



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Participación de YP1/YP2 en la síntesis de proteínas

TESIS

M. en C. Juan Ismael Rea Hernández

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Samuel Zinker Ruzal †

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

CDMX

marzo 2021

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 19 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N bajo la dirección del Dr. Samuel Zinker Ruzal † y la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz.

La asesoría de los miembros del comité:

Dr. Everardo López Romero, Universidad de Guanajuato, Departamento de Biología.

Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, CINVESTAV, Departamento de Bioquímica.

Dr. Javier Hernández Sánchez, CINVESTAV, Departamento de Genética y Biología Molecular.

Dr. Luis Kameyama Yoshio Kawabe, CINVESTAV, Departamento de Genética y Biología Molecular.

Dr. Efraín Garrido Guerrero, CINVESTAV, Departamento de Genética y Biología Molecular.

Dr. Bulmaro Cisneros Vega, CINVESTAV, Departamento de Genética y Biología Molecular.

Durante la realización del presente trabajo el autor contó con el apoyo de la beca número CVU 482693 del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología.

Dedicatoria:

A mis padres Fidelia Hernández y Juan Rea,
por siempre creer en mí y apoyarme en toda
la aventura académica que decidí tomar.

A mis hermanos Pablo, Carlos y Beto, que
compartieron conmigo esta etapa y con las
risas supieron dar alegría a los días
pesados.

A ti Gloria, que me acompañaste, viste y
creíste en mí, este momento no sería
posible sin ti a mi lado.

Abstract

The acidic ribosomal proteins P1A, P1B, P2A and P2B are present in the cell as heterodimers (P1A / P2B, P1B / P2A) bound to the ribosomal protein uL10 establishing a pentameric structure called ribosomal stalk present in the 60S subunit ribosome, the stalk represents a landing pad for translational factors. However, free heterodimers also exist in the cytoplasmic cluster and are dynamically exchanged between this cluster and the ribosomes. Heterodimers are only present in the 60S subunit when they bind to the 40S subunit in the 80S particle; the reason why this occurs in this way has not yet been determined. Here we show that cells lacking all or each of the acidic ribosomal proteins: 1) exhibit alterations in ribosomal populations 2) display a ribosome profile that indicates a significant loss of free cytoplasmic 40S and 60S subunits. Since these alterations suggest a defect during the translation process, a translation restart assay was carried out these results revealed that translation was restarted without any major impairment in cells with non-canonical variants or absence of the acidic ribosomal proteins, furthermore analysis of post-initiation events showed that cells with ribosomes with alterations in ribosomal stalk composition could successfully complete the rounds of elongation in which they were involved, and the rate of 80S particle dissociation determined the time that the subunits remained associated with the 80S particle when the ribosome lacked ribosomal acidic proteins. The data show that a slow rate of dissociation of ribosomes lacking acidic ribosomal proteins is the main cause of loss of the set of free 40S and 60S subunits. We propose that the reason why acidic ribosomal proteins are present in the ribosomal stalk only in the 80S particle is due to an active role in the recycling process of ribosomes mediated by their ability to recruit translation factors.

Resumen

Las proteínas ribosomales ácidas P1A, P1B, P2A y P2B están presentes en la célula como heterodímeros (P1A / P2B, P1B / P2A) unidos a la proteína ribosómica uL10 estableciendo una estructura pentamérica llamada tallo ribosómico presente en el ribosoma de la subunidad 60S, el tallo representa una plataforma de reclutamiento para factores de traducción. Sin embargo, también existen heterodímeros libres en el grupo citoplásmico y se intercambian dinámicamente entre este grupo y los ribosomas. Los heterodímeros solo están presentes en la subunidad 60S cuando se unen a la subunidad 40S en la partícula 80S; la razón por la cual ocurre de esta manera aún no se ha determinado. Aquí mostramos que las células que carecen de todas o cada una de las proteínas ribosomales ácidas exhiben alteraciones en las poblaciones ribosómicas. Las células que carecen de todas las proteínas ribosómicas ácidas muestran un perfil de ribosoma que muestra una pérdida significativa de subunidades libres citoplásmicas 40S y 60S. Estas alteraciones indican un defecto durante el proceso de traducción. Para analizar esto, se determinó un ensayo de reinicio de la traducción donde se observó que la traducción se podía reiniciar sin mayores afectaciones en células con variantes no canónicas o ausencia de las proteínas ácidas ribosomales, el análisis de eventos posteriores al inicio demostró que los ribosomas que presentaban alteraciones en la composición del tallo ribosomal podían concluir de manera satisfactoria las rondas de elongación en las cuales se veían involucrados y la tasa de disociación de partículas 80S donde se cuantificó el tiempo que permanecían asociados las subunidades en la partícula 80S (monosome) cuando el ribosoma carecía de las proteínas ribosomales ácidas. Los datos demuestran que una tasa lenta de disociación de los ribosomas que carecen de proteínas ribosómicas ácidas es la principal causa de pérdida del conjunto de subunidades libres 40S y 60S. Proponemos que la razón por la que las proteínas ribosomales ácidas están presentes en el tallo ribosómico solo en la partícula 80S se debe a un papel activo del tallo en el proceso de reciclaje de los ribosomas mediado por su capacidad para reclutar factores de traducción.

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS	9
<i>Figura 1 Microscopia electronica de barrido de S. cerevisiae.</i>	14
<i>Figura 2 Proceso general de la traducción.</i>	18
<i>Figura 3 Ribosoma eucarionte.</i>	19
<i>Figura 4 Ruta de sintesis de el rRNA ribosomal eucarionte.</i>	20
<i>Figura 5 Diagrama de proteínas ribosomales compartidas y exclusivas de cada uno de los dominios de la vida.</i>	21
<i>Figura 6 Mapa de Microscopia electrónica por criofractura de la partícula 80S de S. cerevisiae.</i>	22
<i>Figura 7 Estructura del tallo ribosomal mediante SAXS en S. cerevisiae.</i>	24
<i>Figura 8 Alineamiento múltiple de la estructura primaria de RPPs de diferentes especies.</i>	26
<i>Figura 9 Modelo de intercambio activo de RPPs en la fracción 80S de las poblaciones ribosomales.</i>	27
<i>Figura 10 Micrografía electronica de ribosomas en S. cerevisiae detectadas por inmunomarcaje con antiRPPS acoplados a oro coloidal.</i>	29
<i>Figura 11 Ensayo funcional de uL10, P1 y P2 purificados en un sistema hibrido con ribosomas de E. Coli</i>	32
<i>Figura 12. Ensayos de Pull down. uL10(P0) es capaz de interactuar con eIF5A aun en ausencia de los heterodímeros P1/P2.</i>	33
<i>Figura 13 Representación esquemática de la interacción independiente de nucleótidos de aP1 con el factor de elongación aEF2.</i>	35
<i>Figura 14 Fosforilación de eIF2A en ausencia y presencia de P1/P2 en el tallo ribosomal.</i>	37
<i>Figura 15 Isoelectroenfoque de fracciones de perfil ribosomal.</i>	38
<i>Figura 16 Esquema de disrupciones génicas utilizadas en S. cerevisiae W303.</i>	51
<i>Figura 17. Construcción de cuádruple deletante de RPPS.</i>	51
<i>Figura 18. Estudios de crecimiento mediante siembra por goteo con diferentes fuentes de carbono fermentable y no fermentable.</i>	53
<i>Figura 19. Estudios de sensibilidad a antibióticos específicos del proceso de elongación de la traducción.</i>	54
<i>Figura 20 Analisis del perfil ribosomal de la cepa Wt, deletantes simples y quadruple mutante</i>	56
<i>Figura 21 Analisis de reiniciación de la traducción.</i>	59
<i>Figura 22 Las ausencia de RPPs no retrasan la terminación de las rondas de elongación de los ribosomas presentes en la fracción polisomal.</i>	60
<i>Figura 23. Medición de permanencia de las nuevas subunidades ribosomales recién sintetizadas con Met-S35 en la fracción 80S (monosome).</i>	62

Índice

1	Introducción.....	12
1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.2	<i>La levadura S. cerevisiae como modelo de estudio</i>	15
1.3	<i>Síntesis de proteínas</i>	16
1.3.1	Iniciación.....	16
1.3.2	Elongación.....	17
1.3.3	Terminación /reciclamiento.....	18
1.4	<i>Ribosoma eucarionte</i>	19
1.5	<i>El tallo ribosomal</i>	22
1.6	<i>Proteínas ribosomales ácidas</i>	24
1.7	<i>Interacciones del tallo ribosoma con otros factores I</i>	28
1.8	<i>Participación del tallo ribosomal en la traducción</i>	29
2	ANTECEDENTES.....	31
3	Justificación.....	39
4	Hipótesis.....	40
5	Objetivos.....	41
5.1	<i>Objetivo general</i>	41
5.2	<i>Objetivos particulares</i>	42
6	Material y métodos.....	43
6.1	<i>Organismo</i>	44
6.2	<i>Cultivo de células</i>	44
6.3	<i>Determinación de tamaño celular</i>	45
6.4	<i>Análisis del perfil de ribosomas mediante gradientes de sacarosa</i>	45
6.5	<i>Ensayo de tiempo de vida cronológico en medio sintético definido (SD)</i> ... 46	46
6.6	<i>Ensayo de recuperación traduccional desde la fase estacionaria</i>	46
6.7	<i>Ensayo de disociación de 80S</i>	46
7	Resultados.....	49
7.1	<i>Caracterización fenotípica de células con conformaciones no canónicas el tallo del ribosoma eucarionte</i>	49
7.2	<i>Caracterización de la maquinaria traduccional con diferentes composiciones del tallo ribosomal</i>	55

7.3	<i>Análisis del proceso de traducción durante los eventos posteriores a la iniciación.</i>	58
7.4	<i>Reciclaje de los ribosomas al final del proceso de traducción.....</i>	61
8	Discusión.....	63
9	Bibliografía.....	72

1 Introducción

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular del grupo de los ascomicetos Figura 1. Se encuentra en fase haploide y diploide su crecimiento es independiente del número cromosómico. Durante su fase asexual (haploide) el mecanismo que emplea para su reproducción es la gemación. Para realizar la reproducción sexual posee dos alelos: MAT α y MAT a para efectuar el apareamiento

Después del crecimiento vegetativo/asexual el apareamiento puede ocurrir entre levaduras que posean alelos contrarios.

Como en otros hongos la esporulación ocurre en condiciones de deficiencia de nutrientes. Durante la esporulación las células diploides entran en meiosis produciendo 4 células haploides las cuales están encapsuladas dentro de esporas (o ascosporas) en una estructura similar a un saco denominado ascus. Estas ascosporas pueden disgregarse mecánicamente por micro manipulación para originar cepas haploides.

Presenta 5 fases de crecimiento, (Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías, & Robles, 2004) cuando se cultivan en medio líquido completo (YPED por sus siglas en inglés: yeast peptone, extract and dextrose) con glucosas como fuente de carbono: la fase lag en la cual la célula está en un estado basal donde no se observa crecimiento; la fase logarítmica donde presenta la mayor tasa de crecimiento aunada a un metabolismo fermentativo y la consecuente producción de etanol. El periodo diáuxico (o cambio diáuxico) ocurre conforme la glucosa se agota y el metabolismo cambia de fermentativo a aeróbico. En la fase post diáuxica las células aumentan su resistencia al estrés y comienzan a utilizar como fuente de Carbono al etanol producido en la fase logarítmica; finalmente la fase estacionaria que ocurre cuando se han agotado todos los nutrientes y la célula deja de dividirse y acumula reservas de carbohidratos

como trehalosa y glucógeno adquiriendo la máxima capacidad de resistencia al estrés adicionalmente su pared celular se engrosa.

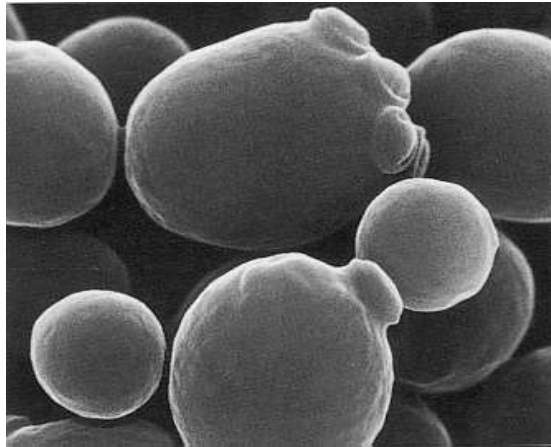


Figura 1 Microscopia electrónica de barrido de *S. cerevisiae*.

Se observan las marcas de gemación en las células (Mark Chan, 2021)

El tamaño de la célula varía dependiendo de la fase de crecimiento (Sherman, 2002). Las células diploides miden entre 5 a 6 μm y poseen una forma elipsoide. Las células haploides son esferoides de 4 μm de tamaño. Otra diferencia es que durante el crecimiento logarítmico las células haploides producen un mayor número de células. Cada célula madre puede producir de 20 a 30 gemas y la edad de la célula se puede determinar por el número de marcas de gemación que se observen en su pared celular (Figura 1). El ciclo celular dura alrededor de 90 a 140 minutos a 24°C y en fase estacionaria alcanza un máximo de 2×10^8 células/ml en medio YPED.

El genoma haploide de *S. cerevisiae* posee 16 cromosomas que oscilan entre 200 y 2200 Kb. El tamaño total del genoma es de 12052 Kb y fue reportado

por Goffeau et al. (1996). Comparaciones a nivel del Genoma con especies relacionadas ha llevado al estimado de 5726 a 5773 genes (Cliften et al., 2003) que codifican para proteínas. Su genoma es muy compacto en comparación con eucariontes pluricelulares dado que el 72% del DNA son genes. El RNA ribosomal (rRNA) está codificado por un arreglo de 120 copias en tándem que se localizan en el cromosoma XII. Posee 262 genes para el RNA de transferencia (tRNA) de los cuales 82 poseen intrones (Kellis, Patterson, Endrizzi, Birren, & Lander, 2003).

1.2 La levadura *S. cerevisiae* como modelo de estudio.

Algunas de las propiedades que hacen a este organismo útil para la investigación son: su rápido crecimiento, ser unicelular, ser inocuo, un genoma secuenciado y su facilidad para ser transformado. Debido a que no es patogénico las medidas de contención y manipulación son mucho menos estrictas que con otros modelos experimentales. Es posible mantenerla estable tanto en forma haploide como diploide lo cual permite de manera sencilla observar las mutaciones recesivas en las mutantes haploides. A diferencia de otros organismos la integración del material genético a su genoma ocurre casi de manera total por la vía de recombinación homóloga. Posee altos niveles de recombinación, por lo que los genes pueden ser reemplazados con facilidad, lo cual contrasta con la dificultad de efectuar esto en otros modelos eucariontes. Las facilidades que plantea han permitido su uso en análisis de regulación genética, las relaciones estructura-función de las proteínas, la estructura del cromosoma entre otras. Adicionalmente la presencia de genes ortólogos a muchos genes humanos ha permitido extrapolar los resultados obtenidos en diferentes estudios biológicos metabólicos y regulatorios. Uno de los procesos moleculares mejor estudiados

en el modelo de *Saccharomyces cerevisiae* corresponden al proceso de traducción, ya que se ha descrito la cercana correlación entre el proceso de traducción en este organismo y la rápida respuesta ante señales ambientales (Ju & Warner, 1994). Esto ha permitido elucidar respuestas puntuales por parte del proceso de traducción ante desafíos ambientales. Recientemente se ha comenzado a trabajar con la proteómica de regiones subcelulares específicas. Tales como la mitocondria y el ribosoma.(G. Yan & Yan, 2015)

1.3 Síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas o traducción, es la cadena de eventos durante las cuales la información genética contenida en los RNA mensajeros (mRNA) pasa a expresarse como proteínas. (Mathews, Sonenberg, & In: N. Sonenberg, 2000) Muestra un alto grado de conservación a lo largo de la evolución, por lo cual la traducción en *S. cerevisiae* no difiere en los mecanismos esenciales en comparación a otros eucariontes. (McCarthy, 1998). Este proceso se puede clasificar en 3 fases: Iniciación, elongación y terminación.(Holtzclaw, 2014) Figura 2.

1.3.1 Iniciación

La iniciación de la traducción es un evento que requiere la participación de proteínas de iniciación, denominadas eIFs. En un primer evento ocurre el ensamble de un complejo de factores proteicos sobre el mRNA circularizado, estas interacciones son mRNA-proteína y proteína- proteína. El 5'CAP del transcrito interactúa con el factor eucarionte de la traducción EIF4E-eIF4G. Esta asociación permite el reclutamiento de eIF4A, este último una helicasa que permite la desestructuración de formaciones secundarias del RNA. La proteína de unión al poliAAA (PABP) es reclutada por el factor eIF4A. Una vez todas estas proteínas interactúan con mRNA lo protegen de la acción de

nucleasas y se facilita el reciclamiento de los componentes de la maquinaria de traducción.

Todas las proteínas mencionadas en conjunto con el mRNA interactúan con el factor eIF3 que se encuentra asociado al complejo de pre-inicio 43S. El complejo de pre inicio está conformado por el complejo ternario (GTP, Met-tRNA y eIF2), el complejo multifactorial eIF5, eIF1 y eIF1A todos ellos en conjunto con la subunidad ribosomal 40S.

Cuanto el mRNA circularizado con sus factores de inicio de la traducción se asocia al complejo 43S ocurre la formación del complejo 48S, el cual escanea el mRNA de 5' a 3' para la localización del codón de inicio AUG. Una vez que este reconocimiento ocurre se da la hidrólisis del GTP asociado, la disociación de la mayoría de los factores de iniciación y el reclutamiento de la subunidad ribosomal 60S. (Pain, 1996)

1.3.2 Elongación.

En contraste con la complejidad de proceso de iniciación, el proceso de elongación, requiere principalmente mantener el marco de lectura correspondiente, el proceso de selección de los tRNAs aminoacilados en la partícula 80S, la formación de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos cargados en los tRNAs.

Este evento es regulado por la participación de 3 factores de elongación eEF1A, que participa en la incorporación de los tRNAs, eEF1A responsable del intercambio de GDP por GTP en el ribosoma y la acción de eEF2 que promueve la translocación de 3 posiciones en el mRNA por parte del ribosoma. (Groppo & Richter, 2009)

1.3.3 Terminación /reciclamiento.

El proceso de finalización de la traducción y consecuentemente de la liberación de los componentes involucrados, reciclamiento, es mediado por el factor de liberación eRF1, el cual se une al ribosoma en la posición A del ribosoma en lugar de un tRNA al reconocer alguno de los 3 codones de paro. Cuando eRF1 se localiza en esa posición ocurre el reclutamiento de eRF3 promueve su liberación de esa posición. Una vez que se da la liberación del péptido recién sintetizado del ribosoma, la partícula 80S queda con un sitio A libre y un tRNA desacilado, pasando a denominarse complejo de post-terminación. Es aquí donde se requiere la disociación de las subunidades 40S y 80S para su participación en nuevas rondas de traducción. Es conocido que eIF3 es uno de los principales factores que participan en este proceso. Favoreciendo la disociación de la subunidad 60S, el mRNA y tRNA asociado a la subunidad 40S. (Pisarev, Hellen, & Pestova, 2007)

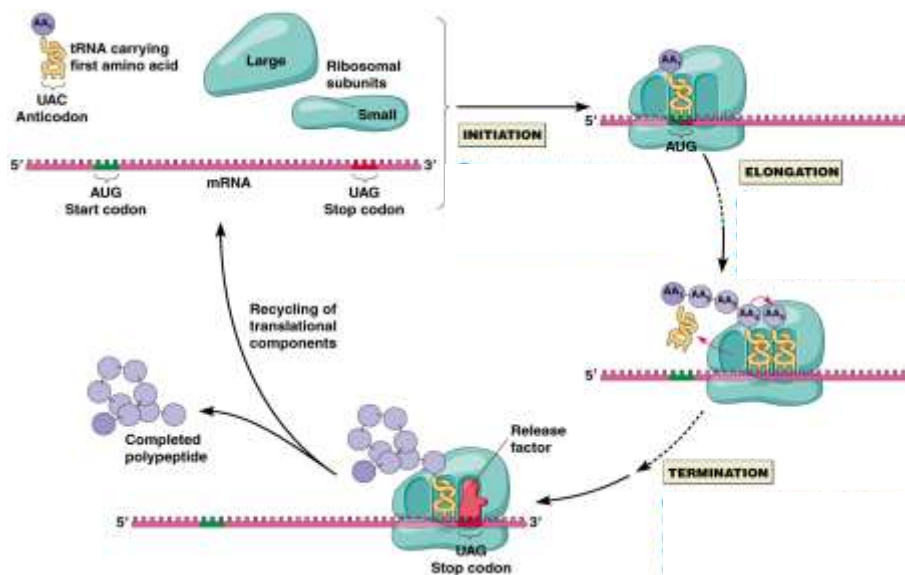


Figura 2 Proceso general de la traducción.

El proceso de traducción en celular eucariotas comprende la participación de las dos subunidades 40 y 60S, así como mRNA y tRNAs. Tomado de (Holtzclaw, 2014)

Cuando el ribosoma detecta un codón de paro, comienza el reclutamiento de

los componentes de terminación de la traducción a la par de componentes del reciclamiento del ribosoma. Lo cual permite la liberación del péptido sintetizado y la disociación de los componentes que se encontraban asociados: mRNA, 40S, 60S, tRNAs etc. (Imai et al., 2015)

1.4 Ribosoma eucarionte.

Todos los ribosomas en eucariontes están constituidos por 2 subunidades (40S y 60S) conformadas por RNA y proteínas (Figura 3). La diferencia más notable entre los ribosomas bacterianos (30S y 50S) y los eucariontes es que los ribosomas de los segundos son de mayor tamaño y complejidad debido a que contienen un mayor número de proteínas ribosomales (PR) además de segmentos adicionales de rRNA denominados extensiones (Wilson & Doudna Cate, 2012).

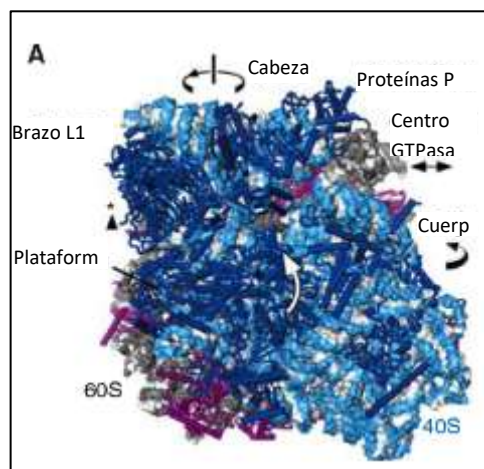


Figura 3 Ribosoma eucarionte.

Rotación del ribosoma en una vista inferior, la plataforma de contacto entre la subunidades, la región de la cabeza y las regiones dinámicas de la subunidad grande o 60S están indicadas con flechas: brazo L1, RPPs (Proteínas P) y el centro con actividad GTPasa. Tomado de (Wilson & Doudna Cate, 2012).

El ribosoma está constituido por 5469 nucleótidos que se distribuyen en el rRNA 18S de la subunidad pequeña y los rRNAs 5S, 5.8S y 25S de la

subunidad grande. (Figura 4) La partícula 80S de levadura contiene 79 PR de las cuales 33 PR se localizan en la subunidad 40S y 44 en la subunidad 60S. Los dominios Archea y Bacteria tienen homólogos en PR con los ribosomas de eucaria; un total de 35 PR tienen sus homólogos entre los 3 dominios, 15 PR en la subunidad menor y 20 PR en la subunidad grande. Adicionalmente existen PR que sólo se comparten entre los dominios Archea y Eucaria: 12 PR en la partícula 40S y 20 en la partícula 60S Figura 5. Por consecuencia sólo 12 PR es exclusivas de los eucariontes y se encuentran distribuidas entre las 2 subunidades con 6 PR en cada una. (Lecompte, Ripp, Thierry, Moras, & Poch, 2002)

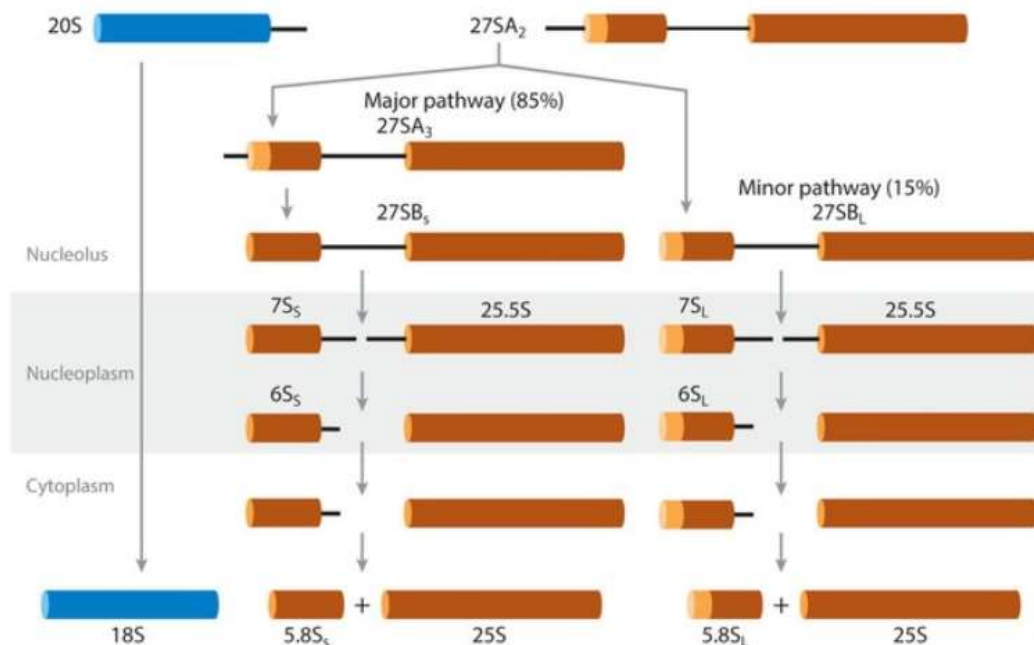


Figura 4 Ruta de síntesis del rRNA ribosomal eucarionte.

El RNA ribosomal 18S se sintetiza a través de una vía única, los RNA ribosomales 5.8 y 25S se sintetizan a través de dos vías. Siendo la vía mayor la responsable del 85% de la síntesis de estos ribosomas. Modifica de (de la Cruz, Karbstein, & Woolford, 2015)

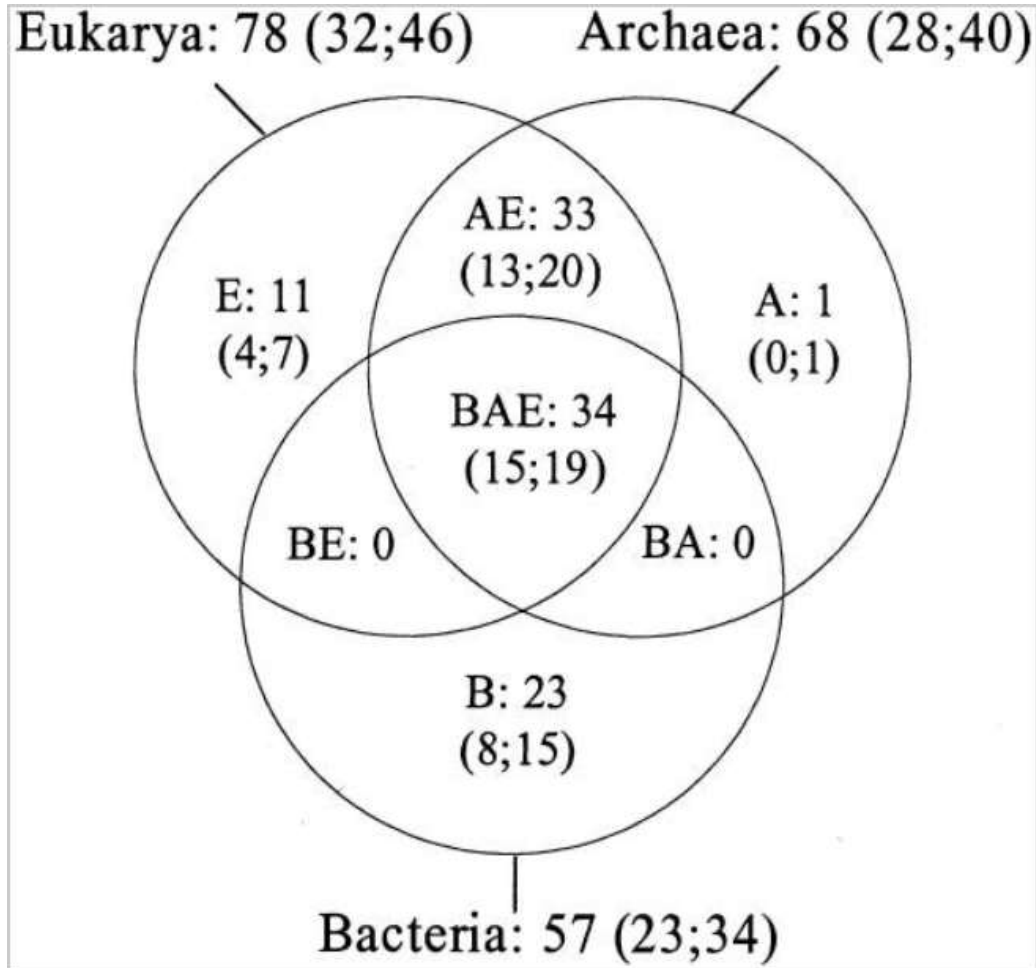


Figura 5 Diagrama de proteínas ribosomales compartidas y exclusivas de cada uno de los dominios de la vida.

El número de proteínas está indicado en cada círculo, los dos números entre paréntesis refieren al número de proteínas en la subunidad pequeña 40S y subunidad grande 60S respectivamente. A) Archea, B) Bacteria, C) Eukarya. Tomado de (Lecompte et al., 2002)

1.5 El tallo ribosomal.

El tallo ribosomal es un dominio funcional que presenta interacción con el dominio de actividad GTPasa de la subunidad 60S y con diferentes factores solubles de la traducción (Mandava et al., 2012). Esta estructura flexible se encuentra conservada en los 3 dominios de la vida, siendo una de las 2 proteínas conservadas entre los 3 dominios de la vida (Figura 4), en el caso de las bacterias se observa una estructura pentámera conformada por 2 dímeros de la proteína L12 (conocida como L7 en su forma acetilada) y una proteína central denominada uL10. En el caso de Archeobacterias se ha descrito por T. Nomura et al. (2008) la presencia de 3 dímeros de homólogos de L12 denominados P1 y la presencia de una sola copia de uL10

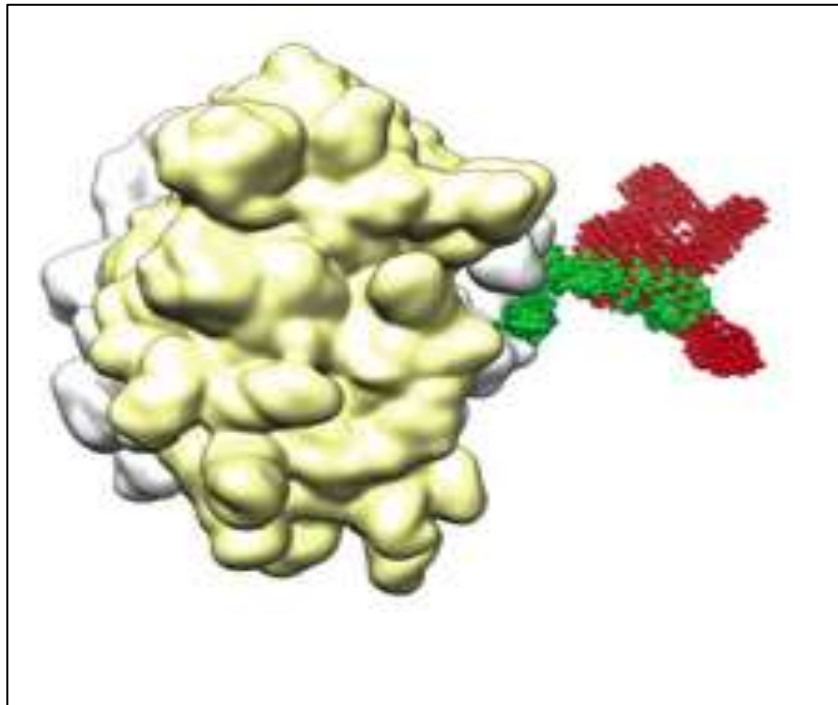


Figura 6 Mapa de Microscopía electrónica por criofractura de la partícula 80S de *S. cerevisiae*.

Datos del tallo por criofractura fueron reemplazados por la reconstrucción del tallo mediante los datos de SAXS de las RPPs (RPP1A, RPP1B, RPP2A y RPP2B) en rojo, junto a los datos obtenidos por cristalografía de rayos X de RPP0 (en verde). (Grela et al., 2012)

El tallo ribosomal eucarionte tiene las mismas funciones que su equivalente bacteriano, sin embargo hay diferencias que deben ser remarcadas (Tchorzewski, 2002);(Tchorzewski, Krokowski, Rzeski, Issinger, & Grankowski, 2003). El equivalente eucarionte posee 3 tipos de proteínas en su tallo ribosomal en contraste con sólo los 2 tipos en bacteria y archeas. El homólogo de L10 es la proteína Ribosomal RPP0 (uL10) que en su carboxilo terminal (CTD) posee una amplificación que asemeja el extremo terminal de las otras proteínas del tallo ribosomal. La presencia de esta sección en el CTD implica que el resto de las proteínas del tallo no sean esenciales, pudiendo así RPP0 realizar la función por si misma sin la necesidad del resto de las proteínas del tallo. En su conjunto las proteínas del tallo ribosomal también se conocen como “proteínas ribosomales ácidas”. Se ha resuelto la estructura tridimensional gracias a estudios realizados con Dispersion de Rayos X de Bajo Angulo (SAXS por sus siglas en ingles) los cuales han reportado en baja resolución la disposición espacial y estructural del tallo ribosomal en *S. cerevisiae* (Grela et al., 2012) Figura 4. RPP0 (en verde) presenta dos sitios de unión para proteínas ribosomales acidas (en rojo). (Krokowski et al., 2006)

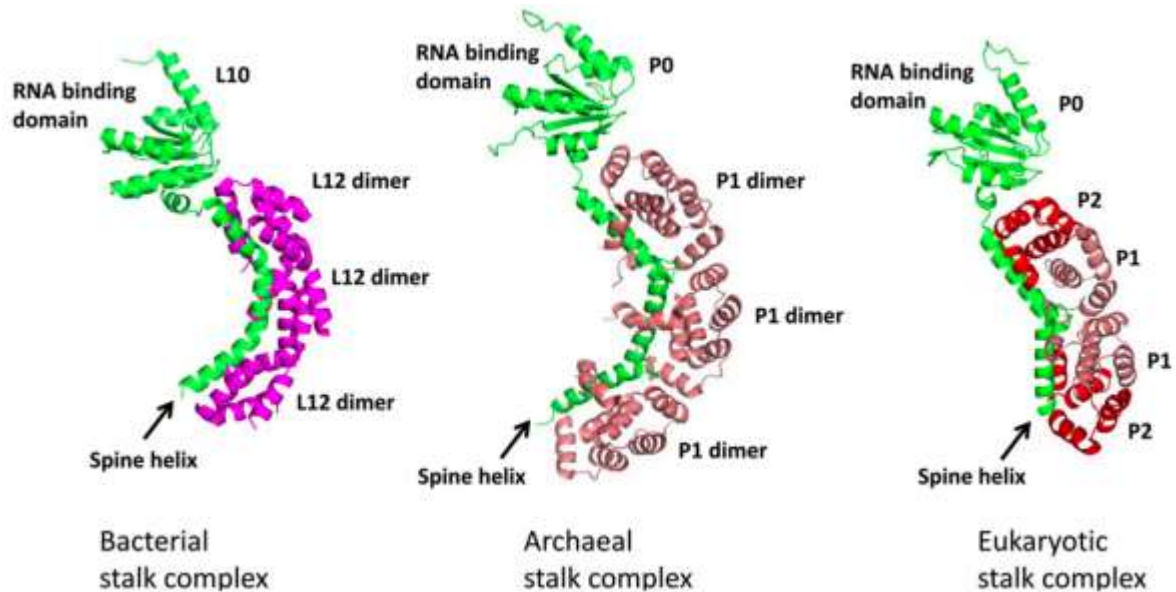


Figura 7 Estructura del tallo ribosomal mediante SAXS en *S. cerevisiae*.

Organización estructural de los tallos ribosomales bacterianos, arqueos y eucariotas. Las estructuras de los tallos bacteriano y arquea se determinaron mediante cristalografía de rayos X mientras que el modelo estructural del complejo. El tallo bacteriano está formado por uL10 (verde) y de 2 a 3 copias de dímeros L12 (magenta), mientras que el tallo de arqueas está formado por uL10 (P0) (verde) y 3 copias de homodímeros P1 (salmón). Por otro lado, el tallo eucariota está formado por uL10(P0) (verde), P1 (salmón) y P2 (rojo) en estequiometría 1:2:2 Modificado de(Choi, Wong, Lee, & Wong, 2015)

1.6 Proteínas ribosomales ácidas.

Se les denomina “ácidas” debido a su punto isoeléctrico que oscila entre 3 y 5 en contraste con las características básicas del resto de las proteínas ribosomales con $pI > 6$. Las proteínas ribosomales ácidas son blanco de numerosas cinasas como PK60 (Pilecki, Grankowski, Jacobs, & Gasior, 1992), CK2 (Kudlicki, Grankowski, & Gasior, 1976) y RAP cinasas (Bou, Remacha, & Ballesta, 2000). Por este motivo también son conocidas como proteínas P. Se clasifican de acuerdo a su homología con las proteínas del

tallo ribosomal de mamíferos (Wool, Chan, Gluck, & Suzuki, 1991). Esto permitió categorizarlas en los grupos P1 y P2, aunque ya se ha reportado la presencia de un grupo adicional en plantas, el grupo P3 (Bailey-Serres, Vangala, Szick, & Lee, 1997).

En el caso de eucariontes inferiores como *S. cerevisiae*, los grupos P1 y P2 han derivado en 4 proteínas: YP1A, YP1B, YP2A y YP2B. Cada una es codificada por un gen independiente RPP1A, RPP1B, RPP2A y RPP2B, siendo no esenciales para la supervivencia de la célula (Remacha, Saenz-Robles, Vilella, & Ballesta, 1988). Estas proteínas poseen un tamaño de 10-11 KDa e interactúan entre sí formando los heterodímeros 1α - 2β y 2α - 1β a través aminoácidos hidrofóbicos de su extremo amino terminal (N-terminal)(Jose, Santana-Roman, Remacha, Ballesta, & Zinker, 1995) siendo estas combinaciones las conformaciones más abundante y canónicas (Cardenas et al., 2012). Entre los dominios amino y carboxilo poseen una región central muy flexible rica en alanina y glicina denominada bisagra. El CTD de las proteínas ácidas está totalmente conservado entre todas las especies eucariontes (Tchorzewski, 2002).

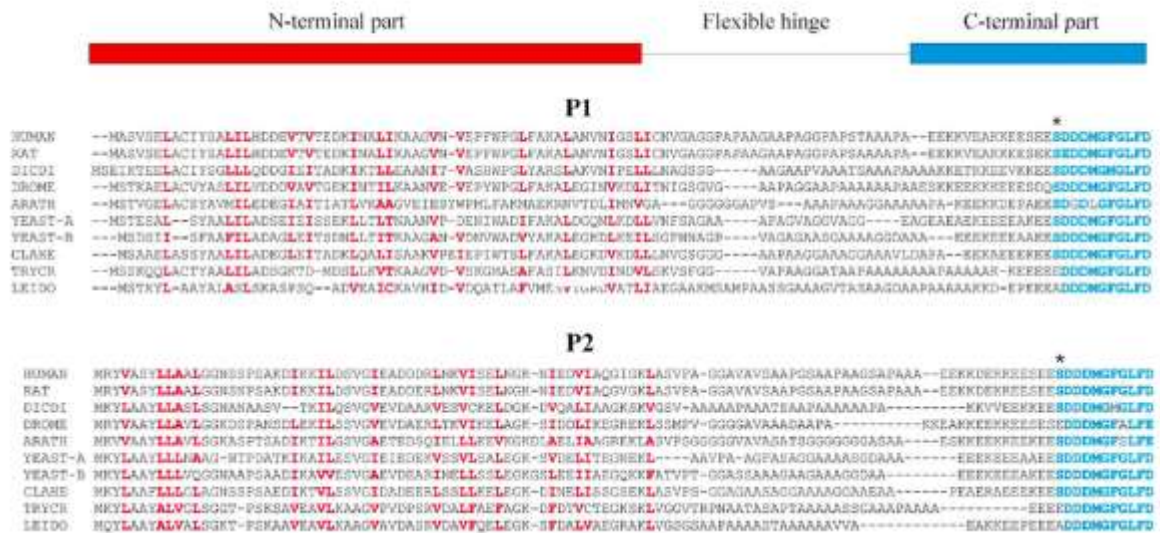


Figura 8 Alineamiento múltiple de la estructura primaria de RPPs de diferentes especies.

Secuencia primaria de aa de humano, rata, Dictyostelium discoideum, Drosophila melanogaster, Arabidopsis thaliana, S. cerevisiae (clase alfa), S. cerevisiae (clase beta), Cladosporium herbarum, Tripanosoma cruzi y Leishmania donovani. El N-terminal cuenta con un zipper hidrofóbico bilateral responsable de las interacciones proteína - proteína (barra roja) los aa hidrofóbicos están marcados en rojo. El CTD se indica con una barra azul y la secuencia conservada (de 11 aa) se indica en letras azules. Los sitios de fosforilación se indican con un asterisco. Tomado de (Tchorzewski, 2002)

La localización espacial de la estructura del tallo ha sido un tema ampliamente estudiado. Se ha logrado resolver que para la formación del tallo, uL10 actúa de soporte para los heterodímeros de las proteínas ácidas. La proteína uL10 posee dos sitios totalmente separados e independientes de unión para cada uno de los heterodímeros formados (Krokowski et al., 2006). En contraste con el resto de las proteínas ribosomales, es posible encontrar una poza citoplasmática (Saenz-Robles, Remacha, Vilella, Zinker, & Ballesta, 1990) de proteínas ácidas (Zinker & Warner, 1976). Esta poza citoplasmática ha sido descrita en numerosos organismos como: *Artemia salina* (van Agthoven, Kriek, Amons, & Moller, 1978), *S. cerevisiae* (Zinker, 1980; Zinker & Warner,

1976) y en mamíferos (Elkon et al., 1986). Otra característica a destacar es el intercambio activo que ocurre entre la poza citoplasmática y los ribosomas activos traduccionalmente; este evento no ocurre con ninguna otra de las proteínas ribosomales (Bautista-Santos & Zinker, 2014) (Tsurugi & Ogata, 1985). La fosforilación ocurre sobre un residuo de serina en posición 96 para P1 α , P1 β y P2 α , y en la posición 100 para P2 β (Nusspaumer, Remacha, & Ballesta, 2000). A diferencia del resto de las proteínas ribosomales que deben regresar al núcleo para ser ensambladas en el ribosoma (Bautista-Santos & Zinker, 2014), Figura 9, las proteínas ácidas ribosomales no presentan transporte activo al núcleo (Tchorzewski et al., 2003) únicamente uL10 permanece de manera fija en el ribosoma, pero su incorporación al tallo se da en el citoplasma en los últimos pasos de la biogénesis ribosomal.

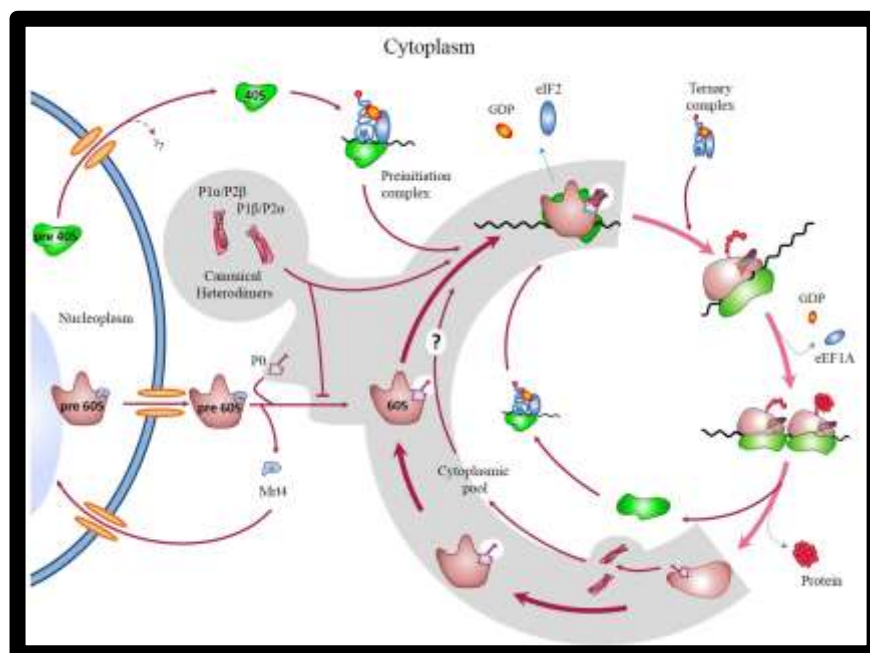


Figura 9 Modelo de intercambio activo de RPPs en la fracción 80S de las poblaciones ribosomales.

Las RPPs no se unen a la subunidad 60S libre pero si se incorporan a las partículas 80S y los polisomas en el momento en que estos comienzan a realizar la traducción. Adicionalmente las RPPs se separan de P0 cuando el proceso de traducción finaliza siendo desconocido, hasta el momento, si se incorporan a la poza o se van a una vía de degradación. (Bautista-Santos & Zinker, 2014)

1.7 Interacciones del tallo ribosoma con otros factores I.

El CTD de las RPPs interactúa con diferentes factores solubles de la traducción; se ha caracterizado la asociación con el factor eEF2 con el tallo, esto es descrito por el contacto que se observó por Crio-EM en el dominio I del factor, específicamente entre los aa Q176–T191 (Spahn et al., 2004). Por ensayos de “*Pull-down*” se demostró la interacción entre P0 y eEF2 con eIF5 (Zanelli et al., 2006). Este factor es capaz de interactuar con las proteínas P2, sin embargo se demostró que uL10 suple la interacción en ausencia de las proteínas P2. De esta manera el tallo es la estructura involucrada en el contacto indirecto de eIF5 con la partícula 80S. Finalmente en un estudio masivo de interacciones en el proteoma de *S. cerevisiae*, se describe la interacción del tallo ribosomal con eIF6 (Ho et al., 2002). Estudios enfocados en la localización celular de las RPPS describen su presencia en la membrana celular, sin embargo las interacciones y funciones que pudieran estar ejerciendo en esta localización no están completamente caracterizadas (Boguszewska, Tchorzewski, Dukowski, Winiarczyk, & Grankowski, 2002) Figura 10.

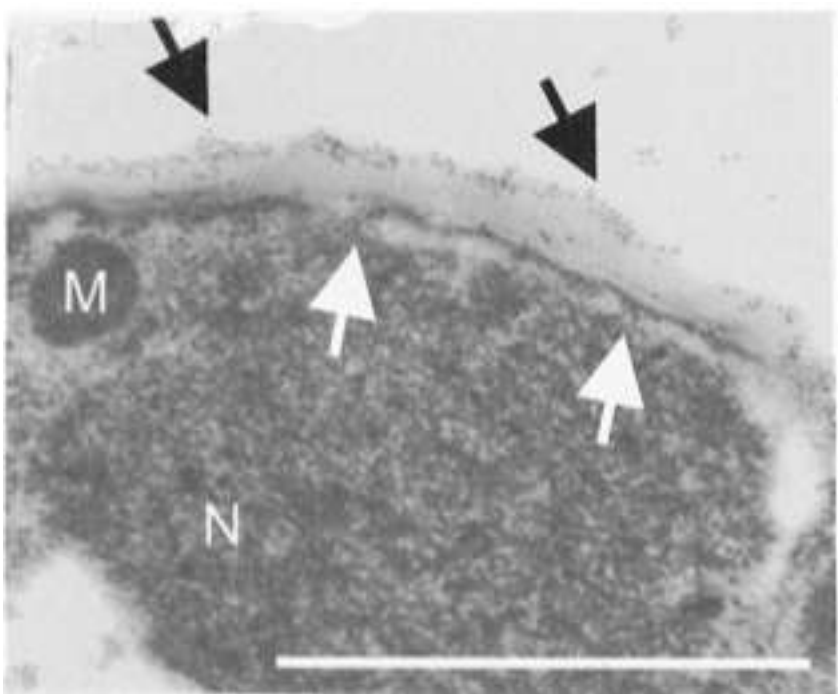


Figura 10 Micrografía electrónica de ribosomas en *S. cerevisiae* detectadas por inmunomarcaje con antiRPPS acoplados a oro coloidal.

Vista magnificada 14000X de una sección de una célula de *S. cerevisiae*. Las flechas negras indican partículas de oro en la pared celular y las flechas blancas indican los ribosomas asociados con el retículo endoplasmático: N: Núcleo, M: mitocondria. Modificado de (Boguszewska et al., 2002)

1.8 Participación del tallo ribosomal en la traducción.

El proceso de traducción involucra sucesivos pasos: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento. El tallo ribosomal (ul10(Honda et al., 2017) y RPPs) ha sido propuesto como un sitio de contacto y reclutamiento de factores de la traducción (Honda et al., 2017). Esta propuesta nace en base a la característica en común de las proteínas ribosomales ácidas, la formación de oligómeros que se unen a una estructura central en para formar un tallo

pentamérico (o heptamérico en algunas bacterias (Diaconu et al., 2005) y estructura pentamérica en eucariontes. Previamente ya se había explorado que el intercambio activo entre la poza citoplasmática y el ribosoma proveía un potencial regulador de la traducción (Gonzalo & Reboud, 2003).

El tallo ribosomal se encuentra espacialmente localizado en las inmediaciones del centro con actividad GTPasa (GAC), esta región ribosomal se encuentra funcionalmente conservada y es requerida para conferir la actividad de hidrólisis del GTP de factores de la traducción. (Tanzawa et al., 2018).

2 ANTECEDENTES

Como se había mencionado previamente, el tallo se encuentra estructuralmente conservado, (Shimizu et al., 2002). Se ha observado que las proteínas eucariontes RPPs no cuentan con ningún dominio de interacción al RNA ribosomal. Y de manera in vitro solo se ha podido observar la formación de un complejo estable RPPs-RNA con la adición de uL10, el cual si posee un dominio de unión al RNA, lo cual sugiere la necesidad de la interacción de las RPPs con uL10 para poder interactuar con el ribosoma. Shimizu y colaboradores demostraron la necesidad del complejo uL10.P1/P2 en un modelo de ribosoma híbrido (Ribosoma procarionte, tallo eucarionte), para esto en un ensayo in-vitro se revelo el requerimiento de la estructura para la funcionalidad del ribosoma en su actividad GTPasa y su capacidad para la síntesis de cadenas de fenilalanina. Figura 11.

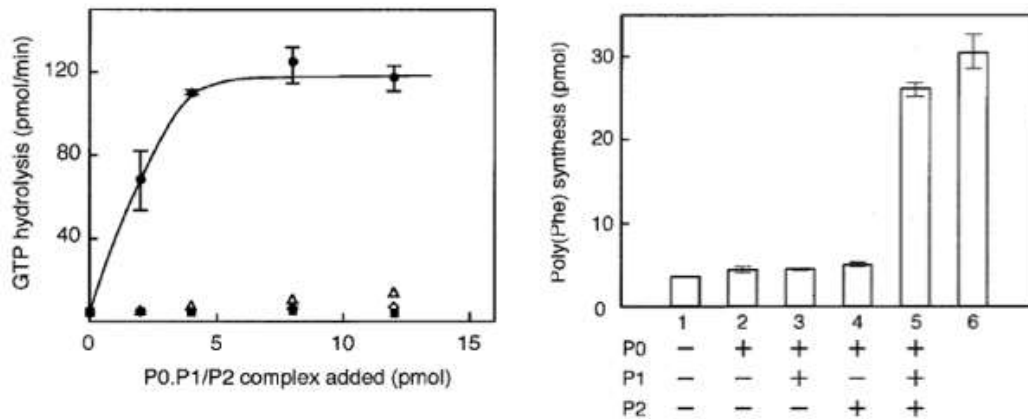


Figura 11 Ensayo funcional de uL10, P1 y P2 purificados en un sistema híbrido con ribosomas de *E. coli*

Hidrólisis del GTP: Usando ribosomas de *E. Coli* deficientes en L10 (uL10), y L7/L12 (2.5pMol) fueron pre incubados en 10 µl de una solución con cantidades crecientes del complejo P0 (uL10).P1/P2 (círculos negros) o una mezcla de complejo P1/P2 (diamantes vacíos) y P0 (UL10) solo (cuadrados negros). Estas muestras fueron evaluadas para actividad GTPasa dependiente del factor eucariótico eEF-2 purificado de hígado de cerdo. Observándose que cuando se adiciono el complejo P0 (uL10).P1/P2 (círculos negros) la actividad de GTPasa es proporcional a la cantidad adicionada. Síntesis de poli fenilalaninas: Ribosomas de *E. Coli* deficientes en L10 (uL10), L7/L12 fueron pre incubados en una solución sin proteínas P (uL10, P1P2), con uL10, uL10+P1, uL10+P2 o el complejo uL10.P1/P2. Observándose que la actividad de síntesis se recupera ante la adición del complejo P0 (uL10).P1/P2 a la reacción. Modificado de (Shimizu et al., 2002)

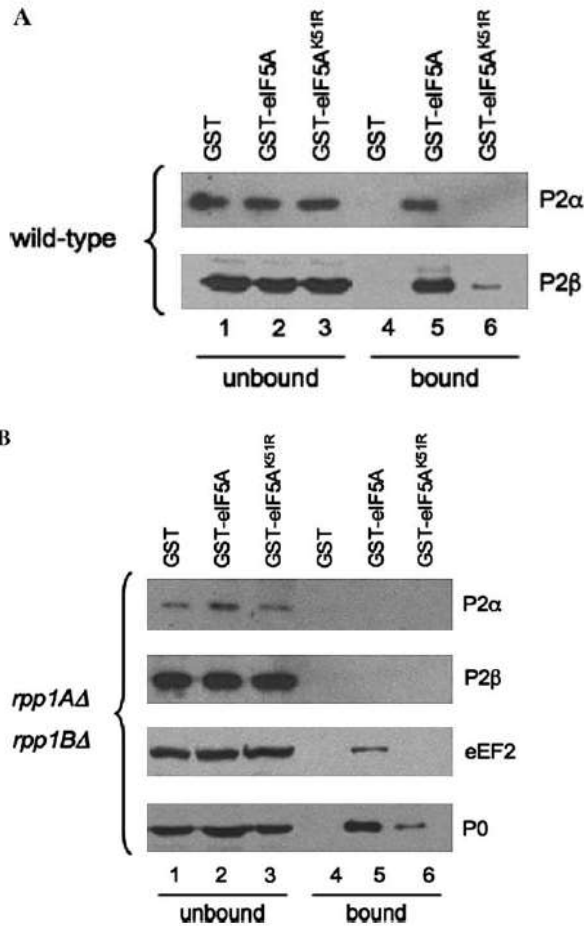


Figura 12. Ensayos de Pull down. uL10 (P0) es capaz de interactuar con eIF5A aun en ausencia de los heterodímeros P1/P2.

Western blot de ensayos de Pull down usando anticuerpos específicos. A) copurificación de 2A y 2B. Copurificación de uL10 (anteriormente P0) en ausencia de proteínas P1A, P1.

Zanelli y colaboradores en 2006 describieron ensayos de *Pull-down* de eIF5A donde detectaron a uL10, demostrando así la interacción física con esta proteína en condiciones in vivo figura 12A, adicionalmente describieron que la

interacción era independiente de la existencia de los heterodímeros P1/P2 para que la interacción se mantuviera. Siendo necesaria la existencia de los heterodímeros para que se diera la interacción con eIF5A. La interacción con eIF5A y el tallo ribosomal permite la asociación del factor aEF2 a dicha interacción. Esta interacción permanece aunque se eliminen las proteínas de la clase P1, pudiéndose inferir que el CTD de P0 es suficiente para mantener la interacción descrita entre estos factores con el ribosoma (Zanelli et al., 2006) Figura 12B.

En 2012 Nomura y colaboradores en el modelo de *Archea Pyrococcus horikoshii* describieron que el CTD conservado de las RPPs , en específico aP1 se une de manera directa al dominio I del factor de elongación aEF-2, independientemente si este factor se encontraba asociado a GTP (figura 13) o GDP. Mediante mutagénesis dirigida se pudo describir que son 4 aminoácidos del CTD de aP1 necesarios para que esta interacción se realice. Adicionalmente se describe que aP1 es capaz de interactuar con aIF5B a través de su CTD. Interesantemente, se demostró que el tallo heptamérico de *P. horikoshii* podía reclutar múltiples proteínas de aEF2 de manera simultánea. Lo que nos indicaría que el tallo ribosomal en conjunto con sus heterodímeros presenta múltiples sitios de incorporación para el factor descrito. Este hecho promovería la habilidad del tallo ribosomal de mantener una alta concentración de factores de la traducción antes y después de la hidrólisis de GTP por parte del centro de actividad GTPasa del ribosoma, lo cual permite promover la eficiencia ribosomal (N. Nomura et al., 2012). Los resultados descritos también permiten inferir que el arreglo del centro con actividad GTPasa del ribosoma y su cambio de afinidad con los factores de traducción no es influenciado y es independiente de las RPPs. Sin embargo, es importante denotar que la cantidad de RPPs disponibles en el tallo tienen

un efecto directo en la capacidad de la actividad GTPasa. En el modelo de Archea esto explicaría la necesidad de múltiples copias de aP1 para una eficiente traducción.

Comparaciones de la estructura del tallo de archeas/eucariontes exhibe diferencias estructurales en las regiones ya identificadas en bacterias de los CTD de L7 y L12 (análogos RPPs). Lo cual nos sugiere que el proceso de reclutamiento probablemente fue adquirido de manera independiente entre estos grupos (T. Nomura et al., 2008)

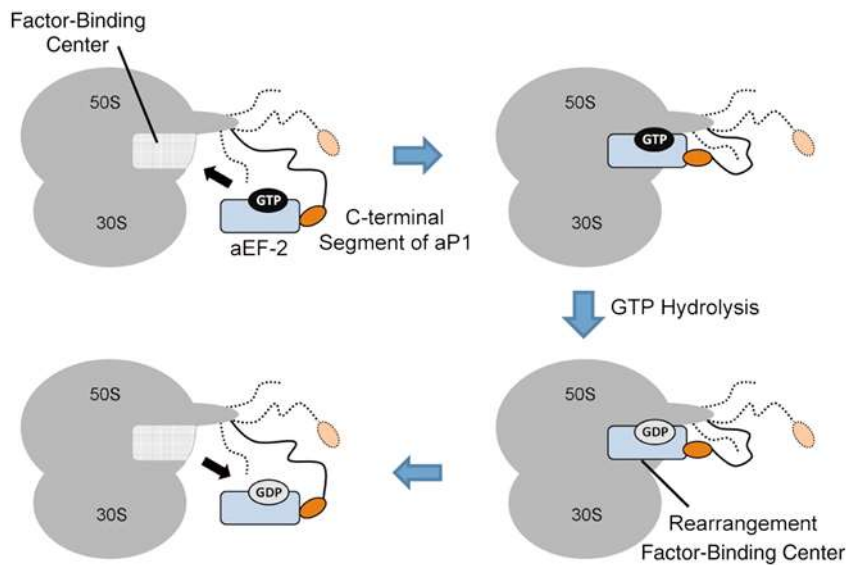


Figura 13 Representación esquemática de la interacción independiente de nucleótidos de aP1 con el factor de elongación aEF2.

Se observa en naranja el CTD de una copia de aP1 del tallo ribosomal. En el tallo de Archea pueden existir hasta 6 copias de aP1 unidas a uL10. Se esquematiza que el CTD de aP1 interactúa con el factor de elongación aEF2, lo acerca al centro de actividad GTP del ribosoma independientemente si se encuentra asociado a GTP o GDP. La línea punteada representa la región flexible de la proteína ubicada entre su amino terminal y su CTD. (N. Nomura et al., 2012)

En condiciones de estrés osmótico y eliminación de glucosa del medio, se pudo observar en mutantes de *Saccharomyces* que carecían de las RPPs, la alteración en la fosforilación del factor eIF2a. La fosforilación de eIF2a en un

evento crucial en la regulación de la síntesis de proteínas en respuesta a una variedad de eventos de estrés ambiental. Esta fosforilación conlleva a una inhibición general de la traducción y a la síntesis de proteínas de conjunto de RNA mensajeros necesarios para la respuesta a la modificación ambiental promoviendo la supervivencia celular (Jimenez-Diaz, Remacha, Ballesta, & Berlanga, 2013). Se describió que las depleciones de P1 y P2 en *S. cerevisiae* afectan directamente la fosforilación de eIF2a mediada por la cinasa GCN2. Durante el crecimiento de cultivos de mutantes carentes de P1/P2 se pudo observar que la fosforilación de eIF2 en fase estacionaria se ve drásticamente disminuida ante la ausencia de estas proteínas en la cepa D4567 (Δ P1A, P1B, P2A, P2B) Figura 14. La participación de P1/P2 en este proceso de fosforilación fue también evaluada de manera In Vitro mediante la adición de la fracción SP, consistente en heterodímeros recuperados de ribosomas purificados de una cepa de *S. cerevisiae* sin mutaciones. La fracción SP adicionada a un extracto traduccional libre de células fue capaz de recuperar la fosforilación de eIF2a, demostrándose así la participación de estas proteínas para la fosforilación de eIF2A in vitro.

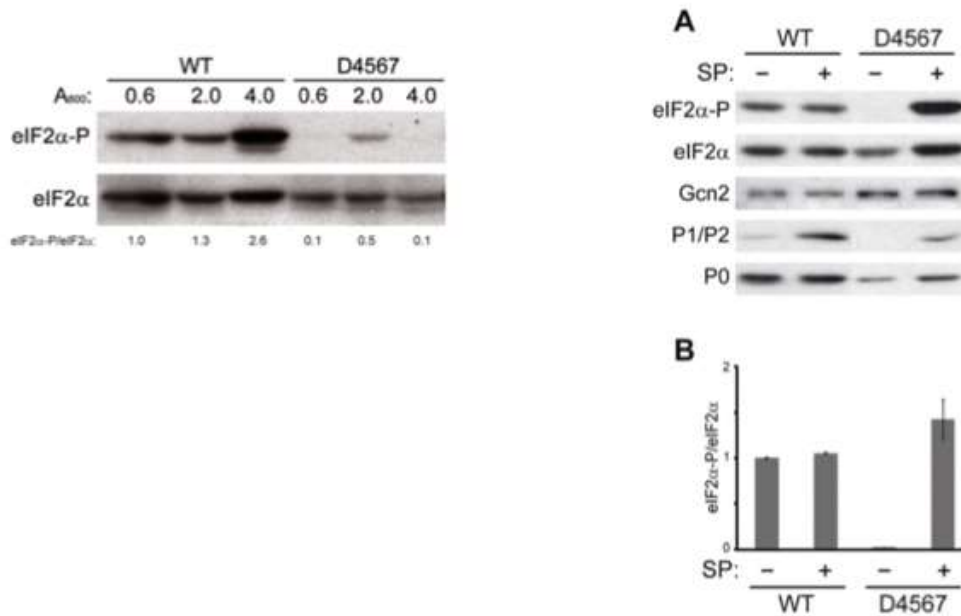


Figura 14 Fosforilación de eIF2A en ausencia y presencia de P1/P2 en el tallo ribosomal.

Izquierda: Se observa que la fosforilación de eIF2a se encuentra ausente o en baja proporción en células carentes de P1/P2. Derecha A: Ensayo de traducción invitro en un sistema libre de células, con adición de fracción SP (P1/P2). Derecha B: la proporción de eIF2A/eIF2A-P no cambia con la adición de SP en extractos de células Wt, sin embargo se restaura ampliamente la fosforilación en extractos de células carentes de P1/P2. **Modificado (Jimenez-Diaz et al., 2013)**

En el grupo de trabajo de biología molecular del ribosoma eucarionte, CINVESTAV, se describió que las partícula 60S “de novo” (que completa su maduración en el citoplasma) y la partícula 60S proveniente del proceso de reciclamiento de subunidades al final de la traducción no presentaban interacción con las proteínas P1 y P2. Esto fue descrito tras observarse que los componentes del tallo ribosomal P1A, P1B, P2A, P2B solo podían recuperarse de la subunidad 60S solamente cuando esta se encontraba asociada a las subunidad 40S(Bautista-Santos & Zinker, 2014) en la fracción 80S del perfil ribosomal, y en la fracción polisomal traduccionalmente activa Figura 14.

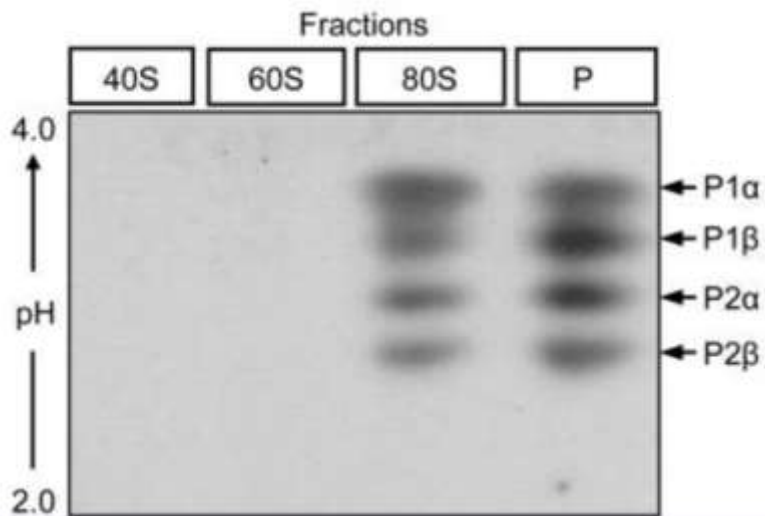


Figura 15 Isoelectroenfoque de fracciones de perfil ribosomal.

Mediante la separación por isoelectroenfoque en un gradiente de pH 2 a 4. Se realizó la separación de las RPPs. Se incluyó la subunidad 40S como control negativo. **Modificado de (Bautista-Santos & Zinker, 2014)**

3 Justificación

Las proteínas ribosomales acidas presentan características únicas dentro del grupo de proteínas ribosomales como son la presencia de una poza citoplasmática y el recambio activo entre la poza citoplasmática y el ribosoma que se encuentra en traducción. Pese a la evidencia acumulada aún desconocemos el papel funcional del tallo ribosomal por el cual presenta la asociación/disociación activa del ribosoma, determinar su rol dentro del proceso de traducción ayudaría a explicar la necesidad de una estructura temporal en el ribosoma durante la síntesis de proteínas.

4 Hipótesis.

El tallo ribosomal es una estructura reclutadora de factores de la traducción por lo cual el cambio de su composición tendrá consecuencias en el proceso de la traducción.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general.

Establecer la función de las RPPS del tallo ribosomal, YP1A, YP1B, YP2A y YP2B, de *Saccharomyces cerevisiae* en el proceso de traducción.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterización fenotípica de variaciones no canónicas en el tallo ribosomal.

1.1 Construcción y caracterización del crecimiento en una cuádruple mutante de RPPS, y en mutantes simples de RPPs

1.2 Caracterización fenotípica. Fuentes de carbono fermentable y no fermentable. Sensibilidad a inhibidores específicos de la traducción.

Análisis de defectos en la traducción.

2.1 Estudiar las poblaciones 40S, 60S y 80S en deletantes simples y cuádruple.

2.2 Análisis de la relación Polisomas /monosoma en deletantes simples y cuádruples.

2. Determinar si las afectaciones observadas en las poblaciones ribosomales son producto de la biogénesis ribosomal. Determinar si las afectaciones observadas en las poblaciones ribosomales son debido a alteraciones en el proceso de inicio de la traducción.

3. Determinar si el proceso de elongación se encontraba afectado en modificaciones al tallo/RPPS.

4. Determinar si el proceso de reciclamiento de ribosomas presentaba alteraciones en ausencia del tallo/RPPS.

6 Material y métodos

6.1 Organismo.

Saccharomyces cerevisiae W303-1B (Mat- α , leu 2-3, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, his 3-11 o 15, can 1-100) (Rothstein, Esposito, & Esposito, 1977) Se cultivó en medio rico YEPD (30g/L YEP+ 20g/L dextrosa y 94mg/L AdeSO₄) a 24°C. (Bautista-Santos & Zinker, 2014).

Deletantes sencillas de cada RPPs y una triple mutante fueron amablemente proporcionadas por Juan Pedro García Ballesta (Center of Molecular Biology, Severo Ochoa). Estas cepas fueron construidas en W303-1B (Mat- α , leu 2-3, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, his 3-11 o 15, can 1-100). La cepa cuádruple mutante fue construida usando la triple mutante D467-I (Δ P2A, Δ P1B and Δ P1A) transformada con la construcción presente en pMRH45 (Remacha, Santos, & Ballesta, 1990) para la disrupción del gene RPPS2B por la inserción de HIS3 como se describe previamente (Rothstein, 1983).

6.2 Cultivo de células.

Se creció un cultivo de *S. cerevisiae* en YEPD hasta alcanzar una Densidad Óptica (D.O.) $> 2.0_{600\text{nm}}$ (las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Jenway 6305) y se almacenó a 4°C (Stock). En 80 ml de YEP se colocó un inóculo del stock a una dilución 1:200 y se permitió su crecimiento en agitación (agitador orbital modelo G76 de New Brunswick Scientific) hasta 0.4-0.7 D.O._{600nm} para obtener células de la fase logarítmica temprana y hasta 1.5 D.O._{600nm} a 24°C para obtener células en fase logarítmica tardía. Para la obtención de células en fase estacionaria se utilizaron cultivos de >36 horas a 24°C en agitación.

Para los ensayos de spot (goteo), las suspensiones de células se prepararon mediante diluciones seriadas a 10 veces y posteriormente se colocaron spots en placas de agar YEPD con inhibidores de traducción; 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 o 0.1 $\mu\text{g/ml}$ Cicloheximida (CHX) o YEP con diferentes fuentes de carbono: glucosa,

galactosa, etanol o glicerol, todos al 2%. Las células se cultivaron a 23 °C durante un máximo de 3 días (Wawiorka et al., 2017).

6.3 Determinación de tamaño celular.

Se cosecharon 4×10^6 células por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% mediante un mezclado lento. Tras 1 hora de fijación con etanol a temperatura ambiente, se resuspendieron 0.3 ml de la suspensión celular en 1 ml de PBS frío (Delobel & Tesnière, 2014). A continuación, se sónico brevemente (5") esta suspensión y se determinó el tamaño celular relativo mediante el BD FACSCalibur™. Se analizaron 1×10^4 células por cepa por triplicado, y se realizaron tres experimentos biológicos independientes.

6.4 Análisis del perfil de ribosomas mediante gradientes de sacarosa

Los cultivos de levadura se incubaron en medio YPD a 23 °C en un agitador orbital hasta la mitad de la fase logarítmica (1,0 D.O. 600 nm). Se añadió Cicloheximida (CHX) a una concentración final de 100 µg/ml y se colocaron los cultivos en un baño de hielo durante 4 minutos, después de que las células se procesaron como se ha establecido previamente (Bautista-Santos & Zinker, 2014). Se cargaron 90 unidades de D.O. 260 sobre gradientes de sacarosa del 10% al 45%, en tampón TMN (Bautista-Santos & Zinker, 2014) y se centrifugaron durante 4.5 horas a 11200 g a 4°C en un rotor SW28Ti (Beckman-Coulter). Los gradientes se exploraron a 254 nm en el fraccionador de gradiente de densidad ISCO Brendel UA-5. Para obtener el perfil ribosómico de cada deletante en las mismas condiciones, cada ensayo se realizó en la misma fase de crecimiento con la misma densidad celular a 600 O.D. Para el análisis del perfil ribosómico en condiciones de run off(X. Yan,

Hoek, Vale, & Tanenbaum, 2016) (Wawiorka et al., 2017) (eventos post iniciación de traducción) las células no fueron tratadas con CHX para permitir que continuara el proceso de elongación por parte de los ribosomas. A continuación, para permitir la elongación de los ribosomas, los extractos celulares se incubaron durante 20 minutos a 30 °C, y luego se cargaron en el gradiente de sacarosa (Wawiorka et al., 2017). Las mediciones de las diferentes áreas bajo la curva se realizaron con el software ImageJ (Rueden et al., 2017).

6.5 Ensayo de tiempo de vida cronológico en medio sintético definido (SD)

Después de 3 días de crecimiento en medio SD líquido, se tomaron 0.08 D.O. a 600 nm y se diluyeron en series 1:10 seis veces en agua destilada estéril, y se colocaron spots de 2 µl en placas de agar YEP, y se cultivaron durante 72 horas a 24°C, las células que presentaron crecimiento el día 3 se consideran la población superviviente (Iadevaia, Caldarola, Tino, Amaldi, & Loreni, 2008). Se dio seguimiento por 31 días.

6.6 Ensayo de recuperación traduccional desde la fase estacionaria

Las cepas de levadura se cultivaron a 23 °C en un agitador orbital durante 72 horas. A continuación, el cultivo se dividió en dos: uno de ellos se centrifugó a 300 g durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en medio fresco YEPD durante 10 min con agitación. Después, esta mitad y la otra se prepararon para realizar el análisis del perfil ribosómico (Wang et al., 2018).

6.7 Ensayo de disociación de 80S

Para determinar la capacidad de disociación de la partícula 80S se realizó un marcaje homogéneo de las proteínas ribosomales por adición al medio de H3-

Leu. Y un marcaje para las proteínas ribosomales “de novo” mediante un pulso de ^{35}S -Met. La medición de la radiación presentada por ambos isotopos permitió determinar en fracciones purificadas de 80S (libres de polipéptidos en traducción y factores de traducción) a diferentes tiempos posteriores al pulso, la cantidad de ribosomas de novo presentes en la fracción 80S y la permanencia de la marca radioactiva en esa etapa. (Bautista-Santos & Zinker, 2014; Fingerman, Nagaraj, Norris, & Vershon, 2003; Warner, 1971)

Las células se cultivaron hasta un D.O. de 1.0 a 600 nm en 10 ml de medio mínimo líquido SD con 37 kBq de ^3H Leucina (37 MBq/ml) para marcar todas las proteínas de manera uniforme. Las células se recogieron y se lavaron con medio mínimo sin ^3H Leucina SD tres veces y se resuspendieron en 10 ml de medio mínimo sin ^3H Leucina SD. Se añadieron 37 KBq de ^{35}S Metionina (actividad específica: 377,4 MBq/ml), se incubó durante 20 minutos. Posteriormente, basado en (Bautista-Santos & Zinker, 2014; Fingerman et al., 2003; Warner, 1971), se determinó como tiempo cero, se recogieron 2 ml de cultivo cada 3 minutos hasta un total de 9 minutos y se trataron con CHX en baño de hielo durante 15 minutos. Se prepararon extractos celulares a partir de estas muestras colectadas, adicionalmente se mezclaron 50 unidades de D.O. (a 260 nm) de extractos de células frías que crecieron en condiciones estándar en medio YEPD con células de extractos etiquetados y se cargaron en gradiente de sacarosa. El perfil de ribosomas se realizó como se ha descrito previamente, la fracción 80S se colectó y purificó después de centrifugar a 225000 g durante 14 h a 4 °C a través de 8 ml de un gradiente discontinuos de sacarosa al 20% y 12 ml, de sacarosa al 40% en un rotor de 50Ti en tampón LMS [2]. Para obtener las subunidades 40S y 60S disociadas sin ningún factor traduccional ni péptidos nacientes, la pastilla 40S/60S se solubilizó en Buffer TMN, luego las proteínas se precipitaron con TCA al 10% (concentración final) enfriado en hielo en filtros Whatman y se determinaron

los recuentos por minuto (c.p.m.) en un contador de centelleo (Beckman LS6000).

Para medir la disociación de los ribosomas, la cantidad de metionina S35 incorporada a las proteínas ribosomales (denominadas nuevas subunidades) se normalizó con la leucina H3 incorporada a las proteínas ribosomales (denominadas antiguas subunidades), de modo que al trazar este aspecto con respecto al tiempo se puede obtener la cantidad de nuevas subunidades presentes en la partícula 80S y también su disminución gradual del complejo purificado 80S.

7 Resultados.

7.1 Caracterización fenotípica de células con conformaciones no canónicas el tallo del ribosoma eucarionte.

Se han determinado previamente diferentes roles para cada RPPs, esto se apoya en el análisis de la estructura del tallo eucariota, en el que como se ha

observado, las proteínas P1 se localizan internamente en la estructura pentamérica del tallo ribosomal con sus CTD teniendo una capacidad de interacción restringida mientras que las proteínas P2 son más externas y accesibles para interactuar con otros componentes celulares (Qiu et al., 2006), esta situación ofrece muchas posibilidades cuando se cambia la estructura canónica. Las RPPS son intercambiables formando parejas canónicas o no canónicas como se ha observado anteriormente y la estructura pentamérica en el ribosoma puede completarse en ausencia de una de ellas mediante pares no canónicos (Cardenas et al., 2012). Sin embargo, esta disposición no canónica induce la expresión de diferentes patrones proteicos, esta variación se ha propuesto que es debido a la afectación de la traducción de ciertos ARNm (Remacha, Jimenez-Diaz, Bermejo, et al., 1995). Para evaluar el impacto de estos cambios, utilizamos cepas de levadura en las que cada copia nativa de P1A, P1B, P2A, P2B carecían de expresión por interrupción génica (Remacha et al., 1990; Remacha, Santos, Bermejo, Naranda, & Ballesta, 1992) (una representación esquemática de las interrupciones se muestra en la Fig. 16) de manera individual y en una cuádruple mutante de todas las RPPS. Las cepas de levadura utilizadas en este estudio permiten analizar la configuración de seis tallos: cuatro proteínas de longitud completa con conformaciones canónicas (cepa Wt), conformaciones no canónicas (cepas mutantes $\Delta P1A$, $\Delta P1B$, $\Delta P2A$, $\Delta P2B$) y un mutante cuádruple que carece de todos los elementos del tallo ($\Delta RPPS$) (Fig. 17).

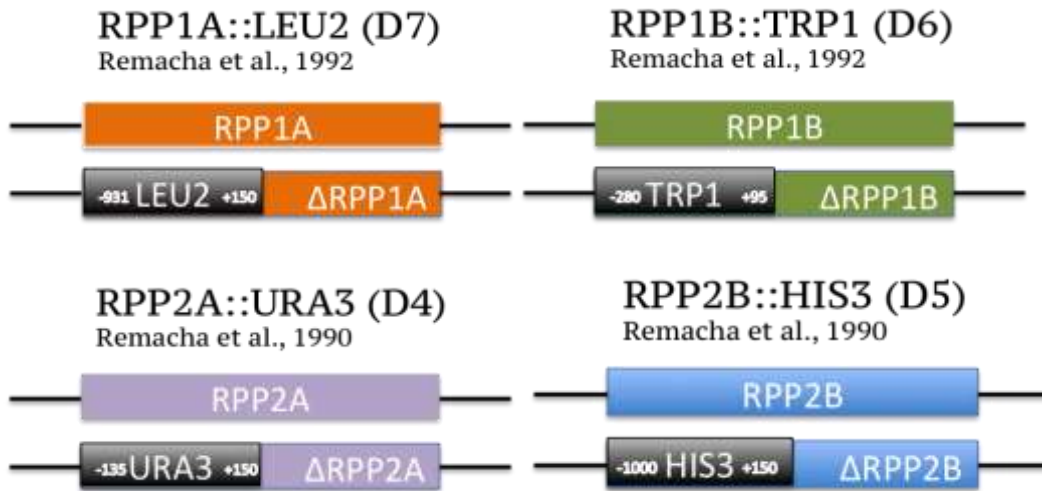


Figura 16 Esquema de disrupciones génicas utilizadas en *S. cerevisiae* W303.

Se esquematizan las disrupciones génicas empleadas en *S. cerevisiae* W303 para la interrupción de la expresión de las RPPs. Las auxotrofias empleadas se consideran de muy baja a nula posibilidad de reversión.

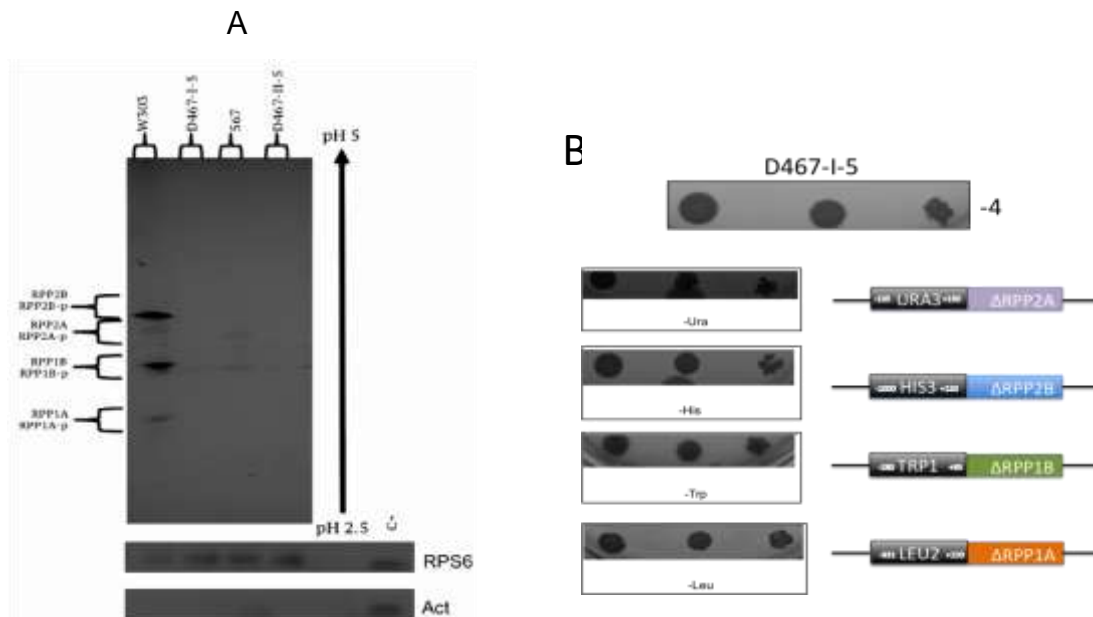


Figura 17. Construcción de cuádruple deletante de RPPs.

A) Isoelectroenfoque para visualizar las RPPs de *S. cerevisiae* W302, Cuádruple deletante D467-I-5 ($\Delta 1A$, $\Delta 1B$, $\Delta 2A$, $\Delta 2B$), triple deletante 567 ($\Delta 1A$, $\Delta 1B$, $\Delta 2B$), Cuádruple deletante D467-II-5 ($\Delta 1A$, $\Delta 1B$, $\Delta 2A$, $\Delta 2B$). B) Ensayo de goteo para evaluar la presencia de las auxotrofias usadas para la disrupción génica de las RPPs.

Todas las cepas mutantes demostraron ser viables, sin embargo al analizar la capacidad de utilizar fuentes de carbono, se observó que las células $\Delta 2B$ eran incapaces de utilizar fuentes de carbono no fermentables, como el etanol y el glicerol (Fig. 18). La cuádruple $\Delta RPPS$ muestra cierta dificultad para utilizar fuentes de carbono fermentables como la maltosa en contraste con las otras cepas que son capaces de fermentar todas las fuentes de carbono probadas (Fig. 18A). Para entender si una deletante específica estaba afectada en un lapso en específico del proceso de traducción como la elongación, se evaluó la respuesta de las cepas de a inhibidores específicos de la traducción. Para ello, se determinó la sensibilidad a los antibióticos capaces de bloquear la translocación ARNm-ARNt un paso posterior de la elongación (Geneticin G418 y glutarimida CHX). Las células $\Delta P1A$ y $\Delta P2A$ mostraron una mayor sensibilidad al antibiótico CHX. Las células $\Delta P1A$ también mostraron sensibilidad a G418 (Fig. 19). Estos datos sugieren que la sensibilidad depende de la configuración del tallo. Esta información sugiere que existe un papel individual para cada RPPS en la célula posiblemente a través de la combinación adoptada en el tallo ribosomal. Las células en crecimiento de los mutantes simples y cuádruples mostraron una morfología celular similar a la del tipo silvestre (S1).

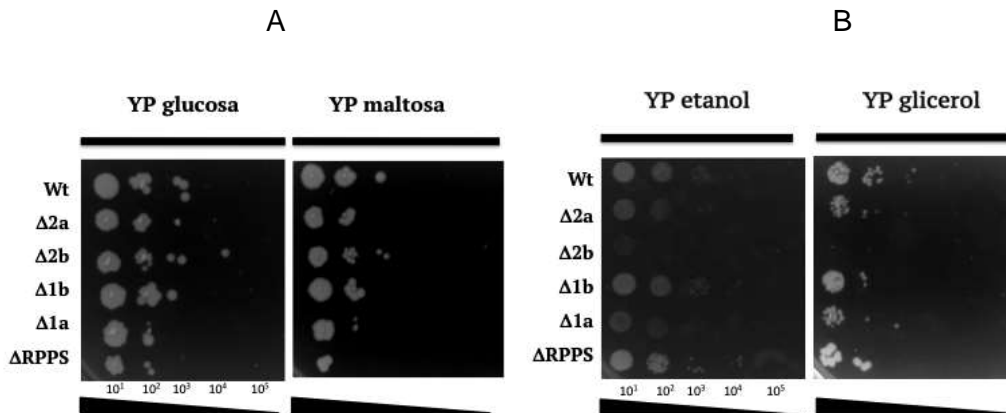


Figura 18. Estudios de crecimiento mediante siembra por goteo con diferentes fuentes de carbono fermentable y no fermentable.

La cepa Wt y las cepas deletantes fueron sembradas por goteo de diluciones seriadas de un cultivo con una OD_{600nm} y se permitió el crecimiento por 3 días. A: Análisis de crecimiento por spots de diluciones seriadas en medio suplementado con una única fuente de carbono fermentable 2% glucosa y 2% maltosa. B: Análisis de crecimiento por spots de diluciones seriadas en medio suplementado con una única fuente de carbono fermentable 2% etanol y 2% glicerol. n=3

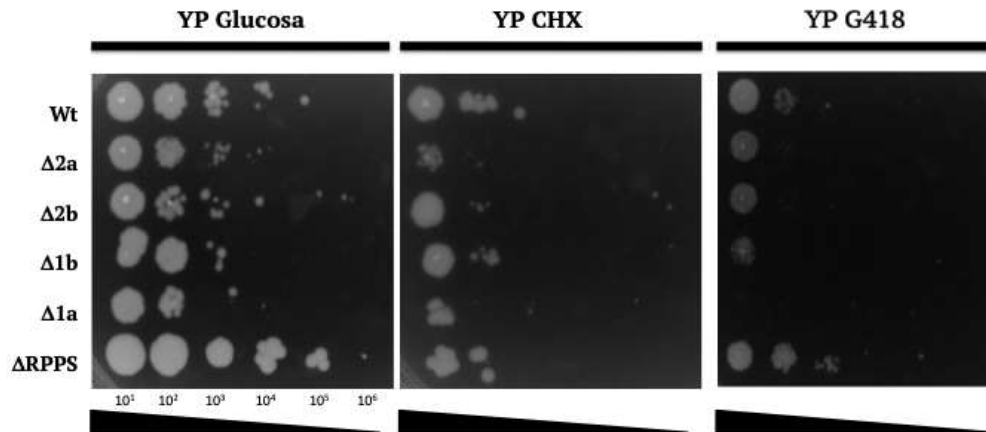


Figura 19. Estudios de sensibilidad a antibióticos específicos del proceso de elongación de la traducción.

La cepa Wt y las cepas deletantes fueron sembradas por goteo de diluciones seriadas de un cultivo con una OD_{600nm} y se permitió el crecimiento por 3 días en medio suplementado con 0.1 µg/ml CCHX o 100 µg/ml G418. Se puede observar que Δ1a es más sensible al inhibidor G418 ya que su crecimiento se vio interrumpido. n=3

7.2 Caracterización de la maquinaria traduccional con diferentes composiciones del tallo ribosomal.

Para observar si la composición del tallo ribosomal es importante en el proceso traduccional, se realizaron perfiles ribosomales en deletantes simples y cuádruples. Este enfoque permitió determinar los cambios en la relación polisoma-monosoma (P/M) en todas las cepas. (Fig. S1). El análisis del perfil del ribosoma en el mutante cuádruple reveló una falta de subunidades 40 y 60S libres, mientras que los mutantes simples muestran cambios en la cantidad de poblaciones de subunidades 40 y 60S libres (Fig. 20). Para evaluar si estas variaciones pueden haber sido causadas por defectos en la biogénesis ribosomal, se realizó un ensayo de vida cronológica. Este ensayo mostró que, en comparación con una cepa de tipo silvestre, la falta de RPPSs simples tiene un efecto negativo en la duración de la vida, ya que ésta se acorta significativamente; este fenotipo es opuesto a lo que se espera cuando se consideran las alteraciones de la biogénesis ribosomal. Por el contrario, la deletante cuádruple mostró un aumento importante en la duración de la vida, (un 50%) en comparación con las deletantes simples (Figura 21).

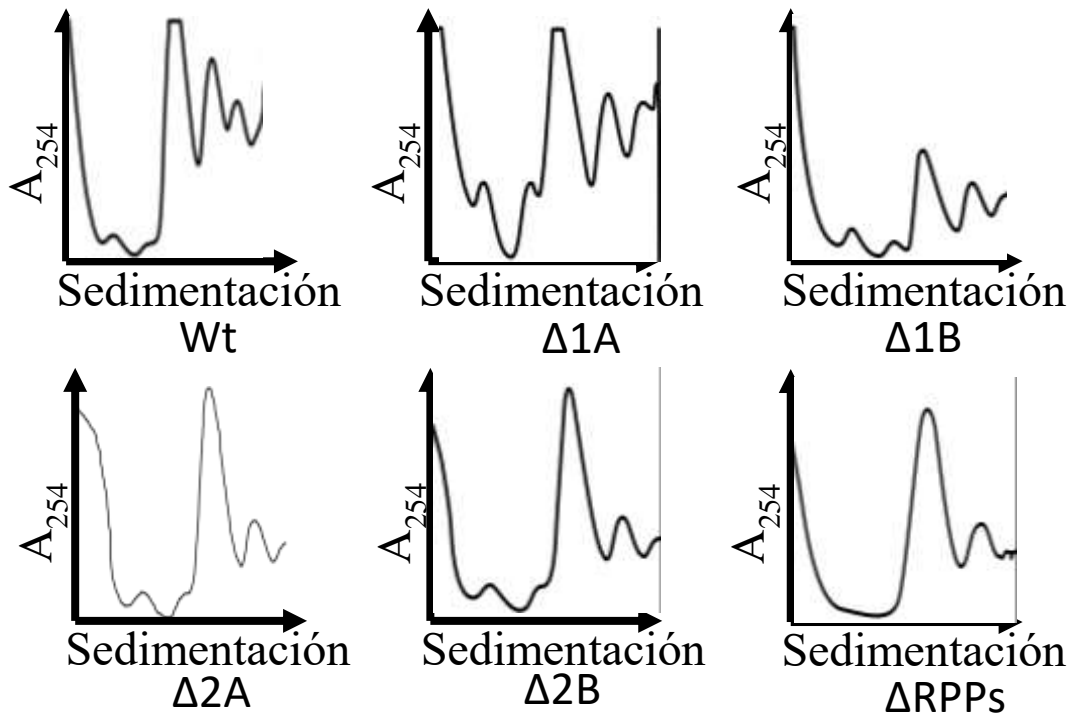


Figura 20. Análisis del perfil ribosomal de la cepa Wt, deletantes simples y cuádruple mutante

Se puede observar alteraciones en el patrón de distribución de las diferentes poblaciones ribosomales 40S, 60S, 80S y polisomas en cada uno de las cepas, tanto $\Delta 1A$, $\Delta 1B$ $\Delta 2A$ $\Delta 2B$, interesantemente en $\Delta RPPs$ no se observa la presencia de poblaciones 40S y 60S. n=6

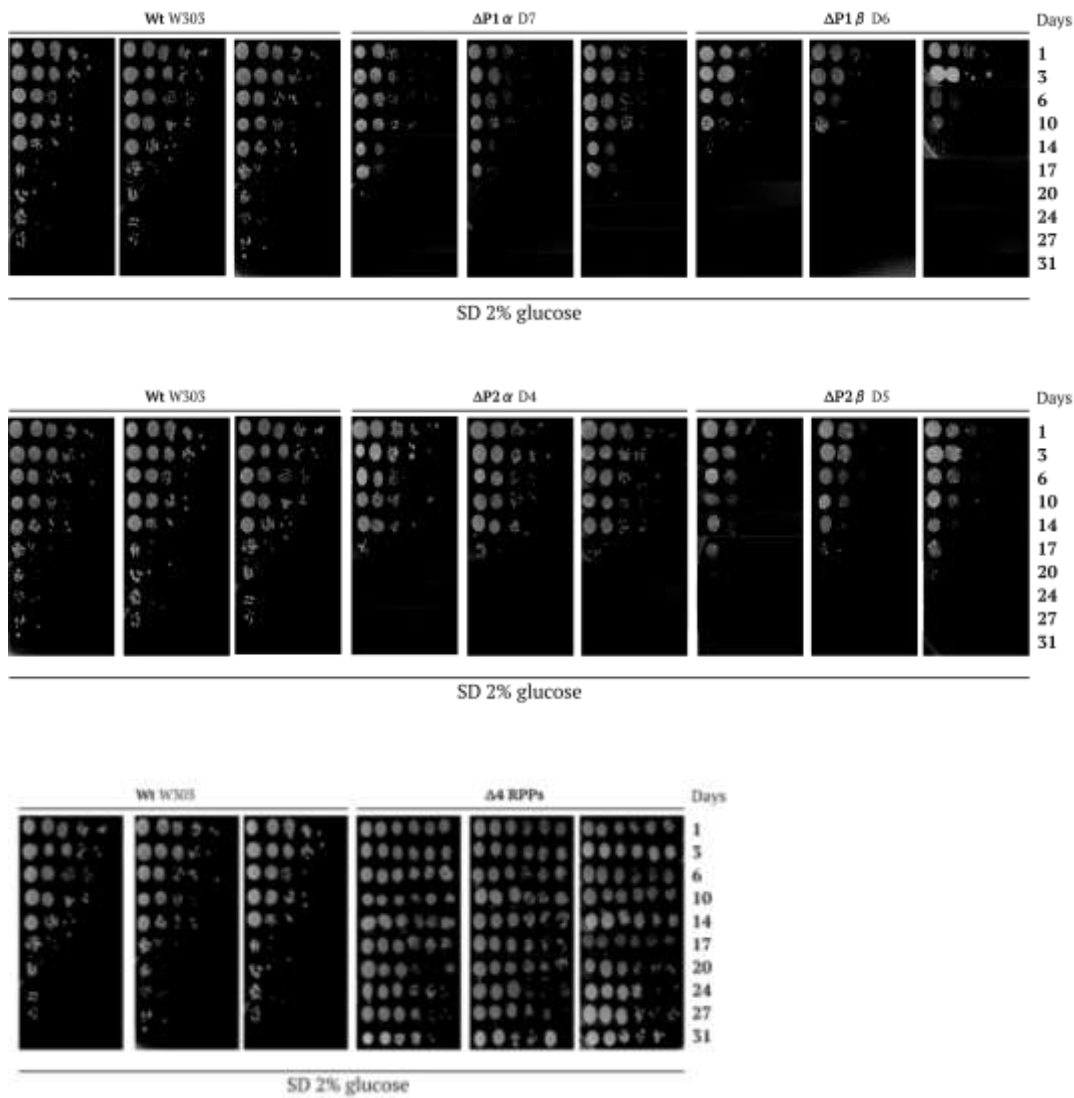


Figura 21. Ensayo de tiempo de vida cronológico en deletantes simples y quádruple deletante de RPPs.

A partir de cultivos líquidos de Wt, $\Delta 1$, $\Delta 1B$, $\Delta 2A$, $\Delta 2B$ y $\Delta 1A1B2A2B$ en YEPD en agitación se tomaron alícuotas a 0.1 DO 600nm y se realizaron diluciones seriadas 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y se sembraron por goteo en placas YEPD, se permitió su crecimiento por 72 horas. Este experimento se realizó durante 31 días con colecta de muestras en los días indicados en la figura. n=3

7.3 Análisis del proceso de traducción durante los eventos posteriores a la iniciación.

Debido a que la evidencia sugería que el proceso biogénesis ribosomal no estaba implicada en los cambios de las poblaciones de subunidades libres 40S y 60S, exploramos la capacidad de cada uno de los deletantes RPPS simples y cuádruples en eventos de iniciación de la traducción. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de recuperación de la traducción desde la fase estacionaria (Ashe, De Long, & Sachs, 2000), en este escenario donde la glucosa del medio se agotó todas las unidades ribosomales existen en una fase de hibernación caracterizada por la ausencia de población polisomal y subunidades libres, la traducción puede ser reiniciada al colocar las células en medio fresco, esto tiene como consecuencia directa el reinicio del proceso de traducción, él puede ser visualizado con la aparición de la fracción polisomal obtenida mediante el perfil ribosomal (Wang et al., 2018). Los resultados muestran que, aunque la mayoría de las cepas mutantes $\Delta 1B$, $\Delta 2A$ y $\Delta 2B$ fueron capaces de reiniciar el proceso de traducción sin diferencias significativas en comparación a la cepa Wt, los deletantes simples $\Delta 1A$ y cuádruple ($\Delta 1A1B2A2B$) mostraron una ligera disminución de la fracción polisomal en comparación con la cepa de tipo silvestre, mientras que el resto de los otros mutantes simples de RPPS tenían un fenotipo similar al de la cepa de tipo silvestre Figura 21.

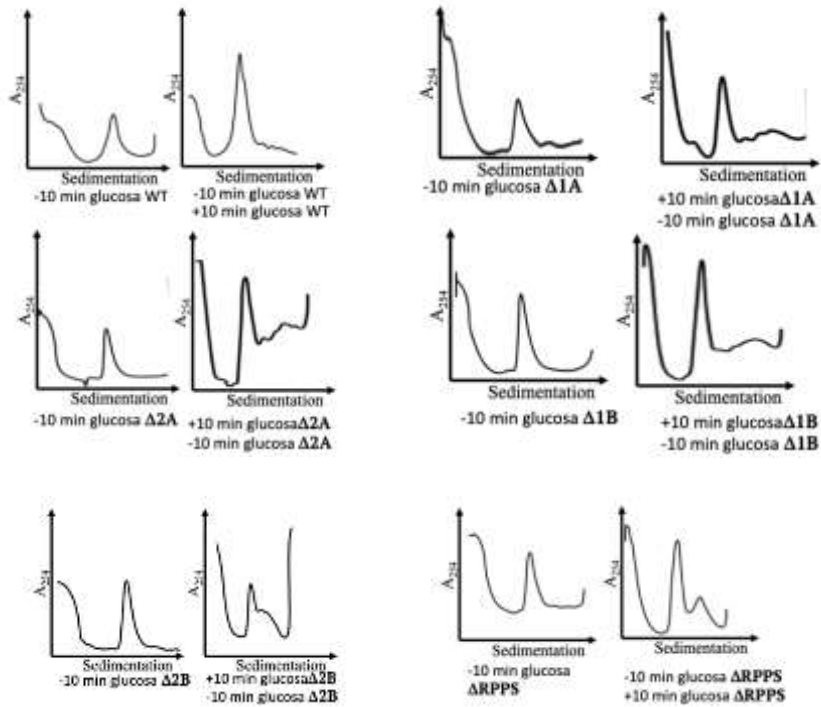


Figura 21 Análisis de reiniciación de la traducción.

Perfil ribosomal de cultivos que antes y después que las células estuvieran en medios carentes de glucosa, la adición de glucosa al medio permitió la recuperación de la fracción polisomal en cada uno de los casos estudiados. n=3

A continuación, se llevó a cabo un ensayo sin bloqueo de la traducción (no se usó CHX) en el cual se permitió que los ribosomas completaran las rondas de elongación en las cuales estaban participando, esto se visualizó sobre el perfil ribosómico en ausencia de CHX al visualizar las fracciones ribosomales.

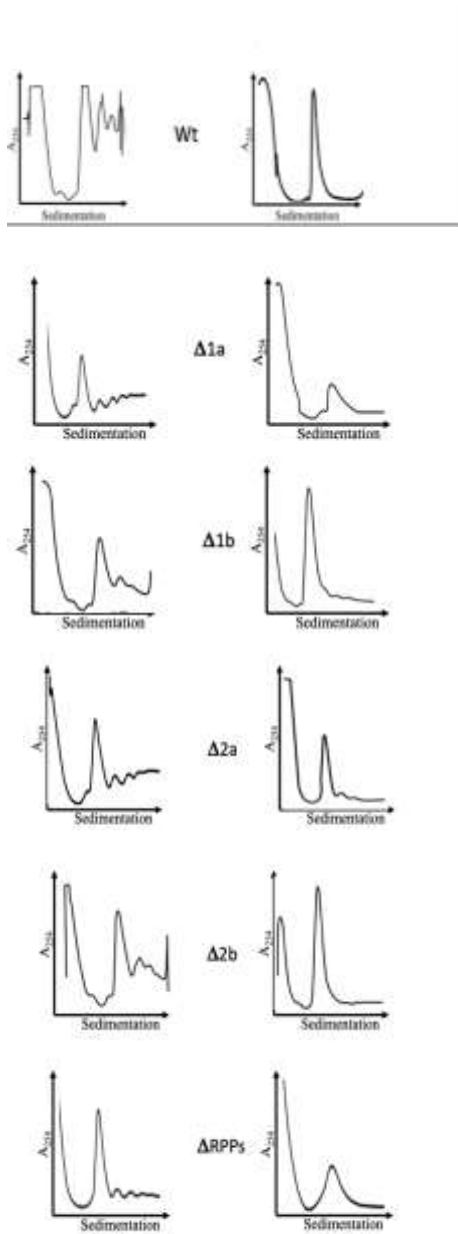


Figura 22 Las ausencias de RPPs no retrasan la terminación de las rondas de elongación de los ribosomas presentes en la fracción polisomal.

Al realizar perfiles ribosomales de extractos celulares sin ningún bloqueador específico de la traducción (CHX) se pudo observar en todos los casos que los ribosomas asociados a mRNA en la fracción polisomal fueron capaces de concluir las rondas de traducción en las que estaban involucrados. n=3

Estos resultados mostraron que todas las cepas mostraban una ausencia completa de la fracción polisomal Figura 22, lo que sugiere fuertemente que la diferente composición de los tallos no tenía efecto un posible efecto significativo en el proceso de elongación durante la traducción y que esta no era la causa de los cambios en las poblaciones de subunidades libres 40S y 60S observadas en las células con variaciones no canónicas del tallo ribosomal y la carencia de poblaciones libres de 40S y 60S en las células carentes de RPPs.

7.4 Reciclaje de los ribosomas al final del proceso de traducción.

Dado que las diferencias observadas en las subunidades libres 40S y 60s no fueron causadas por perturbaciones en la biogénesis ribosomal y que los datos experimentales sugieren que la iniciación y elongación en ribosomas con diferente conformación del tallo tampoco estaban implicados, se analizó la tasa de disociación de las subunidades de la fracción 80S. Para ello, se estableció un nuevo ensayo denominado "OLD VS NEW" Este ensayo comienza con un etiquetado in vivo homogéneo de 40S y 60S con Leu H3, después se añadió un segundo etiquetado Met S35 para incorporarlo a las nuevas subunidades sintetizadas, a continuación se cosecharon partículas 80S de los perfiles ribosómicos a diferentes tiempos y se purificaron a través de un colchón de sacarosa para obtener una mezcla de subunidades nuevas (Met S35) y viejas (Leu H3) como se describe en los métodos. La cantidad de ribosomas nuevos, cuantificado por S35 ppm. Fue normalizada con la

cantidad de ribosomas viejos Leu H3 c.p.m., se estimó trazando los valores para obtener la permanencia de subunidades nuevas en la partícula 80S respecto al tiempo. Observándose cuando el ribosoma carece de RPPs las nuevas subunidades mostraron una mayor permanencia en la partícula 80S en contraste con la cepa de tipo silvestre Figura 22. Estos resultados sugieren la participación de las proteínas ácidas ribosomales en el proceso de disociación de las subunidades de la partícula 80s.

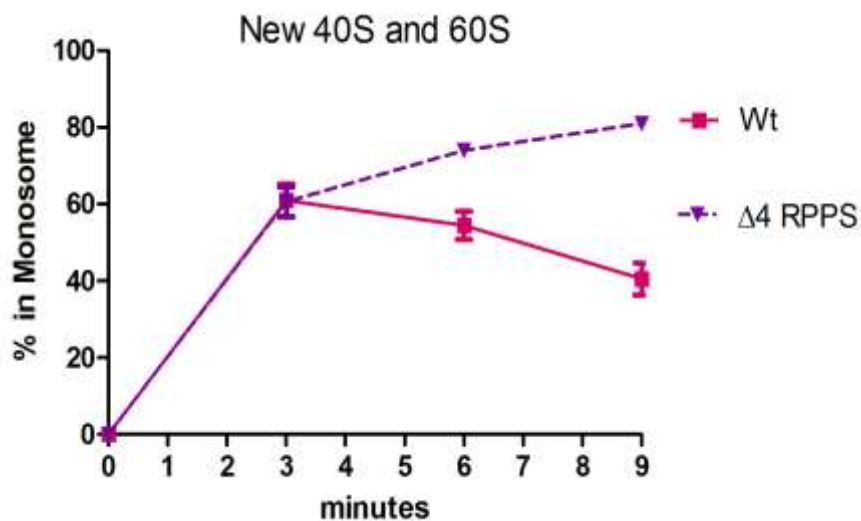


Figura 23. Medición de permanencia de las nuevas subunidades ribosomales recién sintetizadas con Met-S35 en la fracción 80S (monosome).

En ensayos de marcaje metabólico radioactivo in vivo se puede observar que la señal obtenida de las nuevas subunidades ribosomales recién sintetizadas (triángulos morados) de la cepa carente de RPPs permanecían un mayor tiempo

asociadas en la partícula 80S en comparación con la cepa silvestre (cuadrados rosas).

8 Discusión.

En este trabajo se han analizado las diferencias de actividad traduccional entre las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* W303 (cepa silvestre) y mutantes simples deletéreas de cada uno de los genes de las proteínas ribosomales acidas de *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que una cuádruple mutante deletérea de cada una de estas RPPs. Al igual que cualquier otro estímulo o cambio sufrido por la célula, las perturbaciones en esta estructura esencial provocan una respuesta, que consideramos esta mediada por el cambio en la composición canónica o la sola presencia de la estructura mínima de funcionamiento uL10. Las células de los mutantes empleados en este trabajo se encuentran en dicho estado de adaptación a la composición de su tallo, alterada con respecto a la cepa silvestre W303.

El tallo ribosomal exhibe un intercambio dinámico dentro del ribosoma (Zinker & Warner, 1976) (Tsurugi & Ogata, 1985) datos experimentales anteriores sugieren que la estructura pentamérica completa en la subunidad 60S libre es tóxica para la célula y esta es la razón por la que se desasocia parcialmente de la subunidad 60S libre (Bautista-Santos & Zinker, 2014) Cuando la estructura pentamérica está completamente ensamblada, el tallo ribosómico actúa como un sitio de acoplamiento capaz de reclutar factores traduccionales para posteriormente relocalizarlos a los centros GTPasa (Murakami et al., 2018; Naganuma et al., 2010). Esta función es posible a través de los RPPSs y el dominio CTD de uL10 (Remacha, Jimenez-Diaz, Bermejo, et al., 1995;

Santos & Ballesta, 1995), curiosamente cuando el tallo carece de todas las estructuras laterales (RPPSs), no se detecta ninguna pérdida de función durante el proceso de traducción (Santos & Ballesta, 1994). Sin embargo, ningún arreglo canónico en la estructura completamente ensamblada exhibe cambios drásticos en su funcionalidad (Remacha et al., 1990). Por lo tanto, se planteó la cuestión de si la presencia de proteínas ribosomales ácidas desempeña un papel diferente según la configuración presentada y los diferentes estados de fosforilación que pudieran presentar.

La disposición no canónica induce cambios en la respuesta al estrés ambiental. Estudios anteriores sobre mutantes con depleciones de RPPSs de manera individual exhibieron cambios en el crecimiento, la aptitud de traducción in vitro y la tolerancia al estrés salino (Remacha et al., 1990) (Jose et al., 1995; Remacha, Jimenez-Diaz, Bermejo, et al., 1995; Remacha, Jimenez-Diaz, Santos, et al., 1995) En consecuencia, nuestros datos también exhiben alteraciones tales como un crecimiento deficiente para la cepa mutante en 2B al crecer en una fuente de carbono no fermentable y este fenotipo puede ser debido a la disposición no canónica que presentaban los ribosomas de esa cepa en su tallo ribosomal, esto sugiere que la proteína acida 2A podría desempeñar un papel individual en el tallo ribosomal en el contexto del metabolismo de carbono. Además, se observó un aumento de la sensibilidad a la CHX, un inhibidor específico del proceso de elongación durante la traducción en las cepas con mutación simple en 1A y 2A, estos resultados reflejarían una deficiencia con impacto crónico en el desarrollo de la traducción, ya que no se obtuvieron los mismo resultados en ensayos de corta duración, como el caso de los ensayos de evaluación de eventos de pos iniciación. En consonancia con nuestros resultados, estudios anteriores

utilizando deletantes individuales que igualmente sufrieron la modificación canónica del tallo mostraron cambios en los patrones de expresión de proteínas ante estas modificaciones (Remacha, Jimenez-Diaz, Bermejo, et al., 1995). Sin embargo, cuando a la estructura del tallo ribosomal por mutación deletérea se impidió la expresión de las RPPs y en consecuencia perdió los elementos laterales, todos los efectos descritos en los mutantes individuales no fueron observados. Estos datos apoyan un papel individual de las proteínas ribosomales ácidas en el tallo ribosomal. Dado que los datos de regulación del tamaño de la célula muestran que no se ve afectada en los mutaciones simples o cuádruples nos podría significar la ausencia de efectos traducionales en *S. cerevisiae*, al menos en periodos cortos (Turner, Ewald, & Skotheim, 2012). Por el contrario, otros informes que utilizan un aproximación mediante ensayos *in vitro* en ausencia de RPPs revelaron un retraso importante en el proceso traduccional (Baba, Tumuraya, Tanaka, Yao, & Uchiumi, 2013) (Remacha, Jimenez-Diaz, Bermejo, et al., 1995; Remacha, Jimenez-Diaz, Santos, et al., 1995) esto podría explicarse por el diferente enfoque experimental utilizado, de ensayo *in vitro* en comparación con un enfoque *in vivo* (nuestro caso).

Las proteínas P1/P2 regulan las poblaciones de ribosomas en el citoplasma. El efecto más importante sobre la homeostasis celular observado en este estudio son los cambios de las poblaciones ribosomales. Estos cambios nunca se habían asociado a las proteínas ribosomales ácidas y, hasta donde sabemos, es la primera vez que se describe una correlación con las diferentes composiciones del tallo ribosomal inducidas en este trabajo. Como hemos demostrado mediante perfiles ribosomales, el cambio en la disposición canónica del tallo afecta la cantidad de subunidades 40S y 60S libres. La falta de todas las RPPs exhibe el cambio más drástico en las poblaciones ribosomales, una dramática reducción de las subunidades 40S y 60S libres,

sugiriendo que las proteínas ribosomales ácidas pueden tener un papel en el mantenimiento de la homeostasis de estas poblaciones ribosomales.

Estos últimos datos podrían explicar por qué en modelos de estudio in vitro del tallo ribosomal, la ausencia de las RPPs (Baba et al., 2013) (Remacha, Jimenez-Diaz, Bermejo, et al., 1995; Remacha, Jimenez-Diaz, Santos, et al., 1995) produce un marcado efecto en la capacidad de traducción de los ensayos in vitro. Nosotros proponemos que los resultados observados en estos modelos se deben al agotamiento de las subunidades 40S y 60S disponibles para la traducción in vitro de esos modelos de aproximación por el retraso en el reciclamiento de las subunidades en el experimento, lo cual dio como resultado la aparente afectación a la capacidad traduccional de las partículas 80S estudiadas.

Para elucidar si esa fue la consecuencia de los resultados observados sería conveniente evaluar el modelo in vitro con un exceso de 40S libre y 60S libres para poder evaluar la capacidad traduccional de la partícula 80S carente de RPPs.

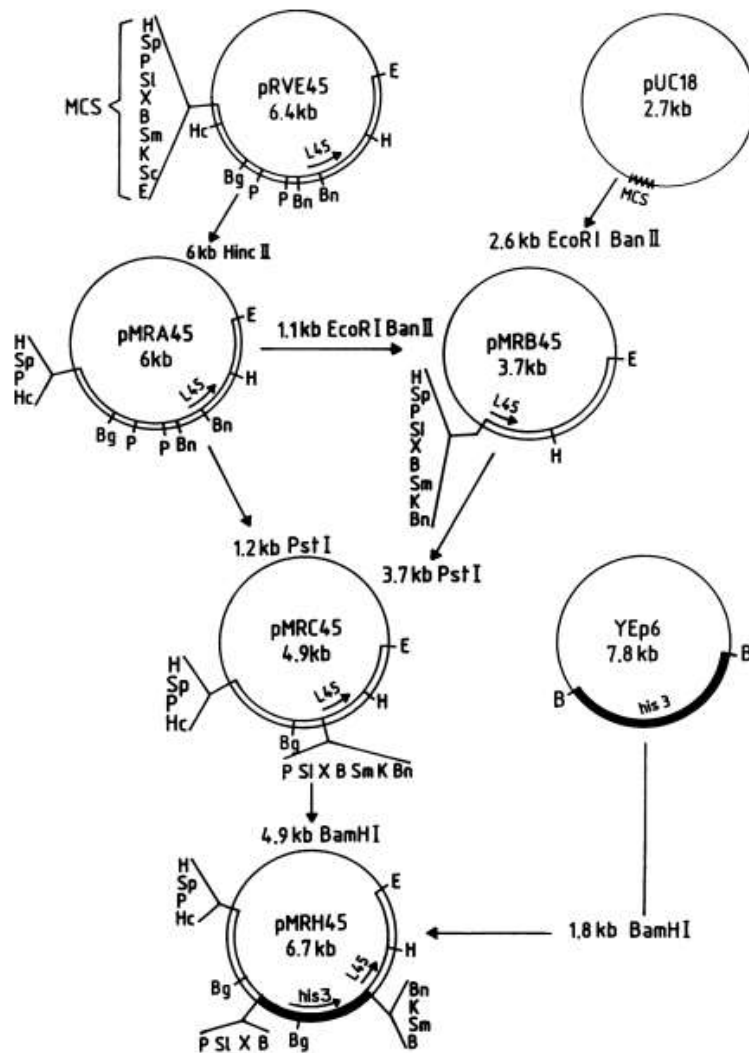
Recientemente usando como modelo de estudio las proteínas ribosomales ácidas de *Pyrococcus horikoshii* se pudo describir que el CTD de aP1 (homólogo de P1A y P1B) podía interactuar con aABCE1 a través de la región NBD1, esto es relevante ya que aABCE1 es un factor compartido entre archeas y eucariontes responsable de la disociación de la partícula 80S durante el reciclamiento de ribosomas. (Imai et al., 2018). La interacción de dicha proteína ribosomal se cree participa en la hidrólisis de ATP necesario para la liberación de las subunidades.

Pelota es un parálogo de (eRF1/aRF1) es el principal factor involucrado en la terminación y rescate de los ribosomas al final del proceso de la traducción

(Franckenberg, Becker, & Beckmann, 2012). Esto se realiza en conjunto con la participación de ABCE1, en archeas se ha observado que ABCE1 podría interactuar indirectamente con el tallo ribosomal a través de aP1 y su asociación con aEF1A. Donde la actividad GTPasa de aEF1A es dependiente de su asociación con el CTD de aP1.(Maruyama et al., 2019). De manera invitro se comprobó que existe estabilidad en el complejo CTD aP1-aEf1A-a-Pelota, lo que refuerza la participación de las RPPs en el proceso de reciclamiento de los ribosomas.

En conjunto, los resultados obtenidos y la evidencia acumulada por otros estudios sugieren un papel similar, pero no por la misma vía de la participación de las RPPs de archeas y eucariontes en el proceso de reciclamiento y rescate de los ribosomas después de la terminación del proceso de traducción.

Anexos:



Plásmido pMRH45. Cuenta con el Gen P2A (anteriormente L45) interrumpido por la secuencia de *his3*. En el fragmento *EcoRI*-*SphI*.

El fragmento de EcoR1-SPh1 de pMRH45 (Remacha et al., 1990) fue utilizado para la disrupción de P2A (anteriormente denominado L45). Tal y como se describe en (Remacha et al., 1990)

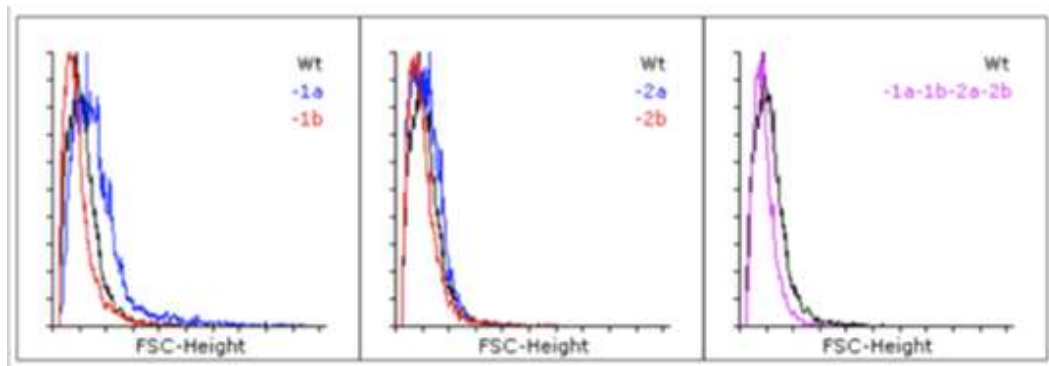


Figura S1. Citometría de flujo de células Wt, mutantes simples y cuádruple mutante crecidas en medio YEPD. Se analizaron 1×10^4 células por cepa por triplicado, y se realizaron tres experimentos biológicos independientes.

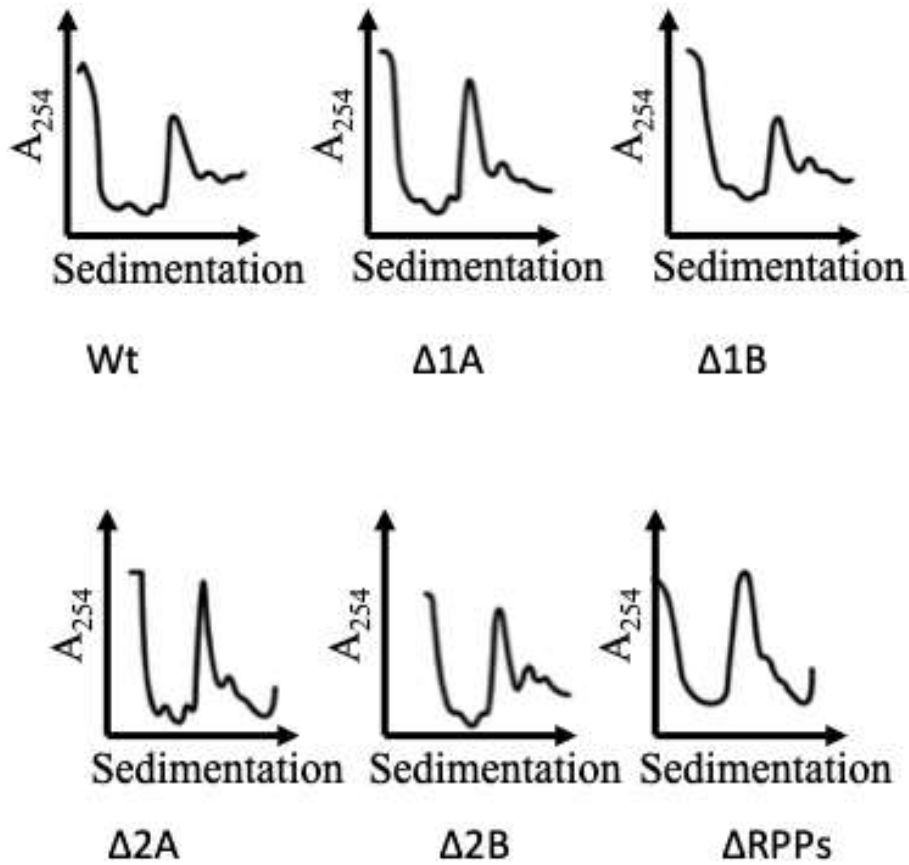


Figura S2. Perfil ribosomal de células Wt, deletantes simples y cuádruple crecidas en medio YEPD. La relación Polisomas/monosoma (PM) fue calculado de cada perfil obteniendo el área bajo la curva de la sección polisomal, entre el área bajo la curva de la sección 80S, se descartó el área de las zonas 40S y 60S. Wt PM 0.88 +/- 0.162, $\Delta 1A$ P/M: 0.90 +/- 0.102, $\Delta 1B$ PM: 0.94 +/- 0.067, $\Delta 2A$ PM: 0.76 +/- 0.158, $\Delta 2B$ P/M 1.2 +/- 0.195, $\Delta RPPs$ 0.556 +/- 0.210. n=3

9 Bibliografía.

- Ashe, M. P., De Long, S. K., & Sachs, A. B. (2000). Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol Biol Cell*, *11*(3), 833-848. doi:10.1091/mbc.11.3.833
- Baba, K., Tumuraya, K., Tanaka, I., Yao, M., & Uchiumi, T. (2013). Molecular dissection of the silkworm ribosomal stalk complex: the role of multiple copies of the stalk proteins. *Nucleic Acids Res*, *41*(6), 3635-3643. doi:10.1093/nar/gkt044
- Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K., & 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.
- Bautista-Santos, A., & Zinker, S. (2014). The P1/P2 protein heterodimers assemble to the ribosomal stalk at the moment when the ribosome is committed to translation but not to the native 60S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, *53*(25), 4105-4112. doi:10.1021/bi500341w
- Boguszewska, A., Tchorzewski, M., Dukowski, P., Winiarczyk, S., & Grankowski, N. (2002). Subcellular distribution of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae* in various environmental conditions. *Biol Cell*, *94*(3), 139-146.
- Bou, G., Remacha, M., & Ballesta, J. P. (2000). Ribosomal stalk protein phosphorylating activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, *375*(1), 83-89. doi:10.1006/abbi.1999.1639
- Cardenas, D., Revuelta-Cervantes, J., Jimenez-Diaz, A., Camargo, H., Remacha, M., & Ballesta, J. P. (2012). P1 and P2 protein heterodimer binding to the P0 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is relatively non-specific and a source of ribosomal heterogeneity. *Nucleic Acids Res*, *40*(10), 4520-4529. doi:10.1093/nar/gks036
- Choi, A. K., Wong, E. C., Lee, K. M., & Wong, K. B. (2015). Structures of eukaryotic ribosomal stalk proteins and its complex with trichosanthin, and their implications in recruiting ribosome-inactivating proteins to the ribosomes. *Toxins (Basel)*, *7*(3), 638-647. doi:10.3390/toxins7030638
- Cliften, P., Sudarsanam, P., Desikan, A., Fulton, L., Fulton, B., Majors, J., . . . Johnston, M. (2003). Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science*, *301*(5629), 71-76. doi:10.1126/science.1084337
- de la Cruz, J., Karbstein, K., & Woolford, J. L., Jr. (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem*, *84*, 93-129. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033917
- Delobel, P., & Tesnière, C. (2014). A simple FCM method to avoid misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle assessment between G0 and sub-G1. *PLoS One*, *9*(1), e84645. doi:10.1371/journal.pone.0084645
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., . . . 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. doi:10.1016/j.cell.2005.04.015

- Elkon, K., Skelly, S., Parnassa, A., Moller, W., Danho, W., Weissbach, H., & 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.
- Fingerman, I., Nagaraj, V., Norris, D., & Vershon, A. K. (2003). Sfp1 plays a key role in yeast ribosome biogenesis. *Eukaryot Cell*, *2*(5), 1061-1068. doi:10.1128/ec.2.5.1061-1068.2003
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *46*(1-2), 24-46.
- Franckenberg, S., Becker, T., & Beckmann, R. (2012). Structural view on recycling of archaeal and eukaryotic ribosomes after canonical termination and ribosome rescue. *Curr Opin Struct Biol*, *22*(6), 786-796. doi:10.1016/j.sbi.2012.08.002
- Goffeau, A., Barrell, B. G., H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, . . . S. G. Oliver Science 274. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(546).
- Gonzalo, P., & Reboud, J. P. (2003). The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell*, *95*(3-4), 179-193. doi:10.1016/s0248-4900(03)00034-0
- Grela, P., Gajda, M. J., Armache, J. P., Beckmann, R., Krokowski, D., Svergun, D. I., . . . Tchorzewski, M. (2012). Solution structure of the natively assembled yeast ribosomal stalk determined by small-angle X-ray scattering. *Biochem J*, *444*(2), 205-209. doi:10.1042/BJ20120115
- Groppo, R., & Richter, J. D. (2009). Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(3), 444-451. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.011
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., . . . Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, *415*(6868), 180-183. doi:10.1038/415180a
- Holtzclaw, F., and Theresa Holtzclaw. (2014). *Translation* (P. Education Ed.).
- Honda, T., Imai, H., Suzuki, T., Miyoshi, T., Ito, K., & Uchiumi, T. (2017). Binding of translation elongation factors to individual copies of the archaeal ribosomal stalk protein aP1 assembled onto aP0. *Biochem Biophys Res Commun*, *483*(1), 153-158. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.175
- Iadevaia, V., Calderola, S., Tino, E., Amaldi, F., & Loreni, F. (2008). All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs. *RNA*, *14*(9), 1730-1736. doi:10.1261/rna.1037108
- Imai, H., Abe, T., Miyoshi, T., Nishikawa, S. I., Ito, K., & Uchiumi, T. (2018). The ribosomal stalk protein is crucial for the action of the conserved ATPase ABCE1. *Nucleic Acids Res*, *46*(15), 7820-7830. doi:10.1093/nar/gky619
- Imai, H., Miyoshi, T., Murakami, R., Ito, K., Ishino, Y., & Uchiumi, T. (2015). Functional role of the C-terminal tail of the archaeal ribosomal stalk in recruitment of two elongation factors to the sarcin/ricin loop of 23S rRNA. *Genes Cells*. doi:10.1111/gtc.12256
- Jimenez-Diaz, A., Remacha, M., Ballesta, J. P., & Berlanga, J. J. (2013). Phosphorylation of initiation factor eIF2 in response to stress conditions is mediated by acidic ribosomal

- P1/P2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8(12), e84219. doi:10.1371/journal.pone.0084219
- Jose, M. P., Santana-Roman, H., Remacha, M., Ballesta, J. P., & Zinker, S. (1995). Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain. *Biochemistry*, 34(24), 7941-7948.
- Ju, Q., & Warner, J. R. (1994). Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(2), 151-157. doi:10.1002/yea.320100203
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., & Lander, E. S. (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, 423(6937), 241-254. doi:10.1038/nature01644
- Krokowski, D., Boguszewska, A., Abramczyk, D., Liljas, A., Tchorzewski, M., & Grankowski, N. (2006). Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol*, 60(2), 386-400. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05117.x
- Kudlicki, W., Grankowski, N., & Gasior, E. (1976). Ribosomal protein as substrate for a GTP-dependent protein kinase from yeast. *Mol Biol Rep*, 3(2), 121-129.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D., & Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res*, 30(24), 5382-5390. doi:10.1093/nar/gkf693
- Mandava, C. S., Peisker, K., Ederth, J., Kumar, R., Ge, X., Szaflarski, W., & Sanyal, S. (2012). Bacterial ribosome requires multiple L12 dimers for efficient initiation and elongation of protein synthesis involving IF2 and EF-G. *Nucleic Acids Res*, 40(5), 2054-2064. doi:10.1093/nar/gkr1031
- Mark Chan, S. T. (2021). The living bioreactor. Retrieved from https://cellgeometry.ucsf.edu/sites/cellgeometry.ucsf.edu/files/STC_Project_4_FIN_AL.pdf
- Maruyama, K., Imai, H., Kawamura, M., Ishino, S., Ishino, Y., Ito, K., & Uchiumi, T. (2019). Switch of the interactions between the ribosomal stalk and EF1A in the GTP- and GDP-bound conformations. *Sci Rep*, 9(1), 14761. doi:10.1038/s41598-019-51266-x
- Mathews, M. B., N. , Sonenberg, a. J. W. B. H., & In: N. Sonenberg, J. W. B. H., and M.B. Mathews. (2000). Origins and Principles of Translational Control, In: Translational Control of Gene Expression. *CSHL Press, Cold*

Spring Harbor.

- McCarthy, J. E. (1998). Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), 1492-1553.
- Murakami, R., Singh, C. R., Morris, J., Tang, L., Harmon, I., Takasu, A., . . . Uchiumi, T. (2018). The Interaction between the Ribosomal Stalk Proteins and Translation Initiation Factor 5B Promotes Translation Initiation. *Mol Cell Biol*, 38(16). doi:10.1128/mcb.00067-18
- Naganuma, T., Nomura, N., Yao, M., Mochizuki, M., Uchiumi, T., & Tanaka, I. (2010). Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes. *J Biol Chem*, 285(7), 4747-4756. doi:10.1074/jbc.M109.068098

- Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., . . . Uchiumi, T. (2012). Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(10), 3748-3753. doi:10.1073/pnas.1112934109
- Nomura, T., Nakatsuchi, M., Sugita, D., Nomura, M., Kaminishi, T., Takemoto, C., . . . 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*, *144*(5), 665-673. doi:10.1093/jb/mvn113
- Nusspaumer, G., Remacha, M., & 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. doi:10.1093/emboj/19.22.6075
- Pain, V. M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem*, *236*(3), 747-771. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00747.x
- Pilecki, M., Grankowski, N., Jacobs, J., & Gasiór, E. (1992). Specific protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae* cells phosphorylating 60S ribosomal proteins. *Eur J Biochem*, *206*(1), 259-267.
- Pisarev, A. V., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*, *131*(2), 286-299. doi:10.1016/j.cell.2007.08.041
- Qiu, D., Parada, P., Marcos, A. G., Cardenas, D., Remacha, M., & 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. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05445.x
- Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Bermejo, B., Rodriguez-Gabriel, M. A., Guarinos, E., & 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.
- Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodriguez Gabriel, M. A., . . . 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.
- Remacha, M., Saenz-Robles, M. T., Vilella, M. D., & 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.
- Remacha, M., Santos, C., & Ballesta, J. P. (1990). Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *10*(5), 2182-2190.
- Remacha, M., Santos, C., Bermejo, B., Naranda, T., & 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.
- Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*, *101*, 202-211.
- Rothstein, R. J., Esposito, R. E., & Esposito, M. S. (1977). The effect of ochre suppression on meiosis and ascospore formation in *Saccharomyces*. *Genetics*, *85*(1), 35-54.

- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, *18*(1), 529. doi:10.1186/s12859-017-1934-z
- Saenz-Robles, M. T., Remacha, M., Vilella, M. D., Zinker, S., & Ballesta, J. P. (1990). The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys Acta*, *1050*(1-3), 51-55.
- Santos, C., & 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.
- Santos, C., & 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.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, *350*(3), 3-41.
- Shimizu, T., Nakagaki, M., Nishi, Y., Kobayashi, Y., Hachimori, A., & 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.
- Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., . . . Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J*, *23*(5), 1008-1019. doi:10.1038/sj.emboj.7600102
- Tanzawa, T., Kato, K., Girodat, D., Ose, T., Kumakura, Y., Wieden, H. J., . . . Yao, M. (2018). The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion. *Nucleic Acids Res*, *46*(6), 3232-3244. doi:10.1093/nar/gky115
- Tchorzewski, M. (2002). The acidic ribosomal P proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, *34*(8), 911-915.
- Tchorzewski, M., Krokowski, D., Rzeski, W., Issinger, O. G., & 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.
- Tsurugi, K., & Ogata, K. (1985). Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. *J Biochem*, *98*(6), 1427-1431.
- Turner, J. J., Ewald, J. C., & Skotheim, J. M. (2012). Cell size control in yeast. *Curr Biol*, *22*(9), R350-359. doi:10.1016/j.cub.2012.02.041
- van Agthoven, A., Kriek, J., Amons, R., & 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.
- Wang, Y. J., Vaidyanathan, P. P., Rojas-Duran, M. F., Udeshi, N. D., Bartoli, K. M., Carr, S. A., & Gilbert, W. V. (2018). Lso2 is a conserved ribosome-bound protein required for translational recovery in yeast. *PLoS Biol*, *16*(9), e2005903. doi:10.1371/journal.pbio.2005903
- Warner, J. R. (1971). The assembly of ribosomes in yeast. *J Biol Chem*, *246*(2), 447-454.

- Wawioroka, L., Molestak, E., Szajwaj, M., Michalec-Wawioroka, B., Molon, M., Borkiewicz, L., . . . Tchorzewski, M. (2017). Multiplication of Ribosomal P-Stalk Proteins Contributes to the Fidelity of Translation. *Mol Cell Biol*, 37(17). doi:10.1128/MCB.00060-17
- Wilson, D. N., & Doudna Cate, J. H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5). doi:10.1101/cshperspect.a011536
- Wool, I. G., Chan, Y. L., Gluck, A., & 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.
- Yan, G., & Yan, X. (2015). Ribosomal proteomics: Strategies, approaches, and perspectives. *Biochimie*, 113, 69-77. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.024
- Yan, X., Hoek, T. A., Vale, R. D., & Tanenbaum, M. E. (2016). Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell*, 165(4), 976-989. doi:10.1016/j.cell.2016.04.034
- Zanelli, C. F., Maragno, A. L., Gregio, A. P., Komili, S., Pandolfi, J. R., Mestriner, C. A., . . . Valentini, S. R. (2006). eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 348(4), 1358-1366. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.195
- Zinker, S. (1980). P5/P5' the acidic ribosomal phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 606(1), 76-82.
- Zinker, S., & Warner, J. R. (1976). The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J Biol Chem*, 251(6), 1799-1807.