



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ IZTACALA ”

CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LA
FOSFOPROTEINA RIBOSOMAL P1 DE
Saccharomyces cerevisiae

TESIS PROFESIONAL

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

HUMBERTO JESUS SERRANO TRONCO

LOS REYES IZTACALA

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ante todo, por todo y a pesar de todo, a:

MI PADRE,
ARTURO ZAVALA ROMERO,
quien me ha enseñado
que el amor y el respeto se conquistan día a día.

MI MADRE,
LUCIA TRONCO DE ZAVALA,
quien me ha enseñado
lo que es el valor a través de su enfrentamiento diario con
la vida.

MI ABUELA,
JOAQUINA TADEO GOMEZ,
quien me ha enseñado
lo que es el amor a los hijos.

Sí a ELLOS, que nunca han dejado de apoyarme y de
preocuparse por que me aseme al conocimiento.

A LOS COMPAÑEROS, APOYO Y MOTIVO DE MUCHAS COSAS;

MIS HERMANOS, LUCIA Y ABRAHAM;

MARTHA, MI ESPOSA;

MIS AMIGOS ERNESTINA Y BLAS.

AGRADEZCO:

A TODOS MIS MAESTROS, POR SUS ENSEÑANZAS;

A MIS FAMILIARES, POR SU APOYO CONSTANTE;

A SAMUEL ZINKER, POR INICIARME EN EL MARA
VILLOSO MUNDO EXPERIMENTAL;

A AQUELLOS QUE PARA MI HAN SIGNIFICADO UN
REFUGIO SEGURO Y UN GRAN TESORO: USTE-
DES, MIS AMIGOS.

PERO ESPECIALMENTE, A AQUELLOS QUE HACEN
POSIBLE LA EDUCACION EN NUESTRO PAIS.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Samuel Zinker R.

" Si no entedeis la función,
estudiad la estructura ". F. Crick.

INDICE.

Abreviaturas Utilizadas	IV
Indice de Figuras y Tablas	V
RESUMEN	VII
INTRODUCCION	1
I. Características Generales del Ribosoma Eucariótico.	
I.1. Características Físicas.	
I.2. Características Químicas.	
I.2.1. ARN Ribosomal.	
I.2.2. Proteínas Ribosomales.	
I.2.2.1. Fosfoproteínas Ribosomales.	
II. Proteínas Ribosomales de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	
II.1. Proteínas Ribosomales.	
II.2. Fosfoproteínas.	
III. La Fosfoproteína Ribosomal Pl de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	
III.1. Características de Pl.	
III.2. Avance en el Estudio de Pl.	
III.3. Objetivos de Trabajo y Perspectivas.	
MATERIALES	31
1. Material Biológico.	
1.1. Células.	
2. Medios de Cultivo.	
2.1. YPAD.	
2.2. YM-1.	
2.3. SC.	
2.4. SCM.	
3. Soluciones para el fraccionamiento celular.	
3.1. Amortiguador para lisis celular.	
3.2. Amortiguador para lavar ribosomas.	
3.3. Amortiguador para lavar y resuspender la fracción ribosomal.	

4. Soluciones para Electroforesis en Geles de Poli-
acrilamida.

4.1. Gel Unidimensional al 12% de acrilamida-SDS.

4.2. Gel Bidimensional pH 3.2 x SDS.

4.3. Gel Bidimensional pH 5.0 x SDS.

4.4. Gel para Iseelectroenfoque.

METODOS 37

1. Esterilización de Medios de Cultivo.

2. Condiciones de Cultivo.

3. Preparación de Esfereplastos.

4. Fraccionamiento Celular.

4.1. Obtención de la Fracción Ribosomal.

5. Extracción de la Proteína Ribosomal Total con
Acido Acético/ Mg^{++} .

6. Electroforesis Unidimensional.

7. Electroforesis Bidimensional pH 3.2 x SDS.

8. Electroforesis Bidimensional pH 5.0 x SDS.

9. Iseelectroenfoque.

10. Tinción de Geles.

RESULTADOS 49

1. Patrón Electroforético de la Proteína Ribosomal Total.

1.1. Electroforesis Unidimensional.

1.2. Electroforesis Bidimensional pH 3.2 x SDS.

1.2.1. Localización Electroforética de Pl.

1.3. Migración de Pl luego de tratar el Paquete
Ribosomal con RNasa.

2. Establecimiento de un Sistema Electroforético
Tridimensional.

3. Caracterización Electroforética de Pl en el
Sistema Bidimensional pH 5.0 x SDS.

3.1. Patrón Electroforético de la Proteína Ribosomal
Total.

3.2. Localización Electroforética de Pl mediante el
Sistema de Electroforesis Tridimensional.

4. Determinación del Punto Isoeléctrico de Pl.	
4.1. Punto Isoeléctrico de Pl.	
4.2. Punto Isoeléctrico de Pl'.	
5. Establecimiento de un Método de Electroelución de Proteínas.	
6. Identificación del Caracter de Proteasa de Pl.	
6.1. Incubación de Pl a 4°C luego de Electroeluir.	
6.2. Tratamiento con Fosfatasa Alcalina.	
DISCUSION	77
1. Caracterización Electroforética de Pl.	
1.1. Electroforesis Unidimensional.	
1.2. Electroforesis Bidimensional.	
2. Caracterización Electroforética de Pl en el Sistema Bidimensional pH 5.0 x SDS mediante Electroforesis Tridimensional.	
3. Determinación del Punto Isoeléctrico de Pl. ¿Multifosforilación?	
4. Método de Electroelución.	
5. Pl ¿Primer Fosfoproteína con Función Establecida?	
CONCLUSION	90
BIBLIOGRAFIA	93

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A	Adenina
ARN	Acido Ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
BRIJ	Polioxi-etilencetileter
C	Citosina
°C	Grados Centígrados
D.O.	Densidad Optica
DOC	Acide Desoxicolico
EF	Factor de Alargamiento
IF	Factor de Iniciación
RF	Factor de Liberación
G	Guanina
GTP	Guanosín Trifosfato
mA	miliAmpere
mARN	ARN mensajero
M	Molar
N	Normal
pI	punte Isoeléctrico
ppGpp	Guanosín Tetrafosfato
ppGppp	Guanosín Pentafosfato
rARN	ARN ribosomal
RNasa	Ribonucleasa
rpm	reveluciones por minuto
S	Unidades Svedberg de sedimentación
SDS	Sodio Dodecil Sulfato de
tARN	ARN de transferencia
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
U	Uracilo
U.K.	Unidades Klett
V	Voltios

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura No.	página
1. Biosíntesis de Proteínas en Procarientes.	3
2. Biosíntesis de Proteínas en Eucarientes.	4
3. Subunidades Ribosomales.	6
4. Ribosomas Adheridos a Membranas.	6
5. Modelo Tridimensional de la Subunidad Mayor.	10
6. Modelo Tridimensional de la Subunidad Menor.	11
7. Modelo Tridimensional del Ribosoma.	12
8. Peliribosomas.	13
9. Efecto del Mg^{++} sobre la Estructura Ribosomal.	14
10. Síntesis del rARN en <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	17
11. Electroforesis Bidimensional de Proteína Ribosomal.	19
12. Proteínas Ribosomales Básicas de <u>S. cerevisiae</u> .	23
13. Proteínas Ribosomales Ácidas de <u>S. cerevisiae</u> .	23
14. Patrón Electroforético pH 5.0 x SDS.	24
15. Patrón Electroforético pH 3.2 x SDS.	30
16. Patrón Electroforético Unidimensional (SDS).	50
17. Patrón Electroforético pH 3.2 x SDS.	52
18. Caracterización de P1 en el sistema pH 3.2 x SDS.	54
19. Patrón Electroforético de P1 por Zinker y Warner.	55
20. Tratamiento con RNasas.	56
21. Electroforesis Tridimensional.	58
22. Electroforesis Tridimensional.	59
23. Patrón Electroforético pH 5.0 x SDS.	61
24. Patrón Electroforético pH 8.6 x pH 4.5.	62
25. Electroforesis Tridimensional.	64
26. Caracterización de P1/P1' en el Sistema pH 5.0 x SDS.	65

27. Isoelectroenfouque de Pl.	67
28. Isoelectroenfouque de Marcadores.	68
29. Punte Isoelétrico de Pl.	68
30. Isoelectroenfouque de Pl.	69
31. Isoelectroenfouque de Pl'.	70
32. Punte Isoelétrico de Pl'.	70
33. Electroelución.	72
34. Electroelución de Pl.	73
35. Actividad Proteolítica de Pl.	74
36. Tratamiento con Fosfatasa Alcalina.	76
37. Material para Electroelución.	86
38. Método de Electroelución.	86
39. Función de Pl.	92

TABLA No.	página
1. Propiedades Fisicoquímicas de Ribosomas.	7
2. Propiedades Físicas de las Subunidades.	8
3. Características de las Fosfoproteínas de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	26

RESUMEN

De las diferencias establecidas entre los ribosomas eucariotes y procariotes, se destaca la presencia en los primeros, de proteínas fosforiladas "in vivo", cuya presencia se reportó -- por vez primera en 1970. Aunque a la fecha no se ha encontrado una función específica a dicha fosforilación, existen razones para creer que juega un papel importante en la actividad ribosomal.

En 1976 Zinker y Warner reportaron la presencia de cinco -- fosfoproteínas ribosomales en Saccharomyces cerevisiae, a las que denominaron de P1 a P5. En el presente trabajo se describe por vez primera la caracterización electroforética de P1 en el sistema de geles de poliacrilamida bidimensional pH 5.0 x SDS mediante electroforesis tridimensional. Así mismo, se empleó -- dicho sistema tridimensional en la determinación del punto isoelectrónico de P1.

Se describe un método de electroelución mediante el cual se evidenció una actividad proteolítica asociada a P1, dependiente del grado de fosforilación de esta fosfoproteína.

En base a los resultados conseguidos, se propone una hipótesis sobre la función de la fosforilación de P1 en el ribosoma, como mecanismo regulador de su actividad dentro del proceso de biosíntesis proteica.

INTRODUCCION

La existencia de una serie de procesos con caracter universal entre los organismos vivos es un hecho sin discusión. Uno de ellos lo constituye la traducción de moléculas de mRNA en moléculas de proteína, es decir, la síntesis de proteínas. Este proceso ha sido objeto de estudios durante muchos años. Durante la síntesis de proteínas intervienen un gran número de elementos (más de 150 componentes en bacterias), de entre los cuales el ribosoma fue de los primeros en ser identificados (1-3). Sin embargo, debido en parte al descubrimiento de los mRNA, tARN y sus funciones, el interés por el ribosoma se vio disminuído. Durante mucho tiempo solo fue considerado como una estructura pasiva cuya función se reducía a la de ser soporte de los otros elementos activos participantes en la biosíntesis de proteínas. Afortunadamente y gracias, entre otros, al estudio del mecanismo de acción de la estreptomícina, se sugirió que el ribosoma juega un papel muy activo dentro del proceso de biosíntesis proteica y que su función es bastante complicada (4-7). Efectúa tanto la lectura del mensaje nucleotídico del mRNA, así como la transformación de esa información en la secuencia de aminoácidos de una proteína; es decir, cataliza la síntesis de proteínas. De hecho el ribosoma es el elemento más complejo de la maquinaria que traduce la información genética, lo cual provoca que el estudio de sus funciones se torne más difícil.

El que la síntesis de proteínas se dé en todos los organismos vivos no implica que el proceso o los elementos que-

intervienen sean idénticos. Respecto al ribosoma se presentan tres grupos de acuerdo a su origen: 1) ribosomas de organismos procariontes, 2) ribosomas de organismos eucariontes y 3) ribosomas de mitocondrias y cloroplastos. Cada grupo presenta características particulares, así como otras que comparten en común. De los tres grupos enumerados el primero es el que se ha estudiado más extensamente (5,8-10). Independientemente de la clasificación, los ribosomas de todos los organismos están constituidos de ARN y proteínas en proporciones aproximadamente iguales. A pesar de que la organización interna del ribosoma no ha sido totalmente aclarada, se cree que en cada partícula la molécula de ácido nucleico constituye el esqueleto alrededor del cual mediante interacciones de naturaleza cooperativa se asocian las proteínas.

Pese a que actualmente existe un panorama amplio de la participación del ribosoma en la biosíntesis proteica (figuras 1 y 2) (6,11-13), su función dista mucho de ser aclarada. Para examinar una función biológica es importante saber a qué elementos estructurales está ligada. Conocer la localización, la estructura y función de cada una de las moléculas que constituyen el ribosoma, es virtualmente el ideal dentro del estudio de este organelo.

I. Características generales del ribosoma eucariótico.

I.1. Características Físicas.

El ribosoma es un organelo celular submicroscópico que en estado deshidratado aparece como una partícula de forma esférica con un diámetro de 15 a 20 nm. Hidratado contiene aproximadamente un 70% de agua y un diámetro sensiblemente mayor (23 nm). Está constituido por dos subunidades, una

Componentes Libres

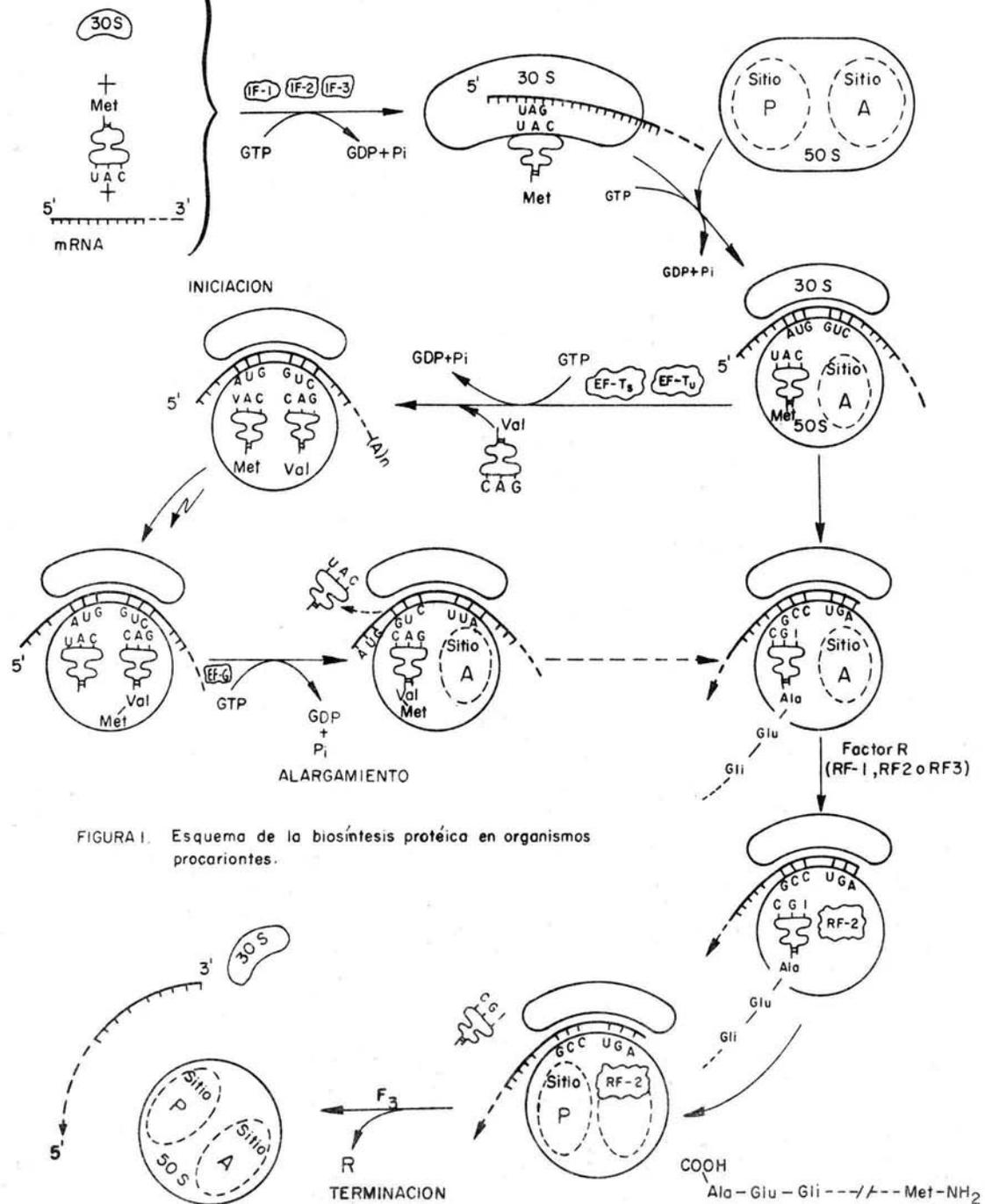


FIGURA 1. Esquema de la biosíntesis proteica en organismos procariontes.

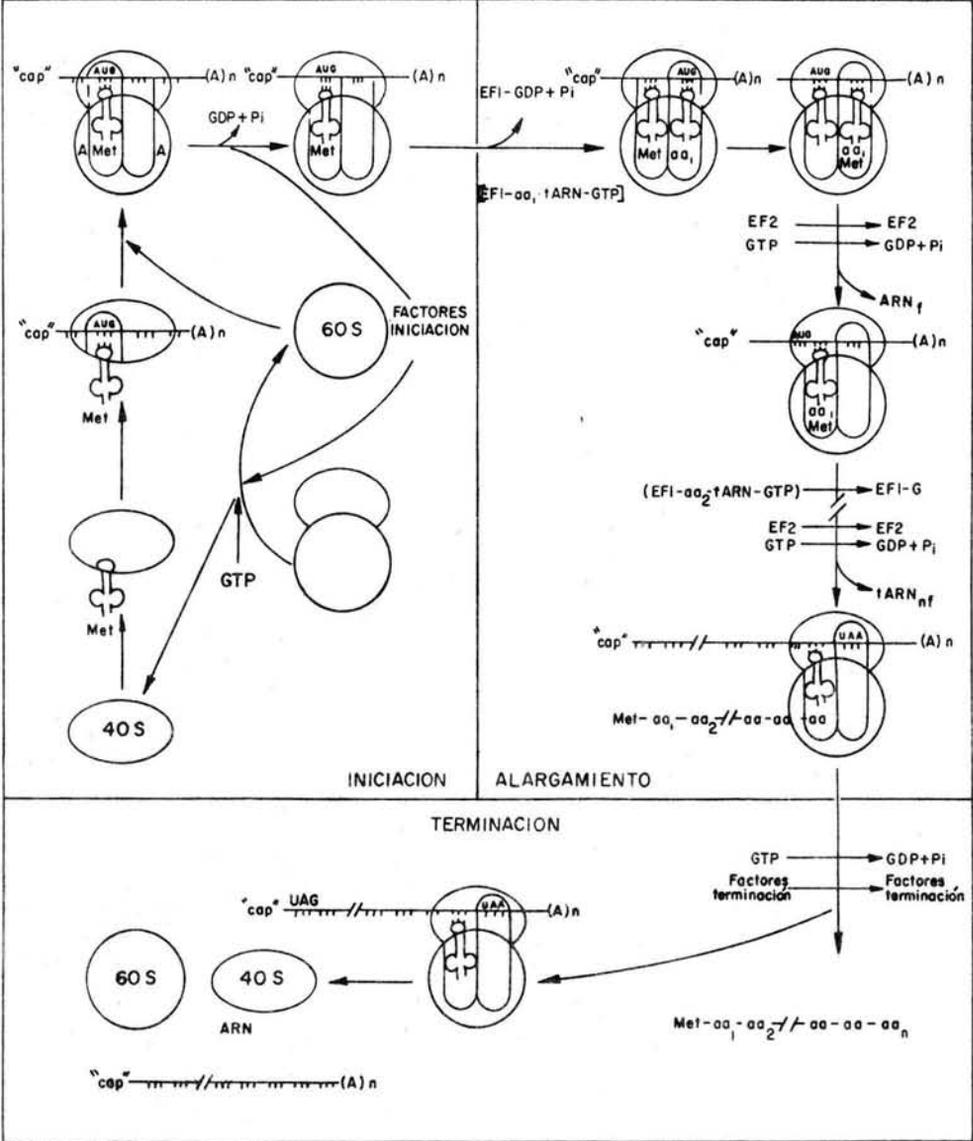


FIGURA 2. Representación esquemática del proceso de biosíntesis de proteínas en organismos eucarióticos.

pequeña y otra mayor (figura 3). El coeficiente de sedimentación del monómero y de las subunidades varía de una especie a otra dentro de un rango muy cercano; 80S para el monómero, 60S para la subunidad mayor y 40S para la subunidad pequeña. La densidad de la subunidad menor es de 1.515 g/ml su coeficiente de extinción es de 94.5 y el de difusión 2.0×10^{-7} (Tabla 2). La subunidad mayor tiene una densidad de 1.6 g/ml, su coeficiente de extinción es de 99.5 y el de difusión 1.21×10^{-7} (Tabla 2). Los ribosomas no forman de ningún modo un grupo uniforme, la masa de los ribosomas 80S oscila desde 3.9 (en plantas) a 4.55×10^6 daltones (en mamíferos). El cambio de la masa ribosomal se debe a un incremento de tamaño en la subunidad mayor, incremento tanto en la masa de ARN como en la de proteína. La subunidad 40S por su parte, no ha tenido ningún cambio apreciable de tamaño durante la evolución de los organismos eucarióticos.

Los ribosomas se pueden encontrar libres en la matriz citoplasmática, o adheridos a las membranas del retículo endoplásmico (figura 4) mediante la subunidad mayor (3,14). Ambos intercambian parcialmente debido a la existencia de un ciclo de los ribosomas y de sus subunidades, relacionado con su función en la síntesis protéica. La proporción de ribosomas unidos a membrana varía dentro de límites muy amplios.

Estudios detallados de microscopía electrónica (15-18) muestran a la subunidad 60S redondeada o bien, como un perfil triangular con dos lados convexos y uno más aplanado en medio, a manera de depresión angosta o muesca (figura 5). La subunidad 40S a su vez, se presenta como una elipsoide larga con perfiles curvos y con las siguientes dimensiones: 23 x 14 x 11.5 nm. Tiene además una línea o tabique de 8 nm



Figura 3. Ribosoma completo donde se señala la subunidad pequeña (p) y la grande (g). Se observa además la hendidura que las separa.

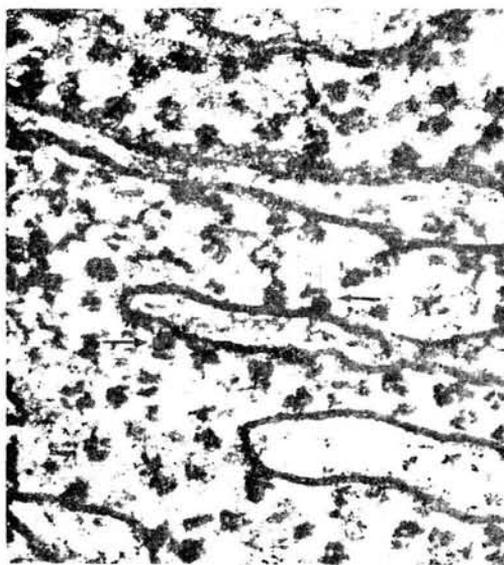


Figura 4. Ribosomas adheridos a las membranas del retículo endoplásmico. Las flechas indican algunos ribosomas en los que la unión a la membrana mediante la subunidad 60S es más evidente.

TABLA 1. Comparación entre algunas propiedades fisicoquímicas de los ribosomas de Escherichia coli y mamíferos.

	E. coli			Mamíferos		
	Monómero	Subunidades		Monómero	Subunidades	
Constante de sedimentación aproximada.	70S	50S	30S	80S	60S	40-45S
Peso Molecular. ^a	2.6×10^6	1.8×10^6	0.7×10^6	4.3×10^6	2.7×10^6	
Constante de sedimentación del rARN.		23S (5S)	16S		28S (5.8S) ^b (5S)	18S
Peso Molecular del rARN. ^a		1.2×10^6	0.55×10^6		1.64×10^6	0.67×10^6
Tipo de Metilación del rARN.		la mayoría de los grupos metilados están en las bases			la mayoría de los grupos metilados están en posición 2'-O de la ribosa	
Cantidad de rARN.	60%	63%	62%	50%		
Disociación en subunidades.	10^{-4} mM Mg ⁺⁺			Tampón sin Mg ⁺⁺ . EDTA 10 mM o KCl 1M		

^a En daltones.

^b Especie exclusiva de los eucariotes.

TABLA 2. Propiedades Físicas de Subunidades Ribosomales Eucariotas.

Propiedades Físicas	Subunidad 40S	Subunidad 60S
Peso Molecular ⁺	1.4×10^6	2.9×10^6
Coefficiente de Sedimentación ⁼	36.9	56.3
Coefficiente de Extinción [¶]	94.5	99.5
Densidad [^]	1.515	1.60
Coefficiente de Difusión [∇]	2.0	1.21

⁺ En daltones.

⁼ $S_{20,w}^{\circ}$

[¶] $E_{260}^{1\%}$

[^] g/cm^{-3}

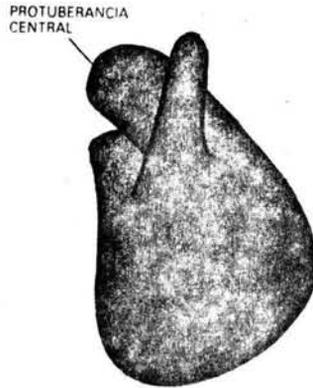
[∇] $D_{20,w}^{\circ} (x 10^7 cm^2/seg)$

(16,19) que la divide en dos porciones desiguales; la cabeza (un tercio) y el cuerpo (dos tercios) (figura 6). En el ribosoma completo, la subunidad pequeña se une por su lado cóncavo con el lado más aplanado de la subunidad grande, -- con el que coincide el tabique de la subunidad pequeña de manera que forman una especie de túnel entre ambas (figura 7). En la figura 8 se esquematizan poliribosomas indicando la ubicación probable del mRNA (que aparentemente se aloja entre ambas subunidades) y la cadena polipeptídica nascente que esta contenida en una especie de canal localizado en la subunidad mayor.

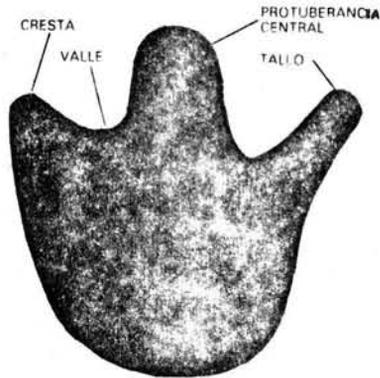
I.2. Características Químicas.

El ribosoma es una partícula ribonucleoprotéica en la que el rARN y las proteínas se encuentran presentes en proporciones aproximadamente iguales. Con poco o ningún material lipídico, las cargas positivas de las proteínas no son suficientes para compensar las cargas negativas de la cadena esterfosfórica del rARN, por lo que los ribosomas son intensamente negativos y fijan cationes. Se cree que cada subunidad ribosomal contiene un filamento muy plegado de rARN sobre el cual se adhieren las distintas proteínas ribosomales. Se presupone además, que el rARN está en la superficie y -- las proteínas ribosomales en el interior en contacto con -- partes no helicoidales del rARN. Para mantener su cohesión estructural, los ribosomas requieren bajas concentraciones de Mg^{++} (0.001M). Cuando esta concentración se duplica, se combinan dos ribosomas para formar un "dímero" con el doble de peso molecular. Por otra parte, si la concentración de Mg^{++} disminuye, el ribosoma se disocia en subunidades (figura 9). La unión con el Mg^{++} aparentemente se realiza mediante el fosfato del rARN.

Vista Lateral



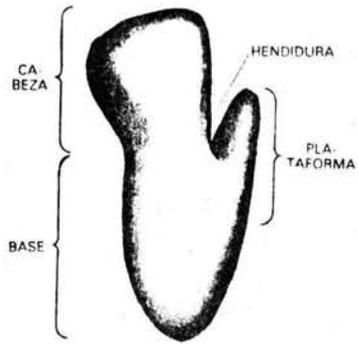
SUBUNIDAD GRANDE



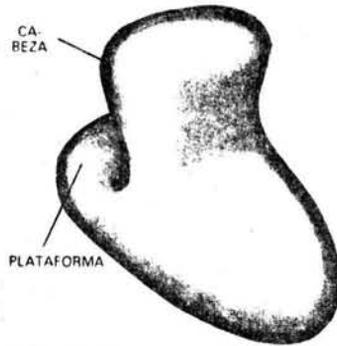
Vista Frontal

Figura 5. Modelo tridimensional de la subunidad mayor del ribosoma.

Vista Lateral



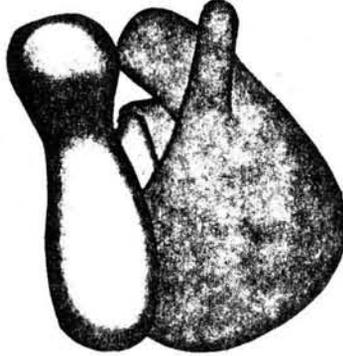
SUBUNIDAD PEQUEÑA



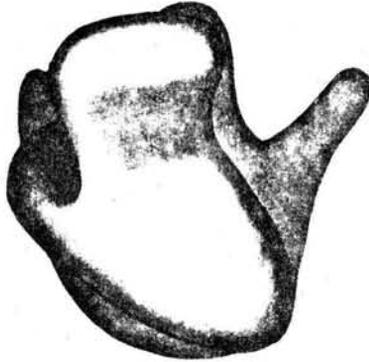
Vista Frontal

Figura 6. Modelo tridimensional de la subunidad 40S del ribosoma.

Vista Lateral



RIBOSOMA



Vista Frontal

Figura 7. Modelo tridimensional del ribosoma. Notése la especie de túnel que se forma entre ambas subunidades.

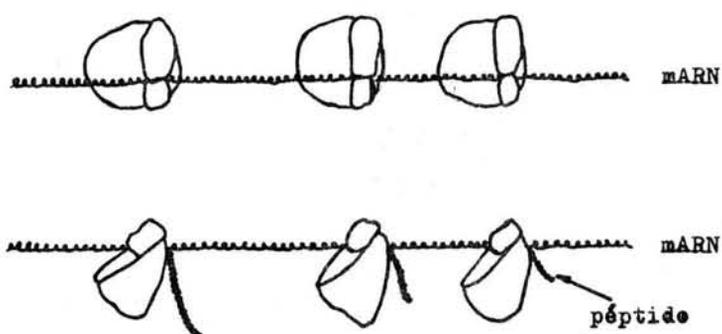


Figura 8. Posible relación de los ribosomas con el mRNA en los polirribosomas. Cada ribosoma está formado por una subunidad grande -- y otra pequeña. El mRNA corre entre las subunidades con todas las ribosomas en la misma posición, las cuales se encuentran en forma perpendicular al mRNA. La cadena polipeptídica sale de la subunidad mayor.

I.2.1. ARN Ribosomal.

Como se mencionó anteriormente, el ribosoma es una partícula ribonucleoprotéica en cuya constitución participan cuatro moléculas de rARN denominadas 28S, 18S, 5.8S y 5S. Del rARN total, aproximadamente un 60% es helicoidal y contiene bases apareadas (22). La composición de bases del ARN de diferentes especies es variable y no sigue la regla de bases características del modelo de Watson y Crick para el ADN. Las bases más abundantes son guanina y citosina. Tanto el rARN 28S como el 18S contiene un número característico de grupos metilo, en su mayor parte como 2'-O-metil-ribosa (23, 24). La subunidad menor del ribosoma contiene una molécula de rARN 18S con un peso molecular de 0.7×10^6 daltones y alrededor de treinta proteínas cuya masa total es de casi 0.7×10^6 (16, 20, 21). Se esperaría que tuviera iguales porcentajes de rARN y proteína, sin embargo determinaciones químicas demuestran que el contenido de rARN es del 45% y el resto proteína. El rARN 18S es el único ácido nucleico que se encuentra formando parte de esta subunidad por lo que quizá su función principal sea estructural.

La subunidad mayor del ribosoma está constituida por tres moléculas de rARN cuyos coeficientes de sedimentación son 5S, 5.8S y 28S con un peso molecular de 3.9×10^4 , 5.1×10^4 y 1.79×10^6 daltones respectivamente y por unas 45 a 50 proteínas. La masa total de rARN en la partícula es cercana a 1.79×10^6 daltones. Representa el 59.4% de la partícula, mientras que la masa correspondiente al total de proteína es de 2.9×10^6 daltones.

En el organismo de estudio del presente trabajo, la levadura Saccharomyces cerevisiae, en la subunidad ribosomal 60S se encuentra un rARN 25S con un peso de 1.3×10^6 dalto

nes (25) en lugar del 28S presente en los organismos superiores. Muy probablemente realiza funciones homólogas y con características semejantes. Por otra parte, el rARN 5.8S se encuentra unido de forma no covalente al rARN 25S mediante un número considerable de puentes de hidrógeno. Forma una estructura de doble cadena y permanece unido al rARN 25S -- aún después de haber sido liberada la proteína ribosomal -- (26,27). Se separa rápidamente de la subunidad 60S íntegra por la acción de la urea (2M) e el calor. No presenta metilación, posee una masa de 6×10^4 y 150 nucleótidos (28) cuya secuencia ha sido reportada por Rubin (29). El rARN 5S de S. cerevisiae, forma parte de la subunidad mayor y se le separa cuando las proteínas ribosomales son liberadas. Su tamaño es de 120 nucleótidos (28,30,31) y al igual que el rARN 5.8S, no está metilado. Su unión a la subunidad es débil ya que muy pocos de sus 120 nucleótidos pueden estar -- (si es que le están) formando una estructura duplohelicoidal con el rARN 25S. Sin embargo parece más probable ----- y esto es de suma importancia en este trabajo ----- que la unión del rARN 5S a la subunidad esté mediada por una o más proteínas ribosomales (28). Cabe señalar que en los experimentos de reconstrucción, el rARN 5S se requiere para un ensamble correcto de la subunidad 60S (23,32). Finalmente en la figura 10 se esquematiza la biosíntesis del ARN ribosomal en S. cerevisiae, proceso que es revisado con más detalle por Udem (25).

I.2.2. Proteína Ribosomales.

Cada subunidad ribosomal está constituida por 30 o más macromoléculas unidas mediante enlaces no covalentes. Pese -- a esta característica de los componentes del ribosoma, el --

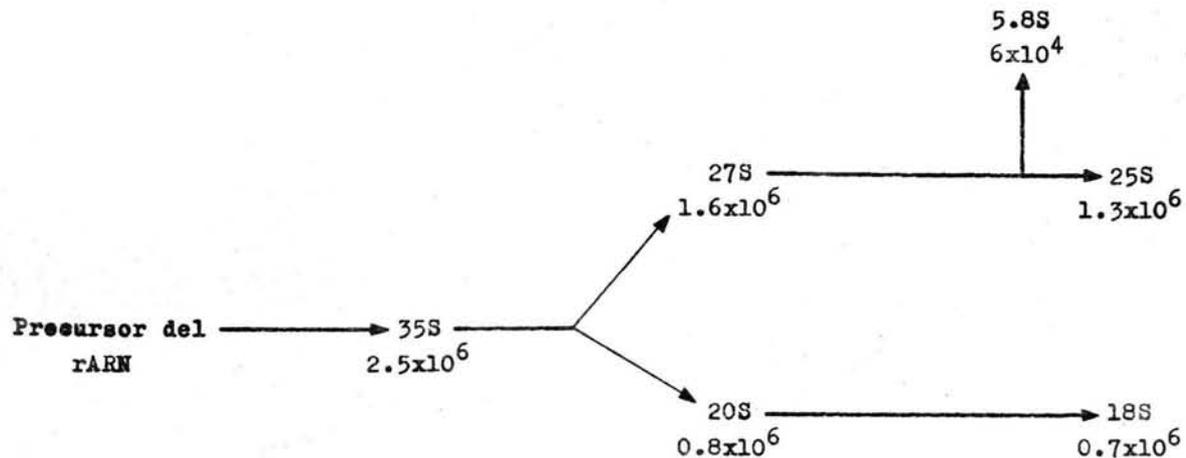


Figura 10. Síntesis de rARN en *S. cerevisiae*. El rARN 5.8S se genera durante el paso final de fragmentación de la molécula precursora 27S. Por otra parte, el rARN 5S se sintetiza de forma independiente (25) - ya que no está relacionado con el organizador nucleolar (23).

estudio de las proteínas, en el caso de los ribosomas eucariotes, se ha relegado debido a su pequeño tamaño, su basicidad (algunas proteínas presentan puntos isoelectricos por arriba de 11), y a su insolubilidad en soluciones amortiguadoras ordinarias. Su gran número (70 a 80) dificulta el aislamiento y conduce al principal problema: la purificación y caracterización fisicoquímica. En contraste, el estudio de las proteínas ribosomales de organismos procariotas (especialmente E. coli) se ha desarrollado considerablemente en los últimos años.

Pese a lo anterior, se han logrado desarrollar métodos de análisis (33,34) que han facilitado y ampliado su estudio. Debido a que las proteínas ribosomales no presentan ninguna actividad al ser separadas del ribosoma, su purificación se debe basar en otros criterios. Por la resolución que ofrece, la electroforesis bidimensional ha sido utilizada ampliamente como base de muchas investigaciones (35). Asimismo, las coordenadas así obtenidas proporcionan la base para la nomenclatura de tales proteínas. Por convención se numeran de izquierda a derecha en filas sucesivas, anteponiéndoles la letra S (del inglés small) para indicar que pertenecen a la subunidad menor y L (del inglés large) si pertenecen a la subunidad mayor. En la figura 11 se ilustra la aplicación de este sistema a unas muestras de proteína ribosomal proveniente de varias fuentes. No obstante la valiosa información que proporciona este sistema de estudio, la designación de ciertas proteínas no está del todo clara. Algunas proteínas aparentemente diferentes resultan ser la misma o bien, lo que al parecer es una sola proteína, resulta ser la agregación de dos o más. Si a lo anterior se añade el que algunas proteínas son removidas en ocasiones al lavar los ribosomas, se comprenderá el desacuerdo en cuanto al número total

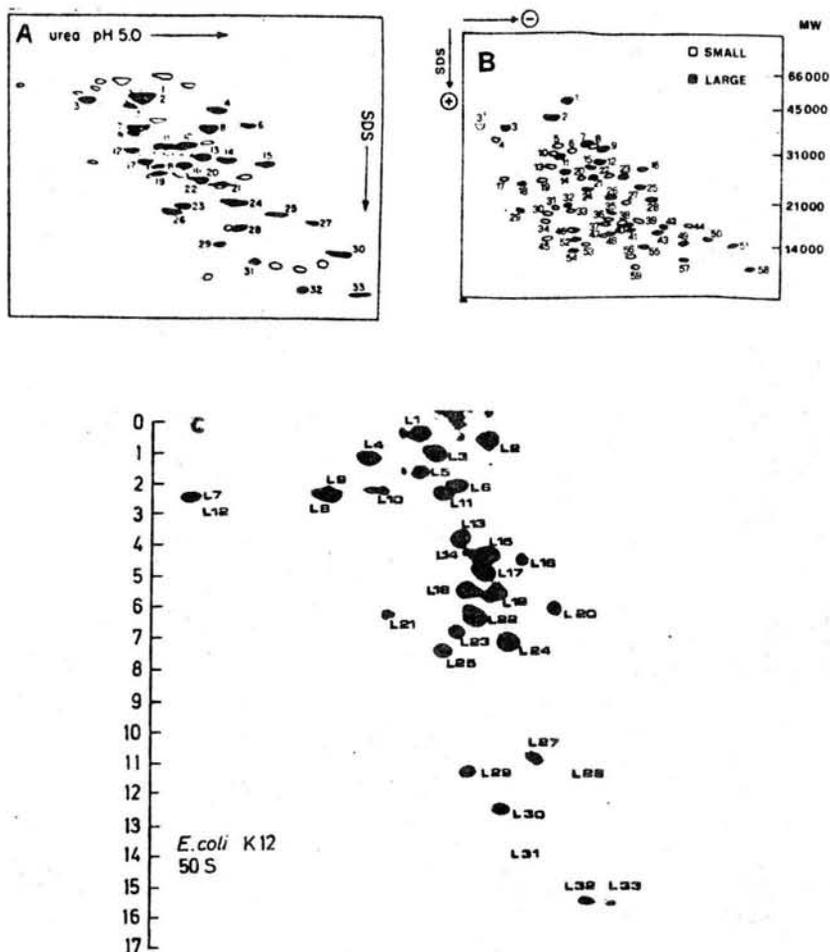


Figura 11. Sistema de Electroferesis Bidimensional aplicado a proteina ribosomal de varios organismos. A) Mitocendria, B) Neurospora crassa, C) E. coli.

de las mismas y la incertidumbre para considerar a una proteína como ribosomal. Warner (36) propuso tres clases de -- proteínas ribosomales: 1) Aquellas que son ensambladas con el rARN en el núcleo y se mantienen unidas a la molécula de rARN hasta su paso al citoplasma. 2) Proteínas que recambian "in vivo" entre el ribosoma y la proteína soluble del citosol, y que se caracterizan por su aparición en los ribosomas aún cuando la síntesis de éstos no se lleva a cabo. -- "In vitro" permanecen como parte del ribosoma aún bajo condiciones rigurosas de lavado con soluciones de elevada fuerza iónica o baja concentración de magnesio o ambas. A este tipo de proteínas se les denomina también de recambio. 3) -- Todas aquellas proteínas que son removidas del ribosoma por lavado riguroso (0.5M KCl). Estas son por lo general proteínas adsorbidas de manera adventicia.

I.2.2.1. Fosfoproteínas Ribosomales.

Entre el grupo de proteínas ribosomales, merecen especial atención las proteínas fosforiladas dado el establecimiento de dos hechos muy importantes relacionados con el metabolismo del fósforo. El primero de ellos se refiere a la inexistencia en los organismos eucariotes de un factor estrictamente en la síntesis de guanosín tetra y penta fosfato (37-39) De hecho las células eucariotas no producen ppGpp ni ppGppp de allí que deben tener algún otro medio aún no definido para regular la síntesis de sus componentes ribosomales. El -- segundo hecho que debe resaltarse, es el concerniente a la posible fosforilación de las proteínas ribosomales eucariotas, fosforilación que no se efectúa en las proteínas ribosomales de organismos procariotas.

El hecho de que algunas proteínas ribosomales están fosfo

riladas fue reportado inicialmente por Kabat (40) y Loeb -- (41). Después siguieron demostraciones sobre la fosforilación de proteínas ribosomales por proteincinasas tanto endógenas como exógenas; además, que la fosforilación de ribosomas por proteincinasas "in vitro" no afecta ninguna de -- las reacciones parciales ensayadas de la síntesis de proteínas (42) y que su desfosforilación no altera su capacidad -- de traducir moléculas de mRNA (43). Por lo que es posible -- que la fosforilación altere una función ribosomal que no es -- té relacionada con la síntesis de proteínas o afecte alguna función que no se haya podido ensayar "in vitro" (tal como -- la fidelidad de la traducción). A pesar de que se esperaba, con gran expectación hallar rápidamente una función a tal -- fosforilación, muy probablemente en la regulación de la actividad ribosomal (objetivo aún no logrado), existen buenas razones para pensar que la fosforilación de las proteínas -- ribosomales es muy importante: 1) El hecho de que la fosforilación de tales proteínas esta limitada normalmente a un -- número reducido de entre las setenta u ochenta proteínas -- que constituyen al ribosoma y 2) Que dicha fosforilación -- se ha conservado en todo el reino eucariota, desde los más -- primitivos como Artemia salina (44) y Saccharomyces cerevisiae (47-49), plantas (45), hasta mamíferos tales como cone -- jo (40), rata (41) y humano (46). Una revisión sobre la fosforilación de proteínas ribosomales eucariotas y su control se encuentra en los trabajos de Kabat (1974), Wool (1979) y Leader (1980).

II. Proteínas Ribosomales de Saccharomyces cerevisiae.

II.1. Proteínas Ribosomales.

Se han identificado mediante electroforesis bidimensional

en geles de poliacrilamida sesenta y siete proteínas ribosomales en la levadura S. cerevisiae. Treinta y siete pertenecen a la subunidad mayor y treinta a la subunidad menor. Como en el caso de bacterias y células de mamífero, casi todas las proteínas son muy básicas y migran hacia el cátodo a un pH de 8.6. En la figura 12 se observa el sistema de numeración de las proteínas básicas separadas por electroforesis bidimensional (pH 8.6 x pH 4.5). De entre las sesenta y siete proteínas ribosomales, cuatro de la subunidad mayor y seis de la subunidad menor poseen a pH 8.6, carga negativa, es decir son ácidas; tales proteínas se aprecian también mediante el mismo sistema de electroforesis y su separación se muestra en la figura 13.

Una caracterización electroforética bidimensional muy útil e importante es la conseguida a pH 5.0 x SDS, que resuelve la mayoría de las proteínas ribosomales. En la figura 14 se aprecia dicho patrón electroforético, este esquema es muy importante para los propósitos del presente trabajo y se volverá a él más adelante en otra sección. Warner y Gorenstein reportaron que para la mayoría de dichas proteínas, existe una correlación 1:1 entre eucariotes tan separados como lo son el hombre y la levadura (55). Sobre la síntesis de proteína ribosomal, su control y su ensamblaje al ribosoma pueden revisarse las citas 51 a 54.

II.2. Fosfoproteínas.

De entre las sesenta y siete proteínas ribosomales de S. cerevisiae, Zinker y Warner, reportaron en 1976 que cinco de ellas son fosfoproteínas y que dicha fosforilación ocurre "in vivo". El fosfato asociado a las proteínas es insensible a altas concentraciones de RNasa A y T2. Al ser sometidas a hidrólisis ácida se obtienen residuos de fosfoseri-

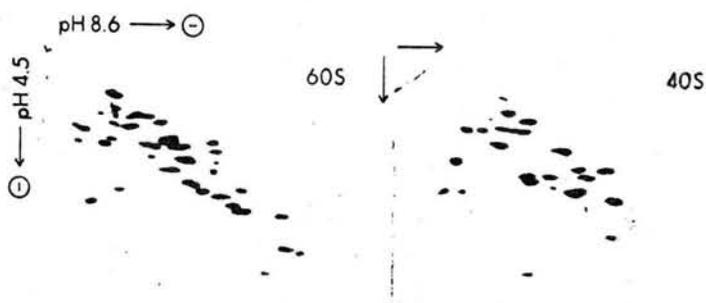


Figura 12. Patrón electroferético de las proteínas básicas de Saccharomyces cerevisiae.

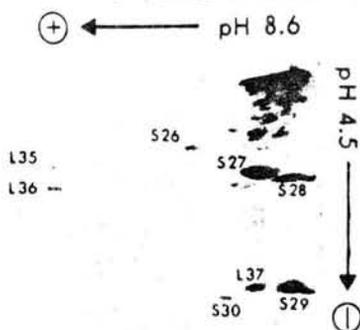


Figura 13. Patrón electroferético de las proteínas ácidas de Saccharomyces cerevisiae.

→ pH 5.0
↓ SDS

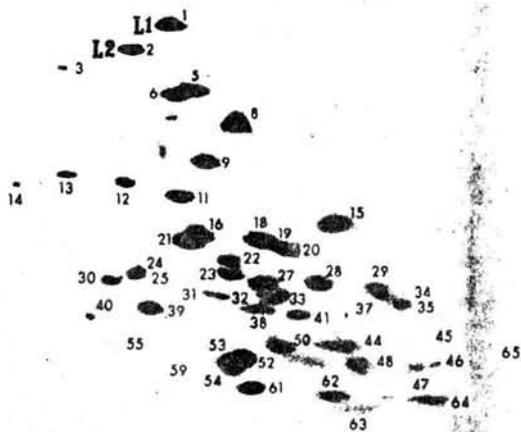


Figura 14. Patrón electroforético de proteína ribosomal total de *S. cerevisiae* en el sistema bidimensional pH 5.0 x SDS.

na y fosfotreonina. En la Tabla 3 se enlistan algunas características de las proteínas en cuestión, denominadas de P1 a P5.

Existen evidencias que sugieren que la proteína P2 es la equivalente, en levaduras, a la fosfoproteína S6 de hígado de rata estudiada por Wool (1979). Por otra parte la proteína P3 es idéntica en sus características electroforéticas a S27, una de las cinco proteínas ácidas de la subunidad 40S. Se ha sugerido que ambas proteínas se localizan en la interfase de las subunidades 40S y 60S, y que probablemente se encuentren involucradas en el enlace del mRNA o la unión del tARN-péptido naciente al complejo de síntesis o bien en ambos casos. La proteína P4 se observa como una mancha muy débil en el sistema electroforético pH 8.6 x pH 4.5, sin embargo su apreciación es clara en un sistema pH 8.6 x SDS. Respecto a P5 debe señalarse que es una proteína de recambio identificada inicialmente con las proteínas L35 y L36, que actualmente se designa como L44 y L45 (57). Su fosforilación sigue siendo de mucho interés ya que se piensa que tales proteínas sean homólogas a las proteínas L7/L12 de E. coli implicadas en todos los pasos de hidrólisis de GTP durante la síntesis de proteínas.

Ninguna de las fosfoproteínas mencionadas (P1 a P5) se encuentra involucrada en la síntesis de ribosomas, es decir, su fosforilación ocurre de manera independiente a la síntesis de ribosomas. Por el contrario, si se inhibe la síntesis de proteínas con cicloheximida o mediante un mutante termosensible para la síntesis de proteínas, a excepción de P2, la fosforilación de las proteínas se ve inhibida considerablemente, lo cual lleva a pensar que realizan alguna función en la síntesis proteica. Pese a que se ha reportado

TABLA 3. Características de las cinco fosfoproteínas ribosomales de Saccharomyces cerevisiae, reportadas por Zinker y Warner.

Designación	Peso Molecular	Localización	Carga a pH 8.6	Comentarios
P1	40 000	60S	Neutra?	De Recambio
P2	31 000	40S ⁼	Basica	Dos Especies: S5/S6
P3	22 000	40S ⁼	Acida	S27
P4	15 500	polisomas	Acida	Una proteína menor
P5	13 700	60S	Muy Acida	Dos o más especies: L34/L35 De Recambio

=. Las proteínas P2 y P3 se encuentran exclusivamente en la subunidad 40S a elevada fuerza iónica. A bajas concentraciones de Magnesio, P2 y P3- se distribuyen entre las subunidades 60S y 40S.

la unión de fosfoproteínas a moléculas de mRNA en células - de mamífero (58,59), en levadura aún es incierto el que alguna de las proteínas P1 a P5 interaccione con el mRNA.

III. La Fosfoproteína Ribosomal P1 de Saccharomyces cerevisiae

III.1. Características de P1.

La fosfoproteína P1 junto con P5 se localizan en la subunidad 60S y ambas son proteínas de recambio. Como se señala en la Tabla 3, P1 es una de los componentes de alto peso molecular del ribosoma. Mientras que el resto de las fosfoproteínas tienen un comportamiento electroforético definido -- a pH 8.6, P1 aparentemente no se desplaza a este pH, ni a -- pH 5.0 ó pH 3.2. En el sistema pH 8.6 migra ligeramente hacia el ánodo como una línea gruesa (figura 14). La migración electroforética de P1 se logra sólo con la presencia -- de SDS en el gel. Estas propiedades han llevado a pensar -- que P1 sea una proteína hipermodificada.

Si se corre una muestra de proteína ribosomal total en -- gel de poliacrilamida en presencia de SDS, P1 aparece ocupando el tercer sitio en dirección al ánodo, en forma de -- dos bandas adyacentes. La suma de esas dos bandas mostró -- que hay casi 1.5 mol de proteína/mol de ribosomas (60). Entre otras palabras, de acuerdo con ese dato P1 se encontraría -- en la mitad de los ribosomas. No está claro si ello representa una mezcla de ribosomas aislados en diferentes etapas del ciclo peptídico, o si se debe a una real heterogeneidad en la población ribosomal.

Debe señalarse que pese a ser una proteína de recambio -- (lo cual sugiere una función importante), P1 se considera -- sin duda como proteína ribosomal de acuerdo a los criterios operacionales definidos por Warner (36). Se encuentra presente en cantidades estequiométricas en ribosomas que han --

sido purificados rigurosamente con soluciones de gran fuerza iónica (KCl 0.5M) tal como lo describen Woel y colaboradores (61). Se ha establecido que Pl no participa en la regulación del ensamblaje del ribosoma dentro del núcleo.

III.2. Avance en el Estudio de Pl.

El estudio de Pl se vió restringido por la carencia de -- tecnología adecuada y por la atención que se prestó a P5 da da su probable homología funcional con L7/L12 de E. coli. - Mas en 1981, en el laboratorio de Zinker, se reinició su estudio (62) debido a la optimización de un sistema electro-- forético bidimensional pH 3.2 x SDS. Mediante este sistema-- se pudo observar claramente la presencia de Pl en dos estados diferentes (figura 15): uno fosforilado (Pl') y otro -- desfosforilado (Pl), lo cual aumentó el interés por dicha -- proteína. Igualmente importantes son las evidencias de que Pl se une a una molécula pequeña de ARN muy probablemente -- al rARN 5S (62,63). Como se describió anteriormente el rARN 5S se une al ribosoma en estadios intermedios durante su en-- samblaje en el núcleo y es indispensable para el funciona-- miento del ribosoma.

III.3. Objetivos de Trabajo y Perspectivas.

Como se ha mencionado, pese a los esfuerzos realizados en el estudio de Pl, siguen sin ser aclarados algunos puntos, -- que son los que dan pie a la realización de este trabajo. -- Estos son:

1. Establecimiento de un sistema de electrofore-- sis que permita caracterizar a Pl.
2. Determinación del punto isoelectrico de Pl.
3. Diseño de un método de purificación para Pl.

Los objetivos señalados son ciertamente ambiciosos, mas -- de conseguirse, darían como consecuencia herramientas para--

un trabajo más amplio y acelerado. Tomando como ejemplo el tercer objetivo, puede señalarse que si bien es cierto que uno de los problemas en el estudio de las proteínas ribosomales eucariotas es la dificultad de su aislamiento y purificación, de obtenerse un método acertado para P1, dicho método podría aplicarse al aislamiento de otras proteínas. Mas aún, la conjunción del primer y tercer objetivos abrirían el camino a un estudio sobre la relación entre proteínas ribosomales de diversas especies. Asimismo darían herramientas para conseguir anticuerpos contra estas proteínas e intentar estudios referentes a su posible función. A pesar de que estas aseveraciones tienen un elemento especulativo, resulta interesante contemplar las perspectivas que se abrirían ante un resultado positivo de este trabajo.

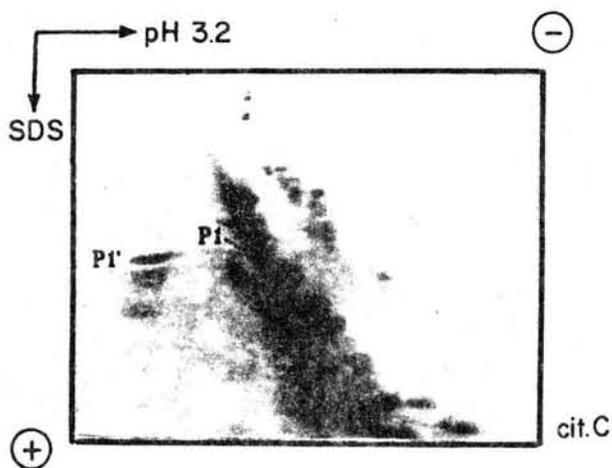


Figura 15. Patrón electroforético de proteínas ribosomales total del sistema bidimensional -- pH 3.2 x SDS.

MATERIALES

1. Material Biológico.

- 1.1. Células. En el presente trabajo se empleó la cepa de ---
Saccharomyces cerevisiae A364A ATCC 22244, --
haploide (a, gal, ade 1,2, ura 1, his 7, lis 2,
tir 1)(74).

2. Medios de Cultivo.

YPAD

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de Levadura	10
Peptona	20
Agar	20
Dextrosa	20
Sulfato de Adenina	0.03

YM-1 (Medio para Levadura)

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de Levadura	5
Peptona	10
Acido Succínico	10
YNB (Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos)	6.7
Glucosa	10
NaOH	6

SC (Sintético Completo)

Componente	Concentración (g/l)
Acido Succínico	10
NaOH	6
Glucosa	20
Adenina	0.02
Uracilo	0.02
Lisina	0.0625
Histidina	0.05
Tirosina	0.05
YNB (Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos)	6.7

SCM (Sintético Completo Magnesio). Idéntico al medio SC más 98.6 g de Sulfato de Magnesio (0.4 M $MgSO_4$).

3. Solución para el Fraccionamiento Celular.

3.1. Solución amortiguadora LHB para la lisis celular.

NaCl	0.1	M
$MgCl_2$	0.03	M
Tris de pH 7.4	0.01	M

3.2. Solución amortiguadora utilizada para lavar los ribosomas (colchón de sacarosa).

Solución 3.1.	15%
Sacarosa	5%
Sulfato de Amonio	

3.3. Solución amortiguadora 10^{-5} para lavar y resuspender la fracción ribosomal.

NaCl	0.1	M
HEPES	0.01	M
MgCl ₂	0.00001	M

4. Soluciones para la electroforesis en geles de poliacrilamida.

4.1. Geles Unidimensionales al 12% de poliacrilamida-SDS.

4.1.1. Acrilamida recristalizada 30%

Bis-acrilamida recristalizada 0.8% en H₂O bidestilada.

4.1.2. Tris de pH 8.8 1 M

4.1.3. SDS al 10% en H₂O bidestilada.

4.1.4. Tris de pH 6.8 0.49 M

4.1.5. Persulfato de amonio 10% en H₂O bidestilada.

4.1.6. Amortiguador para disolver las muestras de proteína.

Solución 4.1.2. 1 ml

Solución 4.1.4. 1 ml

2-β mercaptoetanol 0.1 ml

Glicerol 1 ml

Rojo de fenol al 10% 0.1 ml

H₂O 6.8 ml

4.1.7. Amortiguador de corrida.

Glicina 14.4 g

Tris 3.0 g

Solución 4.1.2. 10.0 ml

H₂O hasta 1000 ml

4.2. Geles bidimensionales de poliacrilamida pH 3.2 x SDS.

4.2.1. Acrilamida recristalizada al 60%

Bis-acrilamida recristalizada 0.4% en H₂O bidestilada.

4.2.2. Acido acético glacial 43.2 ml

TEMED 4.0 g

H₂O hasta 100 ml

4.2.3. Persulfato de Amonio al 0.2% en Urea 10 M.

4.2.4. Amortiguador para disolver las muestras de proteína.

Urea 6 M

Acido acético 0.5 M

Sacacosa 20 %

2-βmercaptoetanol 1 %

Rojo de Pironina 0.1%

4.2.5. Amortiguador de corrida para la 1a. dimensión

Acido acético 0.9 N

4.2.6. Solución para equilibrar el gel de la 1a. dimensión --
para la electroforesis en la 2a. dimensión.

Tris 0.5 M

SDS 1 %

pH 6.8 con HCl.

4.2.7. Gel de poliacrilamida para la 2a. dimensión.

Exactamente igual al descrito en el inciso 4.1.

4.3. Geles bidimensionales de poliacrilamida pH 5.0 x SDS.

4.3.1. Solución para preparar el gel de la 1a. dimensión.

Acrilamida recristalizada 4 %

Bis- acrilamida recristalizada 0.1%

Urea 8.0 M

Bis-Tris 0.057 M

Ajustar a pH 5.0 con Acido acético glacial.

4.3.2. Solución para disolver las muestras de proteína.

Urea	8.0	M
2-β mercaptoetanol	10 %	
Glicerol	10 %	
Acido acético	0.1%	
Fuchsina Básica	0.01%	

4.3.3. Amortiguadores para la electroforesis en la 1a. dimensión.

4.3.3.1. Electrodo Superior (+)

Bis-Tris 10 mM de pH 5.0 ajustado con Acido acético

4.3.3.2. Electrodo inferior (-)

Acetato de Potasio 0.179 de pH 5.0 ajustado con Acido-acético glacial.

4.3.4. Solución para equilibrar el gel de la 1a. dimensión -- para la electroforesis en la 2a. dimensión.

Urea	4.0	M
Tris	0.5	M
SDS	1 %	

pH 6.8 con HCl.

4.3.5. Gel de poliacrilamida para la 2a. dimensión.

Idéntico al descrito en el inciso 4.1.

4.4. Gel de poliacrilamida para isoelectroenfoque.

4.4.1. Acrilamida recristalizada	19.5%
Bis-acrilamida recristalizada en H ₂ O bidestilada	0.53%

4.4.2. Anfolinas.

4.4.3. Persulfato de Amonio al 1.5% en H₂O bidestilada.

4.4.4. Solución para disolver las muestras de proteína.

Anfolinas	2 %	
Urea	8.0	N
Sacarosa	5 %	

4.4.5. Amortiguadores de corrida.

4.4.5.1. Electrodo superior (+)

Acido Fosfórico	1.7%
-----------------	------

4.4.5.2. Electrodo inferior (-)

Etilendiamina 2% en Urea 6 M.

MÉTODOS

1. Esterilización de los Medios de Cultivo.

A excepción de la glucosa al 50% y el YNB que se esterilizaron por filtración, con papel filtro Millipore tipo HA con poro de 0.45μ de diámetro, el resto de las soluciones de los medios, se esterilizaron por calor húmedo a 120°C aproximadamente; es decir, a 15 lb/in^2 durante 20 minutos.

2. Condiciones de Cultivo.

La cepa se mantuvo en medio YPAD a 4°C , resemebrándose cada cuatro meses. Una asada de la cepa crecida en medio YPAD se resuspendió en 50-80 ml de medio YM-1 y se incubó durante 72 horas a 23°C en agitador rotatorio New Brunswick modelo G 76, hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria tardía (stock). El stock se mantuvo a 4°C y se renovó cada cuatro semanas.

A menos que se indique lo contrario, para todos los experimentos se emplearon 2 litros de medio SC inoculando con el stock de A364A en una dilución de 1:100. Los cultivos fueron incubados a 23°C con agitación rotatoria, hasta una concentración de $1-2 \times 10^7$ células/ml (40 a 80 U. K. filtro rojo, en un colorímetro Klett-Summerson).

3. Preparación de Esferoplastos.

A fin de lograr un rendimiento máximo en la obtención de proteína ribosomal total, en ocasiones se procedió a la preparación de esferoplastos.

Al llegar el cultivo a la fase logarítmica (40 a 80 U.K.)

las células se cosecharon por centrifugación a 5 000 rpm. - (Sorvall modelo RC2-B) durante 5 minutos en un rotor GS-3 - de Sorvall Instruments y se lavaron por dos ocasiones con - aproximadamente 50 ml de agua bidestilada estéril fría (ya- que las sales inhiben a la glucosidasa). La pastilla de cé- lulas se resuspendió en Sorbitol 1 M estéril (10 ml de Sor- bitol/1000 ml de cultivo) y se añadió glucosidasa al 1% con - respecto al volúmen de Sorbitol. Bajo este tratamiento, las células se mantuvieron en agitación suave durante 30-40 mi- nutos; pasado dicho tiempo se transfirieron suavemente a -- medio SCM (llevando al volúmen original del cultivo) y se - permitió su recuperación metabólica durante dos horas. Una- vez recuperados los esferoplastos, se les añadió ciclohexi- mida (100 ug/ml) y se enfriaron bruscamente virtiendolos en Sorbitol 1 M congelado. Se empaquetaron mediante centrifu- gación a 10 000 rpm per 3 minutos, deshechando el sobrena- dante y finalmente se resuspendieron en LHB (1/10 del volú- men original del cultivo) para dar paso al fraccionamien- to celular.

4. Fraccionamiento Celular.

4.1. Obtención de la Fracción Ribosomal.

Una vez alcanzada la concentración de células deseada, el cultivo se cosechó por centrifugación utilizando una cen- trífuga Sorvall refrigerada modelo RC2-B, a 5 000 rpm du- rante 8 minutos y entre 4-10°C en un rotor GS-3. La pasti- lla celular se lavó en dos ocasiones con 50 ml de agua bi- destilada estéril fría. Ya lavado, el paquete celular se -- resuspendió en aproximadamente 10 ml de la solución 3.1. y- se transfirió a una botella de agitación B. Braun corres- pondiente a un agitador de la misma marca tipo 7853030; a-- ñandiéndose además 15 g de perlas de vidrio con un diámetro

de 0.45 - 0.5 mm. Se procedió a la lisis celular mediante pulsos de 15 segundos de agitación, seguidos de pulsos de reposos de igual tiempo; la ruptura se verificó al microscopio óptico. Con la seguridad de haber lisado la mayoría de las células (95%), se procedió a coleccionar la suspensión por succión y a lavar las perlas de vidrio cuantas veces fue necesario, a fin de optimizar el rendimiento; juntado al final la solución de lavado y la de lisado, hasta ajustar 180 ml y se mantuvo en hielo.

A continuación se añadió DOC hasta una concentración de 0.5% y se agitó magnéticamente por 5 minutos, luego de los cuales se agregó BRIJ hasta 0.5% manteniendo la agitación. Al cabo de 5 minutos se procedió a centrifugar la solución durante 10 minutos a 10 000 rpm en el rotor SS-34 de Sorvall Instruments. El sobrenadante se colocó sobre 4 ml de solución 3.2. en tubos del rotor 60 Ti de Beckman y se centrifugó durante 3 horas a 55 000 rpm a 4-6°C en una ultracentrifuga Beckman modelo L8-55. Completada la centrifugación el sobrenadante se descartó por succión y la pastilla obtenida (fracción ribosomal) se lavó 2 veces con 2.5 ml de la solución 3.3. mediante rotación cuidadosa del tubo, desechando la solución de lavado.

5. Extracción de la Proteína Ribosomal Total con Acido Acético /Mg⁺⁺.

La fracción ribosomal obtenida como se indica anteriormente, se resuspendió en 2.5 ml de la solución 3.3., mediante agitación magnética y auxiliándose de una pipeta Pasteur sellada en su extremo más angosto, ya que la pastilla obtenida tiene una consistencia gelatinosa bastante firme. Disuelto el paquete ribosomal se añadieron 2.5 volúmenes de Acido acético y 0.1 volumen de MgCl₂ 1M simultaneamente, mante---

niendo la agitación en hielo. Luego de 30 minutos la solución se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante conteniendo la proteína se dializó colocándolo dentro de un tubo de diálisis, contra Acido acético 0.5 N durante 32 horas a 4°C con cambios de solución cada 8 horas. Por último, se liofilizó y se conservó en refrigeración.

6. Electroforesis Unidimensional en Geles de Poliacrilamida.

6.1. Preparación de Geles al 12% de acrilamida en presencia de SDS.

Los geles al 12% de acrilamida-SDS se prepararon de 9.5 cm x 12.80 cm, en placas de vidrio de 16.50 cm x 14.00 cm y separadores de 2-3 mm de espesor, en una cámara de electroforesis en placa.

Se preparó un gel separador mezclando en un matraz Erlenmeyer de 150 ml, inmerso en hielo:

Solución	Volúmen
4.1.1.	12 ml
4.1.2.	11.25 ml
4.1.3.	0.3 ml
H ₂ O	6.25 ml

esta solución se desgasificó manteniéndola al vacío durante 60-90 segundos y agitando vigorosamente. A continuación se añadieron 25 µl de TEMED y 120 ml de la solución 4.1.5. recién preparada. Inmediatamente después la solución se vació entre las placas de vidrio cuidando de que no quedaran burbujas de aire atrapadas entre las placas. Con el fin de que el borde superior del gel quedara parejo, se estratificó cuidadosamente SDS al 1% y se permitió que la solución polimerizara a temperatura ambiente. Ya que hubo polimerizado el gel, la solución de SDS se retiró por absorción.

Con el objeto de que las muestras de proteína penetraran compactadas y al mismo tiempo en el gel separador, sobre este se preparó un gel concentrador de la siguiente forma: en un matraz Erlenmeyer de 50 ml inmerso en hielo se mezclaron

Solución	Volúmen
4.1.1.	1.33 ml
4.1.3.	0.3 ml
4.1.4.	1.25 ml
H ₂ O	7.2 ml

se desgasificó la solución sometiénola al vacío durante -- 30-60 segundos con agitación vigorosa. En seguida se agregan 0.1 ml de la solución 4.1.5. recién preparada y 5 µl de TEMED. Al momento se vació la solución entre las placas de vidrio sobre el gel separador cuidando que no quedaran burbujas de aire atrapadas entre las placas. La polimerización se llevo a cabo a temperatura ambiente.

6.2. Preparación de las muestras para los geles al 12% de acrilamida-SDS.

6.2.1. Proteína liofilizada.

De la proteína obtenida como se indica en el inciso 5 de esta sección, se tomaron 60-100 µg y se disolvieron en --- 15-20 µl de solución 4.1.6.. La muestra se colocó en los pocillos del gel mediante una micropipeta, toda vez que el reservorio superior había sido llenado con el amortiguador de corrida correspondiente.

6.2.2. Proteína obtenida de geles al 12% de acrilamida-SDS.

El trozo de gel al 12% de acrilamida-SDS conteniendo la proteína se colocó en aproximadamente 50 ml de etanol 50%, ácido acético 7% y se agitó magnéticamente durante una hora con un cambio de solución a los 30 minutos. A continuación-

se pasó a un matraz Erlenmeyer con 50 ml de la solución --- 4.3.6. y se agitó durante 30 minutos minimamente. Luego de este tratamiento el trozo de gel se colocó como muestra en los pocillos auxiliándose de unas pequeñas pinzas. Previamente se llenó el reservorio superior con amortiguador de --- corrida y se cuidó que no quedaran burbujas bajo el gel utilizado como muestra.

6.3. Condiciones de corrida.

Tanto el reservorio superior como el inferior se llenaron con la solución 4.1.7. evitando que quedasen burbujas bajo la parte inferior del gel. La electroforesis se realizó hacia el ánodo a 110 Voltios desde un principio y se detuvo --- una vez que el marcador (citocromo C) se encontraba a 1 cm del extremo inferior del gel, lo cual ocurre alrededor de 3 a 3.5 horas. La electroforesis se llevo a cabo a temperatura ambiente aun cuando pueden obtenerse mejores resultados si se realiza a 10°C.

7. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida --- pH 3.2 x SDS.

7.1. Preparación del gel de poliacrilamida pH 3.2 de la primera dimensión.

La primera dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida de 5 mm de diámetro x 80 mm de largo, en un tubo de vidrio de 5 mm x 120 mm. Para su preparación se utilizó un matraz Erlenmeyer de 50 ml inmerso en hielo al que se añadieron las siguientes soluciones en el orden y cantidades que a continuación se indican:

Solución	Volúmen
4.2.4.	5 ml
4.2.2.	1 ml

4.2.1.	1 ml
H ₂ O	1 ml

Manteniendo el matraz en hielo, se procedió a desgasificar la solución mediante su exposición al vacío por 60-90 segundos mínimo y con agitación. La solución se colocó en los tubos (aproximadamente 2 ml de solución por tubo) cuidando que no quedaran burbujas de aire en el fondo. A continuación se colocó una capa de la solución 4.2.5. evitando que se mezclaran y se permitió la polimerización a temperatura ambiente.

7.1.1. Preparación de las muestras.

7.1.1.1. Proteína liofilizada.

Se pesaron generalmente 700 µg de proteína que se disolvieron en 150-200 µl de solución 4.1.4. y se colocaron sobre el gel, mediante una micropipeta.

7.1.2. Condiciones de corrida para la primera dimensión.

En ambos reservorios de la cámara de electroforesis se vació solución 4.2.5. y los geles se precorrieron durante la noche a 50 V, utilizando como marcador 15 µl de la solución 4.2.5.. Se colocaron las muestras y se llevó a cabo la electroforesis hacia el cátodo a un voltaje constante de 110 V durante 3 horas o hasta que el rojo de pironina de la solución 4.2.4. alcanzó el fondo del gel.

7.1.3. Equilibrio del gel cilíndrico para la segunda dimensión

El gel de la primera dimensión se extrajo del tubo mediante la inyección de agua entre el gel y la pared del tubo a través de una jeringa con aguja larga (74 mm). Con el objeto de elevar el pH del gel y variar la carga de las proteínas por asociación con SDS, se colocó el gel en 80 ml de la

solución 4.2.6. y se agitó durante 30 minutos.

7.2. Preparación del gel para la segunda dimensión.

Como segunda dimensión se utilizó un gel en placa al 12% de poliacrilamida-SDS idéntico al descrito en el inciso 6 de esta sección.

7.2.1. Condiciones de corrida de la segunda dimensión.

Las condiciones son exactamente iguales a las de una electroforesis unidimensional en geles al 12% de poliacrilamida-SDS, descritas en el inciso 6.3.

8. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida pH 5.0 x SDS.

8.1. Preparación del gel de poliacrilamida pH 5.0 para la primera dimensión.

La primera dimensión se llevó a cabo en un gel de 5 mm de diámetro x 100 mm de largo en un tubo de vidrio de 5 mm x 120 mm. La preparación de este gel fue muy sencilla ya que consistió únicamente en vaciar en un matraz Erlenmeyer de 50 ml en hielo, un volumen de la solución 4.3.1. correspondiente a la cantidad de gel deseada y posteriormente se añadieron 6 µl de persulfato de amonio al 10% (fresco) y 2 µl de TEMED por mililitro de solución 4.3.1.. A continuación esta solución se desgasificó mediante su exposición al vacío con agitación vigorosa durante por lo menos 1 a 1.5 minutos, completado lo anterior la solución se vació en los tubos hasta alcanzar la altura deseada y se recubrió con una capa de agua evitando en lo posible que se mezclara con la solución de gel. Efectuada la polimerización se sustituyó el agua por solución 4.3.3.1.

8.1.1. Preparación de las muestras.

8.1.1.1. Proteína liofilizada.

Aproximadamente 700 µg de proteína liofilizada se disolvieron en 150 a 200 µl de solución 4.3.2., las muestras así preparadas se colocaron sobre el gel con una micropipeta.

8.1.1.2. Proteína obtenida de geles al 12% de acrilamida-SDS.

Un trozo de gel al 12% de acrilamida-SDS conteniendo una proteína, se mantuvo con agitación durante por lo menos 30 minutos en 50 ml de etanol 50%, ácido acético 7%, y posteriormente en 10 ml de solución 4.3.2. con agitación durante 30 minutos. La muestra así preparada se colocó sobre el gel de la primera dimensión con auxilio de unas pinzas.

8.1.2. Condiciones de corrida para la primera dimensión.

En el reservorio superior de la cámara (+) se colocó la solución 4.3.3.1., mientras que en el inferior (-) se colocó solución 4.3.3.2.. La electroforesis se hizo a temperatura ambiente y se realizó hacia el cátodo a 90 V hasta que el colorante del amortiguador de muestra alcanzó el extremo inferior del gel (7 a 9 horas).

8.1.3. Equilibrio del gel cilíndrico para la segunda dimensión

La extracción del gel se hizo introduciendo agua por medio de una jeringa con aguja larga (74 mm) entre el gel y la pared del tubo. A fin de elevar el pH del gel como de introducir en él SDS y con ello modificar la carga de las proteínas, se colocó en 80 ml de la solución 4.3.4. y se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos.

8.2. Preparación del gel de la segunda dimensión.

La segunda dimensión consistió en un gel al 12% de poliacrilamida-SDS en placa, cuya preparación se describe en el

inciso 6.

8.2.1. Condiciones de electroforesis para la segunda dimensión

Se siguieron las mismas condiciones establecidas en el inciso 6.3. para electroforesis unidimensional en geles al 12% de poliacrilamida-SDS.

9. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida.

El sistema de isoelectroenfoque se compuso de una capa de gel de poliacrilamida (70 mm de longitud) y una capa de solución (12 mm de alto) sobrepuesta a la capa de gel. Ambas capas contenían 2% de anelinas, Urea 8M y Sacarosa al 5%.

9.1. Preparación del gel de poliacrilamida.

Fue un gel cilíndrico de 5 mm x 70 mm. Para preparar dos mililitros de solución de gel (casi 1.6 ml per tubo), en un tubo cónico graduado se disolvieron 0.96 g de Urea en H_2O hasta alcanzar un volumen de 1.3 ml y se añadieron 0.5 ml de solución 4.4.1. y 0.1 ml de solución 4.4.2.. A continuación se desgasificó la solución mediante su exposición al vacío y con agitación vigorosa. Posteriormente se añadieron 0.1 ml de la solución de persulfato de amonio al 10% (fresco) y 1.5 μ l de TEMED, que se mezclaron mediante rotación. Inmediatamente la solución de gel se vació a los tubos (ya que la polimerización se efectúa muy rápido) hasta alcanzar 70 mm de altura a partir del fondo y se recubrió con agua, la cual luego de 1 a 2 horas fue reemplazada por solución 4.4.4..

9.2. Preparación de las muestras.

Se utilizaron como muestras las manchas correspondientes a la proteína P1 en sus dos formas, obtenidas en sistema electroforético bidimensional pH 3.2 x SDS. Antes de ser sometidos a electroenfoque, los fragmentos de gel se coloca-

ren en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de ácido acético al 7%, etanol al 30% y se mantuvieron con agitación magnética durante 1 hora con cambio de solución a los 30 minutos. A continuación se transfirieron a 15 ml de acetona a -20°C y se agitaron hasta quedar deshidratados (aproximadamente 15 minutos). Se descartó la acetona y a los fragmentos de gel se les pasó una ligera corriente de aire con el fin de eliminar la acetona completamente. Por último los fragmentos de gel fueron rehidratados en 2.5 ml de solución 4.4.4. y agitados a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos e -- hasta alcanzar la densidad de la solución. Las muestras así tratadas fueron colocadas sobre el gel para isoelectroenfoque y se recubrieron con solución 4.4.4. hasta alcanzar una altura de 82 mm a partir del fondo del gel.

9.3. Condiciones de corrida.

En el reservorio superior (+), sobre la solución 4.4.4. que recubría las muestras se colocó cuidadosamente ácido -- fosfórico al 1.7%. En el reservorio inferior, se colocó una solución de etilendiamina al 12% en Urea 6M. El isoelectroenfoque se realizó en un cuarto frío con una corriente constante de 1 mA/gel hasta alcanzar un voltaje de 150 V y a -- partir de ese momento a voltaje constante de 150 V por 15 horas más.

10. Tinción de los geles de poliacrilamida.

Todos los geles se tiñeron mediante 40 a 45 minutos de agitación en Azul Brillante de Coomasie G-250 al 2% en ácido acético al 7%, metanol al 50%. A excepción de los geles de isoelectroenfoque, los cuales antes de ser teñidos se colocaron en Azul Brillante de Coomasie G-250 al 2% en ácido -- tricloroacético al 12.5% por una hora y luego en H_2O bides-

tilada durante 2 a 3 horas con cambios a los 40-45 minutos; el resto de los geles se tiñó inmediatamente después de completada la electroforesis. La fijación de los geles de isoelectroenfoque en ácido tricloroacético antes de ser teñidos, reduce bastante la intensidad del color de fondo provocado por las anfolinas. Los geles fueron desteñidos agitando los durante toda la noche en ácido acético al 7%, metanol al 30%. Nuevamente los geles de isoelectroenfoque fueron la excepción en cuanto al tiempo necesario para ser deteñidos y en cuanto a la visualización de las bandas de proteína, ya que mientras en los demás geles ambos procesos implicaban un máximo de 18 y 6 horas respectivamente, en éstos las bandas tardaban en ser visualizadas hasta tres días.

RESULTADOS

1. Patrón Electroforético de la Proteína Ribosomal Total.

1.1. Electroforesis Unidimensional.

La electroforesis unidimensional en geles es un método simple y rápido para la caracterización de proteínas, que permite la separación de éstas no solo de acuerdo a su carga sino también de acuerdo al tamaño y forma de las moléculas. Sin embargo, este método se muestra insuficiente cuando la mezcla a ser examinada consiste de numerosas proteínas de carga y tamaño similares. Pese a este inconveniente, la electroforesis unidimensional en gel es una herramienta muy útil al caracterizar una proteína o proteínas componentes de un organelo, como en el caso del ribosoma. De hecho, la primera evidencia de que existían varias proteínas en el ribosoma fue proporcionada por un fraccionamiento electroforético en gel. En la figura 16 se muestra el patrón electroforético unidimensional de la proteína ribosomal total obtenido en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. Debe señalarse que no obstante la buena resolución que se obtiene en este tipo de gel, no es posible obtener sino un número reducido de bandas de proteína debido a que la mayor parte de las proteínas ribosomales son de carácter básico y con pesos moleculares muy estrechos que oscilan entre 15 000 y 35 000 daltones, lo que provoca superposición de algunas y la migración muy íntima de otras, con lo cual una clara distinción se hace imposible. En el caso de la proteína motivo de este trabajo (P1), no existen estos problemas ya que se identifica muy claramente

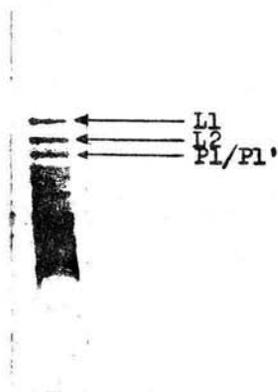


Figura 16. Patrón electroferético unidimensional de la proteína ribosomal total (80 a 100 g) obtenida en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. Se indica la banda correspondiente a P1/P1'.

como la tercer banda hacia abajo a partir del extremo superior del gel. Notese el doblete que aparece en la región correspondiente a la proteína Pl, el cual puede significar una leve diferencia en peso y/o carga entre Pl y Pl'; sin embargo no siempre aparece al realizar la electroforesis.

1.2. Electroforesis Bidimensional pH 3.2 x SDS.

Dada la poca resolución de la electroforesis unidimensional para caracterizar complejos proteicos ribosomales, se desarrolló la electroforesis bidimensional en geles de poli acrilamida (64), la cual es también un método rápido y muy-reproducible ya que las manchas de proteína ocupan posiciones específicas en la placa y sus valores de Rf pueden cuantificarse del punto de partida a ambas direcciones de migración, lo que permite una determinación inequívoca de su posición.

Gracias a la electroforesis bidimensional se ha podido caracterizar entre 70 a 80 el número de proteínas ribosomales en eucariotas y la subunidad a la que pertenecen (65). Dada la solubilidad de las proteínas ribosomales en urea, es comprensible la utilidad que representa una electroforesis bidimensional cuya primera dimensión se realice en un gel de poli acrilamida que contenga urea y que además sea ácido dada la basicidad de las proteínas ribosomales. En base a estas consideraciones se empleó el sistema bidimensional desarrollado por Panyim y Chalkley (66) modificado por Campos (62), quien ha caracterizado en este sistema electroforético a la fosfoproteína ribosomal Pl/Pl'. La figura 17 muestra el patrón electroforético bidimensional de la proteína-ribosomal total obtenido con el sistema pH 3.2 x SDS.

1.2.1. Localización Electroforética de Pl/Pl'.

La introducción de SDS propuesta por Campos (62) en la se

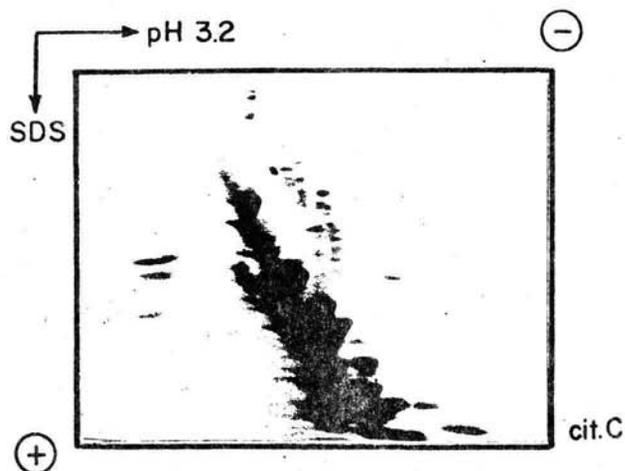


Figura 17. Patrón electroforético de proteína ribosomal total (600 a 700 ug) obtenida con el sistema bidimensional pH 3.2 x SDS.

gunda dimensión del sistema de Panyim y Chalkley, dió como resultado una mejor separación de las proteínas más pesadas entre éstas, Pl/Pl'. En la figura 18 pueden observarse las manchas de proteína correspondientes a Pl/Pl'. Notese que la forma fosforilada se queda al origen en la primera dimensión y en la segunda pueden verse claramente las dos formas además de un barrido que las interconecta. Comparese la resolución así obtenida con el sistema original mediante el cual Zinker y Warner describieron la presencia de Pl (figura 19).

Contar con un sistema electroforético que permite la resolución de Pl/Pl', que es el material de este trabajo, es indispensable para el conocimiento detallado de los componentes individuales de este complejo.

1.3. Migración de Pl/Pl' luego de tratar el paquete ribosomal con RNasas.

Se ha postulado que Pl/Pl' se encuentra unida a un fragmento de ARN ribosomal, lo que explicaría su retención al origen de la primera dimensión. Dado que existen proteínas ribosomales que se encuentran en una situación similar, es decir, unidas a un fragmento de ARN y al tratarlas con RNasas se altera su migración en el gel (67); se decidió tratar el paquete ribosomal con la RNasas T1 y A durante una hora a -37°C antes y después de la extracción de la proteína ribosomal total, a fin de saber si en Pl/Pl' ocurría algo similar. En la figura 20 se observan los geles correspondientes. El resultado en ambos casos fue similar, esto es, no hubo variación en la migración de la proteína Pl/Pl'.

2. Establecimiento de un Sistema Electroforético Tridimensional

A pesar de que recientemente se han desarrollado métodos para la separación de las proteínas ribosomales, tales como

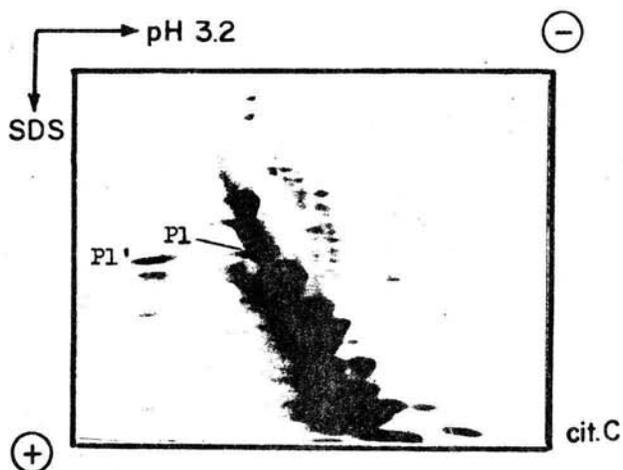


Figura 18. Caracterización de P1/P1' en el sistema de electroforesis bidimensional de ---- Panyim y Chalkley (66) modificado por Campos (62).



Figura 19. Patrón electroferético de proteína ribosomal total obtenida por Zinker y Warner con el sistema de Panyim y Chalkley (66).



Figura 20. Patrón electroferético bidimensional de proteína ribosomal total (600 a 700 µg) obtenida al tratar con la RNasa T1 y A-1 hora a 37°C, antes y después de extraer la proteína con ácido acético. No --hubo diferencia notable en ningún caso.

columnas (68), su uso resulta difícil para la identificación de cantidades muy pequeñas de proteína, por lo que sigue siendo más útil (al menos para este propósito) la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. A pesar de su gran capacidad de resolución, no se ha establecido del todo, si cada mancha en el gel bidimensional representa una sola especie de proteína; por lo que se ha desarrollado la llamada electroforesis tridimensional (69) que consiste en aislar las manchas de proteína obtenidas en una electroforesis bidimensional y someterlas una vez más a electroforesis.

El sistema parte de la electroforesis bidimensional pH 3.2 x SDS y varía en lo referente al gel utilizado para la tercera dimensión. En ocasiones como tercera dimensión se empleó un gel al 12% de poliacrilamida-SDS y en otras, el gel correspondiente a la primera dimensión del sistema pH 5.0 x SDS. En el primer caso, el procedimiento luego de recortar la mancha correspondiente a la proteína deseada, fue el decolearla en 50 ml aproximadamente de la solución 4.2.6. y mantenerla en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se colocó como muestra en una placa de gel de acrilamida-SDS y se corrió como un gel unidimensional tal como se describió en la sección de Métodos. El segundo caso se describe en el inciso 3.2. de esta sección.

La figura 21 muestra el resultado obtenido al someter a Pl/Pl' y el barrido, a una tercera dimensión en presencia de SDS. El método resultó útil al tratar de saber por comparación del peso molecular relativo, si la proteína con la que se trabajaba correspondía a Pl/Pl'. En la figura 22 se puede ver que la electroforesis tridimensional se puede aplicar con igual efectividad a las dos proteínas más pesadas.

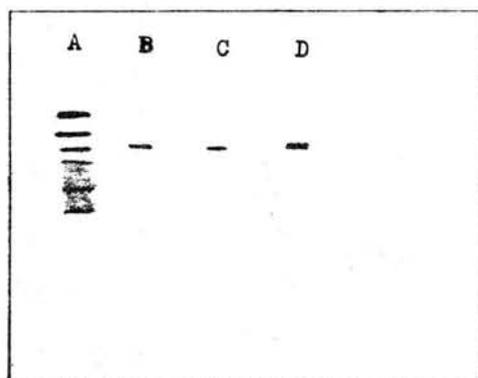


Figura 21. Sistema de electroferesis tridimensional pH3.2 x SDS. A) Proteína ribosomal total B) P1', C) Barrido, D) P1.

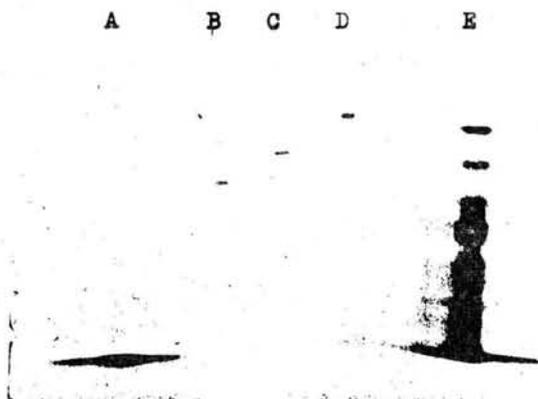


Figura 22. Sistema de electroferesis tridimensional pH 3.2 x SDS. A) elitecreme C, B) Pl, --- C) L2, D) L1, E) Patrón unidimensional - de proteína ribosomal total.

3. Caracterización Electroforética de Pl/Pl' en el Sistema Bidimensional pH 5.0 x SDS.

3.1. Patrón Electroforético de la Proteína Ribosomal Total.

Dentro del estudio electroforético de las proteínas ribosomales, se encuentran dos sistemas bidimensionales que han sido empleados con mayor amplitud y que se consideran indispensables en la aceptación de una proteína como ribosomal. - Tales sistemas son los de Kaltschmitt y Wittmann (pH 8.6 x pH 4.8) (70) y el de Mets y Bogorad (pH 5.0 x SDS) (71). El primero tiene la propiedad de discriminar entre proteínas ácidas y básicas, mientras que el segundo sólo permite la migración de aquellas proteínas cuyo punto isoeléctrico es mayor de pH 5.0 (recuérdese que la mayoría de las proteínas - ribosomales son básicas). Las figuras 23 y 24 muestran el - patrón electroforético de la proteína ribosomal total obtenido con estos sistemas respectivamente.

3.2. Localización Electroforética de Pl/Pl' en el Sistema --- pH 5.0 x SDS mediante Electroforesis Tridimensional.

En el inciso 2 se estableció un sistema electroforético - tridimensional en el cual como tercera dimensión se utiliza una placa de poliacrilamida-SDS, y en ocasiones el gel correspondiente a la primera dimensión del sistema pH 5.0 x - SDS. Se describió el procedimiento utilizado en el primer - caso, ahora en este punto se describe la secuencia empleada para el segundo caso. Como se menciona en su oportunidad, - el sistema electroforético tridimensional parte del sistema pH 3.2 x SDS. Una vez separada la proteína en cuestión, se colocó en 50 ml de una solución de etanol 50% ; ácido acético 7% y se mantuvo en agitación durante un mínimo de 30 - minutos. Completado ese tiempo, la rebanada de gel se transfirió a 20 ml de solución 4.3.2. y se agitó hasta que el -- gel se embebió de la solución (15 minutos aproximadamente).

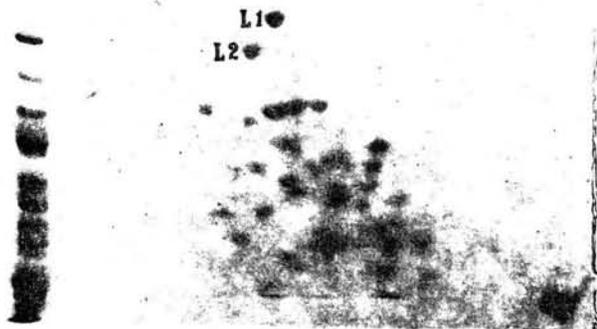


Figura 23. Patrón electroferético de la proteína ribosomal total resultante en el sistema de Mets y Bogerad (71). Notese la región vacía entre L2 y el resto de las proteínas.

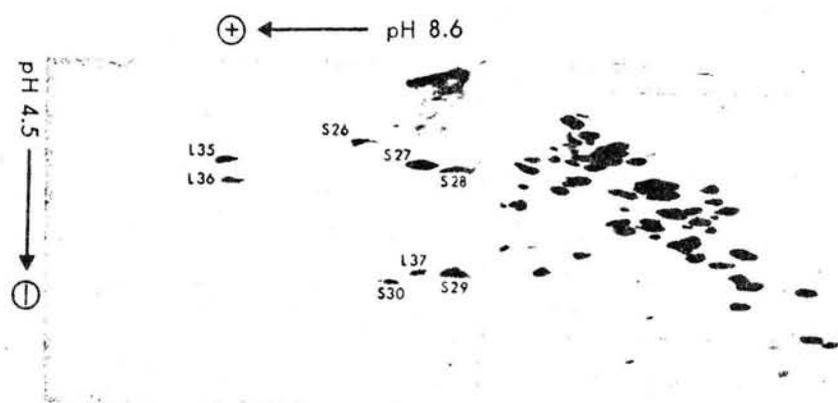


Figura 24. Patrón electroferético bidimensional obtenido con el sistema de Wittmann (70) en el cual pueden distinguirse las proteínas ácidas en el lado izquierdo (ánodo) y las proteínas básicas (la mayoría), al lado derecho (cátodo). Notese la mancha en la zona correspondiente al origen de la primera dimensión.

A continuación se colocó el gel sobre la primera dimensión (pH 5.0) y se recubrió con solución 4.3.2. y/o proteína ribosomal total que sirva como fondo. La figura 25 muestra la validéz del método para las proteínas L1 y L2, mientras que en la figura 26 se observan las localizaciones de P1 y P1', obtenidas mediante este sistema.

4. Determinación del punto Isoeléctrico de P1/P1'.

El isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida es el método selecto para determinar puntos isoeleéctricos (pI's) de polipéptidos o proteínas. Un perfil exacto del gradiente de pH a través del gel es indispensable para obtener cuantificaciones precisas de los puntos isoeleéctricos. Algunos métodos utilizados para determinar el perfil del gradiente de pH, se basan en recortar el gel en rebanadas delgadas, eluir con agua y cuantificar el pH potenciométricamente. En el presente trabajo se emplearon marcadores de pI's bien caracterizados, que se distribuyen como bandas nítidas permitiendo con ello mediciones simples pero confiables, del perfil del gradiente de pH a lo largo de los geles. Una ventaja -- más de dichos marcadores es que pueden utilizarse como indicadores de la calidad del enfoque e inclusive seguir el desarrollo de éste.

4.1. Punto Isoeléctrico de P1.

Se determinó empleando una vez más la electroforesis tridimensional, aunque en este caso la tercera dimensión se -- vió representada por un gel de disco para isoelectroenfoque como se describe en Métodos, a partir de la proteína aislada del sistema pH 3.2 x SDS. Solo debe mencionarse que se -- emplearon hasta cuatro fragmentos de gel sobrepuestos, sinque ello le restara resolución al sistema.

En la figura 27 se muestra el gel donde se observa P1 lue

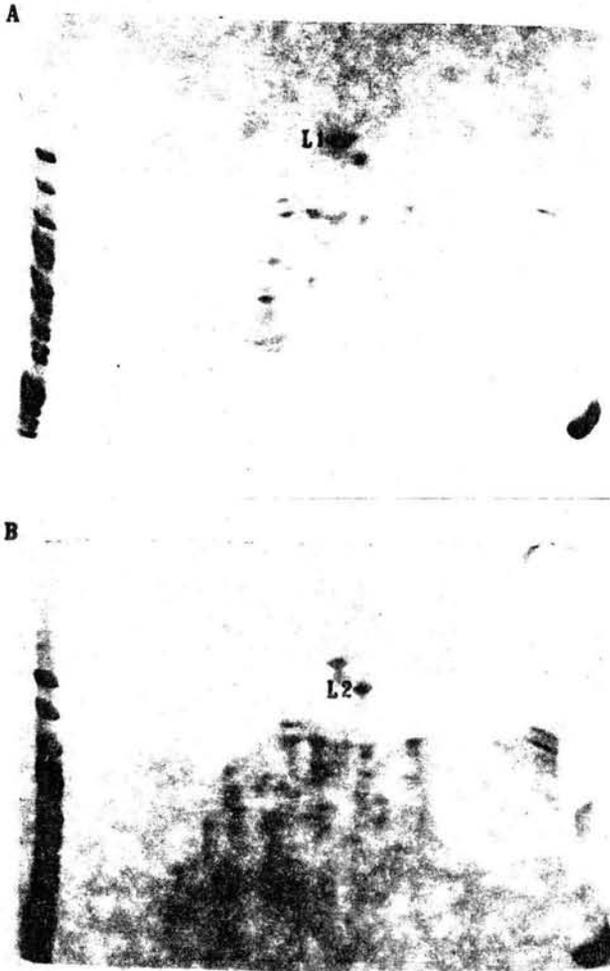


Figura 25. Electroforesis tridimensional. Sistema pH 3.2 x SDS seguido por electroforesis pH - 5.0 x SDS. A) L1 resalta entre un fondo de proteína ribosomal total. B) L2 resalta y se aprecia en concentración semejante a L1.

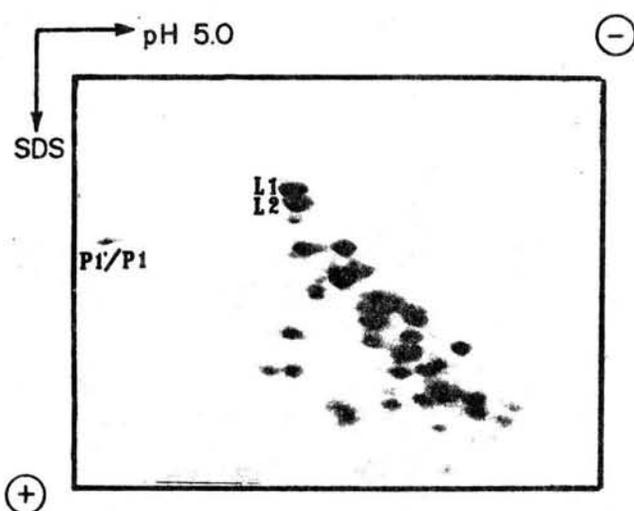


Figura 26. Caracterización de PI/PI' en el sistema pH 5.0 x SDS, mediante el sistema tridimensional.

go de haberse realizado el isoelectroenfoque, en un rango de pH de 3.5 a 10. En la figura 28 puede observarse el patrón electroforético de los marcadores con pI's conocidos y su designación. En la figura 29, se tiene por interpolación el pI de la proteína P1 obtenido a partir de la distribución isoelectrica de los marcadores con pI's conocidos.

Se realizó el isoelectroenfoque en un rango más estrecho de pH (2.5 a 6.5), a fin de establecer con mayor precisión el pI de P1; el resultado se muestra en la figura 29. Nótese que el número de bandas adjuntas a la banda principal es mayor en este caso, que cuando el isoelectroenfoque se realizó en el margen de pH de 3.5 a 10. El pI calculado fue de pH 4.71.

4.2. Punto Isoeléctrico de P1'.

El punto isoelectrico de P1' se determinó de igual forma que el correspondiente para P1. En la figura 31 puede apreciarse que P1' a diferencia de P1, aparece como una sola banda bien definida dentro del rango de pH de 3.5 a 10. Obsérvese además que tanto su posición en el gel como el valor de su pI son distintos a los correspondientes para P1.

5. Establecimiento de un Método de Electroelución de Proteínas

El conocimiento detallado de los componentes ribosomales, hace necesario el aislamiento individual de los mismos, lo cual no es fácil. En el presente trabajo se describe un método de electroelución a partir de geles al 12% de poliacrilamida-SDS cuyas características principales son: rapidez, sencillez y sobre todo un alto rendimiento de recuperación. Este método se basa en la carga negativa que adquiere la proteína luego de permanecer en contacto con SDS y con ello su migración hacia el ánodo, al ser sometida a una corriente eléctrica de 110 V durante 4 horas. Las tres proteínas -

(+)



(-)

Figura 27. Electroforesis tridimensional en la cual la tercera dimensión corresponde al isoelectroenfoco de P1 en un range de pH - 3.5 a pH 10. Notese la presencia de bandas débiles debajo de la banda principal que corresponde a P1.

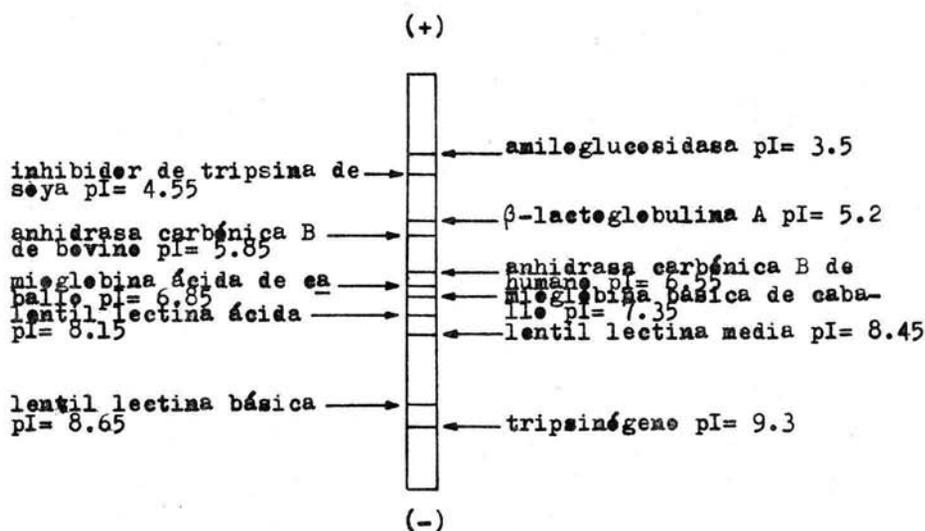


Figura 28. Patrón electroferético de los marcadores con pI's conocidos.

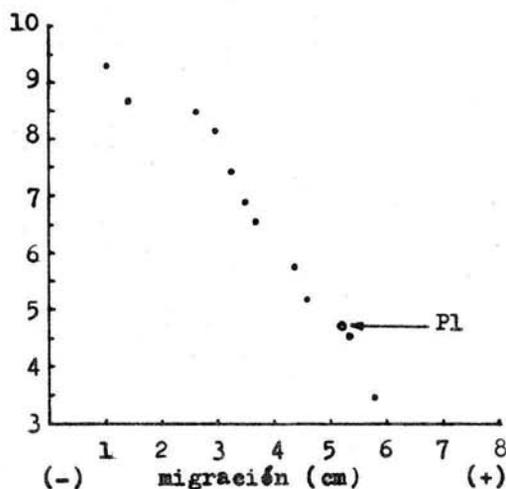


Figura 29. Determinación del pI de P1 por interpolación. pI= 4.71

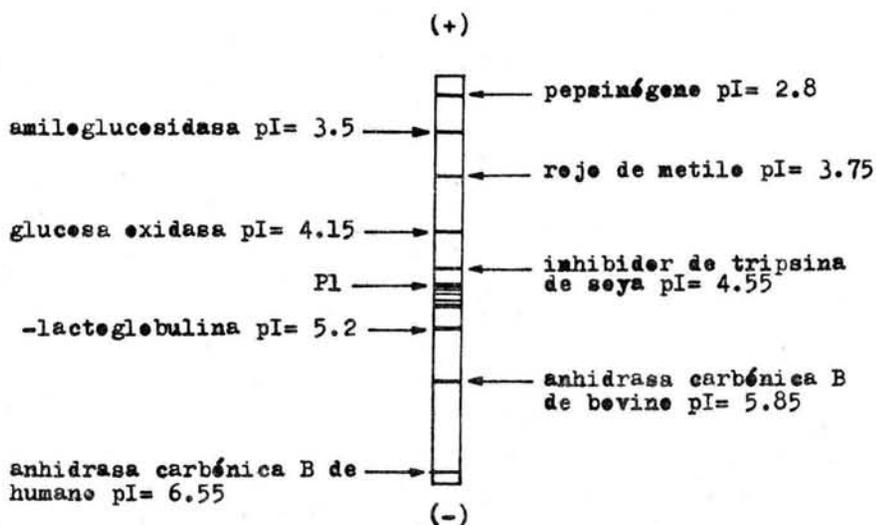


Figura 30. PI sometida a isoelectroenfoque en un rango más estrecho de pH. Se señalan los marcadores y sus pI's respectivos. Obsérvese el incremento en el número de bandas se--cundarias.

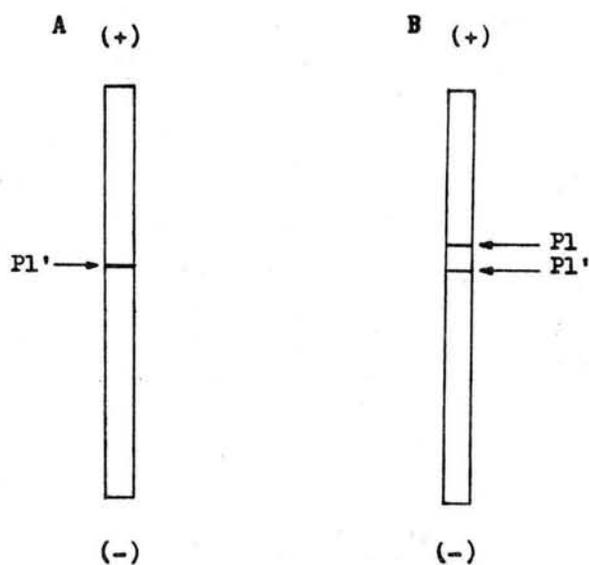


Figura 31. A) Localización isoelectroferética de pI' .
 B) Comparación de la localización de pI' con la de pI .

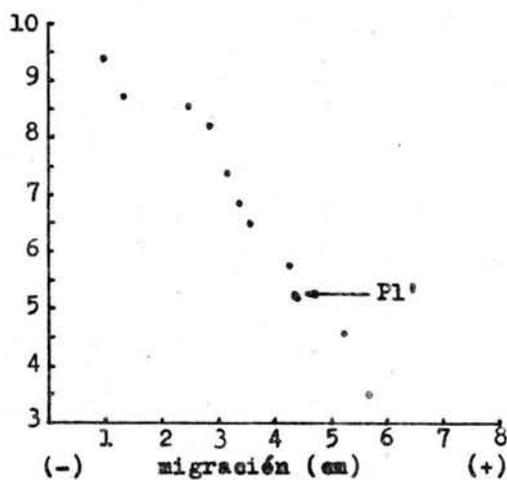


Figura 32. Determinación gráfica del punto isoelectroferético de pI' . $pI = 5.2$

más pesadas obtenidas mediante electroforesis bidimensional pH 3.2 x SDS, que incluyen a Pl/Pl', se sometieron a este procedimiento y el resultado se muestra en la figura 33.

6. Identificación del Caracter de Proteasa de Pl.

6.1. Incubación de Pl a 4°C luego de su Electroelución.

Durante el desarrollo del método de electroelución referido anteriormente, se encontró que la proteína Pl presenta una actividad enzimática de tipo proteasa. Luego de haber sido sometida a electroelución, la solución con la proteína - Pl, se mantuvo alrededor de 14 horas en refrigeración para su posterior análisis electroforético en gel unidimensional. Al realizarse este último, se encontró una banda principal correspondiente a Pl y por debajo de ésta una serie de bandas bien definidas que sugieren degradación. Este hecho se observa claramente en la figura 35. No se realizó ningún otro estudio referente a la especificidad o condiciones óptimas de dicha actividad proteolítica.

6.2. Tratamiento con Fosfatasa Alcalina.

Con el objeto inicial de saber si la migración electroforética de Pl' podía alterarse al eliminar sus grupos fosfato y concentrarse en la posición correspondiente a Pl, el paquete ribosomal fue sometido a un tratamiento con fosfatasa alcalina antes y después de extraer la proteína con ácido acético, en forma análoga al tratamiento con RNasas. La proteína obtenida en ambos casos fue analizada electroforéticamente en el sistema pH 3.2 x SDS. El resultado del tratamiento con fosfatasa alcalina luego de haber extraído la proteína fue negativo, es decir, el patrón original (figura 17) se mantuvo sin alteración alguna (no se muestra el gel correspondiente); mientras que el resultado obtenido al

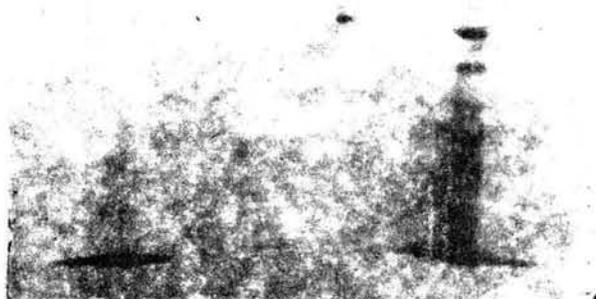


Figura 33. Electreferesis unidimensional de proteina purificada mediante el método de electroelución. Los detalles se describen en el texto. A) citocromo C, B) Proteína Ll, -- C) Proteína ribosomal total.

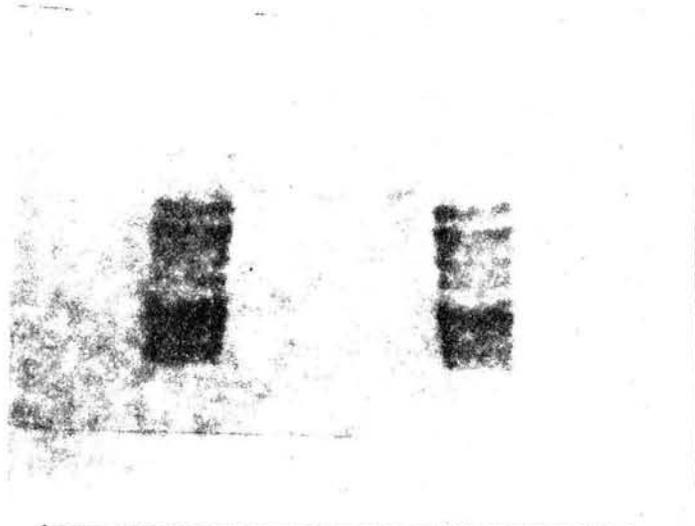


Figura 34. Electroforesis unidimensional de la prote_ína Pl purificada mediante el método de electroelución. A y C corresponden a prote_ína ribosomal total utilizada como marcador, B) Pl.

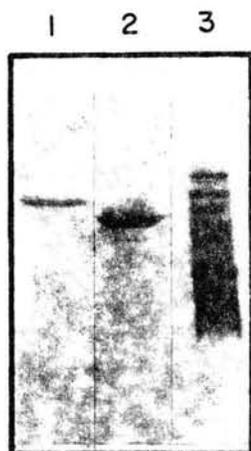


Figura 35. Análisis electroferético unidimensional de P1 electroeluida y mantenida a 4°C - durante 14 horas aproximadamente.

tratar previamente a la extracción de proteína es el que se muestra en la figura 36, en la cual se observa que lejos de aumentar la concentración de Pl, ésta desaparece al igual que Pl' y el barrido que las interconecta. Este resultado es congruente con el hallazgo de la actividad proteolítica asociada a Pl y sugiere un mecanismo de autoregulación en la concentración de Pl mediado por la fosforilación-desfosforilación de la misma.

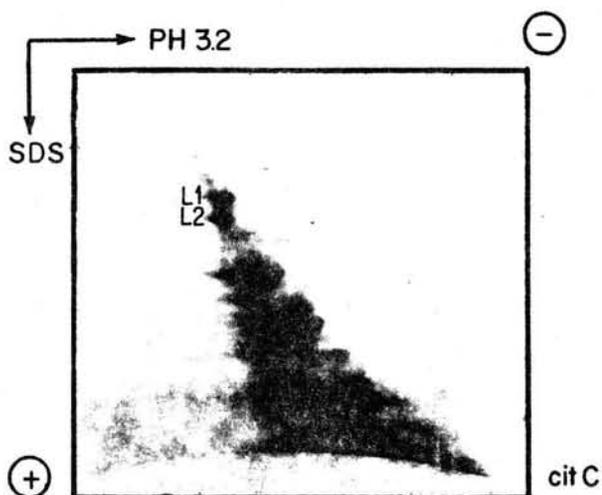


Figura 36. Patrón electroforético obtenido al remover el fosfato de los ribosomas con fosfatasa alcalina antes de la extracción de proteína con ácido acético. Aproximadamente 10 - D.O. de ribosomas se incubaron a 37°C durante una hora con 1 ml de fosfatasa alcalina (1 mg/ml) en 0.1M Tris, 0.4M NaCl, -- pH 7.6 (40).

DISCUSION

1. Características Electroferéticas de Pl/Pl'.

1.1. Electroforesis Unidimensional.

La electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida es un método simple y rápido para caracterizar proteínas debido a que las separa no solo de acuerdo a la carga, sino también de acuerdo al tamaño y forma de la molécula. Por lo anterior, se utilizó inicialmente para identificar a Pl/Pl' entre el conjunto de proteínas ribosomales. En su trabajo - Campos (62) señala que Pl/Pl' corresponde a la tercera banda en dirección al ánodo a partir del origen (figura 16) en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. Debe notarse la presencia de un doblete en la región señalada, - que llevó a pensar inicialmente que podría tratarse de una diferencia en peso, carga o ambas entre Pl y Pl'. Como se - señala en la sección de Resultados, dicho doblete no es reproducible, lo que sugiere que existen dos posibles explicaciones: una, pensar en una posible diferencia en cuanto al número de residuos fosfato unidos a la proteína bien como - condición o como consecuencia de su función, a semejanza de S6 que se ha encontrado en un estado multifosforilado (50)- y dos; una leve diferencia entre sus estructuras primarias, argumento poco probable ya que de ser el caso, el doblete - señalado se observaría claramente en la mayoría de las veces. Campos (62) intentó probar la primera de las posibilidades mencionadas mediante marcaje con ^{32}P , a semejanza del hallazgo de S6 en estado multifosforilado, mas no logró demostrar a Pl y Pl' como bandas bien diferenciadas. El resul

tado aporta una evidencia — aunque débil — de un estado multifosforilado que dadas las experiencias actuales, sólo se podría comprobar mediante un ensayo de isoelectroenfoque con proteína marcada con ^{32}P .

La electroforesis unidimensional resulta insuficiente --- cuando la mezcla a ser examinada consiste de numerosas proteínas de carga y tamaños similares, como es el caso del ribosoma. En el presente trabajo se empleó únicamente como método de identificación y para confirmar la presencia de --- Pl/Pl' --- que salve la cuestión del doblete, la región en la que migró, nunca varió --- y el comportamiento electroforético del resto de la proteína ribosomal.

1.2. Electroforesis Bidimensional pH 3.2 x SDS.

El empleo de este sistema electroforético, precisó aún --- más la identificación de Pl/Pl' entre el total de proteína --- ribosomal. Con la modificación introducida por Campos -- (Métodos 7.2.) se logran apreciar claramente las dos formas de Pl interconectadas por un barrido (figura 18), lo que parece apoyar la suposición de que Pl/Pl' se encuentra en diferentes estados de fosforilación. Al comparar el patrón electroforético así obtenido, se aprecia una mayor resolución que con el descrito por Zinker y Warner (figura 19). Incluso permite la separación de Pl, Pl' y el barrido a fin de realizar estudios de manera separada; además la distancia de migración o la resolución no dependen en un amplio margen, de la concentración de proteína. Otro aspecto importante es que en este sistema la forma fosforilada de Pl se queda en el origen de la primera dimensión, lo cual puede deberse a tres posibles causas: 1) La unión entre Pl/Pl' y una molécula de ARN, específicamente el rARN 5S (63) cuyos grupos fosfato provoquen dicha retención; 2) Que Pl/Pl' po-

sea varios grupos fosfato que sean los responsables del fenómeno; 3) Que se den los dos casos anteriores de manera conjunta. Las posibles razones enumeradas son difíciles de dilucidar marcando con ^{32}P únicamente. Se ha comprobado que algunas proteínas ribosomales unidas a moléculas de ARN sufren alteraciones electroforéticas luego de haber sido expuestas a la acción de RNasas (67). Tomando lo anterior como base, se sometió una muestra de proteína ribosomal al efecto de las RNasas T1 y A, antes y después de extraer la proteína con ácido acético. No se apreció ninguna alteración significativa en la migración de Pl/Pl' (figura 20). Pese a que esta prueba sugiere la presencia de varios grupos fosfato en la proteína, la molécula de ARN pudiera estar protegida de alguna forma y no se descarta totalmente su presencia. En este punto existe cierta divergencia entre las hipótesis de Campos y las derivadas de este trabajo, ya que mientras él se inclina a sugerir que el fosfato de la molécula de ARN es responsable principal de la retención al origen (lo que no explica totalmente la presencia del barrido que interconecta a Pl y Pl'), aquí se sugiere de acuerdo a los resultados obtenidos, la existencia de un estado multifosforilado y que la presencia de ARN (si es que se encuentra unido en las condiciones de trabajo), sea un fragmento suficientemente pequeño para que las RNasas no puedan actuar sobre él. Lo cierto es que no se tiene evidencia definitiva al respecto.

El sistema electroforético pH 3.2 x SDS sirvió como fuente de obtención de Pl, Pl' y el barrido, para trabajos posteriores. Además sirvió como referencia electroforética del comportamiento de Pl/Pl' luego de haber sido sometida a diversos tratamientos.

2. Caracterización Electroforética de Pl/Pl' en el Sistema Bidimensional pH 5.0 x SDS mediante Electroforesis Tridimensional.

Con la idea de establecer si las manchas obtenidas en el sistema de electroforesis bidimensional pH 3.2 x SDS (Pl, - Pl' y el barrido que las interconecta) correspondían al mismo tipo de proteína, se procedió a establecer un sistema electroforético que permitiese probar tal suposición, es decir, desarrollar un método adecuado para el análisis de proteínas individuales. Con esta idea como objetivo se llegó al establecimiento de una electroforesis tridimensional que permitió probar la identidad electroforética entre Pl, Pl' y el barrido (figura 21). A fin de comprobar la efectividad del procedimiento y eliminar la sospecha de algún artificio técnico, las proteínas L1 y L2 fueron sometidas al mismo -- tratamiento, obteniéndose resultados positivos (figura 22).

Probada la efectividad del método en cuestión, únicamente se adaptó al sistema bidimensional pH 5.0 x SDS con el fin de caracterizar a Pl/Pl' en éste, ya que no fue visualizada ni por Zinker y Warner (56) ni por Warner y Gorenstein (55) Per el comportamiento electroforético de Pl, Zinker y Warner concluyeron que podía tratarse de una proteína neutra y su aparente ausencia del sistema pH 5.0 x SDS pareciera con firmar tal suposición.

Nuevamente las proteínas L1 y L2 fueron sometidas a electroforesis tridimensional como prueba control. Los resultados obtenidos aseguran la eficiencia del método, identificándose por vez primera a Pl/Pl' en el sistema pH 5.0 x SDS (figura 26). Nótese la localización de Pl en el sistema de Mets y Bogorad; si se correlaciona este resultado con los patrones electroforéticos de proteína ribosomal total a --- pH 3.2 x SDS y unidimensional, se aprecia en los tres, que -

Pl se localiza como la tercer mancha en dirección al ánodo a partir del origen. De hecho la correspondencia con la proteína ribosomal total utilizada como marcador es muy estrecha lo que da una prueba más de la presencia de Pl/Pl' en el ribosoma. Resta por aclarar el motivo por el que se mantiene cerca del origen durante la primera dimensión. A este respecto la determinación de su pI puede proporcionar la información necesaria, por lo que el método tridimensional -- propuesto se aplicó a la obtención de dicho valor.

Respecto al método en sí, es importante señalar que durante el transcurso de la tercera dimensión, el azul de Coomassie unido a las proteínas, desde la segunda dimensión, no migró. Se recomienda no considerar la migración de dicho colorante como indicador de la migración de la proteína en cuestión. La visualización de Pl en el sistema tridimensional depende de la cantidad de proteína con la que se trabaja, en condiciones normales no se logra visualizar sino una mancha muy ligera la cual es arriesgado identificar como -- Pl. La misma cantidad de Pl aplicada al sistema pH 3.2 x -- SDS no se observa en igual cantidad ni claridad en el sistema pH 5.0 x SDS; esto quizá sea la razón por la que Zinker, Warner y Gerenstein no la visualizaron en sus experiencias. De hecho Pl se observa en el patrón electroforético obtenido por Warner y Gerenstein (notese la parte izquierda de la figura 23) solo que de manera tenue por lo que quizá le consideraron un artificio técnico.

Finalmente debe considerarse que debido a la eficiencia -- en cuanto a rendimiento, rapidez y optimización del material, este sistema proporciona un método conveniente para la identificación de cantidades relativamente pequeñas de -- proteína. Su utilización puede ampliarse a estudios de co--

rrespondencia entre proteínas ribosomales a lo largo de la filogenia o sistemas electroforéticos diferentes, con el fin de uniformar los sistemas de nomenclatura, o bien en la caracterización de las propiedades de una proteína en particular. Debe resaltarse la utilidad que este método puede representar en el aislamiento de proteínas ribosomales de eucariotas superiores debido precisamente a la baja cantidad que de ellas se obtiene por métodos convencionales. También permite realizar trabajos de correlación y homología con las proteínas ribosomales de E. coli, por ejemplo, que son hasta el momento las mejor caracterizadas tanto estructural como funcionalmente.

3. Determinación del pI de Pl/Pl'. ¿ Multifosforilación ?

Diseñado el sistema tridimensional de electroforesis, se aplicó a la determinación del pI de Pl/Pl' apoyados en el método descrito por Gen-Ichi. El valor del pI para Pl así obtenido, se presenta en la figura 29, mientras que en la figura 28 se muestra el patrón electroforético de los marcadores con pI's conocidos que se utilizaron en la determinación. El valor del pI obtenido para Pl (4.71) permite explicar el hecho de su pobre migración durante la primera dimensión tanto en los geles de pH 8.6 y pH 5.0. Así mismo se explica que en presencia de SDS, se diferencie básicamente -- por su peso y no por su carga (recuerdese su peso estimado en 40 000 daltones).

El número de bandas obtenidas a partir de Pl (figura 30) lleva a suponer un estado multifosforilado para esta proteína. Cuando el isoelectroenfoco se realizó en un rango amplio de pH (3.5 a 10) únicamente se apreció una banda ancha correspondiente a Pl y por debajo de ésta, algunas bandas muy tenues que pudieran ser parte del barrido, ya que se te

mó una ligera fracción de éste junto con Pl. Al estrechar los límites de pH en el isoelectroenfoque, el número de bandas aumentó, lo que lleva a pensar en: 1) Que se trata de un gran número de isoformas de Pl, diferentes en la secuencia primaria (algo poco probable dado el número de bandas), o bien 2) Que la diferencia está determinada por el número de grupos fosfato unidos a la proteína, es decir, diferentes estados de fosforilación de la misma proteína a semejanza de S6 (nótese la diferencia de pI entre Pl y Pl')(figuras 29 y 32).

Este resultado es muy importante no solo por el hecho de conocer el valor del pI de Pl e inferir en base a éste la causa de su aparente ausencia en los sistemas electroforéticos bidimensionales, sino que además permite asegurar que si Pl se encuentra unida a una molécula de ARN, aquella es quien aporta principalmente la carga negativa de los fosfatos (que provoca la retención al origen durante la primera dimensión) y no el ARN. Más aún, en base a la ausencia de pruebas en contra, hasta el momento y al resultado obtenido al tratar con RNAsas (figura 36), se postula que Pl no está unida a molécula alguna de ARN bajo las condiciones de trabajo aquí señaladas, sino que se trata realmente de una proteína multifosforilada por condición o a consecuencia de su función.

Es interesante el que Pl sea una proteína multifosforilada ya que ello posiblemente está relacionado con la función que desempeña en el ribosoma. Sólo existe una duda respecto a la multifosforilación: ¿ es el estado multifosforilado de Pl, consecuencia de su función ? • ¿ los diversos estados obedecen a una desfosforilación paulatina de Pl durante su aislamiento ? Las preguntas anteriores parecieran no tener-

cabida dada las evidencias hasta aquí consideradas, sin embargo la discusión que se asienta en el inciso 5, justifica su planteamiento. Las respuestas se lograrían sin duda, marcando a P1 con ^{32}P "in vivo" y luego con ^{14}C "in vitro" a semejanza de la estrategia con la que se estableció que S6 contiene cantidades crecientes de fosfato (72). La caracterización electroforética de las diferentes bandas presentes en el isoelectroenfoque, incidirá directamente sobre la respuesta a esas preguntas. La relación aquí establecida entre P1 y S6 no es en sentido ni estructural ni funcional, sino con miras a una posible aplicación de la metodología utilizada en el estudio de S6 hacia P1; quien pese a tener características fisicoquímicas diferentes, comparte el ser fosfoproteína ribosomal multifosforilada y por ende jugar un papel importante en la actividad ribosomal, dentro del proceso de la biosíntesis proteica.

Por lo que respecta al método, es muy confiable en cuanto a la reproducibilidad de los resultados. Sin embargo deben hacerse dos indicaciones: 1) Respecto a la tinción del gel, resulta más adecuado teñir con azul de Coomasie disuelto en etanol-acético-agua (10:25:65) que seguir lo sugerido por Gen-Ichi de disolver el Coomasie en ácido perclórico. 2) - No tomar como señal de migración de la proteína durante el isoelectroenfoque, al azul de Coomasie (unido a la proteína desde la segunda dimensión) ya que lo hace en sentido opuesto a aquella. Por último, este método permite la optimización tanto del tiempo como del material, amén de su sencillez.

4. Método de Electroelución.

El método de electroelución descrito en este trabajo, surgió como derivación del proceso de aislamiento de la proteí

na objeto de investigación. Teniendo un sistema de electroforesis tridimensional funcional y eficaz que permite estudiar la fracción de gel que contiene a Pl, el siguiente paso ambicionado lo constituía la eliminación del gel para obtener y conservar a Pl completamente aislada. Partiendo del conocimiento de la migración de Pl en presencia de SDS, 4 fragmentos de gel conteniendo a Pl se colocaron en un matraz Erlenmeyer con 25 ml de la solución 4.2.6. y se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, con un cambio de la solución a los 15 minutos. Lo anterior con la finalidad de introducir el SDS a la muestra y ajustar su pH. Se fragmentó la muestra y se colocó en una cámara de elución que contenía solución 4.1.7. (figuras 37 y 38), y se aplicó corriente eléctrica (110 V) tal como si se tratara de una electroforesis unidimensional durante 4 horas. Al final se obtuvo una muestra de 200 μ l aproximadamente, conteniendo a la proteína deseada. Obtenida la solución con proteína, se optó dado el volumen y la dificultad para eliminar el SDS, por liofilizar inmediatamente. La muestra así lograda se sometió a electroforesis para corroborar la presencia de la proteína. Nuevamente las proteínas L1 y L2 se utilizaron como testigo, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 33. Como puede observarse, el aislamiento es aceptable si se toma en cuenta que la proteína se había sometido a electroforesis bidimensional.

Por los resultados obtenidos, este método se muestra efectivo, rápido y sencillo. La recuperación fue del 90% aproximadamente. Así mismo ofrece ventajas sobre otros métodos; una de ellas es que se puede aplicar inmediatamente después de obtener el gel muestra y que no requiere preparación de material adicional. Esta técnica redundará en una acelera--

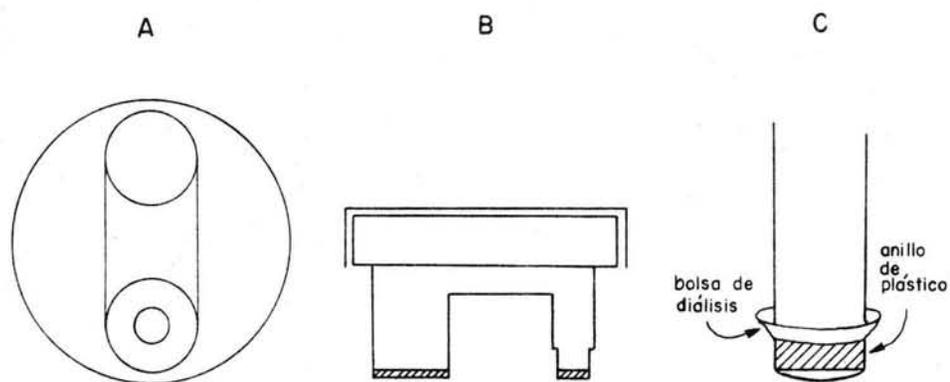


FIGURA 37. Material empleado en el método de electroelución desarrollada en este trabajo (detalles en el texto); A.- Vista frontal, B.- Vista lateral; C.- Detalle de uno de los recipientes de la cámara de electroelución.

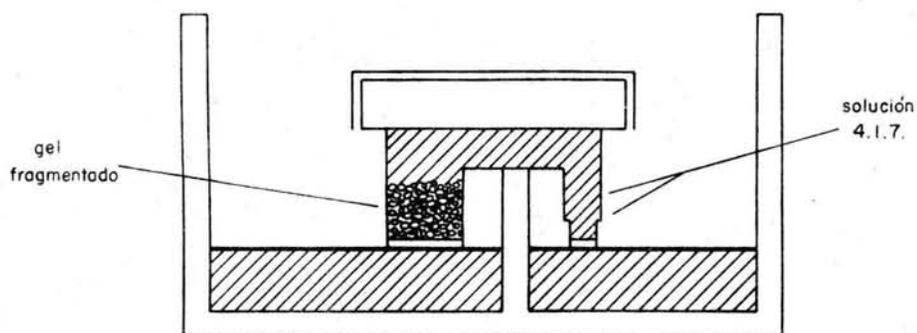


FIGURA 38. Esquema del montaje del material para la técnica de electroelución desarrollada en este trabajo.

ción en el estudio no solo de P1 sino del resto de proteínas ribosomales si se conjuga con otras técnicas como las ya expuestas en este trabajo. Por lo que al método se refiere, debe prevenirse de nueva cuenta que no se toma la movilidad del azul de Coomasie como referencia de la migración de la proteína ya que lo hace primero que ésta.

5. P1 ¿Primer Fosfoproteína Ribosomal con Función Establecida?

Luego de 1970, año en que Kabat describió por vez primera la presencia de fosfoproteínas ribosomales, se pensó que a corto plazo se entendería la función de dicha fosforilación, esperando sobre todo que se tratase de un mecanismo de regulación de la actividad ribosomal. Aunque tal hallazgo no se produjo y a la fecha se desconoce su función, existen buenas razones para creer que la fosforilación de tales proteínas tiene un significado importante, más aún si se tiene en cuenta que dicho fenómeno de fosforilación existe en todo el reino eucariota. Hasta el momento la fosforilación de las proteínas ribosomales sólo es motivo de especulación, tales como la de Kabat mismo quien tomando como base diferencias en el grado de fosforilación entre monosomas y polisomas, sugirió inicialmente que la fosforilación podía causar la inactivación de los ribosomas (se demostró en varios tipos celulares que tal diferencia no existe); o bien, que algunas proteínas ribosomales fosforiladas pueden presentar un punto intermedio en la reacción de GTPasa durante el proceso de síntesis proteica en el que participan. Se ha establecido el recambio de proteínas ribosomales fosforiladas entre el ribosoma y la fracción citosólica (56) que sugiere que la unión y desunión de tales proteínas al ribosoma, influye de alguna manera sobre la actividad del organelo.

P1/P1' es una fosfoproteína ribosomal del tipo de recam--

bio y si se añade que es multifosforilada, se tienen elementos para creer que juega un papel trascendente dentro de la actividad ribosomal. Más aún, una de las aportaciones de este trabajo es el hallazgo de una actividad de tipo proteasa por parte de P1, lo que se aprecia electroforéticamente luego de mantener a P1 electroeluida en solución, a 4°C durante 14 horas aproximadamente (figura 35). Pese a que no se estableció la especificidad ni las condiciones óptimas de dicha actividad, no se pueden pasar por alto las implicaciones que puede tener el hecho de la autodegradación. ¿Cuál es la posible implicación que tiene dicha actividad proteolítica? Hasta el momento no se ha reportado actividad semejante en fosfoproteína ribosomal alguna.

Como es sabido, el fosfato juega un papel importante en los procesos celulares. Por ejemplo, es el punto central de las reacciones metabólicas de degradación, impide la salida de nutrientes celulares al ser fosforilados, etc.; pero además es importante en la actividad de ciertas enzimas en formas interconvertibles con distinta actividad. A menudo, el mecanismo de interconversión consiste en la fosforilación, es decir, la unión covalente de un grupo fosfato proporcionado por el ATP, bien para activar o inactivar a la enzima. Por ejemplo, la glucógeno fosforilasa que degrada el glucógeno, es más activa en el estado fosforilado; en cambio, la glucógeno sintetasa cambia en el sentido opuesto. ¿Ocurrirá algo similar en el caso de P1? Recuerdese que P1 es una proteína que se une al ribosoma una vez que las subunidades de éste salen del núcleo. ¿Está P1 fosforilada al unirse a la subunidad 60S? Resulta atractivo pensar — sin ser más — que especulación — en P1 desfosforilada, que al fosforilarse se une al ribosoma y que de alguna manera influye en-

la actividad del mismo, por ejemplo que lo active y que una vez terminada la función ribosomal, Pl se desfosforile hasta separarse. Aún más, Pl regularía su propia concentración mediante autodegradación una vez perdidos los grupos fosfato (veáse la figura 36). Lo anterior puede parecer muy simple y especulativo, mas no es el caso y realmente se deriva de los siguientes argumentos:

1. Se ha expuesto el hecho de la interconversión enzimática a causa de que Pl mostró tener actividad autoproteolítica en el estado desfosforilado (figura 35);
2. En la figura 27 se aprecia que al realizar el isoelectroenfoque de Pl desfosforilada, se observa más de una banda;
3. Tales bandas sólo aparecen al enfocar a Pl desfosforilada y no al enfocar a Pl fosforilada.

Esto sugiere la idea de una interconversión mediante fosforilación-desfosforilación que proporciona la unión al ribosoma y la actividad proteolítica respectivamente. Por otra parte, la unión de Pl al ribosoma una vez que ha alcanzado cierto grado de fosforilación es factible como hipótesis, dadas las evidencias de que Pl se une al rARN 5S (63).

En base a los resultados del presente trabajo, se postula que Pl en el estado fosforilado se una al rARN 5S y se convierta así, en un tipo de regulación de la actividad ribosomal.

CONCLUSION

En este trabajo se estableció un sistema electroforético tridimensional en geles de poliacrilamida óptimo para el estudio de algunas características fisicoquímicas de la fosfoproteína ribosomal P1 de Saccharomyces cerevisiae. Permitió visualizar por vez primera a P1 en el sistema electroforético bidimensional pH 5.0 x SDS. Los resultados obtenidos reafirman la naturaleza ribosomal de P1.

El pI de 4.71 obtenido para P1 explica su comportamiento electroforético diferente del resto de las proteínas ribosomales y el porqué de la dificultad para visualizarla en el sistema electroforético bidimensional pH 5.0 x SDS. Así mismo evidencia que P1 es una proteína multifosforilada. Los grupos fosfato son quienes proporcionan la carga negativa responsable de que P1 se retenga al origen de la primera dimensión en los sistemas electroforético bidimensionales en geles de poliacrilamida pH 5.0 x SDS y pH 8.6 x pH 4.5.

En el presente trabajo no se aclara totalmente si la multifosforilación de P1 es resultado de o condición para su función. Sin embargo en base a las siguientes evidencias:

- 1) P1 es una fosfoproteína ribosomal de recambio entre el ribosoma y la fracción citosólica.
- 2) P1 se asocia con el rARN 5S.
- 3) La pérdida de los grupos fosfato de P1, conlleva a su separación del ribosoma.
- 4) En el estado desfosforilado P1 presenta actividad proteolítica (autoproteólisis).

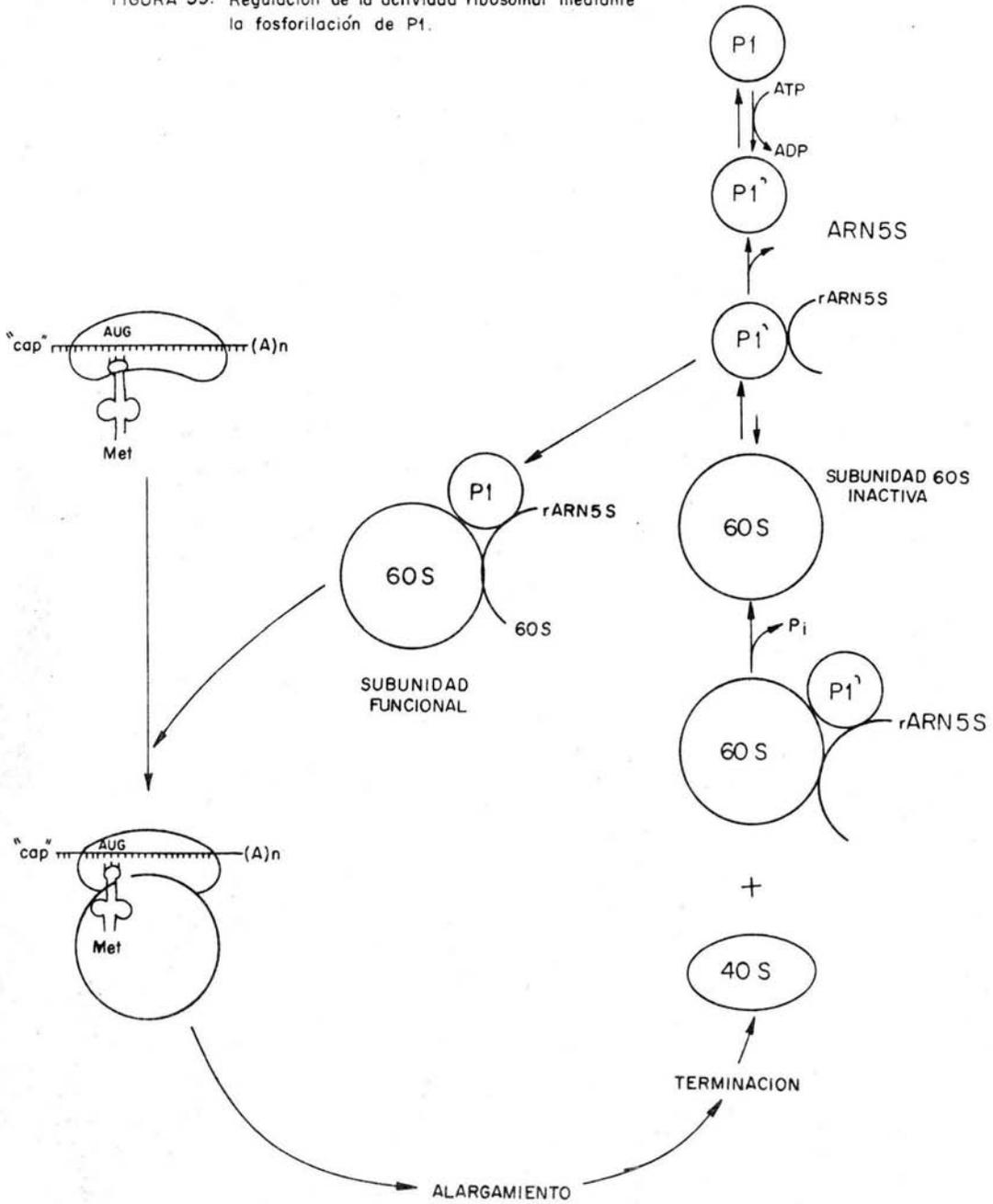
se plantean las siguientes hipótesis:

1. P1 es una proteína ribosomal que al fosforilarse se aso-

cia al rARN 5S y este complejo se une a la subunidad 60S activandola para desempeñar su función dentro de la biosíntesis de proteínas. Una vez completada la función de la subunidad ribosomal 60S, el complejo Pl'-rARN 5S se disocia de la subunidad y en un segundo paso, Pl y el rARN 5S se disocian por la desfosforilación de Pl.

2. Pl permanece en un estado de fosforilación mínimo que no es suficiente para su unión con el rARN 5S.
3. Pl autorregula su concentración en la poza citoplasmática mediante un mecanismo de autoproteólisis.

FIGURA 39. Regulación de la actividad ribosomal mediante la fosforilación de P1.



BIBLIOGRAFIA

1. Beerseek, H. y col. (1950) *J. Biol. Chem.* 184: 529-43.
2. Siekevitz, P., Zamecnick, P.C. (1951) *Fed. Proc.* 10: 246-7
3. Palade, G.E. (1955) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 59-67.
4. Kazuo, T., Kikue, O. (1975) *Biochim et Biophys Acta.* 402:-214-29.
5. Brimacombe, R., Stöffler, G., Wittmann, H.G. (1978) *Ann. -- Rev. Biochem.* 47: 217-49.
6. Wool, I.G. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48: 719-54.
7. Kirsten, G. (1982) *Trends in Biochem. Sciences.* 7: 65-7.
8. Moore, P.B. (1979) en *Ribosomes*, ed. Chamblis, G., Craven, G.R., Davies, J., Davies, K., Kahan, L. y Nemura, M. pp. -111-133. University Park Press, Baltimore. 984 pp.
9. Stöffler, G. y col. (1979) ver referencia 8, pp. 171-205.
10. Lake, J.A. (1979) ver referencia 8, pp. 207-36.
11. Warner, J.R., Rich, A., Hall, C.E. (1962) *Science.* 138: --139.
12. Metspalu, Andrés y col. (1978) *Eur. J. Biochem.* 91: 73-81.
13. Nielsen, P.J., Thomas, G., Maller, J.L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2937-41.
14. Shelton, E., Kuff, E.L. (1966) *J. Molec. Biol.* 22: 23-31.
15. Nemura, Y., Blebel, G., Sabatini, D.D. (1971) *J. Mol. Biol.* 60: 303-23.
16. Lake, J.A., Sabatini, D.D., Nemura, J. (1974) en *Ribosomes* ed. Nemura, M., Tissières, A., Lengyel, P. pp. 543-57. --- Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Lab. 930 pp.
17. Emanuilov, I., Sabatini, D.D., Lake, J.A., Freienstein, C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1389-93.
18. Boublik, M., Hellmann, W. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. -- USA.* 75: 2829-33.
19. Florende, N.T. (1969) *J. Cell. Biol.* 41: 335-39.
20. Loening, U.E. (1968) *J. Mol. Biol.* 38: 355-65.

21. Weinberg, R.A., Penman, S. (1970) *J. Mol. Biol.* 47: 169-78
22. Celter, R., McPhie, P., Gratzner, W.B. (1967) *Nature* 216: - 864.
23. De Robertis, E.D.P., De Robertis, E.M.F., Saez, F.A. (1977) *Biología Celular*. ed. El Ateneo. 9a. edición. pp. 338-55.- Buenos Aires, Argentina. 528 pp.
24. Wagner, E.S., Penman, S., Ingram, V. (1967) *J. Mol. Biol.*- 29: 371-87.
25. Udem, S.A., Warner, J.R. (1972) *J. Mol. Biol.* 65: 227-42.
26. Pene, J., Knight, E., Darnell, J.E. (1968) *J. Mol. Biol.* - 33: 609-23.
27. Sy, J., Mc Carty, K.S. (1970) *Biochem. Biophys.* 199: 86-94
28. Udem, S.A., Kaufman, K., Warner, J.R. (1971) *J. Bacteriol.* 105: 101-6.
29. Rubin, G.M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 3860-75.
30. Knight, E., Darnell, J. (1967) *J. Molec. Biol.* 28: 491-502
31. Forget, B.G., Weissman, S. (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 3148
32. Nierhaus, K.H. (1979) ver referencia 8, pp. 267-94.
33. Lin, A., Cellatz, E., Wool, I.G. (1976) *Mol. Gen. Genet.* - 144: 1-9.
34. Tsurugi, K., Cellatz, E., Wool, I.G., Lin, A. (1976) *J. -- Biol. Chem.* 251: 7940-6.
35. Wool, I.G., Stöffler, G. (1974) ver referncia 16, pp. 417.
36. Warner, J.R. (1966) *J. Mol. Biol.* 19: 383-98.
37. Richter, D., Isene, K. (1977) *Curr. Top. Microbiol.* 76: 81
38. Martini, O., Irr, J., Richter, D. (1977) *Cell.* 12: 1127-31
39. Silverman, R.H., Atherly, A.G. (1977) *Develop. Biol.* 56:200
40. Kabat, D. (1970) *Biochemistry.* 9: 4160-75.
41. Leeb, J.E., Blat, C. (1970) *FEBS Lett.* 10: 105-8.
42. Eil, C., Wool, I.G. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 5130-6.
43. Krystosek, A. y col. (1974) ver referencia 16, pp. 885.
44. Van Agtheven, A.J., Maasen, J.A., Müller, W. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 989-98.
45. Trewavas, A. (1973) *Plant. Physiol.* 51: 760-7.

46. Kaerlein, M., Horak, I. (1976) *Nature*. 259: 150-1.
47. Grankowski, N., Gasier, E. (1975) *Acta. Biochim. Polon.* -- 22: 45-56.
48. Becker-Ursic, D., Davies, J. (1976) *Biochemistry*. 15: 2289
49. Hébert, J., Pierre, M., Leeb, J.E. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72: 167-74.
50. Leader, D.P. (1980) *Recently discovered systems of enzyme-regulation by reversible phosphorylation*. Chapter 9. ----- Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
51. Shulman, R.W., Hartwell, L.H., Warner, J.R. (1973) *J. Mol. Biol.* 73: 513-25.
52. Warner, J.R. y col. (1973) *Biochem. Soc. Symp.* 37: 3-22.
54. Elliot, S.G., Warner, J.R., McLaughlin, C.S. (1979) *J. Bact.* 137: 1048-50.
55. Warner, J.R., Gorenstein, C. (1979) *Methods in Cell Biology* Vol. 20. Chapter 4. Academic Press. N.Y. USA.
56. Zinker, S., Warner, J.R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 1799.
57. Zinker, S. (1983) *Comunicación Personal*.
58. Morel, C. y col. (1973) *Eur. J. Biochem.* 36: 455-64.
59. Averbach, S., Pedersen, T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. - Commun.* 63: 149-56.
60. Warner, J.R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 447-54.
61. Sherton, C., Wool, I.G. (1974) *Methods Enzymol.* 20: 433-46
62. Campos, F. (1983) *Tesis de Licenciatura. Biología. ENEPI.-UNAM. México.*
63. Nazar, R.N. (1979) *J. Biol. Chem.* 256: 7724-9.
64. Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. (1969) *Anal Biochem.* 30: 132
65. Wittmann, H.G., Littlechild, J.A., Wittmann-Liebeld, B. -- (1979) ver referencia 8, pp. 51-88.
66. Panyin, S., Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* -- 130: 337-46.
67. Lambowitz, A.M., La Pella, R.J., Collins, R.A. (1979) *J. - Cell Biology.* 82: 17-31.
68. Cellatz, E., y col. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 1808-16.
69. Ogata, K., Terao, K. (1981) en *RNA and Protein Synthesis.- ed. per Kivie Moldave*. Ed. Academic Press.

70. Wittmann, H.G. (1974) *Methods Enzymol.* 30: 497-505.
71. Mets, L.J., Begerad, L. (1974) *Anal. Biochem.* 57: 200-10.
72. Gressner, A.M., Wool, I.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 6917
73. Maizel, J.V., Jr. (1971) *Methods Virol.* 5: 179-246.
74. Hartwell, L. (1970) *Annu. Rev. Genet.* 4: 373.
75. Goodenough, U. (1978) *Genetics*. Ed Saunders College. Philadelphia, USA.
76. Chapeville, F., Alaenni, A.-L., (1976) *Biosíntesis de Proteínas*. pp. 135-166. Ed. Omega. Barcelona, España. 347 pp.
77. Gen-Ichi Danne (1977) *Anal. Biochem.* 83: 189-93.