



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DE IZTACALA

400282



61060

REGULACION DE LA TRADUCCION EN CELULAS
EUCARIOTAS:

SINTESIS DE PROTEINAS EN MUTANTES DE
Saccharomyces cerevisiae CARENTES DE PROTEINAS
RIBOSOMALES ACIDAS

B01228/96
Ej. 3

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :

A L I C I A O C H O A S A N C H E Z

DIRECTOR DE TESIS:
DR. SAMUEL ZINKER RUZAL
CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.



MEXICO 1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES

Alberta Alicia Sánchez Gómez:

Quien es el mejor ejemplo de esfuerzo y superación
que me alienta a seguir siempre adelante.

Anastasio Ochoa Rivas:

Por su amor y dedicación para lograr mi formación
como profesionista y más.

Aunque este trabajo representa sacrificios y esfuerzos,
nunca podrá compararse con todo aquello que han hecho
para mí a lo largo de toda mi vida.

GRACIAS

A MIS ABUELOS

Como un homenaje a su memoria.

A MI TIA ANGELES

Por su apoyo, con mi cariño y agradecimiento.

A MIS HERMANAS

Marisol, Claudia, Dunia y Lourdes:

Con quienes comparto este logro esperando compartir
los suyos. Gracias por su cariño, comprensión y por
toda la felicidad que me han brindado.

A LA FAMILIA HERNANDEZ BARENAS

Sr. Pedro, Sra. María, Amelia, Guadalupe, Graciela y Lilia

Porque gracias a ustedes estoy aquí.

AL DR. SAMUEL ZINKER RUZAL

Mi más sincero agradecimiento por su tiempo, su apoyo y por su infinita paciencia en la realización de este trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo que de una u otra forma colaboraron con la realización de esta tesis.

De una manera muy especial quiero agradecer el apoyo incondicional y la enorme confianza de dos personas muy importantes en mi vida, que fueron una base muy sólida para mantenerme y seguir adelante, con infinito cariño a *Tí Amor* y a mi inigualable amiga *Ivonne*.

INDICE

INDICE	i
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCION	1
Organización estructural del ribosoma	1
Función ribosomal	2
Proteínas ribosomales	4
Proteínas ribosomales ácidas	5
Proteínas ribosomales ácidas de <u>E. coli</u>	7
Proteínas ribosomales ácidas eucarióticas	8
Proteínas ribosomales ácidas de <u>S. cerevisiae</u>	12
Inactivación de los genes de las proteínas ribosomales ácidas de <u>S. cerevisiae</u> mediante disrupción génica	15
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	20
1. MATERIAL BIOLÓGICO	20
1.1 Cepas de <u>S. cerevisiae</u>	20
2. MEDIOS DE CULTIVO	21
2.1 Medio YPD	21
2.2 Medio YPD-agar	21
2.3 Medio mínimo SD	21
2.4 Medio YNB	21
2.5 Medio SD-agar	23

INDICE

3. METODOS	
3.1 Crecimiento en medio YPD-agar con diferentes concentraciones de NaF	23
3.2 Curvas de crecimiento en medio YPD con diferentes concentraciones de NaF	24
3.3 Crecimiento en medio YPD-agar con diferentes concentraciones de cicloheximida	25
3.4 Obtención de patrones polisomales	26
3.5 Extracción de proteína total	28
3.6 Preparación de la proteína para electroforesis	29
3.7 Técnica para electroforesis	29
4. RESULTADOS	32
4.1 Tolerancia a NaF	32
4.1.1 Curvas de crecimiento	34
4.2 Tolerancia a cicloheximida	34
4.3 Patrones polisomales	35
4.4 Patrones proteicos	37
5. DISCUSION	39
6. CONCLUSIONES	48
7. BIBLIOGRAFIA	50

FIGURAS

FIGURA 1. Esquema de las subunidades ribosomales de procariontas y eucariotas	1b
FIGURA 2. Esquema del mecanismo de síntesis de proteínas en ribosomas eucarióticos	3a
FIGURA 3. Secuencia de aminoácidos de las proteínas ácidas de <u>S. cerevisiae</u>	12a
FIGURA 4. Sitio de acción de inhibidores del proceso de traducción en células eucariotas	18a
FIGURA 5. Crecimiento de las cepas de <u>S. cerevisiae</u> en medio YPD-agar con diferentes concentraciones de NaF	32a
FIGURA 6a. Curvas de crecimiento de las cepas W303-1B, D4 y D5 en medio YPD con diferentes concentraciones de NaF	34a
FIGURA 6b. Curvas de crecimiento de las cepas W303-1B, D6 y D7 en medio YPD con diferentes concentraciones de NaF	34b
FIGURA 7. Crecimiento de las cepas de <u>S. cerevisiae</u> en medio YPD-agar con diferentes concentraciones de cicloheximida	35a
FIGURA 8. Patrones polisomales obtenidos de las cepas con disrupción simple	36a
FIGURA 9. Patrones polisomales obtenidos de las cepas con disrupciones dobles	36b
FIGURA 10. Patrones polisomales obtenidos de las cepas con disrupciones triples	36c
FIGURA 11. Patrones proteicos de las cepas W303-1B y con disrupciones simples crecidas en presencia de 50 y 75 mM de NaF	37a

T A B L A S

TABLA I.	Componentes ribosomales en varios tipos de organismos	1a
TABLA I.	Ribosomas de <u>E. coli</u> : funciones y componentes implicados	2a
TABLA III.	Ribosomas eucarióticos: dominios y componentes implicados	2b
TABLA IV.	Crecimiento celular de las cepas de <u>S. cerevisiae</u> crecidas en diferentes concentraciones de NaF	33a
TABLA V.	Tiempos de duplicación de las cepas W303-1B y con disrupción simple crecidas en diferentes concentraciones de NaF	34c
TABLA VI.	Valores porcentuales correspondientes a cada una de las fracciones de los patrones polisomales	36d
TABLA VII.	Cambios en los patrones de proteína celular total extraída de las cepas W303-1B y con disrupción simple crecidas a 50 y 75 mM de NaF	38a

A B R E V I A T U R A S

A	Amstrong
cm	Centímetros
°C	Grados centígrados
Da	Daltones
DNA	Acido desoxirribonucleico
D.O.	Densidades ópticas
eEF	Factores de elongación eucariotas
gr	Gramos
hrs	Horas
kDa	Kilo daltones
M	Molaridad
min	Minutos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
N	Normal
nm	Nanómetros
P	Peso
pI	Punto isoeléctrico
RNA	Acido ribonucleico
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
S	Unidades Svedberg
seg	Segundos
SDS	Lauril sulfato de sodio
TEMED	NNNN-tetrametiletildiamina
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
ug	Microgramos
ul	Microlitros
V	Voltios
vol	Volumen
YPD	Medio rico para crecer levaduras

R E S U M E N

En la subunidad mayor del ribosoma de la levadura *S. cerevisiae* se detectan cuatro especies proteicas con un marcado caracter ácido, con puntos isoeléctricos (pI) cercanos a 3.0, las cuales actúan en el proceso de la traducción. Estas proteínas ácidas son designadas YP1-alfa, YP1-beta, YP2-alfa y YP2-beta. Mediante técnicas de disrupción génica se han obtenido cepas de *S. cerevisiae* que carecen de uno o más genes que codifican para las proteínas ribosomales ácidas.

La información con que se cuenta actualmente sobre la fisiología de estas mutantes es escasa por lo que en el presente trabajo estas cepas fueron expuestas a inhibidores de las fases de iniciación y elongación del proceso de la traducción (NaF y cicloheximida respectivamente) para tratar de establecer una relación entre la carencia de una o más proteínas ribosomales ácidas y la respuesta fenotípica de las cepas a dichos inhibidores.

Las cepas fueron crecidas en medio sólido en presencia de diferentes concentraciones de NaF (25 mM a 100 mM) y se observó que la ausencia de la proteína YP2-beta le confiere a las cepas un fenotipo de sensibilidad y que esta ausencia ejerce un efecto epistático sobre otras disrupciones en el caso de las cepas que carecen de dos o tres proteínas. Este mismo resultado se observó al crecer a las cepas con disrupciones simples en medio líquido siendo la cepa D5 la más sensible al inhibidor.

El efecto de la cicloheximida sobre las cepas con disrupciones es muy drástico y sólo las cepas D4 y D7 muestran un crecimiento significativo hasta concentraciones de 30 ug/ml. De acuerdo a ésto la ausencia de las proteínas YP2-alfa y YP1-alfa le confieren a estas cepas un fenotipo de resistencia a este antibiótico en concentraciones de 10 a 30 ug/ml.

RESUMEN

Los patrones polisomales obtenidos de las cepas con disrupciones simples, dobles y triples presentan una disminución en la cantidad de ribosomas unidos al mRNA en una forma directa a la ausencia de una o más proteínas ribosomales ácidas. La presencia de "halferos" en el patrón obtenido de la cepa D5 indica un defecto en el ensamblaje de la subunidad 60S a nivel de iniciación, este hecho aunado a la gran sensibilidad de esta cepa al NaF sugiere que la proteína YP2-beta participa en la fase de iniciación del proceso de traducción.

Los patrones proteicos de las cepas W303-1B (control), D4, D5, D6 y D7 crecidas en presencia de 50 y 75 mM NaF muestran que las alteraciones sufridas son diferentes para cada una de las cepas, lo que puede estar relacionado con la diferencia en la sobrevivencia celular entre cada una de las cepas.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las proteínas ribosomales ácidas de *S. cerevisiae* además de actuar en el proceso de la traducción, también pueden ser moduladoras de la actividad del ribosoma o de la traducción misma.

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

ORGANIZACION ESTRUCTURAL DEL RIBOSOMA

En la naturaleza existen diferentes clases de ribosomas que se distinguen entre sí por su tamaño y por el número de moléculas de RNA y de proteínas que contienen **Tabla I**. El ribosoma de cualquier organismo está compuesto por dos subunidades que difieren entre sí en tamaño, forma y función durante la síntesis de proteínas (Bielka, 1982, Hardesty, 1985; Vilella, 1988).

Las diferencias en tamaño se reflejan en el coeficiente de sedimentación que varía en función del número y la masa relativa de las proteínas y del RNA ribosomal (rRNA) que componen a las subunidades ribosomales. Los ribosomas eucariotas presentan un coeficiente de sedimentación 80S donde la subunidad mayor es igual a 60S y la subunidad menor a 40S. Los ribosomas de las células procariotas son más pequeños con un coeficiente de sedimentación 70S y las subunidades mayor y menor de 50S y 30S respectivamente (Palma, 1994; Rustosov, 1980).

Mediante estudios filogenéticos se ha llegado a la conclusión de la existencia de una notable conservación en la estructura secundaria del rRNA en eubacterias, arqueobacterias y eucariotas (Brimacombe, 1981), y en características morfológicas del ribosoma (Frank, 1990; Oakes, 1986) **Figura 1**.

En la subunidad mayor son rasgos conservados: la cresta "ridge", la protuberancia central y el tallo "stalk". En general no es tan patente la conservación en número y secuencia de proteínas ribosomales, lo que puede explicarse por su coevolución en lo que respecta a contactos proteína-proteína (Payo, 1993).

TABLA I

Origen	RNAs constituyentes		Proteínas constituyentes	
	Subunidad mayor	Subunidad menor	Subunidad mayor	Subunidad menor
Eubacterias	5S, 23S	16S	33	20-21
Cloroplastos	5S, 4.5S, 23S	16S	33	20
Mitocondria de plantas	5S, 26S	18S	--	--
Mitocondria de levadura	21-24S	15-17S	34	34
Mitocondria de mamífero	16S	12S	52	33
Arqueobacterias	5S, 23S	16S	33-66	20-25
Levadura	5S, 5.8S, 26S	18S	44	31
Hígado de rata	5S, 5.8S, 28S	18S	50	34

Componentes ribosomales en varios tipos de organismos (Liljas, 1991).

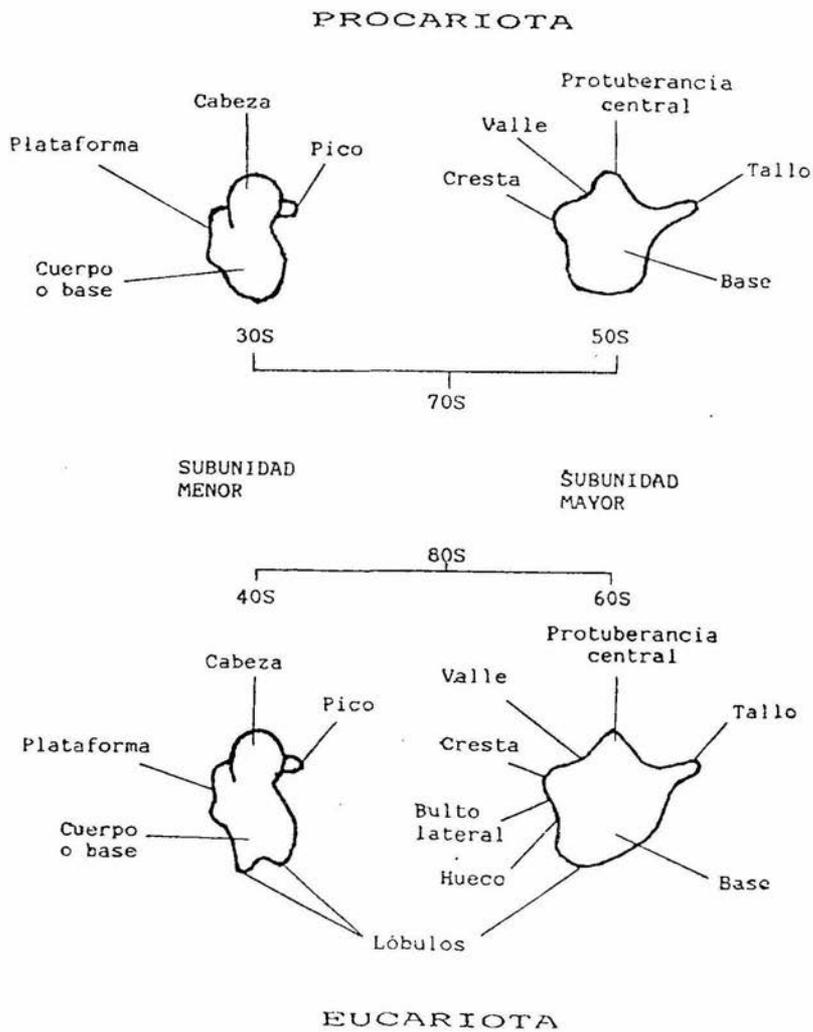


Figura 1. Esquema de las subunidades ribosomales de procariotas y eucariotas según se aprecian en microscopía electrónica (Oakes et al., 1986).

INTRODUCCION

Los cambios estructurales que se han ido produciendo en la evolución guardan, probablemente, relación con el distinto entorno en que se ha ubicado la síntesis de proteínas dentro de la célula, y la interacción con distintas estructuras subcelulares. Los ribosomas bacterianos están unidos a RNA mensajero (mRNA), a su vez conectados todavía con el DNA. En el citoplasma eucariótico, por el contrario, los ribosomas se asocian comunmente con el citoesqueleto y con membranas del retículo endoplásmico. El hecho es que los ribosomas eucarióticos presentan una morfología más compleja al estar formados por mayor número de componentes, lo que ha permitido en estos organismos desarrollar nuevos mecanismos de control de síntesis de proteínas no presentes en eubacterias (Payo, 1993).

El marcaje de afinidad por análogos de moléculas que se asocian con el ribosoma, ha permitido relacionar componentes ribosomales con funciones, cuya relación por lo tanto, se limita a regiones determinadas del ribosoma **Tabla II**. Ribosomas de distintas procedencias poseen una serie de funciones básicas comunes que llevan a cabo durante la síntesis de proteínas, pero los componentes implicados pueden ser distintos **Tabla III** (Payo, 1993).

FUNCION RIBOSOMAL

La función esencial del ribosoma eucariótico consiste, al igual que la del ribosoma procariótico, en sintetizar proteínas de acuerdo con las instrucciones del mRNA mediante una serie de etapas que implican a diferentes componentes celulares. Desde el estado progenote hasta los contemporáneos arqueobacterias, procariotas y eucariotas, se han refinado de modo divergente detalles moleculares para conseguir mayor precisión o eficiencia en la traducción, pero se

TABLA II

SITIO	FUNCIONES	LOCALIZACION	COMPONENTES
Unión mRNA	Asociación de mRNA y factores IF.	30S, próximo al sitio P.	S1, S18, S21; también S3, S4, S5, S12 y 3' rRNA 16S.
Sitio P	Asociación de fMet-tRNA y peptidil-tRNA.	50S principalmente.	L2, L27; también L14, L18, L24, L33 y proximidad del 3' rRNA 16S.
Sitio A	Asociación de aa-tRNA.	50S principalmente.	L1, L5, L7/L12, L20, L30, L33 y rRNAs 16S y 23S.
Sitio E	Asociación de tRNA deacilado.	50S.	23S importante.
Peptidil transferasa	Transfiere péptido al aa-tRNA.	50S, cerca del sitio A y P.	L2, L3, L4, L15, L16; 23S importante.
5S RNA	Desconocida.	Protuberancia central en 50S.	L5, L18 y L25.
Unión EF-Tu	Entrada de aa-tRNA.	Interfase próxima al tallo L7/L12.	S18, L7/L12, L19 y L27.
Unión EF-G	Translocación.	Interfase próxima al tallo L7/L12.	S4, S12, S18, S19, L6, L7/L12, L11, L14, L19.
L7/L12	Necesarias para GTPasa.	Tallo 50S.	L7/L12.

Ribosomas de *E. coli*: funciones y componentes implicados (Lewin, 1990).

TABLA III

DOMINIO FUNCIONAL	COMPONENTES 40S	COMPONENTES 60S
Sitio de unión de eIF-2	rRNA 8Sa, S3, S3a, S6, S13/16, S15/15a, S19 y S24.	---
Sitio de unión de eIF-3	rRNA 18S, S2, S3, S3a, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S14, S15, S16, S19, S23/24, S25, S26, S27.	---
Sitio de unión de eEF-1	S23/24 y S26.	L12, L23 y L39.
Sitio de unión de eEF-2	S3/3a, S6, S7, S23/24 y S11.	rRNA 5S, L3, L4, L5, L8, L9, L12, L13, L21, L23, L26, L27a, L31, L32, P0 y P2.
Sitio de unión de mRNA	rRNA 18S, S1, S3/3a, S6, S11.	rRNA 5S, L5 y L6.
Sitio P	S3/3a, S6, S7, S13/15.	L3, L5, L6, L7, L8, L13, L21/23 y L32.
Sitio A	S4, S6, S10, S13, S14, S15, S23 y S24.	L4, L6, L13/15, L18, L21, L28, L29 y L30.
Peptidil-transferasa	---	rRNA 23S, L10, L13/15, L18, L21, L23, L24, L26, L27, L28, L31, L32/33 y L36.

Ribosoma eucariótico : dominios funcionales y componentes implicados (Nygard y Nilsson, 1993).

INTRODUCCION

mantienen las características básicas: se usa prácticamente el mismo código genético, hay equivalencias en la maquinaria implicada y los pasos en la síntesis son similares (Payo, 1993). La traducción del mRNA a proteínas por el ribosoma comprende tres etapas denominadas iniciación, elongación y terminación **Figura 2**. La iniciación resulta ser el proceso más diferente, implicando en eucariotas, una serie más compleja de componentes y una estrategia distinta (Hershey, 1991; Merrick, 1992; Nygard y Nilsson, 1990).

La traducción se inicia a partir de un punto preciso de la secuencia del mRNA, va seguida de la elongación de la cadena polipeptídica y termina liberando el polipéptido siguiendo una señal en el mismo mRNA. Los ribosomas se ensamblan a partir de sus subunidades, se encuentran como polisomas durante la traducción y termina la síntesis de proteínas con las subunidades ensambladas, en equilibrio dinámico con las desensambladas. Cada fase de la traducción es promovida por distintos factores solubles que constituyen una fracción importante de la proteína intracelular total (Payo, 1993).

Las principales características del sistema de traducción eucariótico, que lo diferencia del procariótico, son las siguientes:

- 1.- Los ribosomas presentan proteínas con un mayor peso molecular y ácidos nucleicos con coeficiente de sedimentación más elevado.
- 2.- Intervienen un mayor número de factores de iniciación.
- 3.- El metionil RNA de transferencia (tRNA) no está formilado.
- 4.- Existe un residuo nucleosídico llamado "cap" que está presente en la mayoría de los mRNA eucarióticos.
- 5.- Los mRNA son monocistrónicos.

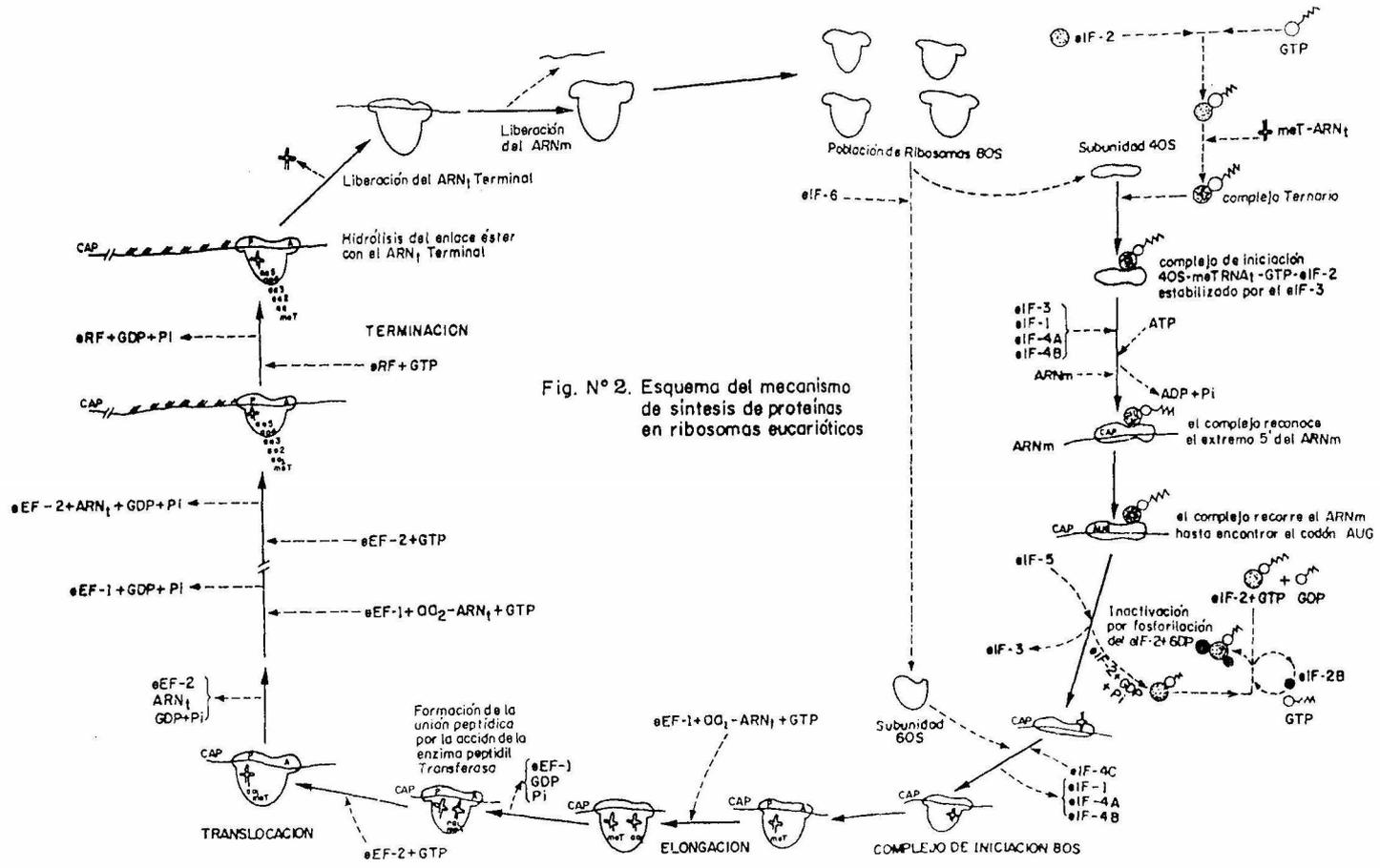


Fig. N° 2. Esquema del mecanismo de síntesis de proteínas en ribosomas eucarióticos

INTRODUCCION

PROTEINAS RIBOSOMALES

Una tercera parte de la masa total de los ribosomas procarióticos y la mitad de la masa de ribosomas eucarióticos está dada por moléculas de proteínas denominadas ribosomales.

Se suele definir como proteínas ribosomales, distinguiéndolas de otras proteínas citoplásmicas contaminantes que se fijan fuertemente a la estructura ribosómica, a aquellas que permanecen unidas a la partícula ribosomal cuando ésta ha sido sometida a un lavado con una solución de fuerza iónica elevada (0.5M de KCl ó NH₄Cl) y que conserve la actividad de síntesis de proteínas "in vitro" dependiente sólo de los factores de la traducción.

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 (Bielka, 1982; Vilella, 1988; Warner, 1971).

Los ribosomas de las células eucarióticas contienen alrededor de 75 especies de proteínas ribosomales (Zinker y Warner, 1976), que se han clasificado en tres categorías dependiendo de las características de su asociación con el rRNA (Warner, 1966):

- 1.- Proteínas que se encuentran asociadas irreversiblemente al rRNA recién sintetizado; éstas constituyen las verdaderas proteínas estructurales del ribosoma. Representan el 60% del total de las proteínas ribosomales de las partículas ribosomales nacientes.
- 2.- Proteínas que aparecen en los ribosomas cuando no hay síntesis de éstos y que por lo tanto intercambian con proteínas solubles homólogas "in vivo". "In vitro" se encuentran fuertemente unidas a los ribosomas; sólo se desprenden de él a concentraciones de KCl por arriba de 0.8M. Estas proteínas ribosomales denominadas de

INTRODUCCION

intercambio, representan entre el 13 y 23 de la proteína ribosomal total.

3.- Proteínas débilmente unidas a los ribosomas. Como las de la clase 2, éstas se encuentran en equilibrio con las proteínas solubles pero pueden ser removidas a baja fuerza iónica (menos de 0.5M KCl). Pueden ser moléculas unidas adventiciamente a los ribosomas, o bien factores del citosol indispensables para la función ribosomal.

La biosíntesis de las proteínas ribosomales está coordinada tanto en procariotes como en eucariotes (Nomura, 1975).

En procariotes la biosíntesis coordinada se asegura debido a que los genes de las proteínas ribosomales están organizados en estructuras funcionales tipo operón (Nomura y Engback, 1972) sujetas además a inhibición por retroalimentación (Nomura et al., 1980; Nomura y Yates, 1980). En eucariotes se desconoce el mecanismo de la regulación coordinada. Debe ser diferente a la de procariotes ya que los genes estructurales son monocistrónicos y están esparcidos en los diferentes cromosomas.

PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS

La separación y caracterización de cada especie de proteína ribosomal ha sido posible gracias al uso de técnicas de electroforesis bidimensional (Kaltshmidt y Wittmann, 1980) que permitieron comprobar el carácter básico de la mayoría de ellas. No obstante, en la subunidad mayor de los ribosomas arqueobacterianos, procarióticos y eucarióticos son detectables especies proteicas con un carácter marcadamente ácido (pI alrededor de 3.0). Designadas generalmente como proteínas "A" (proteínas "P" en eucariotes), las proteínas ácidas del ribosoma son un grupo de macromoléculas con una homogeneidad tal que sólo puede responder a una rigurosa conservación evolutiva de sus propiedades y funciones (Van Agtoven et al., 1978; Vilella, 1988; Payo et al., 1995).

INTRODUCCION

Las proteínas ácidas de la subunidad mayor de ribosomas de diversos orígenes comparten ciertas propiedades fisicoquímicas (Bielka, 1982; Matheson et al., 1980):

- Baja masa molecular (11-14 kDa)
- Alto contenido en Alanina (que les dota de una elevada hidrofobicidad), Aspártico y Glutámico (confiriéndoles un pI muy ácido), pocos residuos aromáticos y pocas o ninguna Arginina, Cisteína y Triptofano
- Alto contenido en alfa hélice.
- Presentan una región rica en Alanina, Glicina y Prolina, de gran flexibilidad.
- Forman dímeros muy estables en solución.
- Fácilmente extraíbles del ribosoma con soluciones conteniendo alta concentración salina y etanol, permitiendo la reconstitución posterior.
- No interaccionan directamente con el rRNA, sino a través de la proteína L10 y probablemente también L11 (P0 y L15/L12 en la levadura y las células de mamíferos).
- Son las únicas proteínas presentes en más de una copia por partícula ribosomal.
- Forman una protuberancia característica en la subunidad mayor del ribosoma (el tallo o "stalk"), implicada en la interacción con factores de elongación y terminación.

En algunos casos se ha demostrado que existe una reconstitución funcional parcial si a un ribosoma de una especie se le cambian sus proteínas ácidas por las de otra especie (Boublick et al., 1979; Sánchez-Madrid, 1981; Vilella, 1988) y una reacción inmunológica cruzada entre las proteínas ácidas de distintas especies (Vidales et al., 1981).

INTODUCCION

PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS EN E. coli

Entre las proteínas ubicadas en la familia de las proteínas "A" las mejor estudiadas son las de los ribosomas de E. coli. Existen dos proteínas "A" localizadas en la subunidad ribosomal mayor 50S, y se denominan L7 y L12. Si bien ambas tienen la misma secuencia de aminoácidos, L7 es la forma acetilada, en el amino terminal de L12, significando que ambas son codificadas por el mismo gene *rplL* (Terhorst et al., 1973; Payo et al., 1995). Ambas proteínas forman dímeros en solución (Vilella, 1988).

Existen cuatro copias de estas proteínas "A" (Subramanian, 1975) y son parte integrante de un complejo pentamérico constituido por dos dímeros de L7/L12 y una molécula de proteína L10, el cual une al rRNA 23S y forma el tallo lateral flexible de la subunidad ribosomal 50S (Brot y Weissbach, 1981; Palma, 1994; Subramanian, 1975; Vilella, 1988). Este complejo es altamente estable, tolerando hasta 8M de urea (Pettersson et al., 1976) y pueden ser removidas fácilmente del ribosoma por lavados de sal-etanol (Highland y Howard, 1975).

Ambos dímeros L7/L12 son necesarios para una función óptima de la síntesis de proteínas y para la unión de los factores de elongación (Moller y Amons, 1985) y aminoacil-tRNA al ribosoma (Brot y Weissbach, 1981; Moller y Maassen, 1986) así como para los factores dependientes de la hidrólisis del GTP (Koteliansky et al., 1978; Lavergne et al., 1992). También se han propuesto como transductores de la energía requerida por el peptidil-tRNA en la translocación (Moller, 1991) y están implicados en la precisión de la traducción (Kirsebom e Isakson, 1985). La evidencia disponible de experimentos "in vivo" sugiere que las proteínas L7 y L12 tienen funciones similares puesto que, a pesar del cambio en su proporción a medida que el cultivo celular en fase logarítmica alcanza la fase

INTRODUCCION

estacionaria, la acetilasa de la proteína ribosomal L12 permanece constante durante el desarrollo del ciclo celular (Subramanian y Nehls, 1975) y el crecimiento celular no se altera en una mutante sin actividad de L12 acetilasa (Isono e Isono, 1981).

PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS EUCARIOTICAS

En organismos eucarióticos, las proteínas ácidas (proteínas "P") se encuentran como una familia de polipéptidos que tienen propiedades fisicoquímicas similares, pero diferente composición de aminoácidos (Tsurugi et al., 1978; Van Agtoven et al., 1978; Vilella et al., 1991)

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 reticulocitos de conejo, el germen de trigo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Scizosaccharomyces pombe* (Beltrame y Bianchi, 1987; Lin et al., 1982; Maassen et al., 1985; Quian et al., 1987; Rich y Steitz, 1987; Van Agtoven et al., 1978; Vidales, 1984).

Las proteínas "P" eucariotas difieren de las eubacterianas L7/L12 en cuatro aspectos principales:

1.- Son codificadas por genes independientes (Maassen, et al., 1985, Rich y Steitz, 1987; Mitsui y Tsurugi, 1988a; Mitsui y Tsurugi, 1988b; Beltrame y Bianchi, 1990; Newton, et al., 1990; Wool, et al., 1991).

2.- Aunque existen también dos formas de proteínas, la diferencia entre ellas no es debida a la acetilación, sino más bien a que éstas se encuentran fosforiladas en el ribosoma (Zinker y Warner, 1976; Vidales, et al., 1984; Naranda y Ballesta, 1991; Naranda et al.,

INTRODUCCION

1993) por lo cual son llamadas proteínas "P" (Tsurugi et al., 1978), así como desfosforiladas en una poza citoplásmica (Van Agtoven et al., 1978; Zinker, 1980; Mitsui et al. 1988).

3.- El intercambio entre las fosfoproteínas ribosomales y sus contrapartes citoplásmicas no fosforiladas depende de la síntesis de proteínas (Zinker y Warner, 1976; Tsurugi y Ogata, 1985) regulándose, muy probablemente, bajo el control de más de una proteino cinasa y de mecanismos de desfosforilación (Naranda et al., 1993).

4.- Sus cantidades ribosomales y citoplásmicas cambian de acuerdo a el estado metabólico de la célula (Saenz-Robles et al., 1990).

Actualmente se conoce la secuencia de las proteínas ribosomales ácidas de diferentes organismos incluyendo: Artemia salina (Maassen et al., 1985), D. melanogaster (Quian et al., 1987), el hígado de la rata (Lin, et al., 1982), el hígado humano (Rich y Steitz, 1987) y S. cerevisiae (Remacha et al., 1988). En el caso de S. pombe, sólo una proteína ha sido reportada (Beltrame y Bianchi, 1987). Cuando la secuencia primaria del DNA de todas ellas se compara, se puede clasificar en dos grupos que se han conservado estrictamente durante la evolución presentando, en promedio, alrededor de 70% de similitud que disminuye hasta 50% cuando se comparan ambos grupos entre sí (Shimmin et al., 1989).

Un grupo está integrado por: la proteína de mamífero P2, la de A. salina eL12, la de D. melanogaster A1, de S. pombe la A1, y las de S. cerevisiae L44 y L45; el otro grupo está formado por la proteína de mamífero P1, la de A. salina eL12', la de D. melanogaster la rp21c y las de S. crevisiae 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.

INTRODUCCION

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 ribosomales ácidas, lo que sugiere que puede ser una característica en los eucariotes inferiores (Remacha, et al., 1988). A través de estudios de las proteínas ribosomales de la rata, se sabe que ningún eucariote superior contiene más de dos especies de proteínas (Tsurugi y Mitsui, 1989), pero la levadura es excepcional teniendo a dos miembros en cada grupo (Remacha et al., 1990).

Basados en criterios fisicoquímicos, inmunológicos y funcionales está aceptado que las proteínas "P" eucarióticas presentan la misma función que las proteínas eubacterianas L7/L12 (Wool y Stoffler, 1974; Howard et al., 1976; Sánchez-Madrid et al., 1981). Existen evidencias de la influencia de las proteínas "P" en la actividad de los factores de elongación. En el hígado de la rata las partículas ribosomales carentes de proteínas ácidas muestran una menor eficacia en la unión del factor eEF-2, en la hidrólisis del GTP y en la síntesis de polifenilalanina (Lavergne et al., 1987; MacConeil y Kaplan, 1982). También se ha observado una disminución en la actividad ribosomal tras la eliminación de las proteínas ácidas de A. salina (Van Agtoven, 1977) y reticulocito de conejo (Cox y Greewell, 1976). Así mismo en S. cerevisiae la extracción de las proteínas ácidas del ribosoma afecta sensiblemente la capacidad de hidrólisis del GTP y la fijación del GDP dependientes de eEF-2 (Sánchez-Madrid et al., 1979). En ribosomas de rata, recientemente, se ha observado la asociación directa de la proteína P2 con el GDP tras la hidrólisis del GTP dependiente de eEF-2 (Lavergne et al., 1992). Tal asociación no se da en el caso de P1, es sensible a la adición de tRNA desacilado y es de naturaleza hidrofóbica, resistiendo concentraciones de urea 9.5M. Esta asociación sugiere la

INTRODUCCION

posibilidad de que las proteínas ácidas (en concreto P2) puedan jugar algún papel en el reciclaje del factor de elongación eEF-2.

En las proteínas ácidas de eucariotas y arqueobacterias el extremo C-terminal posee una alta densidad de carga negativa, y su tamaño es reducido en comparación con el bacteriano. Tanto péptidos sintéticos con la secuencia correspondiente al extremo del C-terminal, como anticuerpos que reconocen dicha secuencia, son capaces de inhibir la síntesis de proteínas "in vitro" (Tsurugi y Mitsui, 1989; Uchiuni et al., 1990), lo que ha sido interpretado como un indicio de la interacción directa del extremo C-terminal de las proteínas ácidas eucarióticas con los factores de elongación.

El hecho de que las proteínas ácidas eucarióticas se fosforilen "in vivo" y recién extraídas del ribosoma estén mayoritariamente fosforiladas (Vidales et al., 1984), unido a datos que indican que las proteínas ácidas ribosomales presentes en el citoplasma celular están desfosforiladas (Zinker, 1980) ha hecho pensar que la fosforilación de estas proteínas puede tener un significado especial en su incorporación al ribosoma. Experimentos de reconstitución "in vitro" en ribosomas de rata (Lavergne et al., 1987; MacConell y Kaplan, 1982) y de *S. cerevisiae* (Vidales et al., 1984) han mostrado que la fosforilación de las proteínas ácidas es necesaria para su incorporación a partículas ribosomales, resultando una activación de la síntesis protéica. En todos los casos las proteínas ácidas desfosforiladas no consiguen reactivar núcleos ribosomales desprovistos de dichas proteínas. Por otra parte, la mutagénesis dirigida sobre los sitios de fosforilación de YP2-beta y YP1-beta impide no sólo la fosforilación, sino también la unión estable de las proteínas mutadas al ribosoma, quedando en el sobrenadante celular (Naranda y Ballesta, 1991; Naranda et al., 1993).

INTRODUCCION

Los diversos datos disponibles han llevado a proponer un mecanismo de control global sobre la elongación, basado en la fosforilación-desfosforilación de proteínas ribosomales ácidas y su grado de asociación a los ribosomas, como posible respuesta a condiciones metabólicas (Ballesta et al., 1993; Naranda y Ballesta, 1991; Saez-Robles, 1990). Este mecanismo podría funcionar simultáneamente junto con otros mecanismos caracterizados basados en la fosforilación-desfosforilación de factores de la traducción (Merrick, 1992; Rhoads, 1993).

PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS DE S. cerevisiae

A pesar de que las proteínas "P" poseen características fisicoquímicas 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 YP2-alfa y YP2-beta forman dímeros cuando están en solución, lo que no sucede con YP1-beta que se comporta como monómero en las mismas condiciones. El gen de YP1-beta se diferencia de los genes que codifican a YP2-alfa, YP2-beta y YP1-alfa en que posee un intrón, además presenta 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 (Vilella, 1988).

Otra característica que diferencia a las cuatro proteínas es la distribución de aminoácidos cargados y apolares a lo largo de la secuencia protéica **Figura 3**. La homología global es de un 80% entre las proteínas del mismo grupo y de un 60% entre componentes de grupos distintos. Se observa que L44 (YP2-alfa) y L45 (YP2-beta) poseen una

YP1 alfa (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 AlaGly 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

YP1 beta (L46 o L44')

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
AlaLeu 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

YP2 beta (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 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 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

YP2 alfa (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

Figura 3. Secuencia de aminoácidos de las proteínas ácidas L47, L46 (L44'), L45 y L44 de la subunidad mayor del ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Remacha y col. 1988).

INTRODUCCION

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 YP1-alfa y YP1-beta comparten con las otras dos el extremo carboxilo pero no así el extremo amino, el cual es diferente (Remacha, 1988; Remacha et al., 1988; Vilella et al. 1991).

En cuanto a la composición de aminoácidos se observa que YP1-beta posee triptofano e histidina mientras que estos aminoácidos no se presentan en las otras dos proteínas (Mitsui y Tsurugi, 1988a; Mitsui y Tsurugi, 1988b; Vilella, 1988). La arginina sólo está presente en YP2-beta; la prolina disminuye drásticamente en YP1 beta (Vidales et al., 1984).

La presencia de un carboxilo terminal idéntico, sugiere la existencia de un sitio de interacción común en el ribosoma para los diferentes polipéptidos solubles involucrados en la traducción (Remacha et al., 1988).

Por las características mencionadas anteriormente las proteínas "P" de la levadura pueden ser agrupadas en dos pares: YP1-alfa/YP1 beta y YP2-alfa/YP2-beta que parecen tener un papel complementario en la función ribosomal (Remacha et al., 1990; Naranda et al., 1991).

Como ya se mencionó, al igual que las proteínas "A" bacterianas, las proteínas "P" eucarióticas son detectadas como dímeros (Vidales et al., 1983) y al parecer forman un complejo pentamérico con una proteína ribosomal semejante a L10, análogo al complejo formado por L7/L12 y L10 (Uchiumi et al., 1987). Este equivalente de la proteína ribosomal L10 es llamado P0 y tiene secuencias de homología a L10 bacteriana que apoya su papel funcional similar (Shimmin et al., 1989) pero también muestra importantes diferencias

INTRODUCCION

estructurales. Probablemente la más importante sea la presencia de una extensión del carboxilo terminal con una alta secuencia de homología a las proteínas "P" (Shimin et al., 1989). El complejo pentamérico eucariótico es mucho menos estable que la estructura bacteriana y se desensambla fácilmente cuando se somete a las mismas condiciones que remueven ésta del ribosoma bacterino (lavados de sal-etanol). Bajo estas condiciones P0 permanece unida a la partícula ribosomal y las proteínas P1 y P2 son liberadas (Sánchez-Madrid et al., 1979; Towbin et al., 1982; Santos y Ballesta, 1994).

Warner y Zinker en 1976 clasificaron a las proteínas "P" de S. cerevisiae como proteínas de recambio, porque las proteínas "P" recién sintetizadas se encontraron en ribosomas previamente sintetizados. Es decir, existe un recambio entre las proteínas "P" del ribosoma con aquellas del citoplasma, en ausencia de biosíntesis de ribosomas "de novo".

Van Agtoven en 1978 reportó, usando radioinmuno pruebas, la presencia de una poza citoplásmica en A. salina.

De acuerdo con estos resultados Zinker en 1980, detectó una gran poza de YP2-alfa/YP2-beta libre (desfosforiladas) en el citoplasma de S. cerevisiae, hasta cuatro veces mayor que el número de proteínas asociadas a los ribosomas.

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 proteínas "P" probablemente están involucradas en un mecanismo que controla la actividad del ribosoma a través de un proceso de fosforilación/desfosforilación fijándose o liberándose de éste y estimulándolo ó inhibiéndolo.

INTRODUCCION

INACTIVACION DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS DE S. cerevisiae MEDIANTE DISRUPCION GENICA

Una peculiaridad de las fosfoproteínas ácidas eucariotas es el hecho de que, en todos los organismos, están presentes como una familia de polipéptidos estrechamente relacionados. La existencia de diferentes proteínas "P" puede ser considerada irrelevante desde el punto de vista de la función ribosomal, como en bacterias. Sin embargo, a pesar de que el extremo carboxilo terminal es prácticamente idéntico en todas las especies eucariotas (Remacha, 1992) el resto de la secuencia, si bien presenta una alta homología, es lo bastante diferente para permitir especulaciones de posibles diferencias funcionales para los diversos miembros de las familias.

Mediante técnicas de disrupción génica se han obtenido cepas de S. cerevisiae deficientes en sus proteínas "P" (YP1-alfa, YP1-beta, YP2-alfa y YP2-beta) con el fin de lograr una mayor comprensión de la relación funcional existente entre ellas (Remacha, 1990, 1992, 1995).

Contrariamente a las proteínas "A" bacterianas, ninguno de los cuatro genes ni sus proteínas codificadas son indispensables para la actividad del ribosoma y la viabilidad celular (Remacha, 1990; Remacha, 1992). La ausencia de una de las proteínas ácidas repercute en la velocidad de traducción y el tiempo de generación.

Se ha mostrado que en el caso de la pareja de proteínas YP2, cada miembro del par puede substituir la ausencia del otro (Remacha, 1992). En S. pombe, sin embargo, los resultados indican una situación diferente puesto que la disrupción de un miembro específico de los 2 pares análogos es letal, pero la inactivación de el otro no tiene efectos deletéreos en el crecimiento celular (Beltrame y Bianchi, 1990).

INTRODUCCION

La ausencia simultánea de una proteína de cada grupo P1 y P2 en S. cerevisiae, conduce a tiempos de generación similares a los obtenidos en la ausencia de sólo una proteína. Pero la ausencia simultánea de los dos genes de un mismo grupo tiene un efecto mucho mayor, llevando a tiempos de generación de 235 minutos en la disrupción del grupo P1 y 215 minutos en la del grupo P2 frente a 85 minutos en la cepa parental.

Como consecuencia de la disrupción de los genes de un mismo grupo, las proteínas del otro grupo no llegan a incorporarse a la partícula ribosomal, aunque siguen estando presentes en extractos celulares totales. Ello sugiere algún tipo de cooperación entre las proteínas P1 y P2 para su unión al ribosoma. Las partículas ribosomales de cepas portadoras de disrupción en los dos genes del mismo grupo, son activas en polimerización de aminoácidos y en actividad GTPasa dependiente de EF-2 aunque menos eficiente en esas actividades que los ribosomas extraídos de la cepa parental. No obstante, la adición de las proteínas ácidas ausentes en esas partículas ribosomales estimula las dos actividades. Estos resultados indican que, al menos en S. cerevisiae, la interacción de las proteínas ácidas con el ribosoma no es imprescindible para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas "in vivo" o "in vitro" (Payo, 1993; Remacha, 1992).

En 1995 Remacha obtuvo cepas con tres y cuatro genes inactivados (triples y cuádruple disrupción) que codifican para las cuatro proteínas ácidas YP1-alfa, YP1-beta, YP2-alfa y YP2-beta, concluyendo que la viabilidad de la levadura no depende de las proteínas ácidas; éstas, más bien regulan la actividad de la subunidad 60S, afectando la traducción de ciertos mRNAs.

INTRODUCCION

En trabajos adicionales con las cepas con disrupciones simples, Olivares (Olivares, 1996) concluye que al tratarlas con choques térmicos la ausencia de la proteína YP1-beta le confiere a la cepa D6 un fenotipo de termosensibilidad y por el contrario la falta de la proteína YP1-alfa le da a la cepa D7 un fenotipo termotolerante. Al someter a estas mismas cepas a estrés salino determina que la ausencia de las proteínas YP2-beta en la cepa D5 y YP2-alfa en la cepa D4 confieren a estas cepas un fenotipo de halotolerancia y que la falta de la proteína YP1-alfa en la cepa D7 la hace fenotípicamente halosensible.

Debido a que las proteínas ribosomales ácidas: 1) Están fosforiladas en el ribosoma (Zinker y Warner, 1976; Vidales et al., 1984; Naranda y Ballesta, 1991; Naranda et al., 1993); 2) Recambian con sus homólogas del citoplasma (Zinker y Warner, 1976; Tsurugi y Ogata, 1985); 3) Este recambio es independiente de la biogénesis del ribosoma; 4) En el proceso de recambio participan protein cinasas específicas (Naranda et al., 1993) y muy probablemente también protein fosfatasas específicas y 5) Son dispensables para la célula según se concluye de los experimentos de disrupción génica (Remacha et al., 1990, 1992, 1995); es probable que estas proteínas ácidas, además de ser estructurales del ribosoma, sean moduladoras ya sea de la actividad de ésta partícula o de la traducción en general. De ser así, se esperaría que en ausencia de alguna de ellas la célula tuviera un comportamiento diferente al enfrentarlas a condiciones que alteran la síntesis de proteínas.

Algunas condiciones que alteran la síntesis de proteínas son: la exposición de la célula a metales pesados, a alcoholes, a infecciones virales, a estrés salino, a choques térmicos y a venenos metabólicos; en estos últimos se pueden encontrar a los inhibidores de la iniciación, la elongación y la terminación, fases del proceso de la traducción.

INTRODUCCION

Las sales de fluoruro (uno de los inhibidores utilizados en este trabajo) han sido propuestos como inhibidores de la unión de la subunidad ribosomal 40S (Lebleu et al., 1970; Hoertz, W. y McCarty, K., 1970), causando disociación polisomal y la acumulación de ribosomas y subunidades ribosomales (Marks et al., 1955; Colombo et al., 1968; Hogan, B. 1969; Bishop, J., 1986). En cultivos de S. cerevisiae se observa que el NaF incrementa la cantidad de proteínas ácidas en las partículas ribosomales y disminuyen en el citoplasma (Saenz-Robles et al., 1990) **Figura 4.**

La cicloheximida (segundo inhibidor utilizado) ha sido descrita como inhibidor de la síntesis de proteínas (Kerridge, D., 1958) y en sistemas libres de células (Felicetti et al., 1966; Siegel y Sisler, 1963). Se sabe que inhibe la elongación de la síntesis en un rango de concentraciones muy amplio. Se ha comprobado que el sitio de acción del antibiótico es el ribosoma (Battaner y Vázquez, 1971) **Figura 4.**

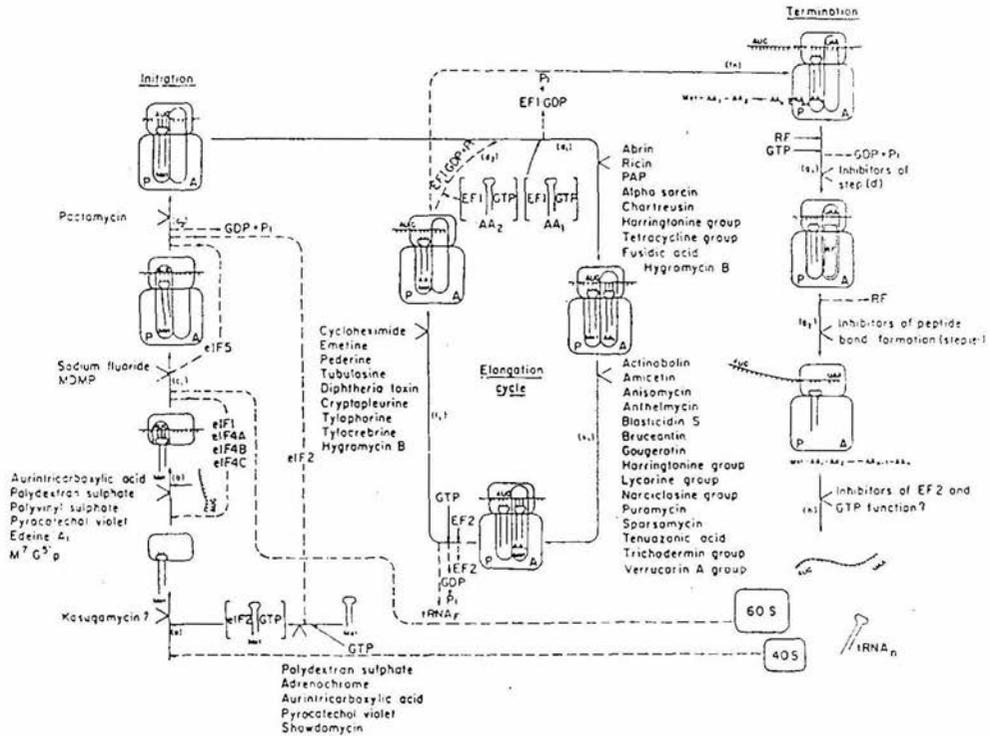


Figura 4. Sitio de acción de inhibidores del proceso de la traducción en células eucariotas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue diferenciar el fenotipo de las cepas con disrupción simple (YP1-alfa::LEU2; YP1-beta::TRP1; YP2-alfa::URA3 y YP2-beta::HIS3) expuestas a condiciones que alteran la síntesis de proteínas como son el crecer en presencia de inhibidores de la iniciación y la elongación de la misma: NaF y cicloheximida respectivamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Conocer si existe relación entre la carencia de una o más proteínas ribosomales ácidas y la tolerancia al inhibidor de la iniciación NaF en mutantes de S. cerevisiae.
- 2.- Conocer si existe relación entre la carencia de una o más proteínas ribosomales ácidas y la tolerancia al inhibidor de la elongación cicloheximida en mutantes de S. cerevisiae.
- 3.- Tratar de establecer la fase del proceso de traducción en la que intervienen las proteínas ribosomales ácidas.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Cepas de Saccharomyces cerevisiae

1.1.a. HA1. Cepa parental con tipo de apareamiento a, grande haploide, con los marcadores nutricionales gal 1, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1.

1.1.b. Y166. Es una cepa de tipo de apareamiento alfa (MAT-alfa, grande, con los marcadores nutricionales Trip5, lis 4).

1.1.c. W303-1B. Presenta tipo de apareamiento alfa, es grande, haploide. MAT-alfa con los marcadores nutricionales: ade 2, can 1, his 3, leu 2, trp 1, ura 3.

1.1.d. Cepas con disrupciones simples, dobles y triples en los genes que codifican para las proteínas ribosomales ácidas.

D4: MAT a; trp 1, his 3, leu 2, ura 3, can 1.

D5: MAT a; ura 3, leu 2, trip 1, ade 2, can 1.

D6: MAT a; ura 3, leu 2, his 3, ade 2, can 1.

D7: MAT a; ura 3, trp 1, his 3, ade 2, can 1.

D45: MAT a; trp 1, leu 2.

D46: MAT a; his 3, leu 2, ade 2.

D47: MAT a; trp 1, his 3.

D56: MAT a; ura 3, leu 2, ade 2, can 1.

D57: MAT a; ura 3, trp 1, ade 2, can 1.

D67: MAT a; ura 3, his 3, ade 2, can 1.

D456: MAT a; leu 2.

D457: MAT a; trp 1, ade 2.

D467: MAT a; his 3.

D567: MAT a; ade 2, ura 3.

MÉTODOS

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medio YPD

Y= Levadura P= Peptona D= Dextrosa

Extracto de levadura(1%) ----- 10 gr.
Peptona (2%) ----- 20 gr.
Glucosa (2%) ----- 20 gr.
Agua bidestilada ----- 1000 ml.

2.2. Medio YPD-agar

Agregar agar al 2% al medio YPD.

2.3. Medio mínimo SD

YNB (10X) ----- 100 ml.
Glucosa (50%) ----- 20 ml.
Histidina ----- 0.04 mg.
Lisina ----- 0.04 mg.
Tryptofano ----- 0.04 mg.
Leucina ----- 0.04 mg.
Adenina ----- 0.04 mg.
Uracilo ----- 0.04 mg.
Aforar con agua bidestilada a 1000 ml.

2.4. Medio YNB (10X)

Se disolvió 50 gr de sulfato de amonio en 500 ml de agua bidestilada. Se agregó 40 ml de la mezcla de vitaminas (250X).

MÉTODOS

Después se agregaron 1 ml de cada una de las sales traza (100X). Se añadieron 200 ml de la mezcla de sales (50X), esto se aforó a 1000 ml con agua bidestilada y se mezcló bien. Posteriormente se esterilizó por filtración. Se usaron 100 ml de la solución por cada 1000 ml de medio de cultivo.

2.4.a. Vitaminas (250X)

Biotina -----	200 ug.
Acido fólico -----	200 ug.
Inositol -----	200 ug.
Pantotenato de Calcio -----	40 mg.
Niacina -----	40 mg.
PABA	
(Acido p-amino benzóico) ---	20 mg.
Piridoxina hidrocloreuro ----	40 mg.
Riboflavina -----	20 mg.
Tiamina hidrocloreuro -----	40 mg.

Se disolvieron en 400 ml de agua bidestilada y se guardó en fracciones de 40 ml a -20°C.

2.4.b. Elementos traza (100X)

Acido bórico -----	50 mg.
Sulfato de Cobre -----	4 mg.
Ioduro de Potasio -----	10 mg.
Cloruro férrico -----	20 mg.
Sulfato de manganeso -----	40 mg.
Molibdato de Sodio -----	20 mg.
Sulfato de zinc -----	40 mg.

MÉTODOS

Cada uno se disolvió en 10 ml de agua bidestilada y se guardó a temperatura ambiente.

2.4.c. Mezcla de sales (50%)

Fosfato de potasio monobásico ---- 50 gr.
Sulfato de magnesio ----- 25 gr.
Cloruro de sodio ----- 5 gr.
Cloruro de calcio ----- 5 gr.

El cloruro de calcio se disolvió en 100 ml. Por separado se disolvieron en 300 ml todas las demás sales juntas en agua bidestilada y posteriormente se juntaron estas dos y luego se aforó a 1000 ml. Se guardó en frascos de vidrio a 4°C.

2.5. Medio mínimo SD. agar

Agregar agar al 2% al medio SD.

3. MÉTODOS

3.1. Crecimiento en YPD-agar con diferentes concentraciones de NaF

Para determinar las concentraciones de NaF a utilizar se tomó como referencia la concentración especificada para levaduras que es de 50 mM (Saenz-Robles, 1990). Se decidió establecer concentraciones inferiores y superiores a la concentración de referencia teniendo así 25 mM de NaF (mínima), 50 mM, 75 mM y 100 mM (máxima).

El medio YPD-agar después de ser esterilizado se reguló a una temperatura de 45°C en baño María. En condiciones de esterilidad se repartió en 5 matraces de 250 ml de capacidad (120 ml/matraz) y se le

MÉTODOS

añadió la cantidad de NaF correspondiente a las concentraciones establecidas.

Para disolver el NaF fué necesario utilizar agitadores magnéticos previamente esterilizados.

Todas las cajas fueron sometidas a prueba de esterilidad incubándolas a 37°C durante 24 horas.

Comprobada la esterilidad de las cajas se sembraron las cepas de S. cerevisiae W303-1B, Y166 y HA1 (controles) y las cepas con disrupciones simples, dobles y triples y se mantuvieron en incubación a 30°C durante 48 horas.

3.2. Curvas de crecimiento en YPD con diferentes concentraciones de NaF

Se siguieron las cinéticas de crecimiento de las cepas de S. cerevisiae W303-1B (control) y las cepas con disrupciones simples durante 24 horas continuas.

Se inocularon 50 ml de medio YPD en matraces de 150 ml de capacidad con la cantidad necesaria de la solución "stock" correspondiente para iniciar la cinética en una D.O. de 0.02 a 0.05 a 660 nm. Inmediatamente a la inoculación del medio se tomaron muestras de 1 ml que fueron leídas a 660 nm teniendo como blanco YPD sin inocular y las lecturas resultantes se consideraron como el inicio de la cinética. Una vez tomada la muestra los matraces se mantuvieron en agitación rotatoria a una temperatura de 30°C.

Posteriormente bajo condiciones de esterilidad se tomaron muestras cada hora hasta completar una cinética de crecimiento de 24 horas.

MÉTODOS

Ocasionalmente se verificó al microscopio que los cultivos no estuvieran contaminados.

3.3 Crecimiento en YPD-agar con diferentes concentraciones de cicloheximida

Se prepararon cajas petri con medio YPD-agar sirviendo 20 ml de medio por caja.

Antes de que el medio gelificara se añadió cicloheximida en cada caja en concentraciones diferentes que fueron desde 10 ug/ml (concentración mínima) hasta una concentración máxima de 100 ug/ml. Las concentraciones fueron aumentando de 10 ug/ml en 10 ug/ml teniendo así cajas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ug/ml de cicloheximida. Todas las cajas fueron sometidas a prueba de esterilidad a 37°C durante 24 horas.

Comprobada la esterilidad de las cajas se sembraron las cepas de *S. cerevisiae* W303-1B, Y166 y HAl (controles) y las cepas con disrupciones simples, dobles y triples y se mantuvieron en incubación a 30°C durante 24 horas.

Las concentraciones de cicloheximida utilizadas se establecieron tomando como referencia las utilizadas por Helser, 1981 donde 10 ug/ml se indica como la concentración mínima y 100 ug/ml como la concentración máxima. En este trabajo se manejaron las concentraciones que se encuentran en este rango aumentando de 10 ug/ml en 10 ug/ml.

MÉTODOS

3.4. Obtención de patrones polisomales

Método de Hensel y col. (1981).

3.4.1. Soluciones.

- Buffer TKM pH-7.4 (1 litro)

KCl -----	100 mM.
MgSO ₄ -----	30 mM.
Tris -----	10 mM.
Beta-mercaptoetanol -----	6 mM.

El pH se ajustó con HCl y se conservó a 4°C.

- Solución de cicloheximida 10 mg/ml

Se utilizaron 10 ul de la solución por cada ml de medio de cultivo obteniéndose una concentración final de 100 ug/ml. Se disuelve en agua bidestilada estéril y esta solución se esteriliza por filtración. Se guarda a 4°C.

- Solución de sacarosa al 10% (P/V)

Se pesan 10 gr de sacarosa y se disuelven en 90 ml de amortiguador TKM. Se guarda a 4°C

- Solución de sacarosa al 45% (P/V)

Se pesan 45 gr de sacarosa y se disuelven en 55 ml de amortiguador TKM. Se guarda a 4°C.

MÉTODOS

DESARROLLO

Se inocularon 100 ml de medio YPD en matraces de 250 ml con la cepa de *S. cerevisiae* a trabajar. El cultivo se incubó a 32°C con agitación rotatoria (200 rpm) hasta una D.O. de 0.4-0.6 a 660 nm (fase media log.). Todo el procedimiento se debe realizar a una temperatura de 4°C.

El metabolismo de las células de *S. cerevisiae* en fase media log fué detenido por la adición de cicloheximida (100 ug/ml) y hielo frapé. Las células fueron cosechadas por centrifugación durante 5 min a 5000 rpm /4°C en botellas corex de 150 ml de capacidad, el sobrenadante fué desechado por decantación y la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de agua estéril más cicloheximida (100 ug/ml) a 4°C con el objeto de eliminar residuos del medio de cultivo.

La suspensión fué transferida a tubos corex de 30 ml y se centrifugaron durante 5min/10,000rpm/4°C descartando el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 1 ml/gr de células con amortiguador TKM a 4°C y se sometió a ruptura celular de forma mecánica con perlas de vidrio con intervalos de 30 seg en vortex y 30 seg en hielo. La ruptura celular se verificó al microscopio. Una vez comprobada la ruptura del 100% de las células, el extracto celular crudo fué transferido a un corex de 15 ml y las perlas de vidrio fueron lavadas dos veces con 0.5 ml de amortiguador TKM con el fin de rescatar la mayor cantidad de extracto celular. El extracto celular crudo fué centrifugado durante 15 min/15,000 rpm/4°C para descartar residuos celulares. Un volumen del sobrenadante equivalente a 75 D.O a 260 nm ajustado, en caso necesario, a un volumen final de 2 ml con amortiguador TKM; se estratificó sobre gradientes de sacarosa del 10-45% en amortiguador TKM. Los gradientes fueron sometidos a ultracentrifugación durante 5 hrs/25,000 rpm/4°C.

El patrón polisomal se obtuvo registrando la absorción a 260 nm.

MÉTODOS

3.5. Extracción de proteína total

3.5.1. Soluciones

TAMPON I	TRIS - HCl -----	100 mM
	KCl -----	80 mM
	MgCl ₂ -----	12.5 mM
	Beta-mercaptoetanol -----	5 mM
	Ajustar el pH a 7.4 con HCl.	

OTRAS	- MgCl ₂ 1M en solución
	- Acido acético glacial
	- Acido acético al 0.5N
	- Acetona

DESARROLLO

Se crecieron las células en medio YPD a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.4 - 0.6 (fase media-log) a 660nm. Se centrifugó a 10,000 rpm/5 min/4°C para empastillar las células y se desechó el sobrenadante. Se lavaron las células con 20ml de tampón I, en seguida se centrifugó a 15,000 rpm/20 min/4°C y se tiró el sobrenadante. Posteriormente se rompieron las células con perlas de vidrio (0.45 micras), 30 seg al vortex y 30 seg en hielo. Se verificó al microscopio que las células estuvieran rotas, una vez rotas se centrifugó a 15,000 rpm/20 min/4°C y al sobrenadante se le agragó 0.1 vol de MgCl₂ 1M y 2 vol de ácido acético glacial simultáneamente, y con agitación magnética se mantuvo a 4°C/30 min. Al término de este tiempo se centrifugó a 15,000 rpm/10 min/ 4°C. El sobrenadante se colocó en bolsas para diálisis (diámetro de 2.1 cm) y se dializó contra ácido acético al 0.5 N a 4°C. Después de la diálisis, se procedió a congelar las muestras con acetona y hielo seco, para liofilizarlas dentro de frascos viales.

MÉTODOS

3.6. Preparación de la proteína para electroforesis

La proteína liofilizada se disolvió en urea 8M. Se tomaron muestras de esta disolución para cuantificarla (Lowry). Sabiendo la concentración que se tenía se procedió a agregarle amortiguador de muestra y poner 50 ug de proteína por carril en un gel discontinuo tipo Maizel.

3.7. Técnica para electroforesis

Gel discontinuo unidimensional Maizel

3.7.1. Soluciones

Solución A.- Acrilamida - Bis acrilamida (30:0.8).

30 gr acrilamida + 0.8 gr Bis - acrilamida para 100ml de agua bidestilada. Filtrar a través de Whatman No.50.

Guardar en botellas oscuras a 4°C.

Solución B.- TRIS de pH 8.8.

12.11 gr de TRIS + 50ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl. Se aforó a 100ml.

Solución C.- SDS al 10% en agua bidestilada.

Solución D.- TRIS de pH 6.8.

6 gr de TRIS + 20ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl. Se aforó a 50ml.

Amortiguador de corrida.

Glicina -----	14.4 gr
TRIS -----	3 gr
SDS 10% -----	10 ml
Agua bidestilada -----	1000 ml

MÉTODOS

Amortiguador muestra

Solución D -----	1.0 ml
Solución C -----	1.0 ml
Glicerol -----	1.0 ml
Beta-mercaptoetanol -----	0.1 ml
Rojo de fenol (0.1% en agua) -----	0.1ml
Agua bidestilada -----	6.8 ml

Solución para teñir el gel

Azul de coomassie al 0.2%
Acido acético glacial al 7%
Etanol al 50%
Teñir por 30 min.

Solución para desteñir el gel

Acido acético glacial al 7%
Etanol al 50%

OTRAS

Persulfato de amonio al 10%
TEMED (NNNN-tetrametiletildiamina).

DESARROLLO

Se prepararon los cristales en donde fué vaciada la solución para el gel. Posteriormente, se preparó la solución para un gel al 15%, la cual consistió en: 15 ml de solución A, 11.25 ml de solución B, 0.3 ml de solución C, agua 3.25 ml, TEMED 25 ul (en este momento se desgacificó durante 2 min en una cámara de vacío) y por último 120 ul de persulfato de amonio (10%). Todo se mezcló perfectamente y se vació a los cristales ya preparados, cuidadosamente para que no se formaran burbujas. En seguida se le agregó SDS (1%) para aplanar la

MÉTODOS

superficie del gel y se dejó polimerizar. Mientras tanto se preparó el gel espaciador mezclando lo siguiente: 1.33 ml de solución A, 1.35 ml de solución D, 100 ul de solución C, 5 ul de TEMED, 7.2 ml de agua, se desgacificó y por último se le agregó 100 ul de persulfato de amonio (10%).

Cuando el primer gel polimerizó, se le quitó el SDS, se enjuagó con agua y se secó cuidadosamente para quitar el exceso. En seguida se le agregó la solución preparada para el gel espaciador, se colocó el peine (0.5 cm arriba del primer gel) y se dejó polimerizar.

Cuando el gel estuvo listo, se procedió a colocarlo en la cámara de electroforesis, la cual contenía amortiguador de corrida. Se cuidó que en la parte inferior del gel no hubiera burbujas. Se colocaron las muestras en los pocillos junto con marcadores de pesos moleculares, se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió el gel a 100V hasta que el colorante de la muestra llegó hasta la parte inferior del gel.

El gel fué colocado en un recipiente con solución para teñir y se mantuvo con muy lenta agitación durante unos 20 min. Después se sacó, se enjuagó con agua bidestilada y se le agregó solución para desteñir.

R E S U L T A D O S

Los experimentos realizados tuvieron como base tratar de diferenciar los fenotipos de las cepas con disrupciones simples al someterlas a condiciones que alteran la síntesis de proteínas, como son el crecer en presencia de inhibidores de la iniciación y la elongación (NaF y cicloheximida respectivamente) de la traducción.

4.1. TOLERANCIA A NaF

Para observar el rango de concentraciones de NaF a las que son tolerantes las cepas de S. cerevisiae W303-1B, HA1 y Y166 (1.2) utilizadas como controles y las cepas con disrupciones simples, dobles y triples (1.2.d) fueron sembradas en medio YPD-agar (2.2) complementado con diferentes concentraciones del inhibidor como se describió (Métodos 3.1). El resultado de este experimento se presenta en la **Figura 5** donde se observa que el efecto del NaF sobre el crecimiento normal de todas las cepas es inversamente proporcional a la concentración del inhibidor.

En presencia de 25 mM de NaF (concentración mínima) el crecimiento de las cepas en general no se ve afectado. Las diferencias significativas en el crecimiento de las cepas control y las cepas con disrupciones se observaron a 50 mM y 75 mM de NaF ya que a estas concentraciones la tolerancia o la inhibición es más evidente en cada una de las cepas. En presencia de 50 mM de NaF pueden distinguirse cepas notoriamente sensibles al inhibidor que son D5, D45, D67 y D567 que muestran un crecimiento apenas visible. Se puede observar también una considerable disminución en el crecimiento de las cepas D56, D57 y D457 en contraste con la obtenida en la concentración anterior. El crecimiento en 75 mM de NaF para un gran número de cepas es casi nulo, presentándose una tolerancia significativa en las cepas W303-1B, D4, D6, D7, D46 y D47.

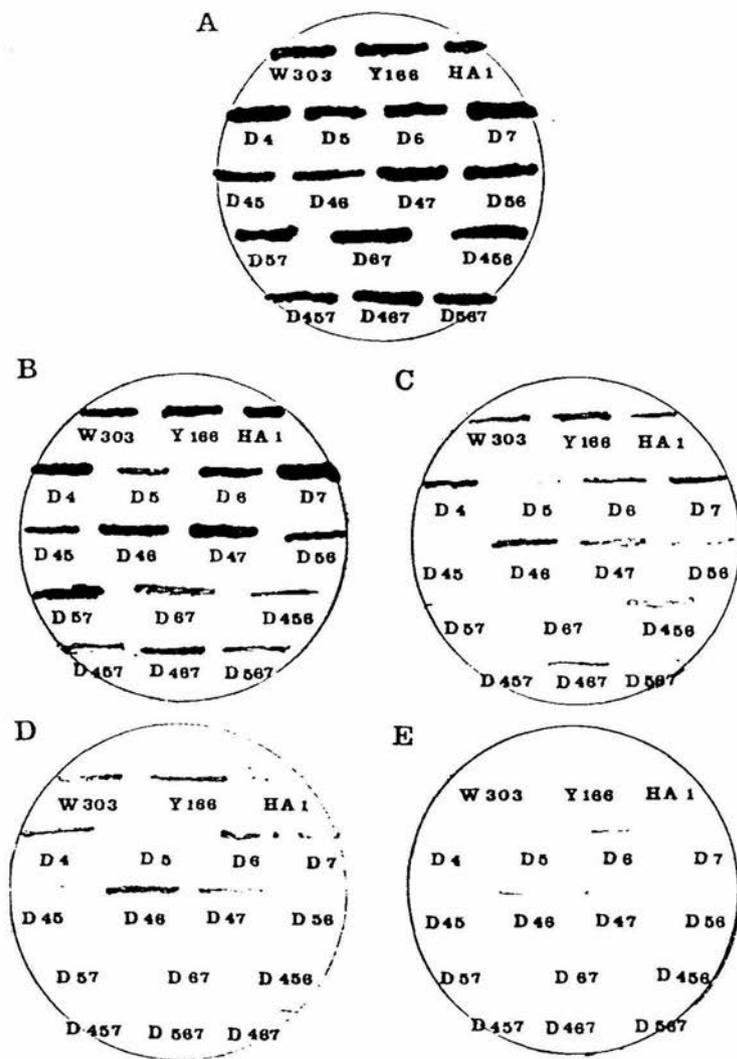


Figura 5. Crecimiento celular de la cepa W303-1B y las 14 cepas con disrupciones en cajas con medio YPD-agar con diferentes concentraciones de NaF. A = YPD-agar control; B = YPD-agar con 25 mM de NaF; C = YPD-agar con 50 mM de NaF; D = YPD-agar con 75 mM de NaF; E = YPD-agar con 100 mM de NaF.

RESULTADOS

Un comportamiento muy singular es el presentado por la cepa con disrupción simple D5. Se observa que desde la concentración mínima del inhibidor (25 mM) D5 disminuye su crecimiento de una forma notable con respecto al control obteniéndose una respuesta similar con las disrupciones dobles y triples que presentan la disrupción D5 (YP2-beta). En 75mM de NaF el crecimiento de estas cepas es nulo.

Los resultados observados en la figura 6 se normalizaron, teniendo así: + + + + = 100% en la intensidad del crecimiento para cada una de las cepas sembradas en medio YPD sin NaF (control); + + + = 75% ; + + = 50% y + = 25% según la intensidad de crecimiento relativa al control, que presentaron en las diferentes concentraciones del inhibidor a las que fueron sometidas **Tabla IV** .

En esta tabla se hace más evidente el efecto del inhibidor sobre la cepa D5 y sobre las disrupciones dobles o triples que carecen de la proteína YP2-beta. Se puede observar que desde la concentración mínima del inhibidor el comportamiento de las diferentes cepas se puede clasificar en tres categorías:

- I.- Cepas que se comportan como W303-1B (toleran hasta 75 mM de NaF) : D4, D6 y D7.
- II.- Cepas que no toleran más de 50 mM de NaF: D5, D45, D56, D57, D67, D456, D457, D467 y D567.
- III.- Cepas que toleran la concentración máxima del inhibidor (100 mM) : D46 y D47

Estos datos sugieren que para la viabilidad celular en presencia de NaF es necesaria la proteína YP2-beta.

Es importante señalar que en las cepas en las que se presentan la disrupción D5 junto con alguna otra que sea tolerante por ejemplo: D4, D6 ó D7; que toleran hasta 75 mM de NaF, el fenotipo dominante es el de D5 haciendo sensibles a estas cepas.

TABLA IV

CEPA	25 mM	50 mM	75 mM	100 mM
W303	+++	++	+	-
D4	++++	+++	++	-
D5	+	-	-	-
D6	+++	+	+	-
D7	++++	++	+	-
D45	+++	-	-	-
D46	++++	++	++	+
D47	++++	+	+	+
D56	+++	+	-	-
D57	++++	+	-	-
D67	+	-	-	-
D456	+	+	-	-
D457	++	+	-	-
D467	++	+	-	-
D567	++	-	-	-

Crecimiento celular de las diferentes cepas crecidas en presencia de diferentes concentraciones de NaF, representado como: ++++ = 100% (éste valor se basó en el crecimiento de cada una de las cepas en medio YPD sin NaF), +++ = 75%, ++ = 50% y + = 25% en la intensidad relativa de crecimiento.

RESULTADOS

En la concentración máxima 100 mM de NaF el 80% de las cepas no presentan crecimiento alguno.

4.1.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

Para observar el efecto del inhibidor sobre los tiempos de duplicación se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas con disrupciones simples y la cepa W303-1B (control) crecidas en medio YPD-líquido (2.1) complementado con diferentes concentraciones de NaF.

La Figura 6 es la representación gráfica del comportamiento presentado por estas cepas. Los resultados muestran que en medio líquido, a excepción de las cepa D5, todas las cepas crecen mejor que en medio sólido. En estas gráficas se confirman los resultados obtenidos en el experimento anterior. Se observa que al faltar la proteína ribosomal ácida YP2-beta (cepa D5) se adquiere una gran sensibilidad al inhibidor aumentando el tiempo de duplicación en la mínima concentración de NaF y no muestra crecimiento alguno en las concentraciones siguientes. Las cepas W303-1B (control), D4, D6 y D7 presentan mayor tolerancia al inhibidor aumentando sus tiempos de duplicación de forma proporcional a la concentración del inhibidor pero sin dejar de crecer aún en la concentración máxima. Estos datos se muestran en la Tabla V.

4.2 TOLERANCIA A LA CICLOHEXIMIDA

Las cepas de *S. cerevisiae* W303-1B, HAL y Y166 (1.2) utilizadas como controles y las cepas con disrupciones simples, dobles y triples (1.2.d.) fueron sembradas en medio YPD-Agar complementado con diferentes concentraciones de cicloheximida (Métodos 3.3) para observar su tolerancia a este inhibidor de la traducción.

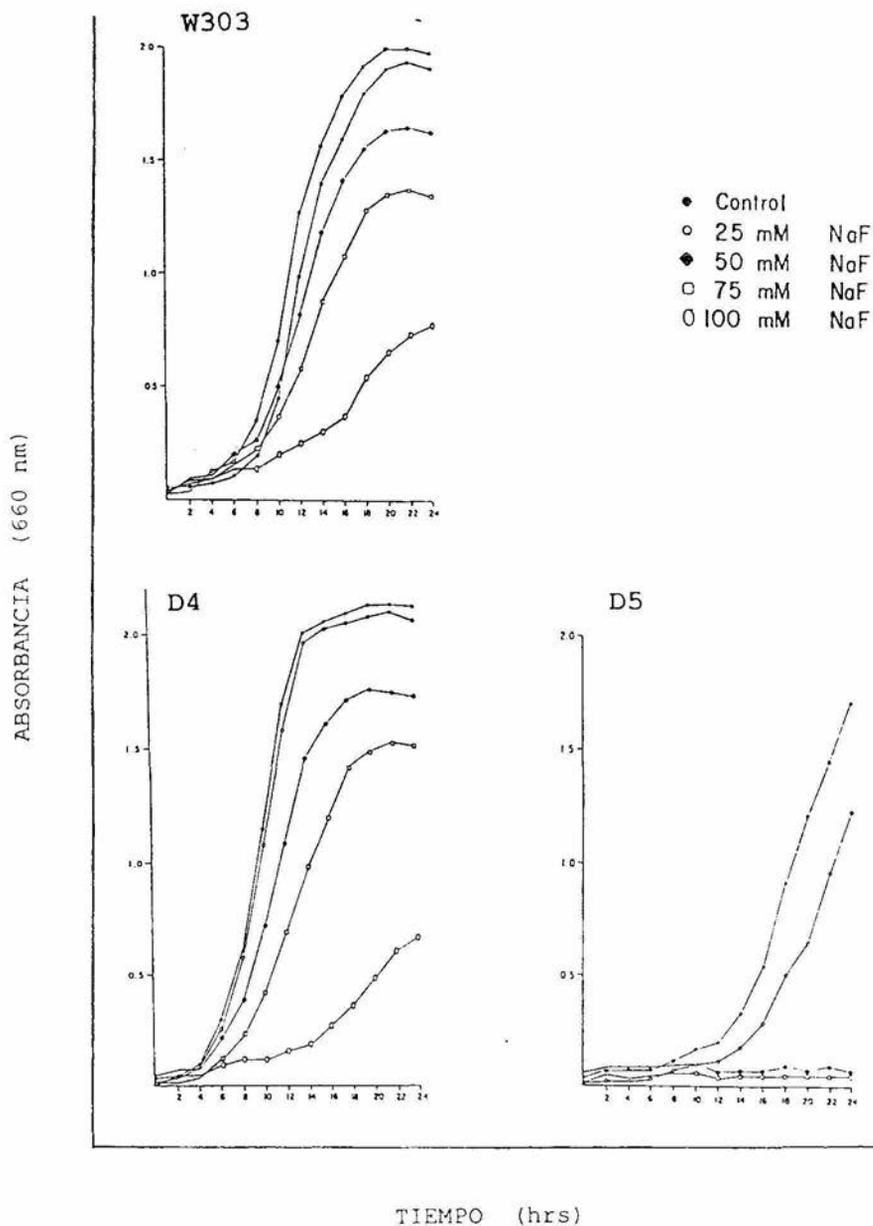


Figura 6a. Curvas de crecimiento de las cepas W303-1B, D4 y D5 en medio YPD complementado con diferentes concentraciones de NaF.

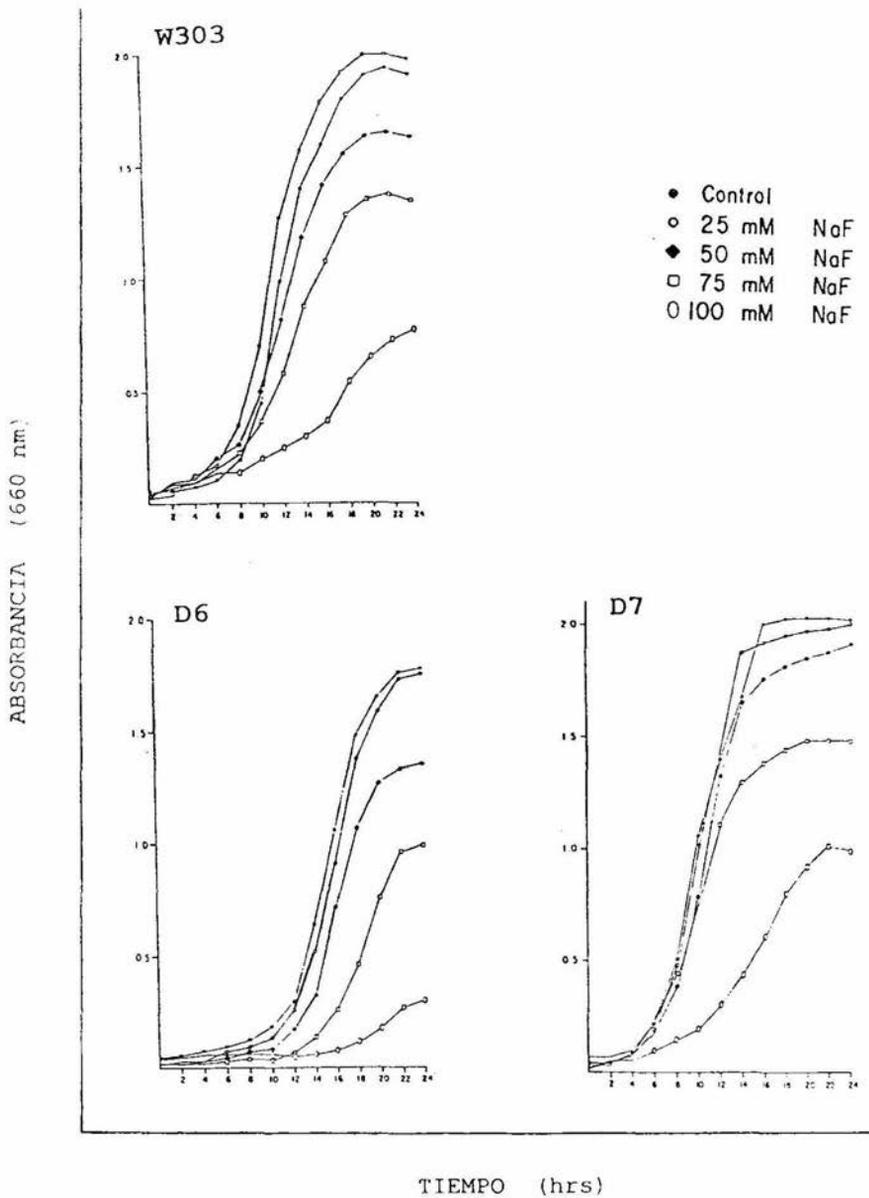


Figura 6b. Curvas de crecimiento de las cepas W303-1B, D6 y D7 en medio YPD complementado con diferentes concentraciones de NaF.

TABLA V

CEPA	CONTROL	25 mM	50mM	75 mM	100 mM
W303	4:11	3:50	4:07	4:34	5:07
D4	4:00	3:40	4:13	4:06	4:46
D5	4:34	4:51	N.D. *	N.D. *	N.D. *
D6	4:41	3:58	4:05	4:52	8:14
D7	4:06	3:05	3:48	4:57	5:02

Tiempos de duplicación de las cepas parental W303 y con disrupción simple crecidas en presencia de diferentes concentraciones de NaF.

* N.D. = No determinado.

RESULTADOS

El efecto de la cicloheximida sobre el crecimiento de todas las cepas es muy drástico. Solo las cepas D4 y D7 presentan un crecimiento normal en la mínima concentración (10 ug/ml) incluso sobre las cepas parentales crecidas en esta misma concentración. El resto de las cepas no presenta crecimiento alguno.

La cepa D4 sigue presentando un crecimiento hasta concentraciones de 30 ug/ml aunque este es inversamente proporcional a la concentración del inhibidor. En las siguientes concentraciones analizadas el crecimiento es nulo. La cepa D7 tiene un crecimiento significativo solo hasta 20 ug/ml. Estos resultados se presentan en la **Figura 7**.

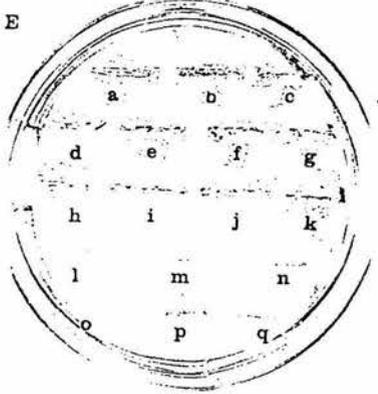
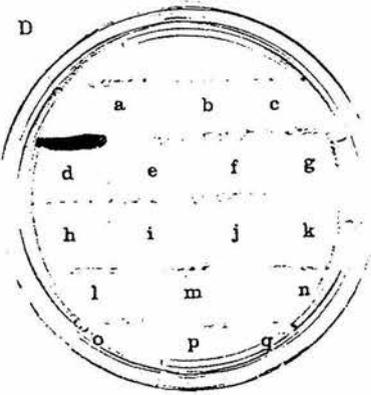
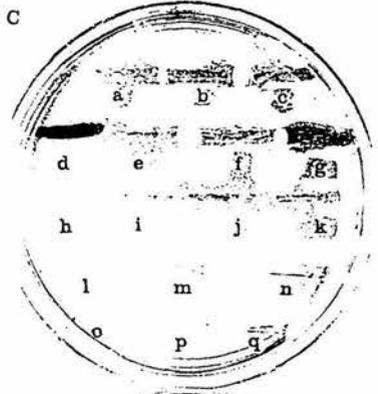
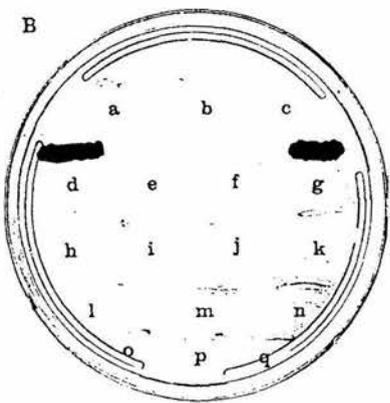
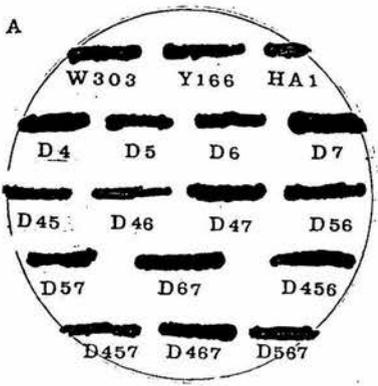
4.3 PATRONES POLISOMALES

De cada una de las cepas con disrupción simple, doble y triple se obtuvo el patrón polisomal para tratar de establecer la fase del proceso de la traducción en la que intervienen las proteínas ribosomales ácidas, utilizando cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas.

En la **Figura 8** se muestran los patrones obtenidos para la cepa W303-1B (control) y las cepas con disrupciones simples. Se observa en todos las siguientes poblaciones ribosomales: las subunidades ribosomales 40S y 60S, los ribosomas 80S y los polisomas, aunque en distintas proporciones. Un comportamiento singular es el presentado por la cepa D5 donde se distingue la presencia de un "hombro" tanto en la fracción 80S como en cada uno de los picos que conforman la fracción polisomal. Se ha demostrado que este "hombro" representa la adición de una subunidad ribosomal 40S a la que no se le une la subunidad 60S con lo que se explica la disminución en el nivel de la fracción ribosomal 80S. Este comportamiento en los patrones

Figura 7. Crecimiento celular de la cepa W303-1B y las 14 cepas con disrupciones en cajas con medio YPD-agar con diferentes concentraciones de cicloheximida (ciclo). A = YPD-agar control; B = YPD-agar con 10 ug/ml de ciclo.; C = YPD-agar con 20 ug/ml de ciclo.; D = YPD-agar con 30 ug/ml de ciclo.; E = YPD-agar con 40 ug/ml de ciclo.; F = YPD-agar con 50 ug/ml de ciclo.

a = W303-1B	d = D4	g = D7	j = D47	m = D67	p = D467
b = Y166	e = D5	h = D45	k = D56	n = D456	q = D567
c = HA1	f = D6	i = D46	l = D57	o = D457	



RESULTADOS

polisomales es llamado "halfmero" (Helser et al., 1981). Los halfmeros indican un defecto en el ensamblaje de la subunidad 60S, a nivel de la iniciación de la traducción; estos datos concuerdan con la mayor sensibilidad de la cepa D5 al NaF.

Los patrones polisomales de las cepas con disrupciones dobles se presentan en la **Figura 9** donde se observa una uniformidad en las fracciones de las subunidades 40S y 60S de cada cepa e incluso entre ellas. La fracción polisomal se muestra más relajada en cada caso significando una disminución en la velocidad de iniciación o de la elongación de traducción y se distingue una menor unión de ribosomas a la presentada por las cepas con disrupción simple.

La **Figura 10** muestra los polisomas obtenidos de las cepas con disrupciones triples donde se nota una considerable disminución de las subunidades 40 y 60S que se reflejan en los altos niveles obtenidos para la unidad ribosomal 80S. Esto se debe a que durante la traducción existe un gran acoplamiento de las subunidades ribosomales para formar así un considerable número de ribosomas simples. La fracción polisomal en estas cepas presenta una disminución en la cantidad de ribosomas unidos al mRNA indicativa de una velocidad de unión muy lenta que se refleja en su escasa formación de polisomas mostrada en la gráfica.

Los valores porcentuales correspondientes a cada una de las fracciones de los patrones polisomales de las cepas trabajadas se presentan en la **Tabla VI** donde se ven reflejados cuantitativamente los datos observados en las gráficas.

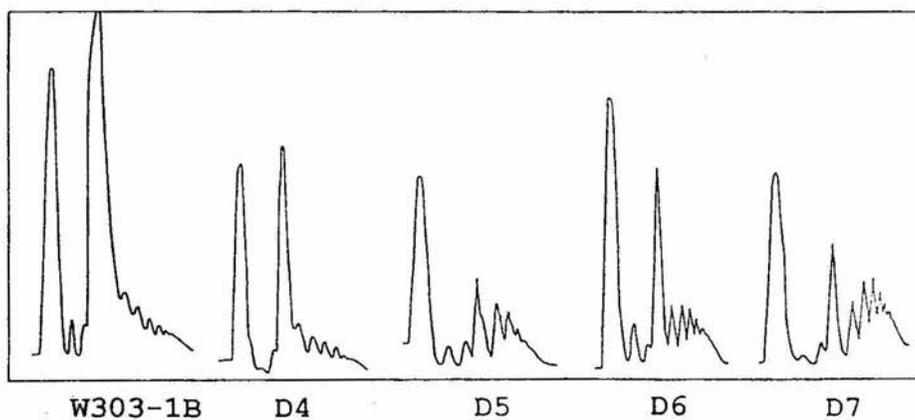


Figura 8. Patrones polisomales de la cepa W303-1B y las cepas con disrupción simple obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa.

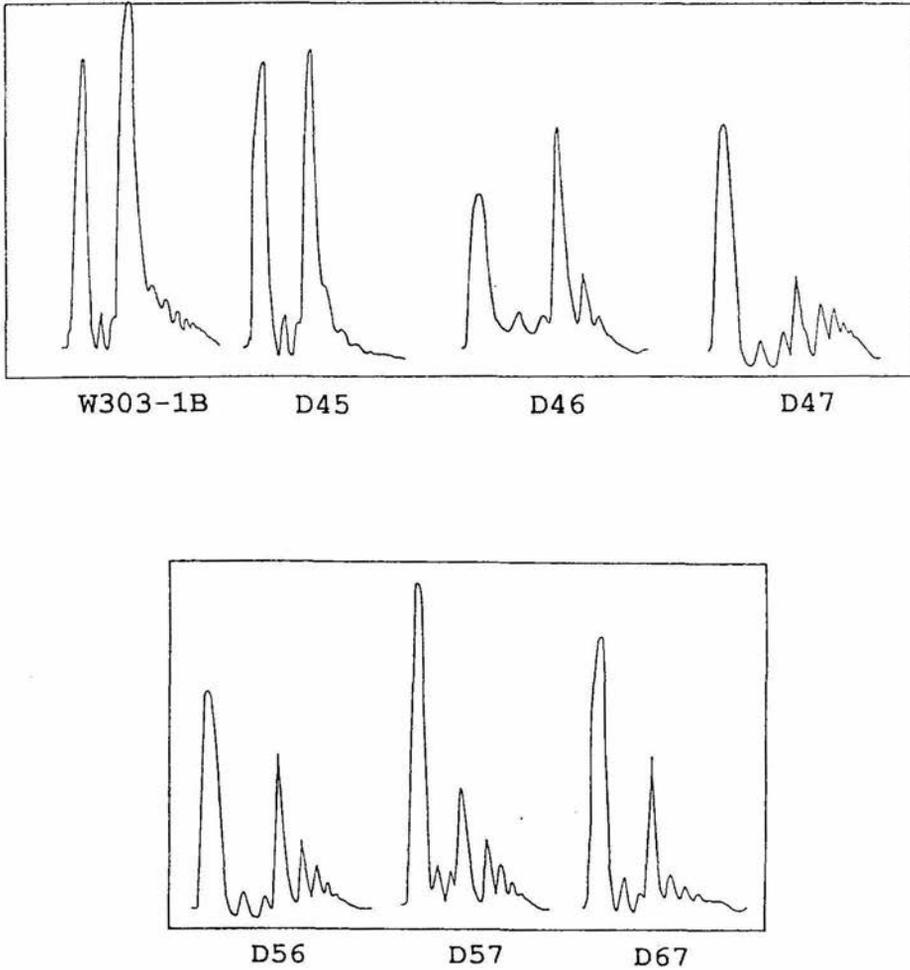


Figura 9. Patrones polisomales de la cepa W303-1B y las cepas con disrupciones dobles obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa.

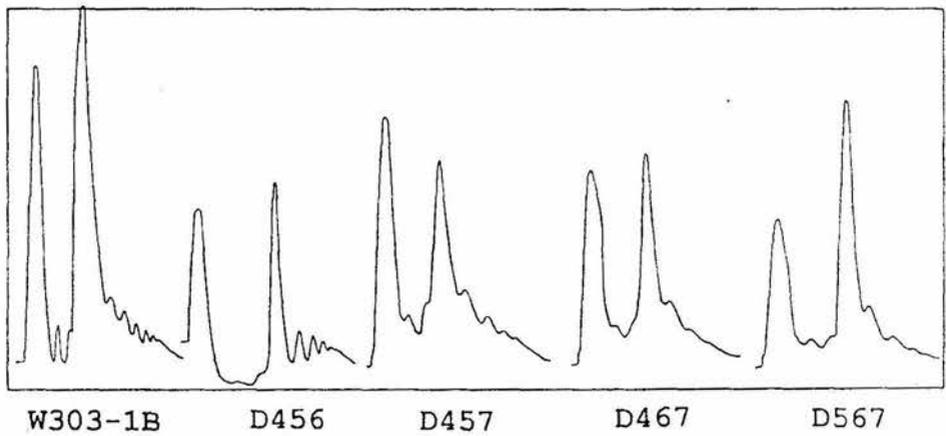


Figura 10. Patrones polisomales de la cepa W303-1B y las cepas con disrupciones triples obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa.

TABLA VI

CEPA	PATRON COMPLETO 100 %	40S %	60S %	80S %	POLISOMAS
W303	1.7	2.06	2.47	70.56	23.52
D4	0.993	0.81	2.82	53.17	40.28
D5	0.491	6.52	6.72	23.02	61.10
D6	0.670	6.27	2.54	43.28	44.78
D7	0.732	2.45	3.55	25.54	68.30
D45	1.0	4.20	3.60	72.00	20.00
D46	0.735	5.72	5.72	57.28	27.21
D47	0.662	7.25	8.00	20.39	60.42
D56	0.697	6.03	4.30	38.60	43.02
D57	0.608	6.02	5.44	27.35	58.82
D67	0.606	8.75	4.95	45.71	33.00
D456	0.657	3.81	3.81	55.71	30.44
D457	0.914	2.52	6.02	55.80	32.82
D467	0.708	1.55	6.77	64.12	28.24
D567	0.684	3.36	6.14	46.34	43.84

Valores porcentuales correspondientes a cada una de las fracciones de los patrones polisomales.

RESULTADOS

4.4 OBTENCION DE PATRONES PROTEICOS

Una posible explicación para los cambios metabólicos mostrados por las cepas con disrupción simple se pueden deber a alteraciones en los patrones de la expresión de proteínas debida a deficiencias de proteínas ribosomales ácidas.

Con el propósito de observar si existían o no cambios en la expresión de los genes estructurales en la tolerancia de estas cepas al inhibidor NaF en concentraciones de 50 y 75 mM se decidió obtener el patrón proteico de la cepa parental W303-1B y las cepas con disrupción simple D4, D5, D6 y D7.

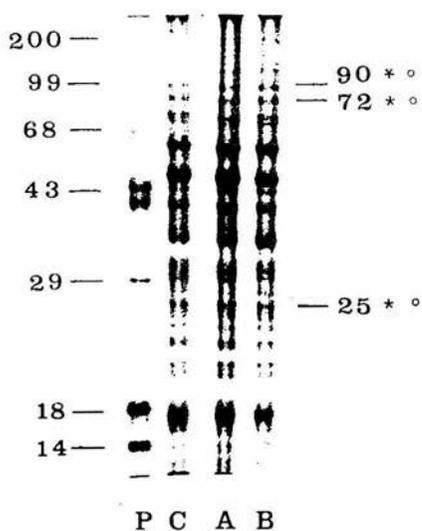
Cada cepa fue crecida en medio YPD en ausencia (control) y presencia de NaF en las concentraciones señaladas hasta su fase media logarítmica (0.6-0.8 D.O. 660nm) y se les extrajo la proteína total (Métodos 3.5). Se compararon los patrones proteicos de las diferentes cepas mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS al 15% (Métodos 3.7). En cada carril se colocaron 50ug de proteína que fueron detectadas, después de la electroforesis, mediante tinción con azul de Coomasie.

Los patrones proteicos obtenidos para la cepa W303-1B y las cepas con disrupción simple al crecer en presencia de 50 mM y 75 Mm de NaF se presentan en la **Figura 11**.

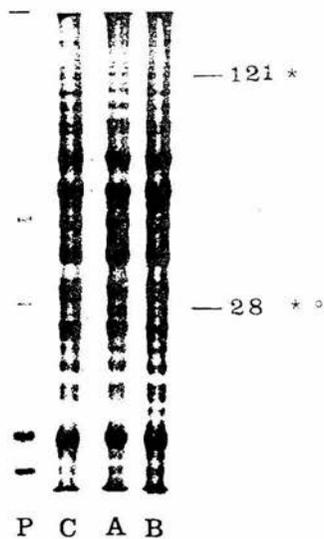
Las alteraciones proteicas se observan sólo en las cepas D4, D5 a 75 mM de NaF y D6 a 50 mM de NaF en comparación con el patrón proteico control y se pueden clasificar en 3 categorías:

Figura 11. Patrones proteicos de células crecidas en presencia y ausencia de NaF. P = Marcadores de Peso Molecular standar; C = Proteína total control; A = Proteína total de células crecidas en presencia de 75 mM de NaF; B = Proteína total de células crecidas en presencia de 50 mM de NaF. Las diferencias obtenidas con respecto al control se designaron con: * = 75 mM de NaF y o = 50 mM de NaF. Los valores están dados en kDa.

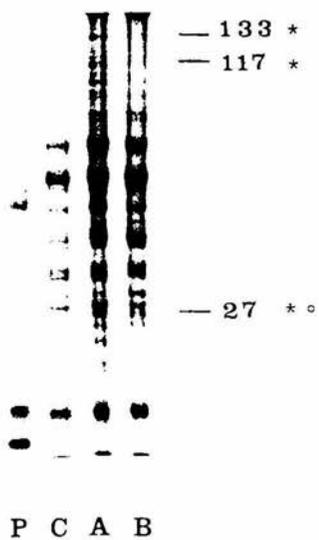
W303-1B



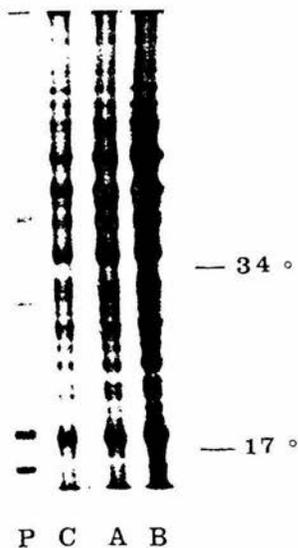
D4



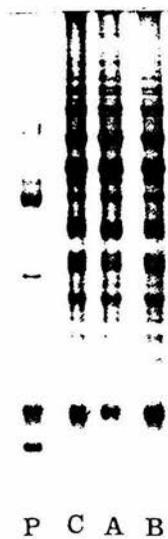
D5



D6



D7



RESULTADOS

1) La síntesis de algunas proteínas aumenta:

W303-1B .- 25, 72 y 90 kDa (50 y 75 mM de NaF).

D5.- 75 kDa (50 y 75 mM de NaF); 117 y 133 kDa (75 mM de NaF).

D6.- 17 kDa (50 mM de NaF).

2) La inducción de la síntesis de proteínas de novo:

D4.- 28 kDa (50 y 75 mM de NaF).

D6.- 34 kDa (50 mM de NaF).

3) La inhibición total de otras proteínas:

D4.- 121 kDa (75 mM de NaF).

La cepa D7 no presentan cambios en su patrón proteico al crecer en presencia del inhibidor en las dos concentraciones trabajadas. Estas observaciones se resumen en la **Tabla VII**.

TABLA VII

BANDAS (kDa)	C E P A S									
	W303-1B		D4		D5		D6		D7	
	50mM	75mM	50mM	75mM	50mM	75mM	50mM	75mM	50mM	75mM
17							↑			
25	↑	↑								
27					↑	↑				
28			+	+						
34							+			
72	↑	↑								
90	↑	↑								
117						↑				
121				--						
133						↑				

Cambios en los patrones de proteína celular total extraída de las cepas W303-1B y con disrupción simple crecidas en presencia de 50 y 75 mM de NaF. ↑ = incremento en la intensidad de la banda; + = síntesis de novo; -- = ausencia.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los experimentos realizados tuvieron como base tratar de diferenciar los fenotipos de las cepas con disrupciones en los genes que codifican para las proteínas ribosomales ácidas al someterlas a condiciones que alteran la síntesis de proteínas, como son el crecer en presencia de inhibidores de la iniciación y la elongación (NaF y cicloheximida respectivamente) de la traducción.

De los efectos del NaF observados en células de mamífero y sistemas libres de células se ha concluido que la iniciación del proceso de la traducción es inhibido, causando disociación polisomal y la acumulación de ribosomas y subunidades ribosomales (Marks et al., 1955; Colombo et al., 1968; Hogan, B. 1969 y Bishop, J. 1986). El complejo de iniciación con la subunidad ribosomal 40S parece formarse normalmente en presencia de NaF, por lo que se ha propuesto que este componente previene las subsecuentes uniones de la subunidad 60S al complejo (Lebleu et al., 1970; Hoertz, W. y McCarty, K., 1970). Esta propuesta ha sido confirmada en experimentos adicionales con KF, el cual parece tener efectos similares al NaF (O' Rourke, J. y Godchaux, W., 1975).

En cultivos de *S. cerevisiae* crecidos hasta la fase exponencial (D.O.= 1.0) tratados con una concentración de 50 mM de NaF por tres horas, se encontró que el crecimiento celular no se detenía totalmente después del tratamiento; sin embargo, la cantidad de proteínas ácidas presentó un incremento substancial en las partículas ribosomales y disminuyó en el citoplasma además, se observaron importantes diferencias en la producción de ribosomas, la cual fue notablemente menor en las células tratadas con respecto al control (0.05% y 0.17% respectivamente), (Saenz-Robles et al., 1990).

DISCUSION

En este trabajo se observa por primera vez el efecto del NaF sobre cepas que carecen de una o más proteínas ribosomales ácidas (disrupciones simples, dobles ó triples) crecidas en medio sólido (**Figura 5**). Los resultados obtenidos sugieren que es necesaria la presencia de la proteína YP2-beta para la viabilidad de la célula, ya que las cepas que presentan la disrupción en el gen que codifica para esta proteína (D5) adquieren una gran sensibilidad al NaF desde la mínima concentración que se trabajó. Este resultado se confirma con el hecho de que las cepas que presentan mayor tolerancia al inhibidor en sus más altas concentraciones (75 mM y 100 mM) si presentan activo el gen de la proteína YP2-beta (**Tabla IV**).

Es importante señalar que en las disrupciones dobles y triples en que se presenta la disrupción D5 ésta ejerce un efecto de epistasia sobre las otras disrupciones confiriéndole a la cepa un fenotipo de sensibilidad al inhibidor.

Una observación interesante es la diferencia en el crecimiento de las cepas entre el medio sólido y el medio líquido. Todas ellas, con excepción de D5, crecen mejor en medio líquido presentando, incluso, crecimiento en la máxima concentración (100 mM) (**Figura 6**). De acuerdo a Hellerbust (Hellerbust, 1976), esto se puede deber a que las levaduras en soporte sólido no son capaces de regular eficientemente sus sistemas de transporte de electrolitos, por lo que el crecimiento en medio sólido es más bajo.

En las cinéticas de crecimiento realizadas para observar el efecto en los tiempos de duplicación de las cepas con disrupción simple nuevamente se observa que la cepa que carece de la proteína YP2-beta (D5) presenta una gran sensibilidad al NaF; reflejándose ésta, en el mayor tiempo de duplicación calculado a la mínima concentración y siendo para esta cepa el único valor posible de calcular (**Tabla V**).

DISCUSION

A las concentraciones mayores del NaF 75 y 100 mM las cepas muestran un aumento considerable en el tiempo de la fase lag, una inhibición aparente de crecimiento que se confirma con los tiempos de duplicación calculados para cada una de las cepas (Tabla V) y una disminución en la densidad final de la población en la fase estacionaria en relación directa a la concentración creciente del inhibidor presente en el medio de cultivo (Figura 6). El hecho de que no se alcance una misma densidad poblacional en cultivos crecidos a diferentes concentraciones de NaF puede deberse a que las levaduras podrían estar ocupando la energía destinada a su crecimiento y duplicación para su mantenimiento en condiciones adversas a las normales, lo que conduce a un menor rendimiento de biomasa.

El crecimiento en presencia de cicloheximida, es la segunda condición que se estudió en el presente trabajo.

La cicloheximida ha sido descrita como un inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucariotas (Kerridge, D. 1958) y en sistemas libres de células (Felicetti et al., 1966; Siegel y Sisler, 1963). Se ha comprobado que el sitio de acción del antibiótico es el ribosoma donde inhibe la elongación de la cadena polipeptídica en un rango de concentraciones muy amplio (Battaner y Vázquez, 1971).

En 1976 Cooper, sugirió que la iniciación de la síntesis de proteínas en levaduras puede ser inhibida por bajas concentraciones de cicloheximida (10 ug/ml) las cuales no afectan significativamente la elongación de la cadena polipeptídica que, para su inhibición requiere de niveles del antibiótico más altos (200 ug/ml).

DISCUSION

Aunado a lo propuesto por Cooper, Oleinick (Oleinick, N. 1977) midió: a) la incorporación de metionina marcada en el N-terminal y en posiciones internas de la cadena de péptido naciente y b) determinando la distribución de los polisomas en presencia de un amplio rango de concentraciones de cicloheximida concluye que la combinación de estas técnicas confirma que las tres fases de las síntesis de proteínas (la iniciación, la elongación y la terminación) son susceptibles a la inhibición por cicloheximida y que a bajas concentraciones la iniciación es la fase más sensible.

Debido a que la acción de la cicloheximida es dependiente de la concentración (Siegel, M. y Sisler, H. 1963) en este trabajo se analizó el efecto de este antibiótico en un rango de concentración de 10 ug/ml a 100 ug/ml sobre cepas que carecen de una ó más proteínas ribosomales ácidas crecidas en medio sólido.

Los resultados obtenidos (Figura7) muestran que el efecto del inhibidor es drástico desde la mínima concentración utilizada (10 ug/ml) en la que sólo las cepas D4 (-YP2 alfa) y D7 (-YP1 alfa) presentan un crecimiento normal incluso sobre la cepa parental W303-1B que no presenta crecimiento alguno. Esta tolerancia se sigue manifestando para la cepa D4 hasta una concentración de 30 ug/ml y para la cepa D7 en una concentración de 20 ug/ml. Estos datos sugieren que la ausencia de las proteínas YP2-alfa y YP1-alfa le confieren a las cepas D4 y D7 respectivamente un fenotipo de resistencia al antibiótico.

Estudiando el mecanismo de acción de la cicloheximida en la inhibición de la síntesis de proteínas en un sistema libre de células preparado de hígado de rata, Baliga (Baliga et al., 1969) demostró que altas concentraciones de componentes sulfhidrilos previenen la inhibición de la síntesis de proteínas en sistemas libres de células

DISCUSION

causada por la estreptovitacina 'A, antibiótico relacionado estructuralmente con la cicloheximida y no actúan sobre la emetina o la esparsomicina que también inhiben la elongación de la síntesis de proteínas, sugiriendo que, aunque ejercen una acción análoga a la cicloheximida su vía de acción es diferente. Concluye que la acción inhibitoria de este antibiótico en la elongación de la cadena polipeptídica envuelve la inactivación de la transferasa II (EF-2), enzima que requiere de grupos sulfhidrilos. También determinó que la cicloheximida inhibe la hidrólisis del GTP en la misma proporción que la transferencia de aminoacil-tRNAs.

Considerando que: a) la extracción de las proteínas ribosomales ácidas de S. cerevisiae afecta sensiblemente la capacidad de hidrólisis del GTP y la fijación de GDP dependientes ambas del factor de elongación eEF-2 (Sánchez-Madrid, 1981), b) el efecto de la cicloheximida sobre estos mecanismos aunado a c) el hecho de que las cepas objeto de estudio de este trabajo, carecen de una o más proteínas ribosomales ácidas se puede sugerir, de acuerdo con los resultados obtenidos, la existencia de una relación entre la ausencia de las proteínas YP2-alfa y YP1-alfa (cepas D4 y D7 respectivamente) y la tolerancia a la cicloheximida en concentraciones de 10, 20 y 30 ug/ml presentada por estas cepas.

Es importante señalar que en las cepas con disrupciones dobles y triples en las que se presentan las disrupciones D4 y D7 éstas no ejercen un efecto epistático por lo que dichas cepas no presentan un fenotipo de resistencia al inhibidor.

Para tratar de establecer la fase del proceso de traducción en la que intervienen las proteínas ribosomales ácidas se analizó el patrón polisomal de la cepa parental W303-1B y el presentado por las cepas con disrupciones simples, dobles y triples en los genes que codifican para éstas proteínas.

DISCUSION

En 1969, Baliga sugiere que la acción de la cicloheximida en la agregación de polisomas difiere de su efecto en la elongación de la cadena polipeptídica ya que en esta la acción del antibiótico parece estar dirigida contra la aminoacil transferasa II y puede ser prevenida por altas concentraciones de componentes sulfhidrilo mientras que su acción inhibitoria en la agregación de polisomas no se interrumpe con el incremento de estos componentes en el medio. Además, mostró que estos mecanismos son inhibidos por diferentes concentraciones del antibiótico siendo necesaria 10 a la 4 veces más cantidad de la droga para inhibir la elongación que la requerida para prevenir la agregación de polisomas.

Bajo condiciones específicas de tratamiento con cicloheximida en *S. cerevisiae* Helser (Helser et al., 1981) detectó y caracterizó un tipo único de poliribosomas llamado halfmero; éste es un polirribosoma o monosoma en el cual está unido una subunidad ribosomal 40S adicional, presumiblemente en forma de un complejo de iniciación. Determinó que los halfmeros son producidos en mayor número en concentraciones de 10 ug/ml del antibiótico aunque utilizando concentraciones superiores (100 ug/ml) también se presentan. Concluye que los halfmeros son un aparente producto de la inhibición de la unión de la subunidad 60S a el complejo de iniciación en la subunidad 40S inducida por la cicloheximida a concentraciones de 10 ug/ml.

Resultados similares a los obtenidos por Helser se presentan en este trabajo específicamente para la cepa D5 (-YP2 beta) en la que también se observa el halfmero (Figura 8). Como ya se ha descrito, este perfil polisomal indica un defecto en el ensamblaje de la subunidad 60S a nivel de la iniciación de la traducción ; estos datos concuerdan con la gran sensibilidad mostrada por la cepa D5 al inhibidor de la iniciación NaF (Tabla IV) apoyando la hipótesis de

DISCUSION

que la proteína YP2-beta participa en la fase de iniciación en el proceso de traducción.

Al estudiar a las proteínas ribosomales ácidas como reguladoras de la actividad ribosomal, Saenz-Robles (Saenz-Robles et al., 1990) encontró que las partículas involucradas activamente en la síntesis de proteínas (polisomas) contienen una cantidad considerablemente mayor de proteínas ácidas que la presente en ribosomas libres (30% más moléculas/ribosoma) determinando un papel activo de estas proteínas durante la función de la partícula ribosomal.

De acuerdo a estos datos y a los reportados por Remacha en 1995 referentes al aumento en los tiempos de duplicación en forma directa al aumento en la disrupción de genes que codifican para las proteínas ribosomales ácidas (simples, dobles, triples y cuádruples), el efecto de la ausencia de las proteínas ácidas se puede relacionar con una reducida eficiencia en la maquinaria de síntesis de proteínas. Esto concuerda con los patrones polisomales obtenidos para las cepas con disrupciones dobles y triples **Figuras 9 y 10** en donde se observa una disminución en la cantidad de ribosomas unidos al mRNA siendo más evidente en las disrupciones triples, sugiriendo, una disminución en la velocidad de iniciación o de elongación de la traducción en forma directa a la ausencia de una o más proteínas ribosomales ácidas.

Una posible explicación para los cambios metabólicos mostrados por las cepas con disrupciones puede ser el que se presenten alteraciones en el patrón de la expresión de proteínas debida a la deficiencia en proteínas ribosomales ácidas.

En 1995 Remacha demostró que las proteínas ribosomales ácidas no son requeridas para la viabilidad celular pero si regulan el patron de expresión de proteínas de cepas de *S. cerevisiae* que carecen de

DISCUSION

tres y cuatro genes que codifican para éstas proteínas. Al estudiar estas cepas "in vivo" así como sistemas de traducción libres de células obtenidos de las mismas observó que un número de proteínas traducidas por las células de la cepa parental están ausentes o dramáticamente reducidas en el patrón de proteínas expresado en las cepas con disrupciones y que estas cepas expresan algunas proteínas que no se observan en el patrón de proteínas de la cepa parental. La recuperación de estos efectos por la adición exógena de proteínas ribosomales ácidas a extractos de células mutantes confirma que dichos efectos son causados por la ausencia de estos componentes del ribosoma y, por lo tanto, que la ausencia de las proteínas ácidas es capaz de afectar positiva ó negativamente la traducción de diferentes mRNAs.

Las alteraciones observadas en los patrones proteicos de las cepas con disrupción simple crecidas a 50 mM y 74 mM de NaF obtenidos en este trabajo pueden ser producto de una combinación de los efectos del inhibidor y la ausencia de las proteínas ribosomales ácidas y, probablemente, puedan explicar la respuesta fenotípica de sensibilidad o tolerancia mostrada por estas cepas al crecer en presencia de NaF. Los cambios presentados en el patrón de expresión (incremento en la síntesis de algunas proteínas, síntesis de novo y desaparición de otras) de las cepas W303-1B, D4, D5 y D6 concuerda con la hipótesis de que la presencia de las proteínas ácidas puede, de alguna forma, reprimir la traducción de algunos mRNAs (Remacha et al., 1995).

Evidencias experimentales soportan el papel de la subunidad 60S en el control de la iniciación de la traducción (Sach et al., 1989) y la ausencia de las proteínas ácidas puede afectar su función haciendo que ésta dependa de alguna característica estructural específica del mRNA. Además se puede considerar un papel de las proteínas ácidas en

DISCUSION

la fase de iniciación de la síntesis de proteínas ya que previamente se ha reportado una dependencia en la actividad de los factores de iniciación de las proteínas L7 y L12 en sistemas bacterianos "in vitro" (Fakunding, J. et al., 1973; Kay, A. et al., 1973).

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

- La ausencia de la proteína YP2-beta (D5) le confiere a las cepas simples, dobles y triples que presentan la disrupción en el gen que la codifica un fenotipo de sensibilidad al inhibidor NaF ya que su crecimiento disminuye desde la mínima concentración que se trabajó.

- La disrupción en el gen de la proteína YP2-beta ejerce un efecto epistático sobre otras disrupciones haciendo fenotípicamente sensibles al NaF a las cepas dobles y triples en que se presenta.

- La ausencia de las proteínas YP2-alfa y YP1-alfa le confieren a las cepas D4 y D7 respectivamente un fenotipo de resistencia a la cicloheximida en concentraciones de 10 a 30 ug/ml.

- La disrupción en los genes que codifican para las proteínas YP2-alfa y YP1-alfa no ejerce un efecto epistático en las cepas dobles y triples en las que se presentan por lo que dichas cepas no son resistentes a la cicloheximida.

- La presencia de "halfmeros" en el patrón polisomal obtenido para la cepa D5 indican un defecto en el ensamblaje de la subunidad 60S a nivel de la iniciación de la traducción aunado a la gran sensibilidad al NaF mostrada por esta cepa sugieren que la proteína YP2-beta participa en la fase de iniciación del proceso de traducción.

- La disminución en la cantidad de ribosomas unidos al mRNA observada en los patrones polisomales obtenidos de las cepas con disrupciones dobles y triples sugiere una disminución en la velocidad de iniciación o de elongación de la traducción en forma directa a la ausencia de una o más proteínas ribosomales ácidas.

CONCLUSIONES

- Las alteraciones mostradas en los patrones proteicos de las células crecidas en 50 y 75 mM de NaF, indican que las proteínas ribosomales ácidas regulan la expresión diferencial de proteínas.

- Todo lo anterior indica que las proteínas "P" de *S. cerevisiae* además de actuar en el proceso de la traducción, también pueden ser moduladoras de la actividad del ribosoma o de la traducción misma.

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

Baliga, B.S.; Pronczuk, A.W. and Munro, H.N. (1969). "Mechanims of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver". J. Biol. Chem. 244 (16), 4480-4489.

Ballesta, J.P.G.; Remacha, M.; Naranda, T.; Santos, C.; Bermejo, B.; Jimenez-Diaz, A. and Ortiz, B.L. (1993). "The acidic ribosomal proteins and the contol of proteins synthesis in yeast". EN "Protein synthesis and targeting in yeast". ED. M.F. Tuite, J.E.G. MacCarthy A.J.P. Brown ans F. Sherman. Springer-Verlang Berlin, Heidelberg. 67-80.

Battaner, E. and Vázquez, D. (1971). "Inhibitors of protein synthesis by ribosomes of the 80S type". Biochim. Biophys. Acta. 154, 316-330.

Beltrame, M. and Bianchi, M. Z. (1987). Sequence of the cDNA for one acidic ribosomal protein of *Schizossacharomyces pombe*. Nucleic. Acids. Res. 15, 9089.

Beltrame, M; Bianchi, M. Z. (1990). "A gene family for acidic ribosomal proteins in *Schizossocharomyces pombe*. Two essetial and two nonessential genes". Mol. Cell Biol. 10, 2341-2348.

Bielka, H. (1982). "The eukaryotiç ribosome". Springer Verlag, Berlin. 76-80.

Bishop, J.O. (1968). "Effect of puromycin and sodium fluoride on reticulocyte ribosomal monomers and subribosomal particles". Arch. Biochem. Biophys. 125, 449-451.

Brot, N. and Weissbach, H. (1981). "Chemistry and biology of *E. coli* ribosomal protein L12". Mol. Cell Biochem. 36, 47-63.

BIBLIOGRAFIA

- Boublick, M.; Visentin, L.P.; Weissbach H. and Brot. N. (1979). "Conformation and biological activity of acidic ribosomal proteins from different organisms". Arch. Bioch. Biophys. 193, 53-59.
- Colombo, B.; Vesco, C. and Baglioni, C. (1968). "The role of ribosomal subunits in protein synthesis in mammalian cells". Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 651-658.
- Cox, R.A. and Greewell, P. (1976). "Reassembly of the peptidyl-transferase centre of larger subparticles of rabbit reticulocyte ribosomes from a core-particle and split-protein". Biochem. J. 160, 533-546.
- Escobar, E. (Tesis de Licenciatura, 1990). "Estudio de las fosfoproteínas ribosomales ácidas de la levadura *S. cerevisiae*". Universidad Nacional Autónoma de México. E.N.E.P. Iztacala.
- Fakunding, J. ; Traut, R. and Hershey, J. (1973). "Dependence of initiation factor IF-2 activity on proteins L7 and L12 from *E. coli* 50S ribosomes". J. Biol. Chem. 248, 8555-8559.
- Felicetti, L.; Colombo, B. and Baglioni, C. (1966). "Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics. II. The site of action of cycloheximide, streptovitacin A and pactomycin". Biochim. Biophys. Acta. 119, 120-129.
- Frank, A.; Radermacher, M. and Wagenknecht, T. (1990). "Morphologies of eubacterial and eukaryotic ribosomes as determined by three dimensional electron microscopy". Ribosome: Structure, function and evolution (Ed. W:E:Hill; Dahlberg, A.; Garrett, A. and Warner, J.) American Soc. Microbiol. Washinton D.C. 107-113.

BIBLIOGRAFIA

Gudkov, A.T. and Belhke, J. (1978). "The N-terminal sequence of protein L7/L12 is responsible for its dimerization". Eur. J. Biochem. 90, 309-312.

Hardesty, B. and Kramer, G. (1985). "Structure, function and genetics of ribosomes". Springer-Verlag. Berlin.

Helser, T.L.; Baan, A.R. and Dahlberg, A.E. (1981). "Characterization of a 40S ribosomal subunit complex in polyribosomes of S. cerevisiae treated with cicloheximide". Mol. Cell. Biol. 1, (1) 51-57.

Hershey, J.W.B. (1991). "Comparison of prokaryotic and eukaryotic translation". In Translation in eukaryotes" (Ed.H.Trachsel), CPR Press, Boca Raton, Florida. 353-374.

Highland, J.H. and Howard, G.A. (1975). "Assembly of ribosomal proteins L7, L10, L11 and L12 on the 50S subunit of Escherichia coli". J. Biol. Chem. 250, 831-834.

Hoerz, W. and McCarty, K.S. (1970). "Initiation of protein synthesis in a rabbit reticulocyte lysate system". Biochim. Biophys. Acta. 228 526-535.

Hogan, B. L. (1969). "The effect of inhibitors of protein synthesis on the level of ribosomal subunits in ascites cells". Biochim. Biophys. Acta. 182, 264-266.

Howard, G.A.; Smith, R.L. and Gordon, J. (1976). "Chicken liver ribosomes: characterization of cross-reaction and inhibition of some functions by antibodies prepared against E. coli ribosomal proteins L7 and L12". J. Mol. Biol. 106, 623-637.

BIBLIOGRAFIA

Isono, S. and Isono, K. (1981). " Ribosomal protein modification in Escherichia coli III. Studies of mutants lacking an acetylase specific for protein L12 ". Mol. Gen. Genet. 183, 437-477.

Kaltschmidt, E. and Wittmann, H.G. (1980). "Ribosomal proteins VII. Two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins". Anal. Biochem. 36, 401-412.

Kar, E.G. and Auene, K.C. (1981). "Solution behavior of proteins L7/L12 from the 50S ribosome subunit of Escherichia coli". Biochemistry. 20, 4638-4646.

Kay, A.; Sander, G. and Grunmerg-Manago, M. (1973). "Effect of ribosomal protein L12 upon initiation factor IF-2 activities". Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 979-986.

Kirsebom, L.A. and Isaksson, L.A. (1985). " Involvement of ribosomal proteins L7/L12 in control of translational accuracy ". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 717-721.

Kruiswijk, T. and Planta R.J. (1975). "Further analysis of the protein composition of yeast ribosomes". FEBS Lett. 58, 102-105.

Kruiswijk, T.; De Hey, J.T. and Planta, R.J. (1978). " Modification of yeast ribosomal proteins phosphorylation ". Biochem. J. 175, 213-219.

Lavergne, J.P.; Conquet, F.; Rebould, J.P. and Reboud, A.M. (1987). "Role of acidic phosphoproteins in the partial reconstitution of the active 60S ribosomal subunit". FEBS Lett. 216: 83-88.

BIBLIOGRAFTA

Lavergne, J.P.; Reboud, A.M.; Sontang, B; Guillot, D. and Rebout, J.P. (1992). "Binding of GDP to a ribosomal protein after elongation factor-2 dependent GTP hydrolysis". *Biochem. Biophys. Acta.* 1132, 284-289.

Lebleu, B.; Marbaix, G.; Werenne, J.; Burny, A. and Huez, G. (1970). "Effect of aurintricarboxylic acid and of NaF on the binding of globin messenger RNA to reticulocytes 40S ribosomal subunits". *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 40, 731-739.

Lewin, B. (1990). "The ribosome translation factory". *Genes* 4a. Edition. Cell. Press, Cambridge, Mass and Oxford University Press, New York. 156-170.

Liljas, A. (1982). "Structural studies of ribosomes". *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 40, 161-228.

Liljas, A. (1991). "Comparative biochemistry and biophysics of ribosomal proteins". *Int. Rev. Cytol.* 124, 103-136.

Lin, A; Wittmann-Leibold, B; McNally, J. and Wool, I. (1982). "The primary structure of acidic phosphoprotein P2 from rat liver 60S ribosomal subunits". *J. Biol. Chem.* 257, 9189-9197.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Rondall, R.J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Maassen, J. and Moller, W. (1981). "Photochemical cross-linking of elongation factors G to 70S ribosomes from *E. coli* by 4-(6-formyl-3-azidophenoxil) butyrimidate". *Eur. J. Biochem.* 115, 279-285.

BIBLIOGRAFIA

Maassen, J.; Brands, J. H.; and Moller, W. (1985). "Molecular cloning and analysis of cDNA sequence for two ribosomal proteins from *Artemia*". *Eur. J. Biochem.* 149, 609-616.

MacConell, W.P. and Kaplan, N.O. (1982). "The activity of the acidic phosphoproteins from the 80S rat liver ribosome". *J. Biol. Chem.* 257: 5359-5366.

Marks, P.A.; Burka, E.R.; Conconi, F. and Perl, W. (1965). "Polyribosomes dissociation and formation in intact reticulocytes with conservation of messenger ribonucleic acid". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53, 1437-1443.

Marquis, O.M.; Fahnestock, S.R.; Henderson, E.; Woo, A.R. and Lake, J.A. (1981). "The L7/L12 stalk, a conserved feature of the prokaryotic ribosome is attached to the large subunit through its N-terminus". *J. Mol. Biol.* 150, 121-132.

Matheson, A.T.; Moller, W.; Amons, R. and Yaguchi, M. (1980). "Comparative studies on the structure of ribosomal proteins, with emphasis on the alanine-rich acidic ribosomal "A" proteins". *Ribosomes, structure, function and genetics* (Ed. Chambliss, G.; Craven G.; Davies, J.; Kahan, L. and Nomura, M.). University Park Press, Baltimore. 297-332.

Merrick, W. C. (1992). "Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis". *Micro. Rev.* 56: 291-315.

Michel, S.; Traut, R. and Lee. (1993). "Yeast ribosomal proteins: electrophoretic analysis in four two dimensional gel systems; correlation of nomenclatures". *Mol. Gen. Genet.* 191, 251-256.

BIBLIOGRAFIA

Mitsui, K.; Nakagawa, T. and Tsurugi, K. (1988). "On the size and the role of a free cytosolic pool of acidic ribosomal proteins in yeast *S. cerevisiae*". J. Biochem. 104, 908-911.

Mitsui, K. and Tsurugi, K. (1988a). cDNA and deduced amino acid sequence of acidic ribosomal protein A1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Nuc. Acids. Res. 16, 3574.

Mitsui, K. and Tsurugi, K. (1988b). cDNA and deduced amino acid sequence of acidic protein A2 from *Saccharomyces cerevisiae*. Nuc. Acid. Res. 16, 3575.

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. 101, 1001-1006.

Moller, W.; Castelan, H. and Terhorst C. (1970). "Characterization of an acidic protein in 50S ribosomes of *E. coli*". FEBS. Lett. 8, 192-196.

Moller, W.; Groene, A.; Terhorst, C. and Amos, R. (1972). "50S ribosomal proteins: Purification and partial characterization of two acidic proteins A1 and A2 isolated from 50S ribosomes of *Escherichia coli*". Eur. J. Biochem. 25, 5-12.

Moller, W.; Scherier, P.I.; Maasen, J. A.; Zantema, A. and Mellema, J.E. (1983). "Ribosomal proteins L7/L12 of *Escherichia coli*. Localization and possible molecular mechanism of translation". J. Mol. Biol. 152, 397-412.

BIBLIOGRAFIA

Moller, W. and Maassen, J.A. (1986). " On the structure, function and dynamics of L7/L12 from E. coli ribosomes ". In Structure, function and genetics of ribosomes. (Ed. Hardesty and G. Kramer) Springer-Verlang, New York. 309-325.

Moller, W. (1991). " Functional aspects of ribosomal proteins ". Biochimie. 73, 1093-1100.

Myers, A.M.; Tzagoloff, A.; Kinney, D.M. and Lusty, C.J. (1986). " Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of Lac Z fusions". Gene 45, 299-310.

Naranda, T. and Ballesta, J.P. (1991). "Phosphorylation of acidic proteins control the activity of the ribosome". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 10563-10567.

Naranda, T.; Ballesta, J.P. and Remacha, M. (1993). " The activity-controlling phosphorylation site is not the same in the four acidic ribosomal proteins from S. cerevisiae". J. Biol. Chem. 268, 2451-2457.

Newton, C.; Yee, J., Shimmin, L. and 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 ribosome ". Eur. J. Bacteriol. 172, 579-598.

Nygaard, O. and Nilson, L. (1990). "Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis". Eur. J. Biochem. 191, 1-17.

Nomura, M. and Enback, F. (1972). "Expression of ribosomal protein genes as analyzed by bacteriophage Mu induced mutation". Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1526.

BIBLIOGRAFIA

- Nomura, M. (1975). "Specialized transducing phages for ribosomal proteins genes *E. coli*". Proc. Nat. Acad.Sci. 72, 1-6.
- Nomura, M.; Yates, J.L. and Arfsten, A.E. (1980). "In vitro expression of *E. coli* ribosomal protein genes: Autogenous inhibition of translation". PNAS 77, 4, 1837.
- Nomura M. and Yates, J.L. (1980). "*E. coli* ribosomal protein L4, is a feedback regulatory protein". Cell. 21, 517.
- Oakes, M.; Henderson, E.; Sheimman, A.; Clark, M. and Lake, J.A. (1986). "Ribosome, structure, function and evolution: mapping ribosomal RNA, proteins and functional sites in three dimensions". Structure, function and genetics of ribosomes. Ed. B. Hardesty and G. Kramer Springer-Verlag, New York. 47-67.
- Okata, E. and Osawa, S. (1981). "Yeast ribosomal proteins V. correlation of several nomenclatures and proposal of a standard nomenclature". Mol. Gen. Genet. 181, 176-182.
- Oleinick, N.R. (1977). "Initiation and elongation of protein synthesis in growing cells: differential inhibition by cycloheximide and emetine". Arch. Biochem. Biophys. 182, 171-180.
- Olivares, I.M. (Tesis de Licenciatura, 1996). "Respuesta al estres térmico y salino en mutantes de *S. cerevisiae* que carecen de una o más proteínas ribosomales ácidas". Universidad Nacional Autónoma de México. E.N.E.P. Iztacala.
- O'Rourke, J.C. and Godchaux, W. (1975). "Fluoride inhibition of the initiation of protein synthesis in the reticulocyte lysate cell-free system. J. Biol. Chem. 250, 3443-3450.

BIBLIOGRAFIA

Palma, A.N. (Tesis de Licenciatura, 1994). "Expresión de los genes de las proteínas ribosomales ácidas en las células petite de S. cerevisiae". Universidad Nacional Autónoma de México. E.N.E.P. Iztacala. 15-28.

Payo, J. (Tesis Doctoral, 1993). "Análisis de la expresión de los genes que codifican las proteínas ácidas ribosómicas de S. cerevisiae mediante fusiones con el gen Lac Z". Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias.

Payo, J.; Santana, H.; Remacha, M.; Ballesta, J.P. and Zinker, S. (1995). " Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain". Biochemistry. 34, 7941-7948.

Pettersson, I.; Hardy, S. and Liljas A. (1976). "The ribosomal protein L8 is a complex of L7/L12 and L10". FEBS Lett. 64, 135-138.

Qian, S.; Zhany, J.; Kay, M. and Jacob-Lorena, M. (1987). "Structural analysis of Drosophila rpA1 gene a member of eukaryotic "A" type ribosomal protein family". Nuc. Acids. Res. 15, 987-1003.

Remacha, M. (Tesis Doctoral, 1988). "Los genes de las proteínas ácidas de S. cerevisiae caracterización y estudios funcionales". Universidad Autónoma de Madrid. Centro de Biología Molecular. España.

Remacha, M.; Saenz-Robles, T.; Vilella, M. and Ballesta, J.P. (1988). "Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunits from S. cerevisiae". J. Biol. Chem. 263, 9094-9101.

BIBLIOGRAFIA

Remacha, M.; Santos, C. and Ballesta, J.P. (1990). "Disruption of single copy genes encoding acidic ribosomal proteins in S. cerevisiae". Mol. Cell. Biol. 10, (5) 2182-2190.

Remacha, M.; Santos, C.; Bermejo, B.; Tatjana, N. and Ballesta, J.P. (1992). "Stable binding of eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for 'in vivo' protein synthesis". J. Biol. Chem. 267, 12061-12067.

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.

Rhoads, R.E. (1993). "Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors". J. Biol. Chem. 268, 3017-3020.

Rubstosov, P. (1980). "The structure of yeast ribosomal RNA gene I. The complete nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from S. cerevisiae". Nuc. Acid. Res. 8, 5779-5784.

Sachs, A. and Davis R. (1989). "The poly (A) binding protein is required for poly (A) shortening and 60S ribosomal-dependent translation initiation". Cell 58, 857-867.

Saenz-Robles, M.T.; Remacha, M.; Vilella, M.; Zinker, S. and Ballesta, J.P. (1990). "The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity". Biochim. Biophys. Acta. 1055, 51-55.

Sánchez-Madrid, F.; Reyes, R.; Conde, P. and Ballesta, J.P. (1979), "Acidic ribosomal proteins from eukaryotic cells". Eur. J. Biochem. 98, 409-416.

BIBLIOGRAFIA

Sánchez-Madrid, F.; Vidales, J; Ballesta, J. P. (1981). " Effect of phosphorylation on the affinity of acidic proteins from S. cerevisiae for the ribosome ". Eur. J. Biochem. 114, 609-613.

Shimmin, L.C.; Ramirez, G.; Matheson, A.T. and Dennis, P.P. (1989). "Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from archaeobacterial, eubacterial and aukaryotes". J. Mol. Evol. 29, 448-462.

Siegel, M.R: and Sisler, H.D. (1963). "Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide". Nature. 200, 675-676.

Subramanian, A.R. (1975). "Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity af the large subunit of E. coli ribosome". J. Mol.Biol. 95, 1-8.

Terhorst, C.; Moller, W.; Laursen, R. and Wittman-Liebold, B. (1973). "The primary structure of an acidic protein from 50S ribosomes of E. coli. which is involved in GTP hydrolisis dependent on elongation factors G and T". Eur. J. Biochem. 34, 138-152.

Tokimatsu, H.; Strychard, W.A. and Dahlberg, A.E. (1981). "Gel electrophoretic studies on ribosomal proteins L7/L12 and the Escherichia coli 50S sununit". J. Mol. Biol. 152, 397-412.

Towbin, H.; Ramjour, H. Kruster, H., Lievenani, D. and Gordon, J. (1982). " Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoprotein P1/P2 ". J. Biol. Chem. 257, 12709-12715.

BIBLIOGRAFTA

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, Pl, P2, L13, L14, L18, L20 and L38". J. Biol. Chem. 253, 946-955.

Tsurugi, K. and Ogata, K. (1985). "Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver". J. Biochem. 98, 1427-1431.

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.

Uchiumi, T.; Wahba, A.J. and Traut, R. (1987). "Topography and stoichiometry of acidic protein in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 5580-5584.

Uchiumi, T.; Traut, R. and Kominai, R. (1990). "Monoclonal antibodies against acidic phosphoproteins P0, P1 and P2 of eukaryotic ribosomes as functional probes". J. Biol. Chem. 265, 89-95.

Van Agthoven, A.J.; Maassen, J.A. and Moller, W. (1977). "Structure and phosphorylation of an acidic protein from 60S ribosomes and its involvement in elongation factor-2 dependent GTP hydrolysis". Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 989-998.

Van Agthoven, A.; Kriek, J.; Amons and Moller, W. (1978). "Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60S ribosomes from *Artemia salina* and rat liver". Eur. J. Biochem. 91, 553-565.

BIBLIOGRAFIA

- Vázquez, D. (1979). "Inhibitors of protein biosynthesis". *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 30, 15-35.
- Vidales, J.; Saenz-Robles, M. and Ballesta, J.P. (1981). "The acidic proteins of eukaryotic ribosomes. A comparative study". *Biochem. Biophys. Acta.* 656, 28-35.
- Vidales, J.; Sánchez-Madrid, F.; Saenz-Robles, T. and Ballesta, J.P. (1983). "Purification and characterization of two ribosomal proteins of *S. cerevisiae*". *Eur. J. Biochem.* 136, 275-281.
- Vidales, J. F; Saenz-Roblez, M. T. and Ballesta, J. P. (1984). Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of phosphorylation. *Biochemistry.* 23, 390-396.
- Vilella, M. (Tesis Doctoral, 1988). "Estructura y función de la proteínas ribosomales ácidas y L15 del ribosoma de *S. cerevisiae*. Utilización de anticuerpos monoclonales específicos. Universidad Nacional Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 1-30.
- Vilella, M.D.; Remacha, M.; Ortiz, B.; Mendez, E. and Ballesta, J.P. (1991). "Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies (proteins L44/L45 and L44' have diferents functional roles)". *Eur. J. Biochem.* 196, 407-414.
- Warner, J.R. (1966). "The assembly of ribosomes in HeLa cells". *J. Mol. Biol.* 19, 383-398.
- Warner, J. (1971). "The assembly of ribosomes in yeast". *J. Biol. Chem.* 246, 447-454.

BIBLIOGRAFIA

Wingboldus, J.D. (1987). "DNA and deduced amino acid sequence of Drosophila rp21C, another "A" type ribosomal protein". Nuc. Acids. Res. 15, 10064.

Wool, I.G. (1979). "The structure and function of eukaryotic ribosomes". Ann. Rev. Biochem. 48, 719-754.

Wool, I.G.; Chang, Y.L.; Gluck, A. and Suzuki, K. (1991). "The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1 and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins". Biochimie. 73, 861-870.

Zinker, S. and Warner, J. (1976). "The ribosomal proteins of S. cerevisiae phosphorylated and exchangeable proteins". J. Biol. Chem. 251, 1799-1807.

Zinker, S. (1980). "P5/P5', the acidic ribosomal phosphoprotein from S. cerevisiae". Biochim. Biophys. Acta. 606, 76-82.