.6666	1.8460	1.7563
TYG 47 Hp	0.3854	0.4130	0.3992	1.2140	0.8095	1.0118
TYG 47 Pv	0.3600	0.3602	0.3601	0.5478	0.5814	0.5646
TYG 357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

^a TYG = W303 1B grande.

^b Estos datos se calcularon tomando en cuenta que: 1 D.O.₂₆₀ = 40 ug de rRNA; 1 mg rRNA = 1 pmoles; el P.M. de la Beta-galactosidasa = 116250. Los valores de la fracción S100 se calcularon en función de la fracción ribosomal.

1 y 2 Valores de experimentos independientes.

RESULTADOS

En la fracción S100 se observó igualmente que la concentración de todas las proteínas híbridas aumentó. La magnitud del incremento también varió en función de que derivaran de YP1-alfa ó YP1-beta y la longitud del polipéptido correspondiente a la proteína ácida. La proteína híbrida que más aumento fue nuevamente TYG 46 (YP1-beta) y la que menos aumento fue TYG 47 Pv (YP1-alfa). Las demás aumentaron en proporciones intermedias.

Es importante hacer notar que el aumento en la concentración de las proteínas híbridas en la fracción S100 no fué proporcional al aumento en los ribosomas, por lo que este último no se debió a la ley de acción de masas simplemente.

No existe razón evidente para explicar el que la proteína TYG 47 Pv se haya comportado de diferente manera. Lo que llama la atención es que tanto en la fracción ribosomal y en la fracción del citosol las que aumentaron en menor proporción son las que derivaron de YP1-alfa.

En la Tabla XII se muestran los resultados de la cuantificación mediante el método de ELISA, de las proteínas híbridas unidas a la fracción ribosomal y libres en el citosol de las levaduras petite crecidas hasta las fases media logarítmica y estacionaria. Al comparar los valores para la fracción ribosomal de la fase media logarítmica contra los de

TABLA XII

Cuantificación de las proteínas híbridas mediante ELISA de inhibición.

FASE MEDIA LOGARITMICA						
pmoles de beta-galactosidasa pmoles de ribosoma ^b						
LEVADURA ^a	FRACCION RIBOSOMAL			FRACCION S100 (CITOSOL)		
	1	2	PROMEDIO	1	2	PROMEDIO
TYP 44	0.2455	0.3004	0.2730	0.0497	0.0679	0.0588
TYP 45-1	0.1523	0.1091	0.1307	0.1791	0.1157	0.1474
TYP 45-2	0.0103	0.0089	0.0096	0.2680	0.2280	0.2480
TYP 46	2.57 ^e	9.53 ^e	6.16 ^e	0.0512	0.1402	0.0957
TYP 47 Hp	0.1758	0.1948	0.1853	0.1490	0.1036	0.1263
TYP 47 Pv	0.0536	0.0356	0.0446	0.0657	0.0467	0.0562
TYP 357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

FASE ESTACIONARIA						
LEVADURA ^a	FRACCION RIBOSOMAL			FRACCION S100 (CITOSOL)		
	1	2	PROMEDIO	1	2	PROMEDIO
TYP 44	0.0763	0.0859	0.0811	0.4008	0.2968	0.3488
TYP 45-1	0.0098	0.0055	0.0162	0.3802	0.6250	0.5026
TYP 45-2	0.1587	0.1243	0.1416	1.0960	1.6118	1.3539
TYP 46	0.0083	0.0095	0.0089	0.2114	0.1820	0.1967
TYP 47 Hp	0.0724	0.0678	0.0701	0.2896	0.2030	0.2463
TYP 47 Pv	0.2765	0.2335	0.2550	0.2477	0.1965	0.2222
TYP 357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

^a TYP = W303 JB petite.

^b Los valores se calcularon como se describió en la Tabla XI.

1 y 2 Valores de experimentos independientes.

RESULTADOS

la fase estacionaria, resulta evidente que en esta última, excepto TYP 45-2 y TYP 46, la cantidad de proteínas híbridas disminuyó. La proporción en la que disminuyeron dependió tanto de que derivaran de YP1-alfa ó de YP1-beta, así como de la longitud del polipéptido de la proteína ácida correspondiente. De tal manera, que la proteína híbrida que más disminuyó en la fase estacionaria fue TYP 45-1 con un 88 % y la que menos disminuyó fue TYP 47 Pv con 43 %. Las otras disminuyeron en proporciones intermedias.

En la fracción S100 se observó lo contrario: la cantidad de todas las proteínas híbridas aumentó. La magnitud del incremento también varió en función de que derivaran de YP1 ó YP2 y de la longitud del polipéptido correspondiente a la proteína ácida. La proteína híbrida que más aumento fue TYP 44 (YP2) y la que menos aumento fue TYP 47 Hp con 95 %. Las demás aumentaron en proporciones intermedias. Puesto que el porcentaje en el que aumentaron en el citosol fué mayor al de la disminución en la fracción ribosomal, el aumento en la concentración de las proteínas híbridas en la fracción S100 no se puede explicar solamente debido a la disociación de las que ya estaban unidas a los ribosomas. Necesariamente debieron sintetizarse " de novo " e incrementar el reservorio en el citoplasma. No hay una razón evidente para explicar el que las proteínas híbridas TYP 45-2 y TYP 46 se hayan comportado

RESULTADOS

distinto. Lo único que llama la atención es que ambos casos se trata de la construcción que tiene la menor longitud del polipéptido de la proteína ribosomal ácida correspondiente.

D I S C U S I O N

En el presente trabajo se abordaron cuatro preguntas fundamentales relacionadas con la regulación de la expresión de las fosfoproteínas ribosomales ácidas de los organismos eucarióticos, a saber : 1) ¿Cuántas moléculas de cada una de las cuatro especies que tiene la levadura *S. cerevisiae* se unen a un mol de ribosoma? ; 2) ¿La cantidad varía en la célula petite que sólo dispone de la glucólisis como fuente de ATP? ; 3) ¿Qué sucede con la poza citoplasmática de esas proteínas en las células petite?; y 4) ¿La concentración de esas proteínas en los compartimientos ribosómico y citoplásmico varía cuando las células entran a la fase estacionaria?. Pero antes de entrar en materia, se discutirán algunos aspectos metodológicos relevantes.

Para la obtención de células petite el bromuro de etidio se usó a la concentración de 50 ug/ml ya que a concentraciones más altas afecta no sólo al DNA mitocondrial, sino también al DNA nuclear con lo que se afecta drásticamente la viabilidad celular (100); además se decidió usar las células del cultivo " lavado " ya que se ha observado que si la exposición al bromuro de etidio continúa, las células entran a una fase donde más del 60% del cultivo recupera la habilidad de formar clones competentes respiratorias y es

DISCUSION

seguida por otra fase lenta hacia la inducción del fenotipo petite (99). Aunque al parecer la viabilidad celular no disminuye, se prefirió usar el cultivo " lavado " para asegurarse que las petite que se eligieran siempre estuvieran en la condición irreversible (99).

No se comprobó la eficiencia de la mutagénesis promovida por el bromuro de etidio porque con una sólo clona petite que se obtuviera sería suficiente. Lo que sí se comprobó (Fig. 18, Tabla IV) fue que la mutagénesis sólo afectara al DNA mitocondrial por lo que se verificó que se conservaran sólo las auxotrofias de la cepa parental. Por otro lado estos experimentos no permiten diferenciar entre el que la mitocondria esté ausente o presente pero anormal (96).

Un hecho importante es que en este trabajo se demostró por vez primera que las levaduras petite se pueden transformar (Fig 19, Tabla V) sin que se afecte esta condición y sin perder los marcadores nutricionales. Este hallazgo es importante debido a que la transformación, al igual que la infección viral en los eucariontes superiores, es dependiente de energía. El que las células petite sean transformables indica que, o bien los requerimientos energéticos son bajos, o bien que la transformación implica un rearrreglo macromolecular

DISCUSION

a nivel de la membrana tal, que el flujo de energía hacia ese sitio se ve favorecido.

Se obtuvieron los tiempos de duplicación de cada una de las levaduras transformadas y las curvas de crecimiento tanto de la levaduras grandes como de la levaduras petite, con el fin de determinar el momento en que alcanzaron la fase media logarítmica y la fase estacionaria. Los datos obtenidos (Fig. 21, Tabla VI) muestran que la levadura grande W303 1B (control) en medio mínimo SD URA⁺ tiene un tiempo de duplicación de 2 hrs 30 min al igual que las transformantes de la serie TYG (transformante de levadura grande en medio SD URA⁻), a excepción de TYG 47 Hp y TYG 357 que tienen un tiempo de duplicación de 2 hrs 40 min , es decir una diferencia de 10 min más, que no se consideró significativa debido a que aún con esta diferencia están dentro de los límites de variación experimental. Para la levadura petite sin transformar, en medio mínimo SD URA⁺, se obtuvo un tiempo de duplicación de 4 hrs. Esta diferencia la explica la condición petite en sí misma ya que estas células, sólo cuentan con la glucólisis como fuente de ATP, que se convierte en la limitante del crecimiento (11, 13, 46 , 61). El tiempo de duplicación de las transformantes petite de la serie TYP (transformante de levadura petite en medio SD URA⁻) fué de 4 hrs \pm 10 min, a excepción de TYP 47 Pv en donde se calculó un

DISCUSION

tiempo de 4 hrs 15 min (Fig. 21, Tabla VII); sin embargo, y al igual que con las células grandes, tampoco se consideró como diferencia significativa debido a que está dentro de los límites de tiempo promedio calculado para la fase media logarítmica. El que los tiempos de duplicación de la cepa silvestre y el de las transformantes, ya sea grande o petite sean similares, significa que la expresión de los plásmidos no modifica sustancialmente al metabolismo general de las células. Si la expresión plasmídica (replicación, transcripción y traducción) requiriera cantidades de energía relativamente elevadas, se hubiera reflejado en el tiempo de duplicación celular ya que éste es un parámetro que responde a alteraciones significativas en el estado de oxido-reducción y energético (ADP/ATP) celulares.

De cada una de las levaduras transformadas, además de la fracción ribosomal, se obtuvo la fracción S100. Como primer método para cuantificar la proteína híbrida que quedara unida a la pastilla ribosomal, y libre en la fracción S100, se utilizó el ensayo de la actividad de la beta-galactosidasa, a la vez que se determinó la cantidad de proteína total en cada muestra, para con ambas, calcular la actividad específica (Tabla IX).

Estos datos sirvieron como referencia cualitativa de la concentración relativa de las proteínas ribosomales ácidas

DISCUSION

quiméricas (unidas covalentemente a la beta-galactosidasa) que se expresaron en la serie de las transformantes. Cabe la posibilidad de que la actividad específica pudiera reflejar la concentración real de proteína híbrida en las fracciones ribosomal y S100 ya que la cantidad de proteína ribosomal por unidad de absorbencia a 260 nm es constante y en la fracción S100 la concentración de la proteína celular total excede, con mucho, a la concentración de la beta-galactosidasa; de no ser así, el tiempo de la duplicación celular se habría alterado, por las razones expuestas en el párrafo anterior. De cualquier modo, el método es indirecto y por lo tanto, se eligió el ensayo de ELISA como método de cuantificación directa de la proteína híbrida.

Para poder llevar a cabo el ensayo de ELISA fué necesario obtener anticuerpos contra la beta-galactosidasa. Con este propósito se inmunizaron dos conejos para su obtención. Ambos conejos presentaron respuesta inmune, pero el conejo etiquetado con el número dos (Figs. 23 y 24) dió una mejor respuesta. Aunque no se supo con certeza a que se debió la diferencia para que uno de ellos presentara una mejor respuesta inmune, cabe señalar, entre otros, los siguientes factores:

DISCUSION

1) El bioterio le compra los conejos a un proveedor. No se sabe si éste los mantenía con la dieta apropiada, el espacio suficiente y en condiciones de higiene.

2) En el bioterio no se diagnostican ni se erradican enfermedades infecciosas o parasitarias.

3) Se calcula la edad de los conejos sólo en función del peso al momento de adquirirlos.

4) No se les da el suficiente tiempo para acostumbrarse a su nuevo hábitat.

5) La dieta de los animales varía, debido a que la composición del alimento industrial no es idéntico de lote a lote.

Los resultados obtenidos mediante el método de ELISA, mostraron que la concentración de proteínas híbridas unidas al ribosoma no siguió un patrón definido (Tablas XI y XII) ni en las levaduras grandes ni en las petite, cuando las células pasaron de la fase media logarítmica a la fase estacionaria. Estos resultados se pueden resumir como sigue:

1) Aumento en la concentración al pasar a la fase estacionaria (tabla XI y XII). Este hecho se puede explicar si durante la fase exponencial las proteínas que se unen con mayor facilidad son las proteínas nativas y no las híbridas, o, si las proteínas híbridas que logaron unirse durante la fase exponencial tienen mayor eficiencia de unión que las

DISCUSION

nativas, de modo que al pasar a la fase estacionaria permanecen unidas mayor tiempo en el ribosoma, de ahí que se cuantifique una mayor cantidad en la fase estacionaria. Otra explicación sería que las proteínas híbridas, a diferencia del resto, sigan sintetizándose por un lapso de tiempo, a pesar de que los cultivos celulares se hayan estacionado. Esta posible explicación se basa en datos obtenidos recientemente en el laboratorio (101, 102).

2) la concentración disminuyó en los ribosomas al pasar a la fase estacionaria. Esto se explicaría si las proteínas que quedaron unidas en mayor número fueron las nativas y además de esto su eficiencia de unión sea también mayor que la de las híbridas; por esto, cuando pasaron a la fase estacionaria, siguieron unidas al ribosoma impidiendo que se unieran más proteínas híbridas durante esta fase. Otra explicación sería que existiera un mecanismo activo, propio de la fase estacionaria, que redujera la cantidad de proteína híbrida como lo sugieren algunos datos de la literatura (65).

Por otro lado, para explicar las variaciones que se obtuvieron, se debe tomar en cuenta que la longitud del polipéptido que corresponde a la proteína ácida fué diferente para cada proteína híbrida, y, probablemente, ésto afecte la eficiencia de unión a la partícula ribosomal o al número de

DISCUSION

copias de cada polipéptido que se pueden unir. Por ejemplo en el caso de TYG 46 (Tabla XI) se obtuvo un aumento de casi 26 veces al pasar a la fase estacionaria. Este resultado es inesperado debido a que es la proteína YP1-beta la que se encuentra en menor cantidad en los ribosomas (57, 83); sin embargo, es el plásmido que contiene insertada la secuencia del gen que codifica para la proteína ácida con el menor número de aminoácidos, 36 , lo que pudo haber facilitado su unión al ribosoma. Aunque TYG 46 es la proteína ácida híbrida que más aumentó, cabe hacer la aclaración que no fue ésta la que se encontró en mayor cantidad en la fracción ribosomal, sino TYG 44.

Por otro lado, los resultados de la Tabla XI muestran que en la fracción S100, la concentración de proteínas híbridas aumentó al pasar las levaduras grandes a la fase estacionaria el incremento en cada caso no fué proporcional al aumento que se observó en la fracción ribosomal. Entre otras posibilidades este resultado puede significar que la unión de las proteínas híbridas al ribosoma no es el resultado del desplazamiento simple debido a la ley de acción de masas. Estos resultados más bien son congruentes con el que la unión de las proteínas ribosomales ácidas al ribosoma depende de mecanismos específicos de fosforilación (65, 69, 90).

En las levaduras petite, el aumento del reservorio citoplasmático al pasar a la fase estacionaria (Tabla XII) no se puede explicar de la misma manera que en el caso de las levaduras grandes, ya que en ellas, la cantidad de ribosomas disminuyó en todos los casos, lo que indica que necesariamente debieron haberse sintetizado " de novo ". Esta explicación es compatible con los datos de la literatura (65) y dá lugar a una hipótesis muy interesante y factible de poner a prueba experimental, a saber, que la concentración citoplasmática de proteínas ribosomales ácidas module o regule, directa o indirectamente la eficiencia del proceso de la traducción.

C O N C L U S I O N E S

En el presente trabajo se demostró por primera vez que las levaduras petite se pueden transformar sin que se afecte esta condición y sin que se pierdan los marcadores nutricionales.

A través del método de ELISA, se mostró que la concentración de proteína híbrida unida al ribosoma de las levaduras petite y grandes varia cuando las células entran a la fase estacionaria, encontrándose que:

A) La concentración de proteínas híbridas aumentó porque:

A.1) Las proteínas que se unen con mayor facilidad son las proteínas nativas y no las híbridas.

A.2) Las proteínas híbridas que lograron unirse durante la fase exponencial tienen mayor eficiencia de unión que las nativas, de modo que al pasar a la fase estacionaria permanecen unidas mayor tiempo en el ribosoma, de ahí que se haya cuantificado una mayor cantidad en la fase estacionaria.

A.3) Las proteínas híbridas, a diferencia del resto, siguen sintetizándose por un lapso de tiempo, a pesar de que los cultivos celulares hayan llegado a la fase estacionaria.

CONCLUSIONES

B) La concentración de proteínas híbridas disminuyó en los ribosomas al pasar a la fase estacionaria porque:

B.1) Las proteínas que quedaron unidas en mayor número y con mejor eficiencia de unión son las proteínas nativas; lo que impidió que se unieran más proteínas híbridas durante esta fase.

B.2) A causa de un mecanismo activo propio de la fase estacionaria, que redujó la cantidad de proteína híbrida.

Para la fracción S100, la concentración de proteínas híbridas de las levaduras grandes al pasar a la fase estacionaria aumentó, pero al no ser proporcional al incremento observado en la fracción ribosomal indica que la unión de las proteínas ribosomales ácidas al ribosoma es dependiente de mecanismo específicos de la fosforilación.

En el caso de la fracción S100, de las levaduras petite la cantidad de proteínas híbridas también aumentó al pasar a la fase estacionaria, pero como la cantidad de ribosomas disminuyó en todos los casos esto indica que necesariamente debieron de sintetizarse de " novo ".

G L O S A R I O

Adyuvante: Cualquiera de muchos materiales extraños introducidos con un antígeno para elevar la respuesta inmune. Esto incluye bacterias muertas, productos bacterianos (endotoxinas) o emulsiones (adyuvante de Freund).

Anticuerpo: Una proteína que es producida como resultado de la inducción de un antígeno y el cual tiene la habilidad de combinarse con el antígeno que estimulo su producción.

Antígeno: Una substancia la cual puede inducir una respuesta inmune detectable cuando se introduce en un vertebrado.

Auxótrofa: Célula incapaz de sintetizar una o más moléculas nutrientes.

Bromuro de etidio: Agente que se intercala en la cadena de DNA, el cual permite la rápida detección de la molécula de doble cadena de ácidos nucleicos en geles de agarosa. El complejo ácidos nucleicos / bromuro de etidio emite fluorescencia cuando es expuesto a la luz ultravioleta.

Clona: Grupo de células, las cuales son la progenie de una sola célula.

GLOSARIO

Coefficiente de Sedimentación: Medida de la rapidez a la que una molécula sedimenta en un campo centrífugo determinado; Se expresa en unidades Svedberg (S).

Delección: Mutación en la estructura cromosómica por pérdida de nucleótidos.

Diálisis: Proceso que permite separar sustancias disueltas a través de membranas semipermeables, en función de su radio hidrato.

Electroforesis: Técnica mediante la cual las moléculas orgánicas cargadas iónicamente se pueden separar en función de su velocidad relativa de migración en un campo eléctrico.

Eucarióta: Célula cuyo material genético se confina en un núcleo rodeado por una membrana.

Factores de alargamiento: Proteínas específicas necesarias para la unión de los aminoacil tRNAs al ribosoma en la fase de alargamiento de la cadena de aminoácidos durante la síntesis proteica.

GLOSARIO

Fluorescencia: Emisión de luz de un color, mientras una sustancia es irradiada con una luz de un color diferente.

Fosforilación: Reacción química mediante la cual se une covalentemente fosfato a un compuesto.

Gel: Una de las formas en que puede presentarse un coloide. En el gel predomina la fase sólida sobre la líquida.

Liofilización: Deseccación de un material por sublimación del disolvente en condiciones de muy baja temperatura y elevado vacío.

Petite: Levadura con deficiencia respiratoria; se divide más despacio que las células grandes (competentes respiratorias) y crecen en colonias pequeñas.

pH: El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno. Es el número que cuantifica la acidez o alcalinidad de una solución acuosa. El intervalo de la escala de pH es desde cero hasta 14.

Plásmido: Replicón. Elemento genético extracromosómico que puede replicarse independientemente del cromosoma hospedero y

GLOSARIO

coexistir con él. Son los principales portadores de genes que confieren resistencia a los antibióticos.

Proteína: Polímero complejo formado de monómeros que son aminoácidos unidos por enlaces peptídicos ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Contiene carbono, hidrógeno, nitrógeno generalmente azufre, y ocasionalmente fósforo. Por debajo de un peso molecular de 6 000 se denomina polipéptido.

Punto isoeléctrico: Aquel valor de pH al cual una molécula no posee carga eléctrica neta y por lo tanto, es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico. A este pH la solubilidad de algunas proteínas es mínima .

RNasa (Ribonucleasa): Enzima capaz de hidrolizar los enlaces fosfodiéster del RNA.

RNasa A : rompe entre pares de nucleótidos
de pirimidinas (uridina y citosina)

RNasa T1 : rompe a nivel del nucleótido de guanina

RNasa T2 : rompe a nivel del nucleótido de adenina

GLOSARIO

RNA: Polímero compuesto de nucleótidos (purinas y pirimidinas) de ribosa, unidos covalentemente por enlaces del tipo fosfodiéster.

mRNA: RNA de cadena sencilla que, unido al ribosoma, funciona como templado para la síntesis de proteínas. A cada proteína le corresponde un mRNA específico.

rRNA: RNA que constituye parte de los ribosomas; representa hasta el 65% de la masa total de los ribosomas. En *E. coli* se encuentran tres clases con coeficientes de sedimentación de 23S, 16S, y 5S. En eucariotes existen cuatro tipos de rRNA: 5S, 5.8S, 18S y 28S.

tRNA: Un tipo de RNA citoplasmático del cual hay por lo menos sesenta variedades, más de uno para cada aminoácido. Este RNA se une covalentemente a su aminoácido específico y lo lleva al ribosoma durante la síntesis de proteínas.

Sustrato: Molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica.

Transcripción: Síntesis de moléculas de RNA usando como templado el DNA.

R E A C T I V O S

Las sustancias empleadas y las compañías proveedoras se listan a continuación.

1.- Baker

Cloruro férrico

Cloruro de magnesio

Cloruro de sodio

Molibdato de sodio

Sulfato de cobre

Sulfato ferroso heptahidratado

Sulfato manganoso

Sulfato de zinc

Yoduro de potasio

2.- CALBIOCHEM

Acido fólico

Biotina

Clorhidrato de piridoxina

Clorhidrato de tiamina

Inositol

Niacina

Pantotenato de calcio

Rivoflavina

3.- COLUMBIA LAB.

Topazone

4.- LABORATORIOS DIFCO

Agar

Bacto peptona

Bacto triptona

Extracto de levadura

5.- LABORATORY REAGENTS

Bromuro de etidio

Poliétilén glycol

6.- MERCK

Acido acético glacial

Acido bórico

Acido succínico

Acetato de potasio

Acido cítrico anhidro

Cloruro de calcio

MERCK (Continuación)

Beta-mercaptoetanol
Bicarbonato de sodio
Carbonato de sodio anhidro
Cloruro de potasio
Cloroformo
Di-potasio hidrógeno fosfato-
tres hidrato
Di-hidrógeno fosfato de potasio
EDIA (Acido etilendiaminotetr acético)
Etanol
Fenol
Glicerol
D-glucosa
Hidróxido de sodio
Isopropanol
Peróxido de hidrógeno
Sacarosa
Sodio hidrógeno fosfato hidrato
Sulfato de amonio
Sulfato de cobre
Sulfato de magnesio
Sulfato de potasio monobásico

7.-SIGMA CHEMICAL

Acetato de amonio
Adenina clorhidrato
Agarosa tipo II
Ampicilina
Adyuvante completo de
Freund
Albúmina de bovino
Acetato de litio
Azul de bromofenol
Azul de Coomassie
Dimetilformamida
Gilensianol
Beta-galactosidasa
L-histidina
L-leucina
L-triptofano
Lizosima
ONPG
OPD
RNasa A
Reactivo de Folin
SDS (lauril sulfato de
sodio

SIGMA (Continuación)

Trizma-HCl

Tween 20

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-
beta-D-galactopiranosido)

Uracilo

B I B L I O G R A F I A

- 1 .-Alexopoulos, C.; Mims, C. 1985 . Introducción a la Micología. Omega. Barcelona. : 272-280.
- 2 .-Amons, R.; Van Agthoven, A. Pluym, W.; Möller, W.; Higo, K.; Itoh, T. and Osawa, S. 1977. A comparison of the amino-terminal sequence of the L7/L12 type proteins of A. salina and S. cerevisiae. FEBS Lett. 81 : 308-310
- 3 .-Amons, R.; Van Agthoven, A.; Pluym, W. and Möller, W. A comparison of the Alanine-rich sequence of the L7/L12 ribosomal proteins from rat-liver, A. salina and E. coli, with the amino-terminal region of the alkali lighth chain A1 from rabbit myosin. FEBS Lett. 86 : 282-284.
- 4 .-Ballesta, J. P. G., Vazquez, D. 1972. Reconstitution of the 50S ribosome subunit. Role of proteins L7 and L12 in the GTPasa activities. Site of action of thiostrepton. FEBS Lett. 28 : 337-342.
- 5 .-Ballesta, J. P. G.; Montejo, V.; Vazquez, D. 1972. Reconstitution of the 50S ribosome subunit. Localization of G-Dependent GTPase activity. FEBS Lett 19. : 78-82.
- 6 .-Beltrame, M. and Bianchi. 1987 . Sequence of the cDNA for one acidic ribosomal protein of Schizosaccharomyces pombe . Nucleic Acids Res. 15 : 6089.
- 7 .-Beltrame, M.; Bianchi, M. Z. 1990. A gene family for acidic ribosomal proteins in Schizosaccharomyces

BIBLIOGRAFIA

- pombe*. Two essential and two nonessential genes .
Mol. Cell Biol. 10 : 2341-2348.
- 8 .-Blenis, J. and Erikson, R. L. 1984. Phosphorylation of the ribosomal protein S6 is elevated in cells transformed by a variety of tumor viruses . J. Virol. 50 : 966-969.
- 9 .-Brassford, P.; Bechwith, A. 1978. Genetic fusion of the lac operon: a new approach to the study of biological processes : 245-261 in Miller J.H. and Reznikoff, W.S. The operon . Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y.
- 10.- Chan, S.; Ephrus, B. and Hottinguer, H. 1950. Heredity Lond. 4 : 335-331.
- 11.-Dodin, G.; Dietrich, A. 1991 . Mitochondrial uptake of bridged Bis-methyl pyridinium aldoximes and induction of phenotype petite in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179 : 992-999.
- 12.-Duncan, R. and Hershey, J . 1985. Regulation of factores during translation repression caused by serum depletion . J. Biol. Chem. 260 : 5493-5497.
- 13.-Ferguson, L.; Sunderberg, R. 1991. Petite mutagenesis in *S. cerevisiae* by a series of bis-cationic trypanocidal drugs. Anti Agents and Chemoterapy 35 : 2318-2321.
- 14.-Gressner, A. D. and Wool, I. G. 1974. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. J. Biol. Chem. 249 : 6917-6925.
- 15.-Hamel, E.; Koka, M; Nakamoto T. 1972 . Requirement

BIBLIOGRAFIA

- of an Escherichia coli 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factor and guanosine triphosphate . J. Biol. Chem. 24 : 805-814.
- 16.-Horack, I. and Schiffmann, D. 1977. Acidic phosphoproteins of 60S ribosomal subunit from HeLa Cells. Eur. J. Biochem. 79 : 375-380.
- 17.- Itoh , Hisao; Yasuku Fukuda; Kousaku Murata and Akira Kimura. 1983 . Transformation of intact yeasts cells treated with alkali cations. J. Bac. 153 : 163.
- 18.-Isono, S. and Isono, K. 1981 . Ribosomal protein modification in E. coli III. Studies of mutants lacking and acetylase specific for protein L12 . Mol. Gen. Genet. 183 : 473-477.
- 19.-Johnson, S. P. and Warner J. R. 1987 . Phosphorylation of the S. cerevisiae equivalent of ribosomal protein S6 has no detectable effect on growth . Mol. Cell Biol. 7 : 1338-1345.
- 20.-Kabat, D. 1970. Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes characterization and regulatory aspects. Biochemistry. 9 : 4160-4174 .
- 21.-Kisha, K.; Möller, W. and Stoffler, G. 1971 . Reconstitution of GTPase activity of 50S ribosomal protein from E. coli . Nature. 233 : 62-63 .
- 22.-Kruiswijk T. Planta, R. J. 1975 . Further analysis of the protein composition of yeast ribosomes . FEBS

BIBLIOGRAFIA

Lett. 58 : 102-105.

- 23.-Kruiswijk T.; Planta, R.; Mager, W. 1978 .
Quantitative analysis of the protein composition of
yeast ribosomes . Eur. J. Biochem. 83 : 245-252.
- 24.-Lake, J. A. 1985 . Evolving ribosome structure:
domain in archeobacteria, eocytes and eukaryotes Ann.
Rev. Biochem. 54 : 507-536.
- 25.-Lin, A.; Wittmann-Leibold, B.; McNally, J. Wool, I.G.
1982 . The primary structure of acidic phospho-
protein P2 from rat liver 60S ribosomal subunits .
J. Biol. Chem. 257 : 9189-9197.
- 26.-Loeb, J. E. and Blat, C. 1970. Phosphorylation of some
rat liver ribosomal proteins and its activation by
cyclic AMP. FEBS Lett. 10 : 105-108.
- 27.-Lowry, O. H.; Nira, J.; Rosebrough, A. Lewis, A.; Rose,
A.; Randall, J. 1951. Protein measurement with the
folin phenol reagent . J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 28.-Maasen, J. and Möller, W. 1981 . Photochemical
cross-linking of elongation factors G to 70S ribosomes
from *E.coli* by 4-(6-formyl-3-azidophenoxy)butyrimidate
Eur. J. Biochem. 115 : 279-285.
- 29.-Maasen, J. ; Schop, E.N.; Brands, J.H.G.; Van Hemert,
J. F.; Lenstra J. A. and Möller W. 1985 . Molecular
cloning and analysis of cDNA sequence for two ribosomal
proteins from *Artemia*: The coordinate expression of
genes for ribosomal and elongation factor 1 during

BIBLIOGRAFIA

- embryogenesis of *Artemia* . Eur. J. Biochem. 149: 609-616.
- 30.-MacConell, W. P. and Kaplan N. D. 1980 . The role of ethanol extractable proteins from the 80S rat liver ribosome . Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 46-52.
- 31.-MacConell and Nathan D. Kaplan. 1982 . The activity of the acidic phosphoproteins from the 80S rat liver ribosome . J. Biol. Chem. 257 : 5359-5366.
- 32.-Maggio, E. T. 1980 . Enzyme-Immunoassay , CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp:23-25, 31-42, 167-211.
- 33.-Maniatis, T.; Fritsch, E. T.; Sambrook, J. 1989 . Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor : 1.25 - 1.28.
- 34.-Michel, S. ; Traut, R and Lee . 1983 . Yeast ribosomal proteins: electrophoretic analysis in four two dimensional gel systems; correlation of nomenclatures. Mol. Gen. Genet. 191: 251-256.
- 35.-Miller, J . H . 1972 . Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory C. S. H. N. Y.
- 36.-Mitsui, K.; Motikuzi, M.; Endo, Y. Yokota, S. and Tsurugi, K. 1987 . Characterization of a novel acidic protein of 38 Kda, A0 in yeast ribosomes which immunologically cross-reacts with the 13 KDa acidic ribosomal proteins A1/A2. J. Biochem. 102 : 1565-1570.
- 37.-Mitsui, K.; Takuzo Nakagawa and Kunio Tsurugi. 1988. On the size and the role of a cytosolic pool of

BIBLIOGRAFIA

- acidic ribosomal proteins in Yeast *S. cerevisiae*.
J. Biochem, 104 : 908-911.
- 38.-Mitsui, K. and Tsurugi, K. 1988 . cDNA and deduced amino acid sequence of acidic ribosomal protein A1 from *S. cerevisiae* . Nuc. Acids Res. 16 : 3574.
- 39.-Mitsui, K. and Tsurugi K. 1988 . cDNA and deduced amino acid sequence of acidic protein A2 from *S. cerevisiae*. Nuc. Acid Res. 16 : 3575.
- 40.-Mitsui, K. and Tsurugi K. 1989 . Identification of A1 protein as the fourth member of 13 KDA-type acidic ribosomal protein family in Yeast *S. cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 : 1001-1006.
- 41.-Möller, W.; Groene, A.; Terhorst, C. and Amons, R. 1972. 50S ribosomal proteins. Purification and partial characterization of two acidic proteins, A1 and A2 isolated from 50S ribosomes of *E. coli*. Eur. J. Biochem. 25 : 5-12.
- 42.-Möller, W.; Slobin, L.I.; Amons and Richeter D. 1975 . Isolation and characterization of two acidic proteins of 60S ribosome from *Artemia salina* cysts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 4744-4748.
- 43.-Morley, S. J. and Traugh, J. A. 1990 . Differential stimulation of phosphorylation of initiation factors eIF-4F, eIF-4B, eIF-3 and ribosomal protein S6 by insulin and phorbol esters. J. Biol. Chem. 265 : 10611-10616.

BIBLIOGRAFIA

- 44.-Mortiner, R. and Hawthorn, D. 1960. Yeast genetics. Ann. Rev. Microbiol. 20 : 151-168.
- 45.-Moustacchi, E, and Marcovich, H. 1963. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 265 : 5640-5648.
- 46.-Nagai S. ; Yanagishima, N. and Nagai, H. 1961. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in Yeast and other microorganisms". Bacteriol. Rev. 25 : 404-426.
- 47.-Nagley, P. J.; Mattick, R. 1975 . Biogenesis of mitochondria, 43. A. comparative study of petite induction and inhibition of mitochondria DNA replication in yeast by ethidium bromide and berenil. Mol. Gen. Genet. 141 : 291-304.
- 48.-Newton, C.; Yee, J.; Shimmin, L. ; Dennis, P. 1990 . A family of genes encode the multiple forms of the S. cerevisiae ribosomal proteins equivalent to the E. coli: L12 protein and a single form of the L10 - equivalent protein, J. Bacteriol. 172 : 579-598.
- 49.-Ochoa, S. and Haro. 1979. Regulation of protein synthesis in eukaryotes. Annu. Rev. Biochem. 48 : 549 - 580.
- 50.-Otaka, E.; Osawa, S. 1981. Yeast ribosomal proteins V. correlation of several nomenclatures and proposal of a standard nomenclature. Mol. Gen. Genet. 181: 176-182.
- 51.-Pain, M. V. 1986 . Initiation of protein synthesis in mammalian cells . Biochem. J. 235 : 625-637.

BIBLIOGRAFIA

- 52.- Planta, J. and Raue, H. A. 1991. Ribosome biogenesis in yeast in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 41. Academic Press, Inc : 89-129.
- 53.-Qian, S.; Zhany, J. Y.; Kay, M. A. and Jacob-Lorena M. 1987 . Structural analysis of *Drosophila* rpA1 gene a member of eukaryotic " A " type ribosomal protein family. *Nucleic. Acids Res.* 15 : 987-1003
- 54.-Ramogopal, S. and Subramanian, A. P. 1974 . Alteration in a cetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 2136-2141.
- 55.-Remacha, M. 1988 . Los genes de las proteínas A. de *S. cerevisiae* caraterización y estudios funcionales. Tesis doctoral. Centro de Biología Molecular. Universidad Autonoma de Madrid. España.
- 56.-Remacha, M.; Saenz-Robles, M. T.; Vilella, M. D. and Ballesta, J. P. G. 1988 . Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunits from *S. cerevisiae*. *J. Biol Chem.* 263 : 9094-9101.
- 57.-Remacha, M.; Santos, C.; Ballesta, J. P. G. 1990 . Disruption of single copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *S. cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol* 10 , (5) : 2182-2190.
- 58.-Remacha, M.; Santos, C.; Bermejo, B.; Tatjana, N.; Ballesta, J. 1992 . Stable binding of eukariotic

BIBLIOGRAFIA

- acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for " in vivo " protein synthesis. J. Biol Chem . 267 : 12061-12067.
- 59.-Reyes, R.; Vazquez, D.; Ballesta, J. P. G. 1977. Peptidyl transferasa center of rat-liver ribosomes cores. Eur. J. Biochem. 73 : 25-31.
- 60.-Rich, B. and Steitz, J. A. 1987 . Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 y P2. analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. Mol. Cell. Biol. 7 : 4065-4074.
- 61.-Rose and Harrison 1989 . Biology of Yeast. Vol I. Academic Press N.Y. pp 20-25, 120-140.
- 62.-Rubstosov, P. 1980 . The structure of yeast ribosomal RNA gene I. The complete nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from S. cerevisiae. Nucleic Acid Res. 8 : 5779-5784.
- 63.-Ruby, S. W.; Toskok, J. W. 1983 . Meth. Enzymol. 101 : 253 - 269.
- 64.-Ryazonov, A. G.; Shestokova, E. A. and Natapov P. 1988 . Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects the rate of translation. Nature, London. 334 : 170-173.
- 65.-Saenz-Robles M. T.; Remacha, M.; Vilella, M. D.; Zinker, S.; Ballesta, J. P. G. 1990. The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity . Bichem.Biophys. Acta 1050 : 51-55.

BIBLIOGRAFIA

- 66.-Sanchez-Madrid, F. y Ballesta, J. P. 1979 . An acidic protein associated to ribosomes of *S. cerevisiae* changes during cell cycle . Biochem. Biophys. Res. Comm. 91 (2): 643-650.
- 67.-Sanches-Madrid, F.; Conde, F.; Vazques, D.; Ballesta, J. P. G. 1979 . Acidic proteins from *S. cerevisiae* ribosomes . Biochem. Biophys. Res. Commun. 87 :281-291
- 68.-Sanchez-Madrid, F.; Reyes,R.; Conde, P.; Ballesta, J.P 1979 . Acidic ribosomal proteins from eukaryotic cell. Effect on ribosomal functions. Eur. J. Biochem. 98 : 409-416.
- 69.-Sanchez-Madrid, F.; Vidales, J. ; Ballesta J P. 1981 . Effect of phosphorylation on the affinity of acidic proteins from *S. cereviciae* for the ribosome. Eur. J. Biochem. 114 : 609-613.
- 70.-Sanchez-Madrid F.; Vidales, J. F. ; Ballesta J. P. G. 1981. Funcional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukariotic cells. Biochemistry. 20 : 3263-3266.
- 71.-Slonimski, P.; Perrodin, G.; Croft, J. H. 1968 . Ethidium bromide induce mutation of yeast mitochondria complete transformation of cells into respiratory deficient Non-cromosomal " petite ". Biochem. Biophys. Res.Commun. 30 : 232-239.
- 72.-Stöffler, G.; Wool, I. G.; Lin, A. and Rack, H. K. 1974 . The identification of the eukaryotic

BIBLIOGRAFIA

- ribosomal proteins homologous with *E. coli* proteins L7 and L12 . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71 : 4723-4726.
- 73.-Subramanian, A.R. 1975 . Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity of the large subunit of *E. coli* ribosome . J. Mol. Biol. 95 : 1-8.
- 74.-Thomas, G.; Siegmann, M. and Gordon, J. 1979. Multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 during transition of sequent 3T3 cells into early G1 and cellular compartmentalization of the phosphate donor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 3952-3956.
- 75.- Tsurugi, K.; Collatz, K.; Todukoro, N.; Ulbrich, H.; Lighfoot, N. and Wool I. G. 1978 . Isolation of eukaryotic ribosomal proteins; purification and characterization of 60S ribosomal subunits protein La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20 y L38 . J. Biol. Chem. 253 : 946-955.
- 76.-Tsurugi, K. y Ogata, K. 1985 . Evidence of the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. J. Biochem. 98 : 1427-1431.
- 77.- Tsurugi K. and Mitsui K. 1989 . Structure of 13 kDa-type acidic ribosomal proteins from yeast *S. cerevisiae* and the function of the conserved carboxyl-terminal sequence . Biochem. Arch. 5 : 211-221.
- 78.-Tatjana Naranda and Ballesta J. P. G. 1991 .

BIBLIOGRAFIA

- Phosphorylation controls binding of acidic proteins to the ribosome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 10563-10567.
- 79.- Van Agthoven; Maassen J. A. ; Möller, W. 1977 . Structure and phosphorylation of an acidic protein from 60S ribosomes and its involvement in elongation factor-2 dependent GTP hidrolisis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77 : 989-998.
- 80.-Van Agthoven, A.; Kriek, J.; Amons, R.; Möller, W. 1978. Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60S ribosomes from Artemia salina and rat liver . Eur. J. Biochem. 91 : 553-565.
- 81.-Vidales, J. F.; Sanchez-Madrid, F.; Ballesta, J. P. G. 1981. The acidic proteins of eukaryotic ribosomes. A comparative study. Biochim. Biophys. Acta. 656 : 28-35.
- 82.-Vidales, J. F.; Sanchez-Madrid, F.; Ballesta, J. P. G. 1981. Characterization of two acidic proteins of S. cerevisiae. Biochim. Biophys. Res. Commun. 98 : 717-728
- 83.-Vidales, J. F.; Saenz Robles, M. T.; Ballesta, J. P. 1984 . Acidic proteins of the large ribosomal subunit in S. cerevisiae. Effect of phosphorylation. Biochemistry. 23 : 390-396.
- 84.-Vilella, Amils, M. D. 1988 . Estructura y función de las proteínas ácidas y L 15 del ribosoma de

BIBLIOGRAFIA

- S. cerevisiae, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Tesis doctoral. Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. pp: 23-30.
- 85.-Vilella, M. D.; Remacha, M.; Ortiz, B.; Mendez, E.; Ballesta, J. P. G. 1991. Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies (proteins L44/L45 and L44' have diferents funcional roles) . Eur J. Biochem. 196 : 407-414.
- 86.-Warner, J. R. 1982 . The yeast ribosome: structure, function and syntesis in : The molecular biology of the yeast Saccharomyces p. 526-560. Cold Spring Harbor.
- 87.-Wilkie, D. 1972 . In Mitochondria: Biomembranes. G. S. Vander, Bergh, : 58-89. Methods in Enzymology Vol XXXI.
- 88.-Wingboldus, J. D. 1987 . DNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* rp21C, another "A"-type ribosomal protein . Nucleic Acids Res. 15 : 10064.
- 89.-Wool, I. G. 1979. The structure and function of eukaryotic ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 48 : 719-754.
- 90.-Zinker, S. and Warner J. R. 1976 . The ribosomal proteins of S. cerevisiae J. Biol. Chem. 251 : 1799 - 1807.
- 91.-Zinker, S. 1980 . P5/P5' The acidic ribosomal phophoproteins from S. cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta. 606 : 76-82

BIBLIOGRAFIA

- 92.-Zinker, S.; Corona, M.; Depardon, F. 1986. Estructura y Biosíntesis de los ribosomas. En el Boletín de Educación Bioquímica. V (4): 100-112.
- 93.-Dunbar, B. S. 1988. Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press. N.Y. : 303-316.
- 94.-Escobar, E. 1990. Estudio de las fosfoproteínas ribosomales ácidas de la levadura S. cerevisiae. Tesis de licenciatura. ENEP Iztacala.
- 95.-Lake, J. A. 1980. Ribosome structure and functional sites. In Ribosome, structure, function and genetics. University Park press. Baltimore : 207-237.
- 96.-Stevens, B. J.; Moustacchi, E. 1975. Ultraestructural characterization of mitochondria from a yeast mutant sensitive to petite induction (uvs 72). In Bioenergetics of mitochondria. Walter de Gruyter. Berlin : 137-151.
- 97.-Myers, M.; Tzagoloff, A.; Kinney, M.; Lusty, C. 1986. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lac Z fusion. Elsevier Science Publishers B.V. Gene 1716 : 299-310.
- 98.-Rose, M.; Malcolm, J.; Bostein, D. 1981. Yeast genes fused to beta-galactosidase in Escherichia coli can be expressed normally in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (4): 2460-2464.
- 99.-Hall, R.; Trembath, M.; Linnane, W. A. 1976. Factores

BIBLIOGRAFIA

affecting petite induction and the recovery of respiratory competence in yeast cell exposed to ethidium bromide. *Molec. Gen. Genet.* 144 : 253-262.

100.-Cryer, R.; Goldthwaite, C.; Zinker, S.; Lam, B.; Storm, E.; Hirschberg, R. Blamire, J.; Finkelstein, B. Marmur, J. 1973. Yeast nuclear and mitochondrial DNA. Cold Spring Harbor. XXXVIII : 17-29.

101.-Martínez Sosa, Rodolfo. Tesis de licenciatura en redacción.

102.-Payo Gijón, José Marcelo. 1993. Análisis de la expresión de los genes que codifican las proteínas ácidas ribosómicas de *S. cerevisiae* mediante fusiones con el gen de Lac Z. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.