

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE DEL TALLO
RIBOSÓMICO DE *Saccharomyces cerevisiae*.
CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES
DE SUS COMPONENTES**

David Bolívar Cárdenas Sanjur
Madrid, 2008

**ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE DEL TALLO
RIBOSÓMICO DE *Saccharomyces cerevisiae*.
CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES
DE SUS COMPONENTES**

**Memoria presentada por David Bolívar Cárdenas Sanjur
para optar al grado de Doctor en Ciencias por la
Universidad Autónoma de Madrid**

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la co-dirección del Dr. Miguel Remacha Moreno, Profesor Titular de Microbiología del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid y del Dr. Juan Pedro García Ballesta, Profesor de Investigación del CSIC.



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Madrid, 2008

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 1 |
| SUMMARY | 4 |
| I. INTRODUCCIÓN | 7 |
| I.1 EL RIBOSOMA Y EL TALLO RIBOSÓMICO | 8 |
| I.1.1 FUNCIONES BÁSICAS DEL RIBOSOMA | 8 |
| I.1.2 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL RIBOSOMA | 8 |
| I.1.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL RIBOSOMA | 9 |
| I.1.4 GENERALIDADES DEL TALLO RIBOSÓMICO | 10 |
| I.2 EL TALLO RIBOSÓMICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 11 |
| I.2.1 COMPONENTES DEL TALLO | 11 |
| I.2.1.1 Proteínas ácidas | 11 |
| I.2.1.1.1 Aspectos estructurales | 11 |
| I.2.1.1.2 Acetilación N-terminal específica de las proteínas P1 | 13 |
| I.2.1.1.3 Reservorio citoplásmico e intercambio con el ribosoma | 13 |
| I.2.1.1.4 Función biológica | 13 |
| I.2.1.2 Proteína P0 | 15 |
| I.2.1.2.1 Aspectos estructurales | 15 |
| I.2.1.2.2 Función biológica | 17 |
| I.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL TALLO | 18 |
| I.2.2.1 Estructura y estequiometría del complejo | 18 |
| I.2.2.2 Estabilidad del complejo | 19 |
| I.3 FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL TALLO RIBOSÓMICO | 19 |
| I.3.1 SITIOS DE FOSFORILACIÓN | 20 |
| I.3.2 PROTEÍNA-QUINASAS INVOLUCRADAS EN LA FOSFORILACIÓN | 20 |
| I.4 PAPEL FUNCIONAL DEL TALLO RIBOSÓMICO COMO REGULADOR DE LA TRADUCCIÓN EN ORGANISMOS EUCARIÓTICOS | 21 |
| I.4.1 EQUILIBRO ENTRE SUBPOBLACIONES RIBOSÓMICAS | 21 |
| I.4.2 ACTIVIDAD DE LAS SUBPOBLACIONES RIBOSÓMICAS | 23 |
| I.5 ENSAMBLAJE DEL TALLO RIBOSÓMICO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>: INTERACCIONES DE LOS COMPONENTES DEL TALLO | 24 |
| I.5.1 ESTUDIOS SOBRE EL ENSAMBLAJE DEL TALLO RIBOSÓMICO | 24 |
| I.5.2 INTERACCIONES CON OTRAS PROTEÍNAS CELULARES EN LA FRACCIÓN CITOSÓLICA | 25 |
| I.5.3 INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS EN LA FRACCIÓN CITOSÓLICA | 26 |

| | |
|--|----|
| I.5.4 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS CON LA PROTEÍNA P0 EN EL RIBOSOMA | 27 |
| I.5.4.1 Estudio del sitio de interacción de la proteína P0 en las proteínas ácidas | 27 |
| I.5.4.2 Estudio de los sitios de interacción de las proteínas ácidas en la proteína P0 | 27 |
| OBJETIVOS | 29 |
| | |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| II.1 MATERIAL BIOLÓGICO | 32 |
| II.1.1 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| II.1.2 CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 32 |
| II.2 PLÁSMIDOS | 34 |
| II.3 MEDIOS DE CULTIVO | 36 |
| II.3.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| II.3.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 36 |
| II.4 OLIGONUCLEÓTIDOS | 37 |
| II.5 ENZIMAS Y REACTIVOS | 38 |
| II.5.1 ENZIMAS | 38 |
| II.5.2 REACTIVOS | 38 |
| II.6 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR | 38 |
| II.6.1 TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> | 38 |
| II.6.2 TRANSFORMACIÓN DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 39 |
| II.7 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 40 |
| II.7.1 OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>Escherichia coli</i> | 40 |
| II.7.2 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 40 |
| II.7.3 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA | 40 |
| II.7.4 ESTRATEGIAS DE CLONAJE | 40 |
| II.7.4.1 Obtención de la construcción de la proteína P2β etiquetada con el TAP en su extremo carboxilo | 41 |
| II.7.4.2 Obtención de las construcciones de las formas truncadas de la proteína P0 | 41 |
| II.8 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS | 43 |
| II.8.1 ELECTROFORESIS DE ADN | 43 |
| II.8.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS | 43 |
| II.8.2.1 SDS-PAGE | 44 |
| II.8.2.2 Electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE | 44 |
| II.8.2.3 Isoelectroenfoque de proteínas | 45 |
| II.9 TÉCNICAS DE TINCIÓN DE GELES | 45 |

| | |
|--|----|
| II.9.1 TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA | 45 |
| II.9.2 TINCIÓN CON SYPRO RUBY | 45 |
| II.10 OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 46 |
| II.10.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTO CITOPLASMÁTICO (FRACCIÓN S30) | 46 |
| II.10.2 OBTENCIÓN DE RIBOSOMAS CRUDOS Y FRACCIÓN CITOSÓLICA (FRACCIÓN S100) | 46 |
| II.10.3 OBTENCIÓN DE RIBOSOMAS LAVADOS A PARTIR DE RIBOSOMAS CRUDOS | 46 |
| II.11 CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS | 47 |
| II.11.1 MUESTRAS DE ADN | 47 |
| II.11.2 MUESTRAS DE RIBOSOMAS | 47 |
| II.11.3 MUESTRAS DE PROTEÍNAS | 47 |
| II.12 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD | 47 |
| II.12.1 PROTEÍNAS ETIQUETADAS CON UNA COLA DE SEIS RESIDUOS DE HISTIDINAS | 47 |
| II.12.2 PROTEÍNAS ETIQUETADAS CON TAP | 48 |
| II.13 ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA (WESTERN-BLOT) | 49 |
| | |
| III. RESULTADOS | 51 |
| III.1 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS EN EL CITOSOL | 51 |
| III.1.1 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS CON OTRAS PROTEÍNAS CELULARES | 51 |
| III.1.1.1 Purificación mediante la cola de histidinas | 51 |
| III.1.1.1.1 Comparación de la purificación de los complejos con las cuatro proteínas ácidas | 51 |
| III.1.1.1.2 Purificación de las proteínas que interactúan con la proteína P2 β acumulada en el citosol | 55 |
| III.1.1.1.3 Identificación de las proteínas diferenciales por espectrometría de masas | 57 |
| III.1.1.2 Purificación mediante el epítipo TAP | 58 |
| III.1.1.2.1 Generación de la cepa que expresa la proteína P2 β etiquetada con el TAP | 59 |
| III.1.1.2.2 Purificación de los complejos de la proteína P2 β TAP | 60 |
| III.1.2 INTERACCIONES ENTRE LAS CUATRO PROTEÍNAS ÁCIDAS | 63 |
| III.1.2.1 Purificación mediante la cola de histidinas | 63 |
| III.1.2.2 Purificación mediante el TAP | 65 |

| | |
|--|-----------|
| III.2 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS A LOS SITIOS DE INTERACCIÓN DE LOS HETERODÍMEROS P1α-P2β Y P1β-P2α EN LA PROTEÍNA P0 | 66 |
| III.2.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS FORMAS TRUNCADAS DE LA PROTEÍNA P0 CARENTES DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS | 66 |
| III.2.1.1 Obtención de las formas truncadas mediante PCR | 67 |
| III.2.1.2 Clonaje de las formas truncadas en los vectores de expresión | 67 |
| III.2.2 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES NULAS CONDICIONALES | 68 |
| III.2.2.1 Generación de las cepas condicionales dGP0 confirmación mediante PCR y fenotipo de crecimiento | 68 |
| III.2.2.2 Caracterización de las cepas mutantes condicionales expresando las diferentes formas de la proteína P0 | 71 |
| III.2.3 ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS A LA PROTEÍNA P0 | 72 |
| III.2.3.1 Análisis de unión de las proteínas ácidas en los mutantes nulos condicionales | 73 |
| III.2.3.2 Análisis comparativo de la abundancia de las proteínas ácidas en el citosol entre los diversos mutantes condicionales | 75 |
| IV. DISCUSIÓN | 78 |
| IV.1 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS CON OTRAS PROTEÍNAS CELULARES | 79 |
| IV.2 INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS EN EL CITOSOL | 83 |
| IV.3 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS A LOS SITIOS DE INTERACCIÓN DE LOS HETERODÍMEROS P1α-P2β Y P1β-P2α EN LA PROTEÍNA P0 | 86 |
| CONCLUSIONES | 91 |
| BIBLIOGRAFÍA | 93 |
| ANEXOS | |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura I.1 Comparación de las subunidades ribosómicas entre procariotas y eucariotas | 9 |
| Figura I.2 Modelo regulador de la traducción mediado por el tallo ribosómico | 21 |
| Figura II.1 Sitios de hibridación de los oligonucleótidos para generar las formas truncadas de P0 | 42 |
| Figura III.1 Análisis de unión inespecífica de las cuatro proteínas ácidas a la resina de Ni-NTA | 53 |
| Figura III.2 Eficiencia de la purificación de las cuatro proteínas ácidas etiquetadas | 53 |
| Figura III.3 Comparación de los complejos purificados con cada una de las cuatro proteínas ácidas etiquetadas | 54 |
| Figura III.4 Eficiencia de la purificación de P2 β his6 | 55 |
| Figura III.5 Detección de proteínas citosólicas co-purificadas con P2 β his6 | 56 |
| Figura III.6 Análisis de restricción del clonaje del gen de la proteína P2 β en los vectores T e YCplac111TAP | 59 |
| Figura III.7 Eficiencia de la purificación de P2 β TAP | 60 |
| Figura III.8 Detección de proteínas citosólicas co-purificadas con P2 β TAP | 61 |
| Figura III.9 Análisis de las interacciones de las proteínas P1 | 64 |
| Figura III.10 Análisis de las interacciones de las proteínas P2 | 64 |
| Figura III.11 Análisis de las interacciones entre las cuatro proteínas ácidas | 65 |
| Figura III.12 Análisis de las interacciones de P1 β y P2 α con la proteína P2 β TAP | 66 |
| Figura III.13 Análisis por restricción del clonaje de las cuatro formas de P0 en los plásmidos centroméricos | 68 |
| Figura III.14 Análisis genético de las cepas mutantes condicionales dGP0 | 69 |
| Figura III.15 Análisis fenotípico de las cepas parentales | 70 |
| Figura III.16 Análisis fenotípico de las cepas condicionales dGP0 | 71 |
| Figura III.17 Análisis fenotípico de cada una de las series de cepas condicionales dGP0 | 72 |
| Figura III.18 Análisis de la presencia de las cuatro formas de la proteína P0 en los ribosomas | 73 |
| Figura III.19 Análisis de la unión de las proteínas ácidas a los ribosomas de la serie W303dGP0 | 74 |
| Figura III.20 Análisis de la unión de las proteínas ácidas a los ribosomas de las series D46dGP0 y D47dGP0 | 74 |
| Figura III.21 Análisis de la unión de las proteínas ácidas a los ribosomas de las series D56dGP0 y D57dGP0 | 75 |
| Figura III.22 Comparación relativa de la cantidad de proteínas ácidas en el citosol entre las cepas que expresan P0wt y P0 Δ AB | 76 |
| Figura III.23 Comparación relativa de la cantidad de proteínas ácidas en la fracción S30 entre todas las cepas que expresan las cuatro formas de la proteína P0 | 76 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I.1 Interacciones de las proteínas ácidas, actuando como cebo o presa, con otras proteínas celulares | 25 |
| Tabla II.1 Cepas de <i>E. coli</i> | 32 |
| Tabla II.2 Cepas de <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| Tabla II.3 Plásmidos | 34 |
| Tabla II.4 Oligonucleótidos utilizados para la construcción y secuenciación de la proteína P2 β etiquetada con el TAP en su extremo carboxilo | 37 |
| Tabla II.5 Oligonucleótidos utilizados para la obtención y secuenciación de las formas truncadas de la proteína P0 | 37 |
| Tabla II.6 Oligonucleótidos utilizados para confirmar la sustitución de la copia genómica del gen de la proteína P0 | 37 |
| Tabla II.7 Condiciones de la reacción de PCR para confirmar la integración de la construcción en el locus de la proteína P0 | 39 |
| Tabla II.8 Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de las regiones de la proteína P2 β que serán fusionadas con la etiqueta TAP | 41 |
| Tabla II.9 Condiciones de la reacción de PCR para la eliminación de los sitios de interacción de las proteínas ácidas | 42 |
| Tabla II.10 Dianas de restricción utilizadas para el clonaje de las formas del gen de la proteína P0 en los plásmidos centroméricos | 43 |
| Tabla II.11 Programa para la carrera de la primera dimensión (IEF) con el Ettan IPGphor 2 | 44 |
| Tabla II.12 Anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas del tallo con y sin etiqueta | 49 |
| Tabla III.1 Proteínas diferenciales identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF | 58 |
| Tabla III.2 Proteína diferencial identificada por espectrometría de masas MALDI-TOF | 62 |
| Tabla IV.1 Proteínas que interaccionan con las proteínas co-purificadas con P2 β | 81 |
| Tabla IV.2 Proteínas ácidas a unidas a los ribosomas de cada cepa dGP0 expresando cada una de las formas de la proteína P0 | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.
Amp: ampicilina (ampicillin).
AMP: adenosin-monofosfato.
APS: persulfato de amonio (ammonium persulfate).
ARNasa: ácido ribonucleasa
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
ARNr: ácido ribonucleico ribosómico.
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.
ARS: secuencia de replicación autónoma (autonomous replication sequence).
BSA: albúmina de suero bovino (bovine serum albumin).
CBMSO: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.
CBP: péptido de unión a calmodulina (calmodulin binding peptide).
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate).
CK-II: caseína-quinasa II (casein kinase II).
CSM: mezcla de suplemento completo (complete supplement mixture).
DTT: ditioneitol.
EDTA: ácido etilendiaminotetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid).
EGTA: ácido etilenglicoltetra-acético (ethyleneglycoltetraacetic acid).
EF: factor de elongación (elongation factor).
Etev: elución después del corte con la proteasa TEV.
FCS: espectroscopia de correlación de fluorescencia (fluorescence correlation spectroscopy).
G418: geneticina.
GTPasa: guanosin-trifosfatasa.
IEF: isoelectroenfoque (isoelectrofocusing).
Kan: kanamicina (kanamycin).
MALDI-TOF: técnica de ionización de espectrometría de masas (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight).
NTA: ácido nitrilotriacético (nitrilotriacetic acid).
ORF: marco de lectura abierto (open reading frame).
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis).
pBS: plásmido bluescript.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction).
PEG: polietilenglicol.
PK60S: proteína-quinasa de la subunidad 60S (protein kinase 60 S).

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (phenylmethylsulphonyl fluoride).
PVDF: fluoruro de polivinilideno (polyvinylidene fluoride).
RAP: quinasa de las proteínas ácidas ribosómicas (ribosomal acidic P protein kinase).
RMN: resonancia magnética nuclear.
SCD: medio sintético completo con glucosa (synthetic complete dextrose).
SCG: medio sintético completo con galactosa (synthetic complete galactose).
SDS: dodecil-sulfato de sodio (sodium dodecylsulfate).
SGD: base de datos del genoma de *Saccharomyces* (*Saccharomyces* genome database).
TAE: tampón con Tris, agarosa y EDTA (Tris agarose EDTA).
TAP: purificación por afinidad en tándem (tándem affinity purification).
TCA: ácido tricloro-acético (trichloroacetic acid).
TEV: virus del mosaico del tabaco (tobacco etch virus).
TMP: timidin-monofosfato.
Tris: 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
UTR: región no traducida (untranslated region).
WT/wt: tipo silvestre (wild-type).
YEPD: medio rico para levadura con glucosa (yeast peptone extract dextrose).
YEPG: medio rico para levadura con galactosa (yeast peptone extract galactose).
YNB: base nitrogenada para levadura (yeast nitrogen base).

SUMMARY

The ribosomal stalk is a very dynamic and flexible lateral protuberance of the large ribosomal subunit present in the ribosomes of all organisms of the three domains of life. The function of the stalk is thought to be related with the recruitment of the soluble translation factors and the enhancement of their GTPase activity. In *S. cerevisiae* the stalk is composed of four 12 KDa acidic proteins (P1 α , P1 β , P2 α and P2 β) forming a pentameric complex with the P0 protein, which is attached to the ribosome through its binding to the highly conserved GTPase associated region of the 26S rRNA. Besides the ribosome, the acidic proteins are also found free in the cytoplasm forming a pool that has been shown to participate in an exchange process with the proteins bound to the ribosome during translation.

Although the ribosome biogenesis has been studied in detail, the mechanism of stalk assembly is very scarcely known. Because it is possible that in the cytoplasmic pool the acidic proteins may interact with other cytosolic proteins that could be involved in their function and assembly into the ribosome during the protein synthesis, we found interesting studying the stalk assembly in three aspects: identifying the possible interactions of the acidic proteins, specially P2 β , with other cellular proteins in the cytosol; analyzing the interactions that take place between the four acidic proteins when found free in the cytoplasm; and characterizing the binding specificity of the interaction sites for the two canonical heterodimers P1 α -P2 β and P1 β -P2 α within the C-terminal domain of P0. The first two aspects were covered by performing affinity purification with the his6 and TAP tags. For the third aspect we analyzed the binding of acidic proteins to the ribosome from several conditional mutant strains expressing truncated forms of P0.

When the his6-tagged P2 β protein was purified, 15 proteins were co-purified and identified by mass spectrometry. From these 15 proteins, two are related to translation and has been previously reported to interact with the acidic proteins. Among the other 13 new interacting proteins, five are enzymes that belong to the glycolytic/gluconeogenic and four are involved in sporulation. The TAP tag purification showed that Tdh3p interacts with P2 β with greater affinity than the rest of the co-purified proteins. These results point to a possible involvement of the stalk acidic proteins in functions others than translation.

Using the histidine tag approach, the analysis of the cytosolic interactions between the four acidic proteins revealed the presence of the two canonical heterodimers P1 α -P2 β and P1 β -P2 α . In addition, the histidine tag as well as the TAP tag approach detected two other non-canonical heterodimers, P1 β -P2 β and P2 α -P2 β . Since these cytosolic associations seem to be involved in the stalk assembly, these results support the formation of a ribosomal stalk with an unusual composition.

The analysis of the acidic protein binding to the truncated P0 mutants lacking different fragments in the region involved in acidic protein binding showed that the heterodimer P1 α -P2 β

binds exclusively to the region of P0 between residues 198 and 230. However, this region lacks of binding specificity because is also able to bind the other heterodimers P1-P2. On the other hand, the region of P0 between residues 231-258 shows binding specificity to the heterodimer P1 β -P2 α . In fact, this second region becomes able to bind the P1 α or P2 β protein provided that P2 α or P1 β protein, respectively, is present in the cell. As expected, the P0 protein lacking the complete binding region (residues 198-258) does not bind any of the four acidic proteins in any of the strains used. Our results indicate that the binding specificity of the heterodimers P1 α -P2 β and P1 β -P2 α in P0 protein is less strict than previously reported.

INTRODUCCIÓN

I.1 EL RIBOSOMA Y EL TALLO RIBOSÓMICO

La traducción es un proceso fundamental en todos los seres vivos a través del cual se lleva a cabo la síntesis de todas las proteínas de la célula. Por ende, es uno de los mecanismos celulares más conservados a lo largo de la evolución y que más componentes celulares requiere. El responsable en gran medida del proceso de traducción es el ribosoma, por ello, es uno de los componentes mayoritarios de la célula. Tal importante función le ha conferido una morfología general muy conservada entre archeas, eubacterias y eucariotas.

I.1.1 FUNCIONES BÁSICAS DEL RIBOSOMA

El ribosoma puede ser considerado como una partícula que lleva a cabo tres funciones básicas durante el proceso de traducción: 1, selecciona y une el ARNm y el ARNt monitorizando el apareamiento de bases entre el codón y el anticodón durante el proceso de descodificación; 2, cataliza la transferencia y formación del enlace peptídico (reacción de transpeptidación) entre el péptido naciente esterificado al ARNt unido al sitio P y el aminoácido entrante esterificado al ARNt unido al sitio A; y 3, participa en la translocación en la cual el ARNt desacilado en el sitio P se mueve al sitio E, el peptidil-ARNt en el sitio A se mueve al sitio P y el ARNm avanza un codón en la dirección 3' (109,132,166). La primera función es llevada a cabo por la subunidad menor (25), la segunda función por la subunidad mayor (114) y la función de translocación requiere la cooperación de ambas subunidades (109,132,166).

I.1.2 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL RIBOSOMA

El ribosoma eucariótico tiene un coeficiente de sedimentación de 80S y está formado por una subunidad mayor 60S compuesta por tres moléculas de ARNr 28S (26S en *Saccharomyces cerevisiae*), 5.8S, 5S y por 46 proteínas; y una subunidad menor 40S compuesta por un ARNr 18S y 32 proteínas (98,124). En el caso del ribosoma procariótico, el coeficiente de sedimentación es de 70S y está formado por una subunidad mayor 50S compuesta por dos moléculas de ARNr, 23S y 5S, y por 33 proteínas; y una subunidad menor 30S compuesta por un ARNr 16S y 21 proteínas (18,164). Teniendo en cuenta la gran cantidad de proteínas que pueden interactuar con el ribosoma durante la traducción se definieron como proteínas ribosómicas a aquellas que fueran capaces de permanecer unidas a la partícula ribosómica después de tratar el ribosoma con soluciones tampones de KCl o NH₄Cl 0.5 M (81).

I.1.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL RIBOSOMA

A pesar de que los ribosomas de diferentes organismos procarióticos y eucarióticos tienen una apariencia similar (18,88), ambas subunidades presentan diversas características estructurales que son observadas en diferentes proyecciones de micrografías electrónicas. Así, la subunidad menor bacteriana está subdividida en tres partes, la cabeza y una protuberancia llamada pico separados por una cavidad del cuerpo y la plataforma (87,193), mientras que en eucariotas se distinguen además una extensión más puntiaguda del pico y una bifurcación conocida como lóbulos eucarióticos (pies izquierdo y derecho), en el extremo del cuerpo distal a la cabeza (73,164). En la figura I.1 se muestra una comparación de las subunidades mayor y menor entre organismos procarióticos y eucarióticos.

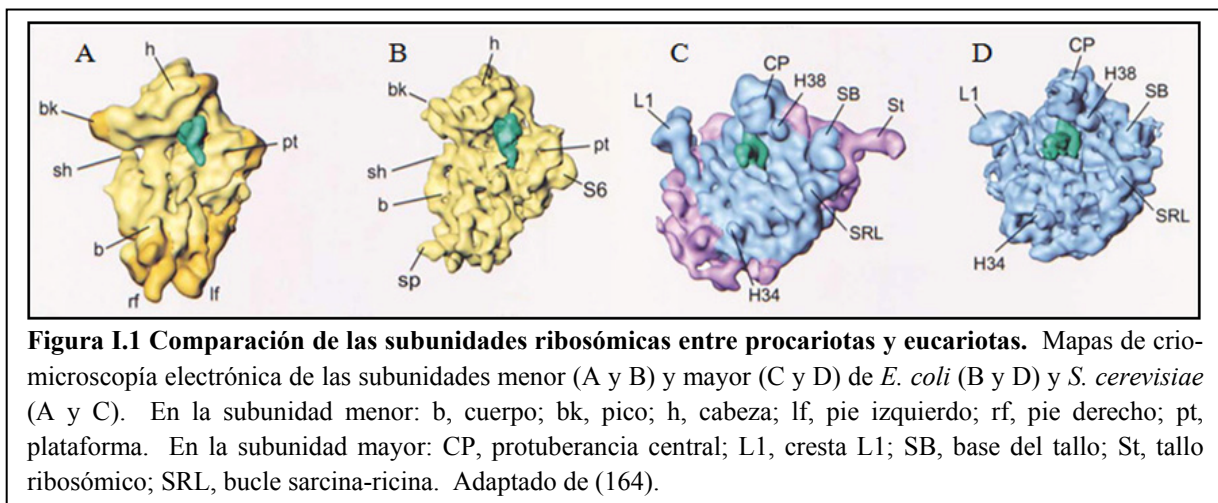


Figura I.1 Comparación de las subunidades ribosómicas entre procariotas y eucariotas. Mapas de criomicroscopía electrónica de las subunidades menor (A y B) y mayor (C y D) de *E. coli* (B y D) y *S. cerevisiae* (A y C). En la subunidad menor: b, cuerpo; bk, pico; h, cabeza; lf, pie izquierdo; rf, pie derecho; pt, plataforma. En la subunidad mayor: CP, protuberancia central; L1, cresta L1; SB, base del tallo; St, tallo ribosómico; SRL, bucle sarcina-ricina. Adaptado de (164).

La subunidad mayor presenta un mayor parecido en los ribosomas procarióticos y eucarióticos (18,87). En la parte superior se distinguen tres protuberancias: una central o cabeza y dos laterales, una llamada tallo ribosómico y otra parecida a un lóbulo y menos pronunciada llamada cresta L1 por contener esta proteína (194). Por otro lado, el cuerpo de la subunidad mayor presenta una bifurcación en el extremo opuesto a la protuberancia central (72). Además, tanto en procariotas (206) como en eucariotas (195) se ha observado un túnel que atraviesa la subunidad mayor desde cerca del centro peptidil-transferasa hasta la parte trasera inferior de la subunidad por el cual los péptidos nacientes salen del ribosoma. Adicionalmente, en esta subunidad también se encuentra una región de la secuencia del ARNr 23/28S que está universalmente conservada en todos los organismos conocida como región asociada a la actividad GTPasa (centro o dominio GTPasa) o bucle de tiostreptón (46).

I.1.4 GENERALIDADES DEL TALLO RIBOSÓMICO

El tallo ribosómico es una estructura muy flexible que fue descrita por primera vez mediante inmunomicroscopía electrónica de ribosomas de *Escherichia coli* (168). Esta peculiar estructura está presente en los ribosomas de todos los organismos archeas, eubacterias y eucariotas (12), aunque presenta variaciones en cuanto a su composición y estequiometría. Universalmente el tallo está formado por una proteína central con carácter hidrofóbico, llamada L10 en procariotas y P0 en eucariotas, rodeada de un grupo de proteínas de menor tamaño con carácter muy ácido (de ahí que comúnmente se les conozcan como proteínas ácidas), llamadas L7/L12 (siendo L7 la forma acetilada en el N-terminal de L12) en procariotas y P1/P2 en eucariotas. El tallo ribosómico interacciona en procariotas con la proteína L11 y el ARNr 23S y en eucariotas con la proteína L12 y el ARNr 26/28S en el centro GTPasa, por consiguiente, está generalmente aceptado que está relacionado con la actividad de los factores de traducción que interaccionan con dicha región (100,168). De hecho, mediante crio-microscopía electrónica, se comprobó que el tallo está localizado en el sitio de entrada de los factores de elongación, tanto en *E. coli* (167) como en *S. cerevisiae* (44). Cabe mencionar que el centro GTPasa junto con el dominio N-terminal de la proteína L10/P0 y la proteína L11/L12, ambas adyacentemente unidas a dicho centro, forman la base del tallo ribosómico (30).

El tallo es la única estructura del ribosoma compuesta por elementos multicopia que involucran interacciones proteicas sin interaccionar aparentemente con el ARNr (8). En organismos procariotas, inicialmente se estableció que el tallo estaba compuesto de cuatro copias de la proteína L7/L12 (74,170) en forma de dos dímeros unidos a la región C-terminal de la proteína L10 (52,58). Sin embargo, recientemente se ha reportado en bacterias termófilas (30,66,115) y en archeas (99) una diferente composición del tallo procariótico que corresponde a un complejo heptamérico L10-(L7/L12)₆. En el caso de organismos eucariotas, la composición del tallo es más compleja puesto que las proteínas ácidas han evolucionado hacia dos tipos o familias, P1 y P2 (203), y en plantas existe un tercer tipo adicional llamado P3 (5,171). Además, el número de proteínas ácidas en cada una de las familias varía entre los diversos organismos eucariotas siendo uno en humanos (139), rata (182,203), e invertebrados como *Artemia salina* (190) y *Drosophila melanogaster* (127,201); dos en levadura (11,112,136); y más de dos en *Trypanosoma cruzi* (93). A pesar de esta variabilidad, la composición del tallo eucariótico corresponde a un complejo pentamérico formado por cuatro copias de proteínas P1/P2 y una molécula de la proteína P0, aunque existe una variabilidad en la composición de las proteínas ácidas dependiendo del organismo eucariota y del estado metabólico de la célula (se comentará más en detalle en el apartado I.2.2.1).

I.2 EL TALLO RIBOSÓMICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

I.2.1 COMPONENTES DEL TALLO

I.2.1.1 Proteínas ácidas

Inicialmente, en *S. cerevisiae* se conocía la existencia de tres proteínas ácidas: L44 o L35, L45 o L36 y L44' (82,196,210). Además de estas tres proteínas ácidas, también se conocía de la existencia de un grupo de polipéptidos ácidos, aún no bien caracterizados, a los cuales se les llamaron genéricamente Ax (148,150,196). Posteriormente, se clonó el gen de una cuarta proteína ácida a la cual se le llamó A1 (107,112). Finalmente, se propuso una nomenclatura uniforme en la cual las proteínas A1, L44', L44 y L45 se denominaron P1 α , P1 β , P2 α y P2 β , respectivamente (98,203).

I.2.1.1.1 Aspectos estructurales

En la estructura primaria de las proteínas ácidas se pueden distinguir tres regiones principales: una región amino-terminal responsable de la dimerización de las proteínas ácidas y del anclaje de éstas al ribosoma a través de la unión a la proteína P0; una región central muy flexible, comúnmente denominada bisagra, compuesta principalmente de residuos de alanina, glicina y prolina; y una región carboxilo-terminal responsable de la interacción con los factores de elongación (9).

De las tres regiones principales la más conservada es la región carboxilo-terminal que corresponde aproximadamente a los últimos 21 aminoácidos compuestos por una serie de residuos muy ácidos, en su mayoría ácido glutámico, y por el péptido terminal DMGFGLFD que está conservado en casi todos los organismos eucariotas, desde levadura hasta humanos, con algunas pequeñas variaciones en plantas y protozoos (6,48). En *S. cerevisiae* el extremo carboxilo es exactamente igual en las 4 proteínas ácidas en los últimos 13 aminoácidos correspondiendo a la secuencia EESDDDMGFGLFD. Además, cabe mencionar que las proteínas ácidas interactúan con el factor de elongación EF2, y posiblemente con otros factores, a través de este extremo carboxilo conservado (9,89,192).

Además del extremo carboxilo, las proteínas ácidas mantienen una secuencia bastante conservada en el extremo amino-terminal, especialmente entre las proteínas P2. Sin embargo, una excepción son las proteínas P1 de plantas que parecen divergir extensamente de la secuencia

consenso y las proteínas P2 de protozoos que muestran notables diferencias siendo en algunos casos más largas que la proteína promedio (5,48,93). Mediante el análisis de fragmentos del extremo amino-terminal de las proteínas ácidas fusionados con el gen LacZ, se ha demostrado que esta región (los primeros 65 aminoácidos) es la encargada del anclaje de éstas al ribosoma a través de la unión con la proteína P0 (118) y de la dimerización entre ellas, al parecer, debido a la presencia de una cremallera hidrofóbica bilateral (183). En años posteriores, se han realizado varios estudios en los cuales se determina el fragmento mínimo necesario para que estas proteínas se unan al ribosoma a través de la proteína P0 (se comentarán con más detalle en el apartado I.5.4.1)

Con respecto a datos sobre la estructura secundaria y terciaria de las proteínas ácidas, en organismos eucariotas se han realizado varios estudios caracterizando la estructura de las proteínas P1 α y P2 β de *S. cerevisiae* tanto individualmente como formando el heterodímero P1 α -P2 β (49,176,211,213), y de las proteínas P1 y P2 de humanos formando el heterocomplejo P1-P2 (50). Sin embargo, su gran flexibilidad ha impedido hasta este momento describir la estructura terciaria de las proteínas ácidas, a diferencia de la proteína procariota L12, cuya estructura cristalina está disponible a una resolución muy alta (13,30,92,198).

Al analizar la estructura de las proteínas P1 α y P2 β individualmente, mediante el uso de diversas técnicas biofísicas y bioquímicas, se demostró que ambas proteínas no están plegadas en solución en condiciones fisiológicas, aunque P2 β muestra un contenido de estructura secundaria mayor que P1 α (211,213). Una importante diferencia entre las proteínas ácidas de ambos tipos es la sensibilidad a la proteólisis, habiéndose observado que las proteínas P1 son más sensibles a la degradación que las proteínas P2 tanto *in vitro* (211) como *in vivo* (116). En resumen, estos resultados sugieren que ambas proteínas ácidas, cuando están en solución, muestran características de una estructura parcialmente plegada similar al llamado “glóbulo fundido” (211,213).

Además, también se han empleado en conjunto las técnicas de RMN y la predicción de estructura secundaria *in silico* para caracterizar la estructura de las mismas proteínas. Los resultados mostraron que ambas proteínas poseen un contenido α -helicoidal de 60%, habiendo un total de 5 α -hélices en P1 α y 6 en P2 β , de las cuales 4 se encuentran en el dominio N-terminal de ambas proteínas, y una y dos se encuentran en el dominio C-terminal de P1 α y P2 β , respectivamente (49,176). El 56% de los residuos del dominio C-terminal está localizado en elementos no estructurados, lo que demuestra que este fragmento contiene una región altamente flexible. La región bisagra de ambas proteínas, con una alta proporción de valinas, glicinas y alaninas, es muy flexible. Sin embargo, dicha región bisagra en P2 β , pero no en P1 α , tiene una alta propensión a la formación de hélice (49).

I.2.1.1.2 Acetilación N-terminal específica de las proteínas P1

Las proteínas ácidas sufren de la eliminación de la metionina inicial y la acetilación N-terminal. Sin embargo, a diferencia de la fosforilación (se comentará en detalle más adelante) que ocurre en las cuatro proteínas ácidas, la acetilación N-terminal sólo ocurre en las proteínas P1. Así, se ha demostrado que las dos proteínas P1, a diferencia de las dos proteínas P2, poseen el extremo amino-terminal bloqueado (155).

I.2.1.1.3 Reservorio citoplásmico e intercambio con el ribosoma

Ninguno de los componentes ribosómicos, ni el ARNr ni las proteínas, se encuentra usualmente libre en el citoplasma celular. La síntesis de las proteínas ribosómicas es un proceso sujeto a una estricta regulación a varios niveles desde la transcripción hasta la traducción, en el cual el exceso de proteínas ribosómicas sintetizadas es eficientemente degradado por la célula (200). Sin embargo, a diferencia del resto de proteínas ribosómicas, las proteínas ácidas sí se encuentran libres formando un reservorio citoplásmico en varios organismos como *E. coli* (130), *A. salina* (190), mamíferos (33) y *S. cerevisiae* (105,145,150,209). Además de la existencia de este reservorio, también se ha demostrado que existe un intercambio de las proteínas ácidas entre dicho reservorio y el ribosoma en *S. cerevisiae* (135,145,210), en rata (184) y en plantas (157). Sin embargo, este proceso de intercambio no se ha detectado en *E. coli* (169).

I.2.1.1.4 Función biológica

Los datos disponibles indican que las proteínas ácidas están implicadas en la actividad de los factores de elongación en *A. salina* (191), *S. cerevisiae* (149) y rata (97), lo cual ha llevado a proponer que estas proteínas juegan el mismo papel que la proteína L7/L12 en bacterias (108). Sin embargo, al contrario de las proteínas bacterianas, las proteínas ácidas eucarióticas no son esenciales para la función del ribosoma y este hecho, junto con su evolución en dos tipos distintos de proteína, P1 y P2, puede ser una consecuencia de su implicación en un proceso regulatorio de la traducción (6).

A. Interrupción de los genes de las proteínas ácidas

El papel de cada una de las cuatro proteínas ácidas de *S. cerevisiae* ha sido estudiado mediante interrupción génica (137,138). Ninguna de las cuatro proteínas ácidas es esencial para el crecimiento celular y consecuentemente para la actividad del ribosoma. Sin embargo, la inactivación independiente de cada gen produce un efecto diferente pero relativamente pequeño sobre el crecimiento celular (137,138). Estos resultados sugirieron una especificidad en la función de cada proteína, la cual no puede ser efectuada por ninguna de las otras proteínas ácidas restantes presentes en el reservorio citoplásmico (6). Esta conclusión está reforzada por resultados de la estimación de las proteínas ácidas en ribosomas de cepas mutantes, los cuales no mostraron ningún aumento compensatorio en las otras proteínas ácidas (137,138).

B. Las proteínas ácidas se unen al ribosoma como heterodímeros P1-P2

La inactivación simultánea de dos genes de las proteínas ácidas del mismo tipo, P1 en el mutante D67 o P2 en el mutante D45, da lugar a ribosomas que no presentan ninguna de las proteínas ácidas cuyos genes están intactos, las cuales, sólo en el caso del mutante D67, deben encontrarse libres en el citoplasma puesto que son detectadas en los extractos celulares totales (138). Estos resultados indican que las proteínas de un solo tipo, ya sea P1 o P2, no interactúan con el ribosoma, para ello se requiere la formación de un complejo que contenga al menos una proteína de cada tipo (6).

Por otro lado, la presencia de proteínas ácidas en los ribosomas de todos los demás mutantes dobles indica que las formas, α y β , de las proteínas ácidas pueden formar un complejo con una u otra forma del otro tipo (6).

C. Las proteínas P1 y P2 no son esenciales para la viabilidad celular

Uno de los resultados más interesantes es la viabilidad de los cuatro mutantes triples y del mutante cuádruple D4567 obtenidos mediante la inactivación simultánea de tres y cuatro genes de las proteínas ácidas, respectivamente (134). Todas estas cepas mutantes de lento crecimiento, así como los mutantes D45 y D67, contienen ribosomas que son funcionales a pesar de que están totalmente desprovistos de proteínas ácidas. Los ribosomas de estas cepas son activos en sistemas de polimerización usando tanto ARNm sintéticos como naturales y su actividad es fuertemente aumentada por la adición de proteínas ácidas exógenas (134,138). La ausencia de proteínas ácidas en los ribosomas afecta la eficiencia de las partículas pero no su precisión puesto que estos ribosomas no muestran una capacidad supresora del codón de terminación ni un grado de lectura errónea mayores que los ribosomas de las cepas parentales (134).

D. Las proteínas P1 y P2 afectan el patrón de expresión proteica

El mutante cuádruple D4567 muestra notables diferencias cuando su patrón de proteínas expresadas es comparado con el de la cepa silvestre mediante electroforesis bidimensional (134). La expresión de un número de proteínas es notablemente reducida o suprimida en el mutante D4567 pero otras proteínas son específicamente expresadas por esta cepa. Un conjunto de proteínas que están notablemente aumentadas en el mutante cuádruple (135) parecen corresponder a algunas proteínas de choque térmico que están expresadas preferencialmente en células en fase estacionaria (35). Este cambio en el patrón de expresión proteica por la ausencia de proteínas ácidas en el ribosoma es coherente con los fenotipos de las cepas mutantes: algunos mutantes son sensibles al frío, no usan algunas fuentes de carbono y, cuando están en estado diploide, son incapaces de esporular (134). Estos fenotipos pueden ser revertidos en los mutantes apropiados mediante la transformación con plásmidos que lleven el gen que codifica una proteína ácida complementaria, cuya expresión permita la formación del complejo P1-P2 que puede unirse al ribosoma.

En resumen, los ribosomas desprovistos de proteínas ácidas pueden participar en la maquinaria de síntesis proteica normal, pero traducen un reservorio de ARNm con diferente eficiencia, o más alta o más baja, que los ribosomas con una dotación completa de proteínas ácidas, resultando en un patrón distinto de proteínas expresadas y, por consiguiente, afectando algunas rutas metabólicas (6).

I.2.1.2 Proteína P0

La proteína P0 se reportó por primera vez en ribosomas de pollo como un polipéptido de 38 KDa reconocido por anticuerpos monoclonales contra las proteínas ácidas P1 y P2 (180). La presencia de una proteína similar se ha confirmado en otros organismos eucariotas como rata, levadura, humanos, protozoos y plantas (65,104,106,112,125,139,158,163,203). A pesar de la baja homología entre sus secuencias de aminoácidos, se ha propuesto a la proteína P0 eucariota como el análogo funcional de la proteína procariota L10 (104,112,139).

I.2.1.2.1 Aspectos estructurales

La estructura primaria de la proteína P0 presenta varios dominios funcionales: en la mitad N-terminal, comprendida por los primeros 200 aminoácidos, se encuentra el dominio de unión al

ARNr 26S; y en la mitad C-terminal, comprendida por los últimos 112 aminoácidos, se encuentran un dominio de unión a las proteínas ácidas, una región bisagra muy flexible y rica en alaninas (161) y un dominio de unión a los factores de traducción en el extremo carboxilo.

El dominio de unión al centro GTPasa del ARNr 26S está determinado por los primeros 121 aminoácidos de la mitad N-terminal de la proteína. En concreto, dentro de este dominio, los fragmentos que comprenden los residuos 3-58 y 81-121 son necesarios para la unión de la proteína P0 al ribosoma (154). Se ha demostrado que este dominio está estructural y funcionalmente conservado entre los organismos eucariotas (143) y es similar en tamaño y función a su contraparte en la proteína procariota L10, la cual también se une al centro GTPasa del ARNr 23S a través de su dominio N-terminal (57). Por otra parte, también se ha reportado que el fragmento en la mitad C-terminal de la proteína comprendiendo los residuos 181-224, participa directa o indirectamente en la interacción de la proteína con el ribosoma (153).

A diferencia del dominio de unión al ARNr, el dominio de unión a las proteínas ácidas en la proteína P0 parece haber sufrido una rápida divergencia entre los organismos eucariotas (143). Inicialmente, la ubicación de este dominio se estableció entre los residuos 225 y 290 (153), concordando con la ubicación de la cremallera hidrofóbica propuesta a participar en la unión a las proteínas ácidas, la cual está comprendida entre los aminoácidos 205 y 282 de la proteína P0 (183). Posteriormente, han habido reportes en los cuales se ha realizado una delimitación más precisa de los sitios de interacción de las proteínas ácidas en la proteína P0 (este aspecto se comentará en más detalle en el apartado I.5.4.2).

El extremo carboxilo de la proteína P0 es idéntico en los últimos 13 aminoácidos al de las cuatro proteínas ácidas. De hecho, la secuencia DMGFGLFD en su extremo carboxilo se conserva prácticamente invariable en todas las proteínas P0 eucarióticas exceptuando alguna variación en plantas y parásitos (5,93,158). Al igual que las proteínas ácidas, la proteína P0 también interacciona con el factor EF2 a través de su extremo carboxilo (89). Sin embargo, además del extremo carboxilo, parece haber otro sitio de interacción del factor EF2 puesto que se reduce su unión al ribosoma cuando en P0 se elimina una región que contiene los residuos 118-138 (154), los cuales previamente se han propuesto como sitio de contacto con dicho factor (156). Esta secuencia de residuos, al parecer, corresponde con la región de la base del tallo que fue detectada interaccionando con el factor EF2 mediante crio-microscopía electrónica (165) y también está involucrada en la susceptibilidad a anti-fúngicos derivados de sordarina (156), los cuales inhiben la síntesis proteica en levadura estabilizando la unión entre el factor EF2 y el ribosoma (24,43,71).

Actualmente, la información sobre la estructura secundaria y terciaria de la proteína P0 en organismos eucariotas es extremadamente escasa. Sin embargo, en el caso de la proteína L10 en

bacterias y archeas, recientemente se ha publicado un estudio en el cual se describen las estructuras cristalinas de un complejo entre las proteínas L10 y el dominio N-terminal de L12 de *Thermotoga maritima* y se refina la estructura del dominio N-terminal de la proteína L10E de *Haloarcula marismortui* en la subunidad ribosómica 50S (30). Con respecto a la proteína P0 de levadura, al comparar la estructura primaria y secundaria del dominio N-terminal entre las proteínas P0 de *S. cerevisiae* y L10E de *H. marismortui* se ha visto que hay una semejanza significativa entre ambas proteínas (30,154). De hecho, las secuencias 6-20 y 56-63 de la proteína P0 de *S. cerevisiae* pueden modelarse como α -hélices (154) que pueden corresponder a las dos α -hélices de la proteína L10E resueltas en la estructura cristalina de la subunidad ribosómica 50S de *H. marismortui* (8). Tomando en cuenta estas similitudes, está aceptado que la estructura del dominio N-terminal de la proteína P0 debe ser similar a la de la proteína L10E.

Por otra parte, también existe un estudio de las propiedades estructurales de la proteína P0 de *T. cruzi* en el cual, utilizando técnicas biofísicas y bioquímicas y análisis de predicción de estructura secundaria, sugieren que la estructura terciaria de P0 podría describirse como un dominio N-terminal de 200 residuos de largo, compacto, estable y resistente a tripsina que pertenece a la clase α/β y un dominio C-terminal de 123 residuos de largo, más flexible, degradable y helicoidal que podría estar involucrado en la formación de una cremallera hidrofóbica inusual con las proteínas P1/P2 para formar el complejo P0-P1-P2 (3).

I.2.1.2.2 Función biológica

A. La proteína P0 es esencial para la viabilidad celular

A diferencia de las proteínas ácidas, la proteína P0 está codificada por un gen esencial. Todos los intentos para interrumpir este gen, usando cepas haploides o diploides, han fallado pero también se observó una capacidad del gen para ser duplicado durante el proceso de interrupción, lo cual indicó que el gen es probablemente requerido para la viabilidad celular (152). Al recurrir a la obtención de un mutante nulo condicional, en el cual la expresión de la copia genómica del gen de P0 está bajo el control del promotor GAL1, se observó que al cambiar las células de dicho mutante de galactosa a glucosa resultó en una parada del crecimiento y un incremento dramático en la muerte celular, confirmando que la proteína P0 es esencial para la actividad del ribosoma (152). En la ausencia de síntesis de P0 las partículas 60S defectuosas, carentes de proteínas P1, P2 y P0, se acumulan resultando en la formación de polisomas con los llamados “half-meros” y, finalmente, en su degradación (152).

B. Función del dominio carboxilo-terminal de P0

Con el fin de analizar el papel funcional del dominio carboxilo-terminal de la proteína P0, se generó una serie de formas truncadas y se analizó su capacidad para permitir el crecimiento en glucosa del mutante nulo condicional (153). Se demostró que la eliminación de los últimos 21 aminoácidos tiene un pequeño efecto sobre la función del ribosoma y la viabilidad celular. Sin embargo, una eliminación progresiva del extremo carboxilo afecta cada vez más la estabilidad del tallo, haciendo los ribosomas menos activos, y reduce la tasa de crecimiento celular notablemente. Finalmente, cuando 132 aminoácidos son removidos, las proteínas ácidas no pueden interactuar con la forma truncada de la proteína, haciendo los ribosomas inactivos y las células no son viables en glucosa (153). Estos datos indicaron que la parte del dominio carboxilo-terminal de P0 correspondiente al dominio amino-terminal de las proteínas ácidas tiene un papel clave en la interacción con dichas proteínas y en la formación del tallo (6). Por el contrario, los últimos 21 aminoácidos no parecen tener un papel relevante en la estabilización del tallo pero se vuelven esenciales para la actividad del ribosoma y la viabilidad celular si las proteínas ácidas no se encuentran en el ribosoma, como ocurre con el mutante nulo condicional D67dGP0 (153).

I.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL TALLO RIBOSÓMICO

I.2.2.1 Estructura y estequiometría del complejo

La pluralidad de los componentes del tallo ribosómico eucariota ha planteado preguntas acerca de su composición, especialmente en especies con múltiples proteínas ácidas. En organismos con un solo miembro en cada familia de proteínas ácidas inicialmente se propuso un modelo pentamérico, análogo al complejo bacteriano L10-(L7/L12)₄ (122), basado en un monómero de la proteína P0 y dos homodímeros de las proteínas P1 y P2 (91,139,187). Sin embargo, habiéndose detectado la presencia de heterodímeros P1/P2 en varios organismos eucariotas (45,160,175), también se propusieron posteriormente diversos modelos de ensamblaje alternativos (45). En *S. cerevisiae*, era evidente que el modelo procariota no es válido ya que en el tallo están presentes la proteína P0 y una proteína ácida de cada familia, las cuales forman asociaciones preferentes, P1 α -P2 β y P1 β -P2 α (55,56,174). Estos datos indican que en este organismo el tallo debe estar formado por un pentámero del tipo P0-(P1 α -P2 β)/(P1 β -P2 α).

Sin embargo, la cantidad total de proteínas ácidas en el ribosoma de levadura parece ser variable. Esta variabilidad, la cual no ha sido reportada para las proteínas ácidas bacterianas (131), se atribuyó inicialmente a la liberación de las proteínas P1/P2 de los ribosomas debido a la

disociación de subunidades durante el proceso de preparación (83). Más tarde, se encontró que la cantidad de proteínas ácidas en *S. cerevisiae* es distinta en varias fracciones ribosómicas, siendo menor en ribosomas 80S que en polisomas (145). Además, se estimó que el número de proteínas P por ribosoma en *S. cerevisiae* se reducía de cinco a tres al entrar las células en fase estacionaria, mientras que la proteína P0 en los ribosomas no variaba (145). Todos estos resultados apuntan a la existencia en la célula de diferentes poblaciones de ribosomas que contienen un diferente número de proteínas ácidas en el tallo, lo cual se ha confirmado directamente fraccionando los ribosomas totales mediante cromatografía de afinidad (56) así como mediante técnicas de espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) de 2 fotones (37). Por lo tanto, parece que en situaciones metabólicas normales, la mayor parte de los ribosomas contienen un tallo ribosómico con una estructura P0-(P1 α /P2 β)/(P1 β /P2 α), aunque en una pequeña subpoblación el tallo puede haber perdido uno o incluso los dos heterodímeros. Sin embargo, esta relación puede ser alterada acumulándose ribosomas deficientes en las proteínas P1/P2 en situaciones metabólicas alteradas, como cuando las células se encuentran en fase estacionaria.

I.2.2.2 Estabilidad del complejo

Los resultados comentados en la sección anterior demuestran que las proteínas ácidas, pero no P0, pueden disociarse fácilmente del ribosoma, indicando una relativa inestabilidad del complejo eucariota P0-(P1-P2)₂ en comparación con su contraparte bacteriana que puede tolerar altas concentraciones de urea (121). Esta diferencia en estabilidad está demostrada por el hecho de que el complejo P0-(P1-P2)₂ no resiste las fuertes condiciones desnaturizantes que el complejo L10-(L7/L12)₄ puede soportar, como por ejemplo las condiciones de electroforesis para proteínas ribosómicas (6). Además, se ha observado que el tratamiento del ribosoma con soluciones conteniendo NH₄CL-etanol solamente disocia las proteínas P1 y P2 del ribosoma eucariota (149,180), mientras que libera el complejo entero L10-(L7/L12)₄ del ribosoma bacteriano (64).

I.3 FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL TALLO RIBOSÓMICO

Las proteínas ribosómicas no se encuentran fosforiladas en general. Sin embargo, en células eucarióticas se ha descrito un pequeño número de proteínas ribosómicas que sí se encuentran fosforiladas: las proteínas S6 y L3 (23,51) y las proteínas del tallo ribosómico (62,80,210). Estas últimas se caracterizaron inicialmente en rata como proteínas P1 y P2, precisamente el nombre de proteínas P o fosfoproteínas proviene de su carácter fosforilado (182).

Posteriormente, la proteína P0 se identificó como una fosfoproteína inmunológicamente relacionada a las proteínas P1 y P2 (180). Cabe resaltar que las proteínas del tallo ribosómico se han encontrado fosforiladas en todos los organismos eucarióticos estudiados con la única excepción de *Tetrahymena pyriformis* (6,151).

I.3.1 SITIOS DE FOSFORILACIÓN

Los sitios de fosforilación en las proteínas del tallo ribosómico se han estudiado solamente en pocos casos. En rata se han detectado 3 sitios de fosforilación en las proteínas P1 y P2 (95) y un solo sitio en las proteínas de *S. cerevisiae* (150,196) y *A. salina* (190), siendo la fosforilación en todos los casos en residuos de serina. Al igual que en el caso de *A. salina* (2,190), el sitio de fosforilación *in vivo* de las cuatro proteínas ácidas de *S. cerevisiae* corresponde a la última serina de la proteína localizada en el extremo carboxilo (207).

En la proteína P0, el sitio de fosforilación *in vivo* es la serina en posición 302 en el extremo carboxilo (142), la cual es equivalente al sitio de fosforilación en las proteínas P1 y P2. Por otra parte, en el caso de mamíferos, no existe información sobre sitios de fosforilación adicionales en la proteína P0 como ocurre en las proteínas ácidas.

I.3.2 PROTEÍNA-QUINASAS INVOLUCRADAS EN LA FOSFORILACIÓN

En un estudio sistemático de todas las actividades capaces de fosforilar las proteínas ácidas en *S. cerevisiae* mediante cromatografía de intercambio iónico (17), se detectaron cuatro picos de actividad enzimática en los eluidos además de la caseína-quinasa I y la proteína-quinasa PK60S, las cuales se encuentran en el volumen de exclusión (85,123): la CK-II (192,209); la proteína-quinasa RAP-I, previamente descrita como quinasa RAP (173); la proteína-quinasa RAP-II; y la proteína-quinasa RAP-III. Los resultados de varios ensayos en los que se caracterizaron todas las enzimas detectadas, con excepción de RAP-III debido a su escasez en la célula, mostraron diferencias notables entre las cuatro enzimas con la única similitud de que el mejor sustrato para las cuatro son las proteínas ácidas cuando están incorporadas en el ribosoma (17,84,123,173). Además, se demostró que las enzimas RAP-I, CK-II y PK60S presentan una especificidad de sustrato con respecto a las proteínas ácidas (17,172,173). Cabe mencionar que, posteriormente, se demostró que la proteína-quinasa 60S corresponde a una subunidad catalítica α' de la CK-II (1).

I.4 PAPEL FUNCIONAL DEL TALLO RIBOSÓMICO COMO REGULADOR DE LA TRADUCCIÓN EN ORGANISMOS EUCARIÓTICOS

Los datos estructurales y funcionales que se han resumido en los apartados anteriores han llevado a proponer que el tallo ribosómico ha adquirido durante la evolución unas capacidades moduladoras de la actividad ribosómica, no detectadas en los organismos procarióticos, que le permiten participar en un mecanismo regulador de la traducción específico de las células eucarióticas (6) que se muestra esquemáticamente en la figura I.2.

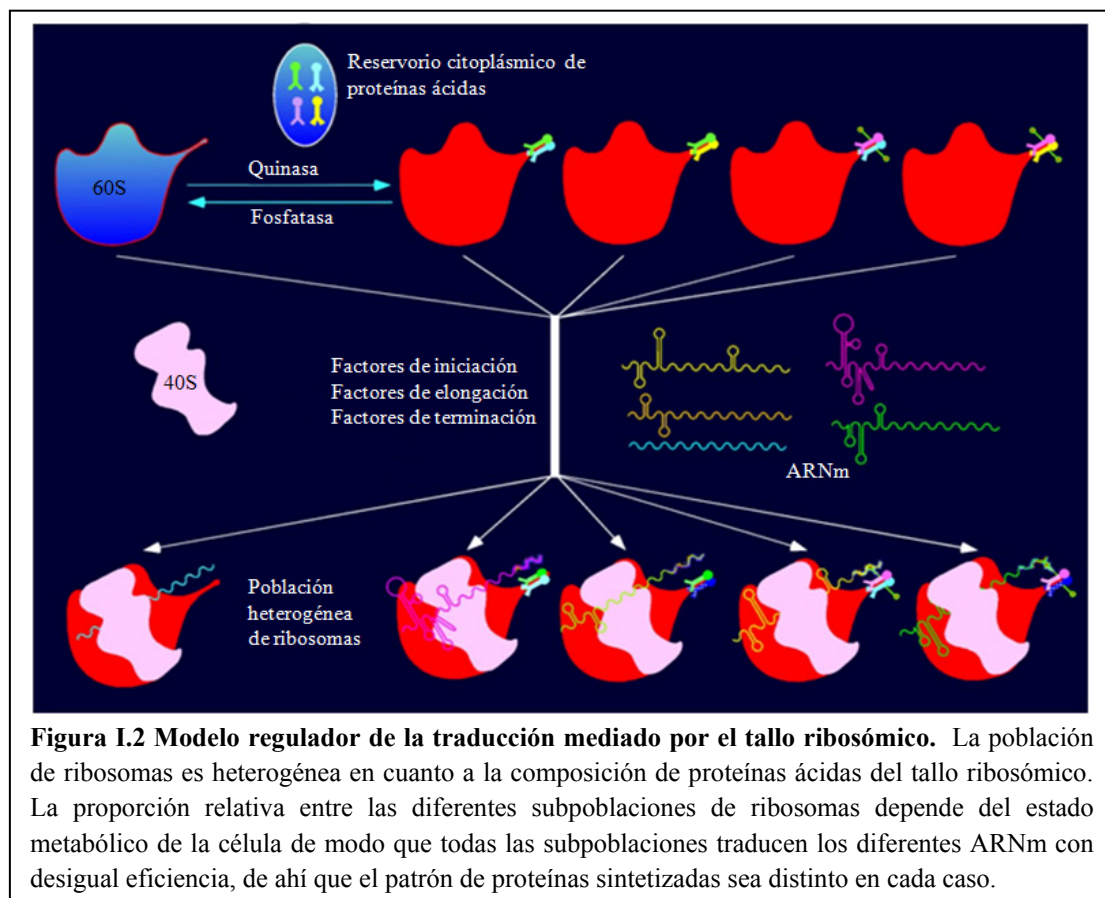


Figura I.2 Modelo regulador de la traducción mediado por el tallo ribosómico. La población de ribosomas es heterogénea en cuanto a la composición de proteínas ácidas del tallo ribosómico. La proporción relativa entre las diferentes subpoblaciones de ribosomas depende del estado metabólico de la célula de modo que todas las subpoblaciones traducen los diferentes ARNm con desigual eficiencia, de ahí que el patrón de proteínas sintetizadas sea distinto en cada caso.

I.4.1 EQUILIBRIO ENTRE SUBPOBLACIONES RIBOSÓMICAS

El mecanismo de regulación propone que en la célula los ribosomas que contienen un tallo completo están en equilibrio con ribosomas desprovistos, total o parcialmente, de proteínas ácidas. El equilibrio entre las diferentes poblaciones de ribosomas está determinado por la actividad metabólica de la célula. Así, en células creciendo en fase exponencial el equilibrio está desplazado hacia los ribosomas que contienen una dotación completa de proteínas ácidas, mientras que en células en fase estacionaria se acumulan ribosomas deficientes en proteínas P1/P2

(6,145). Similarmente, en ribosomas provenientes de semillas no germinadas de maíz las proteínas del tallo parecen estar desfosforiladas y se vuelven fosforiladas durante la germinación (120). La posición del equilibrio entre ribosomas podría estar controlada o por proteína-quinasa o por proteína-fosfatasa que regularían el nivel de fosforilación de las proteínas ácidas. Sin embargo, los datos claramente muestran que la afinidad de las proteínas ácidas por el ribosoma no está alterada por la fosforilación (207), por lo tanto, la cantidad variable de las proteínas ácidas unidas al ribosoma en diferentes condiciones metabólicas (145) no parece estar directamente controlada por la fosforilación.

No se conoce cómo las células pueden controlar la composición del tallo, pero si existe un equilibrio entre las proteínas P1/P2 libres y las que están unidas al ribosoma, la cantidad de proteínas unidas al ribosoma podría estar regulada controlando el tamaño del reservorio citoplásmico. De hecho, el reservorio de proteínas ácidas está reducido al mismo tiempo que la cantidad de proteína unida al ribosoma en células de levadura en fase estacionaria (145). Es razonable pensar que el tamaño del reservorio puede estar controlado por el nivel de expresión o por la degradación, pues ambas alternativas han sido descritas en la regulación de las proteínas ribosómicas en levadura (204). Con respecto al nivel de expresión, se ha demostrado un descenso en la acumulación del ARNm de las proteínas ribosómicas, incluyendo el de las proteínas del tallo, en fase estacionaria (76), lo cual estaría de acuerdo con la reducción detectada de las proteínas ácidas unidas al ribosoma en esta fase de crecimiento. Además, se ha demostrado usando genes de fusión LacZ que el nivel de expresión de las cuatro proteínas ácidas no es el mismo en diferentes condiciones metabólicas (117). Por lo tanto, es posible que la composición cualitativa y cuantitativa del tallo esté controlada regulando la expresión de sus componentes (7). Con respecto a la degradación, se ha encontrado que las cuatro proteínas ácidas no son igualmente resistentes a las proteasas de tal manera que las proteínas P2 se acumulan cuando son sobreexpresadas, mientras que las proteínas P1 son rápidamente degradadas y solamente se acumulan en presencia de las proteínas P2 (116). Por ello, una regulación del tamaño del reservorio citoplásmico de las proteínas ácidas a nivel de la degradación de éstas es una posibilidad que no puede ser excluida (7).

Por otro lado, la acumulación citoplásmica de las proteínas P2, a pesar de su estructura tipo-glóbulo fundido (213), apoya fuertemente la idea de que están protegidas en el citoplasma por proteínas tipo-chaperona, las cuales también pueden participar en el proceso de unión al ribosoma (7). De hecho, se ha demostrado que la proteína P2 β está presente en complejos de alta masa molecular cuando se acumula libre en el citoplasma (138), lo cual está de acuerdo con la idea de que otros elementos además de los propios componentes ribosómicos podrían participar en la interacción de las proteínas ácidas con el ribosoma (7).

I.4.2 ACTIVIDAD DE LAS SUBPOBLACIONES RIBOSÓMICAS

Todas las subpoblaciones de ribosomas son activas en síntesis de proteínas pero no traducen todos los ARNm con la misma eficiencia por lo que el patrón final de proteínas expresadas dependerá de la proporción de cada una de las subpoblaciones (134). Comparando células silvestres con células enriquecidas en ribosomas defectuosos podemos determinar tres tipos de proteínas: a) proteínas que aparecen igualmente representadas en ambos sistemas, indicando que sus respectivos ARNm son similarmente traducidos por los diferentes tipos de ribosomas; b) proteínas ausentes o notablemente reducidas en células enriquecidas en ribosomas defectuosos y que, por lo tanto, sus ARNm son traducidos menos eficientemente por estos ribosomas; y c) proteínas que están aumentadas o incluso sólo presentes en células enriquecidas en ribosomas defectuosos y que sus ARNm son preferente o exclusivamente traducidos estos ribosomas (6).

Los mecanismos por los cuales los ribosomas defectuosos traducen diferencialmente algunos ARNm no han sido todavía explorados en detalle. La reducción o la ausencia de algunas proteínas en los sistemas defectuosos de proteínas P1/P2 puede ser debida a una estructura secundaria más compleja de sus ARNm. Sin embargo, este no parece ser el caso puesto que ensayos con varios ARNm de la cloranfenicol acetyl-transferasa con regiones 5'-UTR de diferentes estabildades (146) no indican diferencias en los niveles relativos de expresión de los mismos ARNm en cepas silvestres y en cepas defectuosas en proteínas P1/P2 (Guarinos, E. y Ballesta, J. P. G., resultados no publicados). En cualquier caso, la mayor dificultad en abrir estructuras complejas de ARNm de doble cadena durante la traducción no explica la expresión preferencial de algunas proteínas por los ribosomas defectuosos, ya que ARNm simples también deberían ser igualmente traducidos por ribosomas normales. El modo en que las proteínas ácidas puedan afectar la selección positiva de estos ARNm por los ribosomas no es claro, pero hay datos que confirman una implicación de la subunidad ribosómica mayor en el proceso de la iniciación de la traducción (144).

Este mecanismo regulatorio propuesto en levadura también parece estar presente en otros organismos eucarióticos y puede haber sido desarrollado para regular la expresión de proteínas requeridas para la fase estacionaria o para condiciones de baja actividad celular metabólica (6).

I.5 ENSAMBLAJE DEL TALLO RIBOSÓMICO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE: INTERACCIONES DE LOS COMPONENTES DEL TALLO

El ensamblaje de las subunidades 60S es un proceso complejo que a efectos analíticos se ha dividido en seis etapas definidas por seis partículas preribosómicas denominadas temprana 0 (E_0), temprana 1 (E_1), temprana 2 (E_2), intermedia (M), tardía (L) y citoplásmica (C) (29). Las partículas preribosómicas pre-60S citoplásmicas quedan definidas por la presencia del factor Kre35p/Lsg1p (113). Este complejo está formado por los ARNr maduros 25S y 5.8S y la mayoría de las proteínas ribosómicas de la subunidad 60S, incluyendo la proteína P0, que se detecta abundantemente en este tipo de partículas (113). Sin embargo, el momento en que la proteína P0 se une a las partículas preribosómicas no está claramente definido, puesto que también se ha detectado su presencia en las partículas preribosómicas 66S tempranas E_0 .

La unión de las proteínas ácidas, a diferencia del resto de proteínas ribosómicas, puede tener lugar en el citoplasma de la célula en la última etapa del ensamblaje del ribosoma (14,177).

I.5.1 ESTUDIOS SOBRE EL ENSAMBLAJE DEL TALLO RIBOSÓMICO

Los primeros estudios sobre el ensamblaje del tallo eucariótico consistieron en reconstituciones *in vitro* del dominio GTPasa de ribosomas de hígado de rata en los cuales se caracterizó el sitio de unión del complejo del tallo al centro GTPasa del ARNr 28S (185,186).

Posteriormente, se realizó el primer estudio del ensamblaje del tallo en *S. cerevisiae* tanto *in vitro* como *in vivo*, en el cual se demostró que las proteínas P1 son capaces de unirse al ribosoma en ausencia de las proteínas P2 y que, por el contrario, estas últimas requieren de la presencia de las proteínas P1 para unirse al ribosoma. Cabe destacar que los datos de este estudio sugieren que las proteínas P1 proveen el anclaje al ribosoma y las proteínas P2 confieren la funcionalidad al complejo P1-P2 (212). Estos datos se confirmaron con estudios de doble híbrido que mostraron la interacción de la proteína P0 con ambas proteínas P1, pero no con ambas proteínas P2 (89).

También existen datos experimentales de la reconstitución parcial *in vitro* del tallo de *S. cerevisiae*, en la cual el heterodímero $P1\alpha$ - $P2\beta$, una vez formado en solución, es capaz de unirse a ribosomas desprovistos de proteínas ácidas y reactivar la capacidad traduccional de éstos (176).

Igualmente se ha estudiado el ensamblaje del tallo mediante espectrometría de masas de ribosomas que contienen las cuatro proteínas ácidas y de ribosomas deficientes de las proteínas

P1 α y P2 β demostrando la localización periférica de las proteínas P2 y la ubicación interna de las proteínas P1 las cuales interaccionarían directamente con la proteína P0 (61).

Recientemente, se realizó un estudio más completo en el cual mediante diversas aproximaciones bioquímicas de replegamiento, reasociación y reactivación se logró la primera reconstitución *in vitro* de un tallo ribosómico de levadura funcional. En dicho trabajo, se propone un modelo de ensamblaje del tallo en el cual el heterocomplejo P1 α -P2 β , después de su formación en el citoplasma, se une a la proteína P0 con el subsiguiente co-plegamiento del complejo trimérico P0-P1 α -P2 β , el cual acomoda las proteínas P1 β y P2 α (por separado o como un heterocomplejo) para formar la estructura pentamérica completa (79).

I.5.2 INTERACCIONES CON OTRAS PROTEÍNAS CELULARES EN LA FRACCIÓN CITOSÓLICA

El único papel fisiológico atribuido al reservorio citoplásmico de proteínas ácidas parece ser el de participar en el intercambio de las mismas entre el citosol y el ribosoma. Sin embargo, el hecho de que este proceso de intercambio no se lleva a cabo en *E. coli* plantea la cuestión de si este reservorio citoplásmico pueda tener otra función adicional en la célula. En cualquier caso, es evidente que las proteínas de dicho reservorio pueden interaccionar con otros componentes del citoplasma y que la caracterización de estas interacciones puede aportar información importante sobre la función del propio reservorio.

Hasta la fecha, no existe un estudio enfocado específicamente a la búsqueda de interacciones de las proteínas ácidas con otras proteínas celulares. Sin embargo, en *S. cerevisiae* se han reportado interacciones de las cuatro proteínas ácidas con otras proteínas celulares en varios estudios sistemáticos de interacciones proteicas mediante purificación por afinidad y sistema de doble híbrido (Tabla I.1). Cabe mencionar que en el caso de los estudios mediante purificación por afinidad se utilizaron lisado total y/o extracto citoplasmático como material de partida para las purificaciones.

Tabla I.1 Interacciones de las proteínas ácidas, actuando como cebo o presa, con otras proteínas celulares (información tomada de la base de datos del genoma de *Saccharomyces*, SGD).

| Proteína ácida | Interacciones | Referencias |
|----------------|---|---------------------------|
| P1 α | Spc1p, Rtt107p, Pho4p, Tpk3p, Trx2p, Sua7p | (26,47,69,77,126,141,188) |
| P1 β | Mis1p, Rli1p, Pam1p, YLR287cp | (69,77) |
| P2 α | Rtt107p, Cla4p, Gen5p, Glc7p, Pho4p, Arb1p, Sec10p | (26,28,32,47,141) |

| | | |
|------------|--|---------------------------|
| P2 β | Ncl1p, Pwp2p, Sec31p, Mak21p, Puf6p, Ski3p, Gcn5p, Pho4p, Tpk3p, Uga2p, Lsm1p, Lsm5p, Dcp1p, Dcp2p | (26,38,39,47,126,178,188) |
|------------|--|---------------------------|

Considerando lo expuesto anteriormente, sería más conveniente utilizar como material de partida para los ensayos de purificación la fracción soluble del citoplasma o citosol, la cual está libre de ribosomas, con el fin de realizar un estudio más exacto de las interacciones entre las proteínas ácidas y otras proteínas citosólicas cuando las primeras se encuentran libres formando el reservorio citoplásmico.

I.5.3 INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS EN LA FRACCIÓN CITOSÓLICA

Como se ha comentado en apartados previos, se ha demostrado la formación de heterodímeros P1-P2 en organismos eucariotas superiores y de las asociaciones preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α en *S. cerevisiae* cuando dichas proteínas forman parte del ribosoma. Sin embargo, la formación de estos heterodímeros también se ha detectado cuando las proteínas no forman parte del ribosoma tanto *in vitro* (45,160) como *in vivo* (4,175). En estos trabajos, la formación de los heterodímeros se detectó mediante ensayos de doble-híbrido y asociaciones *in vitro* combinadas con entrecruzamiento químico, disociación por electroforesis bi-dimensional y análisis de sedimentación.

En el caso de *S. cerevisiae*, también se ha demostrado la formación de los heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α (con menor eficiencia) mediante ensayos de doble-híbrido y cromatografía de exclusión molecular de asociaciones *in vitro* (89,174). La interacción en el citosol de las proteínas P1 β y P2 α también se confirmó, de manera indirecta, al observar un aumento de P1 β en el citosol cuando se sobreexpresan ambas proteínas, sugiriendo que la proteína P2 α previene la proteólisis de la proteína P1 β en este compartimento (116). La interpretación de estos datos apoya la idea de que sea necesaria la formación de los heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α antes de que las proteínas ácidas se ensamblen en el ribosoma para formar el tallo.

Aunque la existencia en el citosol de los heterodímeros preferentes está bien documentada, existen datos que indican que es posible que existan otras interacciones entre las proteínas ácidas en pares distintos que no forman un heterodímero preferente (138). De hecho, hay datos que parecen indicar que la formación previa de estas interacciones no preferentes es necesaria para la unión de las proteínas ácidas al ribosoma (20).

A pesar de los datos previamente mencionados, es necesaria una aproximación más directa mediante la cual se analicen las interacciones entre las cuatro proteínas ácidas y cuyos resultados confirmen no sólo la existencia sino también si es necesaria la formación de los heterodímeros preferentes y no preferentes en el citosol para que las proteínas ácidas puedan ensamblarse en el ribosoma y formar el tallo ribosómico.

I.5.4 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS CON LA PROTEÍNA P0 EN EL RIBOSOMA

I.5.4.1 Estudio del sitio de interacción de la proteína P0 en las proteínas ácidas

Como se ha comentado previamente en el apartado I.2.1.1.1, la interacción de las proteínas ácidas a la proteína P0, y por ende al ribosoma, se lleva a cabo a través de su dominio N-terminal. Recientemente se ha realizado un estudio con una serie de mutantes truncados en el extremo N-terminal y quimeras de las proteínas P1 y P2 de *Bombyx mori* con el fin de determinar con mayor precisión las regiones implicadas en la heterodimerización y en la unión las proteínas al ribosoma. Los resultados mostraron que los primeros 60 aminoácidos de la mitad N-terminal de ambas proteínas son suficientes para la heterodimerización y unión a la proteína P0, de los cuales los 10 primeros residuos son esenciales para realizar ambas funciones (111). En *S. cerevisiae* también se realizó un estudio similar en el cual con el uso de una serie de quimeras de las proteínas P1 α y P2 β se mostró que los primeros 49 aminoácidos de P1 α y los primeros 46 aminoácidos de P2 β son necesarios para la heterodimerización y para la unión de ambas proteínas al ribosoma (20).

I.5.4.2 Estudio de los sitios de interacción de las proteínas ácidas en la proteína P0

Durante estos últimos años, se han realizado varios estudios, especialmente en *S. cerevisiae*, en los cuales se han delimitado las regiones dentro de la mitad C-terminal de la proteína P0 responsables de la interacción con las proteínas ácidas. En un estudio *in vitro* en el cual se analizó el ensamblaje del tallo de *B. mori* en subunidades 50S de *E. coli* desprovistas de tallo, se reportó la existencia de dos sitios, cercanos pero separados, para la interacción de las proteínas ácidas en la proteína P0 situados entre los residuos 210-251 y 252-261 (59).

Por otro lado, en *S. cerevisiae*, mediante ensayos de doble-híbrido con una serie de fragmentos truncados de la mitad C-terminal de la proteína P0, se identificaron los residuos 212-262 (89) y 213-250 (119) como sitios de unión de las proteínas ácidas en la proteína P0, aunque

no se delimitaron los sitios individuales para la unión de cada uno de los dos heterodímeros P1-P2. Posteriormente, mediante el análisis con una serie de aproximaciones *in vitro* e *in vivo* de varias formas truncadas en la mitad C-terminal de la proteína P0, se determinaron los residuos 199-230 y 231-258 como los sitios de unión de los heterodímeros P1 α -P2 β y P1 β -P2 α , respectivamente (78).

La existencia en la proteína P0 de un sitio de unión específico para cada uno de los dos heterodímeros preferentes confirma la existencia del pentámero P0-(P1 α -P2 β)/(P1 β -P2 α) en el tallo ribosómico de células silvestres de *S. cerevisiae*. Sin embargo, este hecho plantea una serie de interrogantes sobre la estructura del tallo en ribosomas deficientes en alguna de las proteínas P1 o P2, como en el caso de los mutantes que expresan las proteínas P1 α y P2 α o P1 β y P2 β , que no fueron capaces de interactuar entre sí en los ensayos previamente comentados. ¿Se asocian estas proteínas para formar un heterodímero en el ribosoma?, ¿a qué sitio de la proteína P0 se uniría dicho heterodímero? La respuesta a estos interrogantes proporcionaría sin duda información muy importante sobre el proceso de ensamblaje del tallo ribosómico.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar las interacciones de los componentes del tallo ribosómico implicadas en su ensamblaje e incorporación al ribosoma.

Objetivos específicos:

1. Estudiar mediante cromatografía de afinidad interacciones proteicas que puedan estar relacionadas con el ensamblaje y/o función del tallo ribosómico.
 - a) Interacciones de las proteínas ácidas con otras proteínas celulares.
 - b) Interacciones de las cuatro proteínas ácidas P1 y P2 entre sí.

2. Determinar la especificidad de unión de cada una de las proteínas ácidas a los sitios de interacción identificados en la proteína P0 in vivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 MATERIAL BIOLÓGICO

II.1.1 CEPAS DE *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* que se utilizaron se detallan en la tabla II.1.

Tabla II.1 Cepas de *E. coli*.

| Nombre | Genotipo | Referencia |
|--------------|---|-----------------------------------|
| DH5 α | F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>SupE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, λ ⁻ | Bethesda Research Laboratories |
| XL1-Blue | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene |

II.1.2 CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* que se han utilizado se detallan en la tabla II.2.

Tabla II.2 Cepas de *S. cerevisiae*.

| Nombre | Genotipo | Referencia |
|-------------------------|--|------------|
| W303-1b | <i>MATα</i> ; <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> | (179) |
| D4 | <i>MATα</i> ; <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> , <i>RPP2α::URA3</i> | (137) |
| D5 | <i>MATα</i> ; <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> , <i>RPP2β::HIS3</i> | (137) |
| D6 | <i>MATα</i> ; <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> , <i>RPP1β::TRP1</i> | (138) |
| D4/P2 α S96Chis6 | D4 transformada con pFL36-P2 α S96Chis6 | (128) |
| D5/P2 β S100Chis6 | D5 transformada con pFL38-P2 β S100Chis6 | (128) |
| D6/P1 β S96Chis6 | D6 transformada con pFL36-P1 β S96Chis6 | (128) |
| D7/P1 α S96Chis6 | D7 (<i>MATα</i> ; <i>ura3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> , <i>RPP1α::LEU2</i>) transformada con pFL38- P1 α S96Chis6 | (128) |

| | | |
|---------------------------|---|--------------|
| D5/P2 β TAP | D5 transformada con YCplac111-P2 β TAP | Este trabajo |
| D67 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP1β::TRP1, RPP1α::LEU2</i> | (138) |
| D567/P2 β S100Chis6 | D567 (<i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2β::HIS3, RPP1β::TRP1, RPP1α::LEU2</i>) transformada con pFL38-P2 β S100Chis6 | Dr. Deyi Qiu |
| D6dGP0 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP1β::TRP1, RPP0::KanMX4:GAL1:RPP0</i> | (129) |
| W303dGP0 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP0::URA3:GAL1:RPP0</i> | (152) |
| W303dGP0/P0wt | W303dGP0 transformada con pFL37-P0wt | Este trabajo |
| W303dGP0/P0 Δ A | W303dGP0 transformada con pFL37-P0 Δ A | Este trabajo |
| W303dGP0/P0 Δ B | W303dGP0 transformada con pFL37-P0 Δ B | Este trabajo |
| W303dGP0/P0 Δ AB | W303dGP0 transformada con pFL37-P0 Δ AB | Este trabajo |
| D46 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2α::URA3, RPP1β::TRP1</i> | (138) |
| D46dGP0 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2α::URA3, RPP1β::TRP1, RPP0::KanMX4:GAL1:RPP0</i> | Este trabajo |
| D46dGP0/P0wt | D46dGP0 transformada con pFL36-P0wt | Este trabajo |
| D46dGP0/P0 Δ A | D46dGP0 transformada con pFL36-P0 Δ A | Este trabajo |
| D46dGP0/P0 Δ B | D46dGP0 transformada con pFL36-P0 Δ B | Este trabajo |
| D46dGP0/P0 Δ AB | D46dGP0 transformada con pFL36-P0 Δ AB | Este trabajo |
| D47 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2α::URA3, RPP1α::LEU2</i> | (138) |
| D47dGP0 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2α::URA3, RPP1α::LEU2, RPP0::KanMX4:GAL1:RPP0</i> | Este trabajo |
| D47dGP0/P0wt | D47dGP0 transformada con pFL39-P0wt | Este trabajo |
| D47dGP0/P0 Δ A | D47dGP0 transformada con pFL39-P0 Δ A | Este trabajo |
| D47dGP0/P0 Δ B | D47dGP0 transformada con pFL39-P0 Δ B | Este trabajo |
| D47dGP0/P0 Δ AB | D47dGP0 transformada con pFL39-P0 Δ AB | Este trabajo |
| D56 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2β::HIS3, RPP1β::TRP1</i> | (138) |

| | | |
|---------------|---|--------------|
| D56dGP0 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2β::HIS3, RPP1β::TRP1, RPP0::KanMX4:GAL1:RPP0</i> | Este trabajo |
| D56dGP0/P0wt | D56dGP0 transformada con pFL38-P0wt | Este trabajo |
| D56dGP0/P0ΔA | D56dGP0 transformada con pFL38-P0ΔA | Este trabajo |
| D56dGP0/P0ΔB | D56dGP0 transformada con pFL38-P0ΔB | Este trabajo |
| D56dGP0/P0ΔAB | D56dGP0 transformada con pFL38-P0ΔAB | Este trabajo |
| D57 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2α::URA3, RPP1α::LEU2</i> | (138) |
| D57dGP0 | <i>MATα; ura3, leu2, trp1, his3, ade2, can1, RPP2α::URA3, RPP1α::LEU2, RPP0::KanMX4:GAL1:RPP0</i> | Este trabajo |
| D57dGP0/P0wt | D57dGP0 transformada con pFL38-P0wt | Este trabajo |
| D57dGP0/P0ΔA | D57dGP0 transformada con pFL38-P0ΔA | Este trabajo |
| D57dGP0/P0ΔB | D57dGP0 transformada con pFL38-P0ΔB | Este trabajo |
| D57dGP0/P0ΔAB | D57dGP0 transformada con pFL38-P0ΔAB | Este trabajo |

II.2 PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla II.3.

Tabla II.3 Plásmidos.

| Vector | Tamaño (pb) | Características | Referencia |
|------------------|-------------|---|----------------------|
| BS/RPP2B | 3.900 | pBS KS+ que contiene el gen de la proteína P2β | (116) |
| Vector T | 2.959 | pBS KS+ digerido con <i>EcoRV</i> y con un TMP en sus extremos 3' | (103) |
| pVT-P2β | 3.682 | Vector T que contiene las regiones 5'-UTR y ORF del gen de la proteína P2β | Este trabajo |
| YCplac111-TAP | 6.997 | YCplac111 (42) que contiene la etiqueta TAP | Dr. Jesús de la Cruz |
| YCplac111-P2βTAP | 7.697 | YCplac111-TAP que contiene las regiones 5'UTR y ORF de la proteína P2β fusionadas | Este trabajo |

| | | al extremo amino-terminal del TAP | |
|-------------|-------|---|--------------|
| pBS5KGP0 | 8.400 | pBS KS+ que contiene la construcción 5'-UTR P0-KanMX4:GALI:RPP0-3'-UTR P0 | (54) |
| pBS-P0 | 5.715 | Lleva clonado el gen de la proteína P0 | (153) |
| pBS-P0ΔA | 5.616 | Lleva clonado el gen de la proteína P0ΔA | Este trabajo |
| pBS-P0ΔB | 5.628 | Lleva clonado el gen de la proteína P0ΔB | Este trabajo |
| pBS-P0ΔAB | 5.532 | Lleva clonado el gen de la proteína P0ΔAB | Este trabajo |
| pFL36 | 6.369 | LEU2, ARS-CEN6, pMB1 ori, <i>Amp^R</i> | (15) |
| pFL36-P0 | 8.584 | pFL36 que contiene el gen de la proteína P0 | Este trabajo |
| pFL36-P0ΔA | 8.485 | pFL36 que contiene el gen de la proteína P0ΔA | Este trabajo |
| pFL36-P0ΔB | 8.497 | pFL36 que contiene el gen de la proteína P0ΔB | Este trabajo |
| pFL36-P0ΔAB | 8.401 | pFL36 que contiene el gen de la proteína P0ΔAB | Este trabajo |
| pFL37 | 5.281 | HIS3, ARS-CEN6, pMB1 ori, <i>Amp^R</i> | (142) |
| pFL37-P0 | 8.038 | pFL37 que contiene el gen de la proteína P0 | Este trabajo |
| pFL37-P0ΔA | 7.939 | pFL37 que contiene el gen de la proteína P0ΔA | Este trabajo |
| pFL37-P0ΔB | 7.951 | pFL37 que contiene el gen de la proteína P0ΔB | Este trabajo |
| pFL37-P0ΔAB | 7.855 | pFL37 que contiene el gen de la proteína P0ΔAB | Este trabajo |
| pFL38 | 4.610 | URA3, ARS-CEN6, pMB1 ori, <i>Amp^R</i> | (15) |
| pFL38-P0 | 7.367 | pFL38 que contiene el gen de la proteína P0 | Este trabajo |
| pFL38-P0ΔA | 7.268 | pFL38 que contiene el gen de la proteína P0ΔA | Este trabajo |
| pFL38-P0ΔB | 7.280 | pFL38 que contiene el gen de la proteína P0ΔB | Este trabajo |
| pFL38-P0ΔAB | 7.184 | pFL38 que contiene el gen de la proteína P0ΔAB | Este trabajo |
| pFL39 | 4.354 | TRP1, ARS-CEN6, pMB1 ori, <i>Amp^R</i> | (15) |
| pFL39-P0 | 7.111 | pFL39 que contiene el gen de la proteína P0 | Este trabajo |
| pFL39-P0ΔA | 7.012 | pFL39 que contiene el gen de la proteína | Este trabajo |

| | | P0ΔA | |
|-------------|-------|--|--------------|
| pFL39-P0ΔB | 7.024 | pFL39 que contiene el gen de la proteína P0ΔB | Este trabajo |
| pFL39-P0ΔAB | 6.928 | pFL39 que contiene el gen de la proteína P0ΔAB | Este trabajo |

II.3 MEDIOS DE CULTIVO

II.3.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA *Escherichia coli*

Los medios líquidos utilizados para el crecimiento de las células de *E. coli* fueron los siguientes:

- A. LB: bacto triptona 2%, NaCl 1%, extracto de levadura 1%.
- B. LBA: bacto triptona 2%, NaCl 1%, extracto de levadura 1%, ampicilina 100 µg/ml.
- C. NYZ⁺: bacto peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, ajustar a pH 7,5 con NaOH, autoclavar y suplementar con 1,25 ml de MgCl₂ 1M, 1,25 ml de MgSO₄ 1M y 2 ml de glucosa 20% o 1 ml de glucosa 2 M por cada 100 ml de medio.

Los medios sólidos tenían la misma composición de los medios líquidos y agar al 2%.

II.3.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA *Saccharomyces cerevisiae*

Los medios líquidos utilizados para el crecimiento de las células de *E. coli* fueron los siguientes:

- A. YEPD: bacto peptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%.
- B. YEPD+G418: bacto peptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%, G418 (geneticina) 250 µg/ml.
- C. YEPG: bacto peptona 2%, extracto de levadura 1%, galactosa 2%.
- D. YEPG+G418: bacto peptona 2%, extracto de levadura 1%, galactosa 2%, G418 (geneticina) 250 µg/ml.
- E. SCD: YNB 0,67%, glucosa 2 %, CSM 0,06%, suplementado con los correspondientes aminoácidos esenciales a 40 µg/ml.

F. SCG: YNB 0,67%, galactosa 2 %, CSM 0,06%, suplementado con los correspondientes aminoácidos esenciales a 40 µg/ml.

Los medios sólidos tenían la misma composición de los medios líquidos y agar al 2%.

II.4 OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por Isogen Biosciences y se detallan en las tablas II.4, II.5 y II.6.

Tabla II.4 Oligonucleótidos utilizados para la construcción y secuenciación de la proteína P2β etiquetada con el TAP en su extremo carboxilo. Las dianas *KpnI* y *BamHI* están subrayadas.

| | |
|---------------|---|
| P2bKpnforward | 5'-TAA <u>GCG GTA CCT</u> GGG AAT CTG TTC ATG TG-3' |
| P2bBamreverse | 5'-GTA TAG <u>GAT CCA</u> TCG AAT AAA CCA AAA CC-3' |
| M13 forward | 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' |
| M13 reverse | 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3' |
| Vb2β 13-3' | 5'-GGT GGT AAC GCT GCC CCA-3' |

Tabla II.5 Oligonucleótidos utilizados para la obtención y secuenciación de las formas truncadas de la proteína P0. La diana *XhoI* está subrayada.

| | |
|----------|---|
| P0A3 | 5'-CGG TCA AGT GTT CAC CTT GCC ATC TGT CG-3' |
| P0A4 | 5'-CGA CAG ATG GCA AGG TGA ACA CTT GAC CG-3' |
| P0B3 | 5'-CTC TTT GGC TAT TGG TTA CGA AAT TGA AGA TTT GGT TGA C-3' |
| P0B4 | 5'-GTC AAC CAA ATC TTC AAT TTC GTA ACC AAT AGC CAA AGA G-3' |
| P0AB1 | 5'-CGA CAA CGG TCA AGT GTT CGA AAT TGA AGA TTT GGT TGA C-3' |
| P0AB2 | 5'-GTC AAC CAA ATC TTC AAT TTC GAA CAC TTG ACC GTT GTC G-3' |
| P0N4 | 5'-ATT GAA ATT GTT TCT GAT GTC AAG-3' |
| P0taaXho | 5'-GAC <u>TCG AGA</u> TCG AAT AAA CCG AAA CCC ATG-3' |

Tabla II.6 Oligonucleótidos utilizados para confirmar la sustitución de la copia genómica del gen de la proteína P0.

| | |
|-----------|-----------------------------------|
| Ant5'-P0 | 5'-GGC TAC TCT GTT TAG GCG GG-3' |
| KanR5' | 5'-CAG GTC TGC AGC GAG GAG-3' |
| Post3'-P0 | 5'-TTT GTG GAG GGA TAC TGA CCC-3' |

| | |
|--------|-------------------------------|
| KanR3' | 5'-CCT CGA CAT CAT CTG CCC-3' |
|--------|-------------------------------|

II.5 ENZIMAS Y REACTIVOS

II.5.1 ENZIMAS

Todas las endonucleasas de restricción utilizadas fueron suministradas por Fermentas Life Sciences. La enzima *DpnI* fue suministrada por Stratagene.

Las ADN polimerasas utilizadas en las reacciones de PCR fueron: *ExTaq* ADN polimerasa suministrada por Takara Bio Inc. y *Pfu* ADN polimerasa suministrada por Stratagene.

Otras enzimas utilizadas fueron: T4 ADN ligasa suministrada por Fermentas Life Sciences y ARNasa A suministrada por Roche.

II.5.2 REACTIVOS

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos (β -mercaptoetanol, glicina, formaldehído, acrilamida, bisacrilamida, etanol, metanol, TCA, PMSF y DTT) fueron suministrados por Merck, Sigma y Fluka.

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por Difco, Merck, Gibco, Roche, Sigma y Bio101.

Otro reactivos utilizados fueron: APS, EDTA, EGTA, SDS, PEG 4000, ácido cumárico, aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatina, quimostatina, antipaína y resina de IgG suministrados por Sigma; urea ultra pura suministrada por ICN Biomedicals; ADN de esperma de salmón suministrado por Roche; H₂O₂ y luminol suministrados por Fluka; anfolinas suministradas por Serva y Pharmacia; anfolitos IPG Buffer, BSA y anticuerpo D α R suministrados por Amersham Biosciences; mezcla de nucleótidos suministrada por Takara Bio Inc. y Stratagene; anticuerpo α -his6 (H-15) suministrado por SantaCruz Biotechnology; anticuerpo R α M suministrado por Nordic; reactivos Bradford Protein Assay y SYPRO Ruby suministrados por Bio-Rad y Molecular Probes, respectivamente; resina de Ni-NTA y proteasa TEV suministrados por Invitrogen; resina de calmodulina suministrada por Stratagene.

II.6 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR

II.6.1 TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli*

Las células de la cepa DH5 α fueron transformadas según el método descrito en (60). Las células de la cepa XL1-Blue se transformaron siguiendo las instrucciones del producto “Quikchange II site-directed mutagenesis kit” de Stratagene.

II.6.2 TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las cepas de levadura se hicieron competentes según el método de acetato de litio modificado (41) y se transformaron mediante choque térmico (68). En el caso de la generación de las cepas condicionales nulas dGP0, las células se transformaron con 0,5-1 μ g de un fragmento *SalI-XbaI*, proveniente del plásmido pBS5KGP0 (54), que contiene el módulo de resistencia a geneticina KanMX4 junto con el ORF de P0 bajo el promotor GAL1 flanqueados por las regiones 5' y 3'-UTR del gen de P0. Después del choque térmico las células se incubaron entre 3 a 4 horas a 30°C en medio rico YEPG para permitir la expresión del gen de resistencia a geneticina antes de la selección de los recombinantes en el mismo medio rico en presencia de dicho antibiótico (YEPG+G418). Para confirmar que se había llevado a cabo mediante recombinación homóloga la sustitución de la copia genómica del gen de la proteína P0 por la construcción del fragmento transformado, se realizaron dos reacciones de PCR con la *ExTaq* ADN polimerasa: una con los oligonucleótidos Ant5'-P0 y KanR5' para amplificar un fragmento que se extiende desde fuera hasta dentro de la construcción por el extremo 5' (región 5'-UTR) y otra con los oligonucleótidos Post3'-P0 y KanR3' para amplificar un fragmento extendiéndose desde fuera hasta dentro de la construcción por el extremo 3' (región 3'-UTR). La cantidad de ADN genómico molde utilizada fue de 2.34 ng para la primera reacción y de 23.4 ng para la segunda reacción. Como control positivo y negativo se utilizó el ADN genómico de las cepas D6dGP0 y D6, respectivamente. Las condiciones para ambas reacciones de PCR se detallan en la tabla II.7.

Tabla II.7 Condiciones de la reacción de PCR para confirmar la integración de la construcción en el locus de la proteína P0.

| Paso | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------|--------|-------------|------------|
| 1 | 1 | 94°C | 5 min |
| 2 | 35 | 94°C | 1 min |
| | | 58°C | 45 s |
| | | 72°C | 3 min 40 s |
| 3 | 1 | 72°C | 5 min |

II.7 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

II.7.1 OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *Escherichia coli*

La obtención de ADN plasmídico a partir de las dos cepas de *E. coli* transformadas se hizo utilizando el producto “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” de Promega.

II.7.2 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

Para la extracción de ADN genómico las células se inocularon en 10 ml de medio de cultivo y se recogieron a una A_{600} mayor de 1,0. Las células sedimentadas se lavaron con H₂O desionizada y se resuspendieron con 200 μ l de tampón GB (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, SDS 1%, NaCl 100 mM, Triton X-100 2%, EDTA 1 mM). Luego se añadieron 200 μ l de fenol:CHCl₃ y la resuspensión se mezcló por inversión. Se añadieron perlas de vidrio a la mezcla y las células se rompieron mediante un equipo FastPrep 120 (Bio 101) con 3 ciclos de 30 segundos a velocidad 6 a 4°C. A la mezcla del lisado se añadieron 200 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) y se agitó vigorosamente durante unos segundos. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm en una microcentrífuga Mikroliter (Hettich) a temperatura ambiente y se colectó la fase acuosa (\approx 400 μ l). A la fase acuosa se añadió un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, el precipitado se lavó con 300 μ l de etanol al 70%, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se volvió a descartar el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente, se disolvió con 100 μ l de ARNasa a 1,25 μ g/ μ l en tampón TE y se incubó a 37°C durante 90 minutos. Después de la incubación la muestra de ADN se guardó a -20°C hasta su utilización.

II.7.3 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para obtener fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa se utilizó el producto “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega.

II.7.4 ESTRATEGIAS DE CLONAJE

II.7.4.1 Obtención de la construcción de la proteína P2 β etiquetada con el TAP en su extremo carboxilo

Para la obtención de la proteína etiquetada primero se amplificaron, a partir del plásmido BS/RPP2B (116), las regiones 5'-UTR y ORF del gen de la proteína P2 β mediante una reacción de PCR con los oligonucleótidos P2bKpnforward y P2bBamreverse y empleando la *ExTaq* ADN polimerasa, que añade un nucleótido de AMP en los extremos 3' generando productos que pueden ser directamente clonados en el vector T (103). Las condiciones de la reacción de PCR se detallan en la tabla II.8. El fragmento de PCR recién obtenido de 724 pb se clonó en el vector T generando el plásmido pVT-P2 β . A partir de este plásmido el fragmento *EcoRI-BamHI* de 726 pb se clonó en los mismos sitios de restricción del vector YCplac111TAP generando el plásmido YCplac111-P2 β TAP.

Tabla II.8 Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de las regiones de la proteína P2 β que serán fusionadas con la etiqueta TAP.

| Paso | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------|--------|-------------|--------|
| 1 | 1 | 95°C | 5 min |
| 2 | 35 | 95°C | 30 s |
| | | 54°C | 45 s |
| | | 72°C | 2 min |
| 3 | 1 | 72°C | 5 min |

II.7.4.2 Obtención de las construcciones de las formas truncadas de la proteína P0

Para obtener las formas truncadas de la proteína P0 se utilizó el producto “Quikchange II site-directed mutagenesis kit” de Stratagene (22), con el cual se eliminaron los sitios de interacción de las proteínas ácidas de manera dirigida. Para este procedimiento se utiliza un plásmido de partida con el inserto de interés que se quiere mutar y un par de oligonucleótidos (tabla II.5 y figura II.1) que contienen la mutación a introducir (en nuestro caso la eliminación de una región) en la parte media y son complementarios entre sí y a las hebras opuestas del plásmido de partida. Mediante una reacción de PCR utilizando la *Pfu* ADN polimerasa de alta fidelidad, se genera el plásmido mutado con mellas en ambas hebras. Luego la muestra es sometida a una digestión con *DpnI*, que es una endonucleasa específica para ADN metilado y hemimetilado utilizada para digerir el ADN del plásmido de partida (parental) y, así, enriquecer el ADN del

plásmido mutado. Finalmente, el plásmido mutado y mellado es transformado en células supercompetentes XL1-Blue.

Como plásmido de partida se utilizó el plásmido pBS-P0 que contiene el gen de la proteína P0 y a partir del cual, después de la reacción de PCR, se generaron los tres plásmidos pBS mutados con las tres formas truncadas de dicho gen utilizadas en este trabajo. Para la eliminación del sitio A se utilizaron los oligonucleótidos P0A3 y P0A4, para eliminar el sitio B los oligonucleótidos P0B3 y P0B4, y para eliminar ambos sitios los oligonucleótidos P0AB1 y P0AB2. En la figura II.1 se muestra un esquema con los sitios de hibridación de los seis oligonucleótidos dentro del ORF de P0. Las condiciones de la reacción de PCR se describen en la tabla II.9.

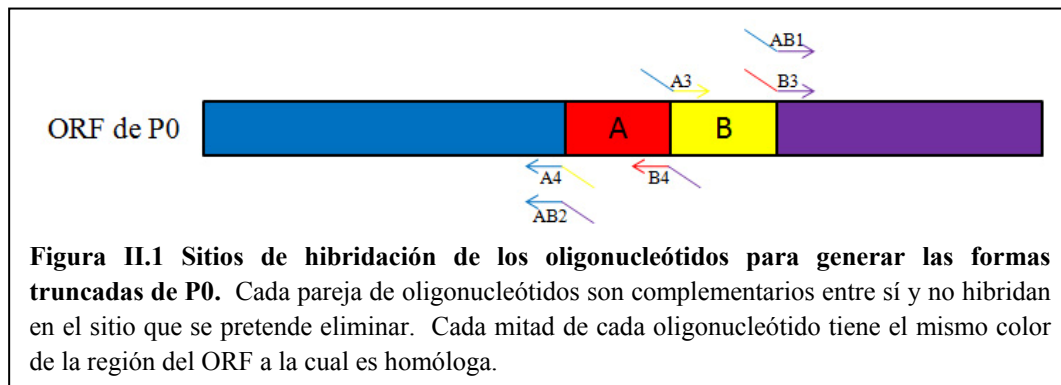


Tabla II.9 Condiciones de la reacción de PCR para la eliminación de los sitios de interacción de las proteínas ácidas.

| Sitio eliminado | Paso | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|-----------------|------|--------|-------------|------------|
| A y AB | 1 | 1 | 95°C | 1 min |
| | 2 | 18 | 95°C | 50 s |
| | | | 60°C | 50 s |
| | | | 68°C | 6 min |
| 3 | 1 | 68°C | 7 min | |
| B | 1 | 1 | 95°C | 1 min |
| | 2 | 18 | 95°C | 50 s |
| | | | 47°C | 50 s |
| | | | 68°C | 6 min 30 s |
| 3 | 1 | 68°C | 7 min | |

Posteriormente, el plásmido pBS-P0 y los tres plásmidos pBS mutados se abrieron mediante una digestión con *ScaI* y luego se liberaron los fragmentos que contienen las cuatro formas del gen de la proteína P0 (la forma completa y las tres formas truncadas) para ser clonados finalmente en los plásmidos centroméricos pFL36, pFL37, pFL38 y pFL39. En la tabla II.10 se detallan las dianas de restricción utilizadas para la liberación de los fragmentos a partir de los plásmidos pBS y para su posterior clonaje en cada plásmido centromérico.

Tabla II.10 Dianas de restricción utilizadas para el clonaje de las formas del gen de la proteína P0 en los plásmidos centroméricos.

| Vector | Forma de P0 | Fragmentos liberados de pBS (kpb) | Sitios de clonaje en el vector |
|--------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| pFL36 | WT | <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I (2,808) | <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I |
| | ΔA | <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I (2,709) | |
| | ΔB | <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I (2,721) | |
| | ΔAB | <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I (2,625) | |
| pFL37 | WT | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,790) | <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I |
| | ΔA | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,691) | |
| | ΔB | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,703) | |
| | ΔAB | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,607) | |
| pFL38 | WT | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,790) | <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I |
| | ΔA | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,691) | |
| | ΔB | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,703) | |
| | ΔAB | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,607) | |
| pFL39 | WT | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,790) | <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I |
| | ΔA | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,691) | |
| | ΔB | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,703) | |
| | ΔAB | <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I (2,607) | |

II.8 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

II.8.1 ELECTROFORESIS DE ADN

La separación de las moléculas de ADN por tamaño se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa/TAE según se describe en (147).

II.8.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

II.8.2.1 SDS-PAGE

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS al 10, 12.5 o 15% según el método descrito en (147) con un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad).

II.8.2.2 Electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE

Para separar los complejos proteicos purificados mediante cromatografía de afinidad los eluidos de las purificaciones se incubaron con TCA al 10% durante 90 minutos a 4°C y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga Mikroliter (Hettich) durante 15 minutos a 4°C. Las proteínas precipitadas se lavaron 2 veces con acetona a -20°C centrifugando las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C después de cada lavado. Finalmente, el precipitado de proteínas se resuspendió en un volumen máximo de 150 µl de tampón L (Tris-HCl 40 mM pH 8,8, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, anfolitos IPG Buffer pH 3-10 1,5%, DTT 50 mM) y se analizó mediante una electroforesis bidimensional. La primera dimensión consistió en un isoelectroenfoque horizontal en un gradiente no lineal de pH de 3-10 usando tiras Immobiline DryStrip Gels (Amersham Biosciences) previamente rehidratadas en tampón R (Tris-HCl 40 mM pH 8,8, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, anfolitos IPG Buffer pH 3-10 1,5%, DTT 50 mM, azul de bromofenol 0,002%) durante un mínimo de 8 horas a temperatura ambiente. El isoelectroenfoque se realizó con un equipo Ettan IPGphor 2 (Amersham Biosciences) con el programa de la tabla II.11 a 50 µA/tira a 20°C. A continuación, las tiras se equilibraron incubándolas en tampón E (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) en presencia de DTT (100 mg por cada 10 ml de tampón E) y luego en presencia de IAA (250 mg por cada 10 ml de tampón E) durante 15 minutos a temperatura ambiente en ambos casos. Después de ambas incubaciones, cada tira se colocó horizontalmente sobre un gel vertical y la segunda dimensión consistió en una electroforesis SDS-PAGE al 12.5% con un equipo SE 600 Ruby (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla II.11 Programa para la carrera de la primera dimensión (IEF) con el Ettan IPGphor 2.

| Paso | Tipo de paso | Voltaje | Duración |
|------|--------------|---------|--------------|
| 1 | STEP | 300 V | 4 horas |
| 2 | GRAD | 1000 V | 5 horas |
| 3 | GRAD | 8000 V | 3 horas |
| 4 | STEP | 8000 V | 24000 Vhoras |

| | | | |
|---|------|-------|----------|
| 5 | STEP | 500 V | 12 horas |
|---|------|-------|----------|

II.8.2.3 Isoelectroenfoque de proteínas

Previo a la separación de las proteínas en los ribosomas, 200 µg de la fracción de ribosomas lavados se incubaron con 15 µg de ARNasa A durante 25 minutos a 4°C y luego la muestra se liofilizó en un equipo miVac concentrator (GeneVac). Después de la liofilización el sedimento se resuspendió con 15 µl de tampón de carga para IEF (urea 8 M, anfolinas pH 2-4 3%, anfolinas pH 2,5-5 3%, azul de bromofenol 0,002%) y las proteínas presentes en los ribosomas se separaron mediante un isoelectroenfoque con un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) en geles de poliacrilamida/urea usando una combinación de anfolinas pH 2-4 y 2.5-5 en una proporción 1:1 en las mismas condiciones descritas en (142,207).

II.9 TÉCNICAS DE TINCIÓN DE GELES

II.9.1 TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

La tinción de los geles con nitrato de plata se realizó fijando el gel en solución A (TCA 10%) durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se lavó con H₂O desionizada durante 5 minutos. El gel se sumergió en H₂O desionizada, se incubó 3 veces en el microondas al máximo durante 20 segundos y luego a temperatura ambiente durante 4 minutos. El gel se incubó en una solución B (DTT 0,2 mM) 3 veces en el microondas al máximo durante 20 segundos y después a temperatura ambiente durante 4 minutos. A continuación, el gel se lavó con H₂O desionizada durante 4 minutos para luego incubarlo en solución C (AgNO₃ 0,1%) 3 veces en el microondas al máximo durante 20 segundos y después a temperatura ambiente durante 4 minutos. El gel se volvió a lavar en H₂O desionizada durante 4 minutos, se reveló en solución D (Na₂CO₃ 3%, formaldehído 0,0185%) y la reacción se detuvo con solución E (ácido cítrico 20%) después de que se tiñeran las bandas de proteínas.

II.9.2 TINCIÓN CON SYPRO RUBY

Los geles bidimensionales se tiñeron con el reactivo SYPRO Ruby según las instrucciones del fabricante. Las bandas de proteínas fluorescentes se detectaron con un equipo Typhoon 9410 (Amersham Biosciences).

II.10 OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE *Saccharomyces cerevisiae*

II.10.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTO CITOPLASMÁTICO (FRACCIÓN S30)

Para obtener la fracción S30 las células se crecieron en medio rico hasta una densidad óptica correspondiente a la fase exponencial ($A_{600} \approx 0,8-1,0$). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm en un rotor Sorvall SS-34 a una temperatura de 4°C y se resuspendieron en tampón 1 (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, β -mercaptoetanol 5 mM, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 12,5 mM). Las células se volvieron a centrifugar en una microcentrífuga Mikroliter (Hettich) a 13000 rpm durante 30 segundos a 4°C. El sedimento de las células lavadas se resuspendió en tampón 1 con una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatina, PMSF, quimostatina y antipaína) y se añadieron perlas de vidrio en una proporción 1:1. Las células se rompieron en un equipo FastPrep 120 (Bio 101) con 3 ciclos de 30 segundos a velocidad 6 a 4°C. El lisado obtenido se transfirió a tubos limpios y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C para recoger el sobrenadante que corresponde a la fracción S30.

II.10.2 OBTENCIÓN DE RIBOSOMAS CRUDOS Y FRACCIÓN CITOSÓLICA (FRACCIÓN S100)

Para obtener los ribosomas y la fracción S100, la fracción S30 se centrifugó a 90000 rpm durante 75 minutos a 4°C en rotores Beckman TLA100.1-3. El sobrenadante de la centrifugación corresponde a la fracción S100 y el sedimento obtenido corresponde a los ribosomas crudos o “no lavados” (ribosomas con proteínas asociadas que no forman parte de éstos), los cuales se resuspendieron en tampón 1.

II.10.3 OBTENCIÓN DE RIBOSOMAS LAVADOS A PARTIR DE RIBOSOMAS CRUDOS

Para obtener los ribosomas lavados (ribosomas sin proteínas asociadas), la fracción de ribosomas crudos resuspendidos en tampón 2 (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, β -mercaptoetanol 5 mM, acetato de amonio 500 mM, $MgCl_2$ 100 mM), en lugar del tampón 1, se cargó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa al 20% (2/5 del total)/40% (3/5 del total) en tampón 2 y se centrifugó a 90000 rpm durante 2 horas a 4°C en un rotor Beckman TLA100.3. El sobrenadante de la

centrifugación se descartó y el sedimento, que corresponde a los ribosomas lavados, se resuspendió en tampón 1.

II.11 CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS

II.11.1 MUESTRAS DE ADN

Las muestras de ADN plasmídico y genómico se cuantificaron utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop) calculando la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a una A_{260} según las instrucciones del fabricante.

II.11.2 MUESTRAS DE RIBOSOMAS

Para la cuantificación de las muestras de ribosomas crudos y lavados primero se cuantificó el ARNr de dichas fracciones ribosómicas utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop) igual que en el apartado anterior. Para la conversión a $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el valor de las unidades de A_{260} se dividió entre 14 según la siguiente fórmula: 14 unidades de $A_{260} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ribosomas totales.

II.11.3 MUESTRAS DE PROTEÍNAS

La cantidad de proteína total de las fracciones S30 y S100 y de las fracciones de purificación por afinidad se cuantificó mediante el método descrito en (19) utilizando el reactivo Bradford Protein Assay.

II.12 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

II.12.1 PROTEÍNAS ETIQUETADAS CON UNA COLA DE 6 RESIDUOS DE HISTIDINAS

Esta purificación se realizó utilizando una resina de Ni-NTA, la cual tiene afinidad por los residuos de histidinas fusionados en el extremo carboxilo de la proteína de interés. Previo al ensayo el volumen de resina a utilizar se equilibró con el tampón A (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, imidazol 10 mM). En los casos de expresión normal y acumulada de la proteína etiquetada en el citosol se utilizaron 25 y 35 μl de resina compacta por

cada mg de proteína total de S100, respectivamente, y la incubación se realizó durante 60 minutos a 4°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se transfirió la mezcla de incubación a una columna, se recogió la fracción no retenida y luego la resina se lavó con 20 volúmenes de tampón B (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, imidazol 20 mM). Los complejos proteicos unidos a la resina a través de la proteína etiquetada se recuperaron eluyendo 4 veces con un volumen de tampón C (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, imidazol 100 mM). La resina se recuperó de la columna resuspendiéndola con un volumen de H₂O desionizada. Todas las fracciones de la purificación se recogieron centrifugando en una microcentrífuga Mikroliter (Hettich) a 13000 rpm durante 10 segundos a 4°C.

II.12.2 PROTEÍNAS ETIQUETADAS CON TAP

Para llevar a cabo este tipo de purificación se utilizaron dos resinas, una de IgG-sefarosa y una de calmodulina-agarosa que tienen afinidad por la proteína A y el péptido CBP dentro de la etiqueta TAP, respectivamente. La etiqueta TAP está localizada en el extremo carboxilo de las proteínas y se compone, desde el extremo N-terminal al C-terminal, de: el péptido CBP; un primer espaciador de 9 aminoácidos; un sitio de corte altamente específico para la proteasa del virus del mosaico del tabaco; un segundo espaciador de dos aminoácidos; y dos dominios de unión a IgG de la proteína A. La purificación se realizó modificando ligeramente el procedimiento descrito en (140). Brevemente, se incubaron 9 mg de S100 con 500 µl de resina de IgG, previamente equilibrada con tampón IPP150 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP 40 0,1%), durante 150 min a 4°C. Transcurrido este tiempo, se transfirió la mezcla de incubación a una columna, se recogió la fracción no retenida y la resina de IgG se lavó 2 veces con 2,2 ml de tampón IPP150 y 2 veces con 2,2 ml de tampón TEV (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP 40 0,1%, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM). Los complejos proteicos unidos a la resina a través de la proteína etiquetada se recuperaron incubando la resina de IgG con 2 ml de buffer TEV y 120 unidades de proteasa TEV durante 90 min a 16°C y obteniendo la fracción líquida de dicha incubación. De este primer eluido (EteV) se separaron 200 µl y el resto se incubó con 400 µl de resina de calmodulina, previamente equilibrada con tampón CAB (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP 40 0,1%, β-mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnesio 1 mM, imidazol 1 mM, CaCl₂ 2 mM), en presencia de β-mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnesio 1 mM, imidazol 1 mM y CaCl₂ 5 mM durante 60 min a 4°C. Después de la incubación la mezcla se transfirió a una columna nueva, se recogió la fracción no retenida, la resina de calmodulina se lavó 2 veces con 1,2 ml de tampón CAB y las proteínas unidas a la resina se recuperaron eluyendo 5 veces con 650

μl de tampón CAE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP 40 0,1%, β-mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnesio 1 mM, imidazol 1 mM, EGTA 2 mM). Las resinas de IgG y calmodulina se recuperaron de las columnas resuspendiéndolas con un volumen de H₂O desionizada. Todas las fracciones de cada paso de purificación se recogieron centrifugando en una microcentrífuga Mikroliter (Hettich) a 13000 rpm durante 10 segundos a 4°C.

II.13 ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA (WESTERN-BLOT)

Después de separar las proteínas en geles de SDS-PAGE, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF (inmobilon, Millipore) previamente humedecida durante 1 minuto en metanol para activarla. Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda Mini-Protean II (Bio-Rad) en el tampón recomendado (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) aplicando un amperaje de 250 mA, para una membrana, y 350 mA, para dos membranas, durante una hora. Tras finalizar la transferencia, se realizó la detección inmunológica de las proteínas transferidas a la membrana según el método descrito en (181). Para la detección de las cinco proteínas del tallo ribosómico y las proteínas ácidas etiquetadas se utilizaron los anticuerpos detallados en la tabla II.12. Para el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales se utilizó un anticuerpo de conejo contra inmunoglobulinas de ratón RαM a una dilución 1:2500, mientras que para los anticuerpos policlonales se utilizó un anticuerpo de asno frente a inmunoglobulinas de conejo DαR a una dilución 1:2500. Ambos anticuerpos secundarios tienen conjugada la enzima peroxidasa de rábano para su detección mediante quimioluminiscencia. Para la reacción de quimioluminiscencia se añadieron 25 μl de ácido cumárico 90 mM, 50 μl de luminol 250 mM y 3 μl de H₂O₂ 33% en 10 ml de una solución Tris-HCl 100 mM pH 8,8, en la cual se sumergió la membrana durante 1 minuto en ausencia de luz para su posterior exposición.

Tabla II.12 Anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas del tallo con y sin etiqueta.

| Anticuerpo | Tipo | Dilución | Antígeno | Referencia |
|------------|------------|----------|--|------------|
| 916 | Policlonal | 1:500 | P1α | (129) |
| 1CE1 | Monoclonal | -- | P1β | (197) |
| 1BE3 | Monoclonal | 1:3 | P2α | (197) |
| 1AA9 | Monoclonal | 1:4 | P2β y P2βCBP (después del corte con la proteasa TEV) | (197) |
| 3BH5 | Monoclonal | 1:4 | Extremo carboxilo fosforilado de | (197) |

| | | | las proteínas P | |
|----------------|------------|--------|-------------------------------------|------|
| R α M | Monoclonal | 1:2500 | Proteína A dentro de P2 β TAP | |
| α -his6 | Policlonal | 1:1000 | Cola de seis residuos de histidinas | (70) |

RESULTADOS

III.1 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS EN EL CITOSOL

La falta de estudios específicamente enfocados a la búsqueda de interacciones de las proteínas ácidas del reservorio citoplásmico nos condujo a llevar a cabo este tipo de estudio en búsqueda de: a) alguna proteína citosólica que pueda participar en el ensamblaje de las proteínas ácidas al ribosoma o que estuviera relacionada con su actividad en la traducción y b) la presencia de heterodímeros entre las proteínas ácidas que pudieran formarse previamente a su incorporación al ribosoma para formar el tallo ribosómico.

III.1.1 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS CON OTRAS PROTEÍNAS CELULARES

La detección de las interacciones proteína-proteína en las que participan las proteínas ácidas en la fracción soluble del citoplasma (citosol) se realizó mediante la purificación por cromatografía de afinidad de los complejos proteicos. En esta técnica, una de las proteínas del complejo a purificar lleva una etiqueta que es afín a una resina en donde es retenida junto con las demás proteínas del complejo para posteriormente ser detectadas mediante técnicas de tinción e inmunodetección con anticuerpos específicos.

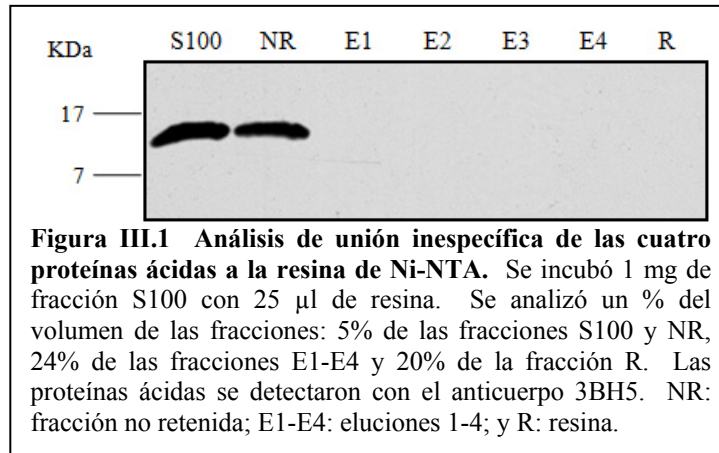
III.1.1.1 Purificación mediante la cola de histidinas

Una de las aproximaciones utilizadas para la purificación de los complejos con las proteínas ácidas fue la cromatografía a través de una cola de histidinas, en la cual las proteínas ácidas etiquetadas en su extremo carboxilo con seis residuos de histidina (his6) son retenidas en una resina de Ni-NTA debido a la afinidad de la histidina por este ión y luego son recuperadas eluyendo con imidazol.

III.1.1.1.1 Comparación de la purificación de los complejos con las cuatro proteínas ácidas

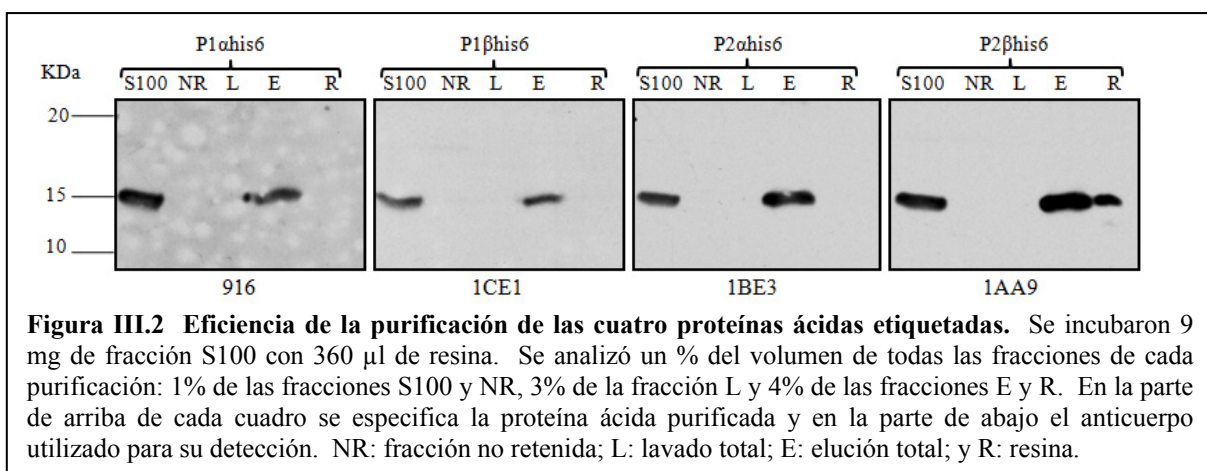
Antes de proceder a realizar los ensayos de purificación con las proteínas ácidas etiquetadas fue necesario comprobar que ninguna de estas cuatro proteínas sin etiquetar se une de manera inespecífica a la resina de Ni-NTA. Por consiguiente, primero se realizó un ensayo de purificación incubando la fracción S100 proveniente de la cepa W303-1b (cepa control) con la resina siguiendo el procedimiento detallado en el apartado II.12.1 de Materiales y métodos. En la figura III.1 se muestra el análisis de la presencia de las proteínas ácidas en las fracciones mediante

inmunodetección con el anticuerpo 3BH5 que reconoce las cuatro proteínas ácidas a través de su extremo carboxilo casi idéntico en ellas.



El análisis mostró que ninguna de las cuatro proteínas ácidas se une inespecíficamente a la resina de Ni-NTA ya que toda la cantidad de proteínas ácidas en la fracción de partida (fracción S100) es recuperada en la fracción no retenida y no se detecta rastro alguno de ellas en las fracciones de las eluciones y de la resina.

Una vez comprobada la incapacidad de las cuatro proteínas ácidas de unirse inespecíficamente a la resina, se procedió a la purificación de los complejos con cada una de las cuatro proteínas ácidas etiquetadas incubando la fracción S100 de cada cepa a utilizar con resina de Ni-NTA (apartado II.12.1 de Materiales y métodos). Para realizar este estudio se utilizaron las cepas D4/pFL36-P2 α his6, D5/pFL38-P2 β his6, D6/pFL36-P1 β his6 y D7/pFL38-P1 α his6 que fueron generadas de forma que las proteínas ácidas endógenas fueron sustituidas por las correspondientes formas etiquetadas con la cola de histidinas (128). Es importante mencionar que

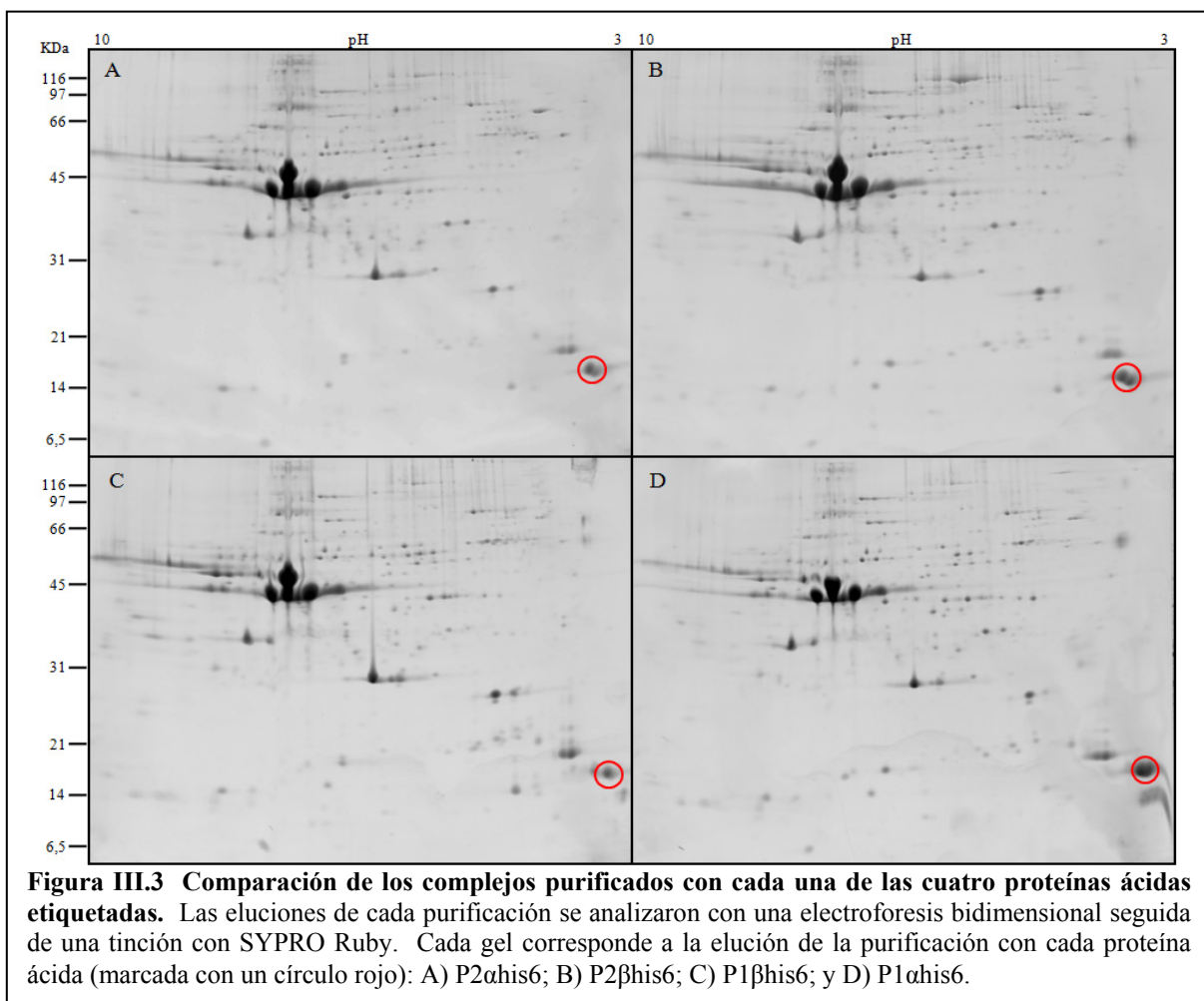


si bien estas cuatro proteínas etiquetadas llevan una mutación en la que el último residuo de serina

del extremo carboxilo es cambiado a cisteína (S96C en las proteínas P1 α , P1 β y P2 α y S100C en la proteína P2 β), está demostrado que dicha mutación no altera la expresión ni la función de las proteínas puesto que los ribosomas de las cuatro cepas que expresan estas proteínas tienen una actividad traductora similar a la cepa control W303-1b (128).

Previamente al aislamiento de los complejos purificados, se analizó la purificación de cada una de las cuatro proteínas ácidas mediante inmunodetección con un anticuerpo específico para cada una como se muestra en la figura III.2. Es evidente que la eficiencia de la purificación con cada una de las proteínas ácidas es alta puesto que toda la cantidad de proteína de partida es retenida en la resina (las fracciones NR y L no muestran pérdida alguna de proteína) y luego es recuperada en su totalidad con la única excepción de la purificación de P2 β his6 que todavía muestra una pequeña porción de la proteína retenida en la resina.

A continuación, nos interesó comparar los patrones de proteínas co-purificadas con cada una de las cuatro proteínas ácidas para observar si existían diferencias significativas entre ellos.



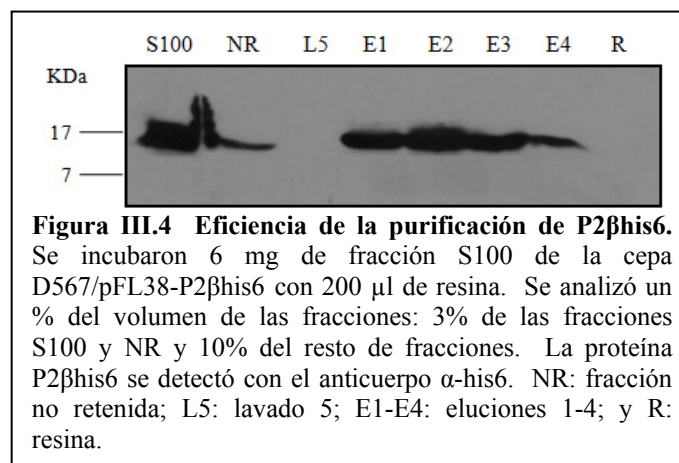
La detección de las proteínas en los complejos purificados se realizó analizando las eluciones de cada purificación mediante una electroforesis bidimensional en un intervalo de pH 3-10 y una

posterior tinción de los geles con SYPRO Ruby (Figura III.3) según lo descrito en los apartados II.8.2.2 y II.9.2 de Materiales y métodos, respectivamente. Los resultados del análisis de los complejos purificados indican que el patrón bidimensional es muy similar entre las cuatro muestras y no se detecta una diferencia significativa de las proteínas co-purificadas con cada proteína ácida. También se puede observar que la diferencia del peso molecular entre las proteínas ácidas es indetectable, si bien las proteínas P1 se encuentran ligeramente más desplazadas hacia un menor pH que las proteínas P2 debido a su mayor carácter ácido.

III.1.1.1.2 Purificación de las proteínas que interactúan con la proteína P2 β acumulada en el citosol

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los patrones de purificación de las cuatro proteínas ácidas nos pareció razonable centrar inicialmente nuestro esfuerzo en identificar las proteínas de los complejos purificados utilizando como cebo la proteína ácida más abundante y estable en el citosol, la proteína P2 β (197). Para este fin, se utilizó la cepa D567/pFL38-P2 β his6 que fue generada de manera que la proteína P2 β endógena fue sustituida por su forma etiquetada P2 β his6. Debido a que en esta cepa están ausentes las dos proteínas P1 (al igual que en la cepa D67), las proteínas P2 son incapaces de unirse al ribosoma concentrándose en su totalidad en el citosol (138), consiguiéndose así una acumulación notablemente alta de estas proteínas en este compartimento celular.

La purificación de la proteína P2 β his6 se realizó de la misma manera que en el apartado anterior incubando en paralelo la fracción S100 proveniente de las cepas D567/pFL38-P2 β his6 y D67 (control negativo de la purificación) con resina de Ni-NTA. Primero, se analizó la



purificación de la proteína P2 β his6 mediante inmunodetección en las fracciones con el anticuerpo α -his6, como se observa en la figura III.4. Claramente se puede observar que la eficiencia de la

purificación de la proteína P2 β his6 es muy alta puesto que, si bien una pequeña porción de la

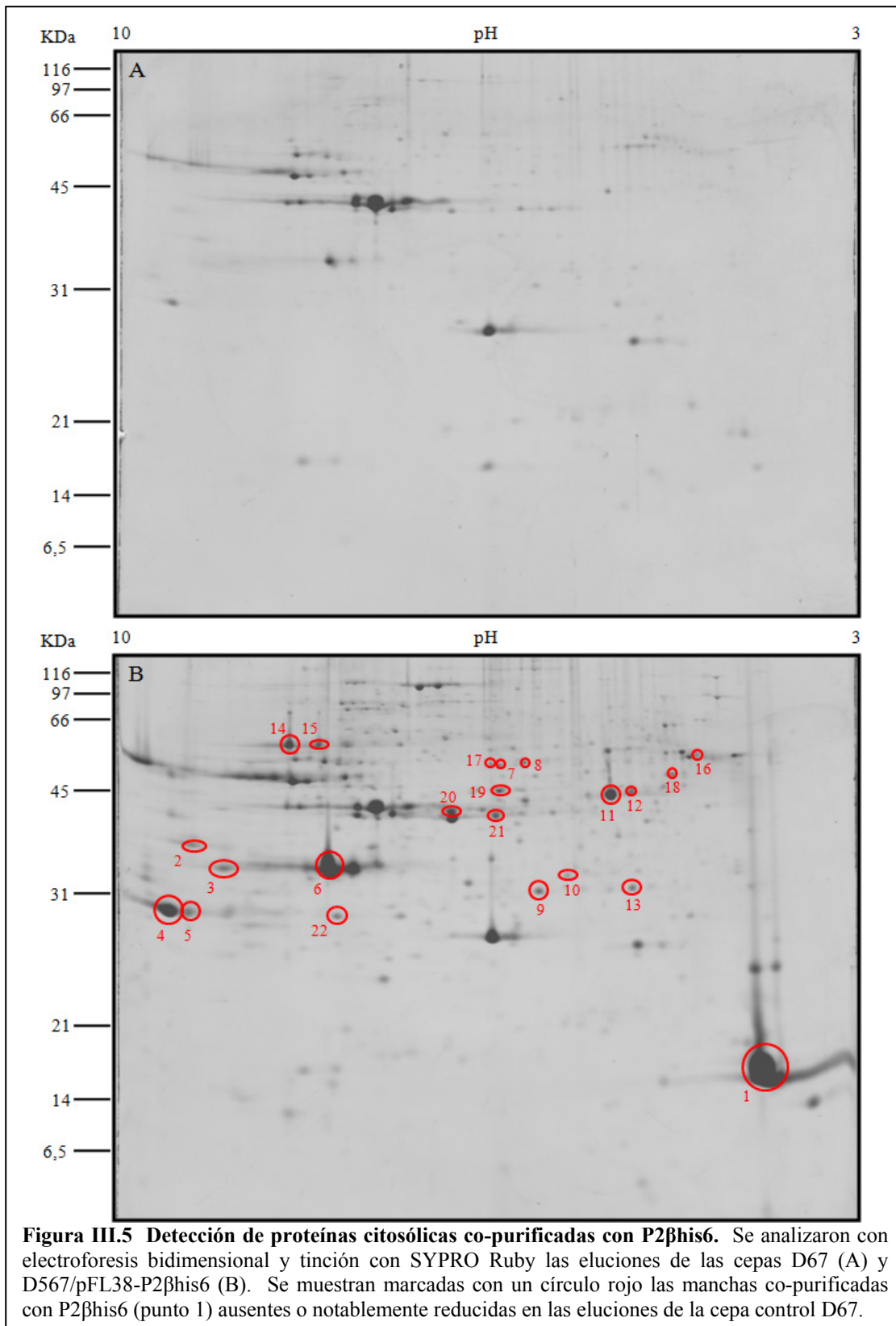


Figura III.5 Detección de proteínas citosólicas co-purificadas con P2 β his6. Se analizaron con electroforesis bidimensional y tinción con SYPRO Ruby las eluciones de las cepas D67 (A) y D567/pFL38-P2 β his6 (B). Se muestran marcadas con un círculo rojo las manchas co-purificadas con P2 β his6 (punto 1) ausentes o notablemente reducidas en las eluciones de la cepa control D67.

proteína que hay en la muestra de partida se pierde en la fracción no retenida, en las eluciones se recupera la totalidad de la proteína que quedó retenida en la resina.

Posteriormente, se procedió al análisis de las proteínas co-purificadas con la proteína P2 β his6 en las eluciones, tanto de la cepa D567/pFL38-P2 β his6 como de la cepa D67, mediante electroforesis bidimensional y tinción con SYPRO-Ruby (Figura III.5). Se detectaron de manera reproducible, en al menos tres experimentos distintos, 21 manchas, junto con la proteína P2 β his6, que aparecen de manera diferencial en las eluciones provenientes de la cepa D567/pFL38-P2 β his6 en comparación con las eluciones provenientes de la cepa control D67. Estas manchas detectadas diferencialmente entre las dos cepas se pueden dividir en dos tipos: el primer tipo está formado por manchas que están presentes en la muestra de la cepa D567/pFL38-P2 β his6 y ausentes en la muestra control, mientras que el segundo tipo está formado por manchas presentes en ambas muestras pero con una intensidad notablemente mayor en la muestra de la cepa D567/pFL38-P2 β his6 que en la muestra control. Este segundo tipo de manchas debe corresponder a proteínas que aunque puedan unirse directamente a la resina es evidente que también lo hacen en mayor proporción a través de la proteína P2 β his6. Cabe mencionar que las manchas diferenciales están comprendidas en un intervalo de peso molecular de 25 a 60 KDa y entre ellas hay proteínas tanto ácidas como básicas.

III.1.1.1.3 Identificación de las proteínas diferenciales por espectrometría de masas

La identificación de las proteínas co-purificadas diferencialmente entre el control y la muestra se llevó a cabo en el servicio de proteómica del CBMSO separando los péptidos trípticos y calculando su masa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para luego compararla por huella dactilar de masa peptídica contra una base de datos de péptidos teóricos generados *in silico*. En la tabla III.1 se muestran los resultados del análisis para cada mancha diferencial. Las 21 manchas diferenciales corresponden a un total de 15 proteínas ya que algunas de ellas están presentes como un par de manchas con la misma masa molecular pero con puntos isoeléctricos ligeramente distintos (gel B de la figura III.5: pares 4 y 5; 7 y 8; 11 y 12; 14 y 15) y que, por lo tanto, deben corresponder a modificaciones post-traduccionales de la misma proteína. Solamente en el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se encontraron dos isozimas o isoformas (Tdh1p y Tdh3p) de la misma proteína. De todas las manchas diferenciales analizadas sólo dos no fueron identificadas: las manchas 10 y 17.

Tabla III.1 Proteínas diferenciales identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Las manchas marcadas con un asterisco pertenecen al primer tipo mientras que las marcadas con dos asteriscos pertenecen al segundo tipo.

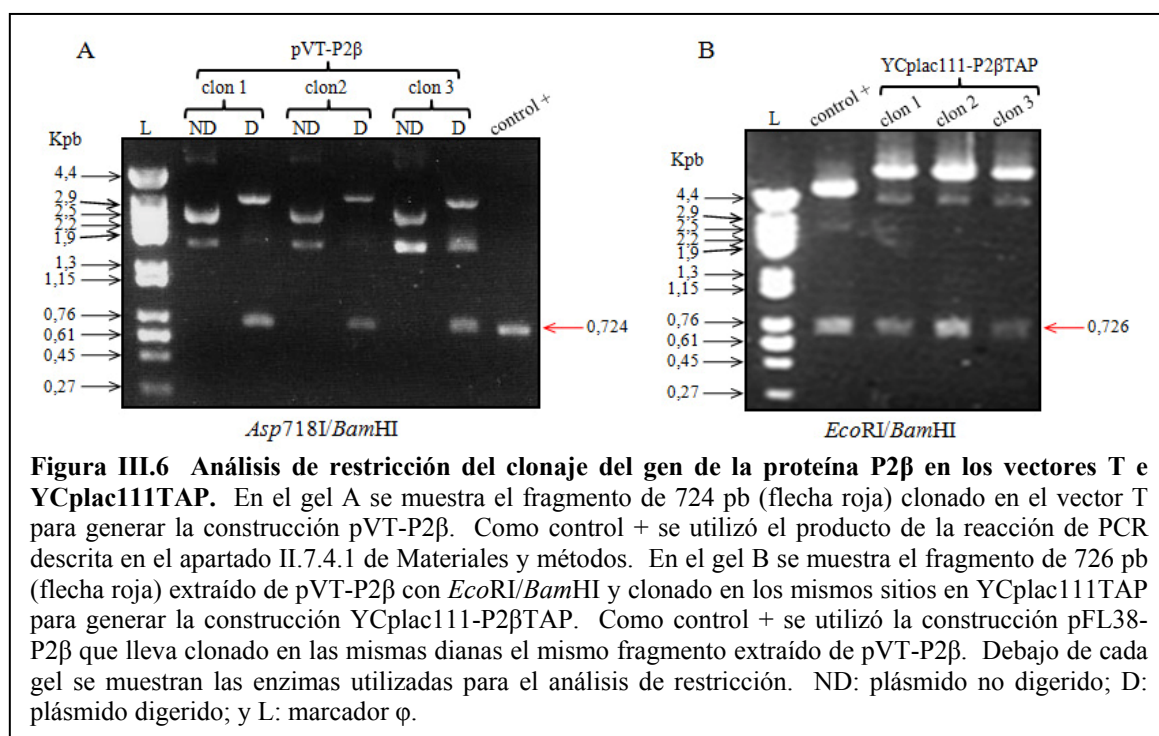
| Mancha | Proteína identificada | Puntaje | Péptidos | Masa (Da) |
|--------|--|---------|----------|-----------|
| 1* | Proteína ribosómica P2 β (Rpp2bp) | 56 | 5 | 11050 |
| 2** | Factor de elongación EF-1 α (Tef1p) | 64 | 7 | 50032 |
| 3* | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 1 (Tdh1p) | 112 | 10 | 35750 |
| 4** | Fosfoglicerato mutasa (Gpm1p) | 141 | 9 | 27608 |
| 5* | Fosfoglicerato mutasa (Gpm1p) | 92 | 8 | 27608 |
| 6** | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3 (Tdh3p) | 127 | 12 | 35746 |
| 7* | Proteína requerida para la inducción transcripcional de Ime1p (Emi2p) | 98 | 9 | 55920 |
| 8* | Proteína requerida para la inducción transcripcional de Ime1p (Emi2p) | 176 | 22 | 55920 |
| 9** | Proteína ortóloga de Rack1 (Asc1p) | 81 | 6 | 34805 |
| 10* | No identificada | -- | -- | -- |
| 11** | Actina (Act1p) | 139 | 14 | 41689 |
| 12* | Actina (Act1p) | 39 | 4 | 41689 |
| 13* | Espermidina sintasa (Spe3p) | 98 | 7 | 33324 |
| 14** | Piruvato quinasa (Pyk1p) | 103 | 17 | 54544 |
| 15* | Piruvato quinasa (Pyk1p) | 246 | 28 | 54544 |
| 16* | Subunidad B del dominio V ₁ de la ATPasa vacuolar de protones (Vma2p) | 243 | 30 | 57749 |
| 17* | No identificada | -- | -- | -- |
| 18* | S-adenosilmetionina sintetasa (Sam1p) | 103 | 16 | 41818 |
| 19** | Enolasa 2 (Eno2p) | 133 | 13 | 46914 |
| 20* | Óxido nítrico oxidoreductasa (Yhb1p) | 125 | 14 | 44646 |
| 21* | GDP-manosa pirofosforilasa (Psa1p) | 128 | 9 | 39566 |
| 22* | Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (Ura3p) | 164 | 17 | 29239 |

III.1.1.2 Purificación mediante el epítipo TAP

A causa de que se estaban detectando un número considerable de proteínas citosólicas que se unían de manera aparentemente inespecífica a la resina de Ni-NTA (gel A de la figura III.1), se decidió utilizar una aproximación diferente para intentar obtener las eluciones de la purificación más limpias y reducir notablemente las uniones inespecíficas. Para ello, se optó por la purificación a través de la etiqueta TAP, en la cual las proteínas ácidas etiquetadas en su extremo carboxilo con dicha etiqueta son purificadas en dos pasos. Primeramente son retenidas en una resina con IgG debido a la afinidad de su fracción constante Fc por la proteína A presente en el TAP para ser recuperadas, a continuación, mediante la incubación con la proteasa TEV de corte específico. Las proteínas obtenidas en el primer paso son retenidas en una segunda resina con calmodulina debido a la afinidad de esta molécula por el péptido CBP contenido en el TAP para finalmente ser recuperadas eluyendo con EGTA. Esta estrategia de purificación asegura una reducción notable de las proteínas de unidas inespecíficamente en las eluciones finales.

III.1.1.2.1 Generación de la cepa que expresa la proteína P2 β etiquetada con el TAP

El fragmento de PCR con el gen que codifica la proteína P2 β se clonó primeramente en el vector T de donde luego fue extraído con las dianas apropiadas y finalmente clonado en el plásmido centromérico YCplac111TAP para generar la construcción YCplac111-P2 β TAP (ver detalles en el apartado II.7.4.1 de Materiales y métodos). La confirmación de que ambos clonajes fueron correctos y de que en la construcción final la proteína P2 β estaba correctamente en fase

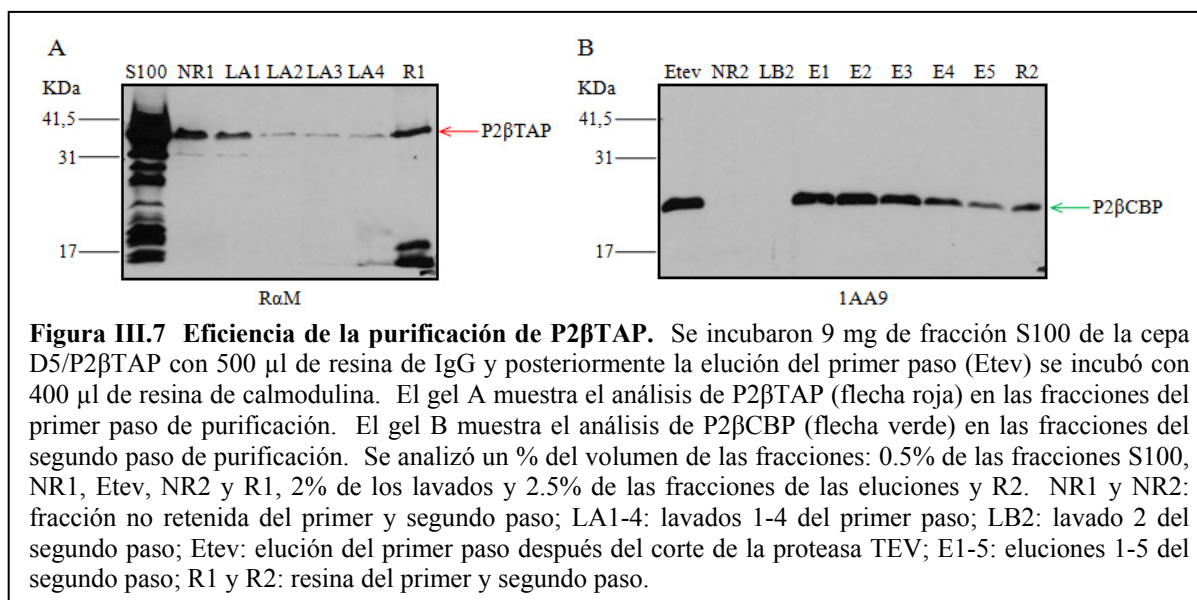


con la etiqueta TAP se llevó a cabo mediante un análisis de restricción (figura III.6) con las enzimas *Asp718I/BamHI*, en el caso del vector T, y *EcoRI/BamHI*, en el caso del vector YCplac111TAP. En ambos geles se muestran los dos fragmentos del tamaño correcto correspondientes a las regiones del gen de la proteína P2 β inicial y finalmente clonadas en los vectores T e YCplac111TAP, respectivamente.

El análisis de restricción se complementó con un análisis de secuenciación de ADN del gen de P2 β en el vector T con los oligonucleótidos M13 forward y M13 reverse y en el vector YCplac111TAP con el oligonucleótido Vb2 β 13-3' que hibrida en el gen de P2 β a partir del residuo 13 del ORF en dirección 3' (tabla II.3 de Materiales y métodos). Con la construcción YCplac111-P2 β TAP, correctamente comprobada por restricción y secuenciación, se transformó la cepa D5 generando la cepa D5/P2 β TAP.

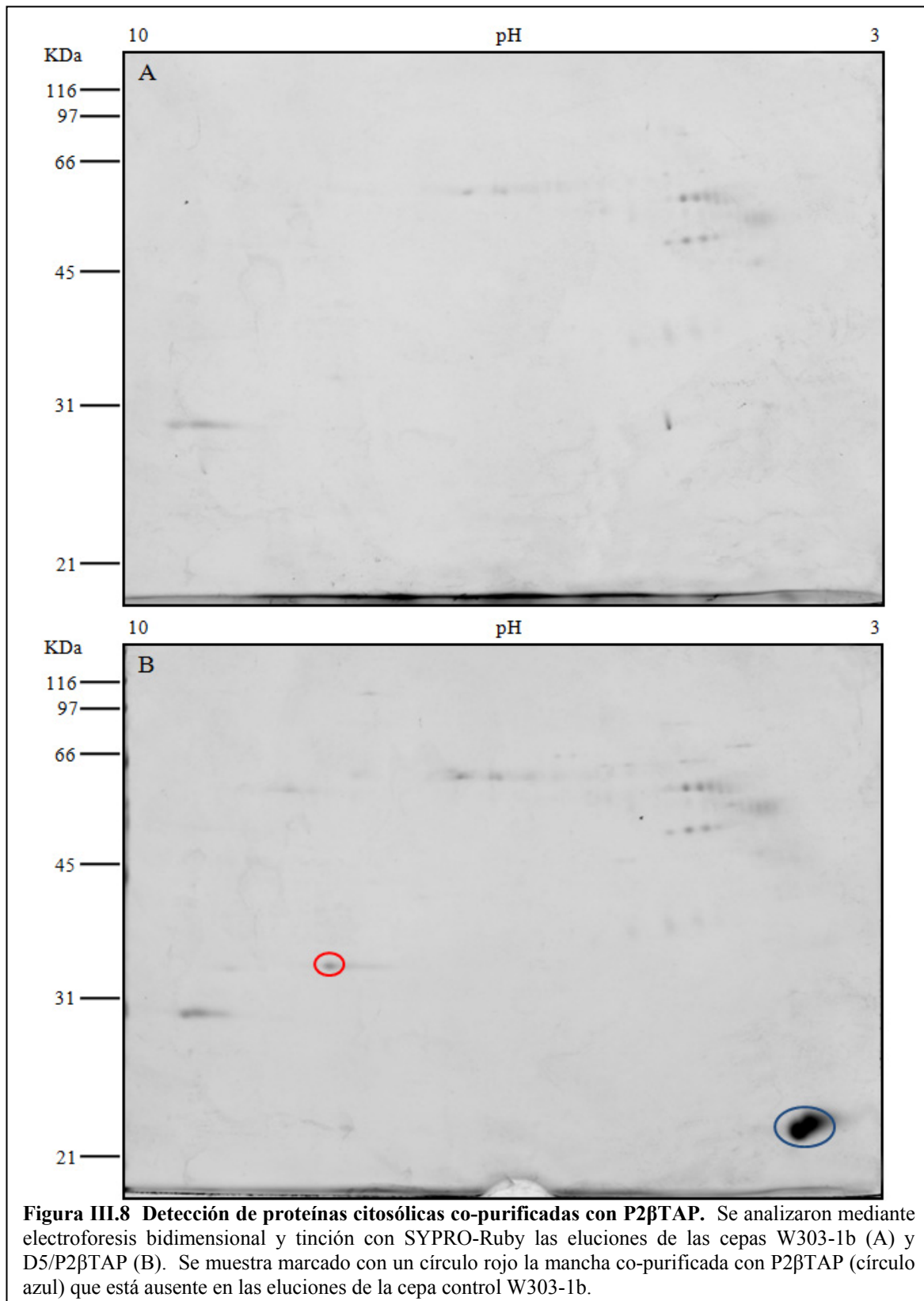
III.1.1.2.2 Purificación de los complejos de la proteína P2 β TAP

La purificación de la proteína P2 β TAP se realizó según el procedimiento descrito en el apartado II.12.2 de Materiales y métodos incubando en paralelo la fracción S100 proveniente de las cepas D5/P2 β TAP y W303-1b (control negativo de la purificación) con una resina de IgG y luego el primer eluido con una resina de calmodulina. La purificación de P2 β TAP (figura III.7) se analizó mediante inmunodetección en las fracciones del primer paso con el anticuerpo RaM,



que reconoce la proteína A dentro del TAP, y en las fracciones del segundo paso con el anticuerpo 1AA9 específico para la proteína P2 β . Los resultados muestran una purificación altamente eficiente de la proteína P2 β TAP aunque hubo una pequeña pérdida de la cantidad de proteína de

partida que fue detectada en la fracción no retenida del primer paso de purificación (fracción NR1). Asimismo la proteína que quedó retenida también se perdió en pequeñas cantidades en los lavados y en la resina del primer paso (fracciones LA1-4 y R1) al igual que en la resina del



segundo paso de purificación (fracción R2). Se puede observar que la etiqueta TAP incrementa en ≈ 20 KDa el tamaño de la proteína P2 β dando un tamaño final de la proteína etiquetada de unos 34 KDa (P2 β TAP), la cual posteriormente es reducida a ≈ 24 KDa (P2 β CBP) después de ser cortada por la proteasa TEV. Cabe mencionar que también se pueden observar una serie de bandas de menor peso molecular a lo largo de casi todo el carril correspondiente a la fracción S100. Lo más probable es que estas bandas correspondan a productos de degradación de la proteína etiquetada puesto que la intensidad de dichas bandas es significativa y comparable a la de las bandas de la proteína etiquetada completa y además porque dichas bandas no son reconocidas por el anticuerpo RaM en la fracción S100 de la cepa control W303-1b (datos no mostrados). En adición, la banda inferior presente en el carril correspondiente a la primera resina (carril R1 de la figura III.7) pertenece a la proteína A del TAP, de ≈ 12 KDa, que queda retenida en la resina después de la digestión por la proteasa TEV.

La detección de las proteínas co-purificadas con la proteína P2 β TAP, al igual que en la purificación a través de la cola de histidinas, se realizó mediante una electroforesis bidimensional de las eluciones y una tinción de los geles con SYPRO Ruby (figura III.8). Los resultados indican que el fondo de proteínas unidas inespecíficamente a las resinas de IgG y calmodulina es notablemente inferior que con la resina de Ni-NTA, pero también lo es el número de proteínas unidas específicamente. Así, a diferencia de la purificación de la proteína P2 β his6 (figura III.5), sólo se detectó una única proteína diferencial co-purificada con la proteína P2 β TAP que está ausente en las eluciones del control negativo. La identificación de dicha proteína diferencial se realizó, al igual que en el caso anterior (apartado III.1.1.3), mediante espectrometría de masas como se resume en la tabla III.2.

Tabla III.2 Proteína diferencial identificada por espectrometría de masas MALDI-TOF.

| Proteína identificada | Puntaje | Péptidos | Masa (Da) |
|---|---------|----------|-----------|
| Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3 (Tdh3p) | 86 | 6 | 35746 |

A pesar de que se detectaron e identificaron un número considerable de proteínas que posiblemente estén interaccionando con la proteína P2 β , especialmente la proteína Tdh3p que fue co-purificada con las dos aproximaciones utilizadas, ninguna de ellas, exceptuando las proteínas Asc1p y Tef1p, está descrita en la literatura con una función directa en el proceso de traducción y particularmente en el ensamblaje del tallo ribosómico. Aunque Asc1p y Tef1p están implicadas con el proceso de traducción, no las consideramos como nuevas interacciones de la proteína P2 β ya que estaba previamente reportada la asociación de ambas proteínas con las proteínas ácidas. Así, en nuestro laboratorio se demostró mediante entrecruzamiento químico la interacción de

Asc1p con las cuatro proteínas ácidas unidas al ribosoma (128). Con respecto a Tef1p, se ha descrito en varios reportes la interacción de su homólogo en *E. coli*, EF-Tu, con la proteína L7/L12 del tallo mediante ensayos de cinética de unión del complejo ternario al sitio A del ribosoma (75), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (63) y crio-microscopia electrónica (167). Por otra parte, no se puede descartar que las interacciones detectadas con las otras proteínas no relacionadas con el proceso de traducción tengan un significado metabólico real pero su investigación en detalle se apartaba excesivamente de los objetivos de nuestro proyecto y del laboratorio. Por estas razones se decidió detener nuestros esfuerzos en el primer objetivo de este trabajo de tesis en este punto de la investigación y enfocarlos hacia los otros objetivos programados.

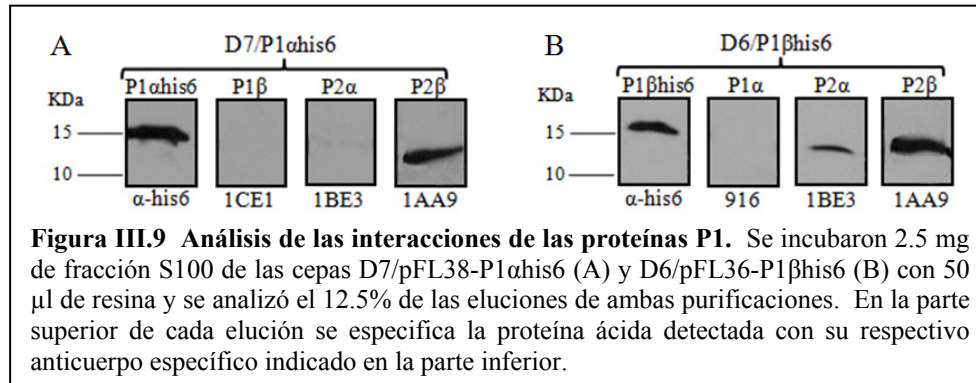
III.1.2 INTERACCIONES ENTRE LAS CUATRO PROTEÍNAS ÁCIDAS

Como se ha comentado previamente en la introducción, se ha detectado la presencia de los heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α , no sólo cuando ya están ensamblados en el ribosoma, sino también en solución tanto *in vitro*, mediante ensayos de asociaciones, como *in vivo* mediante ensayos de doble-híbrido. A pesar de ello, ninguna de estas aproximaciones nos revela realmente si estos heterodímeros preferentes y otros no preferentes se están formando en el citoplasma antes de incorporarse en el ribosoma, es decir, si es necesaria la formación previa de heterodímeros para el ensamblaje de las proteínas ácidas en el ribosoma. Por ello, es de nuestro interés realizar un análisis directo de las interacciones entre las cuatro proteínas ácidas en el citosol para desvelar si éstas se ensamblan al ribosoma independientemente o formando parte de un complejo con otra u otras de ellas. Para realizar este estudio, también se utilizaron las dos aproximaciones de cromatografía de afinidad utilizadas previamente en el apartado III.1.1.

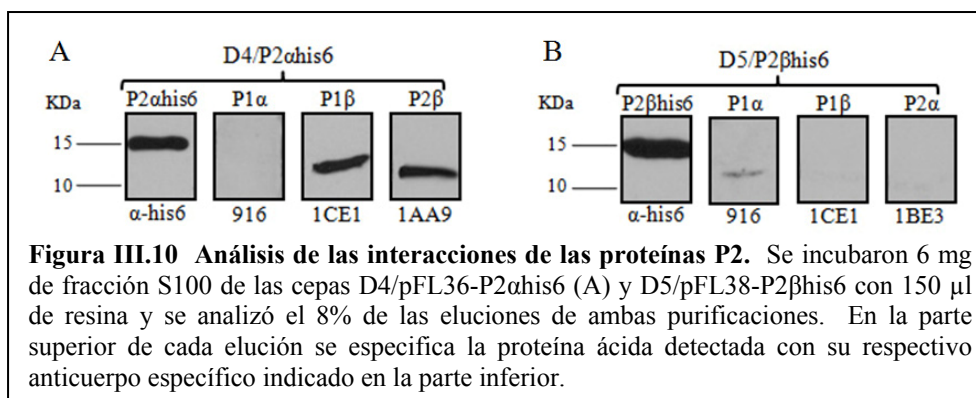
III.1.2.1 Purificación mediante la cola de histidinas

Al igual que en el apartado III.1.1.1.1, también se utilizaron las cuatro cepas D4/pFL36-P2 α his6, D5/pFL38-P2 β his6, D6/pFL36-P1 β his6 y D7/pFL38-P1 α his6, las cuales expresan las formas etiquetadas en lugar de las proteínas ácidas endógenas. La purificación de cada proteína ácida etiquetada se realizó mediante el mismo procedimiento utilizado en el apartado III.1.1.1.1 incubando la fracción S100 de las cuatro cepas con la resina de Ni-NTA. Primero se realizó la purificación de las dos proteínas P1 y la co-purificación de las demás proteínas ácidas se analizó mediante inmunodetección con el anticuerpo específico para cada proteína ácida en eluciones de cada purificación, como se muestra en la figura III.9. Los resultados del análisis de las eluciones

de P1 α his6 muestran una interacción específica solamente con la proteína P2 β , puesto que es la única presente en dichas fracciones. Sin embargo, en el caso de las eluciones de P1 β his6, existe una interacción no sólo con la proteína P2 α sino también con la proteína P2 β .

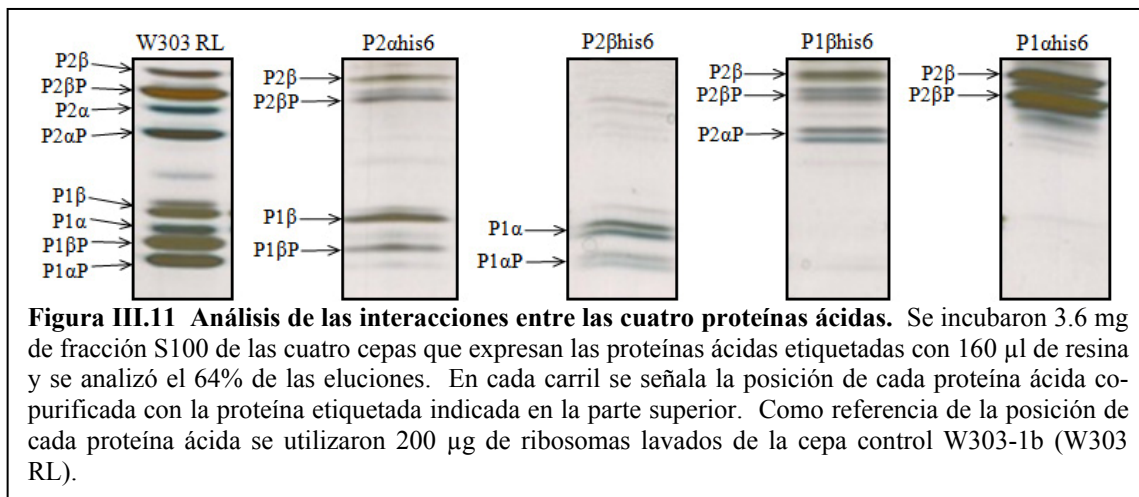


En ensayos preliminares de purificación de las proteínas P2 etiquetadas, al partir de una cantidad similar de fracción S100 como en el caso de las proteínas P1 etiquetadas, no se logró detectar las proteínas P1 en las eluciones. Por ello, para la purificación de ambas proteínas P2 se utilizó una mayor cantidad de fracción S100 y resina de Ni-NTA, como se muestra en la figura III.10. En las eluciones de P2 α his6, además de detectar la presencia de la proteína P1 β , también se detecta la proteína P2 β al igual que en el caso de la proteína P1 β his6. Por el contrario, en las eluciones de la proteína P2 β his6 sólo se detecta la proteína P1 α . Cabe mencionar que la pequeña cantidad de las proteínas P1 α y P2 α en las eluciones de las purificaciones de P2 β his6 (figura III.10) y P1 β his6 (figura III.9), respectivamente, se puede deber a que una cantidad considerable de ambas proteínas co-purificadas se perdió en la fracción no retenida (datos no mostrados).



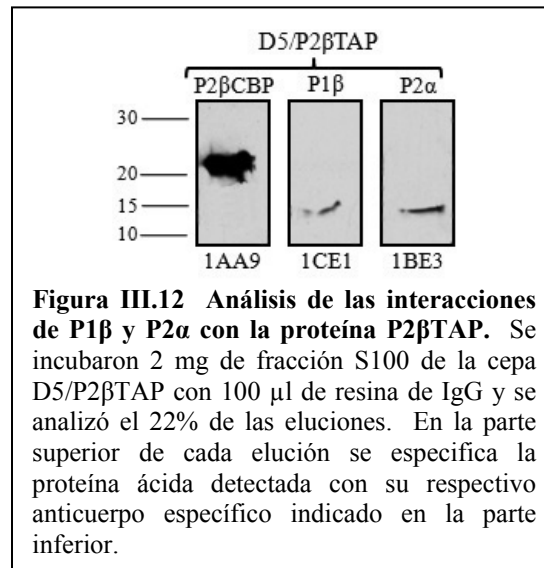
Además de la inmunodetección con los anticuerpos específicos, también se realizó la detección de las proteínas ácidas mediante una tinción de plata de un gel de isoelectroenfoque de las eluciones de las purificaciones de cada una de las cuatro proteínas ácidas etiquetadas (figura

III.11). La tinción con plata corrobora las interacciones previamente detectadas mediante la inmunodetección: las proteínas P1 α y P2 β co-interaccionan específicamente mientras que las proteínas P1 β y P2 α co-interaccionan específicamente pero además ambas co-interaccionan con la proteína P2 β . Cabe destacar que la cantidad de proteína P2 β co-purificada con P1 β his6 es mayor que la cantidad co-purificada con P2 α his6. A pesar de que en las eluciones de las cuatro purificaciones también se pueden observar bandas extremadamente tenues correspondientes a trazas de otras proteínas ácidas, éstas no se consideraron interacciones con las proteínas ácidas etiquetadas. En adición, es posible que la causa de la aparición de dobletes en varias de las bandas de las proteínas ácidas co-purificadas sea debido a un artefacto introducido en la preparación de las muestras.



III.1.2.2 Purificación mediante el TAP

Debido a que las interacción de la proteína P2 β con P1 β y P2 α no han sido descritas previamente en la literatura y como ya disponíamos de la cepa D5/P2 β TAP (apartado III.1.1.2.1), también nos interesó utilizar la cromatografía de afinidad a través del TAP para estudiar y confirmar si las proteínas P1 β y P2 α co-purifican con la proteína P2 β TAP en el sentido inverso al que se mostró en las eluciones de las purificaciones de P1 β his6 y P2 α his6 (figura III.10). Para este análisis, se realizó el mismo procedimiento que en el apartado III.1.1.2.2 con la excepción de que esta vez sólo se realizó el primer paso de purificación después de incubar la fracción S100 de la cepa D5/P2 β TAP con la resina de IgG. La co-purificación de las proteínas P1 β y P2 α (figura III.12) se analizó mediante inmunodetección con el anticuerpo específico para cada una de ellas en las eluciones. Los resultados confirman la co-purificación de ambas proteínas ácidas obtenida previamente con los ensayos de purificación a través de la cola de histidinas puesto que ambas proteínas se detectaron en las eluciones.



III.2 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS A LOS SITIOS DE INTERACCIÓN DE LOS HETERODÍMEROS P1 α -P2 β Y P1 β -P2 α EN LA PROTEÍNA P0

Datos de nuestro laboratorio indicaban que la interacción de las proteínas P1 y P2 con la proteína P0 tenía lugar en una región de ésta comprendida por los residuos 212-262 (89) y 213-250 (119). Posteriormente, se publicó la existencia de dos sitios, adyacentes pero separados, específicos para la unión de cada uno de los heterodímeros P1 α -P2 β y P1 β -P2 α en la proteína P0 (78). Sin embargo, la existencia de sitios específicos para estos dos heterodímeros plantea dificultades para entender la existencia de ribosomas en los que están unidos heterodímeros del tipo P1 α -P2 α o P1 β -P2 β como se ha demostrado en mutantes defectuosos en una de las dos proteínas P1 y P2 (138). ¿A cuál de los dos sitios se unirían estos heterodímeros? ¿Se unen realmente como heterodímeros o como proteínas independientes? Nos propusimos a dar respuesta a este tipo de preguntas y analizar con más profundidad la especificidad de unión de las proteínas ácidas en cada sitio, no sólo cuando se expresan las cuatro proteínas, sino también cuando se expresa en la célula solamente una de las cuatro parejas posibles de proteínas ácidas.

III.2.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS FORMAS TRUNCADAS DE LA PROTEÍNA P0 CARENTES DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS

Para realizar este estudio se generaron formas truncadas de la proteína P0 en las que se eliminaron el sitio de unión del heterodímero P1 α -P2 β (sitio A), el sitio de unión del heterodímero

P1 β -P2 α (sitio B) o ambos sitios a la vez, de modo que se obtuvieron tres formas mutantes de P0: una forma sin el sitio A (P0 Δ A) en la cual se eliminaron los residuos 198-230; una forma sin el sitio B (P0 Δ B) en la cual se eliminaron los residuos 230-258; y una forma sin los dos sitios de unión (P0 Δ AB) en la cual se eliminaron los residuos 198-258.

III.2.1.1 Obtención de las formas truncadas mediante PCR

Para generar las formas truncadas de la proteína P0 se realizó el procedimiento detallado en el apartado II.7.4.2 de Materiales y métodos. Como plásmido de partida se utilizó pBS-P0 (153), el cual contiene el gen completo de la proteína P0 y a partir del cual se generaron los tres plásmidos mutados pBS-P0 Δ A, pBS-P0 Δ B y pBS-P0 Δ AB que contienen las tres formas truncadas P0 Δ A, P0 Δ B y P0 Δ AB, respectivamente. La comprobación de la correcta eliminación de los sitios de interacción en los tres plásmidos mutados se llevó a cabo mediante secuenciación de ADN utilizando los oligonucleótidos P0N4 y P0taaXho, los cuales hibridan en el gen de P0 a partir del residuo 150 en dirección 5' y a partir del codón de terminación en dirección 3' del ORF (tabla II.4 de Materiales y métodos), respectivamente.

III.2.1.2 Clonaje de las formas truncadas en los vectores de expresión

Después de la obtención de las formas truncadas en los plásmidos pBS, se procedió al clonaje de éstas en los plásmidos centroméricos pFL36, pFL37, pFL38 y pFL39 como se describe en el apartado II.7.4.2 de Materiales y métodos. En paralelo a las tres formas truncadas también se realizó el clonaje de la forma completa (silvestre) de la proteína en los mismos plásmidos centroméricos para ser utilizada como control.

La presencia de las cuatro formas de la proteína P0 en los plásmidos centroméricos se analizó mediante una doble digestión, en el caso de pFL36, con las enzimas *Bam*HI/*Nco*I y, en el caso de los otros tres plásmidos, con *Eco*RI/*Nco*I, como se muestra en la figura III.13. El análisis confirmó el correcto clonaje del gen de las cuatro formas de P0 en los cuatro plásmidos centroméricos puesto que cada banda correspondiente a cada forma de la proteína tiene el tamaño apropiado: P0wt tiene \approx 1,6 Kpb; P0 Δ A y P0 Δ B tienen \approx 1,5 Kpb; y P0 Δ AB tiene \approx 1,4 Kpb.

El análisis por restricción se complementó con un análisis de secuenciación de ADN con los mismos oligonucleótidos utilizados previamente en el apartado III.2.1.1 confirmando nuevamente la correcta eliminación de los sitios de interacción en todas las construcciones.

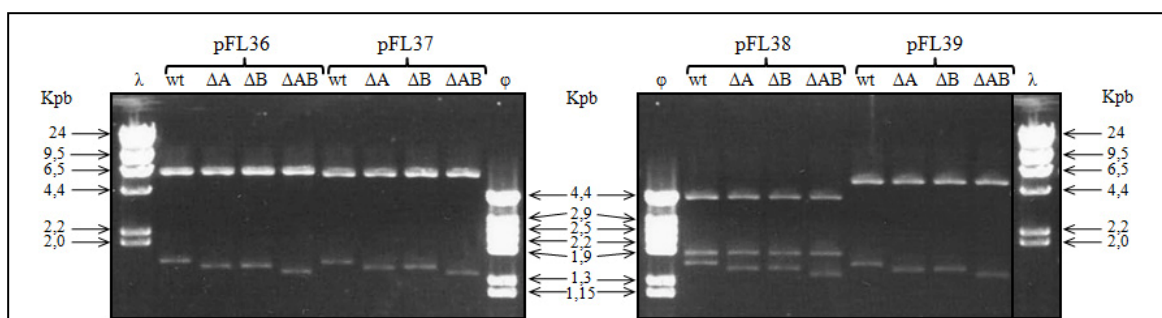


Figura III.13 Análisis por restricción del clonaje de las cuatro formas de P0 en los plásmidos centroméricos. Se analizó la presencia de las cuatro formas en cada construcción mediante una doble digestión con *Bam*HI/*Nco*I, en el caso de pFL36, y con *Eco*RI/*Nco*I, en el caso de los otros tres plásmidos. En ambos geles se muestran las cuatro bandas correspondientes a las cuatro formas de P0 (bandas inferiores de cada carril) clonadas en cada uno de los cuatro plásmidos centroméricos indicados en la parte superior. Las bandas superiores de cada carril corresponden al esqueleto del vector de cada construcción después de la doble digestión: ≈ 7 Kpb para pFL36; $\approx 6,4$ Kpb para pFL37; ≈ 2 y $3,7$ Kpb para pFL38; y $\approx 5,5$ Kpb para pFL39.

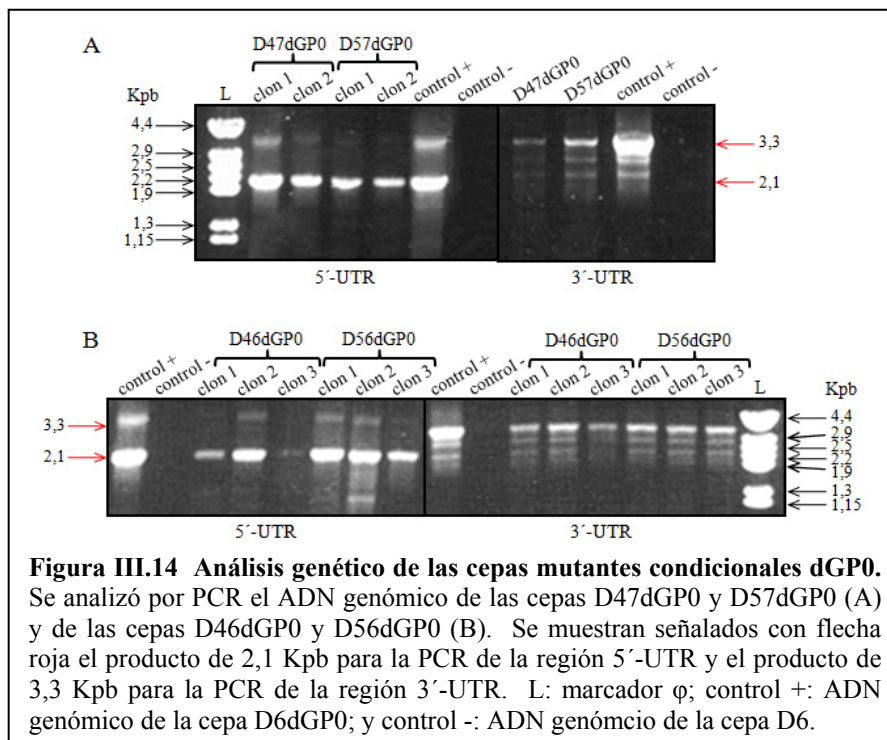
III.2.2 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES NULAS CONDICIONALES

Por otra parte, además de la obtención de las formas truncadas de la proteína P0, es necesario la generación de las cepas en las cuales la expresión de la proteína P0 silvestre endógena esté interrumpida. Como se ha comentado previamente en la introducción, el gen de la proteína P0 es esencial para la célula; por ello, se ha recurrido a la generación de cepas mutantes nulas condicionales en las cuales la expresión de la copia genómica del gen de la proteína está bajo el promotor GAL1, de tal manera que la proteína P0 endógena sólo se expresa en presencia de galactosa en el medio de cultivo (152). La expresión de las formas truncadas de la proteína P0 se lleva a cabo mediante la transformación de estas cepas mutantes condicionales con las construcciones centroméricas (obtenidas en el apartado III.2.1.2) y creciendo los transformantes obtenidos en presencia de glucosa como fuente de carbono que reprime la expresión de la copia genómica del gen de P0.

III.2.2.1 Generación de las cepas condicionales dGP0 confirmación mediante PCR y fenotipo de crecimiento

Para la generación de las cepas mutantes condicionales se utilizaron las cepas mutantes D46, D47, D56 y D57, en las cuales se expresan las parejas P1 α -P2 β , P1 β -P2 β , P1 α -P2 α , y P1 β -P2 α , respectivamente (138). Las cuatro cepas mutantes condicionales nulas D46dGP0, D47dGP0, D56dGP0 y D57dGP0 se generaron según lo descrito en el apartado II.6.2 de Materiales y

métodos. La comprobación de que las células recombinantes fueron correctamente seleccionadas se realizó mediante un análisis genético y un análisis fenotípico funcional. El análisis genético nos indica si la sustitución génica se llevó a cabo en el locus del gen de la proteína P0 y se realizó mediante una reacción de PCR (figura III.14) bajo las condiciones de reacción detalladas en el apartado II.6.2 de Materiales y métodos utilizando como molde el ADN genómico extraído de los transformantes según el procedimiento descrito en el apartado II.7.2 de Materiales y métodos. A pesar de que se detectan varias bandas de hibridación inespecífica para las reacciones de PCR de ambas regiones, claramente se visualizan los productos de amplificación específica de 2,1 Kpb para la región 5'-UTR y de 3,3 Kpb para la región 3'-UTR, tanto en los mutantes dGP0 como en el control positivo.



Por otro lado, el análisis fenotípico funcional nos indica si se llevó a cabo la sustitución génica y si la expresión del gen de la proteína P0 en las cepas es dependiente de la presencia de galactosa en el medio de cultivo. Este análisis se realizó creciendo las cepas dGP0 en paralelo en placas de medios YEPG+G418 e YEPD+G418. Además de las cuatro cepas dGP0 obtenidas en el apartado anterior, también se incluyó en el análisis la cepa W303dGP0 para estudiar la especificidad de unión de las proteínas ácidas a las distintas formas de la proteína P0 cuando las cuatro proteínas ácidas se están expresando en la célula. Esta cepa fue generada previamente (152) utilizando un fragmento *Sall-BamHI*, proveniente del plásmido pBS-UraGP0, que contiene una construcción similar a la del plásmido pBS5KGP0 pero con el gen URA3 en lugar del módulo

de resistencia a genenticina KanMX4 como marcador de selección. Por esta razón, a diferencia de las demás cepas condicionales dGP0, el análisis fenotípico de la cepa W303dGP0 se realizó en placas de medios en ausencia de uracilo (SCG-U y SCD-U). En las figuras III.15 y III.16 se muestra el resultado del análisis fenotípico de las cepas parentales y de los mutantes condicionales dGP0, respectivamente. Las cinco cepas parentales, de las cuales se generaron los mutantes condicionales dGP0, crecen en presencia de glucosa o galactosa como fuente de carbono pero son

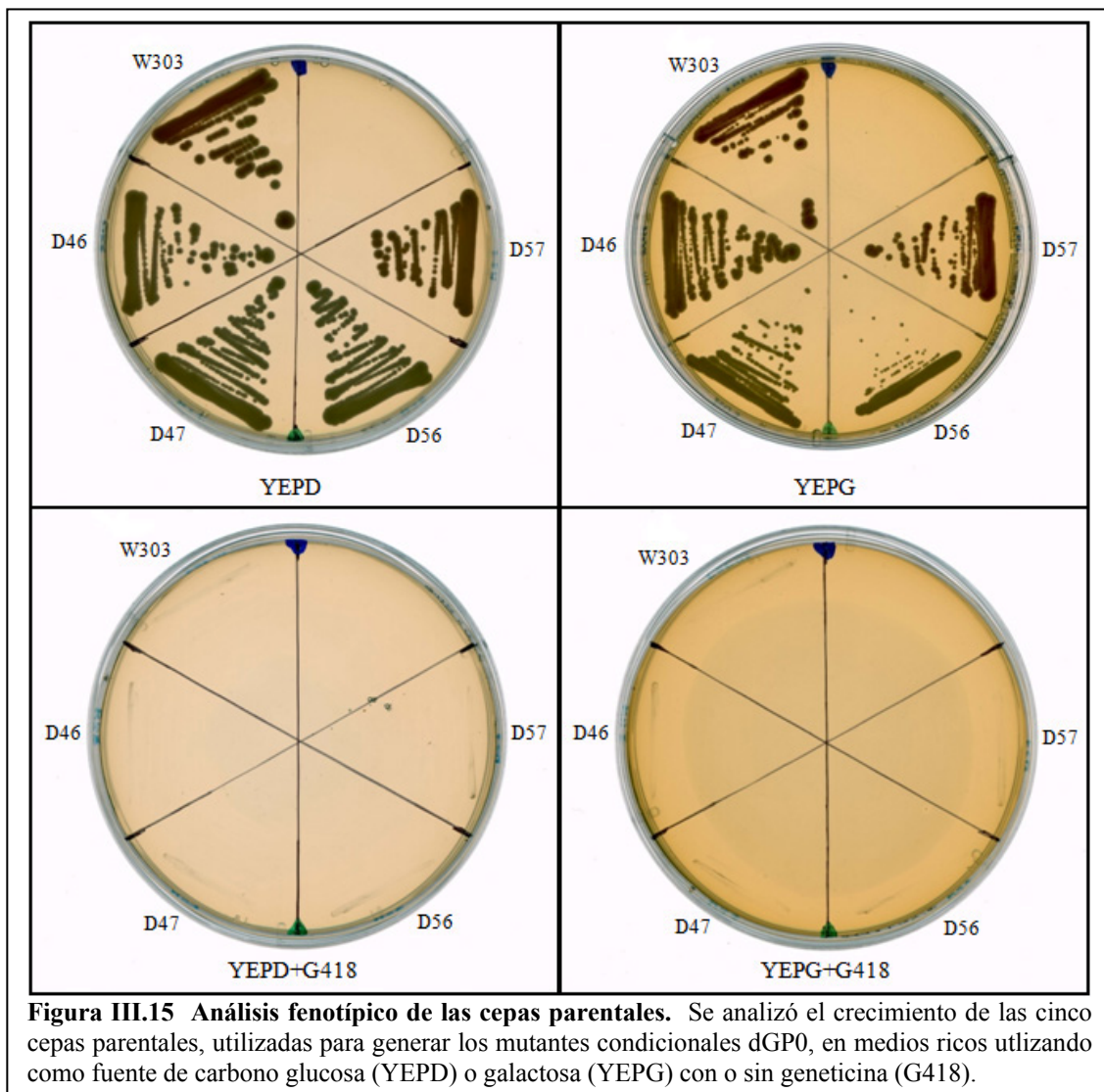


Figura III.15 Análisis fenotípico de las cepas parentales. Se analizó el crecimiento de las cinco cepas parentales, utilizadas para generar los mutantes condicionales dGP0, en medios ricos utilizando como fuente de carbono glucosa (YEPD) o galactosa (YEPG) con o sin genenticina (G418).

incapaces de crecer en presencia de genenticina en el medio independientemente de la fuente de carbono que se utilice. Con respecto a las cepas condicionales dGP0, las células recombinantes fueron seleccionadas correctamente puesto que todos los mutantes dGP0 crecieron en el medio de selección con galactosa pero ninguno creció en el medio restrictivo con glucosa debido a que en estas condiciones la expresión de la proteína P0 está bloqueada a causa de su dependencia, exclusivamente, de galactosa como fuente de carbono.

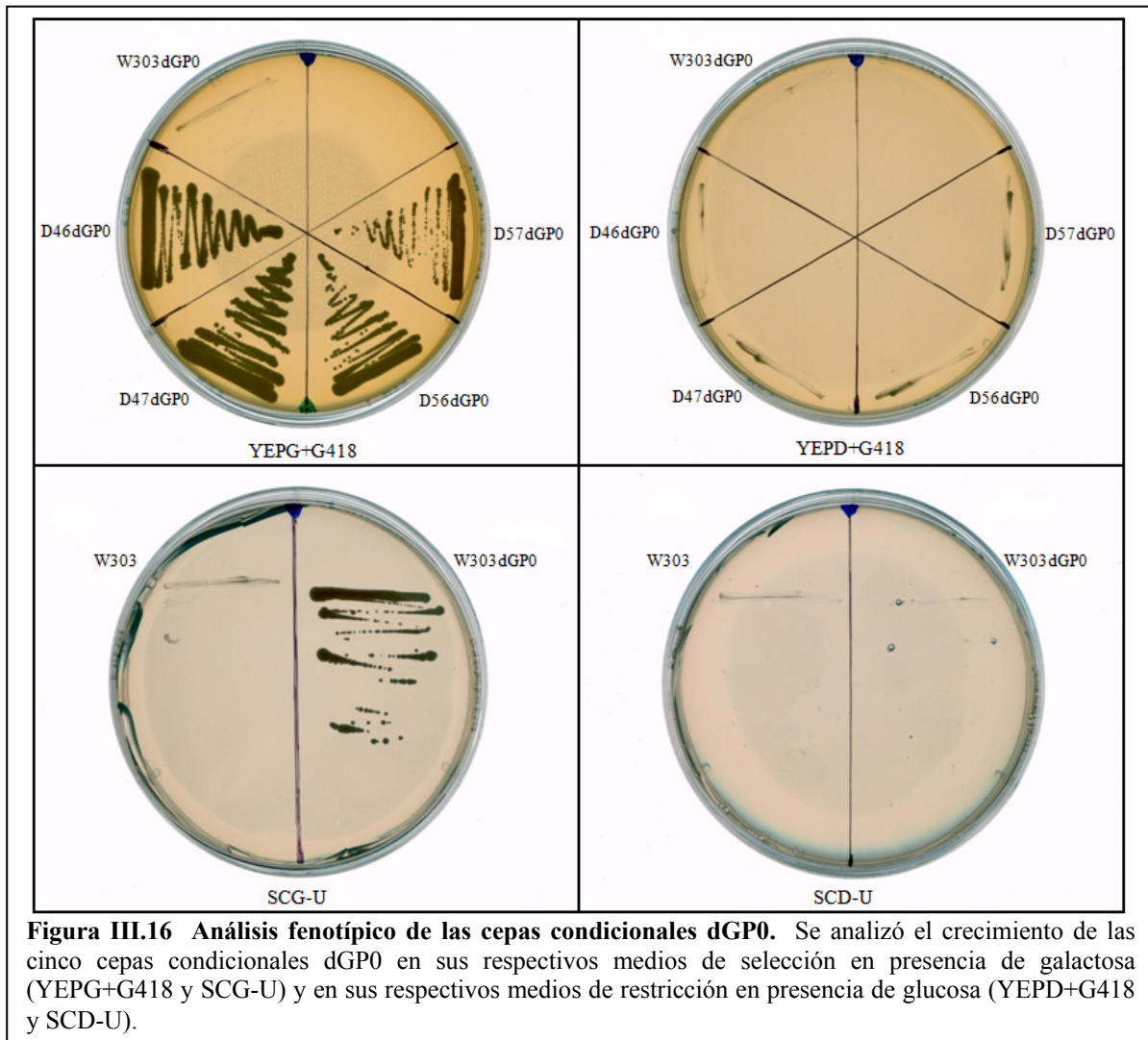


Figura III.16 Análisis fenotípico de las cepas condicionales dGP0. Se analizó el crecimiento de las cinco cepas condicionales dGP0 en sus respectivos medios de selección en presencia de galactosa (YEPG+G418 y SCG-U) y en sus respectivos medios de restricción en presencia de glucosa (YEPD+G418 y SCD-U).

III.2.2.2 Caracterización de las cepas mutantes condicionales expresando las diferentes formas de la proteína P0

Las cinco cepas mutantes condicionales dGP0 se transformaron con las construcciones centroméricas que contienen las cuatro formas de la proteína P0 (construcciones obtenidas en el apartado III.2.1.2). En el caso de las cuatro cepas condicionales dGP0 generadas en el apartado III.2.2.1, los transformantes se seleccionaron en un medio sintético completo en presencia de galactosa y geneticina y ausencia del correspondiente requerimiento presente en la construcción centromérica. En el caso de los transformantes de la cepa W303dGP0, la selección se realizó en un medio sintético completo en presencia de galactosa y ausencia de uridina y del correspondiente requerimiento presente en la construcción centromérica. De esta manera se generaron cinco series de mutantes condicionales dGP0 cada una expresando cada una de las cuatro formas de la proteína P0.

Los transformantes obtenidos para cada una de las series de cepas dGP0 se comprobaron mediante un análisis fenotípico funcional que nos indica si hay o no complementación de la proteína P0 del plásmido. Para ello, los transformantes de cada serie dGP0 se crecieron en placas de medio YEPD+G418, en el caso de las cepas mutantes dobles, y SCD-U, en el caso de la cepa W303dGP0 (figura III.17). Todas las formas de la proteína P0 expresadas a partir de los plásmidos centroméricos complementan la ausencia de expresión de la copia genómica de P0 en las cinco series de cepas condicionales dGP0 puesto que todos los transformantes crecieron en los medios en presencia de glucosa, en donde fueron incapaces de crecer las cinco cepas condicionales dGP0 sin transformar.

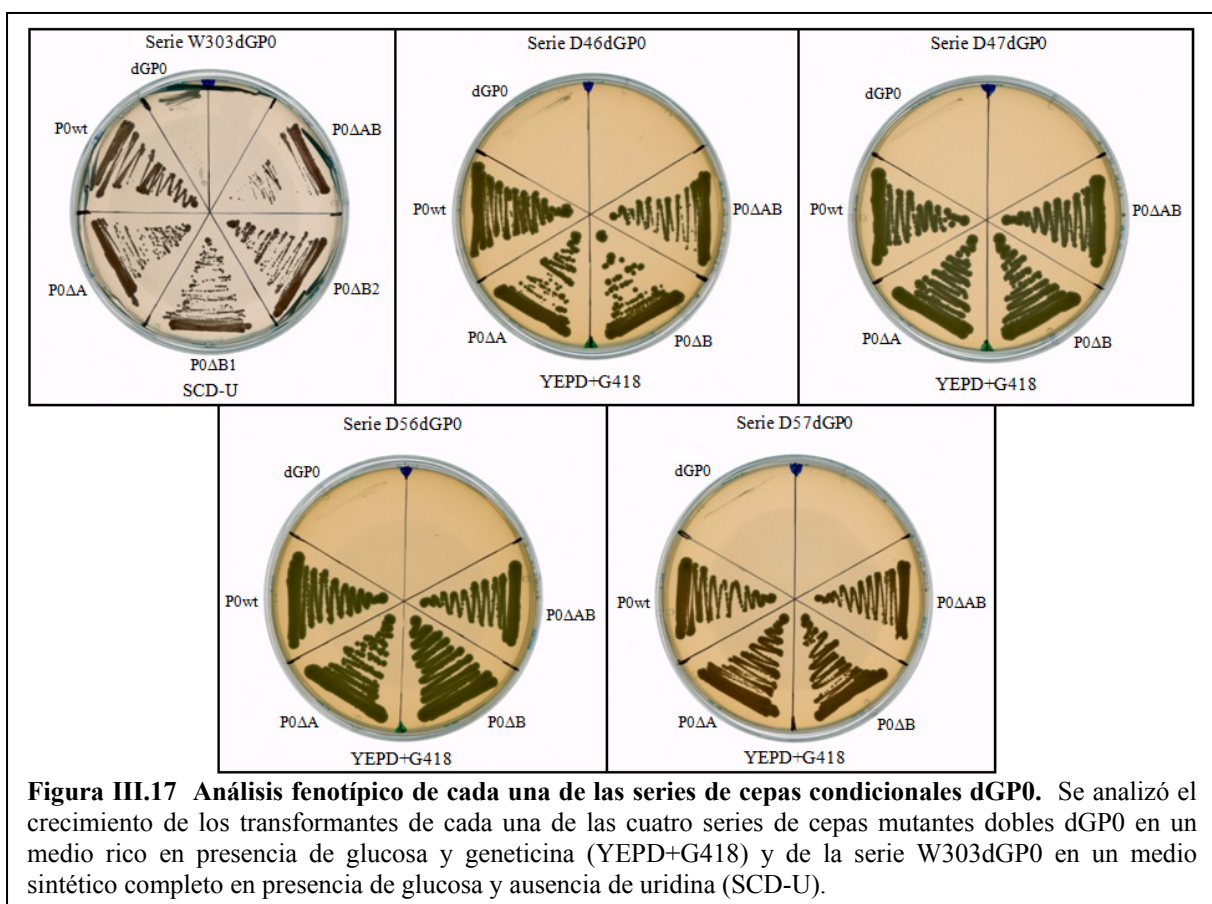


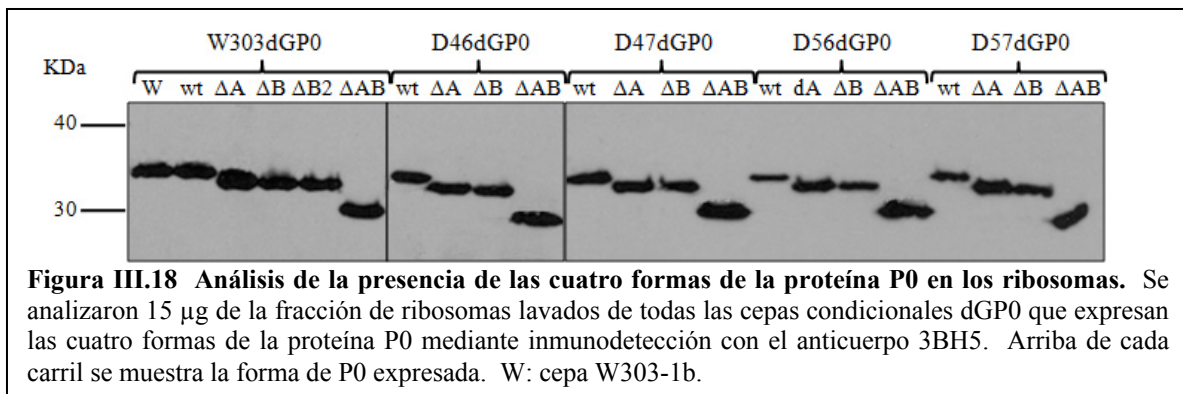
Figura III.17 Análisis fenotípico de cada una de las series de cepas condicionales dGP0. Se analizó el crecimiento de los transformantes de cada una de las cuatro series de cepas mutantes dobles dGP0 en un medio rico en presencia de glucosa y geneticina (YEPE+G418) y de la serie W303dGP0 en un medio sintético completo en presencia de glucosa y ausencia de uridina (SCD-U).

III.2.3 ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS A LA PROTEÍNA P0

Finalmente, después de comprobar, tanto genética como funcionalmente, la generación de las cepas condicionales dGP0 que expresan las cuatro formas de la proteína P0, se procedió al estudio de la especificidad de unión de las proteínas ácidas a los dos sitios de interacción en la proteína P0 en las cinco condiciones de expresión de las proteínas ácidas representadas por las cinco series de cepas condicionales nulas dGP0.

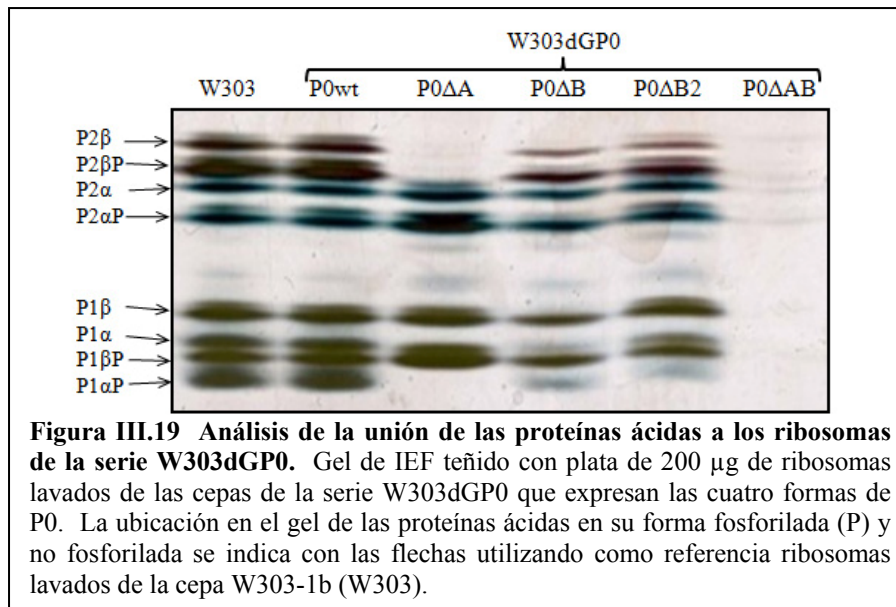
III.2.3.1 Análisis de unión de las proteínas ácidas en los mutantes nulos condicionales

Previo al análisis de la unión de las proteínas ácidas a las diferentes formas de la proteína P0, se comprobó que éstas se expresaran en los ribosomas de todas las cepas condicionales dGP0 previamente generadas. Para ello, se aisló la fracción de ribosomas lavados de todas las cepas según el procedimiento descrito en el apartado II.10.3 de Materiales y métodos y se analizó la presencia de todas las formas de P0 mediante inmunodetección con el anticuerpo 3BH5 (figura III.18). Todas las formas de la proteína P0 están presentes en la fracción de los ribosomas de todas las series de cepas dGP0 concordando cada forma con su peso molecular apropiado según el siguiente orden descendiente: la forma silvestre (P0wt); las formas truncadas P0 Δ A y P0 Δ B que tienen un tamaño muy similar; y la forma truncada P0 Δ AB.

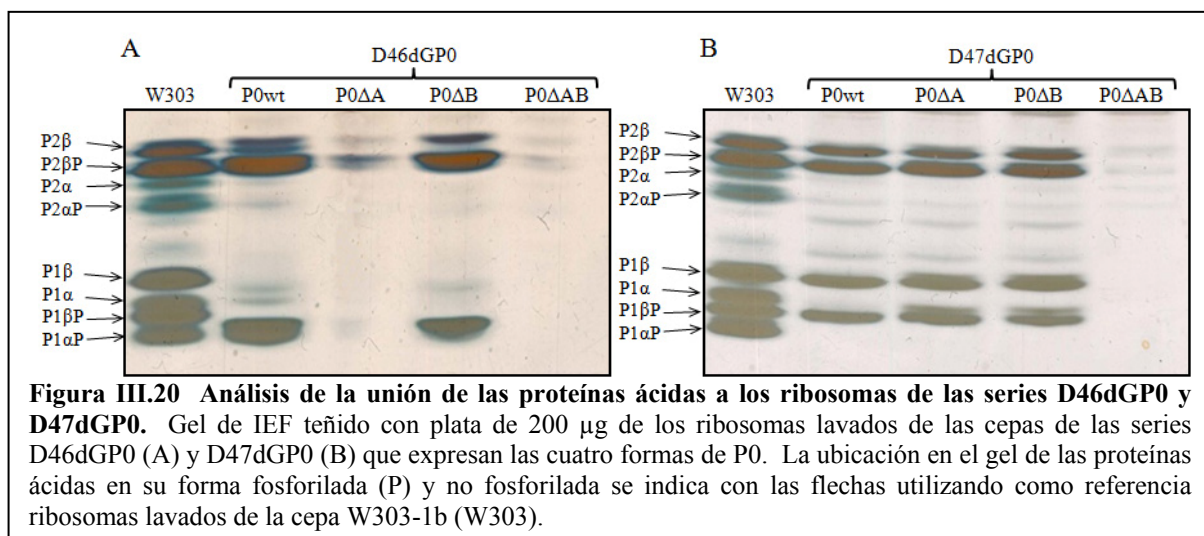


Una vez demostrada la presencia de todas las formas de la proteína P0 en los ribosomas, se procedió a analizar la presencia de las proteínas ácidas que estuvieran expresándose en cada serie de cepas dGP0 mediante una tinción con plata de un gel de isoelectroenfoque de la fracción de ribosomas lavados (figuras III.19, III.20 y III.21) siguiendo el procedimiento descrito en los apartados II.8.2.3 y II.9.1 de Materiales y métodos. En la cepa W303dGP0/P0wt la proteína P0wt une las cuatro proteínas ácidas al ribosoma en la misma proporción que la proteína P0 endógena en la cepa W303-1b. Por otro lado, en la cepa W303dGP0/P0 Δ A sólo se unen al ribosoma las proteínas P1 β y P2 α ya que la proteína P0 Δ A carece del sitio de unión específico del heterodímero P1 α -P2 β (78). Sin embargo, la cepa W303dGP0/P0 Δ B, que carece del sitio de unión del heterodímero P1 β -P2 α (78), une al ribosoma las cuatro proteínas ácidas, siendo P1 α la que está presente en menor cantidad. Este resultado nos llevó a pensar de que esta cepa hubiese sido transformada erróneamente o de que estuviese contaminada con una levadura silvestre, por lo que se realizó una segunda transformación de la cepa W303dGP0 con el plásmido pFL37-P0 Δ B

generando la cepa W303dGP0/P0ΔB2 cuyos ribosomas también se analizaron (P0ΔB2 en la figura III.19) dando el mismo resultado que en el primer caso. En la cepa W303dGP0/P0ΔAB, la proteína P0 carece de los dos sitios unión para ambos heterodímeros haciéndola incapaz de unir proteínas ácidas al ribosoma.

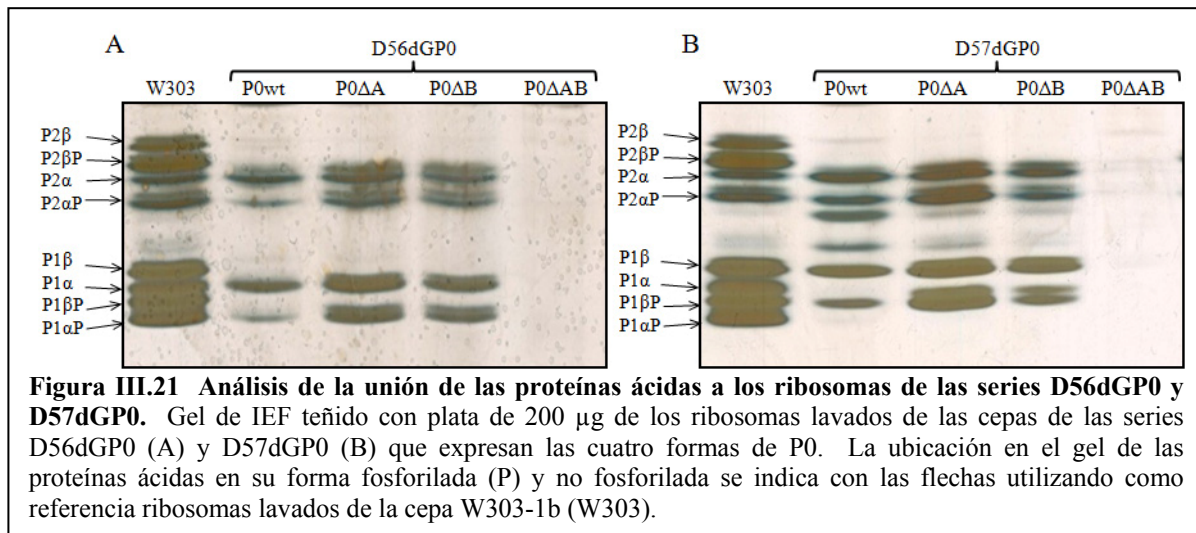


Con respecto a las cepas de la serie D46dGP0, tanto la proteína P0wt como P0ΔB se comportan de la misma manera uniendo al ribosoma las dos proteínas ácidas que se expresan en estas células: P1α y P2β. Cabe mencionar que, a diferencia de lo que pasa en la serie W303dGP0, las proteínas P0wt y P0ΔB unen las dos proteínas ácidas similarmente. Por el contrario, las proteínas P0ΔA y P0ΔAB se comportan de manera similar sin unir ninguna de las dos proteínas ácidas expresadas. Por otro lado, en las cepas de la serie D47dGP0 las tres formas P0wt, P0ΔA y



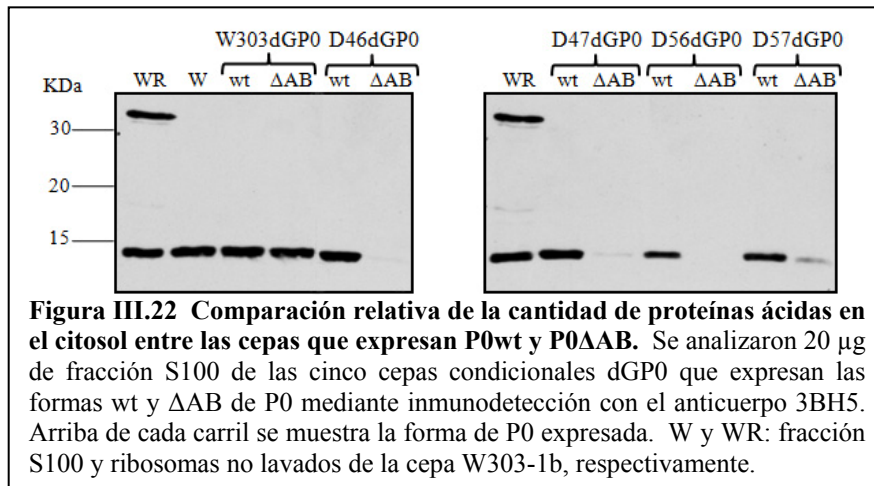
P0 Δ B unen las proteínas P1 β y P2 β de la misma manera. Una vez más, la proteína P0 Δ AB no une ninguna de las dos proteínas ácidas al ribosoma.

Finalmente, en las series D56dGP0 y D57dGP0, las tres formas P0wt, P0 Δ A y P0 Δ B también unen al ribosoma las dos proteínas ácidas que se expresan en estas cepas: P1 α y P2 α en el primer caso y P1 β y P2 α en el segundo caso. Al igual que en todos los casos anteriores, en ambas cepas la forma P0 Δ AB no une ninguna de las dos proteínas ácidas expresadas.

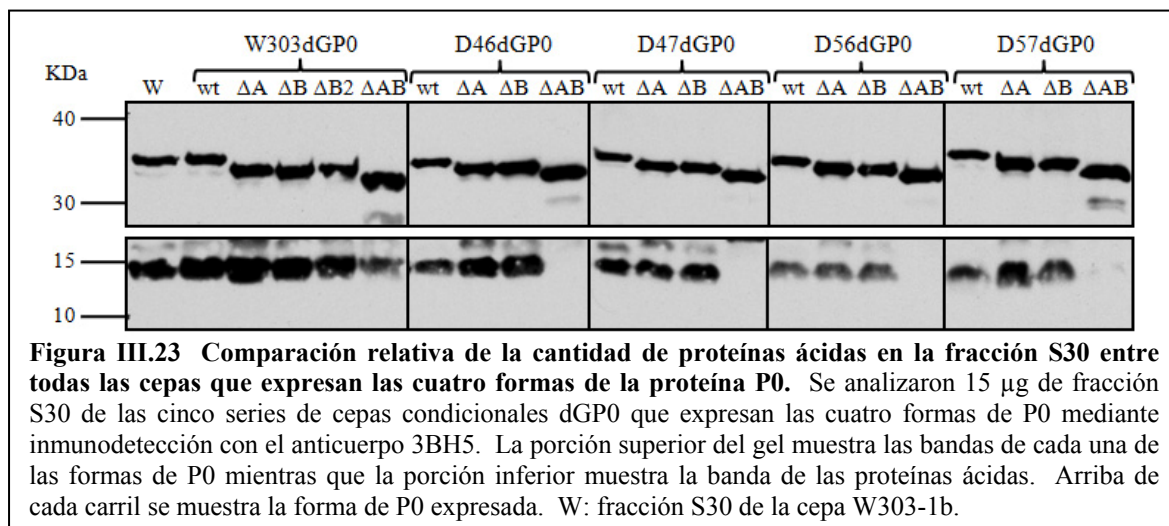


III.2.3.2 Análisis comparativo de la abundancia de las proteínas ácidas en el citosol entre los diversos mutantes condicionales

En los casos donde no hay unión de las proteínas ácidas a las formas truncadas de la proteína P0, es razonable pensar que la cantidad de dichas proteínas ácidas se verá aumentada considerablemente en la fracción S100 en comparación con las cepas condicionales controles, en las cuales se expresa la forma silvestre de la proteína P0. Para comprobar esto, se realizó una comparación relativa de la cantidad de las proteínas ácidas en la fracción S100 de las cepas que expresan las formas completa (P0wt) y truncada sin los dos sitios de unión (P0 Δ AB) de cada una de las cinco series de mutantes condicionales dGP0 mediante inmunodetección con el anticuerpo 3BH5 (figura III.22). A pesar de que no se realizó un análisis cuantitativo, es evidente que cuando se expresa la forma P0 Δ AB en la cepa W303dGP0 la cantidad de proteínas ácidas es muy similar a cuando se expresa la forma completa de P0. Sin embargo, cuando la forma truncada se expresa en las demás cepas condicionales dGP0 la cantidad de proteínas ácidas es notablemente menor (cepa D57dGP0) y hasta prácticamente indetectable (cepas D46dGP0, D47dGP0 y D56dGP0) en comparación a cuando se expresa la forma P0wt.



Para analizar en la fracción S100 la cantidad de proteínas ácidas incapaces de unirse al ribosoma igualmente nos puede valer utilizar la fracción S30 puesto que las proteínas ácidas presentes en esta fracción corresponden con las proteínas ácidas que están libres en la fracción S100 debido a su incapacidad de unirse a los ribosomas presentes en la fracción S30. Por ello, se repitió el análisis comparativo mediante inmunodetección con el anticuerpo 3BH5 en la fracción S30 (ver apartado II.10.1 de Materiales y métodos) de las cinco series de cepas condicionales dGP0 que expresan todas las formas de la proteína P0 (figura III.23). Los resultados de este último análisis muestran que en la cepa W303dGP0 cuando se expresa la forma P0ΔAB la cantidad de proteínas ácidas es menor que cuando se expresa la forma silvestre. En el caso de de las otras cuatro cepas condicionales dGP0, se reproducen los resultados obtenidos del análisis en la fracción S100 (figura III.22): las proteínas ácidas son indetectables cuando no se unen al ribosoma con la forma P0ΔAB. En los casos que se expresan las formas P0ΔA y P0ΔB, la cantidad de proteínas ácidas es similar a cuando se expresa la forma completa en las cinco cepas



condicionales dGPO.

Debido a que el tercer objetivo de esta tesis está cubierto en el apartado III.2.3.1, se decidió detener la investigación de este último apartado, puesto que se trata de un tema adicional cuyos resultados se alejan de dicho objetivo.

DISCUSIÓN

IV.1 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS CON OTRAS PROTEÍNAS CELULARES

El simple hecho de la existencia de un reservorio citoplásmico de proteínas ácidas (33,130,150,209) es un aspecto peculiar y llamativo de estas proteínas ya que es una característica ausente en el resto de proteínas que conforman la estructura de las partículas ribosómicas (200). En adición a este hecho, el que la función de este reservorio sea la de proveer el intercambio de las proteínas ácidas entre el citosol y los ribosomas (135,145,157,184,210) hace a estas proteínas todavía más especiales puesto que este comportamiento implica un mayor dinamismo en comparación con el resto de proteínas ribosómicas durante el proceso de síntesis proteica. Teniendo en cuenta la complejidad del ensamblaje del ribosoma en el que participan muchos componentes que ayudan en el proceso sin formar parte de la partícula final, es muy posible que en el intercambio de las proteínas ácidas también intervengan otras proteínas citosólicas con las que ellas forman complejos estables. Por otra parte, se ha demostrado que el proceso de intercambio de las proteínas ácidas no se lleva a cabo en *E. coli* (169), lo cual sugiere que en este organismo dicho reservorio participe en una función celular diferente que también podría tener lugar en los organismos eucarióticos y en la que las proteínas ácidas intervengan interaccionando con otras proteínas citosólicas. Por todo lo expuesto anteriormente, nos interesó identificar y caracterizar nuevas posibles interacciones de las proteínas ácidas del tallo ribosómico con otras proteínas celulares en el citosol que puedan jugar un papel directo o indirecto en la función y/o ensamblaje de las primeras durante el proceso de traducción.

La alta similitud entre los patrones bidimensionales de co-purificación de complejos con las cuatro proteínas ácidas parece indicar que las posibles interacciones que se estén llevando a cabo entre las proteínas ácidas y otras proteínas citosólicas son las mismas o muy parecidas. Este hecho sugiere que cualquiera que sea la función de las interacciones detectadas, las cuatro proteínas ácidas parecen comportarse de una forma similar en cuanto a su actividad citosólica.

Entre las 15 proteínas co-purificadas con P2 β solamente dos, Tef1p (factor de elongación EF-1 α) y Asc1p (ortólogo de la proteína RACK1 de mamíferos), están relacionadas con la síntesis de proteínas. La interacción con EF-1 α no es sorprendente, ya que, como se ha mencionado previamente en Introducción, está bien establecido que la función del tallo ribosómico está directamente relacionada con la función de los factores solubles de la traducción (9,30,63,89,133,167,199). Sin embargo, llama la atención que dicha interacción también se detecte con la proteína ácida libre en el citoplasma. Aún así, la interacción de P2 β y EF-1 α libres en el citoplasma está respaldada por la interacción entre EF-Tu y L12 en solución descrita mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (63). Aunque no podemos descartar un carácter artefactual de nuestro resultado dada la abundancia de ambas proteínas en el citosol, éste

podría ser una indicación de la existencia de interacciones entre los componentes de la maquinaria de traducción que son previas a las que tienen lugar durante la síntesis proteica y que podrían aumentar la eficiencia del proceso. Es posible que el mecanismo por el cual las proteínas ácidas están implicadas en el reclutamiento de los factores de traducción, previamente descrito en la literatura, sea mediante interacciones entre dichos factores con las proteínas ácidas cuando éstas se encuentran libres en el reservorio citoplásmico y el reclutamiento de los factores al ribosoma tendría lugar cuando las proteínas ácidas del reservorio, unidas a los factores solubles, se intercambien con las proteínas ácidas del ribosoma.

Con respecto a la proteína Asc1p, su interacción con las cuatro proteínas ácidas del tallo fue detectada en nuestro laboratorio mediante entrecruzamiento químico de la fracción de ribosomas con o-fenantrolina/ Cu^{2+} (128). Sin embargo, hay que indicar que en aquel caso las proteínas ácidas están incorporadas en los ribosomas formando parte del tallo mientras que la interacción mostrada en este trabajo tiene lugar cuando la proteína P2 β está libre en el citoplasma. Existen numerosos estudios que apuntan a Asc1p/Cpc2 como un componente de la subunidad 40S del ribosoma (10,27,40,67,96,162), pero su ubicación en la cabeza de dicha subunidad (159) hace que difícilmente sea alcanzada por las proteínas ácidas unidas al ribosoma, por lo que los datos obtenidos mediante entrecruzamiento químico podrían deberse a una interacción del tallo ribosómico con Asc1p libre en el citoplasma (10,86,162).

En adición, parece existir una relación, tanto local como físicamente, en el ribosoma entre EF-1 α y Asc1p ya que se ha demostrado la interacción directa de ambas proteínas con la proteína Scp160p mediante ensayos de inmunoprecipitación de productos entrecruzados químicamente en la fracción de ribosomas totales (10). Puesto que Scp160p se asocia con ARNm específicos (94), su interacción con Asc1p y EF-1 α posiblemente regule la traducción de éstos. Aunque no podamos sugerir un mecanismo, de igual forma es posible que la interacción de P2 β (y el resto de las proteínas ácidas) con Asc1p y EF-1 α regule también la traducción de ARNm específicos dada la implicación de las proteínas ácidas en la regulación a nivel traduccional de ARNm específicos dependiendo de la actividad metabólica de la célula (134).

A diferencia de Tef1p y Asc1p, ninguna de las otras 13 proteínas co-purificadas con P2 β se ha descrito previamente que interaccione con alguna de las cuatro proteínas ácidas (ver tabla I.1 de Introducción). Estas 13 proteínas participan en otros procesos celulares, de los cuales los más comunes son el metabolismo de la glucosa y la esporulación. Así, las proteínas Tdh1p (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 1), Tdh3p (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3), Gpm1p (Fosfoglicerato mutasa), Pyk1p (Piruvato quinasa) y Eno2p (Enolasa 2) son enzimas que participan en los procesos de glucólisis y/o gluconeogénesis (21,90,101,102) mientras que las proteínas Gpm1p, Emi2p (Proteína requerida para la inducción

transcripcional de Ime1p), Act1p (Actina) y Vma2p (Subunidad B del dominio V₁ de la ATPasa vacuolar de protones) están implicadas directa o indirectamente en el proceso de esporulación (16,31,34). Por otra parte, las cinco proteínas restantes participan en otros procesos distintos a los dos mencionados arriba: Spe3p (espermidina sintetasa), Sam1p (S-adenosilmetionina), Yhb1p (Óxido nítrico oxidoreductasa), Psa1p (GDP-manosa pirofosforilasa) y Ura3p (Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa). Pese a que estas 13 proteínas no están directamente relacionadas con la traducción, algunas de ellas (incluyendo a Asc1p) no sólo interaccionan entre sí sino también con proteínas que se han descrito que interaccionan con alguna de las proteínas ácidas (proteínas de la tabla I.1). Dichas interacciones se resumen en la tabla IV.1 en donde se mencionan las proteínas más relevantes que interaccionan con las proteínas co-purificadas con P2β.

Tabla IV.1 Proteínas que interaccionan con las proteínas co-purificadas con P2β (información tomada de la base de datos del genoma de *Saccharomyces*, SGD). Código de colores: en azul proteínas co-purificadas con P2β que interaccionan entre sí; en naranja proteínas que también interaccionan con P2β; y en púrpura proteínas que también interaccionan con las otras tres proteínas ácidas.

| Proteína co-purificada con P2β | Proteína co-purificada actuando como cebo | Proteína co-purificada actuando como presa |
|--------------------------------|---|--|
| Tdh1p | Tdh3p | Pam1p |
| Gpm1p | | Sam1p, Rtt107p, Tdh3p |
| Tdh3p | Gpm1p | Rtt107p, Tdh1p |
| Asc1p | | Mis1p, Ski3p |
| Act1p | Vma2p | |
| Pyk1p | | Sec10p, Sam1p, Psa1p |
| Vma2p | | Arb1p |
| Sam1p | Gpm1p, Psa1p | |
| Eno2p | | Gen5p |
| Yhb1p | Psa1p | Cla4p, Gen5p |
| Psa1p | | Yhb1p, Sam1p |

Se puede apreciar que existen interacciones entre las propias proteínas co-purificadas con P2β (color azul), siendo ejemplos claros Tdh3p, Gpm1p, Pyk1p, Sam1p, Yhb1p y Psa1p que, aunque no todas participan en el mismo proceso celular (como es el caso de Sam1p, Yhb1p y Psa1p), parecen estar interconectadas en uno o más complejos multiproteicos. Algunas de las proteínas co-purificadas interaccionan con proteínas que también interaccionan con P2β (color naranja) como es el caso de Asc1p, Eno2p e Yhb1p, lo cual puede respaldar la veracidad de las interacciones de estas proteínas con P2β detectadas en este trabajo. Por último, algunas de las proteínas co-purificadas también interaccionan con proteínas que interaccionan con alguna de las otras tres proteínas ácidas (color púrpura) como por ejemplo Tdh3p y Gpm1p que interaccionan

con Rtt107p que a su vez interacciona con las proteínas P1 α , P2 α y P0 (141). En conclusión, es posible que las proteínas mencionadas en la tabla IV.1 (proteínas en naranja y púrpura presentes también en la tabla I.1) correspondan a una conexión indirecta entre P2 β y las proteínas co-purificadas que puede apoyar la conexión directa entre ellas reportada por primera vez en este trabajo.

La co-purificación de las proteínas Tdh1p, Tdh3p, Gpm1p, Pyk1p y Eno2p junto con la información mostrada en la tabla IV.1 (proteínas en color naranja y púrpura) son los primeros datos que relacionan las proteínas del tallo ribosómico con el metabolismo de la glucosa, aunque se necesita más información que confirme dicha relación antes de aceptarla como real. En el caso de la esporulación, sí que se dispone de información adicional que señala algún tipo de relación con el tallo ribosómico. Así, en nuestro laboratorio se ha podido comprobar que cepas mutantes en las que no hay proteínas ácidas en el ribosoma son incapaces de esporular (134). Incluso la utilización de la glucosa y la esporulación están relacionadas ya que la presencia de glucosa reprime el proceso de esporulación. Podría suceder, por tanto, que para inducir la misma en ausencia de glucosa sea necesaria la presencia de proteínas P1/P2 en el tallo ribosómico. Actualmente se está estudiando en más detalle esta relación con el proceso de esporulación, pero nuestros resultados apoyan la existencia de la misma.

La aparición de un número considerable de proteínas retenidas en la resina de Ni-NTA de manera inespecífica nos condujo a utilizar la aproximación del TAP como alternativa para solventar este problema. La notable reducción de proteínas que fueron retenidas en la resina de Ni-NTA, no sólo inespecíficamente sino también específicamente, al utilizar la aproximación con la etiqueta TAP puede deberse a sus tres características principales: la elución proveniente de la resina de IgG libera principalmente la proteína P2 β etiquetada junto con las proteínas con las que interacciona debido a la alta especificidad del corte por la proteasa TEV dentro del TAP; el mayor volumen de lavado total debido a que esta aproximación consiste en dos pasos consecutivos de purificación aumenta su fuerza mecánica; y la composición de las soluciones tampones en los lavados otorga una mayor fuerza iónica, lo cual se traduce en una mayor fuerza de arrastre de uniones inespecíficas. Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, el hecho de que únicamente la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3 (Tdh3p) aparezca en las eluciones de la muestra con P2 β TAP sugiere que la interacción de estas dos proteínas es más fuerte que en el caso de las otras proteínas co-purificadas con P2 β his6. Por consiguiente, los resultados indican que, a diferencia de las otras 14 proteínas, Tdh3p interacciona con P2 β con una estabilidad suficiente para resistir la alta astringencia de los lavados en la purificación con el TAP. Finalmente, podemos concluir que la co-purificación de Tdh3p con P2 β , en comparación con las otras 14 proteínas co-purificadas, nos indica con mayor seguridad la existencia de una interacción entre

estas dos proteínas puesto que ha sido detectada utilizando dos aproximaciones de purificación distintas.

El significado fisiológico de las interacciones detectadas con proteínas no relacionadas con la función conocida de la proteína P2 β , es decir, como componente de la maquinaria de síntesis proteica, es en este momento difícil de valorar. Una actividad de esta proteína independiente de la que desempeña como parte del tallo ribosómico no es descartable ya que se han reportado casos de otras proteínas ribosómicas implicadas en procesos metabólicos diferentes a la traducción. Así, la proteína P0, otro de los componentes del tallo ribosómico, ha sido reportada que tiene una actividad endonucleasa en *Drosophila melanogaster* (205). De hecho, se ha reportado en varios estudios una implicación de EF-1 α y Asc1p en la organización y función del citoesqueleto de actina (53,110,202). Además, Asc1p se ha visto implicada en la ruta de señalización de la glucosa actuando como la subunidad β de proteína G para Gpa2 (208) y siendo requerida para el crecimiento invasivo y dimorfismo dependientes de Flo11 (189). Estos datos apoyan la hipótesis de que la proteína P2 β y/o las otras tres proteínas ácidas estén implicadas en otros procesos metabólicos conectándolos con la traducción. Sin embargo, para aclarar definitivamente este punto sería necesario establecer que existe una interacción real en el citoplasma entre P2 β (o alguna de las otras proteínas ácidas) y alguna de las 15 proteínas co-purificadas detectando la misma interacción en el otro sentido, es decir, utilizando como cebo alguna de estas 15 proteínas y co-purificando como presa a la proteína P2 β .

IV.2 INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS EN EL CITOSOL

Como se ha comentado previamente en la sección de Introducción, las proteínas ácidas P1 y P2 interactúan en el tallo ribosómico formando heterodímeros. No está aún claramente determinado si esas asociaciones son un requisito necesario para su unión a la partícula ribosómica o si se establecen una vez unidas a la misma. Se ha detectado la presencia de heterodímeros entre las proteínas P1 y P2 de organismos eucariotas superiores cuando éstas se encuentran purificadas en solución *in vitro* (45,160) y también *in vivo* mediante la técnica de doble híbrido (175). En *S. cerevisiae* también se han detectado los heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α en solución tanto *in vivo* (89,174) como *in vitro* (174) y de manera indirecta en el citosol en el caso del heterodímero P1 β -P2 α (116). Estos datos apoyan la idea de que sea necesaria la formación de los heterodímeros preferentes antes de que se ensamblen las proteínas ácidas en el ribosoma. Sin embargo, también existen indicaciones de la posible existencia de otras interacciones entre las proteínas ácidas en combinaciones distintas de las uniones preferentes antes mencionadas. Así, en cepas mutantes que sólo expresan dos proteínas ácidas que no forman

un par preferente, éstas aparecen unidas al ribosoma (138) sugiriendo que en estas condiciones también es necesaria la previa formación de un heterodímero de ambas proteínas. Apoyando esta posibilidad se ha reportado en diversas publicaciones de que son las proteínas P1, pero no las proteínas P2, las que se unen directamente a la proteína P0 (45,212). Estos antecedentes nos llevaron a explorar directamente, usando la cromatografía de afinidad, las interacciones que tienen lugar en el citosol entre las cuatro proteínas ácidas.

Los resultados de los análisis de las interacciones entre las proteínas ácidas (figuras III.9 y III.10) muestran claramente la presencia de los heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α en el citosol en ambos sentidos, es decir, tanto purificando una proteína del heterodímero y detectando la otra como viceversa. Aunque existe una clara diferencia en la intensidad relativa de las proteínas de ambos heterodímeros, particularmente las proteínas P1 α y P2 α al purificar las proteínas P2 β his6 y P1 β his6, respectivamente, hay que tomar en consideración que para la detección de las cuatro proteínas ácidas se utilizaron cinco anticuerpos distintos (incluyendo el anticuerpo α -his6), cada uno con una afinidad distinta para su correspondiente antígeno, por ello no es correcto hacer una comparación directa de la intensidad de las diferentes bandas con el fin de determinar la relación estequiométrica entre las proteínas en cada heterodímero. A pesar de ello, estos resultados con la inmunodetección fueron corroborados con la tinción de plata (figura III.11) en donde en general la intensidad de las bandas de las proteínas co-purificadas se aprecia de manera más uniforme.

En definitiva, es claro que estos resultados confirman de manera directa lo descrito en previos reportes (89,116,174) utilizando aproximaciones más indirectas como la técnica de doble híbrido, la cual indica que efectivamente las proteínas estudiadas son capaces de interactuar en el núcleo pero no que la interacción este teniendo lugar en el citoplasma. Por lo tanto, podemos concluir que los heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α están presentes en el citosol, lo que apoya que su previa formación es necesaria para el correcto ensamblaje de las proteínas en el ribosoma y la formación final del tallo ribosómico.

Un resultado aún más interesante que la detección de los heterodímeros preferentes fue la inmunodetección de las interacciones de la proteína P2 β con las proteínas P1 β y P2 α (figuras III.9 y III.10), que también fueron corroboradas mediante la tinción con plata (figura III.11). Sin embargo, al contrario que en el caso de los heterodímeros preferentes, estas interacciones sólo se detectaron en un solo sentido, es decir, cuando la proteína P2 β fue co-purificada con las proteínas P1 β his6 y P2 α his6 pero no al revés. La mayor cantidad de proteína P2 β co-purificada con P1 β his6 que con P2 α his6 (carriles segundo y cuarto de la figura III.11) sugiere una mayor afinidad de P2 β por P1 β que por P2 α y, como consecuencia, la existencia de una mayor población de heterodímeros P1 β -P2 β que de P2 α -P2 β en el citosol. A diferencia de la purificación con la

cola de histidinas, las proteínas P1 β y P2 α fueron co-purificadas cuando P2 β fue etiquetada con el TAP (figura III.12), lo cual descarta la posibilidad de que las proteínas P1 β y P2 α no co-purificaran con P2 β his6 por un impedimento estérico de la cola de histidinas puesto que la etiqueta TAP es casi el doble de tamaño (≈ 20 KDa) de la proteína P2 β y aún así ambas proteínas fueron co-purificadas con esta última aproximación. En adición, el hecho de que estas interacciones se puedan llevar a cabo aunque una de las proteínas tenga fusionada en su extremo carboxilo una etiqueta de tal tamaño, como es el TAP, puede indicar que las proteínas ácidas estén interaccionando a través de su dominio N-terminal confirmando lo que se ha descrito previamente en la literatura (118).

Ciertamente, no es fácil interpretar la existencia de estas nuevas interacciones no preferentes entre las proteínas P1 β , P2 α y P2 β de acuerdo con los datos hoy disponibles sobre la estructura del tallo ribosómico, pero también es cierto que existen evidencias experimentales que serían compatibles con este resultado. Un ejemplo son los datos de un reciente trabajo que se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio en el cual se ha realizado un exhaustivo análisis de las interacciones entre las cinco proteínas del tallo ribosómico mediante ensayos de doble-híbrido (Francisco-Velilla, R., Rodríguez-Mateos, M., y Remacha, M., datos no publicados). En el caso de la interacción P1 β -P2 β , la detección de ésta en dicho análisis en presencia y en ausencia de P2 α es perfectamente compatible con los resultados mostrados en este trabajo y además coherente con la existencia de mutantes en los que existen unidas al ribosoma ambas proteínas (138). Otros datos que también apoyan la existencia de la interacción P1 β -P2 β son: a) la detección de dos poblaciones de ribosomas, una con P1 β y P2 α y otra con P1 β y P2 β , en ausencia de P1 α (56) y b) la unión al ribosoma de ambas proteínas P1 dependiente de la capacidad de P2 β de unirse a éste (20). Con respecto a la interacción P2 α -P2 β , su detección mediante doble-híbrido parece ser debida a la formación de un complejo pentamérico entre todos los componentes del tallo ribosómico, P0, P1 α , P1 β , P2 α y P2 β . Dado que está repetidamente comprobado que la proteína P0 no existe libre en el citoplasma (un ejemplo claro se muestra en la figura III.22), los resultados obtenidos mediante cromatografía de afinidad en esta tesis indican que la interacción P2 α -P2 β en el citosol debe tener lugar en ausencia de P0 y, por lo tanto, no como parte de un complejo pentamérico. Sin embargo, aunque no podemos excluir que la interacción entre las dos proteínas P2 sea parte de un tetrámero de las cuatro proteínas ácidas, en nuestro estudio no hemos encontrado trazas de la proteína P1 α entre las proteínas co-purificadas con P1 β y P2 α , lo que podría ser debido a la mayor susceptibilidad a la degradación de la misma. Otros datos que pueden respaldar la existencia de la interacción P2 α -P2 β son la formación de homodímeros de P2 β en soluciones de la proteína purificada (213) y de P2 α antes de su incorporación en el ribosoma (36) así como de ambas proteínas P2 en ribosomas de células que expresan estas

proteínas mutadas para facilitar la formación de puentes S-S entre las mismas (129). Por lo tanto, si la existencia de homodímeros de proteínas P2 es posible, también podría serlo la de heterodímeros P2 α -P2 β sabiendo que los 10 primeros aminoácidos de ambas proteínas son idénticos. El conocimiento actual de la estructura y función del tallo ribosómico y de sus componentes es aún demasiado deficiente para poder excluir totalmente estas posibilidades y son necesarios estudios complementarios usando otras aproximaciones experimentales para poder llegar a conclusiones definitivas. En ese sentido, el uso de técnicas de fluorescencia de alta resolución que ya han empezado a usarse en el laboratorio (37) son muy prometedoras para el estudio de las interacciones entre las proteínas del tallo ribosómico.

IV.3 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS ÁCIDAS A LOS SITIOS DE INTERACCIÓN DE LOS HETERODÍMEROS P1 α -P2 β Y P1 β -P2 α EN LA PROTEÍNA P0

Para comprender a nivel molecular el proceso de ensamblaje del tallo ribosómico es esencial la determinación y caracterización de los sitios implicados en la interacción entre las proteínas del tallo, particularmente los sitios donde las proteínas ácidas son ancladas al ribosoma, es decir, los sitios de interacción de las proteínas ácidas en la proteína P0. Independientemente de si las cuatro proteínas ácidas se unen formando dos heterodímeros por separado o interconectados como un complejo tetramérico, es razonable pensar que cada heterodímero pueda tener un sitio de unión específico en la proteína P0. El modelo propuesto de la existencia de un sitio de interacción en la proteína P0 específico para cada uno de los heterodímeros P1 α -P2 β (sitio A) y P1 β -P2 α (sitio B) (78) no da una respuesta satisfactoria a los resultados obtenidos cuando se usan cepas mutantes que sólo expresan dos proteínas ácidas que no forman un par preferente (138). Si la especificidad propuesta por Krokowski et al. es correcta, el mecanismo por el cual los heterodímeros P1 α -P2 α y P1 β -P2 β se unen a la proteína P0 no está suficientemente elucidado. Para intentar aclarar estos aspectos hemos llevado a cabo los ensayos que corresponden al tercer objetivo de esta tesis en los que se ha estudiado la unión de las diferentes proteínas ácidas a ribosomas que contienen una proteína P0 a la que se le ha eliminado la región que comprende el sitio A, el sitio B o ambos simultáneamente.

Con el fin de hacer más fácil al lector esta sección de la discusión, la información aportada por las figuras III.19, III.20 y III.21 de Resultados se muestra a continuación en la tabla IV.2.

Tabla IV.2 Proteínas ácidas unidas a los ribosomas de cada cepa dGP0 expresando cada una de las formas de la proteína P0.

| Cepa mutante dGP0 transformada | Proteínas ácidas unidas al ribosoma | | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|----------|--------------------|---------|
| | P0wt | P0ΔA | P0ΔB | P0ΔAB |
| W303dGP0 | P1α, P1β, P2α, P2β | P1β, P2α | P1α, P1β, P2α, P2β | Ninguna |
| D46dGP0 | P1α, P2β | Ninguna | P1α, P2β | Ninguna |
| D47dGP0 | P1β, P2β | P1β, P2β | P1β, P2β | Ninguna |
| D56dGP0 | P1α, P2α | P1α, P2α | P1α, P2α | Ninguna |
| D57dGP0 | P1β, P2α | P1β, P2α | P1β, P2α | Ninguna |

Antes de discutir los resultados resumidos en la tabla, es importante mencionar que la eliminación de los sitios de interacción (localizados en la mitad C-terminal de la proteína) en las tres formas truncadas de la proteína P0 no afecta su capacidad de unión al ribosoma, lo cual va de acuerdo con los datos previos que han demostrado que dicha unión se lleva a cabo a través de los primeros 121 aminoácidos de la mitad N-terminal (154).

Un resultado que es indiscutible y reproducible con respecto a lo descrito en la literatura (78,89,119) es que las cuatro proteínas ácidas son incapaces de unirse al ribosoma de todas las cepas condicionales dGP0 cuando a la proteína P0 se le ha eliminado simultáneamente las regiones correspondientes a los sitios de unión A y B. Este dato indica que, ya sea si están separados o solapados, los sitios de unión de las cuatro proteínas ácidas están dentro de la región comprendida entre los residuos 198 y 258 independientemente del heterodímero que se esté formando entre ellas en el citosol.

Los resultados del análisis de la unión de proteínas ácidas a la forma P0ΔA mostraron sólo la unión de las proteínas P1β y P2α en la cepa W303dGP0 y la ausencia de proteínas ácidas en los ribosomas de la cepa D46dGP0. Estos datos indican que las proteínas P1α y P2β son incapaces de unirse al sitio B y, por ende, sólo se unen a los ribosomas cuando en la proteína P0 está presente la región correspondiente al sitio A. Es lógico que en la cepa D57dGP0/P0ΔA se unan a los ribosomas las proteínas P1β y P2α puesto que sólo ellas también fueron capaces de unirse a los ribosomas de la cepa W303dGP0/P0ΔA en donde se expresan las cuatro proteínas ácidas. Sin embargo, en los casos en que se expresan por separado las proteínas P1α y P2β, a diferencia de las cepas W303dGP0/P0ΔA y D46dGP0/P0ΔA, su unión al ribosoma a través de la forma P0ΔA sí se lleva a cabo pero de una manera condicionada. Así, en el caso de la cepa D47dGP0/P0ΔA se puede apreciar la unión de la proteína P2β al ribosoma a pesar de que se ha eliminado el sitio A y la proteína P1α está ausente, lo cual indica que P2β se está uniendo al sitio B de la forma P0ΔA condicionada por la presencia de la proteína P1β. Esto parece implicar una previa formación del

heterodímero P1 β -P2 β en el citosol que luego se ensambla en el ribosoma mediante su unión al sitio B de P0 Δ A, lo cual está de acuerdo con la detección de la interacción entre P1 β y P2 β en el citosol mediante la cromatografía de afinidad discutida previamente en el apartado IV.2. En el caso de la cepa D56dGP0/P0 Δ A (figura III.21) la situación es similar puesto que la proteína P1 α también es capaz de unirse al ribosoma, a pesar de la ausencia del sitio A y de la proteína P2 β , a través de su unión al sitio B de la forma P0 Δ A condicionada por la presencia de la proteína P2 α en esta cepa. Esto también parece implicar una previa formación del heterodímero P1 α -P2 α en el citosol que luego se ensambla en el ribosoma mediante su unión al sitio B de P0 Δ A. Sin embargo, a diferencia de la interacción P1 β -P2 β , la interacción P1 α -P2 α no pudo detectarse mediante la cromatografía de afinidad posiblemente porque esta interacción sólo se lleve cabo en ausencia de las proteínas P1 β y P2 β , como es el caso de la cepa D56dGP0/P0 Δ A en donde están ausentes estas proteínas.

Por otro lado, los resultados del análisis de la unión de las proteínas ácidas a la forma P0 Δ B mostraron que las cuatro proteínas ácidas, principalmente P1 β y P2 α , son capaces de unirse al sitio A en la cepa W303dGP0/P0 Δ B. Este resultado es reproducible en los dos transformantes, independientemente preparados, de esta cepa (carriles P0 Δ B y P0 Δ B2 de la figura III.19). La causa de que en los ribosomas de la cepa W303dGP0/P0 Δ B se detectó una pequeña cantidad de la proteína P1 α es desconocida. Por una parte, es difícil pensar en una ineficiente tinción de esta proteína puesto que en el mismo gel la banda correspondiente a ésta sí se tiñó eficientemente en los ribosomas de las cepas W303 y W303dGP0/P0wt. Por otra parte, también es difícil pensar en una ineficiente unión de P1 α al sitio A de la forma P0 Δ B en la cepa W303dGP0/P0 Δ B ya que dicha proteína mostró una eficiente unión a la forma P0 Δ B en las cepas D46dGP0/P0 Δ B y D56dGP0/P0 Δ B. La capacidad de unión de las cuatro proteínas ácidas al sitio A también se ve reflejada en las cepas D46dGP0/P0 Δ B, D47dGP0/P0 Δ B, D56dGP0/P0 Δ B y D57dGP0/P0 Δ B cuyos ribosomas unen las dos proteínas ácidas expresadas en cada una de ellas.

Por consiguiente, en estas condiciones, nuestros resultados indican que la especificidad del sitio A está notablemente alterada en ausencia del sitio B y sugieren que la afinidad del heterodímero P1 β -P2 α por el sitio A va en contra del modelo propuesto por Krokowski et al.

Datos previos que indicaban que las proteínas de tipo P1, pero no las de tipo P2, eran capaces de unirse por sí mismas al ribosoma (45,212) indujeron a proponer que la interacción de los heterodímeros con el ribosoma estaba dirigida por las proteínas P1. Si eso fuera así, la especificidad de la interacción del heterodímero estaría inicialmente determinada por su componente de tipo P1. Entonces, cabría esperar que los heterodímeros no preferentes P1 β -P2 β y P1 α -P2 α mostraran mayor afinidad por la proteína P0 que tuviera el sitio correspondiente a su proteína P1, es decir, el sitio B en P0 Δ A y sitio A en P0 Δ B, respectivamente. Sin embargo, los

resultados de nuestro estudio no parecen respaldar esa propuesta ya que, como se ha comentado anteriormente, ambos heterodímeros no muestran una preferencia por ninguna de las proteínas P0 en las que se ha eliminado sólo uno de los dos sitios.

Finalmente, podemos concluir que nuestros resultados están por una parte de acuerdo y por otra parte en desacuerdo con el modelo de especificidad de unión propuesto en (78). Así, el heterodímero P1 α -P2 β se une exclusivamente al sitio A de la proteína P0, el cual se vez no específico para dicho heterodímero puesto que las proteínas P1 β y P2 α también son capaces de unirse a este sitio. Sin embargo, el sitio B sí muestra una especificidad de unión por el heterodímero P1 β -P2 α puesto que las proteínas P1 α y P2 β por sí solas son incapaces de unirse a este sitio y sólo pueden hacerlo en presencia de P1 β o de P2 α .

Si la interacción entre las proteínas ácidas y el ribosoma en organismos eucarióticos se lleva a cabo por un mecanismo similar al que se da en organismos procarióticos, la interacción debe tener lugar a través del complejo formado por los extremos amino-terminal de las dos proteínas ácidas (dos moléculas de la proteína L7/L12 en bacteria o una molécula de P1 y una de P2 en eucariotas) (30). Por ello, es muy probable que la unión al ribosoma a través de P0 no esté determinada solamente por una de las dos proteínas ácidas sino por el heterodímero en su conjunto. Por lo tanto, en levadura, la interacción con P0 de cada posible heterodímero tendrá unas características propias. Desafortunadamente, hasta que no se disponga de la estructura tridimensional de estos complejos con una resolución suficientemente alta, que en la actualidad es desconocida, no podremos analizar en detalle el proceso de formación del tallo ribosómico y con ello determinar correctamente la posible especificidad de las interacciones.

Por otro lado, abundantes datos previos indican que las proteínas ácidas que no se unen al ribosoma se acumulan en el citoplasma formado heterodímeros P1-P2 e igualmente, que las proteínas P2 libres son altamente resistentes a la degradación y se acumulan en la célula en ausencia de las proteínas P1 (116,134,138). Teniendo en cuenta estos antecedentes, la ausencia prácticamente total de proteínas ácidas en las cepas que expresan la forma truncada P0 Δ AB (figuras III.22 y III.23) y que, por lo tanto, contienen ribosomas totalmente carentes de proteínas P1 y P2, no es fácil de explicar. Es muy improbable que esta ausencia de proteínas ácidas se deba a un proceso de degradación, sobre todo en el caso de las proteínas P2 dada la bien demostrada resistencia de éstas, lo cual apuntaría hacia un efecto de represión de la expresión bien a nivel transcripcional o traduccional desencadenado por la presencia de la forma truncada de P0.

El tema presenta un enorme interés, sobre todo si la represión tuviera lugar a nivel de la traducción, pues estaría directamente relacionado con el modelo de regulación de la traducción a través de las modificaciones del tallo ribosómico que nuestro laboratorio ha propuesto. Por lo tanto, el estudio en profundidad de este resultado es una prioridad del laboratorio.

Desafortunadamente, estos resultados se han obtenido en la etapa final del desarrollo de esta tesis y no se han podido analizar en más detalle.

CONCLUSIONES

- 1) Las cuatro proteínas ácidas del tallo ribosómico que se encuentran libres en el citoplasma co-purifican con un conjunto de proteínas muy similar indicando que sus interacciones con otros componentes citosólicos posiblemente sean las mismas y, por lo tanto, que la actividad citosólica de las cuatro es equivalente.
- 2) Se identificaron 15 proteínas citosólicas que co-purifican con la proteína P2 β . Dos de ellas, el factor de elongación EF1 α (Tef1p) y Asc1p, participan en el proceso de traducción mientras que las otras 13 proteínas participan en otros procesos celulares principalmente relacionados con el metabolismo de glucosa y la esporulación.
- 3) Sólo Tdh3p co-purifica con P2 β con las dos técnicas utilizadas, lo que indica que interacciona con mayor estabilidad.
- 4) Los dos heterodímeros preferentes P1 α -P2 β y P1 β -P2 α se forman en el citosol como paso previo a su incorporación al ribosoma para formar el tallo ribosómico.
- 5) Los ensayos de cromatografía de afinidad revelaron la existencia de los heterodímeros no preferentes P1 β -P2 β y P2 α -P2 β en el citosol.
- 6) Los sitios de interacción de las cuatro proteínas ácidas en la proteína P0 están dentro de la región comprendida entre los residuos 198 y 258.
- 7) El heterodímero P1 α -P2 β se une al ribosoma exclusivamente en la región correspondiente al sitio A comprendida entre los residuos 198 y 230 en la proteína P0. No obstante, los heterodímeros P1 β -P2 α también se pueden unir a esta región.
- 8) La región correspondiente al sitio B comprendida entre los residuos 230 y 258 es específica para la unión del heterodímero P1 β -P2 α .

BIBLIOGRAFÍA

1. Abramczyk, O., Zien, P., Zielinski, R., Pilecki, M., Hellman, U. and Szyszka, R. (2003) The protein kinase 60S is a free catalytic CK2alpha' subunit and forms an inactive complex with superoxide dismutase SOD1. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**(1): 31-40.
2. Amons, R., Pluijms, W. and Moller, W. (1979) The primary structure of ribosomal protein eL12/eL12-P from *Artemia salina* 80 S ribosomes. *FEBS Lett*, **104**(1): 85-89.
3. Ayub, M.J., Barroso, J.A., Levin, M.J. and Aguilar, C.F. (2005) Preliminary structural studies of the hydrophobic ribosomal P0 protein from *Trypanosoma cruzi*, a part of the P0/P1/P2 complex. *Protein Pept Lett*, **12**(6): 521-525.
4. Ayub, M.J., Smulski, C.R., Nyambega, B., Bercovich, N., Masiga, D., Vazquez, M.P., Aguilar, C.F. and Levin, M.J. (2005) Protein-protein interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex. *Gene*, **357**(2): 129-136.
5. Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K. and Lee, C.H. (1997) Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol*, **114**(4): 1293-1305.
6. Ballesta, J.P. and Remacha, M. (1996) The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **55**: 157-193.
7. Ballesta, J.P., Rodriguez-Gabriel, M.A., Bou, G., Briones, E., Zambrano, R. and Remacha, M. (1999) Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Microbiol Rev*, **23**(5): 537-550.
8. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**(5481): 905-920.
9. Bargis-Surgey, P., Lavergne, J.P., Gonzalo, P., Vard, C., Filhol-Cochet, O. and Reboud, J.P. (1999) Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *Eur J Biochem*, **262**(2): 606-611.
10. Baum, S., Bittins, M., Frey, S. and Sedorf, M. (2004) Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J*, **380**(Pt 3): 823-830.
11. Beltrame, M. and Bianchi, M.E. (1990) A gene family for acidic ribosomal proteins in *Schizosaccharomyces pombe*: two essential and two nonessential genes. *Mol Cell Biol*, **10**(5): 2341-2348.
12. Bielka, H. (1982) *The eukaryotic ribosome*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
13. Bocharov, E.V., Sobol, A.G., Pavlov, K.V., Korzhnev, D.M., Jaravine, V.A., Gudkov, A.T. and Arseniev, A.S. (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem*, **279**(17): 17697-17706.
14. Boguszewska, A., Tchorzewski, M., Dukowski, P., Winiarczyk, S. and Grankowski, N. (2002) Subcellular distribution of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae* in various environmental conditions. *Biol Cell*, **94**(3): 139-146.
15. Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G.Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. and Lacroute, F. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast*, **7**(6): 609-615.
16. Botstein, D., Amberg, D., Molholland, J., Huffaker, T., Adams, A., Dubrin, D. and Stearns, T. (1997) "The yeast cytoskeleton" in *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: cell cycle and cell biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1-90.

17. Bou, G., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2000) Ribosomal stalk protein phosphorylating activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, **375**(1): 83-89.
18. Boublik, M. and Hellmann, W. (1978) Comparison of *Artemia salina* and *Escherichia coli* ribosome structure by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**(6): 2829-2833.
19. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
20. Briceño, V. (2007) Análisis de las regiones de las proteínas P1 α y P2 β que determinan su especificidad estructural y funcional en el tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
21. Burke, R.L., Tekamp-Olson, P. and Najarian, R. (1983) The isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **258**(4): 2193-2201.
22. Burke, T.F., Cocke, K.S., Lemke, S.J., Angleton, E., Becker, G.W. and Beckmann, R.P. (1998) Identification of a BRCA1-associated kinase with potential biological relevance. *Oncogene*, **16**(8): 1031-1040.
23. Campos, F., Corona-Reyes, M. and Zinker, S. (1990) The yeast 5S rRNA binding ribosomal protein YL3 is phosphorylated in vivo. *Biochim Biophys Acta*, **1087**(2): 142-146.
24. Capa, L., Mendoza, A., Lavandera, J.L., Gomez de las Heras, F. and Garcia-Bustos, J.F. (1998) Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**(10): 2694-2699.
25. Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**(6802): 340-348.
26. Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S. and Krogan, N.J. (2007) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, **6**(3): 439-450.
27. Chantrel, Y., Gaisne, M., Lions, C. and Verdiere, J. (1998) The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics*, **148**(2): 559-569.
28. De Craene, J.O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Ferro-Novick, S. and Novick, P. (2006) Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **17**(7): 3009-3020.
29. Dez, C. and Tollervey, D. (2004) Ribosome synthesis meets the cell cycle. *Curr Opin Microbiol*, **7**(6): 631-637.
30. Diaconu, M., Kothe, U., Schlunzen, F., Fischer, N., Harms, J.M., Tonevitsky, A.G., Stark, H., Rodnina, M.V. and Wahl, M.C. (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell*, **121**(7): 991-1004.
31. Dickinson, J.R. and Williams, A.S. (1986) A genetic and biochemical analysis of the role of gluconeogenesis in sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, **132**(9): 2605-2610.
32. Dong, J., Lai, R., Jennings, J.L., Link, A.J. and Hinnebusch, A.G. (2005) The novel ATP-binding cassette protein ARB1 is a shuttling factor that stimulates 40S and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol*, **25**(22): 9859-9873.

33. Elkon, K., Skelly, S., Parnassa, A., Moller, W., Danho, W., Weissbach, H. and Brot, N. (1986) Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(19): 7419-7423.
34. Enyenihi, A.H. and Saunders, W.S. (2003) Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **163**(1): 47-54.
35. Fuge, E.K., Braun, E.L. and Werner-Washburne, M. (1994) Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **176**(18): 5802-5813.
36. Garcia-Marcos, A. (2005) Estudios *in vivo* e *in vitro* del tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae* mediante técnicas biofísicas y bioquímicas. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
37. Garcia-Marcos, A., Sanchez, S.A., Parada, P., Eid, J., Jameson, D.M., Remacha, M., Gratton, E. and Ballesta, J.P. (2008) Yeast ribosomal stalk heterogeneity *in vivo* shown by two-photon FCS and molecular brightness analysis. *Biophys J*, **94**(7): 2884-2890.
38. Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelman, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B. and Superti-Furga, G. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, **440**(7084): 631-636.
39. Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**(6868): 141-147.
40. Gerbasi, V.R., Weaver, C.M., Hill, S., Friedman, D.B. and Link, A.J. (2004) Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol*, **24**(18): 8276-8287.
41. Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**(4): 355-360.
42. Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**(2): 527-534.
43. Gomez-Lorenzo, M.G. and Garcia-Bustos, J.F. (1998) Ribosomal P-protein stalk function is targeted by sordarin antifungals. *J Biol Chem*, **273**(39): 25041-25044.
44. Gomez-Lorenzo, M.G., Spahn, C.M., Agrawal, R.K., Grassucci, R.A., Penczek, P., Chakraborty, K., Ballesta, J.P., Lavandera, J.L., Garcia-Bustos, J.F. and Frank, J. (2000) Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *EMBO J*, **19**(11): 2710-2718.
45. Gonzalo, P., Lavergne, J.P. and Reboud, J.P. (2001) Pivotal role of the P1 N-terminal domain in the assembly of the mammalian ribosomal stalk and in the proteosynthetic activity. *J Biol Chem*, **276**(23): 19762-19769.

46. Gonzalo, P. and Reboud, J.P. (2003) The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell*, **95**(3-4): 179-193.
47. Graumann, J., Dunipace, L.A., Seol, J.H., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Wold, B.J. and Deshaies, R.J. (2004) Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics*, **3**(3): 226-237.
48. Grela, P., Bernado, P., Svergun, D., Kwiatowski, J., Abramczyk, D., Grankowski, N. and Tchorzewski, M. (2008) Structural relationships among the ribosomal stalk proteins from the three domains of life. *J Mol Evol*, **67**(2): 154-167.
49. Grela, P., Helgstrand, M., Krokowski, D., Boguszevska, A., Svergun, D., Liljas, A., Bernado, P., Grankowski, N., Akke, M. and Tchorzewski, M. (2007) Structural characterization of the ribosomal P1A-P2B protein dimer by small-angle X-ray scattering and NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **46**(7): 1988-1998.
50. Grela, P., Sawa-Makarska, J., Gordiyenko, Y., Robinson, C.V., Grankowski, N. and Tchorzewski, M. (2008) Structural properties of the human acidic ribosomal p proteins forming the p1-p2 heterocomplex. *J Biochem*, **143**(2): 169-177.
51. Gressner, A.M. and Wool, I.G. (1974) The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J Biol Chem*, **249**(21): 6917-6925.
52. Griaznova, O. and Traut, R.R. (2000) Deletion of C-terminal residues of Escherichia coli ribosomal protein L10 causes the loss of binding of one L7/L12 dimer: ribosomes with one L7/L12 dimer are active. *Biochemistry*, **39**(14): 4075-4081.
53. Gross, S.R. and Kinzy, T.G. (2005) Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat Struct Mol Biol*, **12**(9): 772-778.
54. Guarinos, E. (1999) El tallo ribosómico de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudio estructural y funcional. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
55. Guarinos, E., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2001) Asymmetric interactions between the acidic P1 and P2 proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk. *J Biol Chem*, **276**(35): 32474-32479.
56. Guarinos, E., Santos, C., Sanchez, A., Qiu, D.Y., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2003) Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol*, **50**(2): 703-712.
57. Gudkov, A.T., Tumanova, L.G., Gongadze, G.M. and Bushuev, V.N. (1980) Role of different regions of ribosomal proteins L7 and L10 in their complex formation and in the interaction with the ribosomal 50 S subunit. *FEBS Lett*, **109**(1): 34-38.
58. Gudkov, A.T., Tumanova, L.G., Venyaminov, S.Y. and Khechinashvilli, N.N. (1978) Stoichiometry and properties of the complex between ribosomal proteins L7 and L10 in solution. *FEBS Lett*, **93**(2): 215-218.
59. Hagiya, A., Naganuma, T., Maki, Y., Ohta, J., Tohkairin, Y., Shimizu, T., Nomura, T., Hachimori, A. and Uchiumi, T. (2005) A mode of assembly of P0, P1, and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosome: in vitro analyses with P0 truncation mutants. *J Biol Chem*, **280**(47): 39193-39199.
60. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**(4): 557-580.
61. Hanson, C.L., Videler, H., Santos, C., Ballesta, J.P. and Robinson, C.V. (2004) Mass spectrometry of ribosomes from *Saccharomyces cerevisiae*: implications for assembly of the stalk complex. *J Biol Chem*, **279**(41): 42750-42757.
62. Hebert, J., Pierre, M. and Loeb, J.E. (1977) Phosphorylation in vitro and in vivo of ribosomal proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **72**(1): 167-174.

63. Helgstrand, M., Mandava, C.S., Mulder, F.A., Liljas, A., Sanyal, S. and Akke, M. (2007) The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *J Mol Biol*, **365**(2): 468-479.
64. Highland, J.H. and Howard, G.A. (1975) Assembly of ribosomal proteins L7, L10, L11, and L12, on the 50 S subunit of Escherichia coli. *J Biol Chem*, **250**(3): 813-814.
65. Hihara, Y., Umeda, M., Hara, C., Toriyama, K. and Uchimiya, H. (1994) Nucleotide sequence of a rice acidic ribosomal phosphoprotein P0 cDNA. *Plant Physiol*, **105**(2): 753-754.
66. Ilag, L.L., Videler, H., McKay, A.R., Sobott, F., Fucini, P., Nierhaus, K.H. and Robinson, C.V. (2005) Heptameric (L12)₆/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(23): 8192-8197.
67. Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z., Jr., Yates, J.R., 3rd, Schieltz, D. and Sachs, A.B. (2002) One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA*, **8**(7): 948-958.
68. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**(1): 163-168.
69. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(8): 4569-4574.
70. Ivanov, S.S., Chung, A.S., Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Sachs, K.V., Reichner, J.S. and Chin, Y.E. (2004) Antibodies immobilized as arrays to profile protein post-translational modifications in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics*, **3**(8): 788-795.
71. Justice, M.C., Hsu, M.J., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D. and Nielsen, J. (1998) Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *J Biol Chem*, **273**(6): 3148-3151.
72. Kiselev, N.A., Orlova, E.V., Stel'maschuk, V., Vasiliev, V.D., Selivanova, O.M., Kosykh, V.P., Pustovskikh, A.I. and Kirichuk, V.S. (1983) Computer averaging of 50 S ribosomal subunit electron micrographs. *J Mol Biol*, **169**(1): 345-350.
73. Kiselev, N.A., Stel'maschuk, V., Orlova, E.V., Platzer, M., Noll, F. and Bielka, H. (1982) On the fine structure of rat liver ribosome small subunits. *Mol Biol Rep*, **8**(4): 185-189.
74. Koteliansky, V.E., Domogatsky, S.P. and Gudkov, A.T. (1978) Dimer state of protein L7/L12 and EF-G-dependent reactions of ribosomes. *Eur J Biochem*, **90**(2): 319-323.
75. Kothe, U., Wieden, H.J., Mohr, D. and Rodnina, M.V. (2004) Interaction of helix D of elongation factor Tu with helices 4 and 5 of protein L7/12 on the ribosome. *J Mol Biol*, **336**(5): 1011-1021.
76. Kraakman, L.S., Griffioen, G., Zerp, S., Groeneveld, P., Thevelein, J.M., Mager, W.H. and Planta, R.J. (1993) Growth-related expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **239**(1-2): 196-204.
77. Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A. and Greenblatt, J.F. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **440**(7084): 637-643.

78. Krokowski, D., Boguszewska, A., Abramczyk, D., Liljas, A., Tchorzewski, M. and Grankowski, N. (2006) Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol*, **60**(2): 386-400.
79. Krokowski, D., Tchorzewski, M., Boguszewska, A. and Grankowski, N. (2005) Acquisition of a stable structure by yeast ribosomal P0 protein requires binding of P1A-P2B complex: in vitro formation of the stalk structure. *Biochim Biophys Acta*, **1724**(1-2): 59-70.
80. Kruiswijk, T., de Hey, J.T. and Planta, R.J. (1978) Modification of yeast ribosomal proteins. Phosphorylation. *Biochem J*, **175**(1): 213-219.
81. Kruiswijk, T. and Planta, R.J. (1974) Analysis of the protein composition of yeast ribosomal subunits by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Biol Rep*, **1**(7): 409-415.
82. Kruiswijk, T. and Planta, R.J. (1975) Further analysis of the protein composition of yeast ribosomes. *FEBS Lett*, **58**(1): 102-105.
83. Kruiswijk, T., Planta, R.J. and Mager, W.H. (1978) Quantitative analysis of the protein composition of yeast ribosomes. *Eur J Biochem*, **83**(1): 245-252.
84. Kudlicki, W., Grankowski, N. and Gasior, E. (1978) Isolation and properties of two protein kinases from yeast which phosphorylate casein and some ribosomal proteins. *Eur J Biochem*, **84**(2): 493-498.
85. Kudlicki, W., Szyszka, R., Palen, E. and Gasior, E. (1980) Evidence for a highly specific protein kinase phosphorylating two strongly acidic proteins of yeast 60 S ribosomal subunit. *Biochim Biophys Acta*, **633**(3): 376-385.
86. Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S. and Snyder, M. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev*, **16**(6): 707-719.
87. Lake, J.A. (1976) Ribosome structure determined by electron microscopy of Escherichia coli small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J Mol Biol*, **105**(1): 131-139.
88. Lake, J.A., Henderson, E., Clark, M.W. and Matheson, A.T. (1982) Mapping evolution with ribosome structure: intralineaage constancy and interlineage variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**(19): 5948-5952.
89. Lalioti, V.S., Perez-Fernandez, J., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2002) Characterization of interaction sites in the Saccharomyces cerevisiae ribosomal stalk components. *Mol Microbiol*, **46**(3): 719-729.
90. Lam, K.B. and Marmur, J. (1977) Isolation and characterization of Saccharomyces cerevisiae glycolytic pathway mutants. *J Bacteriol*, **130**(2): 746-749.
91. Lavergne, J.P., Marzouki, A., Reboud, J.P. and Reboud, A.M. (1988) Topography and stoichiometry of acidic phosphoproteins in rat liver 60 S ribosomal subunit. *FEBS Lett*, **232**(1): 29-34.
92. Leijonmarck, M., Eriksson, S. and Liljas, A. (1980) Crystal structure of a ribosomal component at 2.6 Å resolution. *Nature*, **286**(5775): 824-826.
93. Levin, M.J., Vazquez, M., Kaplan, D. and Schijman, A.G. (1993) The Trypanosoma cruzi ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitol Today*, **9**(10): 381-384.
94. Li, A.M., Watson, A. and Fridovich-Keil, J.L. (2003) Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res*, **31**(7): 1830-1837.
95. Lin, A., Wittmann-Liebold, B., McNally, J. and Wool, I.G. (1982) The primary structure of the acidic phosphoprotein P2 from rat liver 60 S ribosomal subunits.

- Comparison with ribosomal 'A' proteins from other species. *J Biol Chem*, **257**(15): 9189-9197.
96. Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M. and Yates, J.R., 3rd. (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, **17**(7): 676-682.
 97. MacConnell, W.P. and Kaplan, N.O. (1980) The role of ethanol extractable proteins from the 80S rat liver ribosome. *Biochem Biophys Res Commun*, **92**(1): 46-52.
 98. Mager, W.H., Planta, R.J., Ballesta, J.G., Lee, J.C., Mizuta, K., Suzuki, K., Warner, J.R. and Woolford, J. (1997) A new nomenclature for the cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **25**(24): 4872-4875.
 99. Maki, Y., Hashimoto, T., Zhou, M., Naganuma, T., Ohta, J., Nomura, T., Robinson, C.V. and Uchiumi, T. (2007) Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J Biol Chem*, **282**(45): 32827-32833.
 100. Marquis, D.M., Fahnestock, S.R., Henderson, E., Woo, D., Schwinge, S., Clark, M.W. and Lake, J.A. (1981) The L7/L12 stalk, a conserved feature of the prokaryotic ribosome, is attached to the large subunit through its N terminus. *J Mol Biol*, **150**(1): 121-132.
 101. McAlister, L. and Holland, M.J. (1982) Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J Biol Chem*, **257**(12): 7181-7188.
 102. McAlister, L. and Holland, M.J. (1985) Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem*, **260**(28): 15019-15027.
 103. Mead, D.A., Pey, N.K., Herrstadt, C., Marcil, R.A. and Smith, L.M. (1991) A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechnology (N Y)*, **9**(7): 657-663.
 104. Mitsui, K., Motizuki, M., Endo, Y., Yokota, S. and Tsurugi, K. (1987) Characterization of a novel acidic protein of 38 kDa, A0, in yeast ribosomes which immunologically cross-reacts with the 13 kDa acidic ribosomal proteins, A1/A2. *J Biochem*, **102**(6): 1565-1570.
 105. Mitsui, K., Nakagawa, T. and Tsurugi, K. (1988) On the size and the role of a free cytosolic pool of acidic ribosomal proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem*, **104**(6): 908-911.
 106. Mitsui, K., Nakagawa, T. and Tsurugi, K. (1989) The gene and the primary structure of acidic ribosomal protein A0 from yeast *Saccharomyces cerevisiae* which shows partial homology to bacterial ribosomal protein L10. *J Biochem*, **106**(2): 223-227.
 107. Mitsui, K. and Tsurugi, K. (1988) cDNA and deduced amino acid sequence of acidic ribosomal protein A1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **16**(8): 3574.
 108. Moller, W. (1991) Functional aspects of ribosomal proteins. *Biochimie*, **73**(7-8): 1093-1100.
 109. Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2003) The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu Rev Biochem*, **72**: 813-850.
 110. Munshi, R., Kandl, K.A., Carr-Schmid, A., Whitacre, J.L., Adams, A.E. and Kinzy, T.G. (2001) Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. *Genetics*, **157**(4): 1425-1436.
 111. Naganuma, T., Shiogama, K. and Uchiumi, T. (2007) The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center. *Genes Cells*, **12**(4): 501-510.

112. Newton, C.H., Shimmin, L.C., Yee, J. and Dennis, P.P. (1990) A family of genes encode the multiple forms of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins equivalent to the *Escherichia coli* L12 protein and a single form of the L10-equivalent ribosomal protein. *J Bacteriol*, **172**(2): 579-588.
113. Nissan, T.A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J*, **21**(20): 5539-5547.
114. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**(5481): 920-930.
115. Nomura, T., Nakatsuchi, M., Sugita, D., Nomura, M., Kaminishi, T., Takemoto, C., Shirouzu, M., Miyoshi, T., Yokoyama, S., Hachimori, A. and Uchiumi, T. (2008) Biochemical evidence for the heptameric complex L10(L12)6 in the *Thermus thermophilus* ribosome: in vitro analysis of its molecular assembly and functional properties. *J Biochem*.
116. Nusspaumer, G., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2000) Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. *EMBO J*, **19**(22): 6075-6084.
117. Payo, J.M. (1993) Análisis de la expresión de los genes que codifican las proteínas ácidas ribosómicas de *S. cerevisiae* mediante fusiones con el gen lacZ. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
118. Payo, J.M., Santana-Roman, H., Remacha, M., Ballesta, J.P. and Zinker, S. (1995) Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain. *Biochemistry*, **34**(24): 7941-7948.
119. Perez-Fernandez, J., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2005) The acidic protein binding site is partially hidden in the free *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk protein P0. *Biochemistry*, **44**(14): 5532-5540.
120. Perez-Mendez, A., Aguilar, R., Briones, E. and Sanchez de Jimenez, E. (1993) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Sci*, **94**: 71-79.
121. Pettersson, I., Hardy, S.J. and Liljas, A. (1976) The ribosomal protein L8 is a complex L7/L12 and L10. *FEBS Lett*, **64**(1): 135-138.
122. Pettersson, I. and Liljas, A. (1979) The stoichiometry and reconstitution of a stable protein complex from *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett*, **98**(1): 139-144.
123. Pilecki, M., Grankowski, N., Jacobs, J. and Gasior, E. (1992) Specific protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae* cells phosphorylating 60S ribosomal proteins. *Eur J Biochem*, **206**(1): 259-267.
124. Planta, R.J. and Mager, W.H. (1998) The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**(5): 471-477.
125. Prieto, J., Candel, E. and Coloma, A. (1991) Nucleotide sequence of a cDNA encoding ribosomal protein P0 in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*, **19**(6): 1342.
126. Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R.R., Schmidt, M.C., Rachidi, N., Lee, S.J., Mah, A.S., Meng, L., Stark, M.J., Stern, D.F., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P.F. and Snyder, M. (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, **438**(7068): 679-684.
127. Qian, S., Zhang, J.Y., Kay, M.A. and Jacobs-Lorena, M. (1987) Structural analysis of the *Drosophila* rpA1 gene, a member of the eucaryotic 'A' type ribosomal protein family. *Nucleic Acids Res*, **15**(3): 987-1003.

128. Qiu, D. (2004) Study of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk interactions with other ribosomal components using chemical cross-linking. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
129. Qiu, D., Parada, P., Marcos, A.G., Cardenas, D., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2006) Different roles of P1 and P2 *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins revealed by cross-linking. *Mol Microbiol*, **62**(4): 1191-1202.
130. Ramagopal, S. (1976) Accumulation of free ribosomal proteins S1, L7, and L12 in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, **69**(1): 289-297.
131. Ramagopal, S. and Subramanian, A.R. (1974) Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**(5): 2136-2140.
132. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**(4): 557-572.
133. Rawat, U.B., Zavialov, A.V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R.A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M. and Frank, J. (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature*, **421**(6918): 87-90.
134. Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Bermejo, B., Rodriguez-Gabriel, M.A., Guarinos, E. and Ballesta, J.P. (1995) Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**(9): 4754-4762.
135. Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodriguez Gabriel, M.A., Guarinos, E. and Ballesta, J.P. (1995) Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol*, **73**(11-12): 959-968.
136. Remacha, M., Saenz-Robles, M.T., Vilella, M.D. and Ballesta, J.P. (1988) Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **263**(19): 9094-9101.
137. Remacha, M., Santos, C. and Ballesta, J.P. (1990) Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**(5): 2182-2190.
138. Remacha, M., Santos, C., Bermejo, B., Naranda, T. and Ballesta, J.P. (1992) Stable binding of the eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for in vivo protein synthesis. *J Biol Chem*, **267**(17): 12061-12067.
139. Rich, B.E. and Steitz, J.A. (1987) Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol Cell Biol*, **7**(11): 4065-4074.
140. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, **17**(10): 1030-1032.
141. Roberts, T.M., Kobor, M.S., Bastin-Shanower, S.A., Ii, M., Horte, S.A., Gin, J.W., Emili, A., Rine, J., Brill, S.J. and Brown, G.W. (2006) Slx4 regulates DNA damage checkpoint-dependent phosphorylation of the BRCT domain protein Rtt107/Esc4. *Mol Biol Cell*, **17**(1): 539-548.
142. Rodriguez-Gabriel, M.A., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (1998) Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry*, **37**(47): 16620-16626.
143. Rodriguez-Gabriel, M.A., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2000) The RNA interacting domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. *J Biol Chem*, **275**(3): 2130-2136.

144. Sachs, A.B. and Davis, R.W. (1989) The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell*, **58**(5): 857-867.
145. Saenz-Robles, M.T., Remacha, M., Vilella, M.D., Zinker, S. and Ballesta, J.P. (1990) The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta*, **1050**(1-3): 51-55.
146. Sagliocco, F.A., Vega Laso, M.R., Zhu, D., Tuite, M.F., McCarthy, J.E. and Brown, A.J. (1993) The influence of 5'-secondary structures upon ribosome binding to mRNA during translation in yeast. *J Biol Chem*, **268**(35): 26522-26530.
147. Sambrook, J. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition ed.
148. Sanchez-Madrid, F., Conde, P., Vazquez, D. and Ballesta, J.P. (1979) Acidic proteins from *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, **87**(1): 281-291.
149. Sanchez-Madrid, F., Reyes, R., Conde, P. and Ballesta, J.P. (1979) Acidic ribosomal proteins from eukaryotic cells. Effect on ribosomal functions. *Eur J Biochem*, **98**(2): 409-416.
150. Sanchez-Madrid, F., Vidales, F.J. and Ballesta, J.P. (1981) Effect of phosphorylation on the affinity of acidic proteins from *Saccharomyces cerevisiae* for the ribosomes. *Eur J Biochem*, **114**(3): 609-613.
151. Sandermann, J., Kruger, A. and Kristiansen, K. (1979) Characterization of acidic 60 S ribosomal proteins in *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Lett*, **107**(2): 343-347.
152. Santos, C. and Ballesta, J.P. (1994) Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem*, **269**(22): 15689-15696.
153. Santos, C. and Ballesta, J.P. (1995) The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *J Biol Chem*, **270**(35): 20608-20614.
154. Santos, C. and Ballesta, J.P. (2005) Characterization of the 26S rRNA-binding domain in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk phosphoprotein P0. *Mol Microbiol*, **58**(1): 217-226.
155. Santos, C., Ortiz-Reyes, B., Naranda, T., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (1993) The acidic phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes. NH₂-terminal acetylation is a conserved difference between P1 and P2 proteins. *Biochemistry*, **32**(16): 4231-4236.
156. Santos, C., Rodriguez-Gabriel, M.A., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2004) Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of antifungal sordarin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(8): 2930-2936.
157. Scharf, K.D. and Nover, L. (1987) Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat shock conditions. II. Ribosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, **909**(1): 44-57.
158. Schijman, A.G. and Levin, M.J. (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P0 protein: a novel C-terminal domain in *T. cruzi* ribosomal P proteins. *Nucleic Acids Res*, **20**(11): 2894.
159. Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P. and Frank, J. (2004) Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol*, **11**(10): 957-962.
160. Shimizu, T., Nakagaki, M., Nishi, Y., Kobayashi, Y., Hachimori, A. and Uchiumi, T. (2002) Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for

- functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA. *Nucleic Acids Res*, **30**(12): 2620-2627.
161. Shimmin, L.C., Ramirez, C., Matheson, A.T. and Dennis, P.P. (1989) Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from archaebacteria, eubacteria, and eucaryotes. *J Mol Evol*, **29**(5): 448-462.
162. Shor, B., Calaycay, J., Rushbrook, J. and McLeod, M. (2003) Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **278**(49): 49119-49128.
163. Skeiky, Y.A., Benson, D.R., Parsons, M., Elkon, K.B. and Reed, S.G. (1992) Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* ribosomal protein P0 and epitope analysis of anti-P0 autoantibodies in Chagas' disease patients. *J Exp Med*, **176**(1): 201-211.
164. Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G. and Frank, J. (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*, **107**(3): 373-386.
165. Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jorgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P. and Frank, J. (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J*, **23**(5): 1008-1019.
166. Spirin, A.S. (2002) Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett*, **514**(1): 2-10.
167. Stark, H., Rodnina, M.V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W. and van Heel, M. (1997) Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature*, **389**(6649): 403-406.
168. Strycharz, W.A., Nomura, M. and Lake, J.A. (1978) Ribosomal proteins L7/L12 localized at a single region of the large subunit by immune electron microscopy. *J Mol Biol*, **126**(2): 123-140.
169. Subramanian, A.R. (1974) Absence of exchange by ribosomal proteins in extracts of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **374**(3): 400-406.
170. Subramanian, A.R. (1975) Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity of the large subunit of *Escherichia coli* ribosome. *J Mol Biol*, **95**(1): 1-8.
171. Szick, K., Springer, M. and Bailey-Serres, J. (1998) Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(5): 2378-2383.
172. Szyszka, R., Boguszewska, A., Grankowski, N. and Ballesta, J.P. (1995) Differential phosphorylation of ribosomal acidic proteins from yeast cell by two endogenous protein kinases: casein kinase-2 and 60S kinase. *Acta Biochim Pol*, **42**(3): 357-362.
173. Szyszka, R., Bou, G. and Ballesta, J.P. (1996) RAP kinase, a new enzyme phosphorylating the acidic P proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1293**(2): 213-221.
174. Tchorzewski, M., Boguszewska, A., Dukowski, P. and Grankowski, N. (2000) Oligomerization properties of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of P1A protein phosphorylation on the formation of the P1A-P2B hetero-complex. *Biochim Biophys Acta*, **1499**(1-2): 63-73.
175. Tchorzewski, M., Boldyreff, B., Issinger, O. and Grankowski, N. (2000) Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**(7): 737-746.
176. Tchorzewski, M., Krokowski, D., Boguszewska, A., Liljas, A. and Grankowski, N. (2003) Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry*, **42**(12): 3399-3408.

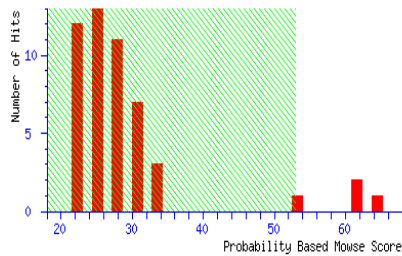
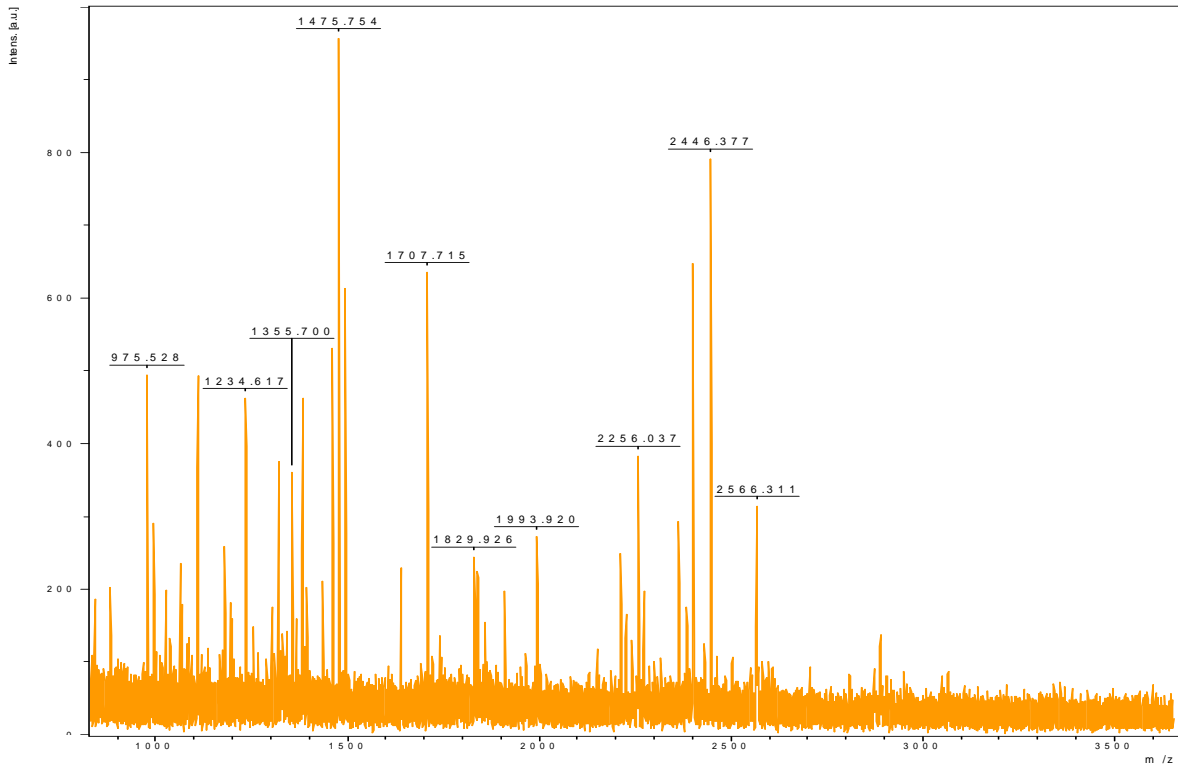
177. Tchorzewski, M., Krokowski, D., Rzeski, W., Issinger, O.G. and Grankowski, N. (2003) The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**(2): 203-211.
178. Tharun, S. and Parker, R. (2001) Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol Cell*, **8**(5): 1075-1083.
179. Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**(4): 619-630.
180. Towbin, H., Ramjoue, H.P., Kuster, H., Liverani, D. and Gordon, J. (1982) Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. *J Biol Chem*, **257**(21): 12709-12715.
181. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9): 4350-4354.
182. Tsurugi, K., Collatz, E., Todokoro, K., Ulbrich, N., Lightfoot, H.N. and Wool, I.G. (1978) Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunit proteins La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20, and L38. *J Biol Chem*, **253**(3): 946-955.
183. Tsurugi, K. and Mitsui, K. (1991) Bilateral hydrophobic zipper as a hypothetical structure which binds acidic ribosomal protein family together on ribosomes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **174**(3): 1318-1323.
184. Tsurugi, K. and Ogata, K. (1985) Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. *J Biochem*, **98**(6): 1427-1431.
185. Uchiumi, T. and Kominami, R. (1992) Direct evidence for interaction of the conserved GTPase domain within 28 S RNA with mammalian ribosomal acidic phosphoproteins and L12. *J Biol Chem*, **267**(27): 19179-19185.
186. Uchiumi, T. and Kominami, R. (1997) Binding of mammalian ribosomal protein complex P0.P1.P2 and protein L12 to the GTPase-associated domain of 28 S ribosomal RNA and effect on the accessibility to anti-28 S RNA autoantibody. *J Biol Chem*, **272**(6): 3302-3308.
187. Uchiumi, T., Wahba, A.J. and Traut, R.R. (1987) Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(16): 5580-5584.
188. Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**(6770): 623-627.
189. Valerius, O., Kleinschmidt, M., Rachfall, N., Schulze, F., Lopez Marin, S., Hoppert, M., Streckfuss-Bomeke, K., Fischer, C. and Braus, G.H. (2007) The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol Cell Proteomics*, **6**(11): 1968-1979.
190. van Agthoven, A., Kriek, J., Amons, R. and Moller, W. (1978) Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60-S ribosomes from *Artemia salina* and rat liver. *Eur J Biochem*, **91**(2): 553-565.
191. van Agthoven, A.J., Maassen, J.A. and Moller, W. (1977) Structure and phosphorylation of an acidic protein from 60S ribosomes and its involvement in

- elongation factor-2 dependent GTP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **77**(3): 989-998.
192. Vard, C., Guillot, D., Bargis, P., Lavergne, J.P. and Reboud, J.P. (1997) A specific role for the phosphorylation of mammalian acidic ribosomal protein P2. *J Biol Chem*, **272**(32): 20259-20262.
193. Vasiliev, V.D. (1974) Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data. *Acta Biol Med Ger*, **33**(5-6): 779-793.
194. Vasiliev, V.D., Selivanova, O.M. and Ryazantsev, S.N. (1983) Structure of the Escherichia coli 50 S ribosomal subunit. *J Mol Biol*, **171**(4): 561-569.
195. Verschoor, A., Warner, J.R., Srivastava, S., Grassucci, R.A. and Frank, J. (1998) Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucleic Acids Res*, **26**(2): 655-661.
196. Vidales, F.J., Robles, M.T. and Ballesta, J.P. (1984) Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of phosphorylation. *Biochemistry*, **23**(2): 390-396.
197. Vilella, M.D., Remacha, M., Ortiz, B.L., Mendez, E. and Ballesta, J.P. (1991) Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies. Proteins L44/L45 and L44' have different functional roles. *Eur J Biochem*, **196**(2): 407-414.
198. Wahl, M.C., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. and Huber, R. (2000) Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12. *EMBO J*, **19**(2): 174-186.
199. Wahl, M.C. and Moller, W. (2002) Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr Protein Pept Sci*, **3**(1): 93-106.
200. Warner, J.R. (1989) Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **53**(2): 256-271.
201. Wigboldus, J.D. (1987) cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* rp21C, another 'A'-type ribosomal protein. *Nucleic Acids Res*, **15**(23): 10064.
202. Won, M., Park, S.K., Hoe, K.L., Jang, Y.J., Chung, K.S., Kim, D.U., Kim, H.B. and Yoo, H.S. (2001) Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**(1): 10-15.
203. Wool, I.G., Chan, Y.L., Gluck, A. and Suzuki, K. (1991) The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie*, **73**(7-8): 861-870.
204. Woolford, J.L. and Warner, J.R. (1991) "The ribosome and its synthesis" in *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: genome dynamics, protein synthesis and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 587-626.
205. Yacoub, A., Kelley, M.R. and Deutsch, W.A. (1996) *Drosophila* ribosomal protein PO contains apurinic/aprimidinic endonuclease activity. *Nucleic Acids Res*, **24**(21): 4298-4303.
206. Yonath, A., Leonard, K.R. and Wittmann, H.G. (1987) A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science*, **236**(4803): 813-816.
207. Zambrano, R., Briones, E., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (1997) Phosphorylation of the acidic ribosomal P proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: a reappraisal. *Biochemistry*, **36**(47): 14439-14446.
208. Zeller, C.E., Parnell, S.C. and Dohlman, H.G. (2007) The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem*, **282**(34): 25168-25176.

-
209. Zinker, S. (1980) P5/P5' the acidic ribosomal phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **606**(1): 76-82.
 210. Zinker, S. and Warner, J.R. (1976) The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J Biol Chem*, **251**(6): 1799-1807.
 211. Zurdo, J., Gonzalez, C., Sanz, J.M., Rico, M., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2000) Structural differences between *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins P1 and P2 support their functional diversity. *Biochemistry*, **39**(30): 8935-8943.
 212. Zurdo, J., Parada, P., van den Berg, A., Nusspaumer, G., Jimenez-Diaz, A., Remacha, M. and Ballesta, J.P. (2000) Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk: binding of P1 proteins is required for the interaction of P2 proteins. *Biochemistry*, **39**(30): 8929-8934.
 213. Zurdo, J., Sanz, J.M., Gonzalez, C., Rico, M. and Ballesta, J.P. (1997) The exchangeable yeast ribosomal acidic protein YP2beta shows characteristics of a partly folded state under physiological conditions. *Biochemistry*, **36**(31): 9625-9635.

ANEXO I
Resultados de espectrometría de masas

Mancha # 2: Factor de elongación EF-1α (Tef1p)



Protein Summary Report

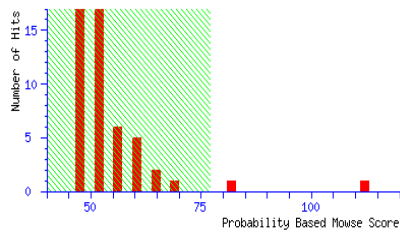
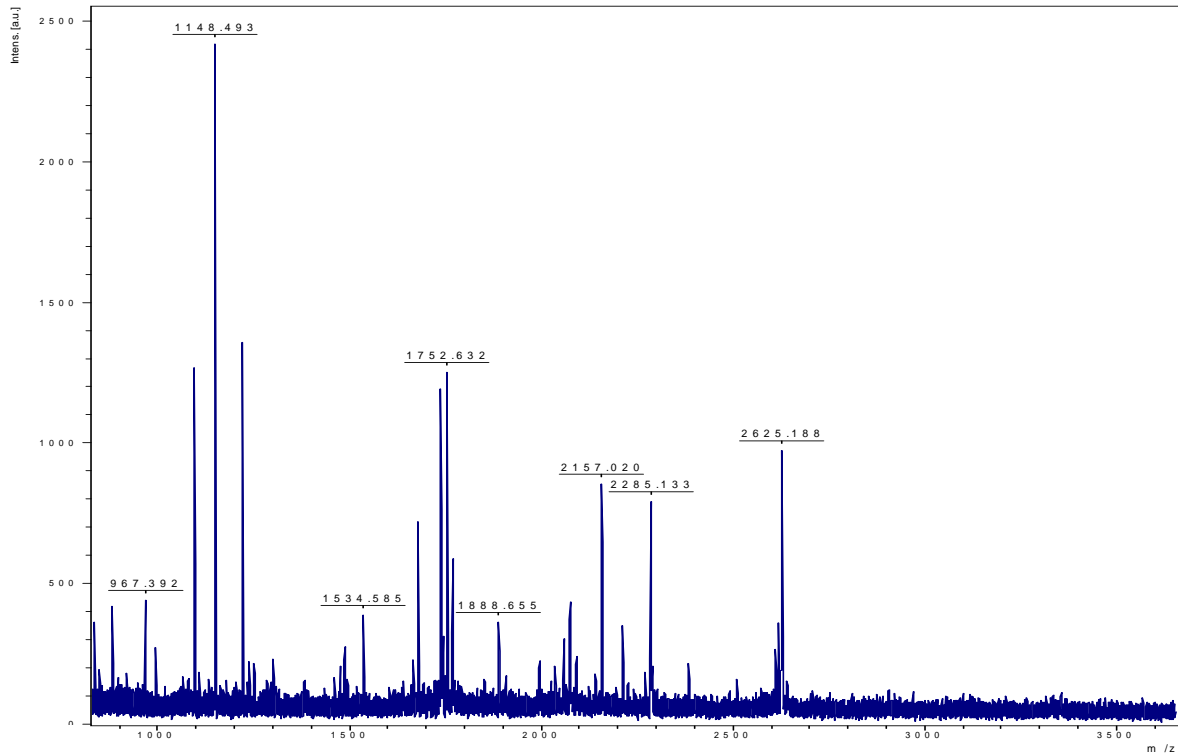
Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|--------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 32693293 | 40225 | 64 | translation elongation factor 1-alpha [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 2. gi 32693297 | 41203 | 63 | translation elongation factor 1-alpha [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 3. gi 32563244 | 41199 | 63 | translation elongation factor 1-alpha [<i>Saccharomyces cariocamus</i>] |
| 4. gi 1230686 | 50001 | 54 | Tef1p: Elongation factor 1-alpha [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 5. gi 6325101 | 31993 | 34 | Pheromone-regulated protein, predicted to have 1 transmembrane segment; transcriptionally regulated by Ste12p during mating and by C- |
| 6. gi 6319725 | 61030 | 32 | Imidazole glycerol phosphate synthase (glutamine amidotransferase:cyclase), catalyzes the fifth and sixth steps of histidine biosynt |
| 7. gi 395155 | 61044 | 32 | glutamine amidotransferase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 8. gi 33357792 | 61319 | 32 | Chain B, Towards Understanding The Mechanism Of The Complex Cyclization Reaction Catalyzed By Imidazole Glycerophosphate Synthase |
| 9. gi 33357794 | 61311 | 32 | Chain B, Towards Understanding The Mechanism Of The Complex Cyclization Reaction Catalyzed By Imidazole Glycerophosphate Synthase |
| 10. gi 6324825 | 34197 | 32 | catalyzes transfer of the sulfane atom of thiosulfate to cyanide to form sulfite and thiocyanate: Yor251cd [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |

Mancha # 3: Gliceráldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 1 (Tdh1p)



Protein Summary Report

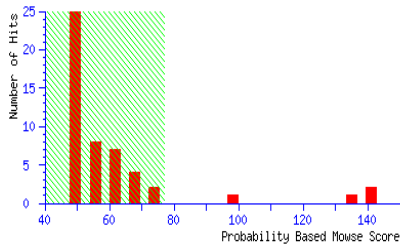
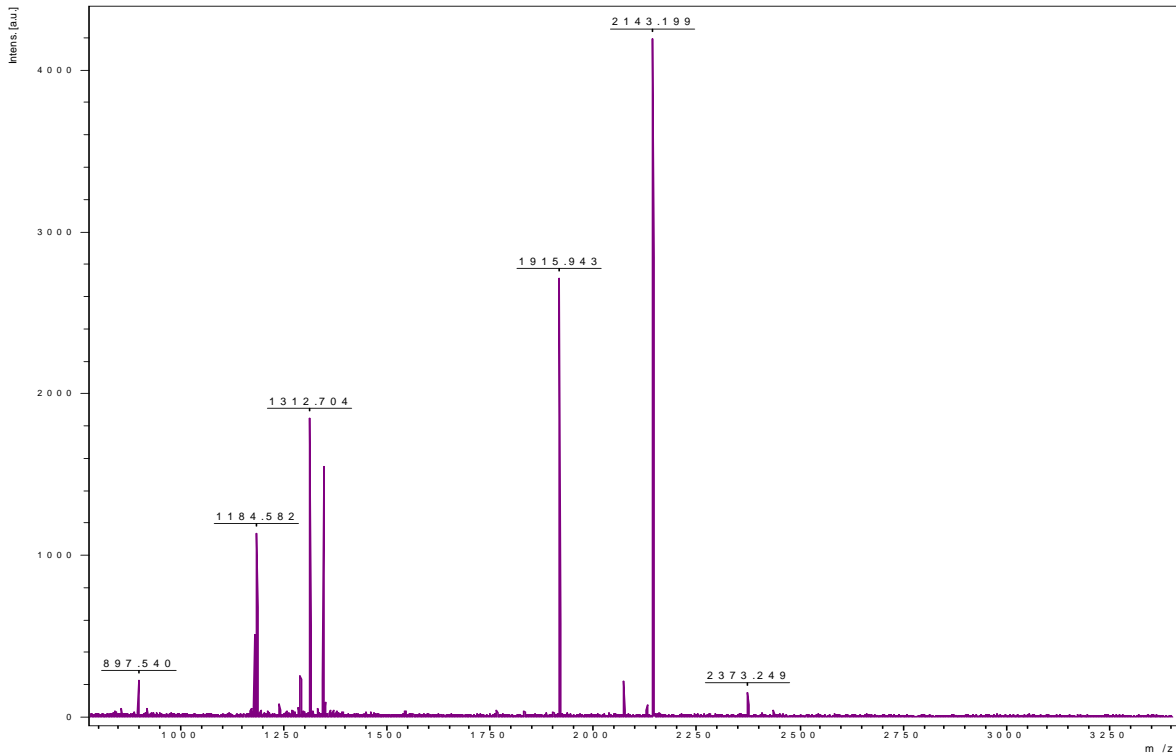
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 6322409 | 35728 | 112 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1, involved in glycolysis and gluconeogenesis; tetramer that catalyzes the reaction |
| 2. gi 3726 | 35662 | 80 | unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae] |
| 3. gi 40890079 | 33690 | 71 | nitrilase [uncultured organism] |
| 4. gi 17936725 | 9330 | 65 | hypothetical protein Atu3014 [Agrobacterium tumefaciens str. C58] |
| 5. gi 57209746 | 10655 | 64 | vacuolar protein sorting 52 (yeast) [Homo sapiens] |
| 6. gi 21593345 | 11021 | 62 | photosystem II [Arabidopsis thaliana] |
| 7. gi 46579345 | 42741 | 61 | sensor histidine kinase [Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris str. Hildenborough] |
| 8. gi 52003791 | 35990 | 61 | conserved hypothetical protein [Bacillus licheniformis ATCC 14580] |
| 9. gi 1465366 | 11066 | 61 | photosystem II [Arabidopsis thaliana] |
| 10. gi 58397748 | 4780 | 59 | cytochrome P450 [Teucrium canadense] |
| 11. gi 16974349 | 28981 | 58 | At1g19700/F6F9 29 [Arabidopsis thaliana] |

Mancha # 4: Fosfoglicerato mutasa (Gpm1p)



Protein Summary Report

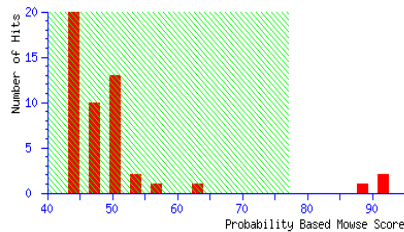
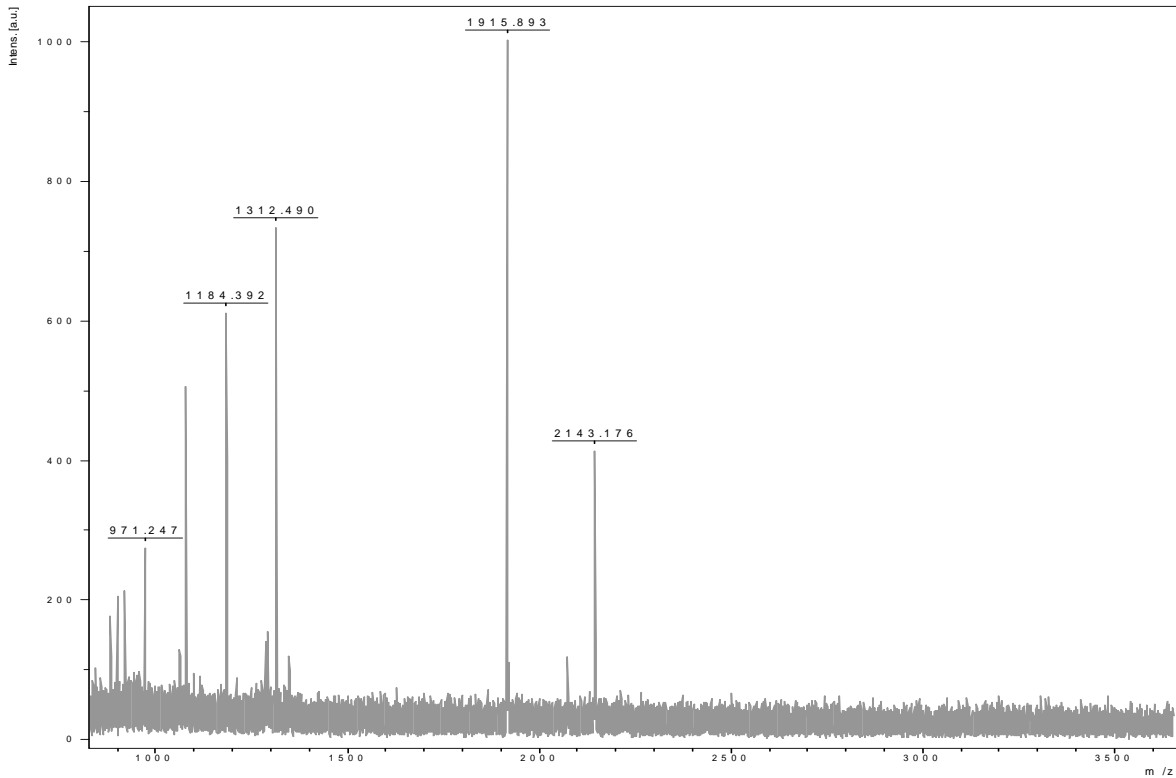
Format As: [Help](#)

Significance threshold p< Max number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 3542363 | 26834 | 141 | Chain B, Yeast Phosphoglycerate Mutase-3pg Complex Structure To 1.7 A |
| 2. gi 1326042 | 27461 | 140 | unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae] |
| 3. gi 6322697 | 27592 | 137 | Tetrameric phosphoglycerate mutase, mediates the conversion of 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate during glycolysis and the rev |
| 4. gi 230910 | 26900 | 98 | Phosphoglycerate Mutase (E.C.2.7.5.3) De-Phospho Enzyme |
| 5. gi 15642923 | 33817 | 72 | fatty acid/phospholipid synthesis protein [Thermotoga maritima MSB8] |
| 6. gi 6685761 | 34588 | 71 | Fatty acid/phospholipid synthesis protein plsX |
| 7. gi 61657348 | 35608 | 71 | fatty acid/phospholipid synthesis protein [Thermotoga naphthophila] |
| 8. gi 61657498 | 35487 | 71 | fatty acid/phospholipid synthesis protein [Thermotoga sp. RQ2] |
| 9. gi 32549141 | 44521 | 66 | bacteriochlorophyll synthase 43 kDa subunit [uncultured archaeon GZfos1D1] |
| 10. gi 22657234 | 38814 | 66 | RNA polymerase alpha subunit [Aegilops uniaristata] |
| 11. gi 47219055 | 5110 | 65 | unnamed protein product [Tetraodon niroviridis] |

Mancha # 5: Fosfoglicerato mutasa (Gpm1p)



Protein Summary Report

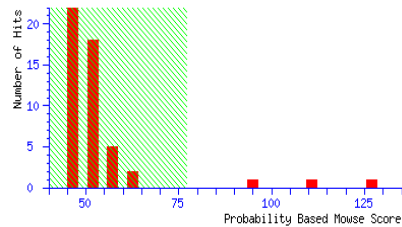
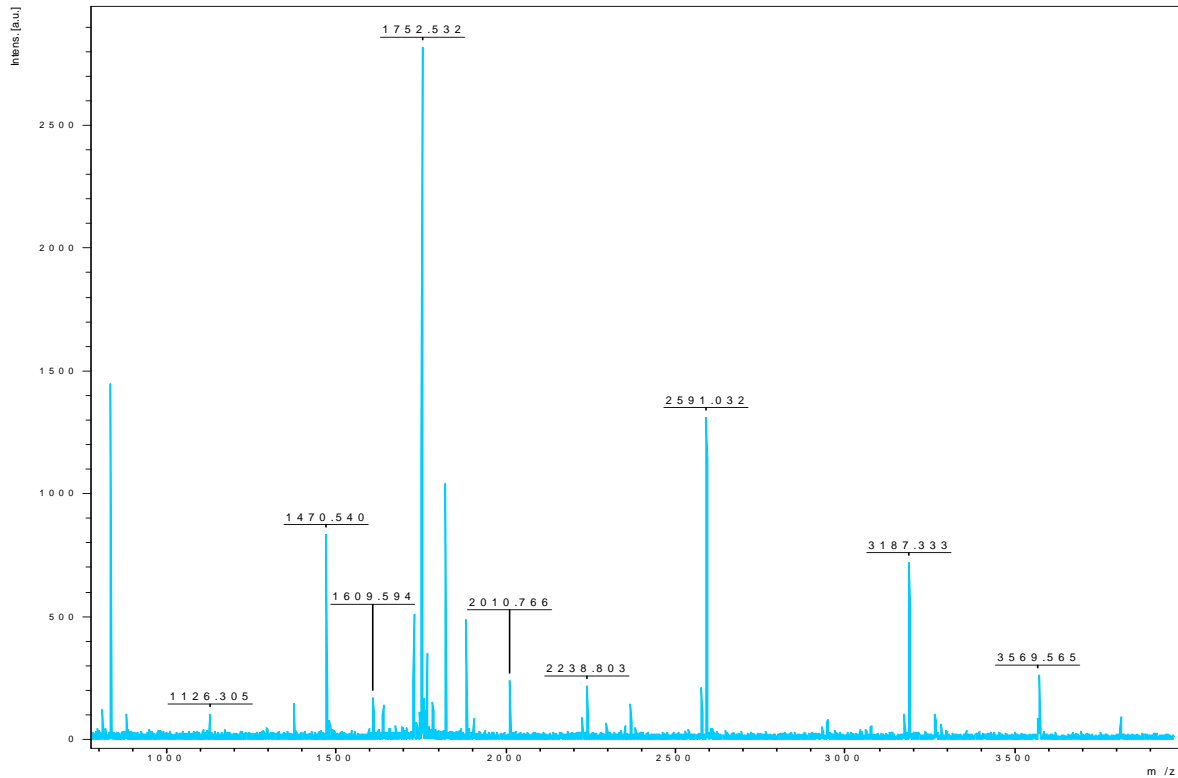
Format As [Help](#)

Significance threshold p< Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 5542363 | 26834 | 92 | Chain B, Yeast Phosphoglycerate Mutase-3pg Complex Structure To 1.7 A |
| 2. gi 1326042 | 27461 | 91 | unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae] |
| 3. gi 6322697 | 27592 | 89 | Tetrameric phosphoglycerate mutase, mediates the conversion of 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate during glycolysis and the |
| 4. gi 230910 | 26900 | 64 | Phosphoglycerate Mutase (E.C.2.7.5.3) De-Phospho Enzyme |
| 5. gi 72607581 | 63862 | 57 | Prolyl-tRNA synthetase, bacterial [Burkholderia ambifaria AMMD] |
| 6. gi 48850666 | 55947 | 54 | COG1961: Site-specific recombinases, DNA invertase Pin homologs [Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444] |
| 7. gi 295355 | 35478 | 53 | peroxidase |
| 8. gi 46226776 | 28042 | 52 | hypothetical protein cgd4_3890 [Cryptosporidium parvum] |
| 9. gi 22096363 | 24725 | 51 | N utilization substance protein B homolog (MusB protein) |
| 10. gi 39597553 | 45199 | 51 | Hypothetical protein CBG03235 [Caenorhabditis briggsae] |
| 11. gi 56543775 | 7945 | 50 | conserved hypothetical protein [Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4] |
| 12. gi 3807460 | 17641 | 50 | PREDICTED: similar to basic transcription factor 3 [Mus musculus] |

Mancha # 6: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3



Protein Summary Report

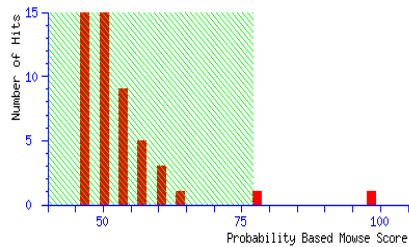
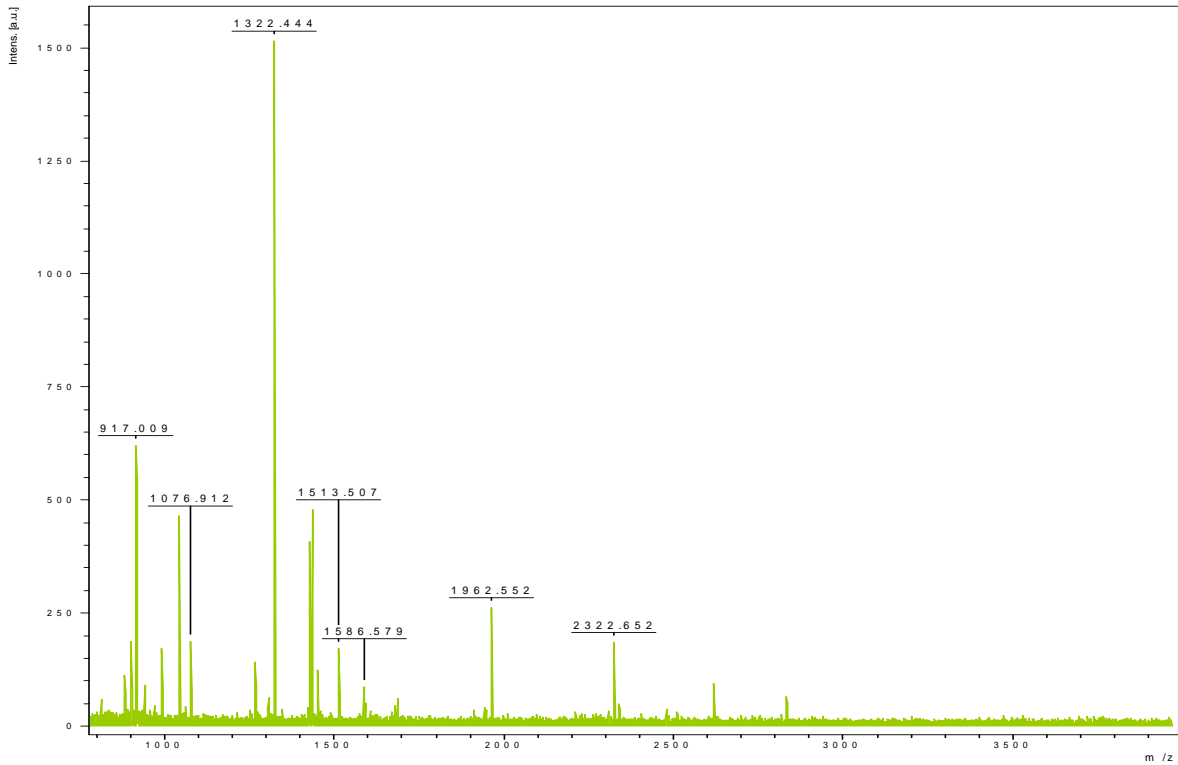
Format As: [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|--------|-------|---|
| 1. gi 6321631 | 35724 | 127 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3, involved in glycolysis and gluconeogenesis; tetramer that catalyzes the reaction |
| 2. gi 45269553 | 35666 | 110 | YGR192C [Saccharomyces cerevisiae] |
| 3. gi 3720 | 35709 | 95 | unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae] |
| 4. gi 2824 | 35302 | 65 | unnamed protein product [Kluyveromyces lactis] |
| 5. gi 3065327 | 3890 | 62 | envelope glycoprotein [Human immunodeficiency virus type 1] |
| 6. gi 30143404 | 13294 | 57 | envelope glycoprotein [Human immunodeficiency virus 1] |
| 7. gi 33860957 | 22847 | 57 | light repressed protein A homolog [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str. CCHP1986] |
| 8. gi 57913073 | 30233 | 56 | ENSANGP00000027631 [Anopheles gambiae str. PEST] |
| 9. gi 56477945 | 73095 | 56 | propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit [Azoarcus sp. EbW1] |
| 10. gi 68191380 | 13953 | 55 | Response regulator receiver [Mesorhizobium sp. ENCI] |
| 11. gi 61812366 | 63684 | 54 | PREDICTED: similar to ZNF529 protein, partial [Bos taurus] |
| 12. gi 71755769 | 104028 | 54 | hypothetical protein Tb11.02.5120 [Trypanosoma brucei] |

Mancha # 7: Proteína requerida para la inducción transcripcional de Ime1p



Protein Summary Report

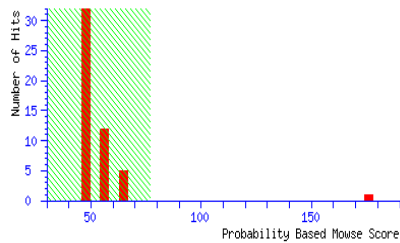
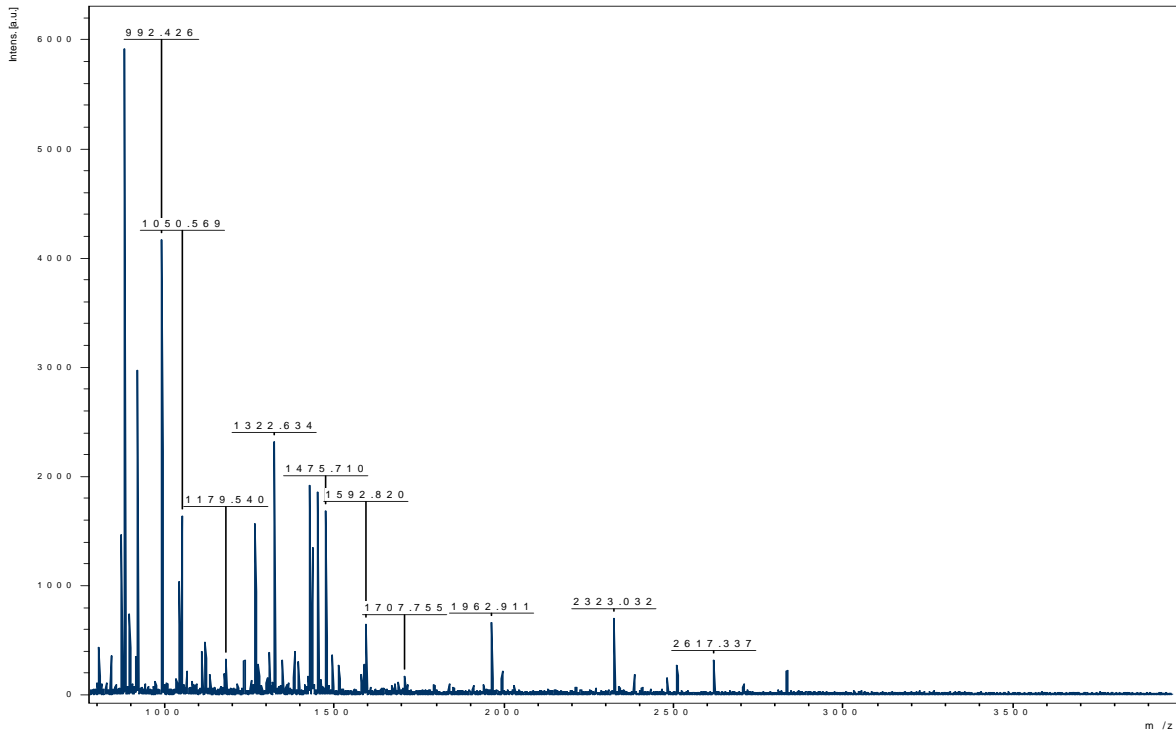
Format As [Help](#)

Significance threshold p< Max. number of hits

Index

| | Accession | Mass | Score | Description |
|-----|-----------------------------|--------|-------|---|
| 1. | gi 6320724 | 55886 | 98 | Non-essential protein of unknown function required for transcriptional induction of the early meiotic-specific transcription fact |
| 2. | gi 29603938 | 47998 | 76 | hypothetical protein [Streptomyces avermitilis MA-4680] |
| 3. | gi 52841088 | 22685 | 62 | hypothetical protein lpg0852 [Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1] |
| 4. | gi 15596104 | 20227 | 61 | hypothetical protein PA0907 [Pseudomonas aeruginosa PA01] |
| 5. | gi 49081578 | 20284 | 60 | PA0907 [synthetic construct] |
| 6. | gi 53134525 | 22853 | 59 | hypothetical protein [Gallus gallus] |
| 7. | gi 21748350 | 121403 | 57 | hypothetical protein Tb10.6k15.0190 [Trypanosoma brucei] |
| 8. | gi 42527945 | 18217 | 56 | hypothetical protein TDE2444 [Treponema denticola ATCC 35405] |
| 9. | gi 3201617 | 41090 | 56 | hypothetical protein [Arabidopsis thaliana] |
| 10. | gi 23821370 | 58485 | 56 | NOU-DARAKE [Dugesia japonica] |

Mancha # 8: Proteína requerida para la inducción transcripcional de Ime1p



Protein Summary Report

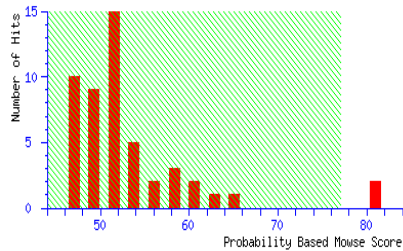
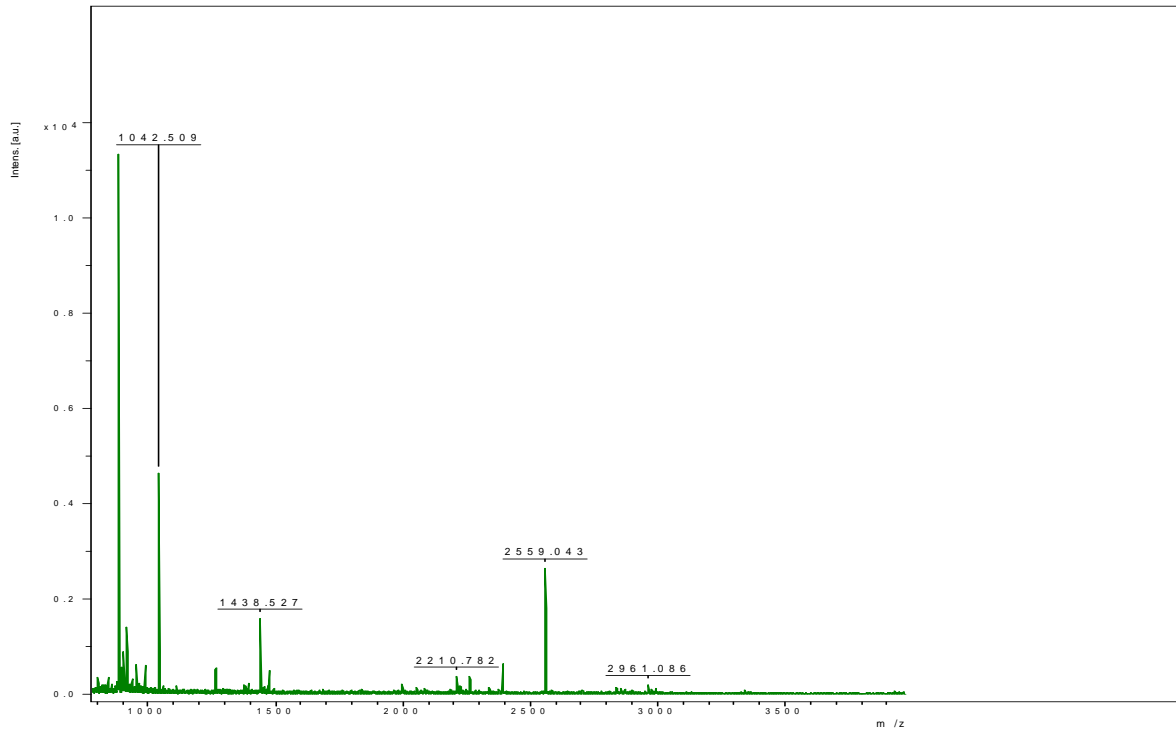
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|--------|-------|---|
| 1. gi 6320724 | 55886 | 176 | Non-essential protein of unknown function required for transcriptional induction of the early meiotic-specific transcription factor : |
| 2. gi 51968736 | 60562 | 67 | unknown protein [Arabidopsis thaliana] |
| 3. gi 7494882 | 60834 | 65 | hypothetical protein B0348.4 - Caenorhabditis elegans |
| 4. gi 1946368 | 46416 | 64 | unknown protein [Arabidopsis thaliana] |
| 5. gi 66826277 | 256278 | 63 | hypothetical protein DDB0190760 [Dictyostelium discoideum] |
| 6. gi 49656627 | 92195 | 61 | unnamed protein product [Debaryomyces hansenii CBS767] |
| 7. gi 21232873 | 44539 | 59 | hypothetical protein XCC3444 [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913] |
| 8. gi 29603938 | 47998 | 58 | hypothetical protein [Streptomyces avermitilis MA-4680] |
| 9. gi 21107304 | 37594 | 58 | conserved hypothetical protein [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306] |
| 10. gi 50591289 | 34280 | 57 | C060202: DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit/40 kD subunit [Streptococcus suis 89/1591] |

Mancha # 9: Proteína ortóloga de Rack1 (Asc1p)



Protein Summary Report

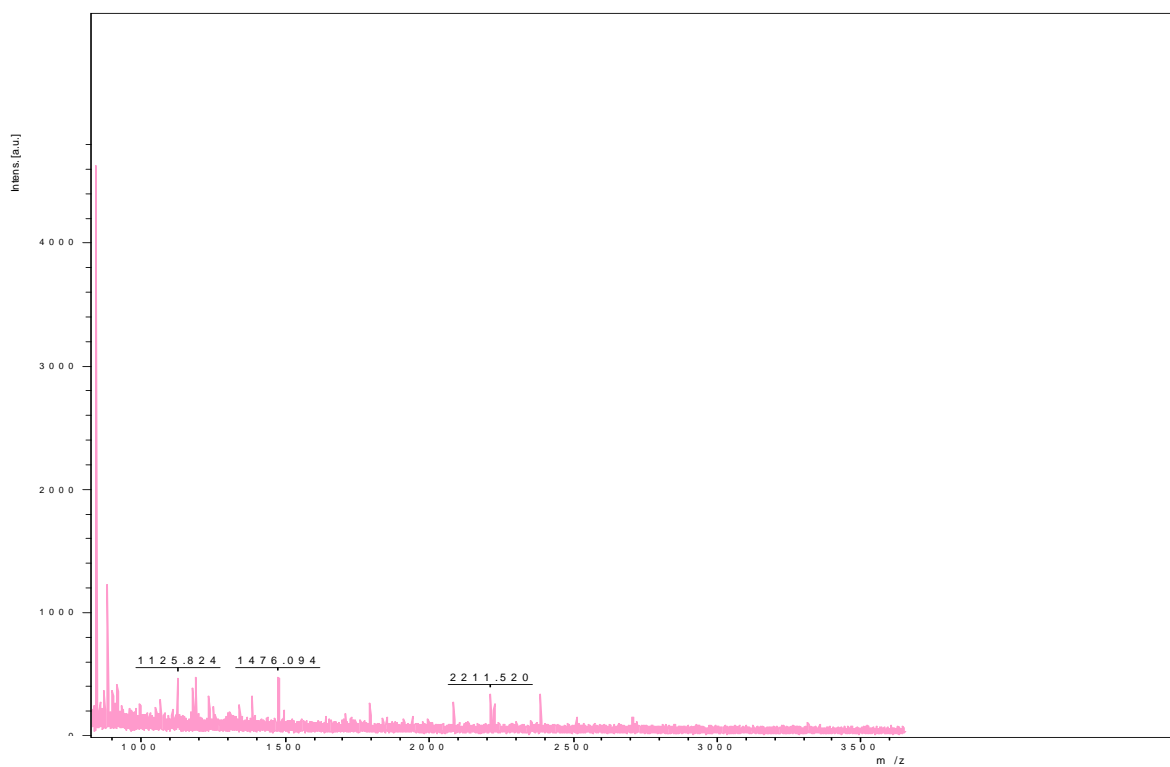
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

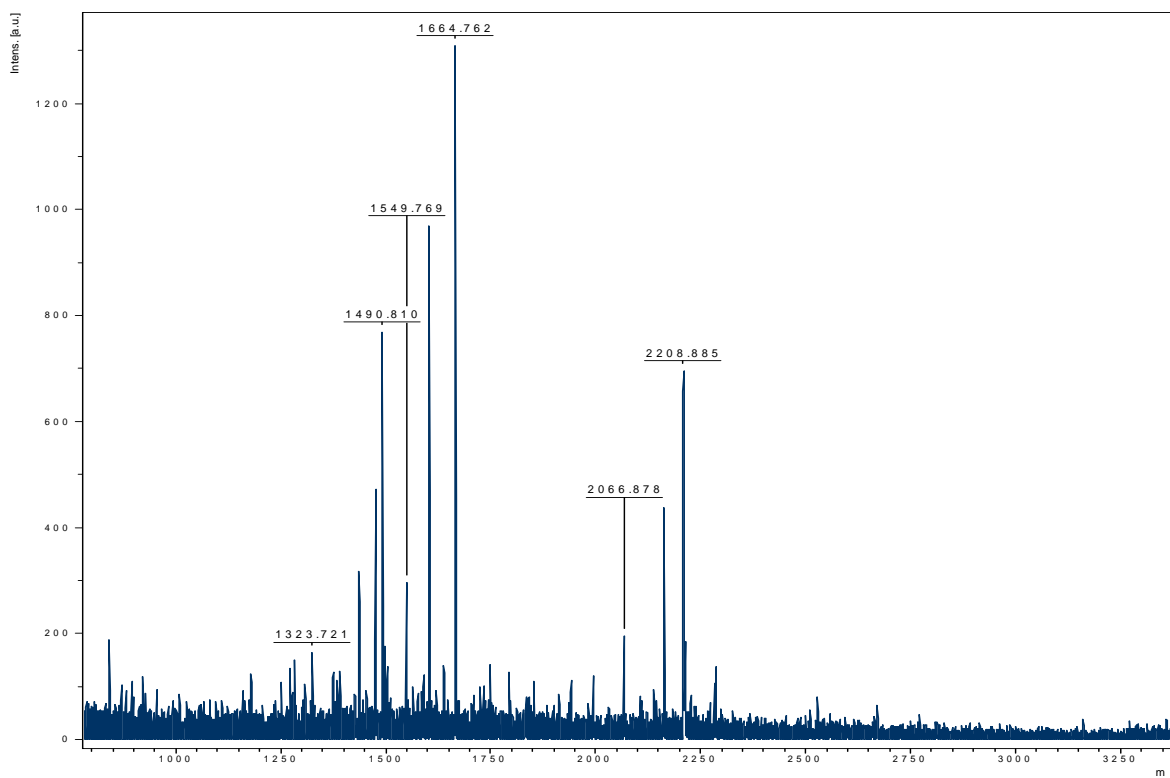
Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|--------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 55670021 | 34267 | 81 | Chain A, Homology Model Of Yeast Rack1 Protein Fitted Into 11.7a Cryo-Em Map Of Yeast 80s Ribosome |
| 2. gi 6323763 | 34784 | 80 | WD repeat protein (G-beta like protein) involved in translation regulation; required for repression of Gcn4p activity in the absence of Gcn5p |
| 3. gi 817875 | 10959 | 64 | unknown [Saccharomyces cerevisiae] |
| 4. gi 42526681 | 30469 | 62 | hypothetical protein TDE1171 [Treponema denticola ATCC 35405] |
| 5. gi 15668665 | 17773 | 61 | hypothetical protein MJ0488 [Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661] |
| 6. gi 68418600 | 29160 | 60 | PREDICTED: similar to patatin-like phospholipase domain containing 2 [Danio rerio] |
| 7. gi 54308819 | 28341 | 59 | putative transposase [Photobacterium profundum S39] |
| 8. gi 66797131 | 81797 | 59 | AAA ATPase, central region:Clp, N terminal:Clp, N terminal [Deinococcus geothermalis DSM 11300] |
| 9. gi 71069290 | 35118 | 59 | paramyosin [Giardia lamblia ATCC 50803] |

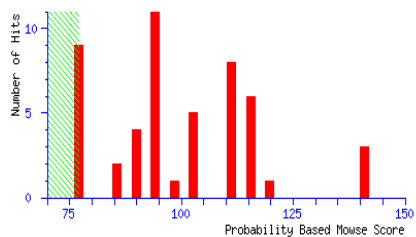
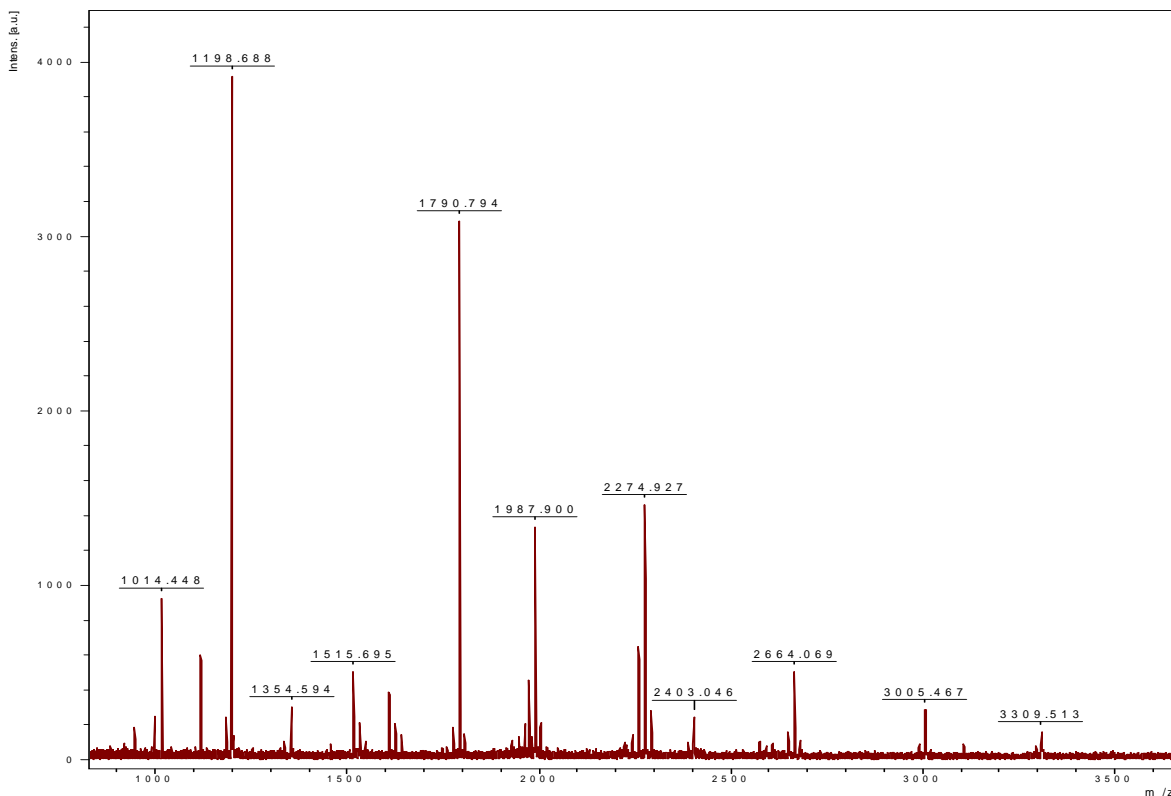
Mancha # 10: No identificada



Mancha 17: No identificada



Mancha # 11: Actina (Act1p)



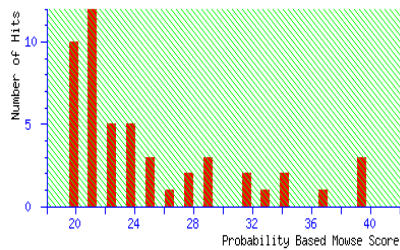
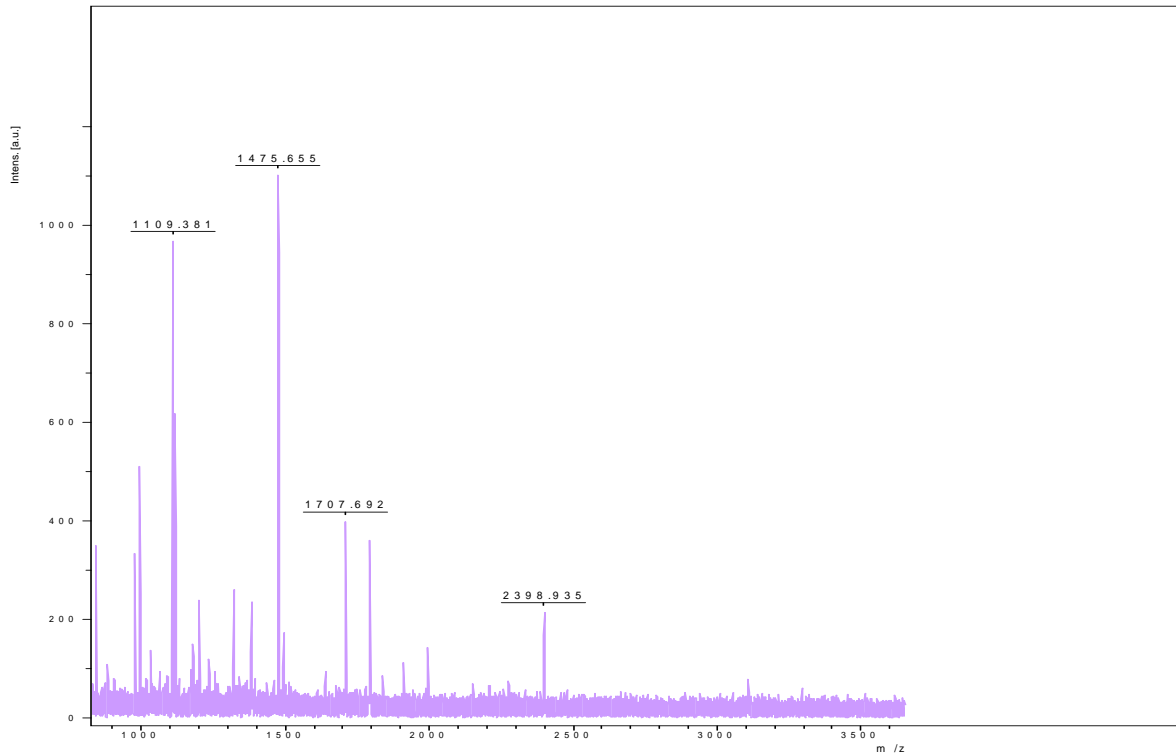
Protein Summary Report

Format As: [Help](#)
 Significance threshold p< Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 49928080 | 40204 | 141 | unnamed protein product [Candida glabrata CBS138] |
| 2. gi 7546413 | 41678 | 139 | Chain A, The Yeast Actin Val 159 Asn Mutant Complex With Human Gelsolin Segment 1 |
| 3. gi 14318479 | 41663 | 139 | Actin, structural protein involved in cell polarization, endocytosis, and other cytoskeletal functions; Act1p [Saccharomyces cerevisiae] |
| 4. gi 49642433 | 41632 | 121 | unnamed protein product [Kluyveromyces lactis NRRL Y-1140] |
| 5. gi 31581432 | 33585 | 114 | actin [Saccharomyces cerevisiae] |
| 6. gi 31581462 | 33593 | 114 | actin [Kluyveromyces sinensis] |
| 7. gi 31581464 | 33577 | 114 | actin [Zygosaccharomyces florentinus] |
| 8. gi 31581466 | 33559 | 114 | actin [Zygosaccharomyces mrakii] |
| 9. gi 31581476 | 33602 | 114 | actin [Candida humilis] |
| 10. gi 31581484 | 33575 | 114 | actin [Kluyveromyces yarrowii] |
| 11. gi 9650775 | 36505 | 111 | actin [Kluyveromyces polysporus] |

Mancha # 12: Actina (Act1p)



Protein Summary Report

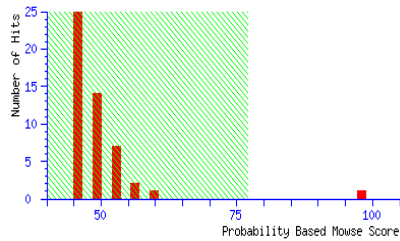
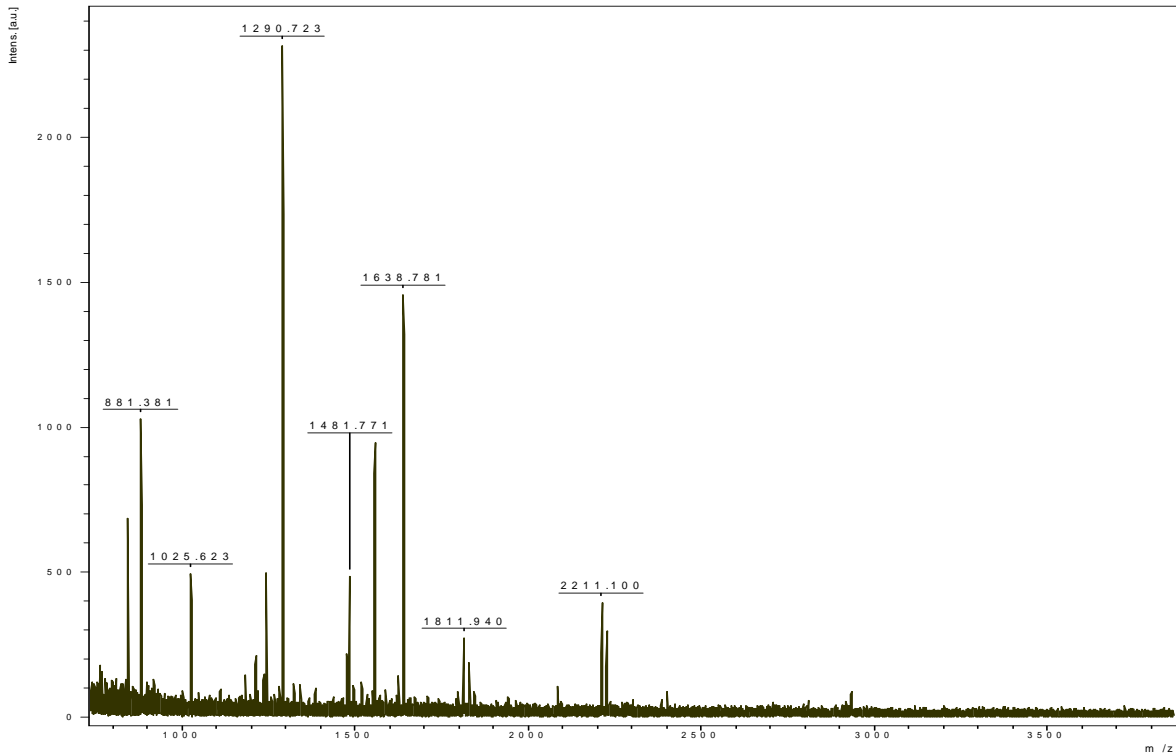
Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Index

| | Accession | Mass | Score | Description |
|-----|-----------------------------|--------|-------|--|
| 1. | gi 7546413 | 41678 | 39 | Chain A, The Yeast Actin Val 159 Asn Mutant Complex With Human Gelsolin Segment 1 |
| 2. | gi 3328 | 41679 | 39 | actin [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 3. | gi 14318479 | 41663 | 39 | Actin, structural protein involved in cell polarization, endocytosis, and other cytoskeletal functions; Act1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 4. | gi 6324899 | 49710 | 36 | Gamma-glutamyl phosphate reductase, catalyzes the second step in proline biosynthesis; Pro2p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 5. | gi 14318532 | 57075 | 34 | Ubiquitin-specific protease situated in the base subcomplex of the 26S proteasome, releases free ubiquitin from branched polyubiquitin |
| 6. | gi 6321265 | 175350 | 34 | 5'-3' exonuclease involved in mRNA decay, evolutionarily conserved component of cytoplasmic processing (P) bodies, plays a role in mRNA surveillance |
| 7. | gi 1301843 | 12528 | 33 | unnamed protein product [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 8. | gi 6320826 | 81064 | 31 | Glycogen branching enzyme, involved in glycogen accumulation; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm |
| 9. | gi 171569 | 81078 | 31 | 1,4-glucan-6-(1,4-glucano)-transferase |
| 10. | gi 51013915 | 38133 | 30 | YPR086W [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |

Mancha # 13: Espermidina sintasa (Spe3p)



Protein Summary Report

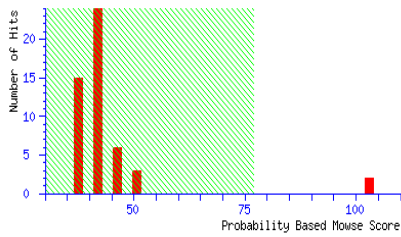
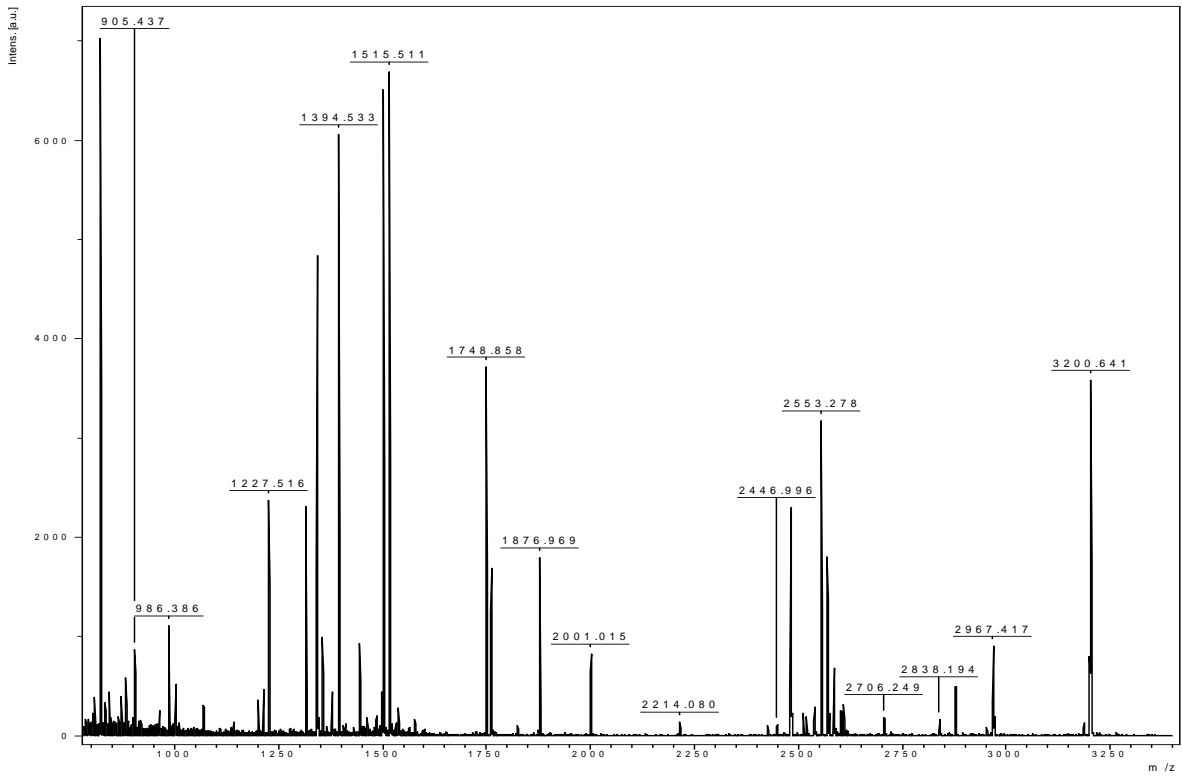
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 1230677 | 33303 | 98 | Spe3p: putrescine aminopropyltransferase(spermidine synthase) [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] |
| 2. gi 34098817 | 89424 | 58 | At2g39930 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] |
| 3. gi 7635787 | 64644 | 56 | probable histone acetyltransferase [<i>Neurospora crassa</i>] |
| 4. gi 30249249 | 15632 | 55 | hypothetical protein NE1269 [<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718] |
| 5. gi 67908611 | 94394 | 54 | Transposase Tn3 [<i>Polaromonas</i> sp. J3666] |
| 6. gi 42554763 | 82542 | 54 | hypothetical protein FG06670.1 [<i>Gibberella zeae</i> PH-1] |
| 7. gi 67664217 | 12330 | 53 | ThiamineS [<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424] |
| 8. gi 68367124 | 52898 | 53 | PREDICTED: similar to RAB GTPase activating protein 1 [<i>Danio rerio</i>] |
| 9. gi 34909628 | 85700 | 52 | P0503C12.13 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] |
| 10. gi 25029153 | 46756 | 52 | adenylosuccinate synthetase [<i>Corynebacterium efficiens</i> Y3-314] |

Mancha # 14: Piruvato quinasa (Pyk1p)



Protein Summary Report

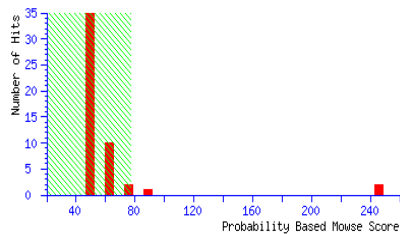
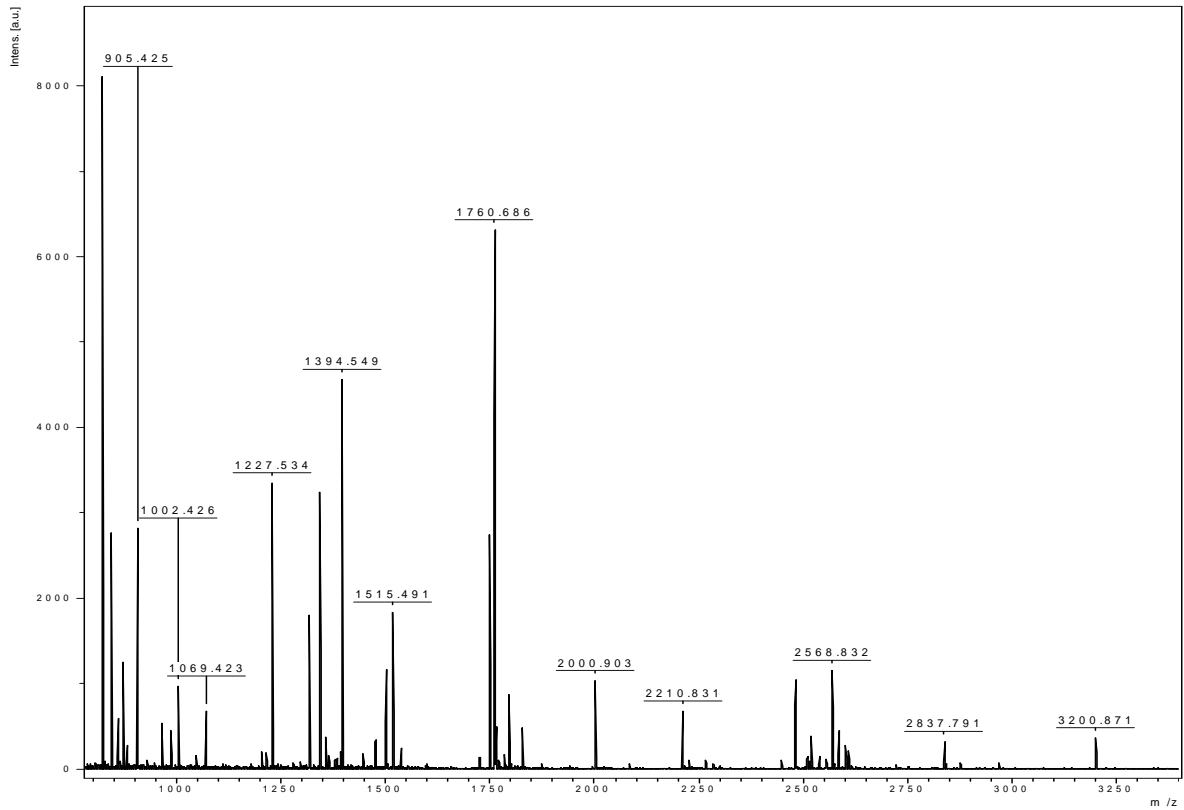
Format As [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 4180 | 54564 | 103 | pyruvate kinase [Saccharomyces cerevisiae] |
| 2. gi 6319279 | 54510 | 103 | Pyruvate kinase, functions as a homotetramer in glycolysis to convert phosphoenolpyruvate to pyruvate, the input for aerobic (TCA c |
| 3. gi 78065806 | 10162 | 52 | transcriptional regulator, XRE family [Burkholderia sp. 383] |
| 4. gi 50294908 | 54633 | 49 | unnamed protein product [Candida glabrata] |
| 5. gi 42570025 | 88567 | 48 | F-box family protein [Arabidopsis thaliana] |
| 6. gi 16077302 | 37241 | 48 | hypothetical protein BSU02330 [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168] |
| 7. gi 78062427 | 28590 | 48 | hypothetical protein Bcep18194_B1577 [Burkholderia sp. 383] |
| 8. gi 50901136 | 18968 | 47 | hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] |
| 9. gi 7742471 | 20286 | 46 | Sigma-70 region 2 [Rhodospseudomonas palustris BisA53] |
| 10. gi 38494195 | 27760 | 45 | Muc19 protein [Mus musculus] |
| 11. gi 51827415 | 11860 | 44 | PREDICTED: similar to ALY [Mus musculus] |

Mancha # 15: Piruvato quinasa (Pyk1p)



Protein Summary Report

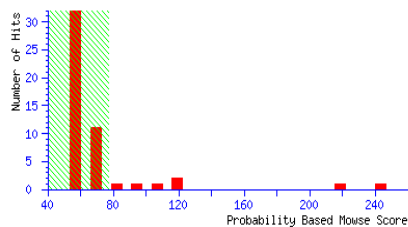
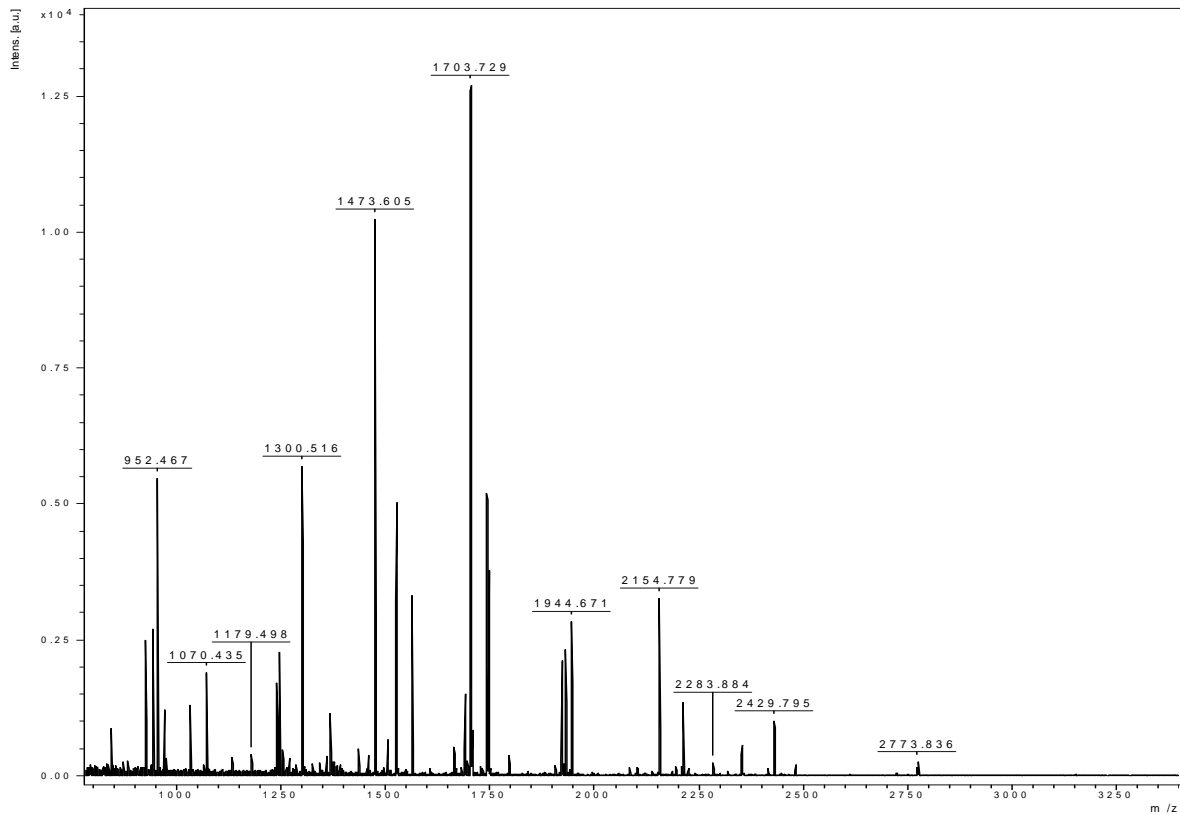
Format As: [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|----------------------------------|--------|-------|---|
| 1. gi 4180 | 54564 | 246 | pyruvate kinase [Saccharomyces cerevisiae] |
| 2. gi 6319279 | 54510 | 246 | Pyruvate kinase, functions as a homotetramer in glycolysis to convert phosphoenolpyruvate to pyruvate, the input for aerobic (TCA cy |
| 3. gi 28563987 | 32567 | 93 | CDCl9 [Saccharomyces bayanus] |
| 4. gi 50294908 | 54633 | 78 | unnamed protein product [Candida glabrata] |
| 5. gi 28564203 | 54428 | 69 | CDCl9 [Saccharomyces castellii] |
| 6. gi 16552166 | 33707 | 66 | unnamed protein product [Homo sapiens] |
| 7. gi 14573809 | 192141 | 65 | Hypothetical protein C16A3.3 [Caenorhabditis elegans] |
| 8. gi 57226862 | 31012 | 60 | conserved hypothetical protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21] |
| 9. gi 71661141 | 122606 | 60 | hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi] |
| 10. gi 11497695 | 46228 | 59 | hypothetical protein AF0075 [Archaeoglobus fulgidus DSM 4304] |
| 11. gi 29339702 | 157679 | 58 | two-component system sensor histidine kinase/response regulator, hybrid ('one component system') [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5- |
| 12. gi 142601420 | 21752 | 58 | hypothetical protein 005-21 [Oikopleura dioica] |

Mancha # 16: Subunidad B del dominio V₁ de la ATPasa vacuolar de protones (Vma2p)



Protein Summary Report

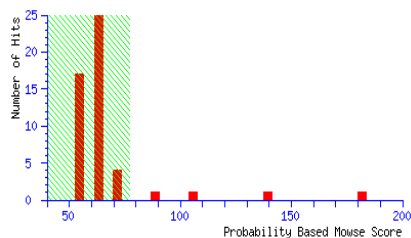
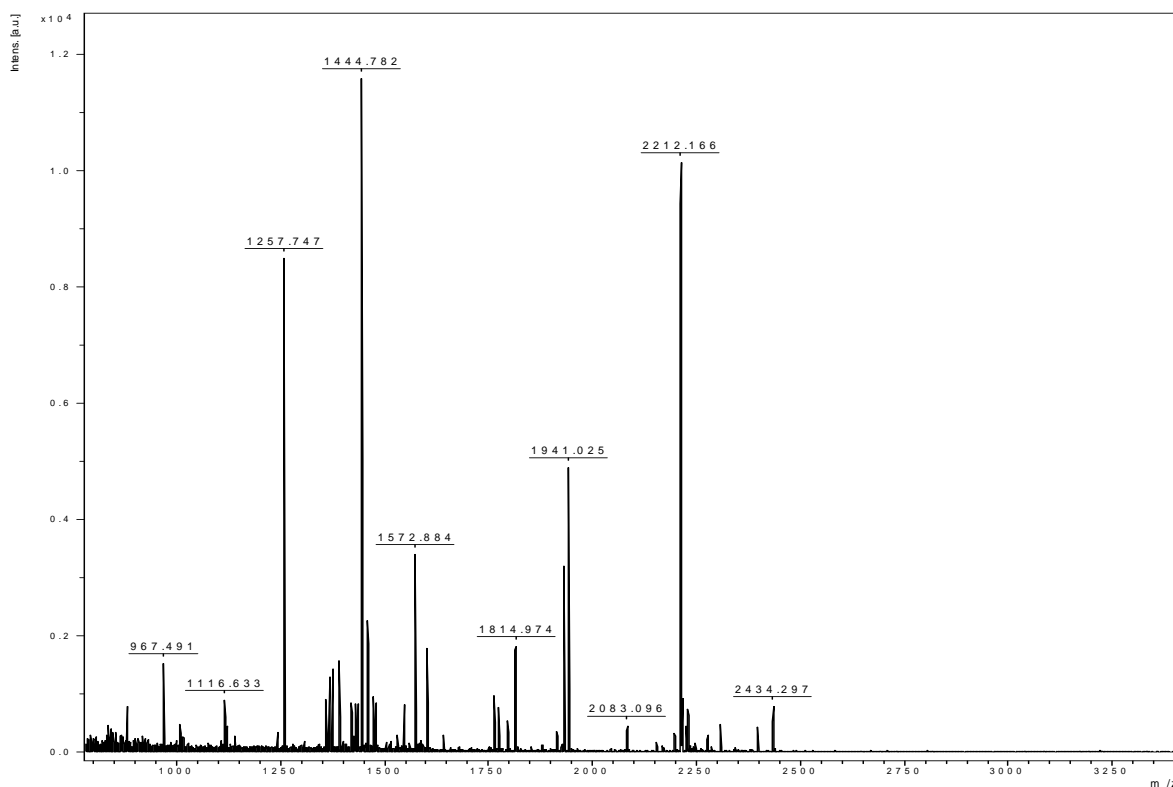
Format As: [Help](#)

Significance threshold p < Max number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|--------|-------|--|
| 1. gi 6319603 | 57713 | 243 | Subunit B of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump fo |
| 2. gi 171122 | 57614 | 217 | vacuolar H ⁺ -ATPase 52 kDa subunit |
| 3. gi 50306905 | 57615 | 121 | unnamed protein product [Kluyveromyces lactis] |
| 4. gi 162699 | 46418 | 114 | H ⁺ -ATPase B subunit |
| 5. gi 50554109 | 57075 | 112 | hypothetical protein [Yarrowia lipolytica] |
| 6. gi 50285963 | 57008 | 91 | unnamed protein product [Candida glabrata] |
| 7. gi 49655919 | 57045 | 81 | unnamed protein product [Debaryomyces hansenii CBS767] |
| 8. gi 68468963 | 32054 | 75 | hypothetical protein Ca019_3042 [Candida albicans SC5314] |
| 9. gi 17973451 | 370462 | 74 | breast cancer 2 [Mus musculus] |
| 10. gi 1854951 | 370432 | 74 | breast cancer susceptibility [Mus musculus] |
| 11. gi 7160860 | 44859 | 74 | hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi] |
| 12. gi 73971282 | 16231 | 72 | PREDICTED: similar to tropomyosin 2 (beta) isoform 2 isoform 8 [Canis familiaris] |

Mancha 18: S-adenosilmetionina sintetasa (Sam1p)



Protein Summary Report

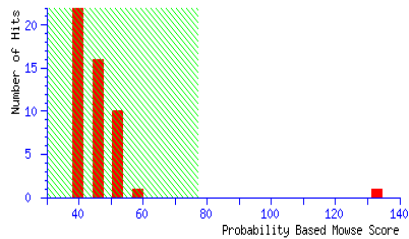
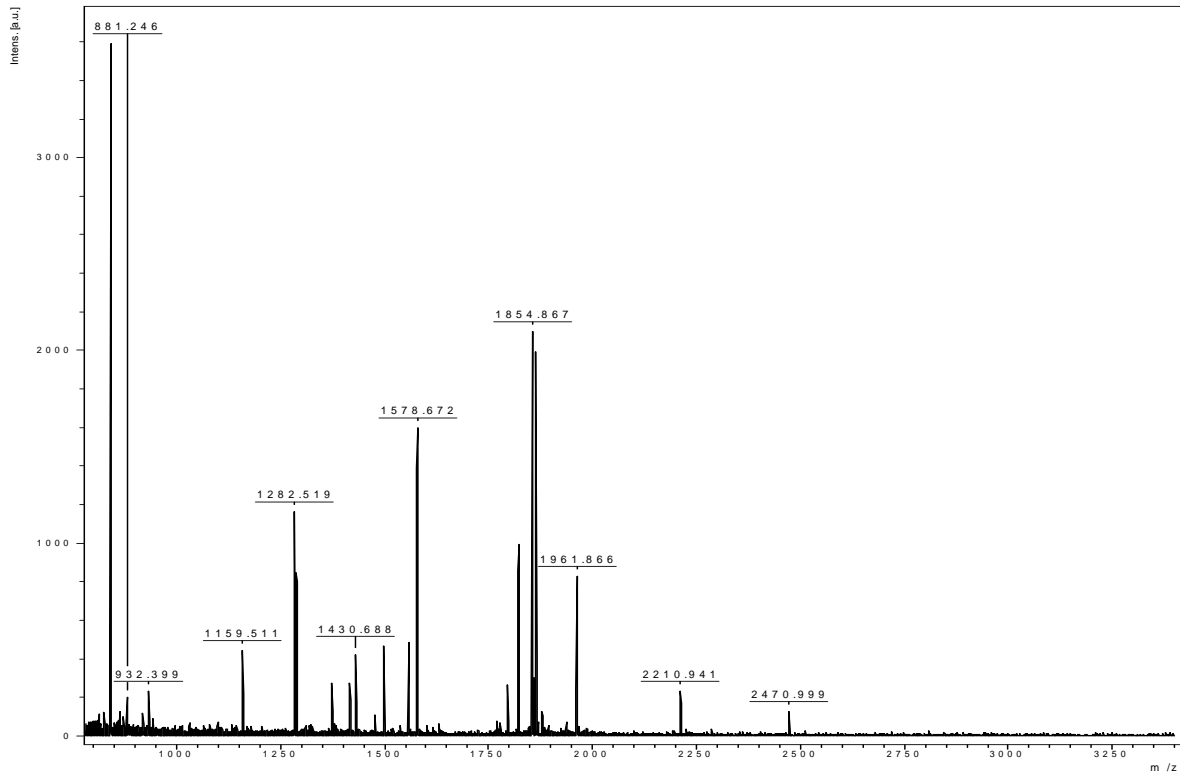
Format As: [Help](#)

Significance threshold p < Max number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|--------------------------------|--------|---------------------------|--|
| 1. Mixture 1 | 182 | gi 6323209 + gi 68233329 | |
| 2. Mixture 2 | 141 | gi 73540469 + gi 73945740 | |
| 3. gi 6323209 | 41792 | 103 | S-adenosylmethionine synthetase, catalyzes transfer of the adenosyl group of ATP to the sulfur atom of methionine; one of two diffe: |
| 4. gi 172534 | 41856 | 92 | S-adenosylmethionine synthetase |
| 5. gi 66813080 | 197371 | 71 | hypothetical protein DDB0205629 [Dictyostelium discoideum] |
| 6. gi 13423885 | 13297 | 70 | hypothetical protein [Caulobacter crescentus CB15] |
| 7. gi 49653183 | 130565 | 69 | unnamed protein product [Debaryomyces hansenii CBS767] |
| 8. gi 72084355 | 17379 | 68 | PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S19 [Strongylocentrotus purpuratus] |
| 9. gi 68233329 | 36086 | 67 | Phage integrase:Phage integrase, N-terminal SAM-like [Frankia sp. EAM1pec] |
| 10. gi 114575 | 54890 | 67 | ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor |
| 11. gi 6322581 | 54760 | 67 | Beta subunit of the F1 sector of mitochondrial F1FO ATP synthase, which is a large, evolutionarily conserved enzyme complex require |

Mancha 19: Enolasa 2 (Eno2p)



Protein Summary Report

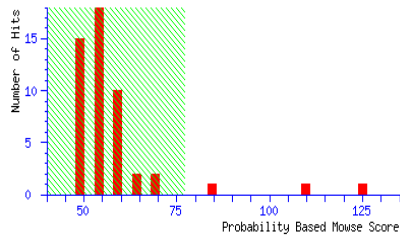
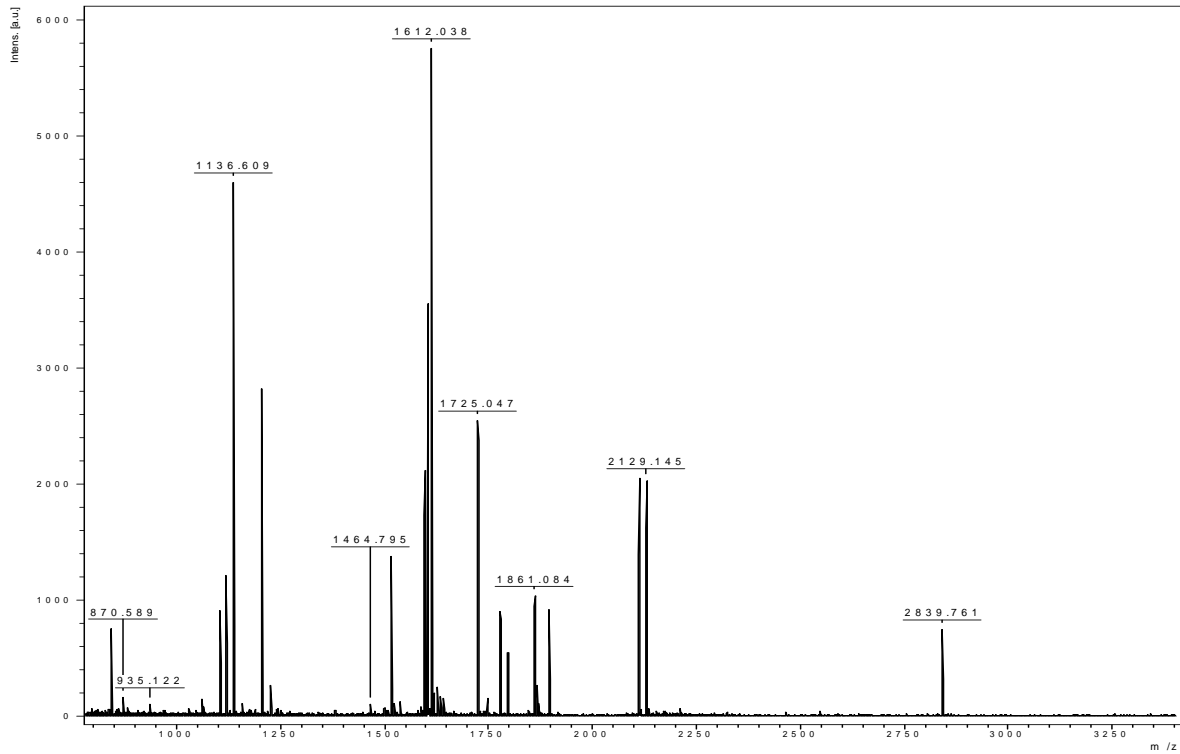
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 6321968 | 46885 | 133 | Enolase II, a phosphopyruvate hydratase that catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate during glycolysis |
| 2. gi 7245665 | 25646 | 57 | Chain A, Crystal Structure Of The Complete Transactivation Domain Of E2 Protein From The Human Papillomavirus Type 16 |
| 3. gi 33300045 | 26752 | 54 | Hypothetical protein C30F2.5 [Caenorhabditis elegans] |
| 4. gi 32453602 | 10200 | 52 | Vs.4 conserved hypothetical protein [Enterobacteria phage RB69] |
| 5. gi 231253 | 46601 | 51 | Enolase (E.C.4.2.1.11) (2-Phospho-D-Glycerate Hydrolase) Complex With 2-Phospho-D-Glyceric Acid And Magnesium |
| 6. gi 2914550 | 46642 | 51 | Chain B, Asymmetric Yeast Enolase Dimer Complexed With Resolved 2'-Phosphoglycerate And Phosphoenolpyruvate |
| 7. gi 20151220 | 46626 | 51 | Chain D, Mg-Phosphonoacetylhydroxamate Complex Of S39a Yeast Enolase 1 |
| 8. gi 39654416 | 46641 | 51 | Chain B, Reverse Protonation Is The Key To General Acid-Base Catalysis In Enolase |
| 9. gi 39654418 | 46641 | 51 | Chain B, Reverse Protonation Is The Key To General Acid-Base Catalysis In Enolase |
| 10. gi 119336 | 46773 | 51 | Enolase 1 (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) |
| 11. gi 6321693 | 46787 | 51 | Enolase I, a phosphopyruvate hydratase that catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate during glycolysis at |
| 12. gi 50933935 | 7352 | 50 | hvothetical protein [Orzva sativa (iaonica cultivar-grow)] |

Mancha # 20: Óxido nítrico oxidoreductasa (Yhb1p)



Protein Summary Report

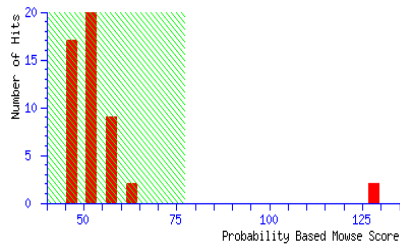
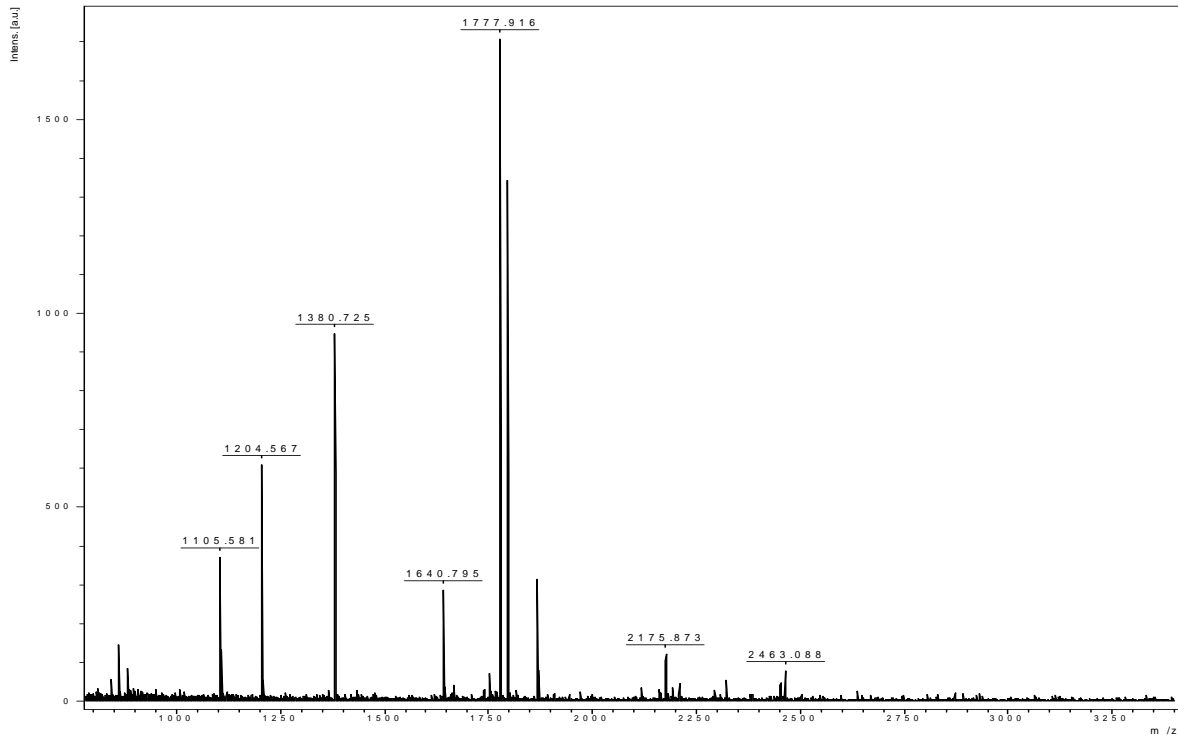
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|----------------------------------|-------|-------|---|
| 1. gi 6321673 | 44618 | 125 | Nitric oxide oxidoreductase, flavohemoglobin involved in nitric oxide detoxification; plays a role in the oxidative and nitrosative |
| 2. gi 729488 | 44619 | 112 | Flavohemoprotein (Hemoglobin-like protein) (Flavohemoglobin) (Nitric oxide dioxygenase) (NO oxygenase) (MOD) |
| 3. gi 14571694 | 41664 | 85 | myosin heavy chain like protein [Takifugu rubripes] |
| 4. gi 34419366 | 17649 | 72 | EndoVII packaging and recombination endonuclease [Bacteriophage KVP40] |
| 5. gi 55665741 | 76472 | 67 | RP3-522B19.2 [Homo sapiens] |
| 6. gi 57997519 | 76530 | 66 | hypothetical protein [Homo sapiens] |
| 7. gi 30268573 | 79750 | 62 | hypothetical protein [Homo sapiens] |
| 8. gi 34541502 | 47669 | 61 | S-adenosylmethionine synthase [Porphyromonas gingivalis W83] |
| 9. gi 30722291 | 80241 | 61 | hypothetical protein [Homo sapiens] |
| 10. gi 50875785 | 43292 | 60 | probable twitching mobility protein [Desulfotalea psychrophila L3v54] |
| 11. gi 54291006 | 47818 | 60 | loricrin-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] |
| 12. gi 160685216 | 76430 | 59 | muscle-derived protein 77 [Homo sapiens] |

Mancha # 21: GDP-manosa pirofosforilasa (Psa1p)



Protein Summary Report

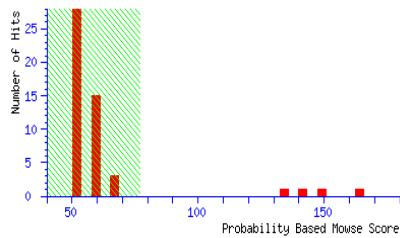
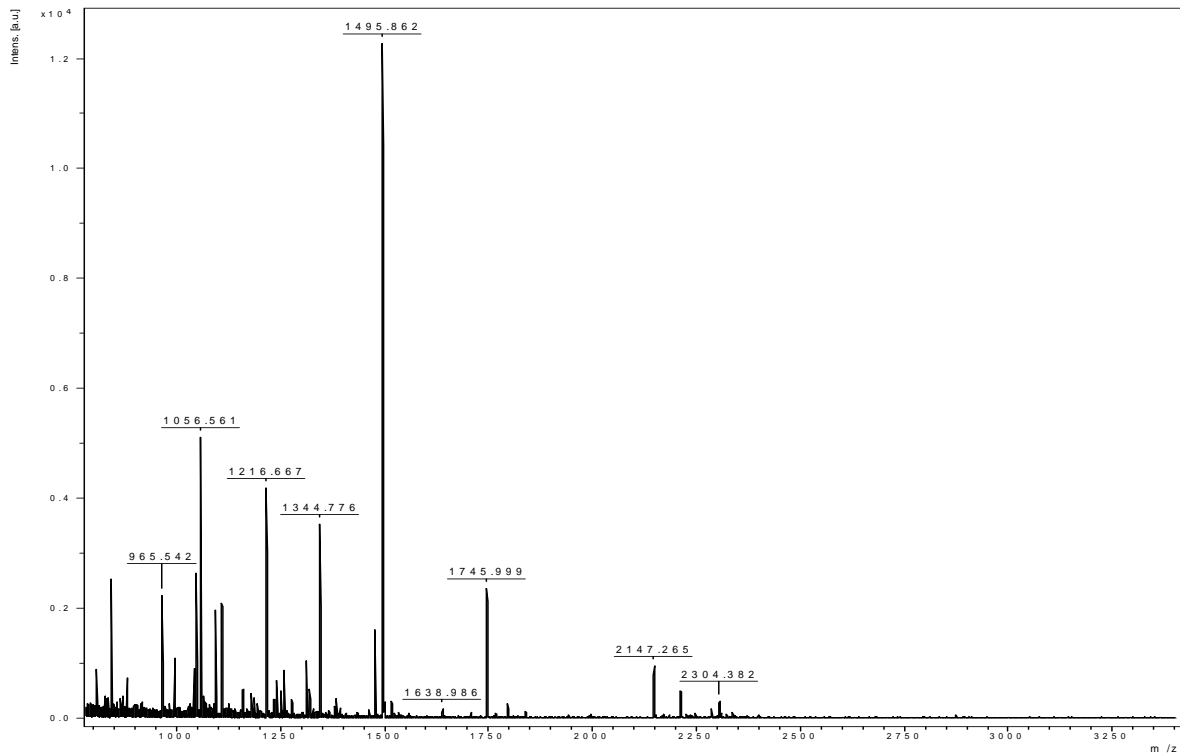
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|-------|-------|--|
| 1. gi 894204 | 39513 | 128 | mannose-1-phosphate guanyltransferase |
| 2. gi 6320148 | 39541 | 128 | GDP-mannose pyrophosphorylase (mannose-1-phosphate guanyltransferase), synthesizes GDP-mannose from GTP and mannose-1-phosphate in c |
| 3. gi 32445821 | 41496 | 66 | hypothetical protein [Rhodopirellula baltica SH 1] |
| 4. gi 54643513 | 23797 | 62 | GAI4838-PA [Drosophila pseudoobscura] |
| 5. gi 67972392 | 28746 | 60 | unnamed protein product [Macaca fascicularis] |
| 6. gi 6968515 | 22987 | 58 | thiamin-phosphate pyrophosphorylase [Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11168] |
| 7. gi 57237963 | 23014 | 58 | thiamine-phosphate pyrophosphorylase [Campylobacter jejuni RM1221] |
| 8. gi 56684504 | 33977 | 56 | Wzd [Lactobacillus rhamnosus] |
| 9. gi 14010527 | 35093 | 56 | Pto-like kinase SG5-3c [Phaseolus vulgaris] |
| 10. gi 56684524 | 33977 | 56 | Wzd [Lactobacillus rhamnosus] |
| 11. gi 55661101 | 36010 | 56 | PREDICTED: similar to HP-20 [Pan troglodytes] |
| 12. gi 18462482 | 22047 | 55 | unknown [Bacteroides fragilis] |

Mancha # 22: Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (Ura3p)



Protein Summary Report

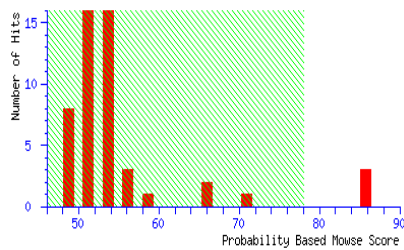
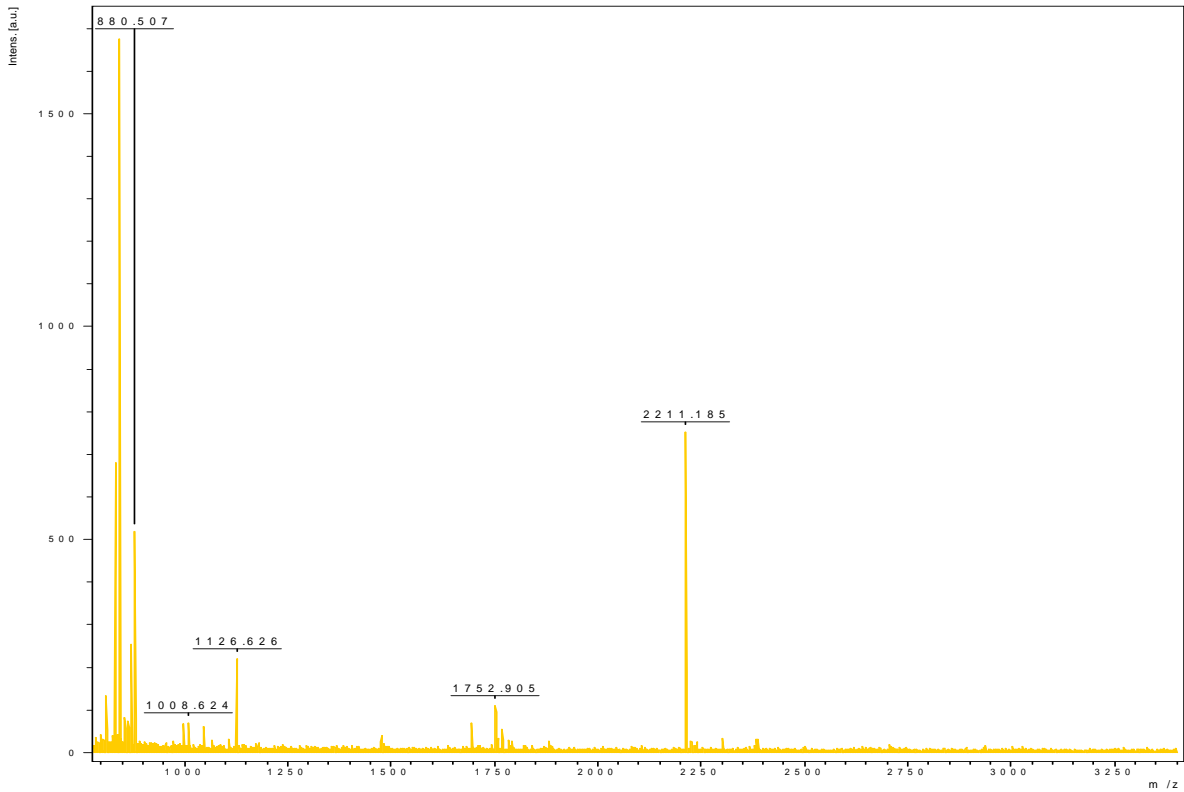
Format As [Help](#)

Significance threshold p < Max. number of hits

Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|--------|-------|--|
| 1. gi 7546471 | 29288 | 164 | Chain D, Crystal Structure Of Orotidine 5'-Phosphate Decarboxylase Complexed To 6-Hydroxyuridine 5'-Phosphate (Bmp) |
| 2. gi 77819892 | 29237 | 149 | Ura3 [Shuttle vector pM061] |
| 3. gi 224095 | 29222 | 138 | decarboxylase,orotidine phosphate |
| 4. gi 6320814 | 29221 | 136 | Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase, catalyzes the sixth enzymatic step in the de novo biosynthesis of pyrimidines, convertin |
| 5. gi 13507650 | 392076 | 68 | zinc finger homeodomain 4 [Mus musculus] |
| 6. gi 32417786 | 17246 | 67 | hypothetical protein (ribosomal protein Y57 homolog - Emericella nidulans) [Neurospora crassa] |
| 7. gi 7270288 | 71584 | 66 | Dem-like protein [Arabidopsis thaliana] |
| 8. gi 13236212 | 70075 | 63 | RNA adenosine deaminase 1 [Mus musculus] |
| 9. gi 68447079 | 70076 | 62 | DNA primase [Staphylococcus haemolyticus JCS1435] |
| 10. gi 68479899 | 41494 | 62 | hypothetical protein Ca019_7456 [Candida albicans SC5314] |
| 11. gi 32188228 | 25967 | 61 | synaptobrevin-like 2 [Entamoeba histolytica] |
| 12. gi 62528036 | 18578 | 61 | C0G1956: GAF domain-containing protein [Streptococcus thermophilus LMD-91] |

Mancha única del TAP: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isozima 3 (Tdh3p)



Protein Summary Report

Format As: [Help](#)

Significance threshold p<: Max. number of hits:

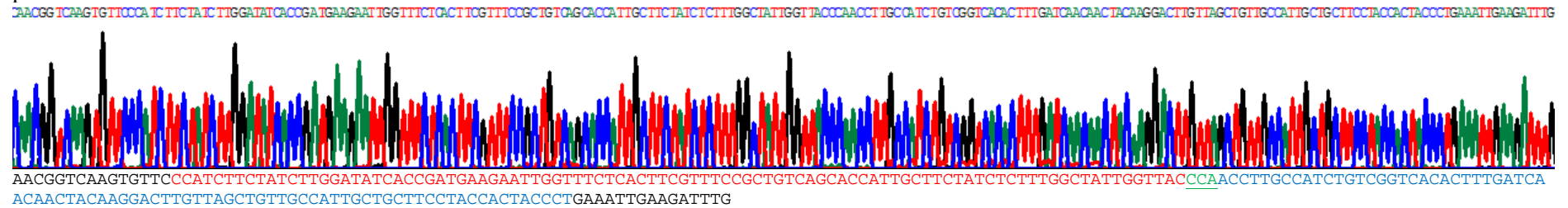
Index

| Accession | Mass | Score | Description |
|---------------------------------|--------|-------|---|
| 1. gi 145262553 | 35666 | 86 | YGR192C [Saccharomyces cerevisiae] |
| 2. gi 13720 | 35709 | 86 | unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae] |
| 3. gi 1323341 | 35724 | 86 | TDH3 [Saccharomyces cerevisiae] |
| 4. gi 154110953 | 52320 | 71 | Hypothetical protein F4562.6 [Caenorhabditis elegans] |
| 5. gi 192886228 | 9188 | 66 | hypothetical protein MtrDRAFT_AC148359g17v1 [Medicago truncatula] |
| 6. gi 1229428 | 35524 | 66 | glyceraldehydephosphate dehydrogenase |
| 7. gi 50255601 | 48093 | 59 | hypothetical protein CNEJ2570 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A] |
| 8. gi 149611951 | 81260 | 56 | putative DNA-binding protein [Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043] |
| 9. gi 192894859 | 15223 | 56 | Haem peroxidase [Medicago truncatula] |
| 10. gi 16411472 | 103785 | 55 | isoleucyl-tRNA synthetase [Listeria monocytogenes] |
| 11. gi 11466658 | 23515 | 55 | ribosomal protein S2 [Malawimonas jakobiformis] |

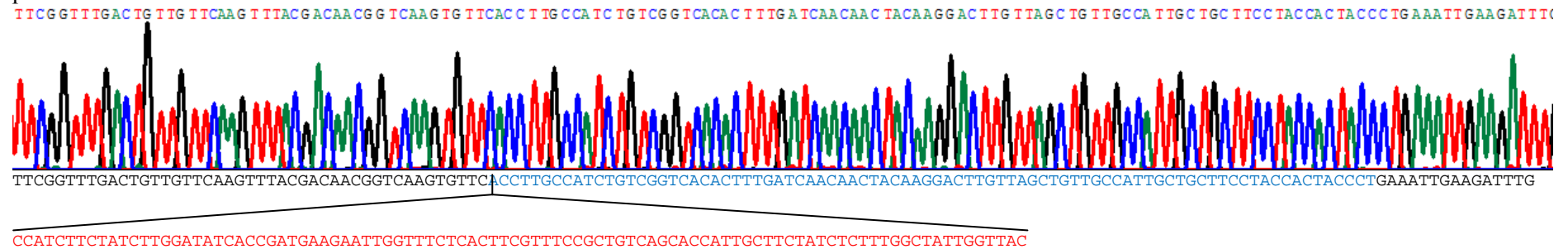
ANEXO II
Secuenciación de ADN de las cuatro formas de P0

A continuación se muestra el análisis mediante secuenciación de ADN con el oligo P0N4 del plásmido pFL36 conteniendo las cuatro formas de la proteína P0 generadas en este trabajo de tesis. Para cada construcción primero se muestra la región del cromatograma correspondiendo a la zona del ORF de P0 que engloba los dos sitios de interacción de las proteínas ácidas y por debajo se muestra la secuencia de nucleótidos de dicha zona. En la secuencia de nucleótidos se muestra en rojo el sitio A, en azul el sitio B y en verde y subrayado el residuo de prolina común para ambos sitios. En el caso de las formas truncadas se muestra delimitado por barras diagonales el sitio ausente para cada caso.

pFL36-P0:

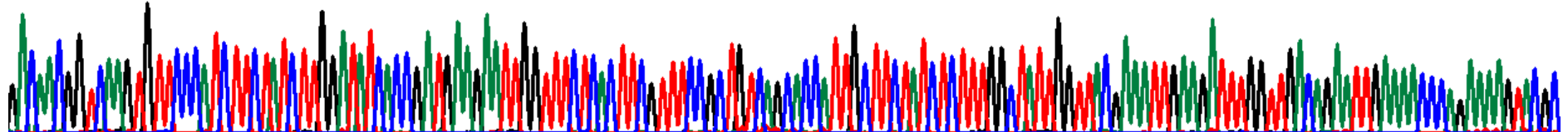


pFL36-P0ΔA:



pFL36-P0ΔB:

GACCAACGG TCAAGTG TTCCTCATCTTGGATATCACC GATGAAGAATTGGTTTCTCACTTCGTTCCGCTGTCAGCACCAT TGCCTTCTATCTCTTTGGCTATTGGTTACGAAAT TGAAGATTTGGTTGACAGAAATGAAAACCCAGAAAAGTACGC

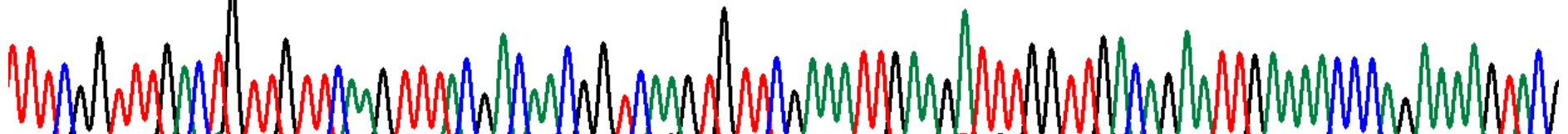


AACGGTCAAGTGTTC CATCTTCTATCTTGGATATCACC GATGAAGAATTGGTTTCTCACTTCGTTCCGCTGTCAGCACCAT TGCCTTCTATCTCTTTGGCTATTGGTTACGAAAT TGAAGATTTGGTTGACAGAAATGAAAACCCAGAAAAGTACGC

ACCTTGCCATCTGTCGGTCACACTTTGATCAACAAC TACAAGACTTGTAGCTGTTGCCATTGCTGCTTCCTACCACTACCCCT

pFL36-P0ΔAB:

ITTCGGTTGACTGTTGTTCAAGTTTACGACAACGG TCAAGTGTTTCGAAAT TGAAGATTTGGTTGACAGAAAT TGAAAAACCCAGAAAAGTACGC



ITTCGGTTGACTGTTGTTCAAGTTTACGACAACGG TCAAGTGTTTCGAAAT TGAAGATTTGGTTGACAGAAAT TGAAAAACCCAGAAAAGTACGC

CCATCTTCTATCTTGGATATCACC GATGAAGAATTGGTTTCTCACTTCGTTCCGCTGTCAGCACCAT TGCCTTCTATCTCTTTGGCTATTGGTTACACCTTGCCATCTGTCGGTCACACTTTGATCAACAAC TACAAGACTTGTAGCTGTTGCCATTGCTGCTTCCTACCACTACCCCT